# UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE



# THÈSE DE DOCTORAT DE

### L'UNIVERSITE DE NANTES Comue Université Bretagne Loire

ÉCOLE DOCTORALE N° 605 *Biologie Santé* Spécialité : Technologies Biomédicales, Vectorisation, Nanomédecine, Thérapie Cellulaire et Génique, Médecine Régénératrice et Biomatériaux

### Par Pierre TOURNIER

## Caractérisation et amélioration des propriétés ostéogéniques d'un nouveau substitut osseux allogénique

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18 décembre 2019 Unité de recherche : INSERM U1229 « Regenerative Medicine and Skeleton » Thèse N° :

### Rapporteurs avant soutenance :

Jean-Christophe Fricair	Professeur de Laboratory for	s Universités – Praticien Hospitalier, INSERM U1026, The r the Bioengineering of Tissues
Florence Apparailly	Directeur de re Medicine & Bi	echerche, INSERM U1183 Institute for Regenerative otherapy (IRMB)
Composition du Jur	у:	
Examinateur : Delphine	Logeart-Avramoglou	Chargé de recherche, UMR CNRS 7052 INSERM U1271
Directeur de thèse : Pie	rre Weiss	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, INSERM U1229
Co-directeur de thèse :	Jérôme Guicheux	Directeur de recherche, INSERM U1229
Co-encadrant de thèse	Alexis Gaudin	Maitre de conférences des universités – Praticien Hospitalier, INSERM U1229
Membres invités : Valérie Geoffroy	Directeur de recherch	ne, INSERM U1229
Georges Khoury	Chirurgien-dentiste, e	exercice privé
Raphaël Bardonnet	Directeur des opératio	ons, BIOBank SAS

À mon père,

« Le savant ce n'est pas celui qui sait, c'est celui qui sait chercher » Michel Tournier 1952-2016

À ceux sans qui je n'aurais et ne serais rien, ma mère, ma sœur, Philippe, mes amis de la Drôme.

### Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Pierre Weiss et M. Jérôme Guicheux mes directeurs de thèse, ainsi que M. Raphaël Bardonnet pour avoir bien voulu croire en moi et me confier ce projet passionnant.

Je remercie mon encadrant de thèse, M. Alexis Gaudin pour avoir accepté de participer à ce travail et pour tout ce qu'il m'a apporté pendant nos deux années ensemble, pour son immense implication dans le papier et le manuscrit de ma thèse, ainsi que pour avoir fait le travail ingrat des premières relectures.

Je remercie aussi Mme Valérie Geoffroy qui a participé tout autant que mes directeurs et encadrants à la réalisation de ce travail.

J'aimerais remercier tout particulièrement Mme Florence Apparailly et M. Jean-Christophe Fricain de bien avoir voulu juger ce travail. J'ose espérer que ce manuscrit trouvera un intérêt à vos yeux, et que sa lecture vous sera agréable.

Pour finir, je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi individuel de thèse, M. Emmanuel Pauthe et M. Hervé Petite, pour avoir accepté de suivre l'évolution de ce travail, ainsi que d'avoir été extrêmement critique à son égard, et bienveillant au mien. Imaginez une journée dans un désert.

Un désert sans rien à perte de vue. Voici une idée de comparaison avec une thèse. Dans ce désert il faut avancer. On avance pour aller quelque part. Mais où ? Dans certains déserts il y a des rails et c'est facile, dans d'autres il y a des dunes que l'on doit franchir pour avancer, mais attention à la descente de ne pas finir la tête dans le sable.

Mon désert était plat. Je pouvais aller où je voulais, mince mais vers où? Cela fait partie du jeu. J'aime bien ce jeu.

Il faut aller quelque part mais il faut aussi construire quelque chose là-bas. Le trajet est épuisant, et c'est pour y arriver et construire quelque chose qui tient debout (ou presque) que les directeurs et encadrants jouent leur rôle. Les miens étaient là quand j'avais besoin mais j'ai préféré me tromper de chemin plusieurs fois plutôt que de leur demander la route, sinon ce n'est pas drôle.

Quand tu as erré longtemps dans le désert et que tu t'es perdu, tu tombes d'épuisement, ta vision se distord et les hallucinations commencent. Mais d'un coup, une force te redresse, tu as une idée en tête, une direction à suivre en étant persuadé que c'est la bonne. Tes pas sont sûrs et décidés. Voilà l'effet qu'a Pierre.

Jérôme te laisse crever dans le désert. C'est même le vautour qui vient se nourrir de ton cadavre. En revanche, si tu as survécu et que tu commences à construire quelque chose, c'est le forgeron qui te donne l'acier nécessaire à ce que ta construction soit solide. Mieux, il t'apprend à fabriquer et à le battre cet acier. Il va aussi te taper dessus avec son marteau pour que ton esprit durcisse, et soit tu durcis soit tu finis en bouillie. Mais au moins tu sais utiliser un marteau.

Alexis c'est le gars qui sait toujours quoi faire, qui remarque que tu as mal vissé quelque chose, et qui a toujours le boulon qui te manque dans sa poche. Il va aussi nettoyer la poussière de l'édifice pour qu'il brille. Et c'est le futur maire de la ville. Combien de fois ais-je entendu : « Ce qu'il me manque c'est un Alexis dans ma thèse ».

Puis quand tu es en manque d'inspiration, que tu as besoin de nourrir ton esprit ou que tu t'es mis un coup de marteau sur le doigt, tu vas voir Valérie. Je pense qu'elle tiendrait une sorte d'épicerie, tu vas la voir quand tu as besoin de quelque chose, et elle a toujours un truc qui te sera utile.

Voilà, la structure ressemble finalement à quelque chose. Bon elle s'est écroulée plusieurs fois et elle tangue un peu mais elle tient debout et je trouve que cela ressemble à quelque chose.

Cela dit quand on y réfléchit, la structure ne sert à rien. L'important de cette journée c'est qu'on ait appris à se frayer un chemin dans le désert, à battre l'acier, à construire un édifice et le rendre plaisant à regarder. Si en plus il sert à quelque chose c'est du bonus. On peut aussi avoir appris à d'autres à construire un château de sable, ou bien à choisir la bonne planche pour leur propre construction, et ça c'est intéressant.

Je changerais sûrement de planches, de boulons, d'endroit où construire, de forme, de taille, de couleur. Je changerais tout si c'était à refaire.

Mais surtout pas mes encadrants.

Très honnêtement j'ai passé une super journée.

Je veux d'abord remercier ma famille, mes grands-parents, oncles, tantes, cousins et cousines que j'adore toutes et tous du fond du cœur. Un grand merci à mes amis de la Drôme et de Grenoble qui ont énormément contribué à mon développement, qui m'ont tiré vers le haut et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Un remerciement tout particulier à Philippe mon beaupère, de qui mon humour s'est imprégné pour le bonheur de certains et le malheur des autres.

Des remerciements tout particuliers à toi Giulia pour tous les bons moments passés ensemble, je n'ai malheureusement pas su m'y prendre et je le regrette. De sincères excuses pour les moments difficiles que nous avons traversés et subis.

Je tiens à remercier mes ainées qui m'ont précédé dans cet exercice particulier, Nina, Nina, Maude et Elodie, qui ont été une grande source d'inspiration et qui m'ont transmis énormément. J'espère avoir fait de mon mieux pour essayer de transmettre à mon tour aux nouveaux étudiants que j'espère avoir pu aider au moins à moitié de ce que l'on m'a aidé.

Merci à toi Leslie dont j'ai la sensation de m'être beaucoup rapproché au cours de ces trois ans. Tu m'as tenu la main quand c'était compliqué, et j'ai essayé de faire la même chose pour toi. C'est vrai que l'on ne vit pas tous cela de la même façon mais ton support m'a été important et j'espère avoir été un peu là pour toi.

Je veux te remercier Hilel pour ta joie, ta positivité et ta bonne humeur, avec qui aussi j'ai échangé quand cela n'allait pas. J'ai aussi passé de très bons moments en congrès, surtout ne change pas. J'espère t'avoir transmis des choses qui te seront utiles.

Un grand merci à Cyril avec qui je forme une belle paire. Nos personnalités parfois insupportables ensembles s'accordent à la perfection pour le plus grand malheur des autres. J'avoue ne plus beaucoup jouer au tennis avec toi depuis que tu me bats une fois sur deux. Bravo pour ton vin, je l'apprécie de plus en plus. Amitiés sincères. Merci à Fabien avec qui je suis arrivé en même temps au laboratoire, qui est un exemple de dévotion à ses tâches et qui arrive à faire trois fois plus que tout le monde dans deux fois moins de temps.

Un remerciement tendre et tout particulier à Chichi qui a été la première personne avec qui j'ai échangé au laboratoire, et avec qui j'ai tout de suite accroché. Un grand merci du fond du cœur à toi, dont je me suis senti très proche, qui m'a beaucoup aidé dans les moments un peu difficiles et à qui j'ai toujours pu parler. Tu m'auras beaucoup manqué dans cette dernière année.

Merci à Anne, Laurent, Guy et Pierre C, ces chercheurs que je trouve admirables et que j'ai le plaisir de côtoyer, dont la passion est une inspiration et une fascination au quotidien. Merci à Angélique, Marianne, Cécile et Vianney que je trouve brillants et droits, et avec qui chaque échange est toujours un plaisir enrichissant.

Un grand merci aux personnes qui m'ont aidés au jour le jour dans ce travail, Boris, Joëlle, Julie et tout le plateau d'histo, Sophie en biomol, et le pôle gestion pour leur gros support, Mélanie, Fabienne, Sophie et Carole (merci beaucoup Carole !!).

Un remerciement chaleureux aux membres du bureau CIFR'Os qui n'a jamais vu le jour, Cyril, Kilian et Aymeric, on s'est bien amusés !

Merci à Pierre G, Vianney, Laurent, Cyril et Florent pour les bons moments au squash, dommage que Jérôme ait encore trop la trouille pour nous jouer.

Merci beaucoup au bureau 134 pour m'avoir acceuilli les bras ouverts dans la dernière ligne droite un peu difficile, pour les excellents moments en si peu de temps et tous les suivants je l'espère.

Merci à tous les membres du bureau 111, Fabien, Mélina, Nicolas, Giulia, Benoît, Anaïs, Solène et du bureau des « pétasses » Brian, Lily, Nina, Cécile, Claire et Leslie pour la super ambiance et quelques discussions enflammées ! Sans oublier mes M2, Aymeric et Karolina que j'ai eu plaisir à encadrer.

Un remerciement spécial à Claire V qui m'a appris que tous les combats ne valent pas la peine d'être menés...

Merci à mes anciens maitres de stages en L3, M1 et M2, Fayçal, Jean et Sébastien, et Tuan pour m'avoir poussé à faire une thèse et continuer dans la recherche.

### **Avant-propos**

Cette thèse a été réalisée en collaboration entre la société BIOBank et le laboratoire INSERM U1229, RMeS « Regenerative Medicine and Skeleton », et subventionnée par le dispositif CIFRE « Convention Industrielle de Formation par la Recherche » (n°2016/1192), et codirigée par Pierre Weiss, Jérôme Guicheux et Alexis Gaudin au sein du laboratoire RMeS.

La société BIOBank est une banque de tissus française autorisée à recueillir, conserver, préparer et distribuer des greffons osseux d'origine humaine pour des greffes chez l'homme que ce soit en chirurgie orthopédique, rachidienne, maxillo-faciale ou dentaire. BIOBank s'associe avec plusieurs laboratoires académiques afin de développer de nouveaux greffons osseux au bénéfice de la performance clinique.

Le laboratoire RMeS est quant à lui spécialisé dans la recherche fondamentale, translationnelle et clinique de la médecine 4R (Remplacer, Réparer, Régénérer et Reprogrammer) en lien avec les tissus squelettiques (os, cartilage, dent). Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe REGOS « regenerative medicine of bone tissues » et plus particulièrement dans le groupe « hybrid biomaterials for bone scaffold ».





### Liste des publications

### Publication principale sur le travail de thèse

• A partially demineralized allogeneic bone substitute: in vitro osteogenic potential and preclinical evaluation in two different intramembranous bone healing models

Pierre Tournier, Jérôme Guicheux, Arnaud Paré, Aymeric Maltezeanu, Thibaut Blondy, Joëlle Veziers, Caroline Vignes, Manon André, Julie Lesoeur, Ana Barbeito, Raphaël Bardonnet, Christophe Blanquart, Pierre Corre, Valérie Geoffroy\*, Pierre Weiss\*, Alexis Gaudin\*

\*Co-last authors Soumis dans "Biomaterials"

### **Publications annexes**

• Tailored 3D-printed triply periodic calcium phosphate implants: a preclinical study for craniofacial bone repair

A.Paré\*, B.Charbonnier\*, P.Tournier, C.Vignes, J.Veziers, J.Lesoeur, H.Bertin, G.De Pinieux, G.Cherrier, J.Guicheux, O.Gauthier, P.Corre, D.Marchat, P.Weiss \*Co-first authors

### En révision mineure dans "ACS Biomaterials Science & Engineering"

• Axially vascularized custom-made macroporous bioceramic for the reconstruction of segmental mandibular defect: a preclinical study in sheep

A.Paré\*, B.Charbonnier\*, P.Tournier, C.Vignes, J.Veziers, J.Lesoeur, H.Bertin, G.De Pinieux, G.Cherrier, J.Guicheux, P.Corre, D.Marchat, P.Weiss, A.Saucet, A.Bossart, O.Gauthier

\*Co-first authors

Soumis dans "Plastic Reconstructive Surgery journal"

### Liste des communications

### **Communications orales**

P. Tournier et al.

"A novel injectable bone allogenic substitute for maxillo-facial skeleton regenerative medicine"

Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM) 2018, Monaco, Monaco

European Orthopaedic Research Society (EORS) 2018, Galway, Irlande

**Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – Europe** (**TERMIS**) 2019, Rhodes, Grèce

Biomat – Materials for Health Congress 2019, La Grande Motte, France

### **Communications affichées**

P. Tournier et al.

"A novel injectable bone allogenic substitute for cranio-facial skeletal regenerative medicine"

Bioregate – European Regenerative Medicine Forum 2018, Nantes, France

**Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – World (TERMIS) 2018**, Kyoto, Japan

### Activités d'encadrement

### Aymeric MALTEZEANU Janvier-Juillet 2017; Stage Master 2 Recherche

Biominéralisation, Morphogenèse et Pathologies Inflammatoires (BMPI), Université Paris Diderot - Université Paris Descartes - Université Paris 13.

« Reconstruction de défauts osseux maxillo-faciaux : intérêt d'un transporteur d'oxygène en ingénierie tissulaire osseuse. »

### Karolina FRANKOVA Février-Août 2018; Stage Master 2 Recherche

Sciences du Médicament, parcours Biomatériaux et Dispositifs Médiaux, Université de Nantes.

« Étude de la cytotoxicité d'un nouvel hydrogel photoréticulable composé de copolymère tribloc de poly(oxyde d'éthylène) (tPEO). »

### Liste des abréviations

**µ-CT**: *microtomographie assistée par ordinateur* **ADN**: acide désoxyribonucléique **ALP**: alkaline phosphatase ANSM: agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé **Arg-1**: arginase 1 **ARNm**: acide ribonucléique messager **BCP**: *biphasic calcium phosphate* **BGLAP**: bone gamma-carboxyglutamate protein **BMP**: bone morphogenetic protein **BSP**: bone sialoprotein **CCK-8**: cell counting kit 8 **CCL**: *C*-*C* motif ligand **CD**: cluster of differentiation **CM**: *milieu de culture* **CO<sub>2</sub>-SC**: *dioxyde de carbone supercritique* **CSF-1**: colony stimulating factor 1 **CSF-R1**: *colony stimulating factor 1 receptor* **CXCL**: *C*-*X*-*C* motif ligant **DMEM**: Dulbecco's modified eagle medium ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay **ESB**: *encéphalopathie spongiforme bovine* **F12**: *Ham's F-12 nutrient mixture* **FACS**: *fluorescence-activated cell sorting* FAK: focal adhesion kinase

FGF: fibroblast growth factor

**GM-CSF**: granulocyte macrophage-colony stimulating factor

**GMP**: good manufacturing practice

**hBM-MSC**: human bone marrow – mesenchymal stromal cells

HMPC-Si: hydroxypropylméthylcellulose silanisé

**IGF**: *insulin growth factor* 

**IL**: *interleukin* 

**INF**: *interferon* 

**iNOS**: *inducible nitric oxide synhtase* 

**IRF5**: *interferon regulatory factor 5* 

JAK: Janus kinase

**LDH**: *lactate dehydrogenase* 

LPS: lipopolysaccharide

MAFIA: macrophage fas-induced apoptosis

M-CSF: macrophage-colony stimulating factor

MEB: microscopie électronique à balayage

MET: microscopie électronique à transmission

MHC: major histocompatibility complex

MOT: moelle osseuse totale de rat

MSC: mesenchymal stromal cells

**MS-TOF**: mass spectrometry – time of flight

MV/TV: mineral volume / tissue volume

MV: volume mineral

**NF- κB**: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

nHA: nano-hydroxyapatite

**NO**: *nitric oxide* **OCN**: *osteocalcin* **OM**: *milieu ostéogénique* **OPG**: osteoprotegerin **OPN**: osteopontin **PDGF**: *platelet-derived growth factor* **Pi**: *phosphate inorganique* PM: milieu de prolifération **PPD**: poudre partiellement déminéralisée **PPi**: *pyrophosphate inorganique* **PS**: *pénicilline-streptomycine* **PTFE**: *polytétrafluoroéthylène* **RANK**: receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ **RANKL**: receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  ligand **RGD**: *arginine-glycine-aspartate* (*Arg-Gly-Asp*) **RGE**: risque géogrpahique d'ESB **rhBMP**: recombinant human bone morphogenetic protein **ROG**: régénération osseuse guidée **ROS**: radical oxygen species **RUNX2**: runt-related transcription factor 2 **SP7**: *transcription factor Sp7* **SPP1**: secreted phosphoprotein 1 STAT: signal transducer and activator of transcription SVF: sérum de veau fœtal TAM: tumor associated macrophages

TGF: transforming growth factor THA: tissus ou organes d'origine humaine ou animale TNF: tumor necrosis factor TRAP: tartrate resistant acidic phosphatase TV: volume de tissu

**VEGF**: vascular endothelial growth factor

### Table des matières

Partie 1 – Introduction et objectifs de la thèse	1
Introduction	2
Chapitre I. Fonctions, structure et composition du squelette	3
I.1. L'origine du squelette	4
I.2. Les fonctions du squelette	4
I.3. Classification des pièces osseuses	5
I.4. Organisation du tissu osseux	7
I.4.a. L'os compact	7
I.4.b. L'os trabéculaire	
I.4.c. Les membranes osseuses	
I.4.c.1. Le périoste	
I.4.c.2. L'endoste	
I.5. Composition du tissu osseux	11
I.5.a. Les composants cellulaires	11
I.5.a.1. Les cellules bordantes	11
I.5.a.2. Les ostéoblastes	11
I.5.a.3. Les ostéocytes	
I.5.a.4. Les ostéoclastes	13
I.5.b. Composants extracellulaires de la matrice osseuse	14
I.5.b.1. La phase minérale	14
I.5.b.2. La phase organique	15
Chapitre II. Les événements de la régénération osseuse	17
II.1. Les différentes étapes de la régénération osseuse	

	II.1.a. La phase inflammatoire	. 19
	II.1.b. La formation cartilagineuse	. 19
	II.1.c. L'ossification de la zone cartilagineuse	20
	II.1.d. Le remodelage osseux	21
	II.2. Description et classification des monocytes et macrophages	22
	II.2.a. Les monocytes	22
	II.2.b. Origine et classification des macrophages	22
	II.2.b.1. Les macrophages « M-1 »	24
	II.2.b.2. Les macrophages « M-2 »	25
	II.3. Le rôle des macrophages M1 et M2 dans la régénération du tissu osseux	26
	II.4. Le dialogue macrophages-MSCs	28
(	Chapitre III. Atteintes squelettiques, biomatériaux et greffes osseuses	31
	III.1. Les atteintes osseuses	32
	III.1.a. Les cancers osseux	32
	III.1.b. Les malformations osseuses congénitales	. 33
	III.1.c. Les traumatismes osseux accidentels	. 34
	III.1.d. Les traumatismes balistiques	34
	III.1.e. Les pertes osseuses en chirurgie dentaire	. 35
	III.2. Les greffes osseuses autologues	36
	III.3. Les substituts de greffes osseuses	39
	III.3.a. Définitions des biomatériaux et substituts osseux	39
	III.3.b. Les différents types de substituts osseux	40
	III.3.b.1. Les substituts osseux synthétiques	41
	III 2 h 2 L as groffons assour vénogéniques	11
	III.5.0.2. Les grenous osseux xenogeniques	44

III.4. Délipidation et fluides supercritiques	50
III.4.a. Les fluides supercritiques	51
III.4.b. Le dioxyde de carbone supercritique	52
III.5. Les greffons osseux BIOBank	54
Objectifs de la thèse	56
Partie 2 – Résultats expérimentaux	59
Chapitre I. Caratérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse	60
Rationnel de l'étude	61
Article expérimental	67
Discussions sur l'étude	67
Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse	76
Rationnel de l'étude	77
Matériel et méthodes	80
Résultats expérimentaux	81
Discussions sur l'étude	95
Conclusions et perspectives	99
Références bibliographiques	102
Annexes	119

# Figures et tableaux

Figure 1 : Classification à cinq catégories des pièces osseuses du squelette humain	6
Figure 2 : Organisation des tissus osseux	9
Figure 3 : Observation histologique de tissu osseux	13
Figure 4 : Observation d'un ostéocyte et d'un ostéoclaste	14
Figure 5 : Organisation submicronique de la matrice osseuse	15
Figure 6 : Les grandes étapes de la régénération osseuse endochondrale	19
Figure 7 : Activation ostéoclastique et résorption osseuse.	21
Figure 8 : Classification et signaux d'activation des macrophages et sous-catégories	24
Figure 9 : Classification élargie des macrophages.	26
Figure 10 : Activations, sécrétions et rôles des macrophages dans le tissu osseux	28
Figure 11 : Effets pro- et anti-inflammatoire des MSC sur les macrophages	29
Figure 12 : Illustration de traumatismes osseux balistiques des membres	35
Figure 13 : Prélèvement osseux autologue sur la crête iliaque.	37
Figure 14 : Exemple de formes et présentation de substituts osseux	40
Figure 15 : Libération de principes actifs en réponse à l'environnement.	44
Figure 16 : Répartition géographique des banques de tissus en France	47
Figure 17 : Diagramme pression-température du dioxyde de carbone	53
Figure 18 : Procédé de délipidation des têtes fémorales au CO <sub>2</sub> -SC.	54
Figure 19 : Étapes de nettoyage des têtes fémorales	55
Figure 20 : Exemples de greffons osseux allogéniques BIOBank	55
Figure 21 : Aspect de la poudre et de la pâte d'os	63
Figure 22 : Description du mode opératoire des modèles animaux utilisées	65
Figure 23 : Représentation de la préparation d'échantillons protéiques.	69
Figure 24 : Principe du dosage de protéines en multiplex	71

Figure 25 : Dosage de cytokines sécrétées par les macrophages72
Figure 26 : Analyse histologique et quantification au $\mu$ -CT de la repousse osseuse dans des
défauts critiques de calvaria 7 semaines après chirurgies74
Figure 27 : Observation en microscopie électronique à balayage des nHA
Figure 28 : Observation des nHA en solution
Figure 29 : Observation de cellules STRO-1 <sup>+</sup> en présence de nHA
Figure 30 : Viabilité des cellules STRO-1 <sup>+</sup> en présence de nHA
Figure 31 : Observation des cellules STRO-1 <sup>+</sup> en absence ou en présence de facteurs
ostéogéniques
Figure 32 : Coloration au rouge alizarine des dépôts de calcium dans la matrice extracellulaire
des cellules STRO-1 <sup>+</sup>
Figure 33 : Dosage de l'activité de l'ALP des cellules STRO-1 <sup>+</sup> 85
Figure 34 : Phénotype des monocytes après 3 jours de culture en présence de nHA
Figure 35 : Phénotype des monocytes après 3 jours de culture en présence de la pâte d'os et de
la pâte associée aux nHA
Figure 36 : Reconstruction des acquisitions au µ-CT des défauts de clavaria, 3 et 7 semaines
après l'implantation
Figure 37 : Quantification de la repousse osseuse dans les défauts critiques de clavaria, 3 et 7
semaines après l'implantation91
Figure 38 : Reconstruction des acquisitions au µ-CT des défauts de clavaria à l'implantation
puis après 3 et 7 semaines de régénération
Figure 39 : Quantification de la repousse osseuse dans les défauts critiques de clavaria à 0
(implantation), 3 et 7 semaines après l'implantation94
Figure 40 : Repousse osseuse dans des défauts critiques de clavaria de rat

Table 1 : Avantages et inconvénients de quelques sites de prélèvement d'autogreffe.    38
Table 2 : Exemples de substituts osseux naturels, synthétiques et composites
Table 3 : Les différentes banques de tissus en France. 47
Table 4 : Activité de traitement des têtes fémorales en France depuis 2017.    47
Table 5 : Températures et pressions critiques de quelques fluides courants
Table 6 : Exemples de quelques sustituts osseux injectables ou malléables naturels à base de
matrice osseuse déminéralisée
Table 7 : Description des peptides retrouvés dans la fraction de gélatine de la pâte d'os en
spectrométrie de masse70

### Annexes

- Avis des comités d'éthique en expérimentation animale

<u>Projet n°1</u> : Étude de l'association de différents adjuvants aux biomatériaux dans la réparation osseuse : application aux pertes de substances de clavaria.

Dossier n° : 2016111513349765 / APAFIS 8560

<u>Projet n°2</u>: Étude II de l'association de différents adjuvants aux biomatériaux phosphocalciques dans la réparation osseuse : application aux pertes de substances de clavaria.

Dossier n° : 2018202015215582 / APAFIS 15410

<u>Projet n°3</u> : Étude III de l'association de différents adjuvants aux biomatériaux phosphocalciques dans la réparation osseuse : application aux pertes de substances de clavaria.

Dossier n° : 2019012313017323 / APAFIS 18616

- Attestation de formations doctorales
- Attestation de suivi et d'évaluation des acquis de la formation à l'expérimentation animale ; Niveau Concepteur – « Rongeurs, Lapins ».
- Attestation de participation « Formation réglementaire de base en chirurgie chez le rongeur de laboratoire »
- Publication annexe n°1 : *Tailored 3D-printed triply periodic calcium phosphate implants: a preclinical study for craniofacial bone repair.*
- Publication annexe n°2 : Axially vascularized custom-made macroporous bioceramic for the reconstruction of segmental mandibular defect: a preclinical study in sheep.

Partie 1 – Introduction et objectifs de la thèse

# Partie 1 – Introduction et objectifs de la thèse

Partie 1 – Introduction

Introduction

Partie 1 – Chapitre I. Fonctions, structure et composition du squelette

# Chapitre I. Fonctions, structure et composition du

squelette

### I.1. L'origine du squelette

L'explosion cambrienne (environ 545 et 505 millions d'années avant notre ère) a exponentiellement diversifié les espèces marines capables de biominéralisation (d'abord grâce au carbonate de calcium), favorisant à la fois la prédation (dents) et la protection contre les prédateurs (épines minéralisées, carapaces, coquilles)[1-4]. Malgré cela, les animaux marins dotés d'un exosquelette minéral sont limités en taille. Par la suite, la dislocation du squelette minéralisé vers l'intérieur du corps des animaux s'est imposée comme un avantage évolutif important en terme de locomotion, tant pour l'exploration de nouvelles zones habitables que pour la fuite face aux prédateurs. Concernant la composition de la phase minérale du tissu, l'intégration du phosphate dans le squelette des vertébrés à la place du carbonate, a permis la formation de cristaux élémentaires plus stables dans leur environnement. En effet, les cristaux phosphatés sont moins sensibles que les carbonatés lors d'une acidose métabolique, engendrée notamment par un effort physique intense, par exemple lors de la fuite face à des prédateurs[4-6]. En outre, les pièces squelettiques internes minéralisées permettent le support d'une masse corporelle plus conséquente que les squelettes internes non minéralisés et que les exosquelettes. Ce support structural facilitant la lutte contre la gravité a donc permis l'apparition et le développement des grands animaux terrestres.

### I.2. Les fonctions du squelette

Les os jouent un rôle mécanique majeur ; ils sont le support des insertions musculaires, assurant le maintien de la posture et la locomotion de notre corps, mais aussi la mastication, les mouvements oculaires et la respiration. De plus, les pièces osseuses assurent la protection des organes vitaux de notre corps, le crâne et la colonne vertébrale protégeant notre système nerveux central, et la cage thoracique les organes vitaux du thorax. De surcroît, le tissu osseux

### Partie 1 – Chapitre I. Fonctions, structure et composition du squelette

est essentiel dans le maintien de l'homéostasie minérale, en contenant environ 99% du calcium, 85% du phosphore, et environ 40-60% du sodium et du magnésium de l'organisme[7,8]. Ces éléments essentiels sont mobilisables en réponse à des variations de leur concentration sanguine, ou bien en réponse à des *stimuli* hormonaux, comme la calcitonine ou les hormones parathyroïdes[9–11]. Enfin, la moelle osseuse rouge (pauvre en graisse) remplissant les cavités de l'os trabéculaire et les fûts des os longs est le siège de la production des éléments figurés du sang (hématopoïèse, granulopoïèse, lymphopoïèse et mégacaryocytopoïèse).

### I.3. Classification des pièces osseuses

Chez l'adulte, le squelette compte 206 pièces osseuses constantes. Plusieurs types d'os composent le squelette se distinguant par leur origine embryologique et architecture. Les classifications des os du squelette humain les regroupent en deux catégories anatomiques : les os du squelette axial, la tête et le tronc, au nombre de 80, et ceux du squelette appendiculaire, les membres supérieurs et inférieurs, regroupant 126 os. Les pièces osseuses du squelette sont généralement réparties selon leur forme en trois à cinq catégories (Fig. 1)[12–14].



<u>Figure 1</u> : Classification à cinq catégories des pièces osseuses du squelette humain. Modifié d'après [16].

- <u>Les os longs</u> : Ces os sont plus longs que larges, avec une certaine épaisseur. Ils représentent la majorité des os appendiculaires. On peut citer pour le membre supérieur : humérus, ulna, radius, phalanges, et pour le membre inférieur : fémur, tibia, fibula, phalanges.

- <u>Les os courts</u> : Ce sont des os de longueur, largeur et épaisseur comparables, principalement représentés par les os du carpe pour le membre supérieur et du tarse pour le membre inférieur.

### Partie 1 – Chapitre I. Fonctions, structure et composition du squelette

<u>Les os plats</u>: Dénomination trompeuse car bien que peu épais, ces os sont très fréquemment courbes. Ils constituent certains os du crâne (la voute crânienne et la mâchoire), la cage thoracique (sternum, côtes), et la ceinture scapulaire (scapula, clavicules).

 <u>Les os irréguliers</u>: Ces os sont parfois placés dans cette catégorie à part à cause de leur forme singulière. Sont classés ici les vertèbres et certains os du plancher crânien.

<u>- Les os sésamoïdes</u> : Cette dernière catégorie regroupe les os majoritairement de petite taille (parfois semblables à une graine de sésame). Ceux-ci varient en leur nombre et place suivant les individus, mais sont généralement associés aux tendons des pieds, mains et genoux. La patella est le seul os classé « sésamoïde » présent chez tous les individus.

### I.4. Organisation du tissu osseux

La classification morphologique des os ne distingue donc pas leur microstructure, dont le tissu peut se décliner en deux organisations distinctes : l'os compact et l'os trabéculaire.

#### I.4.a. L'os compact

Aussi appelé lamellaire ou haversien et constituant les parties corticales des os, le tissu osseux compact est un tissu minéralisé dense (entre 5-30% de porosité) dont l'unité structurale est appelée système de Havers ou ostéon. Ces ostéons sont des structures cylindriques, parallèles au grand axe de l'os, faites de couches concentriques appelées lamelles (Fig. 2a, b). Chaque ostéon est constitué d'un canal central, le canal de Havers, traversé par les vaisseaux sanguins, fibres nerveuses et canaux lymphatiques. Les lamelles des ostéons sont composées de fibres de collagène, parallèles entre elles au sein d'une même lamelle, mais orientées différemment entre deux lamelles adjacentes. Cette microstructure confère une grande résistance mécanique à l'os cortical. Entre les lamelles se situent les ostéocytes dans leurs lacunes reliés entre eux par des canalicules. Ces canalicules servent aux ostéocytes à communiquer à travers le tissu osseux via leurs prolongements cytoplasmiques. Ces ramifications permettent en outre de relier les lacunes entre elles et au canal central de l'ostéon, permettant aux informations, nutriments et déchets de se propager dans le tissu osseux malgré l'imperméabilité de la matrice[12,14–20].

#### I.4.b. L'os trabéculaire

Dénominé parfois os spongieux par homologie de structure avec une éponge, il se distingue du tissu osseux cortical par son absence d'ostéons et sa porosité bien supérieure (jusqu'à 90%) (Fig. 2a, c). Il est retrouvé au centre des os courts et plats, ainsi que dans les épiphyses des os longs. Ce tissu se compose de lamelles osseuses organisées de façon non concentriques, appelées trabécules. Les cavités de l'os trabéculaire sont remplies de moelle osseuse, dont la nature et composition varient en fonction de sa localisation, ainsi que de l'âge et l'état de santé global de l'individu. Le système haversien étant absent dans ce tissu, le support trophique des ostéocytes est assuré par leur proximité avec la moelle osseuse.



<u>Figure 2</u> : Organisation des tissus osseux. (a) Schéma anatomique d'un os long, (b) os compact, (c) os trabéculaire. Modifié d'après [20,23].

#### I.4.c. Les membranes osseuses

Les surfaces du tissu osseux sont tapissées par deux membranes : le périoste recouvrant la face externe, et l'endoste la face interne, dont les compositions et les rôles diffèrent.

#### I.4.c.1. Le périoste

Le périoste est le tissu conjonctif recouvrant la face externe de l'os (Fig. 2a), s'interrompant au niveau des surfaces articulaires. Ce tissu est composé de deux couches : une couche externe riche en matrice extracellulaire (principalement collagène de type I et élastine) et contenant des fibroblastes ; et une couche interne plus cellularisée, riche en fibroblastes mais contenant aussi des ostéoblastes et des cellules souches. Le périoste est richement vascularisé et innervé, il est aussi très sensible aux *stimuli* mécaniques. Ce tissu permet la croissance en épaisseur de l'os, le remodelage des couches superficielles du tissu osseux et participe à la réparation des fractures[21,22].

### I.4.c.2. L'endoste

L'endoste quant à lui tapisse les cavités des canaux médullaires et de Havers et recouvre les trabécules (Fig. 2a). Ce tissu fin est composé d'une couche fine de cellules avec peu de matrice extracellulaire. Il est le siège de l'équilibre de formation/résorption osseuse, où l'on retrouve les zones ostéoïdes (os immature partiellement ou non minéralisé) et les lacunes de Howship (engendrées par l'activité des ostéoclastes). Les zones inactives de l'endoste contiennent les cellules bordantes (cellules ostéoblastiques en quiescence)[23,24].
# I.5. Composition du tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif. Celui-ci est composé d'une abondante matrice extracellulaire minéralisée et de différents types cellulaires.

## I.5.a. Les composants cellulaires

## I.5.a.1. Les cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des cellules quiescentes, présentes en couche unicellulaire à la surface du tissu osseux lorsque celui-ci n'est ni en formation ni en résorption (Fig. 3a). Ce sont des cellules aplaties et allongées, possédant peu d'organites. Les cellules bordantes peuvent répondre à différents *stimuli*, par exemple provenant de lésions osseuses, où les cytokines et les facteurs de croissance présents dans la matrice osseuse sont libérés et vont activer ces cellules bordantes en ostéoblastes[25–29].

#### I.5.a.2. Les ostéoblastes

Ces cellules sont issues de précurseurs mésenchymateux (cellules stromales mésenchymateuses (CSM)), principalement via l'activation du facteur de transcription Runx2, puis Ostérix en aval de Runx2[30]. Les préostéoblastes continuent de proliférer et sécrètent notamment du collagène (principalement de type I) et de l'ostéopontine (OPN). Leur différentiation se poursuit avec l'arrêt de leur prolifération cellulaire puis la maturation de la matrice extracellulaire grâce notamment à l'augmentation de la sécrétion d'ALP et par la suite la sécrétion d'ostéocalcine (OCN)[31]. De nombreux signaux paracrines et endocrines influencent la differenciation ostéoblastique des CSM, comme les BMPs, membres de la superfamille des TGF- $\beta$ . Les ligants comme BMP-2 ou BMP-4 se lient à leur recepteur membranaire (BMPRs) activant les effecteurs SMADs qui se transloquent dans le noyau pour

#### Partie 1 – Chapitre I. Fonctions, structure et composition du squelette

augmenter la transcription de gènes cibles, notamment via Runx2[32]. D'autres facteurs de croissance favorisent la diffrenciation ostéoblastique des CSM comme l'IGF ou le FGF, activant Ostérix ; ou bien l'hormone parathyroïde (PTH), un régulateur positif de Runx2 ou encore la vitamine D qui forme un complexe avec Runx2, augmentant par exemple la transciption du gène de l'ostéocalcine[33,34].

Lors de l'ossification endochondrale au cours du développement, il a aussi été demontré chez la souris une transdifférentiation des chondrocytes hypertrophiques en ostéoblastes, représentant environ 60% des ostéoblastes matures chez des souris âgées de 1 mois[35].

Les ostéoblastes sont des cellules généralement cubiques ou polygonales synthétisant les composants organiques de la matrice osseuse (Fig. 3b). De plus, ces cellules sont impliquées dans la minéralisation de la matrice osseuse en accumulant notamment des ions calcium et phosphate pour initier leur précipitation et la nucléation des cristaux d'apatite, l'unité fondamentale de la phase minérale du tissu osseux. Les ostéoblastes jouent également un rôle dans le remodelage osseux en régulant l'activité des ostéoclastes, les cellules résorbant l'os. Les ostéoblastes peuvent évoluer de plusieurs façons : ces cellules peuvent s'inclure dans le tissu en minéralisation puis maturer en ostéocytes, disparaître par apoptose, ou encore retourner à l'état de quiescence en tant que cellules bordantes[25–29].

#### I.5.a.3. Les ostéocytes

Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes du tissu osseux, ils sont issus des ostéoblastes emmurés dans la matrice osseuse pendant sa minéralisation (Fig. 3a, b). Les ostéocytes se situent dans les lacunes de l'os minéralisé, appelés ostéoplastes. Ces cellules ont un corps cellulaire allongé avec de nombreux prolongements anastomosés dans le tissu osseux à travers le réseau de canalicules (Fig. 4a). Ces prolongements cytoplasmiques leur permettent d'échanger nutriments et informations, grâce à des jonctions communicantes, ceci jusqu'aux ostéocytes voisins, aux cellules bordantes, ainsi qu'au canal central de l'ostéon[36,37]. Les

#### Partie 1 – Chapitre I. Fonctions, structure et composition du squelette

ostéocytes participent à l'activation des ostéoclastes, via l'expression de RANKL sur leurs prolongements[38]. Enfin, ce sont des cellules mécanosensibles, indispensables à l'homéostasie tissulaire osseuse[39].



<u>Figure 3</u> : Observation histologique de tissu osseux. Coloration au pentachrome de Movat. Jaune : collagène, brun : noyaux cellulaires, rouge : barrière ostéoïde. (a) Tissu osseux stable, (b) tissu osseux en formation. Barres d'échelles :  $50 \mu m$ .

## I.5.a.4. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse. Ces cellules dérivent de la lignée monocytaire, et sont issues de la fusion de plusieurs monocytes (jusqu'à plusieurs dizaines) médiée via le M-CSF et RANKL. Les ostéoclastes matures sont ensuite activés par RANKL afin de se polariser et de mettre en place des jonctions sérrées au niveau de la zone d'os à résorber[40–43]. Ce sont des cellules volumineuses, plurinucléées, polarisées et très mobiles (Fig. 4b). Les ostéoclastes dégradent la phase organique de l'os à l'aide d'enzymes (métalloprotéases, collagénases), et la phase minérale grâce à des pompes à protons au niveau de leur bordure en brosse acidifiant l'environnement en regard de la surface d'os à résorber (Fig. 4b). Ces cellules sont facilement reconnaissables grâce à leurs nombreux noyaux, de nombreuses vésicules d'exocytose et la lacune de résorption appelée lacune de Howship entre la cellule et l'os lorsque ce dernier est résorbé[44].



<u>Figure 4</u> : (a) Observation d'un ostéocyte (généralement 15-30µm) dans son ostéoplaste et (b) un ostéoclaste (généralement 50-100µm) en activité (Pillet, P./Guicheux, J. non publié). Microscope électronique à transmission.

# I.5.b. Composants extracellulaires de la matrice osseuse

La matrice extracellulaire du tissu osseux entoure les ostéocytes disséminés dans le tissu. Elle contient environ 60% (m/m) de matière minérale, 25-30% (m/m) de matière organique, et 10-15% (m/m) d'eau. Le poids sec du tissu osseux est réparti à 65% (m/m) entre la phase minérale et 35% (m/m) pour la phase organique[45].

## I.5.b.1. La phase minérale

La phase minérale est l'élément conférant à l'os sa rigidité et sa résistance mécanique, tour en jouant un rôle de réservoir ionique (Cf. I.2). Cette phase minérale est principalement composée de cristaux d'hydroxyapatite de formule brute canonique Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, pouvant être substitués par différents composés (carbonate, phosphate, sodium ou magnésium...)[16,45]. Ces cristaux sont disposés dans les espaces interfibrilaires de la matrice organique (Fig. 5).



Figure 5 : Organisation submicronique de la matrice osseuse [22]

#### I.5.b.2. La phase organique

La phase organique du tissu osseux se compose très majoritairement de collagène de type I (environ 90% des protéines de la matrice), mais aussi de collagène de type III et V. Le collagène est organisé en microfibres, arrangés de façon parallèle dans une même lamelle osseuse. Cette structure collagénique fibrillaire est associée à de l'élastine conférant à l'os ses propriétés élastiques, et de la fibronectine favorisant l'adhésion des cellules à la matrice. Le reste de la matrice organique est composée notamment de glycosaminoglycanes, protéoglycanes et glycoprotéines. Enfin, on retrouve en faible proportion d'autres protéines non collagéniques, majoritairement sécrétées par les ostéoblastes et les ostéocytes et incorporées à la matrice, ces protéines sont très diverses et jouent un rôle primordial dans l'équilibre de formation/résorption osseuse. Parmi celles-ci nous pouvons citer la sialoprotéine osseuse (BSP) impliquée dans la minéralisation initiale du tissu en favorisant la nucléation des cristaux

# Partie 1 – Chapitre I. Fonctions, structure et composition du squelette

d'apatite, l'ostéocalcine (OCN) ayant un rôle dans la minéralisation et le maintien de l'homéostasie calcique ou encore l'ostéopontine (OPN), reliant les cristaux d'apatite aux ostéocytes. Outre ces protéines non collagéniques, nous pouvons retrouver aussi des facteurs de croissance (FGFs, TGFs, IGFs, PDGFs, BMPs...) et cytokines (ILs, TNFs...)[45–48]. Ces protéines piégées dans la matrice lors de sa formation jouent un rôle dans l'activation et la différenciation des acteurs cellulaires de la formation/résorption osseuse, en étant libérées lors de la résorption ostéoclasique ou bien à la suite d'une rupture de l'intégrité du tissu osseux.

Partie 1 – Chapitre II. Les événements de la régénération osseuse

Chapitre II. Les événements de la régénération osseuse

# II.1. Les différentes étapes de la régénération osseuse

Le tissu osseux possède la capacité de se régénérer fonctionnellement, après une lésion ou une perte osseuse. Ceci reste vrai tant que le volume osseux atteint ne dépasse pas une taille dite « critique », au-delà de laquelle le tissu osseux échouera à retrouver sa structure initiale. Cette taille critique dépend de facteurs propres à l'individu comme les comorbidités associées, l'âge ou le genre, mais aussi de facteurs propres au site de la lésion osseuse comme sa localisation et sa complexité.

Lors de la régénération, la formation osseuse peut se faire par deux mécanismes : l'ossification endochondrale et l'ossification intramembranaire. Les os dits « longs » du squelette axial et des membres se développent et se régénèrent par ossification endochondrale, les os « plats » et certaines zones des os longs par ossification intramembranaire. La principale différence entre ces deux processus réside en la formation d'une structure cartilagineuse (cal cartilagineux) pour l'ossification endochondrale via la différenciation des progéniteurs en chondrocytes. Le cal cartilagineux sera dans ce cas progressivement remplacé par du tissu osseux minéralisé. L'ossification intramembranaire s'affranchit de cette étape de formation cartilagineuse, les cellules progénitrices se différenciant directement en ostéoblastes pour sécréter et minéraliser la matrice sans formation de cartilage[15,25,49–52].

La régénération osseuse endochondrale se segmente en quatre grandes étapes successives (trois pour la régénération intramembranaire) : inflammation, formation du cal cartilagineux, ossification, et enfin remodelage (Fig. 6).

#### Partie 1 – Chapitre II. Les événements de la régénération osseuse



Figure 6 : Les grandes étapes de la régénération osseuse endochondrale. Vsx : vaisseaux sanguins. Modifié d'après [42].

# II.1.a. La phase inflammatoire

La phase inflammatoire suit immédiatement l'atteinte de l'intégrité du tissu osseux (Fig. 6). La destruction de tissus, osseux et mous environnants, induit l'activation de voies de signalisations inflammatoires. De plus, la rupture de l'architecture vasculaire osseuse et péri osseuse entraine la formation d'un hématome, contenant notamment des plaquettes et des cellules immunitaires (granulocytes, lymphocytes et monocytes). Ces cellules immunitaires sécrètent notamment des chemokines afin d'attirer d'autres cellules au site de lésion, mais aussi des cytokines et des facteurs de croissance nécessaires au bon déroulement de la régénération. Parmi des facteurs nous pouvons citer le TGF- $\beta$ , FGF-2, les PDGFs, le VEGF-A, l'IL-1 et -6, le TNF- $\alpha$  ou encore certaines BMPs[52–57].

#### II.1.b. La formation cartilagineuse

Le recrutement de cellules progénitrices (cellules stromales/souches mésenchymateuses, (MSC)) est indispensable au bon déroulement de la régénération. Ces cellules recrutées grâce aux signaux inflammatoires et chemoattractants peuvent parvenir de la moelle osseuse à proximité, de la circulation sanguine, du périoste ou encore des tissus mous alentours. Ces

progéniteurs prolifèrent et se différencient en chondrocytes sous l'effet de facteurs de croissance comme les TGF- $\beta$ 2 et - $\beta$ 3, PDGFs, FGF-1, IGF, et BMP-2, -4, -5, -6. Ces chondrocytes vont sécréter notamment du collagène de type II et de l'aggrécane puis subissent une différenciation hypertrophique et sécrètent de grandes quantités de matrice extracellulaire, composée principalement de collagène de type X, ainsi que du VEGF. Le VEGF induit l'invasion vasculaire progressive de la zone cartilagineuse par des cellules endothéliales issues du bourgeonnement de vaisseaux alentours, apportant des progéniteurs supplémentaires et augmentant la tension locale en oxygène, initiant la phase de minéralisation [15,25,49,50,52,58].

#### II.1.c. L'ossification de la zone cartilagineuse

Cette étape représente la période d'ostéogénèse de la lésion et est caractérisée par une activité élevée des ostéoblastes et la formation d'une matrice minéralisée. Les ostéoblastes partagent le même progéniteur que les chondrocytes, se différenciant sous l'effet de facteurs de croissance comme les BMPs, et grâce à la tension locale en oxygène élevée apportée par l'invasion vasculaire du cartilage. Il a aussi été décrit une transdifférenciation des chondrocytes en ostéoblastes au niveau de la plaque de croissance[59]. Le cartilage est progressivement dégradé par les ostéoclastes pour être remplacé par de l'os néoformé, riche en collagène de type I. Néanmoins, la formation osseuse ne nécessite pas nécessairement la présence d'une zone cartilagineuse. Comme évoquée précédemment, la régénération osseuse intramembranaire dans les os plats s'affranchit de la phase cartilagineuse. Dans ce cas, les MSC recrutées lors de la phase inflammatoire précoce se différencient directement en ostéoblastes, sécrétant la matrice osseuse. Enfin, lors de la croissance en épaisseur des os longs, le dépôt minéral s'effectue par apposition sur la matrice osseuse minéralisée préexistante au niveau du périoste.

# II.1.d. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux constitue l'étape ultime de la régénération, faisant intervenir les ostéoclastes en plus des ostéoblastes. L'induction de la résorption osseuse se fait via la sécrétion de facteurs solubles comme M-CSF et RANKL par les ostéoblastes, induisant la différenciation et la fusion de progéniteurs hématopoïétiques mononucléés de la lignée monocytaire en cellules plurinucléées. L'activation et l'activité des ostéoclastes sont aussi régulés par l'OPG, sécrétée par les ostéoblastes, où le ratio RANKL/OPG joue un rôle essentiel dans le remodelage osseux [26,29,60,61] (Fig. 7). Les zones minéralisées dans le cartilage sont résorbées à cette étape par les ostéoclastes, et remplacées par de l'os mature par les ostéoblastes reformant ainsi la morphologie normale de l'os.



<u>Figure 7</u>: Effet de la triade RANK, RANKL, OPG et du ratio RANKL/OPG sur l'activation ostéoclastique et la résorption osseuse [52].

# II.2. Description et classification des monocytes et macrophages

Comme évoqué, les monocytes font partie des premières cellules à parvenir sur le site de la lésion osseuse lors de la formation de l'hématome primaire. Les cellules immunitaires et notamment les cellules de la lignée monocytaire jouent un rôle clé dans la régénération osseuse.

#### **II.2.a.** Les monocytes

Les monocytes dérivent des précurseurs myéloïdes, eux-mêmes issus des cellules souches hématopoïétiques. Les monocytes nouvellement formés quittent la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine, constituant un réservoir circulant. Chez l'humain, la majorité des monocytes circulants sont caractérisés par l'expression du CD14 à leur surface (CD14<sup>+</sup>) et l'absence du CD16 (CD16<sup>-</sup>), ceux-ci représentant 85 à 90% de la population monocytaire [62]. Ces monocytes se différencient en macrophages dans les tissus une fois recrutés sur des sites d'infection, de lésion, dans des environnements inflammatoires ou tumoraux.

Les macrophages sont des cellules généralement résidentes dans les tissus, où leur appellation diffère (microglie pour le système nerveux central, cellules de Kupffer pour le foie, ostéomacs pour le tissu osseux...). Les macrophages peuvent aussi être issus de la maturation de monocytes circulants, recrutés grâce à différents signaux (inflammation, lésion, tumeur, infection...). Le phénotype des macrophages et leur fonction varie selon leur tissu de résidence, leur microenvironnement et leur état de maturation et d'activation.

# II.2.b. Origine et classification des macrophages

Originellement décrits par leur capacité de phagocytose par Ilya Metchnikov en 1883, les macrophages sont impliqués notamment dans la défense contre les pathogènes, l'élimination des débris cellulaires, et favorisent l'inflammation et la réponse immunitaire[63]. Ce sont des

composants majeurs de l'immunité innée. Ils font aussi le lien avec les cellules de l'immunité adaptative en tant que cellules présentatrices d'antigènes et grâce au phénomène d'opsonisation[64]. Les macrophages exercent aussi certaines fonctions essentielles lors de la cicatrisation et la réparation tissulaire. Ces rôles bien distincts introduisent l'idée que les macrophages sont des cellules pluridisciplinaires et adaptatives, pouvant répondre à des signaux opposés. En effet, les premiers travaux sur l'activation des macrophages ont démontré leur activation en présence de Listeria monocytogenes, puis l'INF-y a été relié à l'activité proinflammatoire des macrophages. Cependant, d'autres études s'intéressant aux propriétés immunorégulatrices des macrophages ont démontré une augmentation de l'expression du récepteur au mannose (CD206) et une diminution de la sécrétion de cytokines proinflammatoires lors de la stimulation de macrophages par l'IL-4. Ceci engendra les premières propositions de classifications de ce paradigme d'activation, notamment par Charles D. Mills. Les macrophages étant classés « M-1 » lorsque ces derniers étaient activés par des lymphocytes Th1 ou leurs cytokines pro-inflammatoires (comme l'INF- $\gamma$ ), et « M-2 » pour les macrophages activés par les lymphocytes Th2 ou leurs cytokines anti-inflammatoires (par exemple l'IL-4 ou l'IL-13). Les études sur ce paradigme d'activation des macrophages se sont poursuivies, démontrant que leurs phénotypes constituent un continuum dont les « M-1 » et « M-2 » seraient les « extrémités ». Des sous-classes de macrophages ont par la suite encore été décrites, toujours en fonction de leurs signaux d'activation, mais aussi par les antigènes qu'ils présentent à leur surface et les cytokines qu'ils sécrètent (Fig. 8). L'utilisation de ces classifications tend à diminuer, au vu de la complexité et de l'hétérogénicité des populations de macrophages, sans réelle segmentation in vivo. Ces nomenclatures sont tout de même utiles pour comprendre l'hétérogénicité des réponses des macropahges aux différents stimuli.



Figure 8 : Exemple de classification et signaux d'activation des macrophages et sous-catégories. Modifié d'après [54].

#### II.2.b.1. Les macrophages « M-1 »

Les macrophages « M-1 » ou M1, sont souvent décrits « *classically activated* » dans la littérature internationale. Le phénotype de ces macrophages a été décrit en réponse à l'INF- $\gamma$  et au LPS, induisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme par exemple l'IL-1 $\beta$ , -6, -12, -17, -23 et le TNF- $\alpha$ . Ces macrophages produisent aussi des chemokines (CXCL-5, -9, -10 et -11), des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'oxyde nitrique (NO) via l'enzyme iNOS. Plus récemment, le GM-CSF a été décrit comme favorisant le phénotype « M1 ». Son récepteur, le CSF2-R, recrute JAK2 après dimérisation, conduisant à une phosphorylation de STAT5 et une translocation de NF- $\kappa$ B et IRF5 dans le noyau[65]. Les macrophages M1 se sont révélés essentiels dans la réponse immunitaire contre les pathogènes et également impliqués dans la promotion de la réponse anti tumorale[66]. En revanche, ces macrophages sont aussi associés à certaines pathologies, comme dans les inflammations liées à l'obésité[67,68], l'arthrite chronique[69], ou le rejet des greffes rénales[70]. Les macrophages inflammatoires peuvent aussi ralentir les phénomènes de régénération et de cicatrisation osseuse dans un environnement hyper-inflammatoire, en cas d'infection ou bien lors de pathologies

inflammatoires associés à proximité du site de régénération osseuse[71]. La protection contre l'hyperactivation des macrophages et de l'inflammation chronique est donc primordiale pour rétablir l'homéostasie tissulaire.

#### II.2.b.2. Les macrophages « M-2 »

Ces macrophages sont aussi appelés « *alternatively activated* » ou simplement M2. D'un point de vue fonctionnel, les macrophages M2 sont aussi capables de phagocytose, récupérant notamment les débris cellulaires et les corps apoptotiques. Ils possèdent en outre la capacité de promouvoir la réparation et le remodelage tissulaire, la cicatrisation et l'angiogenèse, avec un rôle anti-inflammatoire[72–76]. Néanmoins, le rôle anti-inflammatoire et pro-angiogénique des macrophages M2 a été observé dans certaines pathologies, comme dans la fibrose pulmonaire, dans des néovascularisation pathologiques (rétinopathies induites par l'oxygène), ou encore dans la progression tumorale[77,78].

Les macrophages M2 sont sous-classés en différentes catégories en fonction des signaux qui les activent, de leur expression des marqueurs de surface, et des facteurs qu'ils sécrètent (Fig. 9).

- <u>M2a</u> : induits par l'IL-4 et -13, ils expriment notamment le CD163, CD206 et MHC II, et sécrètent des cytokines comme l'IL-10, le TGF- $\beta$  ou l'IGF-1.

- <u>M2b</u> : induits par le LPS et la formation de complexes immuns (IC), ils expriment par exemple le CD86 et le MHC II, et sécrètent de l'IL-1, -6, -10 et du TNF- $\alpha$ .

- <u>M2c</u> : induits par l'IL-10 et les glucocorticoïdes, ils expriment le CD163 et CD206, et sécrètent aussi de l'IL-10, -12 et du TGF- $\beta$ .

- <u>M2d</u> : Ce sous-type de macrophages est induit par des facteurs du microenvironnement tumoral comme le CCL-2 et -5. À mesure que la masse tumorale évolue, ces macrophages vont sécréter de l'IL-6, -10, -12, du VEGF, ou encore du TGF-β. Ils sont communément désignés TAM pour « *Tumor Associated Macrophages* ».

# Partie 1 – Chapitre II. Les événements de la régénération osseuse

Le M-CSF est aussi décrit pour favoriser le phénotype M2 des macrophages, notamment via la promotion de l'expression du CD163 et de la sécrétion d'IL-10 sur des monocytes humain issus de sang périphérique[74,79,80].

D'autres sous-types de macrophages ont été décrits ou proposés à mesure de caractérisations plus poussées ou à l'aide de nouveaux modèles. Par exemple, les macrophages M4 décrits comme activés par le CXCL-4 et étant pro-athérogéniques ; les Mhem, activés par l'hème, et les MHb, activés par le complexe hémoglobine/haptoglobine ayant des propriétés athéroprotectives ; ou encore les Mox, décrits chez la souris, activés par des phospholipides oxydés et ayant des propriétés anti-oxydantes.



Figure 9 : Classification élargie des macrophages [71].

# II.3. Le rôle des macrophages M1 et M2 dans la régénération du tissu osseux

Peu d'études ont étudié la réponse inflammatoire des monocytes/macrophages dans des sites crânio-faciaux comme la calvria ou la mandibule, en particuler chez le rat. Néanmoins, le

rôle des macrophages dans les phénomènes régénératifs osseux ont été mis en évidence dans plusieurs études de régénération osseuse endochondrale.

Chez l'axolotl en éliminant les macrophages au moment de l'amputation d'un membre à l'aide de liposomes de chlodronate, il a été montré que ces cellules étaient indispensables à la régénération de ce membre [81]. En utilisant la même technique de déplétion chez la souris, il a été démontré que la phase inflammatoire primaire (la formation de l'hématome) était totalement abolie lorsque la déplétion des macrophages était initiée au moment d'une fracture osseuse[82]. De plus, une déplétion des macrophages à la fin de cette phase inflammatoire empêchait la formation du cal cartilagineux, alors qu'une injection de CSF-1 (M-CSF) permettait d'augmenter la taille du cal[82]. Une autre étude chez la souris a pu mettre en évidence le rôle des macrophages dans la phase d'ossification du cal cartilagineux, ainsi que l'évolution du phénotype des macrophages au cours de la régénération, où les macrophages présents sur le site de la fracture exprimaient le CD206 à partir de 3 à 7 jours après la lésion osseuse[83]. Cette étude a aussi démontré une persistance du cal cartilagineux après injection de liposomes de chlodronate, alors qu'une injection d'IL-4 et d'IL-13, favorisant la polarisation des macrophages vers un phénotype de type M2, augmentait le volume du cal et le volume osseux. Plus récemment, les macrophages M2 ont été associés à une accélération de la guérison de fractures claviculaire chez l'homme, où la proportion de macrophages M2 dans le cal était proportionnelle à la vitesse de guérison des patients[84].

Les différents types de macrophages sont donc impliqués à tous les niveaux de la régénération osseuse, les macrophages M1 étant présents lors des phases précoces de la régénération, puis une transition de leur phénotype s'opère conjointement à une formation du cal cartilagineux, laissant place aux macrophages M2 impliqués dans la résolution de l'inflammation, la vascularisation du cal et sa minéralisation[85] (Fig. 10).



Figure 10 : Activations, sécrétions et rôles des macrophages dans le tissu osseux.

# II.4. Le dialogue macrophages-MSCs

Le rôle clé des macrophages dans la régénération osseuse a encouragé les études sur leur relation avec les cellules ostéoformatrices, à savoir les ostéoblastes et leurs progéniteurs : les cellules souches mésenchymateuses (MSC). *In vitro*, du surnageant de culture conditionné par des macrophages non polarisés a permis d'augmenter la minéralisation de la matrice extracellulaire de MSC, ainsi que leur production de RUNX2, OCN, ALP et SP7[86]. Des co-cultures de MSC/macrophages ont aussi été réalisées, où l'expression des ARNm de *RUNX2, Col I, ALP* et *OCN* était augmentée après 3 jours de culture en présence de macrophages M1, et l'expression des ARNm de *RUNX2, Col I, ALP, OCN*, et *BSP* était augmenté après 14 jours de culture[87]. Dans un modèle de co-culture MSC/macrophages indirect, la minéralisation de la matrice la matrice extracellulaire des MSC était augmentée en présence de macrophages M2 au bout de 21 jours de culture [88]. Ceci corrèle l'implication des macrophages M1 dans les temps précoces de la régénération osseuse, et les macrophages M2 dans un modèle de souris MAFIA (déplétion conditionelle des macrophages), où les MSC issues de moelle osseuse présentaient

une différenciation altérée avec une diminution de l'expression des ARNm de *RUNX2, SP7, ALP, Col I, SPP1* et *BGLAP* au bout de 21 jours de culture[89].

Comme tout dialogue, ce dernier s'opère dans les deux sens, et l'effet des MSC sur le phénotype des macrophages a aussi été étudié. En effet, les MSC ont été décrites pour leurs propriétés immunomodulatrices, en addition à leurs caractéristiques progénitrices. Les MSC peuvent favoriser le phénotype M1 ou M2 des macrophages en fonction du caractère pro- ou anti-inflammatoire de leur environnement (Fig. 11)[90].



Figure 11 : Effets pro- et anti-inflammatoire des MSC sur les macrophages. Modifié d'après [77].

*In vitro*, du milieu conditionné par des MSC induisait l'augmentation de l'expression d'IL-10 et d'Arg1 dans des macrophages murins d'origine intrapéritonéale non polarisés[91]. Dans une autre étude, des MSC murines pré-exposées à du LPS et du TNF- $\alpha$ , augmentaient les niveaux d'Arg1 et de CD206, et diminuaient ceux de TNF- $\alpha$ , dans des macrophages M1 après 24h de contact[92]. Une étude chez le rat a aussi démontré qu'un milieu conditionnée par des MSC induisait l'apoptose de macrophages M1 *in vitro*[93]. De plus, en co-cultivant des MSC avec une lignée de macrophages (THP-1) ou des macrophages primaires humains, il a été

# Partie 1 – Chapitre II. Les événements de la régénération osseuse

démontré une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-12) par les macrophages non polarisés, une diminution des marqueurs CD80, CD50 et CD54 par les macrophages M1, et une augmentation de l'expression de CD163 par les macrophages M2 [94]. Ces études soulignent donc que la communication macrophages-MSC peut avoir lieu à plusieurs niveaux de la régénération osseuse, à partir de la fin de la phase précoce d'inflammation où les monocytes sont recrutés sur le site osseux à régénérer, jusqu'à l'ossification du cal.

Partie 1 – Chapitre III. Atteintes squelettiques, biomatériaux et greffes osseuses

# Chapitre III. Atteintes squelettiques, biomatériaux et

# greffes osseuses

# **III.1.** Les atteintes osseuses

Chaque année, plus de deux millions de greffes osseuses sont réalisées à travers le monde, faisant du tissu osseux le deuxième tissu le plus greffé[95,96]. Le nombre de greffes osseuses augmente d'environ 5% par an, principalement via l'accroissement de la population mondiale et l'allongement de l'espérance de vie. Les greffes osseuses sont réalisées dans de multiples contextes cliniques, afin de combler des déficits osseux en orthopédie, oto-rhino-laryngologie, stomatologie, chirurgie crânio-maxillo-faciale et chirurgie dentaire. Il existe trois types de greffes osseuses : les autogreffes, dont l'individu donneur est le même que l'individu receveur (le greffon est alors prélevé sur une partie du corps du patient greffé) ; les xénogreffes, dont l'espèce du donneur est différente de celle du receveur (par exemple un os bovin greffé chez un humain) ; et les allogreffes dont l'individu donneur est de la même espèce que l'individu receveur (le tissu est prélevé chez un individu humain, et greffé chez un autre). La chirurgie osseuse reconstructrice est très demandeuse de greffons osseux ou de substituts de greffe osseuse, que ce soit en raison de reconstructions après une résection tumorale, lors de déformations osseuses congénitales, ou bien dans le cas de traumatismes osseux sévères. L'ensemble de ces atteintes osseuses peuvent être extrêmement douloureuses, et entrainer des conséquences esthétiques et fonctionnelles lourdes pour le patient, ayant un fort impact sur la qualité de vie générale de l'individu, tout en représentant une charge financière conséquente pour la société.

#### III.1.a. Les cancers osseux

Deux formes de cancers osseux sont retrouvées : les cancers osseux primitifs et les cancers osseux secondaires. Les cancers osseux primitifs sont des tumeurs osseuses primaires, dont l'origine de la tumeur est osseuse, d'une incidence d'environ 1 cas sur 100.000 individus

# Partie 1 – Chapitre III. Atteintes squelettiques, biomatériaux et greffes osseuses

avec un taux de survie d'environ 65%[97,98]. Malheureusement, les phases précoces du développement tumoral sont asymptomatiques et la majorité des tumeurs sont de ce fait détectées tardivement. Les cancers osseux secondaires sont de loin les plus fréquents parmi les cancers osseux, les tumeurs étant principalement issues d'une extension d'un carcinôme epidermoïde ou plus rarement de métastases d'autres cancers. En effet, 60% des cancers prostatiques et du sein, cancers les plus fréquents chez l'homme et la femme, métastasent dans le tissu osseux. D'autres cancers fréquents comme le carcinome rénal, thyroïdien, ou le mélanome, métastasent aussi dans le tissu osseux. Le traitement principal local des cancers osseux est la chirurgie de résection, où la masse osseuse est retirée ainsi qu'une partie du tissu à proximité, auquel s'ajoute, si nécessaire, un traitement systémique (chimiothérapie, hormonothérapie...)[99–101]. Lorsque la résection tumorale est importante, la cicatrisation naturelle du tissu osseux ne suffit pas à rétablit son homéostasie. Une reconstruction osseuse est donc nécessaire pour combler la cavité, rétablir la hauteur, ou pallier à l'interruption du tissu osseux, afin d'en rétablir sa fonctionnalité.

#### III.1.b. Les malformations osseuses congénitales

Les malformations osseuses congénitales peuvent entrainer dans les cas les plus graves des troubles importants de la locomotion, de la préhension ou de la phonation en fonction des zones osseuses malformées[102–107]. Par exemple, parmi les malformations congénitales les plus fréquentes en France, on retrouve les fentes labio-maxillo-palatines (communément appelés « bec de lièvre ») touchant jusqu'à 1 enfant sur 700[108]. Cette malformation résulte d'une insuffisance ou absence de fusion entre la lèvre supérieure, le rebord alvéolaire de l'os maxillaire, le palais osseux et le voile du palais. Ces malformations faciales provoquent chez l'enfant des troubles du développement, buccodentaires, de la phonation et de l'alimentation. Pour traiter ces malformations, la seule approche est chirurgicale, où un des défis pour le chirurgien est de reconstruire ces fentes malgré les conditions chirurgicales parfois défavorables

(important volume osseux, irrégularité et complexité du défaut) afin d'apporter une qualité de vie optimale pour l'enfant.

#### III.1.c. Les traumatismes osseux accidentels

Les traumatismes osseux accidentels comme les amputations, fractures, lésions par écrasement et luxations peuvent entrainer des incapacités parfois sévères ou permanentes. Dans les pays développés, les traumatismes graves des membres imposant des hospitalisations résultent principalement de chutes, d'accidents de la route, ou d'utilisation de machines et d'outils. Les chutes représentent le risque maximal pour les personnes âgées, alors que ce sont les accidents de la route pour les adolescents et les jeunes adultes.

#### III.1.d. Les traumatismes balistiques

Les traumatismes balistiques sont la conséquence de la pénétration dans l'organisme d'un projectile provenant de l'enveloppe ou du contenu d'un engin explosif, par exemple une grenade, une mine, un obus ou une bombe. On dénombre aux États-Unis 230 millions d'armes à feu en circulation, responsables d'environ 24 000 tués et 300 000 blessés chaque année engendrant des coûts de soins inhérents à ces traumatismes balistiques de l'ordre du milliard de dollars[109]. Les traumatismes engendrés par les projectiles dans l'organisme dépendent de facteurs à la fois anatomiques et balistiques. Le transfert d'énergie du projectile au corps dépend de la nature du projectile (balle, éclats, plombs), de sa composition (capacité à s'écraser, à se fragmenter), de sa stabilité (effet de bascule, de rotation) ainsi que de sa vitesse (Fig. 12)[110]. En outre, plus la densité du tissu touché est élevée et son élasticité faible, plus le transfert d'énergie sera important. Ainsi, les structures osseuses qui sont les plus denses de l'organisme, seront celles à haut transfert d'énergie avec pour conséquence la possibilité de fracas complexes.

A l'heure actuelle les lésions des membres sont prédominantes, pouvant représenter jusqu'à 95% des traumatismes balistiques[110].



<u>Figure 12</u> : Illustration de traumatismes osseux balistiques des membres générés par différents types de munitions. Modifié d'après[100].

#### III.1.e. Les pertes osseuses en chirurgie dentaire

Les causes des pertes osseuses dans l'os mandibulaire, maxillaire ou alvéolaire sont diverses : extraction dentaire, maladie parodontale, tumeur osseuse, traumatisme, infection, malformation. La restauration du volume osseux est nécessaire afin de reconstruire la dentition grâce à des implants. Les implants dentaires sont importants pour l'homéostasie du tissu osseux local, où les forces mécaniques de pressions et tensions sont indispensables au maintien du volume osseux[111]. Afin d'obtenir un volume osseux suffisant pour la pose d'un implant, plusieurs techniques de restauration du stock osseux sont disponibles en fonction des sites. La régénération osseuse guidée (ROG) est utilisée pour reconstruire des défauts osseux en associant des greffons ou substituts de greffes et une membrane de recouvrement. Des biomatériaux particulaires sont généralement utilisés, mais des biomatériaux injectables, extrudables ou malléables sont préférés dans des défauts osseux de plus grande taille, avec des contours réguliers, que ce soit en comblement, en augmentation verticale ou horizontale. Il est aussi possible d'augmenter la hauteur du plancher sinusien en utilisant des greffons particulaires ou injectables à travers l'os maxillaire[112,113].

# **III.2.** Les greffes osseuses autologues

Dans toutes ces atteintes squelettiques la prise en charge chirurgicale est indispensable et dans certains cas où la lacune osseuse n'est pas de taille à se régénérer d'elle-même, un comblement osseux s'impose. Historiquement, et encore dans de nombreux contextes chirurgicaux aujourd'hui, la greffe osseuse autologue, ou autogreffe, reste le « *gold standard* », c'est-à-dire le traitement de référence. Cette procédure consiste à effectuer un prélèvement de tissu osseux sur le même patient qui recevra cette greffe (Fig. 13). Le greffon ainsi récolté possède les propriétés essentielles à la régénération osseuse, à savoir[114–119]:

- L'ostéoconduction, représentant la capacité du greffon à supporter la repousse osseuse à son contact.

- L'ostéogenèse, avec la présence de cellules ostéoblastiques, et de précurseurs dans leur niche, permettant la formation osseuse à partir de ces cellules.

- L'ostéoinductivité, grâce aux facteurs de croissance dans la matrice et la moelle osseuse ayant la capacité d'induire la différenciation des progéniteurs en cellules ostéoformatrices.

## Partie 1 – Chapitre III. Atteintes squelettiques, biomatériaux et greffes osseuses



<u>Figure 13</u> : Représentation schématique d'un prélèvement osseux autologue sur la crête iliaque. Modifié d'après[110].

La greffe osseuse autologue est considérée comme fiable, principalement grâce à la parfaite immunotolérance de l'hôte pour le greffon, s'agissant du même individu. Le choix du greffon prélevé se fera en fonction des besoins. L'utilisation d'os trabéculaire étant intéressante pour gagner en volume osseux, alors qu'une lame d'os cortical sera un choix préférentiel pour un support structural grâce à sa grande résistance mécanique. En outre, même si le taux de succès des greffes osseuses autologues est élevé, il reste dépendant de l'état de santé général du patient, des sites de prélèvements, et des sites receveurs[115]. La vascularisation des greffons osseux autologues est aussi un facteur clé de leur succès thérapeutique dans de grands défauts interrupteurs. Par exemple, le succès des greffons non vascularisés passe de 80% à 50% lorsque les défauts mandibulaires dépassent les 9 cm[120]. Plus généralement, la vascularisation des greffons permet de raccourcir le temps de régénération osseux, et diminuer le risque infectieux, tout en augmentant la résistance mécanique de la zone régénérée[121].

De plus, les inconvénients majeurs de la greffe d'os autologue résident dans le prélèvement du greffon dont les principaux sites incluent la crête iliaque, la fibula, l'humérus, les côtes flottantes, la voute crânienne, et certaines zones intra-orales[122,123]. Le premier inconvénient du prélèvement d'os autologue est la quantité limitée de tissu récoltable en un site donneur. Nous comprenons aisément que lors d'une intervention de reconstruction osseuse, où un greffon autologue volumineux est requis, le site donneur de ce greffon ne peut pas excéder

une certaine taille, faute de quoi, un deuxième prélèvement serait nécessaire. Outre le volume limité de prélèvement, les cicatrices inesthétiques laissées par le recueil du greffon sont fréquentes. De plus, de nombreuses complications per- et post- opératoires ont été reportées au prélèvement d'os autologue. Parmi les risques inhérents au prélèvement du greffon, nous pouvons retrouver : infections, douleurs, œdèmes, hématomes, blessures artérielles, veineuses, lymphatiques, blessures nerveuses, paresthésies, pertes de tonus musculaire, blessures des uretères ou encore fractures. Ces complications sont néanmoins dépendantes des sites de prélèvements (Table 1).

Advantages	Disadvantages
Large bone volume, rich source of progenitor cells and growth factors, easy access, providing both cancellous and cortical bones	Nerve, arterial, and urethral injury, increased blood loss, hematoma, infection, chronic post-operative donor site pain, high patient morbidity, high recovery time, large scar, hip subluxation, pelvic fractures, costly, local infection
Lower bone turn-over than iliac crest, lower post-operative pain than the iliac crest, easy to harvest, small incision is needed	Superficial radial nerve injury, fracture, infection
Easy to access, less operative time, and less gait disturbance than the iliac crest	Fracture, less bone volume than iliac crest, infection
	Advantages Large bone volume, rich source of progenitor cells and growth factors, easy access, providing both cancellous and cortical bones Lower bone turn-over than iliac crest, lower post-operative pain than the iliac crest, easy to harvest, small incision is needed Easy to access, less operative time, and less gait disturbance than the iliac crest

Table 1 : Avantages et inconvénients de quelques sites de prélèvements d'autogreffe osseuse [113].

Par ailleurs, une anesthésie générale est fréquemment requise pour les prélèvements, au moins extra-oraux, et les risques qui lui sont associés s'ajoutent à ceux de la chirurgie. Ceci étant, le prélèvement du greffon autologue entraîne un allongement du temps chirurgical et/ou la mobilisation d'une seconde équipe de chirurgie pour le prélèvement, augmentant *de facto* le coût global de l'intervention et sa complexité. Pour finir, même s'il est possible d'associer plusieurs greffons pour générer un angle, leur forme est tributaire de leur lieu de prélèvement, limitées de par l'arrangement anatomique de nos pièces osseuses. Il est toutefois envisageable de tailler ou de broyer un greffon autologue, mais il sera difficile de lui donner une forme complexe ou de le rendre malléable ou injectable par exemple.

# **III.3.** Les substituts de greffes osseuses

#### III.3.a. Définitions des biomatériaux et substituts osseux

Pour pallier les nombreux inconvénients liés au prélèvement lors de la greffe d'os autologue, de nombreux biomatériaux de reconstruction et substituts osseux ont été développés au fil des décennies. La définition internationale d'un biomatériau a été clairement définie lors de la conférence « European Society of Biomaterials »[124]:

« A non-viable material used in a medical device, intended to interact with biological systems. »

Par la suite, une nouvelle définition lui a été préférée :

« A material intended to interface with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissue, organ or function of the body. »

Nous retrouvons dans ces définitions les notions d'interface et d'interaction du matériau en question avec le ou les système(s) biologique(s). Une telle notion peut se définir par la biocompatibilité, propre à un système biomatériau-hôte, et non pas intrinsèque d'un biomatériau seul[125–127].

Concernant les substituts osseux en revanche, il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus quant à leur définition. Nous pouvons néanmoins en retrouver plusieurs contenants des notions similaires[128] :

«A synthetic, inorganic or biologically organic combination -« biomaterial »- which can be inserted for the treatment of a bone defect instead of autogenous or allogenous bone. »

« Tout biomatériau d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique,

-destiné à l'homme

-dans la perspective d'une reconstruction du stock osseux

-par le renforcement d'une structure osseuse ou le comblement d'une perte de substance osseuse d'origine traumatique ou orthopédique. »

« Le substitut osseux est un matériau ostéoconducteur, reprenant partiellement la composition et la fonction de l'os physiologique, avec une capacité de résorption et une fonction mécanique et/ou volumétrique. »

# III.3.b. Les différents types de substituts osseux

Il existe de nombreux substituts osseux, de nature et formes diverses, notamment des blocs, poudres, ciments et pâtes (Fig. 14). Il existe deux grandes familles de substituts, ceux d'origine naturelle (animale ou végétale), et ceux d'origine synthétique (issus de synthèse chimique ou les substituts naturels modifiés) (Table 2). Une troisième famille peut être décrite, celle des composites, créés à partir d'un assemblage de substituts de diverses natures ou formes. La plupart des substituts sont représentés sous forme de bloc, granulés, poudre, pâte modelable, extrudable ou ciment injectable. L'avantage des substituts osseux modelables ou injectables est de s'adapter à la forme de la perte de substance osseuse, contrairement aux blocs qui sont parfois fragiles en fonction de leur nature et difficiles à retailler (certains substituts osseux synthétiques). Près d'une centaine de substituts osseux sont disponibles sur le marché français, la plupart ayant des compositions très proches mais avec des noms commerciaux différents [108].



Figure 14 : Exemple de formes et présentation de substituts osseux. Modifié d'après [119].

Origine	Ту	pe	Exemple clinique
Naturels	Allogreffe Xénogreffe	<u>.</u>	GRAFTON & DBM, OSTEOSET BDM &
	HA biologique		ENDOBON ®, BIO-OSS ®, LUBBOC®, OXBONE®, SURGIBONE®, OSTEOGRAFT®
	Carbonates de calcium		BIOCORAL®
Synthétiques	Céramiques Phospho- Calciques	HA	CERAPATITE®, TRANS-OSSATITE®
	calciques	aTCP - bTCP	BIOSORB®, CALCIRESORB®, CEROS®, CERASORB®, BIOSORB®, RTR®
		BCP	CALCIRESORB 35®, CERAFORM®, ALASKA®, MBCP®, CROSS-BONE®, SBS60/40®
	Polymères	Ciments acryliques (PMMA) Polyesters aliphatiques	BIOPLANT®, HTR®
	Bioverres	anphalqueo	PERIOGLASS®, BIOGRAN®, BIOGLASS®.
	Sulfate de calcium		LIFECORE®, OSTEOSET
Matériaux composites	Naturels		BIOSTITE®, BIO-OSS®COLLAGEN, RTR®, CALCIRESORB-COLLAGEN™, CERAPATITE- COLLAGEN™, COLLAPAT ®, COLLAGRAFT ®
	Synthétiques		PEPGEN®

<u>Table 2</u> : Exemples de substituts osseux naturels synthétiques et composites selon leur origine. Modifié d'après [120].

# III.3.b.1. Les substituts osseux synthétiques

Ces substituts sont généralement faciles à synthétiser et à bas coût, et sont particulièrement intéressants en cas de considérations éthiques ou religieuses puisqu'ils sont fabriqués sans recours à des éléments d'origine humaine ou animale. Un avantage majeur des substituts osseux synthétiques réside dans l'adaptabilité, dans une certaine mesure, de leur composition (en maitrisant la stœchiométrie des composants) et de leurs caractéristiques physico-chimiques en fonction des besoins. Ces modifications peuvent influer sur leur porosité, surface spécifique, dégradabilité, gonflement, dissolution, adsorption ou relargage d'ions ou de protéines, leur propriétés mécaniques ou encore leur malléabilité[129–142]. Pour la synthèse et la conception de ces substituts osseux synthétiques, l'approche biomimétique est privilégiée,

# Partie 1 – Chapitre III. Atteintes squelettiques, biomatériaux et greffes osseuses

consistant à se rapprocher de la structure et de la composition naturelle de la phase minérale des tissus osseux (faite de cristaux d'hydroxyapatite). Parmi les substituts osseux synthétiques les plus largement représentés, on retrouve les céramiques de phosphate de calcium, principalement l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique, parfois associés sous la forme de phosphates de calcium biphasés[141,143]. Bien que moins répandus, d'autres substituts synthétiques existent comme les sulfates de calcium (le plâtre de Paris) ou encore les bioverres (verres bioactifs).

Concernant leurs propriétés de formation osseuse, la majorité de substituts osseux synthétiques agissent par ostéoconduction. Cette capacité ne suffit généralement pas pour atteindre la régénération osseuse complète du tissu dans de larges défauts, en site hypotrophique ou sans la proximité avec la moelle osseuse. Pour pallier cela, la tendance actuelle du développement et de l'utilisation de ses substituts osseux est de les associer et à des composants chimiques, naturels modifiés, peptides, protéines ou facteurs croissance afin d'obtenir une régénération osseuse satisfaisante dans ces territoires osseux hypo-vascularisés ou sans proximité médullaire[144-150]. Les substituts osseux synthétiques sont très utilisés pour la délivrance de principes actifs, grâce à la maitrise de leur composition et de leur architecture, mais aussi via des modifications chimiques de surface. À titre d'exemple, en augmentant la surface spécifique d'un biomatériau, il est possible d'y adsorber de grandes quantités de principe actif. Cette augmentation de surface spécifique peut être atteinte en diminuant la taille de particules dans le cas d'une poudre par exemple, ou en augmentant les irrégularités de surface ou la porosité pour des solides de grande taille. Enfin, la délivrance de principes actifs peut être achevée via des forces mécaniques, par des variations de concentrations ioniques, de pression oncotique, de pH, ou encore médiée par les cellules du tissu hôte (Fig. 15). Ces facteurs libérés peuvent être de nature très variés, il est possible d'incorporer des molécules chémoattractantes pour recruter ces progéniteurs, des facteurs de croissance (type BMPs,

# Partie 1 – Chapitre III. Atteintes squelettiques, biomatériaux et greffes osseuses

TGFs,) afin de promouvoir leur différenciation, ou encore des molécules inhibant la résorption osseuse. De plus, certains substituts osseux peuvent contenir des antibiotiques, particulièrement utiles en cas de plaie infectée, ou en site à risque comme par exemple dans le cas d'ostéomyélites.

Enfin, les substituts osseux synthétiques sont très utilisés en ingénierie tissulaire, où ils sont associés par exemple à de la moelle osseuse, des concentrés leuco-plaquettaires, des sécrétions cellulaires ou bien à des cellules préalablement sélectionnées. Les cellules utilisées en ingénierie tissulaire peuvent être autologues, prélevées sur le patient à traiter puis amplifiées et/ou différenciées avant d'être utilisées en combinaison avec un substitut osseux. Il peut aussi s'agir de cellules de banques, sélectionnées pour leurs propriétés thérapeutiques. Néanmoins, ces processus restent dépendants du patient à traiter ou des cellules de la banque. Ces thérapies sont aussi généralement longues ou coûteuses, parfois même les deux, en raison des nombreux contrôles qualité requis et des difficultés réglementaires, les facteurs associés aux biomatériaux devant répondre aux normes de fabrication GMP, augmentant drastiquement les coûts de revient de ces adjuvants.

Pour finir, les principaux défauts des substituts synthétiques résident dans leurs propriétés mécaniques faibles en comparaison à l'os natif. De plus, le tissu osseux étant un mélange complexe de minéraux et de nombreuses protéines, la synthèse chimique d'un substitut osseux synthétique biomimétique de nature et structure comparable à l'os natif, ferait perdre l'avantage de la manufacture rapide, facilie et peu onéreuse.



Figure 15 : Exemples de libération de principes actifs sensibles en réponse à l'environnement.

# III.3.b.2. Les greffons osseux xénogéniques

Les greffons osseux utilisés chez l'homme issus d'une espèce différente (bovins, porcins, coraux), sont appelés greffons osseux xénogéniques. Ces derniers sont particulièrement utilisés en chirurgie osseuse maxillo-faciale, péri-implantaire et post-extractionelle. Parmi les substituts osseux d'origine xénogénique, les plus largement utilisés sont ceux d'origine bovine. Tout d'abord, la provenance géographique de l'animal donneur a son importance, principalement afin de limiter le risque de transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). Pour cela, l'organisation mondiale de la santé animale a établi un indicateur servant à évaluer le risque sanitaire en fonction du pays d'origine de l'animal, appelé risque géographique d'encéphalopathie spongiforme bovine (RGE). Ce dernier est un indicateur qualitatif de la

## Partie 1 – Chapitre III. Atteintes squelettiques, biomatériaux et greffes osseuses

probabilité de présence de bovins infectés par l'ESB, à un stade préclinique ou clinique, à un moment donné et dans un pays donné[151–153]. De plus, le risque infectieux de l'ESB s'accumule sur une période d'incubation de plusieurs années, la sélection d'animaux jeunes et en bonne santé est donc un facteur de réduction du risque de transmission. Une série de normes européennes a en outre permis d'harmoniser les moyens mis en œuvre par les banques pour atteindre l'objectif de sécurité imposé aux substituts osseux xénogéniques :

NF EN ISO 22442: « Dispositifs médicaux utilisant des tissus animaux et leurs dérivés »

Partie 1 : application de la gestion des risques.

Partie 2 : contrôles de l'origine, de la collecte et du traitement.

Partie 3 : validation de l'élimination et/ou de l'inactivation des virus et autres agents responsables d'encéphalopathie spongiforme transmissible.

Les séries de traitement des tissus osseux récoltés servent donc à éliminer tous les éléments vivants du tissu (cellules), ainsi que tous les éléments à potentialité pathogène ou immunogène, le tout permettant d'assurer la biocompatibilité du substitut osseux final. Généralement, ces traitements consistent à éliminer toute trace organique dans les tissus afin de ne conserver que la fraction minérale de l'os bovin, dont la structure et composition est similaire à celle de l'os humain. Ces substituts osseux xénogéniques agissent donc uniquement par ostéoconduction, n'ayant aucune potentialité d'ostéogenèse ni d'ostéoinduction.

#### III.3.b.3. Les greffons osseux allogéniques

Les greffons osseux allogéniques, ou allogreffes, sont des tissus osseux d'origine humaine destinés à être greffés chez l'homme, très utilisés depuis des décennies. Ces greffons sont recueillis et distribués par des banques de tissus, réparties sur tout le territoire, sous autorisation de l'ANSM (Fig. 16, Table 3). En France, les greffons osseux d'origine humaine sont très majoritairement prélevés sur des donneurs vivants subissant une opération de pose de

## Partie 1 – Chapitre III. Atteintes squelettiques, biomatériaux et greffes osseuses

prothèse totale de hanche, les têtes fémorales étant considérées comme un déchet opératoire. Ces opérations ont principalement lieu après des fractures du col du fémur ou lors d'une arthrose avancée, pathologies fortement liées à l'âge. De ce fait, l'accroissement et le vieillissement de la population Française augmente le nombre de greffons disponibles. En 2017, 26.479 têtes fémorales ont été récoltées sur l'ensemble du territoire (Table 4). Historiquement, ces têtes fémorales récoltées étaient cryoconservées et utilisées telles qu'elles, sans processus de nettoyage ou de stérilisation. Cette utilisation est la plus ancienne, mais n'est aujourd'hui plus utilisée principalement en raison de la transmission possible de pathogènes, du risque d'immunogénicité, ainsi que de la variabilité de la qualité des tissus osseux. De plus, les températures de conservation étaient trop élevées pour éviter la formation de cristaux de glace, abimant la trame osseuse et diminuant grandement les propriétés mécaniques des greffons[154,155]. De nombreuses améliorations ont été effectuées concernant les processus de préparation des têtes fémorales, mais aussi leur recueil et conservation, les températures de cryoconservations étant aujourd'hui autour de -80°C et la congélation se faisant rapidement afin de prévenir la formation de gros cristaux de glace abimant le tissu[95,156–158].


<u>Figure 16</u> : Répartition géographique des banques de tissus en France et tissus traités [150].

Statut	Cornées	Membranes Amniotiques	Os Massifs	Têtes fémorales	Peau	Artères	Veines	Valves cardiaques	Total
Etablissement Français du Sang	7	7	6	6	4	6	1	5	8
Etablissement de santé	8	9	7	9	5	4	3	4	11
Etablissement privé				5			1		6
Structure associative	1		1	1					2
Etablissement du Ministère de la Défense					1				1
Total	16	16	14	21	10	10	5	9	28

Table 3 : Les différentes banques de tissus en France [150].

Activité Têtes fémorales	2013	2014	2015	2016	2017
Reçu	22640	23314	25848	26458	26479
Distribué	33452	32623	37843	47106	56155
Importé	3211	122	297	126	433
Exporté	2917	4661	4225	4947	7036

<u>Table 4</u> : Activité de traitement des têtes fémorales en France depuis 2017 [150]. Les distribuées réprésentent des unités de greffes, plusieurs unités de greffes peuvent être obtenues à partir d'une tête fémorale.

Ces têtes fémorales sont ensuite traitées et préparées selon des procédés propres à chaque banque d'os. Ces procédés de préparation servent à éliminer les cellules dans le tissu, les pathogènes potentiellement présents (viro-inactivation principalement mais aussi élimination des agents transmissibles du type prions) et les protéines non osseuses résiduelles. Les performances de nettoyage et viro-inactivation étant variables entre les banques, les greffons obtenus après les différents procédés sont de qualité inégale[159], représentant le principal inconvénient des greffons osseux allogéniques.

Lors du nettoyage des têtes fémorales, l'élimination des lipides est la partie critique du procédé de traitement. En effet, le tissu adipeux présent dans la partie trabéculaire de la tête fémorale entraine une forte diminution de la mouillabilité du tissu. Dans ce cas les solvants aqueux utilisés pour le nettoyage se doivent d'être agressifs ou bien agir longtemps pour pouvoir correctement éliminer toutes les cellules, débris, protéines et peptides extra-matriciels[95]. Enfin, la forte imperméabilité de l'os cortical limite grandement la pénétration des solvants dans le tissu, la seule voie de passage étant les canalicules des ostéocytes. Historiquement, les solvants utilisés pour la délipidation des têtes fémorales sont le chloroforme, l'acétone ou encore l'urée qui peuvent altérer la structure du tissu osseux et laisser des traces de composés toxiques dans le tissu, même après rinçage. Des jets de solvants ou d'eau à haute pression peuvent aussi être utilisés pour éliminer les lipides et les éléments cellulaires du tissu, mais au prix d'une forte altération de la trame osseuse[115,156–158,160].

Bien que les traitements des allogreffes altèrent généralement le tissu, la majorité des procédés de nettoyage permettent de conserver la fraction protéique de la matrice osseuse, qui n'induit pas de rejet immunologique. De plus, la conservation quasi intacte des fractions minérales et protéiques du tissu osseux permet au greffon de conserver la majeure partie de ses propriétés mécaniques, c'est pourquoi il est préféré à la majorité des substituts synthétiques et xénogéniques, mais aussi aux autogreffes dans plusieurs applications. En effet, certains greffons

osseux allogéniques ont démontré des capacités régénératrices équivalentes ou supérieures à la greffe d'os autologue dans plusieurs indications, comme en chirurgie pré-implantaire (élévation du plancher sinusien[161,162]), en chirurgie orthopédique (reconstruction acétabulaire[163]), et en chirurgie du rachis (fusion cervicale[116]). De ce fait, l'utilisation de greffons osseux allogéniques dans ces applications supplante peu à peu les greffons osseux autologues ; de par leur efficacité thérapeutique, leur rapidité et facilité d'usage, ainsi que leur cout moindre principalement grâce à la réduction du temps opératoire comparé au prélèvement d'un greffon autologue. De plus, les greffons osseux allogéniques peuvent être manufacturés à façon, ce qui autorise de nombreuses formes et tailles (blocs, lames, poudres, copeaux, pâtes...). Les formes anatomiques ou géométriques (blocs, coins, angles...) sont destinées à des espaces bien précis, par exemple des corrections d'angles de diaphyses, où le chirurgien peut retailler au besoin le greffon au moment de l'opération. Il est aussi possible de manufacturer des greffons sur mesure, en utilisant les données radiologiques d'un patient, afin que le greffon épouse parfaitement les bordures du défaut osseux, favorisant l'ostéoconduction et par extension la régénération osseuse. Ce procédé permet de gagner encore plus de temps opératoire pour la pose d'un greffon car aucune retaille n'est nécessaire au moment de l'implantation.

Néanmoins, les allogreffes osseuses simplement nettoyées et stérilisées agissent uniquement par ostéoconduction. Cependant, le non-rejet immunologique des greffons allogéniques a permis le développement de substituts osseux allogéniques déminéralisés, permettant la libération des facteurs de croissance présents dans la matrice osseuse, incorporés lors de sa formation. En effet, les facteurs de croissance libérés par la déminéralisation de la matrice osseuse vont pouvoir agir sur les différents types cellulaires impliqués dans la repousse osseuse (précurseurs, ostéoblastes, cellules hématopoïétiques...(Cf. Chapitre II)) afin de promouvoir ou d'induire la néoformation de tissu osseux[164–166]. La libération de ces facteurs de croissance via la déminéralisation de la matrice a pour avantage principal de ne pas

utiliser de molécules ou produits exogène au greffon, tous les facteurs de croissance nécessaires à la régénération étant naturellement présents dans le tissu osseux. Il est donc possible d'obtenir des greffons osseux allogéniques ostéoinducteurs de cette manière, ces derniers étant très utilisés notamment en Amérique du Nord[167]. La déminéralisation présente aussi l'avantage de pouvoir « modeler » les greffons allogéniques ainsi traités. En effet, l'élimination de la trame minérale du tissu permet d'obtenir des greffons injectables ou sous forme de pâte, épousant la forme des défauts à combler, plus facile d'utilisation qu'un amas de granules par exemple.

En revanche, les greffons osseux déminéralisés vont perdre totalement leurs propriétés mécaniques, leurs applications seront donc différentes des blocs solides, à moins d'être utilisés en association avec ces derniers. Il a aussi été décrit que la teneur en facteurs de croissance de la matrice osseuse et leur libération après déminéralisation est variable, et tributaire de la qualité du tissu initial et par extension de l'individu donneur[168,169]. Enfin, la revendication réglementaire de l'ostéoinductivité, requiert sa démonstration dans chaque lot de greffon, augmentant drastiquement leurs coûts.

#### **III.4.** Délipidation et fluides supercritiques

Comme évoqué, l'étape critique du nettoyage des têtes fémorales est l'élimination des lipides afin de favoriser la pénétration des solvants aqueux préservant la matrice osseuse, les solvants organiques agressifs classiquement utilisés ou les solvants aqueux à haute pression abimant la structure osseuse. Afin d'éliminer efficacement les lipides sans endommager le tissu osseux, un procédé de nettoyage utilsiant le dioxyde de carbone supercritique (CO<sub>2</sub>-SC), décrit dans le brevet WO2005082432 (A1), a été et développée par la banque de tissu BIOBank pour être appliquée au tissu osseux humain sous le nom de procédé Supercrit<sup>®</sup> [170]. Ce procédé de nettoyage associe séquentiellement une délipidation au dioxyde de carbone à l'état

supercritique, puis une élimination des protéines extra matricielles résiduelles à la soude, peroxyde d'hydrogène, et éthanol[170].

#### **III.4.a.** Les fluides supercritiques

L'état supercritique d'un fluide est atteint lorsqu'il est comprimé au-delà de sa « pression critique » et que sa température est supérieure à sa « température critique », ces valeurs étant dépendantes de chaque fluide (Table 5).

Cet état de la matière a été décrit pour la première fois par Charles Cagniard de La Tour en 1822 décrit comme :

« ... un état intermédiaire de vapeur extrêmement comprimée, ou de vapeur coulante, si l'on peut parler ainsi. »[171,172]

		Température critique (°C)	Pression critique (Bar)
o=c=o	Dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> )	31,06	73,83
0⁺ <u></u> C⁻	Monoxyde de carbone (CO)	-140,23	34,99
H~o~H	Eau $(H_2O)$	373,95	220,64
0=0	<b>Dioxygène</b> (O <sub>2</sub> )	-118,57	50,43
N N	<b>Diazote</b> (N <sub>2</sub> )	-146,95	34
н —— н	Dihydrogène (H <sub>2</sub> )	-239,96	13,13

<u>Table 5</u> : Températures et pressions critiques de quelques fluides courants[165].

En effet, les propriétés physiques d'un fluide dans son état supercritique sont intermédiaires, ou plutôt additionnelles, entre celles d'un liquide et celle d'un gaz, ayant une densité proche de celle d'un liquide mais diffusant comme un gaz. Les fluides supercritiques ont donc conjointement un pouvoir de diffusion et de dissolution très élevé, leur caractère hydrophile ou hydrophobe dépendant de la nature du fluide. Ce caractère hydrophile ou hydrophobe d'un fluide supercritique peut être différent de ses autres états, l'eau supercritique étant par exemple apolaire.

La haute diffusion et le fort pouvoir solvant des fluides supercritiques sont largement exploités, depuis les années 1970s-1980s, dans de nombreuses applications, par exemple en électronique pour nettoyer des composants, en agro-alimentaire et dans l'industrie pharmaceutique pour extraire ou précipiter des composés[173–177].

#### III.4.b. Le dioxyde de carbone supercritique

L'état supercritique du dioxyde de carbone est très facilement atteignable ayant une température critique d'environ 31°C et une pression critique de 73.8 bar (Table 5, Fig. 17) ; à titre d'exemple, la pression contenue dans une bouteille de plongée varie entre 150 et 300 bar. Le CO<sub>2</sub>-SC permet donc de travailler à des températures faibles, très utile sur des composés thermosensibles comme les tissus biologiques. De plus le CO<sub>2</sub>-SC ne laisse pas de résidus toxiques dans les éléments extraits ou nettoyés. Il possède aussi un puissant pouvoir solvant apolaire et peut être séparé des éléments extraits par une simple diminution de pression, faisant retourner le CO<sub>2</sub> dans son état gazeux. Voilà pourquoi le CO<sub>2</sub>-SC est aujourd'hui largement utilisé en agro-alimentaire (extraction de caféine, d'arômes (ail, aneth...), de nicotine, vitamines liposolubles...), ainsi qu'en biochimie et dans l'industrie pharmaceutique (purification d'antibiotiques, acides organiques, extraits de plantes, stéroïdes, élimination de solvants organiques...)[176–178].

Le pouvoir solvant apolaire du CO<sub>2</sub>-SC est aussi utilisé pour le nettoyage de composés électroniques, notamment l'élimination des lipides, et plus récemment la synthèse, le nettoyage et la stérilisation de dispositifs médicaux[174,179–182]. En effet, les propriétés de stérilisation du CO<sub>2</sub>-SC ont été clairement démontrées sur des biofilms bactériens, et certains

52

virus[180,183,184]. D'autres applications dans le domaine biomédical ont vu le jour, comme la stérilisation d'implants dentaires et d'hydrogels mais aussi la décellularisation de tissus (aorte, cornée, tendons)[179,185–187].



Figure 17 : Diagramme pression-température du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) [166].

#### **III.5.** Les greffons osseux BIOBank

Le procédé de délipidation des têtes fémorales Supercrit<sup>®</sup> se base donc sur l'utilisation de CO<sub>2</sub>-SC afin d'éliminer les lipides dans la matrice osseuse[188–192]. Cette délipidation (Fig. 18) autorise ensuite l'élimination des protéines et débris cellulaires extra matriciels résiduels à l'aide de solvants aqueux doux comme de la soude et de l'eau oxygénée (Fig. 19). Ce procédé n'altérant pas le tissu osseux, les têtes fémorales ainsi traitées conservent leur propriétés mécaniques, même après leur stérilisation terminale aux rayons gamma[193–195]. Les greffons taillés dans les têtes fémorales peuvent donc être utilisés en chirurgie reconstructrice en zone porteuse (blocs, coins, angles...) ou bien broyés (copeaux, poudres...) si la conservation des propriétés mécaniques n'est pas nécessaire (Fig. 20).



<u>Figure 18</u> : Représentation schématique du procédé de délipidation des têtes fémorales au CO<sub>2</sub>-SC [189].



<u>Figure 19</u> : Étapes de nettoyage des têtes fémorales par le procédé Supercrit<sup>®</sup>. De gauche à droite : hémi tête native, délipidée, puis nettoyée [189].



<u>Figure 20</u> : Exemples de greffons osseux allogéniques BIOBank, de la tête fémorale entière à la poudre fine [189].

Partie 1 – Objectifs de la thèse

# Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse porte sur la caractérisation et l'amélioration des propriétés de formation osseuse (autrement dit d'ostéoformation ou encore régénératrices) d'un nouveau greffon osseux allogénique sous forme de pâte. Cette pâte d'os se compose de grains partiellement déminéralisés, avec un cœur minéralisé entouré de matrice osseuse déminéralisée. Les grains de ce greffon baignent dans une gélatine résultant de la dénaturation de la matrice osseuse, principalement donc de collagène de type I dénaturé.

Cette pâte a été développée en réponse au besoin de greffons et substituts de greffes osseuses faciles à manipuler pour des utilisations dans des défauts osseux complexes ou difficile d'accès. Ces problématiques se rencontrent tout particulièrement en comblement d'alvéoles dentaires post-extractionelles, comblements sinusiens, et autres interventions de reconstruction osseuse en chirurgie orale et crânio-maxillo-faciale. En effet, dans ces applications la facilité d'usage des greffons et substituts de greffes est un facteur majeur pour limiter le temps opératoire, au bénéfice du patient et du chirurgien.

La première partie de ce manuscrit rappelle quelques généralités sur le squelette, ses modes de régénération, ainsi que les biomatériaux de reconstructions et greffes osseuses.

La deuxième partie de ce document présente les résultats expérimentaux de la caractérisation et l'amélioration *in vitro* et *in vivo* des propriétés régénératrices de la pâte osseuse allogénique BIOBank. Ceci en comparaison avec une poudre d'os allogénique avant sa déminéralisation partielle, utilisée comme matière première pour la fabrication de la pâte osseuse. Les résultats de la caractérisation sont présentés dans l'article expérimental :

« A partially demineralized allogeneic bone substitute: in vitro osteogenic potential and preclinical evaluation in two different intramembranous bone healing models. »

(Tournier et al. Biomaterials, soumis)

Sont décrits par la suite les résultats sur la recherche de l'optimisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse grâce à son association avec des nanoparticules d'hydroxyapatite.

Ce manuscrit se termine à travers des conclusions générales, ainsi que des perspectives quant à la portée du travail effectué.

Des visualisations de la poudre et de la pâte d'os allogénique BIOBank sont disponibles à l'adresse suivante :



https://uncloud.univ-nantes.fr/index.php/s/fW9dRSoPTCPTAaw

Partie 2 – Résultats expérimentaux

## Partie 2 – Résultats expérimentaux

Partie 2 - Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

# Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques

## de la pâte osseuse

## Rationnel de l'étude

La banque de tissu BIOBank a développé un nouveau greffon osseux allogénique sous forme de pâte, tout d'abord pour répondre à un besoin de pratique clinique. Ce besoin s'exprime principalement à travers la demande de substituts osseux et de greffons faciles et rapides à utiliser, pour le bénéfice du patient et du clinicien. Ces biomatériaux pratiques d'utilisation sont développés dans l'optique de remplacer les substituts osseux sous forme de poudre ou de granules.

Les greffons osseux malléables ou injectables existants (Table 6) sont fabriqués à partir de matrice osseuse déminéralisée (DBM), à laquelle peut être ajouté un autre composé (glycérol, gélatine, alginate, sulfate de calcium...). Ce composé additionnel sert généralement à améliorer les propriétés de malléabilité ou d'ajouter une phase minérale au produit fini. Néanmoins, aucun substitut osseux n'est constitué de tissu allogénique partiellement déminéralisé, sans aucun ajout de matière exogène.

Commercially available product	Composition	Commercially available forms
AlloFuse™	Heat-sensitive copolymer with DBM	Injectable gel and putty
InterGro*	DBM in a lecithin carrier	Paste, putty, and mix with HA/CC composite granules
ALLOMATRIX*	DBM with/without CBM in surgical grade calcium sulfate powder	Various volumes of injectable/ formable putty
allomatrix® RCS	DBM with CACIPLEXTM Technology in surgical grade calcium sulfate powder	Various volumes of formable putty
Progenix™ DBM Putty	DBM in type1 bovine collagen and sodium alginate	Ready to use injectable putty
Osteofil <sup>®</sup> DBM	DBM in porcine gelatin	Injectable paste
Puros* Demineralized Bone Matrix	DBM putty	Putty
Grafton®	DBM combined with glycerol	Formable putty, injectable gel, putty mixed with chips, flexible sheets, and matrix
Graft on Plus®	DBM combined with a starch carrier	Paste
BioSet™	DBM combined with natural gelatin carrier	
VIAGRAF	DBM combined with glycerol	Putty, paste, gel, crunch, and flex
Accell 100™	DBM putty	Injectable putty
Accell Connexus®	DBM plus reverse phase medium	Injectable putty

<u>Table 6</u> : Exemples de quelques sustituts osseux injectables ou malléables naturels à base de matrice osseuse déminéralisée. Modifié d'après [159].

La pâte osseuse développée par BIOBank quant à elle est composée de grains de poudre d'os allogénique partiellement déminéralisés entourés de collagène de type I dénaturé. Le procédé de fabrication de la pâte osseuse développée par BIOBank est décrit dans le brevet n° WO 2015/162372 A1 [196]. Sa matière première est une poudre d'os allogénique spongieuse, corticale ou cortico-spongieuse (0,3-1mm) obtenue après broyage de têtes fémorales humaines nettoyées (Cf. III.5). Cette poudre d'os est plongée dans un bain d'acide chlorhydrique afin d'éliminer une partie de la matrice minérale des grains, le traitement acide permettant de mimer

#### Partie 2 - Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

la déminéralisation de la matrice osseuse médiée par les ostéoclastes dans la lacune de Howship. La solution acide est neutralisée avant la déminéralisation complète des grains de poudre, ces derniers conservant donc une partie de leur matrice osseuse minéralisée en leur centre (Fig. 21). Les grains de poudre partiellement déminéralisés (PPD) sont ensuite hydratés puis chauffés à 121°C en autoclave. Cette étape de chauffage transforme une partie de l'enveloppe externe des grains de PPD hydratés en gélatine (le collagène de type I dénaturé), enveloppant les grains et remplissant les espaces entre ces derniers pour obtenir une pâte malléable prête à l'emploi. Le passage à l'autoclave permet aussi la stérilisation de cette pâte. Le greffon final est donc une pâte malléable, pouvant s'extruder à travers une seringue par exemple, conservant ces propriétés de malléabilité à 37°C, lui permettant de s'adapter aux formes irrégulières des défauts osseux dans lesquels elle est placée. De plus, cette pâte est prête à l'emploi et rapide à utiliser, ne requérant pas d'ajout de substance, de mélange, d'hydratation ou d'incubation avant son utilisation.



<u>Figure 21</u>: Aspect de la poudre (a-c) et de la pâte (d-f). (a,d) Observations en microscopie optique à l'air, barres d'échelles :  $500\mu m$ . (b,c,e,f) Observations au microscope électronique à balayage, barres d'échelles :  $100\mu m$  (b,e),  $20\mu m$  (c,f).

#### Partie 2 - Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

Cette pâte osseuse a aussi été développée dans l'optique de pallier les défauts de régénération osseuse des allogreffes minéralisées (tels que la poudre d'os avant sa déminéralisation partielle) ainsi que des allogreffes totalement déminéralisées. En effet, comme évoqué dans le paragraphe III.3.e de ce manuscrit, les allogreffes non déminéralisées agissent uniquement par ostéoconduction (limitant l'efficacité thérapeutique dans les zones difficiles à régnérérer), alors que les allogreffes totalement déminéralisées peuvent agir via ostéoinduction avec néanmoins des résultats variables entres les sources d'allogreffes, les individus donneurs, et les procédés de préparation.

L'innovation dans la fabrication de cette pâte osseuse allogénique réside dans la conservation d'une fraction minérale au cœur des particules du greffon, et la génération d'un liant aux particules sans ajout de matière exogène, naturelle ou synthétique. Néanmoins, l'autoclavage de la pâte, devrait abolir les propriétés d'ostéoinduction de ce greffon, les facteurs de croissance de la matrice osseuse libérés lors de la déminéralisation étant thermolabiles.

L'objectif de ce travail était de caractériser les propriétés régénératrices (d'ostéoformation) de cette pâte osseuse allogénique développée par BIOBank, en utilisant comme comparateur la poudre d'os allogénique avant sa déminéralisation partielle.

Cette analyse des propriétés de repousse osseuse s'est d'abord effectuée *in vitro*, en plaçant au contact des greffons des cellules stromales mésenchymateuses humaine provenant de moelle osseuse (hBM-MSC). La viabilité et l'adhésion de ces cellules ont été tout d'abord évaluées afin d'estimer si le procédé de préparation de la pâte osseuse avait des conséquences sur le comportement de ces cellules à son contact. Nous savons en effet que l'adsorption ou la libération de molécules (ions, protéines...) peut influer sur le comportement de cellules au contact ou à distance de biomatériaux en fonction de leurs procédés de fabrication. De plus, l'autoclavage de la PPD afin de générer la pâte osseuse peut modifier la chimie de surface des particules du greffon et ainsi altérer l'interaction des cellules à leur contact. Par la suite, nous

avons mesuré l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) dans ces cellules cultivées en absence ou présence de facteurs ostéogéniques. Cette enzyme est impliquée dans le processus de minéralisation de la matrice osseuse, en hydrolysant du pyrophosphate inorganique (PPi) en phosphate inorganique (Pi) pour la formation des cristaux d'hydroxyapatite. La modification de l'activité de cette enzyme est donc un indicateur de la capacité des cellules à minéraliser leur matrice et de ce fait à former un tissu osseux[197–200]. Pour finir avec les études *in vitro* sur cette pâte, nous avons obtenus des monocytes humains circulants isolés de sang grâce à la plateforme « Développement et Transfert Clinique » de l'Hôpital de Nantes (DTC, CIC Biothérapies 0503) et une collaboration avec le CRCINA (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers). L'effet de la pâte sur le phénotype pro- ou antiinflammatoire de ces monocytes a été évalué, l'inflammation et sa modulation jouant un rôle primordial dans la régénération osseuse (Cf. II.3).

Par la suite, l'effet régénératif de la pâte a été évalué *in vivo*, dans deux modèles de régénération osseuse intramembranaire dans la calvaria de rat, tout d'abord en régénération osseuse guidée (ROG), puis dans des défauts osseux de taille critiques (Fig. 22).



Figure 22 : Description du mode opératoire des modèles animaux utilisées dans cette étude. (a) ROG, (b) défauts critiques.

Le choix du site opératoire, la calvaria de rat, a tout d'abord été fait sur la base de son mode de régénération intramembranaire (Cf. II.1) qui est identique à l'ossification des os de la mâchoire et de la plupart des os maxillo-faciaux chez l'humain. En effet, la malléabilité de la pâte osseuse la rend particulièrement intéressante pour des comblements osseux difficiles d'accès ou irréguliers, comme dans des défauts mandibulaires et maxillo-faciaux. Le choix de l'espèce (*Rattus norvegicus*) s'est effectué grâce à la taille des animaux, ayant un crâne suffisamment large pour effectuer plusieurs défauts osseux de taille conséquente par animal, contrairement à des souris. Ces animaux sont en outre robustes, récupérant très rapidement après une opération et une anesthésie générale, avec peu de complications per- et postopératoires. De plus, notre laboratoire possède les compétences techniques et un recul scientifique sur l'utilisation de ces animaux dans de nombreux modèles[201–208]. Enfin d'un point de vue logistique, ce sont des animaux dociles, faciles à héberger et à bas coûts, en comparaison à des espèces de lagomorphes par exemple.

Les deux modèles de régénération osseuse (ROG et défauts critiques) diffèrent uniquement par la pose d'une membrane recouvrant les défauts pour le modèle de ROG. Cette procédure se base sur l'exclusion par une barrière physique des cellules provenant des tissus mous alentours, tels que les fibroblastes, afin de les empêcher de remplir l'espace du défaut osseux et laisser le champ libre aux cellules progénitrices. De nombreuses membranes de ROG existent en fonction de leurs caractéristiques (rigidité, résorption...). Les membranes de polytétrafluoroéthylène (PTFE) sont largement utilisées en ROG en territoire oraux et maxillofaciaux, c'est pourquoi nous avons choisi ce type de membrane dans notre modèle[209–211]. Cette première étude *in vivo* dans un modèle de ROG a servi à démontrer que la repousse osseuse est capable de s'effectuer au contact de la pâte osseuse.

#### Partie 2 - Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

Le modèle de défaut critique quant à lui, nous a permis d'apprécier le potentiel de régénération osseuse de la pâte dans des conditions beaucoup moins favorables à la repousse osseuse. En effet, la calvaria de rat est une zone peu vascularisée et sans moelle osseuse (chez des rats de 8 semaines) donc une proximité pauvre en cellules ostéoformatrices, progéniteurs et facteurs de croissance. Dans ce modèle, le potentiel ostéoconducteur seul d'un biomatériau ne suffit pas à générer une repousse osseuse suffisante pour cicatriser les défauts, comme démontré dans la littérature avec des comblements de clavaria par des substituts osseux synthétiques comme des phosphates de calcium biphasiques (BCP)[201,202].

### Article expérimental

Les résultats expérimentaux obtenus sont décrits dans l'article suivant :

"A partially demineralized allogeneic bone substitute: *in vitro* osteogenic potential and pre-clinical evaluation in two different intramembranous bone healing models."

# A partially demineralized allogeneic bone substitute: *in vitro* osteogenic potential and pre-clinical evaluation in two different intramembranous bone healing models

Pierre Tournier<sup>1,2,3</sup>, Jérôme Guicheux<sup>1,2,4,5</sup>, Arnaud Paré<sup>1,2,6</sup>, Aymeric Maltezeanu<sup>1,2</sup>, Thibaut Blondy<sup>7</sup>, Joëlle Veziers<sup>1,2,4,5</sup> Caroline Vignes<sup>1,2,5</sup>, Manon André<sup>1,2,5</sup>, Julie Lesoeur<sup>1,2,5</sup>, Ana Barbeito<sup>3</sup>, Raphaël Bardonnet<sup>3</sup>, Christophe Blanquart<sup>7</sup>, Pierre Corre<sup>1,4,8</sup>, Valérie Geoffroy<sup>1,2+</sup>, Pierre Weiss<sup>1,2,4\*+</sup>, Alexis Gaudin<sup>1,2,4+</sup>

<sup>1</sup>INSERM, Université de Nantes, UMR 1229, RMeS, Regenerative Medicine and Skeleton, ONIRIS, Nantes, F-44042, France
<sup>2</sup>Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes, F-44042, France
<sup>3</sup>BIOBank SAS, Presles-en-Brie, France
<sup>4</sup>CHU Nantes, PHU4 OTONN, Nantes, F-44093, France
<sup>5</sup>INSERM, UMS 016, CNRS 3556, Structure Fédérative de Recherche François Bonamy, SC3M Facility, CHU Nantes, Université de Nantes, Nantes, F-44042 France
<sup>6</sup> Service de Chirurgie Maxillo-faciale, Plastique et Brulés, Hôpital Trousseau, CHU de Tours, F – 37170, France
<sup>7</sup>CRCINA, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France
<sup>8</sup> Service de chirurgie Maxillo-faciale et stomatologie, CHU de Nantes, Nantes F-44093, France

<sup>+</sup>*Authors who contributed equally* <sup>\*</sup>*Corresponding author* 

#### ABSTRACT

Autologous bone grafts continue to be the gold standard for bone augmentation procedure in case of large bone defects when the tissue fails to self-repair. However, to overcome the numerous drawbacks of autologous bone grafts, allogeneic bone has been used extensively for decades as a reliable alternative. In this study, we assessed the regenerative potential of a partially demineralized allogeneic bone paste that combines rapidity and ease of use. *In vitro*, this bone paste maintained the viability, allowed for better adhesion, and resulted in higher alkaline phosphatase activity in primary human bone marrow mesenchymal stromal cells (hBM-MSC) compared to an allogeneic bone powder before its partial demineralization (the entity from which the bone paste is derived). Moreover, the bone paste was able to induce a pro-regenerative phenotype in human monocytes in a pro-inflammatory environment compared to the bone powder. *In vivo*, the bone-forming ability of the paste was evidenced by three-dimensional radiological quantification, histological and immunohistochemical observations in a guided bone regeneration model, and in a critical size defect model in rat calvaria. To our knowledge, this study is the first to demonstrate the regenerative potential of a moldable partially demineralized allogeneic bone paste.

#### Keywords

Allogeneic bone, MSC, calvaria, macrophage polarization

#### 1. Introduction

Bone tissue is well known to exhibit a capacity for self-healing. However, bone grafts and substitutes are required to heal complex or large bone defects. Two million bone grafts are performed annually worldwide in numerous surgical applications such as the treatment of deformities, traumatisms, non-union fractures, or pre-implant dental surgeries[1,2]. In these clinical contexts, autologous bone grafts remain the gold standard. This reference technique has a high success rate as a result of the combination of osteoconductivity (the ability to provide a structural support for bone regrowth), osteogenicity (the promotion of osteoblastic differentiation of progenitors cells), and osteoinductivity (the induction of bone growth in large bone defects or heterotopic site mainly thanks to growth factors in the bone and marrow environment)[3–6]. However, the success of autologous bone grafts remains dependent on the donor site and the graft indication[4]. Despite its many advantages, this reference technique also suffers from numerous serious per- and post-operative drawbacks. Among these, the potential donor site morbidities (e.g., pain, hematoma, blood loss, nerve injury, the risk of bone fracture[3,4,7–18]), the additional operative time, the limited available bone (e.g., iliac crest, calvarial bone), and the occasional need for a second surgical team are the main limitations of this procedure. To overcome these limitations, several alternatives such as bone substitutes and xenogeneic or allogeneic bone grafts have been considered.

Allogeneic bone is reliable and has been used extensively for decades as an alternative to autologous bone grafts [19–21]. The use of allogeneic bone has several advantages over autologous bone. The amount of allogeneic bone is virtually unlimited, and it can be obtained in various sizes and shapes (blocks, blades, paste, putty, powder, chips, injectable, etc.). The duration of the surgery is shortened without the need for a bone harvesting procedure. Moreover, allogeneic bone grafts exhibit the same bone healing capacities as autografts in multiple indications such as pre-implant dental surgery (sinus floor augmentation[22,23]), orthopedic surgery (acetabular grafting[24]), and spine surgery (cervical fusion[5]). Consequently, allogeneic bone grafts are increasingly being used over autologous bone grafts.

Femoral heads are a widely used source for allogeneic bone, and they can be harvested after a total hip replacement from living donors. Over the years, many improvements have been made in terms of the production, preservation, and storage of femoral heads[9,25,26]. The main challenges with allograft preparations lie with ensuring their microbial safety and immunotolerance[27]. Therefore, in order for bone allografts to be entirely safe, the cleaning process needs to remove all of the cells, debris, and extracellular matrix proteins and peptides[1]. Although such cleaning procedures abolish the osteogenic properties of the grafts, and they alter the bone matrix structure, they do allow their osteoconductivity to be maintained. Moreover, depending on the demineralization processes, osteoinductivity can be obtained by demineralization of the bone matrix, assuming that the growth factors in the bone matrix are preserved[9,26,28–31]. In light of the need to handle bone grafts in irregular or hard-to-reach areas, especially in craniomaxillofacial bone surgery or in pre-implant dentistry, a ready-to-use, easy-to-handle, extrudable, and moldable human bone graft for bone regenerative medicine has been developed (BIOBank, France)[32]. This allogeneic bone paste is made of partially demineralized bone powder particles, comprising a mineral core surrounded by a demineralized bone matrix, engulfed in a collagen-rich gelatin, that does not require any mixing, rehydration, or reconstitution prior to its use. Such a bone paste could replace the bone substitutes in powder forms if it exhibits at least a similar bone regenerative capacity. Investigation of the regenerative properties of such a graft is, therefore, of considerable relevance to the maxillofacial applications. In this context, the present work was aimed at providing a thorough assessment of the bone healing capacity on this allogeneic bone paste compared to an allogeneic bone powder before its partial demineralization.

In this study, we investigated *in vitro* the effect of the bone paste on the viability, adhesion, and alkaline phosphatase activity of primary human bone marrow mesenchymal stromal cells (hBM-MSC) as well as the polarization of primary human monocytes isolated from circulating blood. We also assessed and confirmed the *in vivo* regenerative properties of this innovative bone paste in two preclinical models of intramembranous bone healing. A guided bone regeneration and a critical size defect model in rat calvaria were used to simulate healing in oral and maxillofacial defects such as dental post-extraction and jaw surgeries.

#### 2. Materials and Methods

#### 2.1. The process to obtain the bone paste

The allogeneic bone powder and bone paste from donor pools were obtained from BIOBank, France. Briefly, human femoral heads were harvested from living donors who had undergone a total hip replacement surgery. Cleaning of the femoral heads was ensured by supercritical CO<sub>2</sub> extraction followed by successive immersions in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaOH, and EtOH, leaving the bone matrix defatted, virally inactivated, and unaltered (Supercrit® process)[33–36]. The bone powder (0.3 to 1 mm in diameter, Fig. 1) was obtained from crushed femoral heads. In order to obtain a bone paste, this bone powder was partially demineralized with HCl. It was then hydrated with water to make it an injectable preparation and heated (121 °C) to ensure partial transformation of the outer demineralized collagen of the particles into gelatin and simultaneous sterilization of entire bone graft (patent N°WO2015/162372 A1)[32].

The bone paste is cohesive in both air (Fig.1b, e) and water (Fig.1d, f) and is composed of particles consisting of a mineralized core (Fig. 1f, black arrows) surrounded by demineralized bone matrix (Fig. 1f, white arrows) engulfed in type I collagen-rich gelatin (from type I collagen naturally present in the bone matrix). The bone and paste in air and in water were imaged with transmitted light (Leica DM12 LED, Wetzlar, Germany) or with reflected light (Leica M125). For all of the X-ray micro-computed tomography ( $\mu$ CT), the samples were scanned with a SkyScan-1072 (Bruker, Billerica, USA) under the following conditions: 70 kV, 142  $\mu$ A, resolution = 18 $\mu$ m, single 360° scan, Al 0.5mm filter, averaging frames =4, rotation = 0.710°. A three-dimensional dataset was reconstructed with NRecon software (Micro Photonics Inc, Allentown, USA). For scanning electron microscopy (SEM) imaging, the samples were sputtered with a gold plasma (Sputter Coater Desk V Denton Vacuum, Moorestown, USA) and placed in the void chamber of the electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). All of the images were taken using a secondary electron detector set at 10 kV.

# 2.2. Effect of the bone powder and the bone paste on the behavior of human bone marrow mesenchymal stromal cells (hBM-MSC)

hBM-MSC from two independent donors (one male and one female) (PromoCell, Heidelberg, Germany) were cultured in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks (Corning, USA) with 10 mL of PromoCell Growth Medium supplemented with 1% penicillin-streptomycin (P/S) (Invitrogen, Paisley, UK) changed every other day, in a humidified atmosphere at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> (Air Liquide, Paris, France). The cells were passaged when they reached 70-80% confluency. The cells were always used between passages 2 and 5.

For the viability test, hBM-MSC were seeded in 96-well plates (Corning, Avon, France) at  $1\times10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in culture medium (DMEM/Ham's F12 (1:1), high glucose, GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific) with 15% fetal calf serum (FCS, Dominique Dutscher, Brumath, France) and 1% P/S, and then incubated in a humid atmosphere at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The powder was rehydrated with 1X PBS (0.6 mL/cc) for 10 min prior to the experiment. The bone powder or the bone paste (0.05 cc/well, 26 and 37 mg, respectively) were added to 2D adherent cells. After 1, 2, and 4 days, the DNA content of the cells (which correlates with the cell

number) was measured with Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen® dsDNA Reagent (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions.

For the adhesion assay, the bottoms of 24-well plates (Ultra-Low Attachment Surface, Corning) were covered with the bone powder or the bone paste (0.125 cc/well, 66 and 93 mg, respectively). One milliliter of proliferative medium was added to each well and the plates were incubated in a humid atmosphere at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The medium was then removed and  $1\times10^5$  hBM-MSC were seeded in each well. After 1 h, 3 h, and 6 h of contact between the hBM-MSC and the bone powder or the bone paste, the cells were rinsed extensively with 1X PBS at 37 °C to remove the non-adherent cells. The DNA in the adherent cells in contact with the bone powder or the bone paste was measured as described above, and then normalized to the surface of the particles measured by  $\mu$ -CT. For confocal imaging, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min, then permeabilized with Triton X-100 (1% in PBS) for 10 min at room temperature. The adherent cells were then labeled with Phalloidin-Alexa Fluor® 568 (1:200, Thermo Fisher Scientific) in 1X PBS at room temperature for 1 h, and the nuclei stained with Hoechst 33258 (1:50,000, Thermo Fisher Scientific) for 15 min at room temperature. The cell samples were imaged using a confocal microscope (A1RS, Nikon, Champigny sur Marne, France).

For the ALP activity assay, the bone powder and the bone paste were placed in lowbinding 24-well plates as described above. The culture medium was removed and  $1 \times 10^5$  hBM-MSC were seeded in each well. After 48 h, the medium was changed or replaced with culture medium with or without osteogenic factors (50 µM ascorbic acid (Thermo Fisher Scientific), 10 mM β-glycerophosphate (Thermo Fisher Scientific), and 100 nM dexamethasone (Thermo Fisher Scientific)). The medium was changed every other day for 14 or 21 days. The ALP activity was measured with an Alkaline Phosphatase Substrate kit (Bio-Rad, Hercules, USA) and the total protein content was measured using a BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. The results were then expressed as nmol pNP/µg protein/min.

#### 2.3. Monocyte/macrophage polarization

Monocytes and human serum (HS) from circulating blood were obtained from the clinical transfer platform of Nantes Hospital (PF DTC, CIC 0503). Monocytes were seeded in 12-well plates at a density of  $1.25 \times 10^6$  cells in 2.5 mL of culture medium (RPMI 1640, Thermo Fisher Scientific), 8% HS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin). To induce pro-inflammatory "M1-like macrophages", the medium was supplemented with GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) at 20 ng/mL (CellGenix GmbH, Freiburg im Breisgau, Germany), while to induce pro-regenerative "M2-like" macrophages, the medium was supplemented with M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) at 50 ng/mL (Isokine, Kopavogur, Iceland), for 3 days as previously described[37]. The cells were cultured in contact with the bone powder, the bone paste (0.125 cc/well, 66 and 93 mg, respectively), or without contact as a control. After 3 days, lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) at 200 ng/mL was added to all of the wells and the total RNA was extracted after 6 hours.

The total RNA was prepared with TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific), followed by Nucleospin XS RNA columns (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer's instructions. A 0.5  $\mu$ g quantity of the total RNA was reverse transcribed and analyzed using a Bio-Rad CFX96 detection system using SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix (Thermo Fischer Scientific). The relative mRNA expression was normalized to the expression of the *B2M* and *PPIA* housekeeping genes and calculated using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> method with Bio-Rad CFX Manager software. The primer sequences and the names of the target and the housekeeping genes are indicated in Table 1.

Gene	Common name	Primer names/sequence	Supplier	
IL-12	Interleukin 12	QT0000364	Qiagen	
IL-6	Interleukin 6	QT00083720	Qiagen	
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha	QT01079561	Qiagen	
TGF-β	Transforming growth factor beta	QT00000728	Qiagen	
IL-10	Interleukin 10	QT00041685	Qiagen	
VEGF-A	Vascular endothelial	F: 5' GCTGTCTTGGGTGCATTGGA	Eurofins	
	growth factor A	R: 5' ATGATTCTGCCCTCCTCCTTC		
B2M	Poto? microalchulin	F: 5' CCTGGAGGCTATCCAGCGTA	Eurofina	
	Deta2-microgrobumi	R:5' GGATGACGTGAGTAAACCTGAATCT	Luionns	
PPIA	Peptidyl prolyl	F: 5' GTCAACCCCACCGTGTTCTT	Eurofina	
	isomerase A	R: 5' CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT	Luioiiiis	

 Table 1: Targets, primer names, and sequences used for the RT-qPCR analysis of mRNA expression in human monocytes/macrophages. F: forward, R: reverse.

#### 2.4. In vivo analyses

#### 2.4.1. Animals and ethical aspects

All of the procedures involving animals were conducted in accordance with the institutional guidelines of the European and French Ethics Committee and approved by the local ethics committee (CEEA.Pdl.06) (agreement  $n^{\circ}$  2016111513349765 / APAFIS 8560 and 201802021521 / APAFIS 15410). A concerted effort was made to minimize physical and psychological suffering and to reduce the number of animals used. Seven-week-old syngeneic male Lewis rats were purchased from an approved breeder (Charles River, Écully, France).

#### 2.4.2. Surgical procedures

The animals were allowed to acclimate for a week at the animal facility before the surgery. The acclimated animals were anesthetized by inhalation of a 4% air/isoflurane (Centravet, Dinan, France) mixture in a closed induction chamber. Throughout the surgical procedures, the animals were placed on a heating carpet, and the anesthesia was maintained with an air/isoflurane mixture (2% isoflurane) through an inhalation mask. The operating site (the top of the skull) was shaved and the skin was cleaned with sterile water and iodized polyvidone (Betadine (Centravet)). Preoperative analgesia was performed by a subcutaneous injection of lidocaine (Xylocaine (Centravet)) at 5 mg/kg on the shaved and cleaned area, and subcutaneous injections of buprenorphine (Buprecare (Centravet)) at 0.02 mg/kg and meloxicam (Metacam (Centravet)) at 1 mg/kg in the back of the rats. After several minutes (for the lidocaine to take effect), the skin and periosteum were incised and pushed back on the sides. A full-thickness bilateral paramedian parietal craniotomy was performed using a 5-mm outer diameter trephine (two defects per rat). The defects were abundantly irrigated with saline solution to avoid cauterization of the edges of the defects by the trephine. Afterward, the defects were left unfilled as a negative control or filled with the bone powder (rehydrated with 0.9% NaCl (0.6 mL/cc) for 10 min) or the bone paste. The defects were covered with a polytetrafluoroethylene membrane to obtain a guided bone regeneration (GBR) model, or left uncovered to obtain a critical size defect model[38]. The skin was then sutured (5/0, nonabsorbable suture (Ethicon, Bridgewater, USA)) and the animals were returned to their cages with water and food *ad libitum*. The postoperative analgesia was provided by subcutaneous injection of buprenorphine at 0.02 mg/kg twice daily for 3 days and meloxicam at 1 mg/kg mixed in their water supply for 5 days. After 7 weeks for the GBR model, and after 3 or 7 weeks for the critical size defect model, the animals were euthanized in a CO<sub>2</sub> enclosed chamber. The calvaria were collected using sharp scissors inserted through the *foramen magnum* and the skulls were cut following the temporal crest to the frontal bone, above the coronal suture. The calvaria were fixed in 4% PFA for 72 h and then stored in 70% ethanol.

#### 2.4.3. Radiological quantification

All of the calvaria were scanned using  $\mu$ -CT as mentioned above. The mineral volume (MV) within the tissue volume (TV) within the defects was quantified with the CTAn software. Tree-dimensional quantitative results were expressed as MV/TV (%) after 3 or 7 weeks. In order to assess the mineral volume augmentation during the regeneration, we measured the (MV/TV)<sub>0 weeks</sub> in the defects after surgery in additional animals. MV/TV (fold change related to 0 weeks) were then expressed as (MV/TV)<sub>3 or 7 weeks</sub> / (MV/TV)<sub>0 weeks</sub>.

#### 2.4.4. Histological and immunological analyses

Fixed samples were dehydrated by means of a graded series of ethanol baths. Nondecalcified bone specimens were infiltrated and embedded in Technovit 9100 New (Heraeus Kulzer, Les Ulis, France). For each sample, a frontal section was performed through the defects of each explant using a circular diamond saw (Leica) and serial 7-µm sections were cut using a hard tissue microtome (Polycut, Leica). The sections were stained with Movat's pentachrome (Thermo Fisher Scientific) and scanned with a slide reader (NanoZoomer®, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan).

Single immunostaining was performed with three antibodies (anti-CD68: 1:500 ab125212, anti-CD163 (scavenger receptor): 1:2,000 ab182422, or anti-iNOS (inducible nitric oxide synthase): 1:250 ab15323 (Abcam, Cambridge, UK). The labeling was visualized with a horse anti-rabbit peroxidase-conjugated antibody (Vector, Burlingame, USA) and 3,3– diaminobenzidine (DAB) (Vector). The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin (Microm Microtech, Brignais, France).

For double CD68/CD163 fluorescent labeling, the samples were processed as described above. The incubation with CD163 (1:2,000) was followed by incubation with a secondary antibody (Alexa Fluor® 568-conjugated goat anti-rabbit 1:200, ab17471). The CD68 (1:500) was then added, followed by Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-rabbit (1:200, ab150081 (Abcam)). All of the slides were scanned with a slide reader (NanoZoomer®).

#### 2.4.5. Statistical analyses

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, USA). Statistical significance was determined using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test for multiple group comparisons with different variables, or t-test for two-group comparisons. Statistical significance was set at p < 0.05. Unless stated otherwise, the experiments were repeated at least three times. The results are presented as means  $\pm$  the SEM.



Partie 2 – Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse Macroscopic Microscopic

μ-CT

SEM



**Figure 1:** Images of the bone powder and the bone paste particles. The bone powder exhibited angular particles, while the bone paste was composed of smoother particles with a mineralized inner core (white arrows) and an outer demineralized bone matrix (black arrows). μ-CT revealed denser samples for the bone powder compared to the bone paste. SEM images revealed the fibers of the bone matrix on the surface of the bone powder particles as well as the modified surface of the bone paste particles. The dashed yellow square indicates the magnified area.

#### 3. Results

3.1. Behavior of hBM-MSC in contact with the bone powder or the bone paste



**Figure 2:** Behavior of hBM-MSC cultured in contact with the bone powder or the bone paste. hBM-MSC were cultured in contact with the bone powder or the bone paste for 1, 3, and 6 h in low-binding dishes. (a) Representative confocal images of stained hBM-MSC. Red (phalloidin-AF568): F-actin, blue (Hoechst): nucleus. Scale bars: 100  $\mu$ m (b) Quantification of the total DNA in hBM-MSC in contact with the bone powder or the bone paste. (c,d) hBM-MSC were grown with or without osteogenic factors for 14 and 21 days prior to SEM imaging (c), Scale bars: 20  $\mu$ m, and ALP activity measurements (d). All of the results are expressed as the means ± the SEM (N=3, n=3; \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 \*\*\*: p<0.001)

We first investigated the attachment of hBM-MSC in contact with the bone powder or the bone paste in a proliferative medium at short time points, as well as their osteogenic differentiation in longer-term culture on the surface of the bone powder or on the bone paste particles.

We first labeled the cells with phalloidin-Alexa Fluor 568 (F-actin) and Hoechst (nuclei), and we used confocal imaging to determine their shape when in contact with the bone powder or the bone paste. When in contact with either graft, the hBM-MSC had similar round, spread out, or elongated shapes at all of the time points (Fig. 2a). The bone powder and the bone paste particles were visible as a result of their blue autofluorescence. Quantification of the DNA (ng DNA/cm<sup>2</sup>) revealed no difference after 1 h of contact. However, after 3 h and 6 h, the DNA quantifications were 60% and 70% higher, respectively, in the cells cultured in contact with the bone powder (Fig. 2b).

To determine whether the bone powder or the bone paste may affect the osteogenic differentiation of hBM-MSC, we cultured these cells in contact with the particles in medium with or without osteogenic factors for 14 and 21 days. As seen by SEM, the cells were able to colonize the bone powder and the bone paste particles with or without osteogenic factors, and they had elongated cellular bodies and cytoplasmic expansions (Fig. 2c, white arrows). Interestingly, cohesion with the bone paste particles allowed the cells to create a network from particle to particle, in culture or in osteogenic medium. at all of the time points (Fig. 2c). This phenomenon was not observed with the cells cultured in contact with the bone powder.

Finally, to evaluate the osteogenic fate on the hBM-MSC cultured in contact with the bone powder or the bone paste, colorimetric assays were performed to measure the ALP activity in cell lysates. We found that the ALP activity was higher in the hBM-MSC cultured in contact with the bone paste compared to the cells in contact with the bone powder, both in proliferative and in osteogenic medium, after 14 and 21 days. Without osteogenic factors, the ALP activity was 3.3 and 2.7 times higher after 14 and 21 days, respectively (Fig. 2d). With osteogenic factors, the ALP activity was 7.3 and 4.6 times higher after 14 and 21 days, respectively (Fig. 2d).

Altogether, these data demonstrate that the bone paste is a better support for hBM-MSC osteogenic differentiation than the bone powder.

#### Partie 2 – Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

3.2. In vivo analysis – guided bone regeneration model

a





**Figure 3:** Rat calvaria healing 7 weeks after surgery in a guided bone regeneration model. (a) Representative images of the reconstructed  $\mu$ -CT acquisitions (yellow arrows: newly formed bone, white arrows: graft particles) and histological observation of the defects with Movat's pentachrome staining of undecalcified 7- $\mu$ m thick frontal sections. The control represents the defects with the GBR membrane without bone grafts (unfilled defects). Scale bars: 1 mm for the X-ray images, 250  $\mu$ m for the histological full defects, and 100  $\mu$ m for the histological magnification (dashed square). Dark yellow: collagen in the mature bone, light red: cytoplasm, dark red: osteoid borders, brown: nucleus. *Ft*: fibrous tissue, *oc*: osteocyte, *nb*: newly formed bone, *vs*: blood vessel, *gr*: graft. (b) Three-dimensional  $\mu$ -CT quantitative analysis of the mineral volume (MV) within the tissue volume (TV) in the defects at the time of surgery (0w, baseline) and 7 weeks (7w) after surgery. (c) MV/TV (fold change from baseline) 7 weeks after surgery in the grafted defects. Results are expressed as the means  $\pm$  the SEM (n=6) \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.001)

#### Partie 2 – Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

To mimic clinical indications of guided bone regeneration (alveolar socket preservation, horizontal ridge augmentation), the ability of the bone paste and bone powder to support bone healing was first assessed in a GBR model in rat calvaria.

The defects were histologically analyzed using Movat's pentachrome staining of undecalcified sections. The histological analyses revealed the presence of a dark yellow tissue (Fig. 3a), indicative of collagen-rich bone, as observed in the native bone outside the defects. In the unfilled defects, the newly formed bone exhibited a collagen-rich matrix and a lamellar structure similar to the native bone tissue, with numerous osteocytes (Fig. 3a, oc) and a number of vessels (Fig. 3a, vs). A degree of fibrous tissue could be seen above the healed bone, and in the defects (Fig. 3a, st, unfilled, whole calvaria). However, none of the unfilled defects exhibited full bone regeneration 7 weeks post-surgery. In the defects implanted with the bone powder, the particles were still visible (Fig. 3a, gr) and recognizable based on their shape and the absence of osteocytes. The Movat's pentachrome staining revealed the collagen-rich nature of the bone grafts (yellow matrix), which was identical to the native and the regenerated bone (Fig. 3a). Numerous osteocytes were also present in the collagen-rich matrix and layerorganized bone tissue of the healed bone, which was similar to the native bone and the regenerated bone in the unfilled defect. For the bone paste, the particles inside the healed bone tissue were integrated perfectly into the newly formed bone (Fig. 3a, higher magnification). The defects grafted with the bone paste also exhibited collagen-rich mineralized tissue, osteocytes, and a number of vessels.

The reconstructed  $\mu$ -CT of the grafted defects revealed homogenous bone regrowth (Fig.3a, yellow arrows, Sup. Fig. 1a), thus confirming the histological results. In the unfilled defects, the bone regrowth was clearly centripetal from the edges of the defects (Fig.3a, Sup. Fig. 1a). Particles of bone powder and bone paste were present in the graft defects (Fig.3a, white arrows, Sup. Fig. 1a). The three-dimensional quantification of the MV/TV showed new bone formation in the unfilled defects (Fig. 3b). New bone formation was also observed in the groups filled with the bone powder and the bone paste (Fig. 3b) but the fold change was greater with the bone paste than with the bone powder (2.2 vs. 1.6, respectively) (Fig. 3c).

Taken together, these data indicate that the bone paste induced a higher intramembranous bone regeneration in this GBR model compared to the bone powder.

## Partie 2 – Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

## 3.3. In vivo analyses – critical size defect model



Partie 2 – Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse



**Figure 4:** Rat calvaria healing after 3 and 7 weeks in a critical size defect model. (a,b) Representative images of the reconstructed  $\mu$ -CT acquisitions (yellow arrows: newly formed bone, white arrows: graft particles) and histological staining of the defects 3 weeks (a) and 7 weeks (b) after implantation. Histological images were generated by Movat's pentachrome staining of undecalcified 7- $\mu$ m thick frontal sections. The control represents the defects that were left unfilled. Scale bars: 1 mm for the  $\mu$ -CT images, 250  $\mu$ m for the full defects, 100  $\mu$ m for the high magnification image (dashed square). Dark yellow: collagen in the mature bone, light red: cytoplasm, dark red: osteoid borders, brown: nucleus. *St*: soft tissue, *oc*: osteocyte, *nb*: newly formed bone, *vs*: blood vessel, *gr*: graft. (c) Three-dimensional  $\mu$ -CT quantitative analysis of the mineral volume (MV) within the tissue volume (TV) in the defects after 0 weeks (baseline), 3, and 7 weeks of regeneration. (c) MV/TV (fold change from baseline) after 3 and 7 weeks in the graft defects. The results are expressed as the means  $\pm$  the SEM (n=6) \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001).

Having demonstrated the bone-forming ability of the bone paste in an intramembranous GBR model, we embarked on a second set of animal experiments using a critical size defect model of intramembranous bone healing to determine whether similar results will be obtained than in the previous GBR model. This critical size defect model was used to assess the bone healing capacity of the bone paste without any covering membrane, i.e., its intrinsic regenerative properties.

The histological observations confirmed the critical size defect model by the absence of newly formed bone in the center of the unfilled defects after 3 (Fig. 4a) and 7 weeks (Fig. 4b). A limited amount of newly formed bone was nonetheless observed at the edges of the defects. After 3 weeks, the unfilled defects had filled in as a thin cell-rich fibrous tissue with abundant vascularization (Fig. 4a). After 7 weeks, there was still an abundance of fibrous tissue, but a tiny area of newly formed bone could be discerned in the lower part of the defect (Fig. 4b, dark vellow). For the defects that had filled in with the bone powder, no newly formed bone in contact with the bone powder particles could be discerned after 3 and 7 weeks (Fig. 4a). Moreover, at all of the time points, the particles of the bone powder could be clearly distinguished in the defects. After 3 weeks, the soft tissue was extensively vascularized and highly cellularized in the vicinity of the particles of bone powder (Fig. 4a, magnification). The surface of these bone powder particles, close to the highly cellularized areas (Fig. 4a, magnification, white arrow), were light blue due to the fact that this surface had lost its collagen content (yellow by Movat's pentachrome staining). After 7 weeks, none of the defects filled with the bone powder contained newly formed bone, while the particles were still present in the defect. The soft tissue was clearly less vascularized and less cellularized compared to the defects at 3 weeks after implantation, thus suggesting fibrous encapsulation of the graft particles without bone formation.

On the other hand, bone regeneration was obvious in the defects filled with the bone paste, as a substantial degree of newly formed bone was already visible after 3 weeks post-

surgery (Fig. 4a, nb), and particles of the bone paste had become fully integrated in the regenerated bone at 7 weeks after the surgery (Fig. 4b, gr). After 3 weeks, the newly formed bone was distributed heterogeneously in the defects, (Fig. 4a), but with already an intramembranous lamellar bone structure with numerous osteocytes and a number of vessels (Fig. 4a, magnification, nb, vs). After 7 weeks of regeneration, the bone regrowth in the defects filled with the bone paste was much more abundant and homogeneous compared to 3 weeks (Fig. 4b, whole defect), and with a limited amount of soft tissue. Here too, the regenerated bone (Fig. 4b, magnification, nb) exhibited the typical lamellar structure of intramembranous bone, with a high density of osteocytes (Fig. 4b, magnification, oc) and vasculature similar to that observed in the native bone tissue outside the defect area. The particles of bone paste were still clearly discernible in the defects, with their characteristic acellular mineralized inner core and demineralized outer part (Fig. 4b, magnification, gr).

The reconstructed  $\mu$ -CT images did not reveal any newly formed bone in the defects left unfilled after 3 and 7 weeks, as seen by histological staining. Similarly, no newly formed bone was observed in the defects filled with the bone powder particles at 3 and 7 weeks after the surgery (Fig.4a, white arrows, Sup. Fig. 1b, c). By contrast, in the defects filled with the bone paste, newly formed bone was clearly visible after 3 and 7 weeks (Fig.4a, yellow arrows, Sup. Fig. 1b, c), thus indicating healing of the defects in presence of the bone paste.

The three-dimensional quantification of the MV/TV showed that there was very limited new bone formation in the control defects after 3 and 7 weeks, thereby confirming the critical size defect model (Fig. 4c). In this model, the defects filled by the bone powder were unable to heal, while those filled by the bone paste were able to regenerate after 3 and 7 weeks (Fig. 4c). Consequently, the MV/TV fold changes after 3 and 7 weeks were 1.8 and 2.3, respectively, for the defects filled by the bone paste and 0.9 and 0.7 for the bone powder.

Altogether, these data demonstrate the capacity of this bone paste to regenerate intramembranous critical size defects.

3.4. In vitro monocyte/macrophage mRNA expression and in vivo macrophage marker expression





b


Partie 2 – Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse



### Partie 2 – Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

**Figure 5:** Effect of the bone powder and the bone paste on monocyte/macrophage polarization. (a) mRNA expression in human monocytes cultured in the presence of GM-CSF or M-CSF for 3 days while in contact with the bone powder or the bone paste. The scale represents the mean relative mRNA expression of the specified genes (N = 3). Immunohistochemical and immunofluorescence staining in the GBR model after 7 weeks (b), and in the critical size defect model after 3 and 7 weeks (c) on successive undecalcified 7-µm thick sections. The representative pictures were taken at the vicinity of bone graft particles in the grafted defects, and in the soft tissue in the unfilled defects. Immunohistochemical staining was performed for CD68, iNOS, CD163, and immunofluorescence with double labeling of CD68 (green)/CD163 (red) and DAPI (blue) for the nuclei. For single labeling, positive cells were stained with a brown precipitate (black arrow). For double labeling, double-positive cells appeared as light yellow (white arrow). Typical/characteristic autofluorescence images.

Having demonstrated that the bone paste had higher regenerative properties than the bone powder in two complementary models of intramembranous bone healing, we wished to determine whether this could be due to a possible interaction of the bone grafts with monocytes/macrophages, as they are one of the first cell types to interact with bone implants and they are critical for a proper bone healing.

To assess the *in vitro* effect of the bone paste on macrophage polarization, we cultured monocytes in contact with the bone powder or the bone paste in the presence of GM-CSF (generation of pro-inflammatory "M1-like macrophages") or M-CSF (generation of pro-regenerative "M2-like macrophages") for 3 days. We used RT-qPCR to quantify the mRNA expression of a panel of pro-inflammatory factors (*TNF-a*, *IL-6*, and *IL-12*) or pro-angiogenic (*VEGF-A*), anti-inflammatory (*IL-10*) and growth factor (*TGF-β*) at the end of the 3-day culture.

Our data indicate that the macrophages induced towards a pro-inflammatory phenotype had a lower mRNA expression of *TNF-a*, *IL-6*, and *IL-12* while in contact with the bone powder (orange line) or the bone paste (green line) compared to the control (blue line) (Fig. 5a). However, the expression of *VEGF-A* and *IL-10* mRNA was only higher in the macrophages cultured in contact with the bone paste compared to the control (Fig. 5a). On the other hand, in the macrophages induced towards a pro-regenerative phenotype, the expression of *TNF-a* and *IL-6* mRNA was higher when they were in contact with the bone powder, while only the expression of *IL-6* mRNA was higher in the macrophages that were in contact with the bone paste compared to the control (Fig. 5a). Moreover, no change was observed in *VEGF-A*, *TGF-* $\beta$ , or *IL-10* mRNA expression in macrophages cultured in contact with the bone powder or the bone paste compared to the control (Fig. 5a).

To determine whether this *in vitro* observation may have a degree of *in vivo* relevance, we analyzed the phenotype of the macrophages in the defects by CD68, iNOS, and CD163 immunochemical and immunofluorescence labeling. In the GBR model, after 7 weeks of regeneration, qualitative immunohistochemical and immunofluorescence analyses showed that in all of the groups there were few CD68<sup>+</sup>, iNOS<sup>+</sup> or CD163<sup>+</sup> cells in the vicinity of the regenerated bone or the particles of bone powder and bone paste. All of the labeled cells were mostly present in the soft tissue at some distance from the regenerated bone (Fig. 5b). Nonetheless, CD68<sup>+</sup>, iNOS<sup>+</sup>, and CD163<sup>+</sup> cells (Fig. 5b, black arrows), as well as CD68<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup> double-positive (Fig. 5b, white arrows) cells (M2 macrophages) were found in all of the groups. However, in the defects filled with the bone paste, fewer iNOS<sup>+</sup> cells were present compared to the other groups. In the defects filled with the bone paste, fewer iNOS<sup>+</sup> cells were present compared to the defects filled with the bone powder or left unfilled (Fig. 5b).

In the critical size defect model, after 3 weeks of regeneration, CD68<sup>+</sup>, iNOS<sup>+</sup>, and CD163<sup>+</sup> cells (Fig. 5c, black arrows) were present in the control group, and the presence of CD68<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup> double-positive cells (Fig. 5c, white arrow) was also confirmed. In the defects filled with the bone powder, there were few CD68<sup>+</sup> cells, while iNOS<sup>+</sup> cells were found close to the smaller particles of the grafts, and almost no CD163<sup>+</sup> cells were present (Fig. 5c, black arrows). The double fluorescent labeling confirmed the limited number of CD68<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup> positive cells (Fig. 5c, white arrow). For the defects filled with the bone paste, CD68<sup>+</sup>, iNOS<sup>+</sup>,

and CD163<sup>+</sup> cells were clearly visible (Fig. 5c, black arrows), as well as CD68<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup> double-positive cells (Fig. 5c, white arrow). After 7 weeks of regeneration in this critical size defect model, CD68<sup>+</sup>, iNOS<sup>+</sup>, and CD163<sup>+</sup> cells were found in the control defects, and the ones filled with the bone powder, but only CD163<sup>+</sup> cells were found in the defects filled with the bone paste (Fig. 5d, black arrows). At this time point, fluorescence imaging indicating the presence of CD68<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup> double-positive cells in all of the groups (Fig. 5d, white arrows).

These data on *in vitro* and *in vivo* macrophage polarization suggest that the regenerative potential of the bone paste may be at least partially due to the polarization of the macrophages towards a pro-regenerative phenotype.

### 4. Discussion

In order to overcome the limitations of autologous bone harvesting or the difficulties with handling particular bone substitutes, an easy to handle and ready-to-use allogeneic bone graft has been developed in a paste form that is made of partially demineralized bone powder[32]. This bone powder is sterilized by autoclaving, thereby resulting in a cohesive bone paste that consists of partially demineralized bone particles engulfed in a denatured and heated bone matrix. To assess the regenerative potential of this novel allogeneic bone paste, we used a two-pronged strategy based on (i) a study of its *in vitro* effect on the behavior of osteoprogenitor cells and innate immune cells and (ii) an analysis of its *in vivo* bone regenerative capacity in two intramembranous bone healing models. As an internal comparator, we choose the clinically used allogeneic bone powder before the partial demineralization of the particles.

The assessment of these two entities firstly involved culturing hBM-MSC in contact with the bone powder or the bone paste using low-binding plates for short time-periods (1, 3, and 6 h). Using confocal microscopy, we were able to image extensions of the cells and an elongated skeleton, which are typical features of adherent cells. Surprisingly, we observed higher ng DNA/cm<sup>2</sup> in cells cultured in contact with the bone paste compared to the bone powder after 3 and 6 h of contact, indicating higher adhesion rate of the hBM-MSC to the bone paste compared to the bone powder. Since the demineralization and the heating of the bone paste modified the surface of the particles, the interaction between the hBM-MSC and the particles of the bone paste may be different than with the particles of the bone powder.

Although further analyses are required to properly characterize the nature of the interactional changes, it has been reported that the denaturation of collagen can expose cryptic sites of adhesion and RGD (Arg-Gly-Asp) integrin-binging sites that favor adhesion of hBM-MSC[39–44]. Moreover, type I collagen is thought to drive osteogenic fate, and the exposure of RGD binding sites is known to enhance the osteogenic phenotype of mesenchymal stromal cells[44–47]. In longer-term cultures, SEM imaging showed the cohesivity of the bone paste after 14 and 21 days in culture medium, and the adherent hBM-MSC were able to form bridges between the particles of the bone paste. This property is of particular relevance to bone regeneration, since the particles of the graft could act as a cohesive scaffold in the defects. This may lead to better osteointegration and osteoconduction than with independent particles, considering that the three-dimensional interactions between the cells are likely to recreate a cellular network that promotes osteoblastic differentiation and bone regeneration[48,49]. Moreover, this cohesive form may prevent leakage of the bone paste out of the defect area.

We also demonstrated that hBM-MSC in contact with the bone paste expressed a higher level of ALP activity compared to cells in contact with the bone powder, both in control and in osteogenic medium, after 14 and 21 days. This may be due to the cell/surface interaction, and/or the cohesivity of the particles that allows the hBM-MSC to create a cellular network. Since ALP activity is an indicator of osteoblastic differentiation, the hBM-MSC in contact with the bone paste particles *in vivo* could be responsible for the higher level of newly formed bone.

We demonstrated the regenerative properties of the bone paste in vivo, using two intramembranous bone healing models in rat calvaria. This operating site allows easy and rapid examination of bone healing properties of bone graft materials, in the GBR model or with critical size defects[50,51]. In light of the occurrence of intramembranous ossification, these models are highly regarded for preclinical studies aimed at the development of bone substitutes for oral and craniofacial surgeries[52]. Rats have been used in previous studies with the same healing time (7 weeks), with unfilled defects unable to heal, and defects implanted with an autologous bone graft that were able to regenerate [53,54]. The healing time of 3 weeks was chosen to highlight early differences in bone regeneration between the defects filled with bone powder versus bone paste. The in vivo GBR model was first used to ascertain that the bone paste was able to support intramembranous bone repair. Additionally, the GBR technique is clinically relevant and the ability of bone grafts to support or promote bone repair in GBR preclinical models is, therefore, an appropriate investigative approach. The control (unfilled) defects exhibited significant bone formation after 7 weeks, validating the GBR model, as expected[55,56]. Radiological and histological qualitative analyses revealed newly formed bone in defects in all of the groups and complete closure only for the defects filled with the bone paste. Three-dimensional quantitative analysis confirmed the bone regeneration in all of the groups since a higher MV/TV was found 7 weeks after surgery in all of the groups. However, the similar mineral density of the newly formed bone and the bone grafts (both powder and paste) did not allow for direct determination of the difference between them. To do so, we used the fold increase of the MV/TV after 7 weeks of regeneration. At this point, the higher MV/TV fold increase found in the defects filled with the bone paste compared to the bone powder can be explained either by the lower MV/TV at the time of the surgery for the bone paste compared to the bone powder, or a higher bone mineral density in defects filled by the bone paste at the end of the experiment.

The substantial bone regenerative ability of the bone paste was demonstrated in a second *in vivo* model, based on critical size defects. Bone regeneration is harder to complete in a critical size defect model than in a GBR model, since the covering membrane prevents non-osteoblastic cells from migrating from the surrounding soft tissues, thereby indirectly increasing the invasion of the bone defects by osteoprogenitors, which improves the bone regeneration[38,57,58]. The atrophic environment of the rat calvaria (a lack of abundant vasculature or bone marrow), is an additional challenge in achieving bone regeneration. In this critical size defect model, radiological and histological observations showed that the bone powder failed to support bone repair, while the bone paste allowed a substantial degree of bone regenerative capacity of the bone paste, with a higher MV/TV ratio after 3 and 7 weeks compared to 0 weeks in this critical size defect model.

Considering the key role of pro-inflammatory "M1" macrophages in early immune responses[59–61] and that pro-regenerative "M2" macrophages play a role in the later stages of bone healing[62–64], we first investigated the *in vitro* influence of the bone powder and the bone paste on macrophage polarization. In particular, we investigated whether the bone paste could stimulate "M2-like" polarization of macrophages.

Our real-time PCR data suggest that the bone paste is able to promote a switch from an "M1-like" phenotype towards an "M2-like" phenotype in a pro-inflammatory environment, and that this "M2-like" phenotype could be maintained in an anti-inflammatory environment. We observed a reduction of *IL-12*, *IL-6*, and *TNF-* $\alpha$  mRNA expression concomitant with an elevation of *IL-10* mRNA expression. In other words, we observed an increase in the *IL-10/IL-12* ratio, which is typical for an "M1-like" to "M2-like" phenotype switch, thereby promoting

inflammation resolution, wound repair, and bone healing [65–68]. Moreover, the increase in *VEGF-A* mRNA by the bone paste could potentiate bone healing, since *VEGF-A* promotes angiogenesis, which is crucial for bone healing [69–73]. Additionally, the conservation of the expression of the mRNA of anti-inflammatory markers with an increase in the expression of *IL-6* mRNA in the monocytes grown in an anti-inflammatory environment in contact with the bone paste suggests a phenotype that can secrete both pro- and anti-inflammatory cytokines, called M2b [74].

In light of these results, we then investigated the presence of macrophages in the calvaria defects using immunohistology. In the GBR model, all of the defects contained CD68<sup>+</sup>, iNOS<sup>+</sup>, and CD163<sup>+</sup> cells. However, the small number of CD68<sup>+</sup> cells in the defects filled with the bone powder, and the small number of iNOS<sup>+</sup> cells in the defects filled with the bone paste after 7 weeks may be correlated with the more abundant bone tissue observed in the histological analysis and three-dimensionally quantified with the MV/TV fold change after 7 weeks in the defects filled by the bone paste compared to the bone powder. Additionally, in the critical size defect model, the small number of CD68<sup>+</sup> cells and the detection of CD163<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup> cells after 3 and 7 weeks in the defects filled with the bone powder suggest a delay in either the monocyte/macrophage recruitment and/or in the M1 to M2 transition, thereby leading to the failure of bone healing, as evidenced by the µ-CT three-dimensional quantification and histological analysis. Longer time points could indicate whether the defects are able to ultimately heal when filled with the bone powder. By contrast, the small number of iNOS<sup>+</sup> cells and the abundance of CD163<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup>/CD163<sup>+</sup> cells in the defects filled with the bone paste after 3 weeks suggests a suitable inflammatory environment for the bone regeneration. Indeed, as the initial inflammation phase was shorter in those defects, the healing and mineralization phase of the bone tissue could begin earlier, thus resulting in a higher MV/TV after 7 weeks in the defects filled by the bone paste compared to the bone powder. The substantial bone healing detected after 7 weeks with µ-CT three-dimensional quantification and histological analysis supports this hypothesis. Nonetheless, the abundance of CD163<sup>+</sup> cells in all of the groups in the soft tissue outside the defects suggests that some non-macrophagic cells were labeled, and CD163 has indeed been reported in fibrocytes and pro-angiogenic cells[75-78].

Collagen-based bone substitutes have been reported to modulate the phenotype of macrophages, thereby promoting wound healing and bone regeneration *in vivo*[79–82]. In light of the data in the literature and our results, we hypothesize that the bone paste promotes an "M2-like" phenotype in macrophages and ALP activity in hBM-MSC by means of the interaction between the cells and the outer demineralized and heat-denatured collagen surface of the bone paste particles.

Taken together, our data demonstrate that the allogeneic bone paste, described here for the first time, is a promising candidate for bone regenerative medicine, combining ease of use and substantial regenerative properties. To our knowledge, this study is the first to demonstrate the bone regenerative capacity *in vitro* and *in vivo* of a partially demineralized bone paste. Moreover, the preparation process of the bone paste without the addition of any compounds may accelerate regulatory approval, thereby facilitating clinical applications, such as in craniomaxillofacial surgery, particularly since intramembranous ossification is a feature that the human jaw and calvaria have in common. Ultimately, additional experiments are ongoing in order to compare the bone healing capacity of this allogeneic bone paste with the "goldstandard" autograft, and to assess whether this bone paste may be a relevant clinical alternative to the use of autologous bone grafts.

### 5. Conclusion

In this study, we successfully demonstrated that a ready-made and easy to use partially demineralized allogeneic bone paste has substantial bone regenerative properties. We demonstrated that, in vitro, this bone paste was able to maintain the viability, allowed for better adhesion, and resulted in higher alkaline phosphatase activity in hBM-MSC compared to an allogeneic bone powder before its partial demineralization. Our data also suggest that this allogeneic bone paste was able to switch the phenotype of monocytes from a pro-inflammatory phenotype towards an anti-inflammatory one. In vivo, this bone paste was able to heal defects in rat calvaria in a guided bone regeneration model and in a critical size defect model. The healed defects in the presence of the bone paste exhibited full closure, with a large amount of newly formed bone, a mineralized collagen-rich matrix, blood vessels, and numerous osteocytes. Immunostaining also suggested a pro-regenerative phenotype of the macrophages in the defects filled with the bone paste. This allogeneic bone paste could induce the regeneration of bone tissue through the contact of its partially demineralized and heat-denatured collagen surface with innate inflammatory cells and osteoprogenitors. This bone paste induces a pro-regenerative macrophage phenotype and it promotes the mineralization process by osteoprogenitors by acting as a cohesive three-dimensional scaffold for bone repair.

### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge BIOBank for funding this work. The authors wish to thank Pierre Autin for his kind help with the monocyte cultures, the DTC core facility (CIC-biothérapies Nantes) for purifying the human monocytes, as well as Philippe Hulin and Steven Nedellec from the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for their precious help with the acquisition of the confocal imaging data.

### **Conflicts of interests**

This work was funded by BIOBank as part of a collaborative PhD project (CIFRE  $n^{\circ}2016/1192$ ) between BIOBank and the RMeS laboratory.

# Supplementary data

### $\mu$ -CT-reconstructed images







References

[1]H. Shegarfi, O. Reikeras, Review Article: Bone Transplantation and Immune Response,JOrthopSurg(HongKong).17(2009)206–211.https://doi.org/10.1177/230949900901700218.

[2] O. Faour, R. Dimitriou, C.A. Cousins, P.V. Giannoudis, The use of bone graft substitutes in large cancellous voids: Any specific needs?, Injury. 42 (2011) S87–S90. https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.020.

[3] O. Ozgul, B. Altay, F. Atıl, M.E. önder, U. Tekin, S. Yılmaz, I.D. Kocyigit, Allogeneic versus Autogenous Bone Rings in Dental Implant Surgery: Guidance of Stress Analysis-Part II, J Biomater Tissue Eng. 8 (2018) 448–453. https://doi.org/10.1166/jbt.2018.1763.

[4] A. Sakkas, F. Wilde, M. Heufelder, K. Winter, A. Schramm, Autogenous bone grafts in oral implantology—is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures, Int J Implant Dent. 3 (2017) 23. https://doi.org/10.1186/s40729-017-0084-4.

[5] A. Tuchman, D.S. Brodke, J.A. Youssef, H.-J. Meisel, J.R. Dettori, J.-B. Park, S.T. Yoon, J.C. Wang, Autograft versus Allograft for Cervical Spinal Fusion: A Systematic Review, Global Spine Journal. 7 (2017) 59–70. https://doi.org/10.1055/s-0036-1580610.

[6] J. Urrutia, N. Thumm, D. Apablaza, F. Pizarro, A. Zylberberg, F. Quezada, Autograft versus allograft with or without demineralized bone matrix in posterolateral lumbar fusion in rabbits. Laboratory investigation, J Neurosurg Spine. 9 (2008) 84–89. https://doi.org/10.3171/SPI/2008/9/7/084.

[7] E.M. Younger, M.W. Chapman, Morbidity at bone graft donor sites, J Orthop Trauma. 3 (1989) 192–195.

[8] S. Motamedian, M. Khojaste, A. Khojasteh, Success rate of implants placed in autogenous bone blocks versus allogeneic bone blocks: A systematic literature review, Ann Maxillofac Surg. 6 (2016) 78. https://doi.org/10.4103/2231-0746.186143.

[9] A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri, N. Maffulli, Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions, (2014) 27.

[10] R. Hu, T. Hearn, J. Yang, Bone graft harvest site as a determinant of iliac crest strength, Clin. Orthop. Relat. Res. (1995) 252–256.

[11] E.D. Arrington, W.J. Smith, H.G. Chambers, A.L. Bucknell, N.A. Davino, Complications of iliac crest bone graft harvesting, Clin. Orthop. Relat. Res. (1996) 300–309. https://doi.org/10.1097/00003086-199608000-00037.

[12] D.L. Skaggs, M.A. Samuelson, J.M. Hale, R.M. Kay, V.T. Tolo, Complications of posterior iliac crest bone grafting in spine surgery in children, Spine. 25 (2000) 2400–2402.

[13] B.N. Summers, S.M. Eisenstein, Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion, J Bone Joint Surg Br. 71 (1989) 677–680.

[14] L.T. Kurz, S.R. Garfin, R.E. Booth, Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques, Spine. 14 (1989) 1324–1331.

[15] J.C. Banwart, M.A. Asher, R.S. Hassanein, Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation, Spine. 20 (1995) 1055–1060.

[16] J.L. Russell, J.E. Block, Surgical harvesting of bone graft from the ilium: point of view, Med. Hypotheses. 55 (2000) 474–479. https://doi.org/10.1054/mehy.2000.1095.

[17] Z. Liao, C.-H. Wang, W.-L. Cui, Comparison of Allograft and Autograft in Lumbar Fusion for Lumbar Degenerative Diseases: A Systematic Review, Journal of Investigative Surgery. 29 (2016) 373–382. https://doi.org/10.3109/08941939.2016.1166534.

[18] R. Dimitriou, G.I. Mataliotakis, A.G. Angoules, N.K. Kanakaris, P.V. Giannoudis, Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the

RIA: A systematic review, Injury. 42 (2011) S3–S15. https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.015.

[19] M.T. Temple HT, Bone Allografts In Dentistry: A Review, Dentistry. 04 (2014). https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000199.

[20] S. Elakkiya, A. Ramesh, K. Prabhu, Systematic analysis on the efficacy of bone enhancement methods used for success in dental implants, J Indian Prosthodont Soc. 17 (2017) 219. https://doi.org/10.4103/jips.jips\_19\_17.

[21] A. Kinaci, V. Neuhaus, D.C. Ring, Trends in Bone Graft Use in the United States, Orthopedics. 37 (2014) e783–e788. https://doi.org/10.3928/01477447-20140825-54.

[22] M. Nevins, S. Parma-Benfenati, U. Janke, A. Kleyer, G. Rasperini, C. Tinti, P. Schupbach, D. Kim, The Efficacy of Mineralized Allograft Cortical and Cancellous Chips in Maxillary Sinus Augmentations, Int J Periodontics Restorative Dent. 34 (2014) 789–793. https://doi.org/10.11607/prd.1720.

[23] M. Del Fabbro, T. Testori, Systematic Review of Survival Rates for Implants Placed in the Grafted Maxillary Sinus, Int J Periodontics Restorative Dent. (n.d.).

[24] P. Hernigou, A. Dubory, F. Roubineau, Y. Homma, C.H. Flouzat-Lachaniette, N. Chevallier, H. Rouard, Allografts supercharged with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells possess equivalent osteogenic capacity to that of autograft: a study with long-term follow-ups of human biopsies, International Orthopaedics. 41 (2017) 127–132. https://doi.org/10.1007/s00264-016-3263-7.

[25] C.S. Moucha, R.L. Renard, A. Gandhi, S.S. Lin, R.S. Tuan, Bone Allograft Safety and Performance, in: F. Bronner, M.C. Farach-Carson, A.G. Mikos (Eds.), Engineering of Functional Skeletal Tissues, Springer London, London, 2007: pp. 46–54. https://doi.org/10.1007/978-1-84628-366-6\_3.

[26] A. Rasch, H. Naujokat, F. Wang, A. Seekamp, S. Fuchs, T. Klüter, Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality, PLoS ONE. 14 (2019) e0218404. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218404.

[27] L.F. Coutinho, J.B. do Amaral, É.B. dos Santos, E.F. Martinez, V.A.M. Montalli, J.L.C. Junqueira, V.C. de Araújo, M.H. Napimoga, Presence of Cells in Fresh-Frozen Allogeneic Bone Grafts from Different Tissue Banks, Braz. Dent. J. 28 (2017) 152–157. https://doi.org/10.1590/0103-6440201701206.

[28] B.D. Boyan, D.M. Ranly, J. McMillan, M. Sunwoo, K. Roche, Z. Schwartz, Osteoinductive Ability of Human Allograft Formulations, J Periodontol. 77 (2006) 9.

[29] M.J. Eagle, P. Rooney, J.N. Kearney, Production of an osteoinductive demineralised bone matrix powder without the use of organic solvents, Cell Tissue Bank. 16 (2015) 433–441. https://doi.org/10.1007/s10561-014-9487-0.

[30] S.T. Moore, J.M. Katz, R.M. Zhukauskas, R.M. Hernandez, C.S. Lewis, P.R. Supronowicz, E. Gill, S.M. Grover, N.S. Long, R.R. Cobb, Osteoconductivity and osteoinductivity of Puros(R) DBM putty, J Biomater Appl. 26 (2011) 151–171. https://doi.org/10.1177/0885328210366061.

[31] P. Hernigou, Bone transplantation and tissue engineering, part III: allografts, bone grafting and bone banking in the twentieth century, International Orthopaedics. 39 (2015) 577–587. https://doi.org/10.1007/s00264-015-2669-y.

[32] B. Raphaël, B. Ana, Method for Producing a Bone Paste, WO2015/162372 A1, 2018.

[33] D. Mitton, J. Rappeneau, R. Bardonnet, Effect of a supercritical CO2 based treatment on mechanical properties of human cancellous bone, Eur J Orthop Surg Traumatol. 15 (2005) 264–269. https://doi.org/10.1007/s00590-005-0250-x.

[34] R. Bardonnet, Method for Treating Bone Tissue and Implantable Biomaterials, WO2005082432 (A1), 2005.

[35] J. Fages, A. Marty, C. Delga, J.-S. Condoret, D. Combes, P. Frayssinet, Use of supercritical CO2 for bone delipidation, Biomaterials. 15 (1994) 650–656. https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90162-7.

[36] J. Faces, B. Poirier, Y. Barbier, P. Frayssinet, M.-L. Joffret, W. Majewski, G. Bonel, D. Larzul, Viral Inactivation of Human Bone Tissue Using Supercritical Fluid Extraction:, ASAIO Journal. 44 (1998) 289–293. https://doi.org/10.1097/00002480-199807000-00009.

[37] A.-L. Chéné, S. d'Almeida, T. Blondy, J. Tabiasco, S. Deshayes, J.-F. Fonteneau, L. Cellerin, Y. Delneste, M. Grégoire, C. Blanquart, Pleural Effusions from Patients with Mesothelioma Induce Recruitment of Monocytes and Their Differentiation into M2 Macrophages, Journal of Thoracic Oncology. 11 (2016) 1765–1773. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.06.022.

[38] M. Retzepi, N. Donos, Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications, Clinical Oral Implants Research. 21 (2010) 567–576. https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.01922.x.

[39] M. Pfaff, M. Aumailley, U. Specks, J. Knolle, H.G. Zerwes, R. Timpl, Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI, Exp. Cell Res. 206 (1993) 167–176. https://doi.org/10.1006/excr.1993.1134.

[40] A.A. Sawyer, D.M. Weeks, S.S. Kelpke, M.S. McCracken, S.L. Bellis, The effect of the addition of a polyglutamate motif to RGD on peptide tethering to hydroxyapatite and the promotion of mesenchymal stem cell adhesion, Biomaterials. 26 (2005) 7046–7056. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.006.

[41] Y. Suwa, K. Nam, K. Ozeki, T. Kimura, A. Kishida, T. Masuzawa, Thermal denaturation behavior of collagen fibrils in wet and dry environment: Thermal Denaturation Behavior of Collagen Fibrils in Wet and Dry Environment, J. Biomed. Mater. Res. 104 (2016) 538–545. https://doi.org/10.1002/jbm.b.33418.

[42] M.C. Porté-Durrieu, F. Guillemot, S. Pallu, C. Labrugère, B. Brouillaud, R. Bareille, J. Amédée, N. Barthe, M. Dard, C. Baquey, Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti–6Al–4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion, Biomaterials. 25 (2004) 4837–4846. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.037.

[43] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, Biomaterials. 24 (2003) 4385–4415. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00343-0.

[44] A.V. Taubenberger, M.A. Woodruff, H. Bai, D.J. Muller, D.W. Hutmacher, The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation, Biomaterials. 31 (2010) 2827–2835. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.051.

[45] J. Mauney, V. Volloch, Collagen I matrix contributes to determination of adult human stem cell lineage via differential, structural conformation-specific elicitation of cellular stress response, Matrix Biology. 28 (2009) 251–262. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.04.002.

[46] R. Detsch, I. Dieser, U. Deisinger, F. Uhl, S. Hamisch, G. Ziegler, G. Lipps, Biofunctionalization of dispense-plotted hydroxyapatite scaffolds with peptides: Quantification and cellular response, Journal of Biomedical Materials Research Part A. 92A (2010) 493–503. https://doi.org/10.1002/jbm.a.32386.

[47] P.-H. Chua, K.-G. Neoh, E.-T. Kang, W. Wang, Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion, Biomaterials. 29 (2008) 1412–1421. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.019.

[48] M. Honda, R. Hariya, M. Matsumoto, M. Aizawa, Acceleration of Osteogenesis via Stimulation of Angiogenesis by Combination with Scaffold and Connective Tissue Growth Factor, Materials. 12 (2019) 2068. https://doi.org/10.3390/ma12132068.

[49] J.P. Stains, R. Civitelli, Cell-cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast

function, Birth Defect Res C. 75 (2005) 72-80. https://doi.org/10.1002/bdrc.20034.

[50] J.A. McGovern, M. Griffin, D.W. Hutmacher, Animal models for bone tissue engineering and modelling disease, Dis. Model. Mech. 11 (2018) dmm033084. https://doi.org/10.1242/dmm.033084.

[51] P.S. Gomes, M.H. Fernandes, Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies, Lab Anim. 45 (2011) 14–24. https://doi.org/10.1258/la.2010.010085.

[52] Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate | Elsevier Enhanced Reader, (n.d.). https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.01.003.

[53] F. Espitalier, C. Vinatier, E. Lerouxel, J. Guicheux, P. Pilet, F. Moreau, G. Daculsi, P. Weiss, O. Malard, A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone, Biomaterials. 30 (2009) 763–769. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.051.

[54] P. Corre, C. Merceron, J. Longis, R.H. Khonsari, P. Pilet, T.N. thi, S. Battaglia, S. Sourice, M. Masson, J. Sohier, F. Espitalier, J. Guicheux, P. Weiss, Direct comparison of current cell-based and cell-free approaches towards the repair of craniofacial bone defects – A preclinical study, Acta Biomaterialia. 26 (2015) 306–317. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.013.

[55] L. Dupoirieux, D. Pourquier, M.C. Picot, M. Neves, Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects, International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 30 (2001) 58–62. https://doi.org/10.1054/ijom.2000.0011.

[56] A. Stavropoulos, L. Kostopoulos, N. Mardas, J. Randel Nyengaard, T. Karring, Deproteinized Bovine Bone Used as an Adjunct to Guided Bone Augmentation: An Experimental Study in the Rat, Clin Implant Dent Rel Res. 3 (2001) 156–165. https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2001.tb00136.x.

[57] N. Donos, X. Dereka, N. Mardas, Experimental models for guided bone regeneration in healthy and medically compromised conditions, Periodontol 2000. 68 (2015) 99–121. https://doi.org/10.1111/prd.12077.

[58] C. Verna, Carles Bosch1, M. Dalstra, U.M.E. Wikesjo, L. Trombelli, Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis, J Clin Periodontol. 29 (2002) 865–870. https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.2002.290912.x.

[59] R. Huang, X. Wang, Y. Zhou, Y. Xiao, RANKL-induced M1 macrophages are involved in bone formation, Bone Research. 5 (2017) 17019. https://doi.org/10.1038/boneres.2017.19.

[60] P. Italiani, D. Boraschi, From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation, Frontiers in Immunology. 5 (2014). https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514.

[61] F.O. Martinez, S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, F1000Prime Rep. 6 (2014) 12703.

[62] S. Gordon, Alternative activation of macrophages, Nature Reviews Immunology. 3 (2003) 23–35. https://doi.org/10.1038/nri978.

[63] M. Okubo, M. Kioi, H. Nakashima, K. Sugiura, K. Mitsudo, I. Aoki, H. Taniguchi, I. Tohnai, M2-polarized macrophages contribute to neovasculogenesis, leading to relapse of oral cancer following radiation, Scientific Reports. 6 (2016). https://doi.org/10.1038/srep27548.

[64] R. Zhang, Y. Liang, S. Wei, M2 macrophages are closely associated with accelerated clavicle fracture healing in patients with traumatic brain injury: a retrospective cohort study, Journal of Orthopaedic Surgery and Research. 13 (2018). https://doi.org/10.1186/s13018-018-0926-7.

[65] K. Haselow, J.G. Bode, M. Wammers, C. Ehlting, V. Keitel, L. Kleinebrecht, A.-K.

Schupp, D. Häussinger, D. Graf, Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages, Journal of Leukocyte Biology. 94 (2013) 1253–1264. https://doi.org/10.1189/jlb.0812396.

[66] X. Ma, W. Yan, H. Zheng, Q. Du, L. Zhang, Y. Ban, N. Li, F. Wei, Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells, F1000Res. 4 (2015) 1465. https://doi.org/10.12688/f1000research.7010.1.

[67] T.A. Wynn, K.M. Vannella, Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis, Immunity. 44 (2016) 450–462. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015.

[68] X.-L. Yu, B.-T. Wu, T.-T. Ma, Y. Lin, F. Cheng, H.-Y. Xiong, C.-L. Xie, C.-Y. Liu, Q. Wang, Z.-W. Li, Z.-G. Tu, Overexpression of IL-12 reverses the phenotype and function of M2 macrophages to M1 macrophages, (n.d.) 10.

[69] A.E. Al Subaie, H. Eimar, M.-N. Abdallah, R. Durand, J. Feine, F. Tamimi, E. Emami, Anti-VEGFs hinder bone healing and implant osseointegration in rat tibiae, Journal of Clinical Periodontology. 42 (2015) 688–696. https://doi.org/10.1111/jcpe.12424.

[70] J. Amirian, N.T.B. Linh, Y.K. Min, B.-T. Lee, Bone formation of a porous Gelatin-Pectin-biphasic calcium phosphate composite in presence of BMP-2 and VEGF, International Journal of Biological Macromolecules. 76 (2015) 10–24. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.021.

[71] O. Strachna, D. Torrecilla, M.K. Reumann, I. Serganova, J. Kim, S. Gieschler, A.L. Boskey, R.G. Blasberg, P. Mayer-Kuckuk, Molecular Imaging of Expression of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF A) in Femoral Bone Grafts Transplanted Into Living Mice, Cell Transplantation. 23 (2014) 901–912. https://doi.org/10.3727/096368912X667015.

[72] C. Maes, G. Carmeliet, Vascular and Nonvascular Roles of VEGF in Bone Development, Landes Bioscience, 2013. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6134/ (accessed January 28, 2019).

[73] C.E. Clarkin, L.C. Gerstenfeld, VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication: VEGF AND BONE CELL SIGNALLING, Cell Biochemistry and Function. 31 (2013) 1–11. https://doi.org/10.1002/cbf.2911.

[74] F.O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, M. Locati, Macrophage activation and polarization, Front. Biosci. 13 (2008) 453–461.

[75] E. Gottfried, L.A. Kunz-Schughart, A. Weber, M. Rehli, A. Peuker, A. Müller, M. Kastenberger, G. Brockhoff, R. Andreesen, M. Kreutz, Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types, Scand J Immunol. 67 (2008) 453–463. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02091.x.

[76] W. Lu, L. Su, Z. Yu, S. Zhang, J. Miao, The New Role of CD163 in the Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells into Vascular Endothelial-Like Cells, Stem Cells International. 2016 (2016) 1–10. https://doi.org/10.1155/2016/2539781.

[77] D. Pilling, T. Fan, D. Huang, B. Kaul, R.H. Gomer, Identification of Markers that Distinguish Monocyte-Derived Fibrocytes from Monocytes, Macrophages, and Fibroblasts, PLoS ONE. 4 (2009) e7475. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007475.

[78] C. Urbich, A.I. De Souza, L. Rossig, X. Yin, Q. Xing, M. Prokopi, I. Drozdov, M. Steiner, J. Breuss, Q. Xu, S. Dimmeler, M. Mayr, Proteomic characterization of human early pro-angiogenic cells, Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 50 (2011) 333–336. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.11.022.

[79] H. Elgharably, K. Ganesh, J. Dickerson, S. Khanna, M. Abas, P.D. Ghatak, S. Dixit, V. Bergdall, S. Roy, C.K. Sen, A modified collagen gel dressing promotes angiogenesis in a preclinical swine model of chronic ischemic wounds, Wound Repair Regen. 22 (2014) 720–729. https://doi.org/10.1111/wrr.12229.

[80] Y. Sun, S. Liu, Y. Fu, X.-X. Kou, D.-Q. He, G.-N. Wang, C.-C. Fu, Y. Liu, Y.-H. Zhou, Mineralized Collagen Regulates Macrophage Polarization During Bone Regeneration, J Biomed Nanotechnol. 12 (2016) 2029–2040.

[81] F.G. Lyons, A.A. Al-Munajjed, S.M. Kieran, M.E. Toner, C.M. Murphy, G.P. Duffy, F.J. O'Brien, The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs, Biomaterials. 31 (2010) 9232–9243. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.056.

[82] X.-D. Shi, L.-W. Chen, S.-W. Li, X.-D. Sun, F.-Z. Cui, H.-M. Ma, The observed difference of RAW264.7 macrophage phenotype on mineralized collagen and hydroxyapatite, Biomed Mater. 13 (2018) 041001. https://doi.org/10.1088/1748-605X/aab523.

## **Discussions sur l'étude**

Cette étude a été effectuée en utilisant comme comparateur interne une poudre d'os allogénique de la même origine que la pâte (tête fémorale humaine), la matière première de la fabrication de la pâte (Cf. Rationnel de l'étude). Les premières observations macroscopiques nous ont permis d'immédiatement apprécier la cohésivité et malléabilité de cette pâte, en opposition avec la poudre d'os dont les particules sont indépendantes les unes des autres (Cf. vidéos annexes). En MEB, les surfaces des particules des deux greffons se sont révélées bien différentes, la surface des particules composant la pâte apparaissant plus « lisse », comme fondue, à cause du traitement acide et thermique, où les fibres de collagènes de la matrice osseuse n'étaient plus distinguables. Cette modification n'avait néanmoins pas d'influence sur la viabilité de hBM-MSC cultivées en deux dimensions (adhérentes au plastique des puits) à leur contact. En revanche, lorsque ces cellules étaient cultivées directement à la surface des particules, nous avons observé un nombre de cellules adhérentes plus important par unité de surface sur les particules de la pâte par rapport à la poudre. De plus, ces cellules présentaient une activité de la phosphatase alcaline (ALP) supérieure lorsque qu'elles étaient cultivées à la surface des particules de la pâte, en comparaison à la poudre d'os.

Il a été décrit que la dénaturation du collagène peut exposer des sites cryptiques d'adhérence et des motifs RGD (Arg-Gly-Asp) utilisables par les hBM-MSC comme substrat d'adhésion via les intégrines[212–220]. De plus, le collagène de type I a été décrit comme pouvant favoriser la différenciation ostéoblastique des progéniteurs mésenchymateux à son contact. Il a en effet été observé que l'exposition des sites de liaison des cellules à des motifs RGD favorise la minéralisation de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes, et augmente leur expression de marqueurs ostéogéniques tels que BSP, RUNX2 ou l'ALP[220–223]. L'exposition des motifs RGD par la dénaturation thermique du collagène de la pâte d'os pourrait donc expliquer ces résultats observés *in vitro*.

Nous pouvons néanmoins souligner plusieurs limitations à ces expérimentations. Tout d'abord, la quantification de l'ADN dans les cellules mises au contact des greffons ne permet pas d'apprécier leur effet sur la prolifération des cellules, ni si un effet cytotoxique a lieu. Nous avons cependant observé que la morphologie du tapis cellulaire au contact des greffons de poudre et de pâte était identique au tapis des cellules contrôles. De plus, les cellules utilisées ici (cellules stromales mésenchymateuses) ne sont pas connues pour effectuer des endomitoses, ce qui nous permet de relier la quantité d'ADN dosé au nombre de cellules. Nous aurions pu néanmoins effectuer des dosages de la lactate déshydrogénase (LDH), dont l'activité dans les surnageants de culture est proportionnelle aux nombres de cellules endommagées libérant leur contenu cytoplasmique dans le milieu. Pour nous assurer de l'état prolifératif des cellules, une analyse en cytométrie en flux avec un intercalant de l'ADN (type BrdU) pourrait nous indiquer la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/1, S, G2/M) et ainsi mettre évidence des éventuelles perturbations dans ce cycle[224]. Enfin, un ensemencement des cellules à des faibles densités aurait aussi pu être envisagé pour visualiser l'effet de la poudre et de la pâte sur cette prolifération. Concernant l'adhésion des cellules aux particules des greffons, l'analyse des événements des mécanismes d'adhésion comme la formation de points d'adhésion focaux aurait pu être envisagé. Ceci par exemple grâce à un immunomarquage de la focal adhesion kinase (FAK) en quantifiant à un temps donné le nombre de ces points d'adhésion, ou encore en visualisant la distribution de certaines protéines impliquées dans les complexes d'adhésion comme les intégrines, la taline ou la vinculine[225]. Il pourrait aussi être intéressant d'effectuer des études de décrochement cellulaire avec des flux de liquides, où l'on mesure la force nécessaire au décrochement des cellules. Néanmoins les irrégularités de surface des particules de poudre et de pâte pourraient être un biais important à ces méthodes à cause des turbulences qu'ils génèrent dans le déplacement des liquides.

Concernant l'activité plus élevée de l'ALP dans les cellules au contact de la pâte d'os que de la poudre d'os, nous avons émis les hypothèses suivantes : (i) ceci pourraît ête dû à l'interaction des cellules avec la surface des particules, ou bien (ii) au réseau intercellulaire formé grâce à la cohésivité de la pâte, comme observé au MEB. Pour tester ces hypothèses, il serait envisageable d'isoler les grains de la pâte les uns des autres, et de comparer l'activé de l'ALP dans les cellules sur les grains isolés à l'activité ALP dans les cellules sur la pâte cohésive. Si l'activité est différente, le réseau cellulaire inter-grains devrait alors jouer un rôle dans la différenciation de l'ensemble des cellules du réseau. Dans le cas contraire l'hypothèse de l'interaction cellules/surface n'en serait que renforcée. Pour aller plus loin dans la caractérisation de la différenciation de MSC au contact des particules de greffons, il serait aussi possible de mesurer l'expression des ARNm et la production des protéines exprimées ou sécrétées au cours de la différentiation ostéoblastique comme RUNX2, SP7, BSP, OCN ou OPN.

L'hypothèse de l'interaction cellules/surface a aussi été confortée par une analyse des protéines totales de pâte d'os en spectrométrie de masse (plate-forme SFR, Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH), Nantes) (Fig. 23).



<u>Figure 23</u>: Représentation de la préparation d'échantillons protéiques pour le passage en spectrométrie de masse. Les protéines sont digérées en peptides puis chargés et séparés en chropatographie liquide, puis analysés en sprctrométrie de masse en temps de vol (MS-TOF) [220].

### Partie 2 – Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

Seuls quelques fragments de collagène de type I ont été retrouvés dans un échantillon de pâte, comme attendu (Table 7). Aucun facteur de croissance n'a été détecté par cette méthode, ces derniers étant soit trop peu abondants, ou bien absents de l'échantillon.

Accession	Peptide count	Description
P02452;P02457;P02454	18	Collagen alpha-2(I) chain
P02768	13	Collagen alpha-1(I)
P08123	11	Collagen alpha-2(I) chain
Q8TCU4	5	Collagen alpha 2(I) chain precursor

Table 7 : Description des peptides retrouvés dans la fraction de gélatine de la pâte d'os en MS-TOF.

La spectrométrie de masse est efficace pour détecter des peptides, même dégradés, dans des échantillons, comme c'est le cas de la pâte d'os stérilisée par autoclave. Cela dit, cette technique reste très dépendante de l'abondance des peptides, et donc des protéines dans l'échantillon initial, et ne donne pas non plus d'indication sur leur concentration ou leur conformation.

L'hypothèse de l'effet de la pâte via l'interaction cellules/surface peut aussi être avancée pour les cultures *in vitro* des macrophages au contact de la pâte ou de la poudre d'os. Cette interaction est privilégiée puisque les cultures sont faites sur 3 jours au lieu de 21, ne laissant pas le temps au réseau cellulaire de se former de façon très avancée.

Nous avons aussi dosé certains facteurs sécrétés par les macrophages dans un environnement pro- ou anti-inflammatoire au contact de la poudre et la pâte. Il s'agit d'un dosage de type ELISA (LEGENDplex, BioLegend (Fig. 24)) où plusieurs protéines sont dosées simultanément, les anticorps étant liés à des billes de fluorescence définies, et leur lecture se faisant au FACS contre une gamme étalon des protéines d'intérêt.



Figure 24 : Principe du dosage de protéines en multiplex (LEGENDplex) [221].

Nous pouvons noter dans les surnageants de cellules cultivées dans un environnement pro-inflammatoire, une augmentation de la concentration du VEGF-A dans le milieu avec les macrophages au contact de la pâte comparé au contrôle (macrophages seuls), ainsi qu'une diminution du TNF- $\alpha$  et de l'IL-12p40, ce qui corrobore en partie les données obtenues en ARNm (Fig. 25). Néanmoins, ne s'agissant pas des mêmes cultures, les donneurs de macrophages sont différents des donneurs utilisées pour la mesure de l'expression des ARNm, il est donc difficile d'établir une corrélation certaine entre ces deux études, étant donné la forte variabilité interindividuelle généralement observée dans les échantillons biologiques primaires. De plus, la forte variabilité entre les donneurs n'a pas permis de mettre en évidence de différences statistiquement significatives, malgré le fait que les macrophages des différents donneurs répondaient dans le même sens au contact de la poudre et de la pâte d'os.

Partie 2 – Chapitre I. Caractérisation des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse



<u>Figure 25</u> : Dosage de facteurs sécrétés par les macrophages après 3 jours dans un environnement pro- (+GM-CSF) ou antiinflammatoire (M-CSF). Les données repsésentent la moyenne d'un dosage (n=1) sur 3 cultures de macrophages issus de 3 donneurs différents (N=3). Ctrl : contrôle (macrophages sans pâte ou poudre), PA : macrophages en présence de pâte, PO : macrophages en présence de poudre. ANOVA avec test posthoc de Bonferonni.

D'autre part, une caractérisation des cellules en cytométrie de flux pourrait être intéressante afin de préciser leur phénotype « M1 » ou « M2 » grâce notamment au marquage de CD68 (macrophages totaux), CD80 (M1) ou CD163 et CD206 (M2)[65,75,226].

*In vivo*, la régénération des défauts de calvaria induite par la pâte a été clairement démontrée dans deux modèles de régénération osseuse intramembranaire, un modèle de ROG et un modèle de défauts critiques. La première indication clinique potentielle de la pâte d'os est le comblement de défauts osseux dans des zones irrégulières ou difficile d'accès, notamment en chirurgie maxillo-faciale et dentaire post-extractionelle. Afin de générer des données de régénération d'os longs, il serait envisageable d'effectuer la même étude comparative entre la pâte et la poudre, par exemple chez le rat dans un modèle de défaut critique fémoral[227,228]. Enfin, un modèle de comblement osseux post-extractionel chez le chien (classiquement Beagle) peut aussi être envisagé pour obtenir une preuve de concept du potentiel régénératif de cette

pâte osseuse en zone mandibulaire. Néanmoins, une étude clinique chez l'homme est envisagée compte tenu des résultats obtenus.

Toujours est-il que la calvaria reste une zone difficile à régénérer, et ces résultats concernant la cicatrisation de défauts osseux dans ce site constituent de solides données quant à la capacité de la pâte d'os à induire une repousse osseuse. Comme évoqué, de nombreux matériaux ostéoconducteurs comme la poudre d'os ici testée ou bien des céramiques phosphocalciques biphasés (BCP) synthétiques, références cliniques dans de nombreuses indications, ne parviennent pas à régénérer ces défauts[201,202]. Cette observation a été faite dans notre laboratoire sur le même modèle de défauts critiques chez le rat Lewis (Fig. 26). Dans cette étude, des défauts de calvaria de 5mm de diamètre (défauts critiques) comblés grâce à des BCP seuls (MBCP®, 0.5-1mm, Biomatlante SA) ne présentaient aucune repousse osseuse 7 semaines après l'implantation (Fig. 26). Ceci souligne la difficulté de la repousse osseuse dans ce modèle, ces BCP étant très largement utilisés chez l'homme dans de nombraux contextes chirurgicaux en orthopédie, chirurgie du rachis ou maxillo-faciale[229–232].

a





<u>Figure 26</u> : Analyse histologique et quantification au  $\mu$ -CT de la repousse osseuse dans des défauts critiques de calvaria 7 semaines après chirurgies. (a) Coloration au trichrome de Goldner. Ft : fibrous tissue, Gr : granules de phosphate de calcium biphasé (BCP), Bo : os néoformé. D'après Paré, A *et al*. En révision mineure dans « ACS Biomaterials Science & Engineering ». Voir article annexe n°1.

Lors de la deuxième étude *in vivo* réalisée dans ce travail, nous avons évalué la repousse osseuse des défauts de calvaria de rat de taille critique de après 3 et 7 semaines d'implantation afin de mettre en évidence une différence précoce entre la poudre et la pâte. Dans cette étude nous avons observé que les défauts comblés avec la poudre d'os étaient incapables de régénérer, alors que ceux comblés par la pâte présentaient une forte repousse osseuse.

Nous nous sommes aussi intéressés au phénotype pro- ou anti- inflammatoire des macrophages dans ces défauts, où ces derniers comblés avec la poudre d'os contenaient très peu de cellules CD163<sup>+</sup>, et ceux avec la pâte d'os peu de cellules iNOS<sup>+</sup>. Dans ce même modèle de défauts critiques, nous pourrions aller plus loin dans la caractérisation *in vivo* de la transition phénotypique des macrophages recrutés lors de l'inflammation aiguë engendrée par l'acte chirurgical. Pour tenter de mettre en évidence des différences de cette transition du phénotype « M1 » vers « M2 », des analyses pourraient s'effectuer dans des temps post implantation plus précoces, par exemple lors de la première semaine après la création du défaut et le comblement osseux, où la transition phénotypique commence[233,234]. Nous pourrions alors avoir des précisions sur celle-ci en supplément du phénotype global des macrophages, illustré dans l'étude que nous avons réalisée.

Partie 2 - Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

# Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de

la pâte osseuse

# Rationnel de l'étude

Le deuxième objectif de ce travail est d'améliorer les propriétés ostéogéniques de la pâte d'os.

De nombreux adjuvants peuvent être associés à un biomatériau afin d'augmenter la repousse ou inhiber la résorption osseuse. Nous pouvons citer par exemple des facteurs de croissance (rhBMP-2), des molécules chimiques médicamenteuses (bisphosphonates), des anticorps (dénosumab), ou encore des dispositifs médicaux (cristaux d'hydroxyapatite, phosphates de calcium). L'objectif pour améliorer les propriétés de repousse osseuse de la pâte d'os était de pouvoir y mélanger la substance sélectionnée, après sa fabrication ou bien à la PPD avant l'étape d'autoclavage. Il était aussi question de ne pas changer le statut réglementaire du greffon « Tissus ou organes d'origine humaine ou animale (THA) », afin de faciliter la potentielle mise sur le marché et application thérapeutique. L'ajout de substances peptidiques, protéiques, chimiques ou médicamenteuses modifie généralement ce statut, à cause de leur effet biologique. De plus, dans l'optique de pouvoir mélanger l'adjuvant en amont de l'autoclavage, sa thermostabilité se devait d'être établie. Ceci nous a conduits à nous tourner vers des adjuvants de type « dispositifs médicaux » à incorporer au greffon.

Pour cela, nous avons choisi des nanoparticules cristallines d'hydroxyapatite de taille nanométrique (nHA), ces derniers étant utilisées comme matière première pour la fabrication de dispositifs médicaux implantables. De plus, la fraction minérale du tissu osseux est composée de nano cristaux d'hydroxyapatite. Les nHA synthétiques ont cependant des propriétés biologiques très variées en fonction de leur taille, forme et composition. Il a été démontré que des doses faibles des nHA sphériques (environ 20nm de diamètre) favorisaient la prolifération de MSC, mais aussi la production d'ostéocalcine et d'ostéopontine dans ces cellules. En revanche, la minéralisation de la matrice était altérée en présence de ces nHA[235]. Une autre étude a démontré que des nHA en forme d'aiguilles ou de plaques induisaient une

### Partie 2 - Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

mortalité cellulaire en comparaison à des nHA de forme sphérique ou de bâtonnets chez des cellules BEAS-2B, une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines[236]. Néanmoins, cette mortalité cellulaire in vitro induite par des nHA était due à l'agglomération des particules et leur sédimentation au niveau du tapis cellulaire conduisant à une forte concentration locale et une endocytose massive de ces nHA induisant la mort des cellules [237]. En outre, l'effet des nHA in vivo va dépendre de leur voie d'administration et de leur association à d'autres biomatériaux. À titre d'exemple, des nHA entrent dans la composition de certains dentifrices « désensibilisants », via la reminéralisation de la dent[238-240]. Si certaines nHA sont ingérés, ils se retrouvent dans l'estomac où ils sont dissous par son pH extrêmement acide (pH=1-2)[241]. Lors d'une ingestion, le passage dans le flux sanguin des nHA qui n'auraient pas été dissous, s'effectue via un transport cellulaire. Ce transport est dépendant d'une endocytose dans un endolysosome acide, suivi d'une exocytose, ce qui laisse peu de chance aux nHA, instables à pH acide, de franchir les barrières du tractus gastro-intestinal, ce dernier ayant été démontré comme une barrière efficace contre les nanoparticules [242,243]. Enfin, lors d'une implantation des nHA, seules ou associées à d'autres biomatériaux, ceux-ci peuvent s'agglomérer, s'éparpiller ou se dissoudre en fonction de leur forme, mobilité et de leur zone d'implantation. L'effet des cellules sur ces nHA et les biomatériaux associés sont variables ; par exemple les ostéoclastes vont solubiliser des surfaces solides, alors que les macrophages vont endocyter les nanoparticules et les dissoudre grâce au pH acide des endolysosomes[244,245].

Les nHA choisies dans cette étude ont une taille de 30 à 40nm, sous forme de courts bâtonnets, fabriquées par la société Fluidinova (Portugal), et utilisée comme matière première pour la production de biomatériaux, ou bien comme agent de traitement de surface afin de favoriser l'osteointégration de dispositifs médicaux[246–250].

L'effet de ces nHA a d'abord été évalué *in vitro* sur des cellules STRO-1<sup>+</sup>, une lignée de cellules stromales mésenchymateuse humaine[251]. L'activité métabolique de ces cellules a

### Partie 2 - Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

d'abord été mesurée en présence de doses croissantes des nHA. Ces cellules ont ensuite été cultivées en présence de ces nHA avec ou sans facteurs ostéogéniques où nous avons observé la minéralisation de leur matrice et quantifié l'activité de l'ALP dans ces cellules. Par la suite, l'évolution du phénotype de monocytes humains (Cf. Partie 2) a été évaluée en présence de ces nHA seules ou mélangées à la pâte d'os allogénique. Pour terminer, deux études *in vivo* ont été effectuées dans des défauts osseux de taille critique dans la calvaria de rats. Dans une première étude nous avons évalué l'effet régénératif de la pâte d'os associée à de faibles doses de nHA, puis une deuxième étude nous a permis de comparer l'effet régénératif de la pâte d'os à l'autogreffe ainsi qu'en association à des doses plus élevées de nHA.

# Matériel et méthodes

Le matériel utilisé ainsi que les méthodes expérimentales effectuées dans ce chapitre ont pour la plupart été détaillées dans l'article expérimental précédent. Les éléments identiques ne seront donc pas repris ici, certains éléments différents seront néanmoins indiqués au fil des besoins.

# **Résultats expérimentaux**

Les nHA utilisées dans cette étude ont d'abord été observées en microscopie électronique à balayage (Fig. 27). La solution stock à 5,3% (m/v, soit 53000  $\mu$ g/mL) de nHA dans de l'eau ultra-pure se présentait comme une suspension blanche opaque. Une fois l'eau évaporée et les nHA placées dans la chambre à vide du microscope, celles-ci apparaissaient comme une couche épaisse homogène, où la densité des particules rendait difficile leur observation. Une fois ces nHA diluées et observées à concentration plus faible (100 $\mu$ g/mL), nous avons pu observer au plus fort grossissement (4000x) des amas de nHA d'une taille très inférieure à 1 $\mu$ m.



<u>Figure 27</u>: Observation en microscopie à balayage des nHA à leur concentration stock et diluées. Barres d'échelles :  $5\mu m$  (400x),  $10\mu m$  (1000x),  $1\mu m$  (4000x).

La solution stock de nHA a été placée dans des flacons en verre scellés puis mis à l'autoclave (20min à 121°C) pour stérilisation. Cette solution stock ainsi qu'une dilution (100µg/mL) ont été mises dans du milieu de culture (DMEM/F12, 10% SVF sans antibiotiques) et placées à l'incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Après une semaine, aucune turbidité ni changement de couleur des solutions n'ont été observés, ce qui nous a permis de nous assurer que les nHA

### Partie 2 - Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

ne se dissolvaient pas dans le milieu (nHA toujours présents dans la solution stock) et que les solutions étaient bien stériles (Fig. 28).



<u>Figure 28</u> : Observation des nHA de la suspension stock (gauche) puis diluée (droite) dans du milieu de culture) après une semaine à l'incubateur.

Nous avons ensuite mis au contact ces nHA diluées avec des cellules de la lignée STRO- $1^+$  adhérentes en deux dimensions (ensemencement à  $5.10^3$  cellules/cm<sup>2</sup>). L'évolution de l'activité métabolique de ces cellules a été suivie pendant 48h grâce au test CCK-8 basé sur la réduction de sels de tétrazolium.

Après 24 et 48h de culture, les cellules cultivées en présence de nHA à 10 et 80 µg/mL avaient une morphologie similaire aux cellules contrôles (Fig. 29). Dans les cultures avec la concentration de nHA la plus élevée 2500µg/mL, nous avons néanmoins remarqué des amas de nHA visibles au niveau du tapis cellulaire, rendant les cellules difficiles à voir (Fig. 29). Au bout de 24h, aucune différence d'activité métabolique n'était observée dans les cellules cultivées en présence de nHA en comparaison au contrôle (Fig. 30). En revanche, après 48h de contact les cellules cultivées en présence de nHA présentaient une activité métabolique rapportée à J0 jusqu'à deux fois plus faible par rapport au contrôle (Fig. 30).

Partie 2 - Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse



<u>Figure 29</u> : Observation de cellules STRO-1<sup>+</sup> en culture en présence de nHA à 10, 80 et  $2500\mu$ g/mL. Le contrôle représente les cellules en absence de nHA. Act. D indique des cellules traités avec  $5\mu$ g/mL d'actynomicyne D, un inhibiteur de la transcription de l'ADN. Barres d'échelle :  $100\mu$ m.



<u>Figure 30</u>: Viabilité des cellules STRO-1<sup>+</sup> en présence de nHA à 10,80 et  $2500\mu$ g/mL. Les données sont représentées comme la moyenne ± l'écart standard à la moyenne (N=1, n=3).

Ces cellules ont ensuite été ensemencées à  $1.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> et cultivées pendant 4 et 7 jours en absence de facteurs ostéogéniques (-) (DMEM/F12 10% SVF, 1% PS) ou en présence de ces facteurs (+) (50 $\mu$ M d'acide ascorbique, 100nm de dexaméthasone et 10mM de  $\beta$ -

glycérophosphate) en présence de plusieurs concentrations de nHA (10, 25, 50 et 100 µg/mL). Ces cellules conservaient une morphologie identique aux cellules contrôles (sans nHA) avec un tapis cellulaire dense (Fig. 31). Seules les cellules cultivées en présence de 100µg/mL de nHA au bout de 7 jours présentaient des dépôts minéralisés visibles dans les cultures (Fig. 31, flèches blanches). Une coloration au rouge alizarine, spécifique des dépôts de calcium, a pu mettre en évidence une différence nette dans la minéralisation de la matrice. Comme attendu, les cellules cultivées en présence de 100µg/mL de nHA présentaient une coloration rouge de la matrice plus intense que les cellules cultivées à des doses inférieures de nHA ou aux cellules contrôle (Fig. 32). Ce phénomène était observé dès le quatrième jour de culture en absence et en présence de facteurs ostéogéniques (Fig. 32). Néanmoins, le dosage de l'activité de l'ALP dans ces cellules au bout de 7 jours n'a pas permis de mettre en évidence de différences entre les différentes conditions de culture (Fig. 33).



<u>Figure 31</u> : Observation des cellules STRO-1<sup>+</sup> en absence de facteurs ostéogéniques (-) ou en leur présence (-) en présence de nHA à 10, 25, 50 et  $100\mu$ g/mL. Le contrôle représente les cellules cultivées en absence de nHA. Barres d'échelle :  $200\mu$ m





<u>Figure 32</u> : Coloration au rouge alizarine des dépôts de calcium dans la matrice extracellulaire des cellules STRO-1<sup>+</sup> en absence de facteurs ostéogéniques (-) ou en leur présence (+) en présence de nHA à 10, 25, 50 et 100µg/mL. Le contrôle représente les cellules cultivées en absence de nHA. Barres d'échelle :  $500\mu$ m



<u>Figure 33</u> : Dosage de l'activité de l'ALP des cellules STRO-1<sup>+</sup> après 7 jours en absence de facteurs ostéogéniques (CM) ou en leur présence (OM) en présence de nHA à 10, 25, 50, 80 et  $100\mu$ g/mL. Le contrôle représente les cellules cultivées en absence de nHA. (N=1, n=3)

Dans le but d'évaluer l'effet des nHA sur le phénotype de macrophages humains, trois doses de nHA précédemment utilisées ont été mises en contact avec des monocytes circulants isolés de sang humain (plate-forme de développement et transfert à la clinique (DTC, CIC Biothérapies 0503 Nantes). Ces monocytes ont été placés dans un environnement pro- (+GM-CSF à 20ng/mL) ou anti-inflammatoire (+M-CSF à 50ng/mL) pendant 3 jours (Cf. Partie 2 Article expérimental) en présence de nHA, ou bien en présence de mélanges de pâte d'os + nHA. Les nHA seules à des doses faibles (10 et 80µg/mL) modifiaient le phénotype des macrophages par rapport au contrôle (cellules sans nHA). En présence de GM-CSF, l'expression des ARNm du *TNF-a*, de l'IL-12 et de l'IL-6 était diminuée en présence des deux doses les plus faibles de nHA. En revanche, en présence de 2500µg/mL de nHA l'expression des ARNm de l'IL-12 et de l'IL-6 était augmentée (Fig. 34). Ces résultats suggèrent une extinction du phénotype pro-inflammatoire des macrophages en présence de GM-CSF avec 10 et 80µg/mL de nHA et une promotion de ce phénotype avec 2500µg/mL de nHA. En présence de M-CSF, une diminution de l'expression des ARNm du VEGF-A, de l'IL-10 et du TGF-β était observée, quelle que soit la dose de nHA (Fig. 34). De plus, dans cet environnement antiinflammatoire, l'expression des ARNm du  $TNF-\alpha$ , de l'IL-12 et de l'IL-6 était augmentée en présence des nHA à 10 et 2500µg/mL (Fig. 34). Ces données suggèrent une extinction du phénotype pro-régénératif des macrophages en présence de M-CSF et de 10, 80 et 2500µg/mL de nHA.

Partie 2 - Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse



<u>Figure 34</u> : Phénotype des macrophages après 3 jours de culture en présence de nHA à 10, 80 et  $2500\mu$ g/mL. Le contrôle représente les cellules cultivées en absence de nHA. Les résultats sont représentés comme la moyenne de l'expression relative des ARNm.

Des macrophages ont par la suite été cultivés en présence de la pâte d'os seule ou associée aux deux doses les plus faibles de nHA, 10 et 80 µg/mL. Dans un environnement proinflammatoire (+GM-CSF) la pâte modifiait le phénotype des macrophages en diminuant l'expression des ARNm du *TNF-a*, de l'*IL-12* et de l'*IL-6*, tout en augmentant celle du *VEGF-A* et de l'*IL-10*. Un effet similaire était observé avec le mélange pâte + nHA 10µg/mL, cependant avec une augmentation moindre de l'expression des ARNm du *VEGF-A* et de l'*IL-10* (Fig. 35). Le mélange pâte + nHA 80µg/mL quant à lui diminuait l'expression des ARNm de *TNF-a* et *IL-12* tout en augmentant celle de l'*IL-6* ainsi que du *VEGF-A*, de l'*IL-10* et du *TGF-β*. Concernant les macrophages cultivés dans un environnement anti-inflammatoire (+M-CSF), toutes les conditions de culture (pâte, pâte + nHA 10µg/mL et pâte + nHA 80µg/mL) augmentaient l'expression des ARNm de l'*IL6*, du *VEGF-A* et du *TGF-β*. Les macrophages cultivés dans cet environnement en présence de la pâte ou de la pâte associée à 10µg/mL de nHA présentaient aussi une augmentation de l'expression des ARNm de l'*IL-10* (Fig. 35). Ces

### Partie 2 - Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

résultats indiquaient une conservation du phénotype pro-régénératif des macrophages, avec des expressions d'ARNm toutefois plus importantes que ches les contrôles (macrophages seuls).



<u>Figure 35</u> : Phénotype des macrophages après 3 jours de culture en présence de la pâte d'os et de la pâte associée à 10 ou  $80\mu$ g/mL de nHA. Le contrôle représente les cellules cultivées en absence de pâte ou de nHA. Les résultats sont représentés comme la moyenne de l'expression relative des ARNm.

Afin de déterminer le potentiel ostéogénique *in vivo* des mélanges pâte + nHA, une première étude animale a été réalisée dans un modèle de défauts critiques de calvaria chez le rat (Cf. Partie 2 Article expérimental). Des défauts de 5mm de diamètre ont été effectués sur des rats Lewis mâles âgés de 8 semaines, puis la repousse osseuse (volume minéral MV / volume de tissu TV) a été quantifiée tridimentionellement à l'aide microtomographie aux rayons X ( $\mu$ -CT) après 3 et 7 semaines de régénération. Les groupes effectués étaient (n=6 par groupe et par temps):

- Défauts non comblés (contrôle)
- Pâte
- Pâte + MOT (moelle osseuse totale de rat)
- ➢ Pâte, nHA 10µg/mL (0,001% m/m)
- ➢ Pâte, nHA 80µg/mL (0,008% m/m)
- ➢ Pâte, nHA 2500µg/mL (0,22% m/m)

Tous les mélanges ont été effectués au moment de l'opération, la moelle osseuse de rat ayant été récoltée en rinçant au NaCl 0.9% (100µL/rat) les fémurs et tibias de 2 rats donneurs.

Les observations radiologiques ont mis en évidence l'absence de cicatrisation à 3 et 7 semaines des défauts contrôles, validant leur taille critique des défauts, où seulement une faible repousse osseuse centripète aux berges des défauts était observée. Tous les autres défauts présentaient une repousse osseuse dès 3 semaines, et à 7 semaines (Fig. 36, flèches blanches). Les quantifications des MV/TV ont montré des valeurs équivalentes pour tous les groupes comblés à 3 et 7 semaines, les repousses osseuses étant donc équivalentes dans les défauts comblés avec de la pâte, pâte + MOT ou les mélange de pâte et nHA (Fig. 37).


<u>Figure 36</u> : Reconstruction des acquisitions au  $\mu$ -CT des défauts de clavaria 3 et 7 semaines après l'implantation. Flèches jaunes : pâte d'os allogénique, flèches blanches : os néoformé. Barres d'échelles : 1mm.





<u>Figure 37</u>: Quantification de la repousse osseuse dans les défauts critiques de clavaria 3 et 7 semaines après opération. Twoway ANOVA avec test post-hoc de Bonferonni. Les valeurs représentent la moyenne de 6 défauts  $\pm$  l'écart standard à la moyenne (SEM).

Nous avons ensuite effectué une deuxième étude *in vivo* dans le même modèle avec des mélanges pâte nHA à des doses plus élevées (3% et 10% m/m final). Nous avons aussi inclus dans cette étude des groupes « témoins » additionnels, à savoir une suspension de nHA hautement concentrée (30%) dans de l'eau ultra pure, ainsi que de l'autogreffe la technique de référence dans de nombreux contextes cliniques. Les rats Lewis ayant un degré de consanguinité très élevé cette méthode est une approche simple et fiable pour l'autogreffe de tissus chez le rongeur. Les greffons autologues ont été récoltés chez des annimaux donneurs en récupérant l'os trabéculaire dans les épiphyses fémorales et tibiales.

Dans cette étude les groupes effectués étaient donc (n=6 par groupe et par temps):

- Défauts non comblés (contrôle)
- ▶ nHA 30%
- Autogreffe
- ➢ Pâte
- Pâte + MOT (moelle osseuse totale de rat)
- ➢ Pâte, nHA 0,22% m/m
- ➢ Pâte, nHA 3% m/m
- ➢ Pâte, nHA 10% m/m

L'observation des reconstructions des défauts et la quantification du MV/TV a été effectuée dans tous les groupes au moment de l'implantation (0 semaines), ainsi que 3 et 7 semaines après l'implantation.

Lors de l'observation radiologique, les défauts contrôles ne présentaient qu'une faible repousse osseuse centripète à 3 et 7 semaines, comme observé dans notre précédent modèle, validant la taille critique des défauts (Fig. 38). La suspension de nHA à 30% était bien visible au moment de l'implantation, mais n'était plus distinguable après 3 et 7 semaines. Les défauts comblés avec ces nHA à 30% présentaient uniquement une repousse osseuse centripète visible à 7 semaines aux berges des défauts de façon similire aux contrôles. Les greffons autogéniques étaient bien visibles au moment de l'implantation, mais les particules d'os broyés n'étaient plus retrouvées après 3 semaines, laissant place à une repousse osseuse bien visible quoique poreuse. Cet os néoformé était aussi bien visible au bout de 7 semaines, tout en étant moins poreux qu'à 3 semaines (Fig. 38). Dans tous les autres groupes comblés avec la pâte d'os, la pâte d'os + MOT ou bien la pâte d'os mélangée à des nHA, les particules de la pâte étaient retrouvées après 3 et 7 semaines d'implantation. Cependant une repousse osseuse n'était observée que dans les

## Partie 2 - Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

groupes pâte, pâte + MOT et pâte nHA 0.22% à 3 et 7 semaines post implantation (Fig. 38, flèches blanches). En effet, dans les défauts comblés avec la pâte d'os associée aux deux doses les plus élevées de nHA (3% et 10% m/m), aucune repousse osseuse n'était observée. De plus, peu de particules de greffon étaient retrouvés dans les défauts comblés avec la pâte mélangée à 10% de nHA au bout de 7 semaines (Fig. 38).



<u>Figure 38</u> : Reconstruction des acquisitions au  $\mu$ -CT des défauts de clavaria à l'implantation puis après 3 et 7 semaines de régénération. Les flèches blanches pointent l'os nouvellement formé. Flèches jaunes : greffons, flèches blanches : os néoformé. Barres d'échelles : 1mm.

### Partie 2 - Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

La quantification tridimensionnelle du MV/TV dans les défauts a confirmé les observations des reconstructions radiologiques (Fig. 39). Une faible repousse osseuse a été quantifiée dans les défauts contrôles après 3 et 7 semaines. Concernant les défauts comblés avec les nHA à 30%, le MV/TV à l'implantation était d'environ 90%, chutant à moins de 5% après 3 semaines (Fig. 39). Une augmentation du MV/TV jusqu'à 15% à 7 semaines a confirmé l'observation radiologique de la repousse osseuse centripète dans ces défauts. Concernant les défauts comblés avec de l'autogreffe, la repousse osseuse a été clairement mise en évidence par l'augmentation du MV/TV passant de 22% à l'implantation à 40% puis 50% à respectivement 3 et 7 semaines post implantation, soit une augmentation de plus de 2 fois (Fig. 39). Une augmentation comparable a été observée dans les défauts comblés avec la pâte. Concernant les défauts comblés avec les mélanges pâte + MOT et pâte nHA 0.22%, le MV/TV semble augmenter au cours du temps dans ces groupes, malgré le fait que le test statistique utilisé ne permette pas de mettre en évidence des différences significatives entre les MV/TV à 0, 3 et 7 semaines (Fig. 39). Concernant les deux derniers groupes avec les mélanges pâte nHA les plus élevés, aucune différence statistique n'a été mise en évidence dans ces groupes avec néanmoins une tendance à la diminution des MV/TV au bout de 3 et 7 semaines d'implantation avec 10% de nHA intégrés à la pâte d'os (Fig. 39).



<u>Figure 39</u>: Quantification de la repousse osseuse dans les défauts critiques de clavaria à 0 (implantation), 3 et 7 semaines après l'implantation. Two-way ANOVA, \*: p<0,05; \*\*\*: p<0,001. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  l'écart standard à la moyenne (SEM) (n=6).

## **Discussions sur l'étude**

L'observation des nHA utilisées dans cette étude a été effectuée au MEB à des grossissements jusqu'à 4000x, néanmoins même dans la dilution la plus élevée (100µg/mL) les nHA n'étaient pas vraiment individualisées lors de l'observation. Une observation de nHA encore plus diluées pourrait être envisagée au MEB à des grossissements plus élevés, ou bien en microscopie électronique à transmission (MET) afin d'observer clairement ces particules.

Afin de nous assurer de la stérilisation des nHA par autoclave (recommandé par le fournisseur), nous aurions pu étaler ces nHA sur des boites des géloses de « *lysogeny broth* » (LB) sans antibiotique. Afin de nous assurer de la stébilité des nHA dans le milieu de culture, nous aurions pu effectuer un dosage des ions en solution à l'aide d'un osmomètre. Néanmoins, les milieux contenant les solutions stocks et dilué de nHA n'ont pas montré de turbidité, commun lorsque qu'une contamination microbienne a lieu dans les solutions. Ces suspensions n'ont pas non plus changé de couleur, le rouge de phénol dans les milieux de culture étant un indicateur coloré du pH de la solution, le milieu tirant vers le jaune lors d'une acidification[252,253]. Ceci indique que les systèmes tampons phosphate (NaH2PO4/PO4<sup>3-</sup>) et bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) ne sont pas perturbés par l'ajout de nHA et leur dissolution.

L'ajout des nHA au contact des cellules STRO-1<sup>+</sup> a uniquement diminué l'activité métabolique des cellules au bout de 48h en présence de la plus forte dose de nHA ( $2500\mu g/mL$ ). Cependant nous aurions pu coupler ce test d'activité métabolique à un comptage de cellules ou à une quantification de l'ADN dans cellules (test PicoGreen, Cf. Partie 2 – Article expérimental). Bien que l'ensemencement des cellules à 5.10<sup>3</sup> cellules/cm<sup>2</sup> ait permis d'observer l'effet des nHA sur des cellules prolifératives, des cultures sur plus long terme auraient pu être envisagées. Cependant cette lignée de cellules a tendance à se décoller une fois la confluence atteinte et le tapis cellulaire formé, rendant les cultures impossible au long cours. Néanmoins, il aurait pu être possible d'observer ces cellules en présence de nHA au microscope

électronique à transmission (MET) afin de visualiser l'éventuelle endocytose des nHA par les cellules et leur devenir dans les endosome, leur dissolution ou bien leur relargage dans la matrice.

Les cultures des cellules STRO-1<sup>+</sup> en absence et présence de facteurs ostéogéniques ont permis de mettre en évidence une coloration de la matrice extracellulaire au rouge alizarine plus importante en présence de 100µg/mL de nHA que les concentrations plus faibles. Il aurait cependant pu être possible d'effectuer un dosage de cette coloration en dissolvant la coloration au rouge alizarine dans de l'acide acétique à 10% pour quantifier ces différences grâce à un dosage spectrophotométrique[254]. De plus, il est probable que les nHA soient piégés dans la matrice extracellulaire, plutôt qu'endocytés dans les cellules puis exocytés pour former une matrice minéralisée. Quoi qu'il en soit l'activité ALP de ces cellules n'a pas été modifiée quelle que soit la dose de nHA dans leur milieu, reste à savoir si des western blots auraient pu détecter l'augmentation de la production d'autres protéines impliqués dans la repousse osseuse ou caractéristiques d'un stade de différenciation ostéoblastique, comme la BSP, l'OCN ou l'OPN.

Concernant la modification du phénotype des macrophages, ici aussi il serait intéressant de visualiser en MET l'endocytose et la dissolution des nHA dans ces cellules et d'effectuer des dosages de cytokines dans le surnageant de culture. Un test de fonctionnalité des macrophages au contact de lymphocytes T pourrait aussi nous indiquer si les macrophages en présence de nHA sont capables d'induire ou inhiber la prolifération et activation de ces lymphocytes[255,256]. Ceci dans le but de préciser l'état pro- ou anti-inflammatoire des monocytes au contact des nHA seuls ou associées à la pâte d'os.

*In vivo*, les doses faibles de nHA mélangées à la pâte d'os n'ont pas pu induire de repousse osseuse supérieure par rapport à la pâte seule. Les mélanges avec les doses de nHA les plus fortes inhibaient même la repousse osseuse engendrée par la pâte d'os. Ceci malgré les données de la littérature ainsi que des données de notre laboratoire dans le même modèle (Fig.

#### Partie 2 - Chapitre II. Amélioration des propriétés ostéogéniques de la pâte osseuse

40). Dans ce modèle de défauts osseux critiques de calvaria chez le rat, ces nHA étaient associées à un hydrogel d'hydroxypropylméthylcellulose silanisé (HMPC-Si) supplémenté ou non en moelle osseuse de rat. Ces nHA à 1% (m/m) avec l'HPMC-Si ne permettaient pas de repousse osseuse, mais une fois associés à l'HPMC-Si + MOT une forte repousse osseuse était observée.



<u>Figure 40</u>: Repousse osseuse dans des défauts critiques de clavaria de rat après 10 semaines. (a) défauts entiers, (b) partie centrale des défauts. Hydrogel : HMPC-Si, HA-RP : nHA (Fluidinova), HA-NP : nHA synthétisés sous forme d'aiguilles. Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  l'écart-type (SD) [253].

Ces nHA sont donc capables de supporter ou de promouvoir une repousse osseuse dans certaines conditions. Dans cette étude ces nHA étaient piégés dans l'hydrogel d'HPMC-Si alors que dans notre étude ils étaient autour des grains de pâte, étant mélangées au moment de l'implantation. Ces nHA dans l'HPMC-Si seraient peut-être libérés progressivement au cours du temps en empêchant une éventuelle réaction inflammatoire aiguë empêchant la régénération du tissu osseux. Néanmoins, les nHA associées à l'HMPC-Si seuls n'induisaient pas de repousse osseuse, seul le groupe nHA + HPMC-Si + MOT présentait une repousse des défauts. Dans notre étude, des analyses histologiques pourraient nous indiquer si ces nHA induisent une réaction inflammation importante au moment de l'implantation se poursuivant dans le temps et empêchant la régénération des défauts. Étant donné la faible taille des nHA, ces derniers ne pourraient être visibles uniquement en gros amas avec ces observations histologiques. Ici aussi, des analyses au MEB nous indiqueraient si les particules de nHA sont endocytées par les cellules immunitaires ou les progéniteurs ostéoblastiques. Ceci n'explique cependant pas pourquoi si ces nHA quittent le défaut osseux, la pâte ne peut plus régénérer ces derniers étant donné les résultats obtenus avec la pâte seule.

Conclusions et perspectives

**Conclusions et perspectives** 

Ce travail démontre les propriétés de fomation osseuse de la pâte d'os développée par BIOBank. Ceci est le premier travail à notre connaissance concernant la caractérisation des capacités régénératrices d'un greffon osseux allogénique partiellement déminéralisé sous forme de pâte. Nous avons effectué cette démonstration à plusieurs reprises dans des modèles de calvaria chez le rat, en régénération osseuse guidée et dans des défauts osseux de taille critique. Cette pâte d'os devrait montrer des propriétés de repousse osseuse intéressantes dans des modèles d'os long chez le rat (fémur par exemple), où la proximité avec la moelle favorise la régénération osseuse contrairement à la calvaria. Le potentiel régénératif de la pâte osseuse pourraît aussi être évalué dans des défauts segmentaires de plus grand taille, par exemple des défauts mandibulaires chez la brebis. Enfin, il serait intéressant d'étudier le pouvoir ostéoinducteur de la pâte d'os en site hétérotopique, par exemple en sous-cutanné ou intramusculaire. Néanmoins, la revendication réglementaire de l'ostéoinductivité d'un substitut osseux passe par sa vérification sur chaque lot, et est donc onéreuse. Cette revendication n'est pas l'objectif, mais il serait néanmoins intéresant d'étulier le pouvoir ostéoinducteur de la pâte

Il est évident que la déminéralisation partielle de ce greffon osseux allogénique améliore ses capacités thérapeutiques en comparaison à un greffon osseux totalement minéralisé. Dès lors, il serait intéressant d'appliquer cette déminéralisation à des greffons massiques tout en essayant de garder leurs propriétés mécaniques afin d'élargir les contextes cliniques d'utilisation de ces greffons osseux partiellement déminéralisés.

L'association de nHA à la pâte d'os dans nos études n'a pas permis d'induire une repousse osseuse supérieure à celle engendrée par la pâte seule, cette repousse étant même inhibée avec les doses les plus élevées de nHA. Dans notre étude, les nHA étaient mélangées à la pâte d'os, se retrouvant donc à la surface des particules et ont donc probablement été rincées par les fluides biologiques dans les premiers jours de l'implantation. Dans tous les cas ces nHA

100

ont un effet délétère sur la repousse osseuse lorsque associées à la pâte d'os dans le modèle de défauts osseux critiques de la calvaria de rat utilisé dans cette étude.

En revanche, dans la dernière étude *in vivo* effectuée dans ce travail de thèse, nous avons pu comparer l'effet régénératif de la pâte d'os à l'autogreffe osseuse, la technique de référence dans beaucoup de contextes cliniques en chirurgie du squelette. Après 3 et 7 semaines de régénération dans des défauts critiques de calvaria chez le rat, les MV/TV (volume minéral/volume de tissu) étaient équivalents entre les défauts comblés par la pâte et l'autogreffe. Des études histologiques sont en cours afin de qualifier la nature des tissus observés et comparer au niveau tissulaire la qualité de la repousse osseuse engendrée par la pâte d'os et l'autogreffe.

Pour terminer ce manuscrit, toutes ces études soulignent l'effet régénératif majeur de cette pâte d'os partiellement déminéralisée, qui à notre connaissance est la première description à la fois *in vitro* et *in vivo* d'un substitut osseux allogénique de ce genre. Les objectifs de cette thèse CIFRE sont pleinement atteints, la perspective principale de ce travail étant le transfert à la clinique de ce nouveau greffon osseux, avec la mise en place d'un essai clinique dans une indication de régénération osseuse intramembranaire chez l'homme en chirurgie crâniomaxillo-faciale ou en chirurgie dentaire post-extractionelle.

# **Références bibliographiques**

- [1] D.O. Wagner, P. Aspenberg, Where did bone come from?, Acta Orthopaedica. (n.d.) 6.
- [2] S. Bowring, J. Grotzinger, C. Isachsen, A. Knoll, S. Pelechaty, P. Kolosov, Calibrating rates of early Cambrian evolution, Science. 261 (1993) 1293–1298. https://doi.org/10.1126/science.11539488.
- [3] A. Kouchinsky, S. Bengtson, B. Runnegar, C. Skovsted, M. Steiner, M. Vendrasco, Chronology of early Cambrian biomineralization, Geol. Mag. 149 (2012) 221–251. https://doi.org/10.1017/S0016756811000720.
- [4] B.S.P. Bentham Science Publisher, Origin and Evolution of Bone and Dentin and of Acidic Secretory Calcium-Binding Phosphoproteins, in: M. Goldberg (Ed.), Series Title: Frontiers Between Science and Clinic in Odontology Volume Title: Phosphorylated Extracellular Matrix Proteins of Bone and Dentin, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2012: pp. 3–60. https://doi.org/10.2174/978160805465711202010003.
- [5] J.A. Ruben, The Evolution of Bone, (n.d.) 12.
- [6] J.A. Ruben, A.F. Bennett, Intense exercise, bone structure and blood calcium levels in vertebrates, Nature. 291 (1981) 411–413. https://doi.org/10.1038/291411a0.
- [7] D. Harold, FUNCTION OF BONE AS A MINERAL, 16 (n.d.) 7.
- [8] C. Aparicio, M.P. Ginebra, Biomineralization and Biomaterials: Fundamentals and Applications, Woodhead Publishing, 2015.
- [9] W. Zhao, M.H. Byrne, B.F. Boyce, S.M. Krane, Bone resorption induced by parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase-resistant mutant mice, J. Clin. Invest. 103 (1999) 517–524. https://doi.org/10.1172/JCI5481.
- [10] W.D. Fraser, K.W. Colston, J.C. Stevenson, Chapter 9.4 Bone and Calcium Metabolism, in: D. Wild (Ed.), The Immunoassay Handbook (Fourth Edition), Elsevier, Oxford, 2013: pp. 705–720. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00058-0.
- [11] N. Beck, S.K. Webster, Effects of acute metabolic acidosis on parathyroid hormone action and calcium mobilization, Am. J. Physiol. 230 (1976) 127–131. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1976.230.1.127.
- [12] Bones: Types, structure, and function, Medical News Today. (n.d.). https://www.medicalnewstoday.com/articles/320444.php (accessed July 8, 2019).
- [13] Bone Classification and Structure | Anatomy and Physiology, (n.d.). https://courses.lumenlearning.com/nemcc-ap/chapter/bone-classification/ (accessed July 9, 2019).
- [14] Introduction to Bone Biology: All About our Bones | International Osteoporosis Foundation, (n.d.). https://www.iofbonehealth.org/introduction-bone-biology-all-aboutour-bones (accessed July 9, 2019).
- [15] S.C. Marks, S.N. Popoff, Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton, Am. J. Anat. 183 (1988) 1–44. https://doi.org/10.1002/aja.1001830102.
- [16] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, A. Ripamonti, N. Roveri, M. Romanello, K.N. Suarez, L. Moro, D. Cbimica, U. Bologna, Chemical and Structural Characterization of the Mineral Phase from Cortical and Trabecular Bone, Journal of Inorganic Biochemistry. (n.d.) 7.
- [17] Different Types of Bones in Body and Their Function, Bone and Spine. (n.d.). https://boneandspine.com/types-of-bones/ (accessed July 8, 2019).
- [18] E.N. Marieb, Human Anatomy & Physiology (7th Edition), in: 2006.

- [19] S. Weiner, W. Traub, H.D. Wagner, Lamellar Bone: Structure–Function Relations, Journal of Structural Biology. 126 (1999) 241–255. https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4107.
- [20] J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, Medical Engineering. (1998) 11.
- [21] H. Chang, M.L. Knothe Tate, Concise Review: The Periosteum: Tapping into a Reservoir of Clinically Useful Progenitor Cells, STEM CELLS Translational Medicine. 1 (2012) 480–491. https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0056.
- [22] X. Zhang, H.A. Awad, R.J. O'Keefe, R.E. Guldberg, E.M. Schwarz, A Perspective: Engineering Periosteum for Structural Bone Graft Healing, Clin Orthop Relat Res. 466 (2008) 1777–1787. https://doi.org/10.1007/s11999-008-0312-6.
- [23] B. Clarke, Normal Bone Anatomy and Physiology, CJASN. 3 (2008) S131–S139. https://doi.org/10.2215/CJN.04151206.
- [24] S.C. Miller, B.M. Bowman, J.M. Smith, W.S.S. Jee, Characterization of endosteal bonelining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles, Anat. Rec. 198 (1980) 163– 173. https://doi.org/10.1002/ar.1091980204.
- [25] A.D. Berendsen, B.R. Olsen, Bone development, Bone. 80 (2015) 14–18. https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.035.
- [26] D.J. Hadjidakis, I.I. Androulakis, Bone Remodeling, Annals of the New York Academy of Sciences. 1092 (2006) 385–396. https://doi.org/10.1196/annals.1365.035.
- [27] N. Rosenberg, O. Rosenberg, M. Soudry, Osteoblasts in Bone Physiology Mini Review, RMMJ. 3 (2012). https://doi.org/10.5041/RMMJ.10080.
- [28] L. Li, T. Xie, STEM CELL NICHE: Structure and Function, (2005) 30.
- [29] P. Katsimbri, The biology of normal bone remodelling, Eur J Cancer Care. 26 (2017) e12740. https://doi.org/10.1111/ecc.12740.
- [30] T. Komori, H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R.T. Bronson, Y.-H. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki, T. Kishimoto, Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts, Cell. 89 (1997) 755–764. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80258-5.
- [31] A. Rutkovskiy, K.-O. Stensløkken, I.J. Vaage, Osteoblast Differentiation at a Glance, Med Sci Monit Basic Res. 22 (2016) 95–106. https://doi.org/10.12659/MSMBR.901142.
- [32] D. Chen, M.A. Harris, G. Rossini, C.R. Dunstan, S.L. Dallas, J.Q. Feng, G.R. Mundy, S.E. Harris, Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) Enhances BMP-3, BMP-4, and Bone Cell Differentiation Marker Gene Expression During the Induction of Mineralized Bone Matrix Formation in Culturesof Fetal Rat Calvarial Osteoblasts, Calcif Tissue Int. 60 (1997) 283–290. https://doi.org/10.1007/s002239900230.
- [33] G.S. Stein, J.B. Lian, A.J. van Wijnen, J.L. Stein, M. Montecino, A. Javed, S.K. Zaidi, D.W. Young, J.-Y. Choi, S.M. Pockwinse, Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression, Oncogene. 23 (2004) 4315–4329. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207676.
- [34] E.D. Jensen, R. Gopalakrishnan, J.J. Westendorf, Regulation of gene expression in osteoblasts, BioFactors. (2010) NA-NA. https://doi.org/10.1002/biof.72.
- [35] X. Zhou, K. von der Mark, S. Henry, W. Norton, H. Adams, B. de Crombrugghe, Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice, PLoS Genet. 10 (2014) e1004820. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004820.
- [36] M. Kerschnitzki, W. Wagermaier, P. Roschger, J. Seto, R. Shahar, G.N. Duda, S. Mundlos, P. Fratzl, The organization of the osteocyte network mirrors the extracellular

matrix orientation in bone, Journal of Structural Biology. 173 (2011) 303–311. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.014.

- [37] M. Prideaux, D.M. Findlay, G.J. Atkins, Osteocytes: The master cells in bone remodelling, Current Opinion in Pharmacology. 28 (2016) 24–30. https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.02.003.
- [38] L.F. Bonewald, The amazing osteocyte, J Bone Miner Res. 26 (2011) 229–238. https://doi.org/10.1002/jbmr.320.
- [39] S. Tatsumi, K. Ishii, N. Amizuka, M. Li, T. Kobayashi, K. Kohno, M. Ito, S. Takeshita, K. Ikeda, Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction, Cell Metabolism. 5 (2007) 464–475. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.001.
- [40] N. Nakagawa, M. Kinosaki, K. Yamaguchi, N. Shima, H. Yasuda, K. Yano, T. Morinaga, K. Higashio, RANK Is the Essential Signaling Receptor for Osteoclast Differentiation Factor in Osteoclastogenesis, Biochemical and Biophysical Research Communications. 253 (1998) 395–400. https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9788.
- [41] T.L. Burgess, Y. Qian, S. Kaufman, B.D. Ring, G. Van, C. Capparelli, M. Kelley, H. Hsu, W.J. Boyle, C.R. Dunstan, S. Hu, D.L. Lacey, The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) Directly Activates Mature Osteoclasts, J Cell Biol. 145 (1999) 527–538. https://doi.org/10.1083/jcb.145.3.527.
- [42] W.J. Boyle, W.S. Simonet, D.L. Lacey, Osteoclast differentiation and activation, Nature. 423 (2003) 337–342. https://doi.org/10.1038/nature01658.
- [43] H. Hsu, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.-L. Tan, G. Elliott, M.J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X.-Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M.B. Bass, W.J. Boyle, Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand, Proceedings of the National Academy of Sciences. 96 (1999) 3540–3545. https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3540.
- [44] W.J. Boyle, W.S. Simonet, D.L. Lacey, Osteoclast differentiation and activation, 423 (2003) 6.
- [45] X. Feng, Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease, Current Chemical Biology. 3 (2009) 189–196. https://doi.org/10.2174/187231309788166398.
- [46] G. Tomoaia, R.-D. Pasca, On the Collagen Mineralization. A Review, Medicine and Pharmacy Reports. 88 (2015) 15–22. https://doi.org/10.15386/cjmed-359.
- [47] E.P. Katz, S.-T. Li, Structure and function of bone collagen fibrils, Journal of Molecular Biology. 80 (1973) 1–15. https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90230-1.
- [48] J.E. Eastoe, B. Eastoe, The organic constituents of mammalian compact bone, Biochem. J. 57 (1954) 453–459. https://doi.org/10.1042/bj0570453.
- [49] N. Little, B. Rogers, M. Flannery, Bone formation, remodelling and healing, Surgery (Oxford). 29 (2011) 141–145. https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.01.002.
- [50] J.C. Crockett, F.P. Coxon, M.H. Helfrich, Bone remodelling at a glance, Journal of Cell Science. (n.d.) 8.
- [51] S.F. Gilbert, Osteogenesis: The Development of Bones, Developmental Biology. 6th Edition. (2000). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10056/ (accessed July 9, 2019).
- [52] H.K. Datta, W.F. Ng, J.A. Walker, S.P. Tuck, S.S. Varanasi, The cell biology of bone metabolism, Journal of Clinical Pathology. 61 (2008) 577–587. https://doi.org/10.1136/jcp.2007.048868.

- [53] S. Stewart, S.J. Bryant, J. Ahn, K.D. Hankenson, Chapter 24 Bone Regeneration, in: A. Atala, J.G. Allickson (Eds.), Translational Regenerative Medicine, Academic Press, Boston, 2015: pp. 313–333. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410396-2.00024-4.
- [54] Y.Y. Yu, S. Lieu, C. Lu, T. Miclau, R.S. Marcucio, C. Colnot, Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair, Bone. 46 (2010) 841–851. https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.11.005.
- [55] Y.-Q. Yang, Y.-Y. Tan, R. Wong, A. Wenden, L.-K. Zhang, A.B.M. Rabie, The role of vascular endothelial growth factor in ossification, International Journal of Oral Science. 4 (2012) 64–68.
- [56] K. Hu, B.R. Olsen, The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration, Bone. 91 (2016) 30–38. https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.06.013.
- [57] C. Maes, G. Carmeliet, Vascular and Nonvascular Roles of VEGF in Bone Development, Landes Bioscience, 2013. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6134/ (accessed January 28, 2019).
- [58] H. Zhang, X. Shi, L. Wang, X. Li, C. Zheng, B. Gao, X. Xu, X. Lin, J. Wang, Y. Lin, J. Shi, Q. Huang, Z. Luo, L. Yang, Intramembranous ossification and endochondral ossification are impaired differently between glucocorticoid-induced osteoporosis and estrogen deficiency-induced osteoporosis, Sci Rep. 8 (2018) 3867. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22095-1.
- [59] X. Zhou, K. von der Mark, S. Henry, W. Norton, H. Adams, B. de Crombrugghe, Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice, PLoS Genet. 10 (2014) e1004820. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004820.
- [60] L.J. Raggatt, N.C. Partridge, Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling, J. Biol. Chem. 285 (2010) 25103–25108. https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087.
- [61] B.F. Boyce, L. Xing, Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling, Archives of Biochemistry and Biophysics. 473 (2008) 139–146. https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.018.
- [62] M.L. Mouël, Apport de l'immunophénotypage monocytaire sanguin dans le diagnostic de la leucémie myélomonocytaire chronique, (n.d.) 89.
- [63] J.-M. Cavaillon, The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff, Journal of Leukocyte Biology. 90 (2011) 413–424. https://doi.org/10.1189/jlb.0211094.
- [64] A. Shapouri-Moghaddam, S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S.-A. Esmaeili, F. Mardani, B. Seifi, A. Mohammadi, J.T. Afshari, A. Sahebkar, Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease, J Cell Physiol. 233 (2018) 6425–6440. https://doi.org/10.1002/jcp.26429.
- [65] D.C. Lacey, A. Achuthan, A.J. Fleetwood, H. Dinh, J. Roiniotis, G.M. Scholz, M.W. Chang, S.K. Beckman, A.D. Cook, J.A. Hamilton, Defining GM-CSF– and Macrophage-CSF–Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models, J.I. 188 (2012) 5752–5765. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103426.
- [66] A. Celada, Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity, Journal of Experimental Medicine. 160 (1984) 55–74. https://doi.org/10.1084/jem.160.1.55.
- [67] S. Devaraj, N. Glaser, S. Griffen, J. Wang-Polagruto, E. Miguelino, I. Jialal, Increased Monocytic Activity and Biomarkers of Inflammation in Patients With Type 1 Diabetes, Diabetes. 55 (2006) 774–779. https://doi.org/10.2337/diabetes.55.03.06.db05-1417.
- [68] C.N. Lumeng, J.L. Bodzin, A.R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization, J. Clin. Invest. 117 (2007) 175–184. https://doi.org/10.1172/JCI29881.

- [69] K. Kawane, M. Ohtani, K. Miwa, T. Kizawa, Y. Kanbara, Y. Yoshioka, H. Yoshikawa, S. Nagata, Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages, Nature. 443 (2006) 998–1002. https://doi.org/10.1038/nature05245.
- [70] P.C. Grimm, R. Mckenna, P. Nickerson, M.E. Russell, J. Gough, E. Gospodarek, B. Liu, J. Jeffery, D.N. Rush, Clinical Rejection Is Distinguished from Subclinical Rejection by Increased Infiltration by a Population of Activated Macrophages, J Am Soc Nephrol. (1999) 8.
- [71] R. Abou-Khalil, F. Yang, M. Mortreux, S. Lieu, Y.-Y. Yu, M. Wurmser, C. Pereira, F. Relaix, T. Miclau, R.S. Marcucio, C. Colnot, Delayed Bone Regeneration Is Linked to Chronic Inflammation in Murine Muscular Dystrophy: INFLAMMATION DELAYS BONE REPAIR IN MDX MICE, Journal of Bone and Mineral Research. 29 (2014) 304–315. https://doi.org/10.1002/jbmr.2038.
- [72] N. Jetten, S. Verbruggen, M.J. Gijbels, M.J. Post, M.P.J. De Winther, M.M.P.C. Donners, Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo, Angiogenesis. 17 (2014) 109–118. https://doi.org/10.1007/s10456-013-9381-6.
- [73] D.A. Hume, The Many Alternative Faces of Macrophage Activation, Front. Immunol. 6 (2015). https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00370.
- [74] T. Rőszer, Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms, Mediators of Inflammation. 2015 (2015) 1–16. https://doi.org/10.1155/2015/816460.
- [75] S. Gordon, F.O. Martinez, Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions, Immunity. 32 (2010) 593–604. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007.
- [76] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, Nat Rev Immunol. 8 (2008) 958–969. https://doi.org/10.1038/nri2448.
- [77] Y. Zhou, S. Yoshida, S. Nakao, T. Yoshimura, Y. Kobayashi, T. Nakama, Y. Kubo, K. Miyawaki, M. Yamaguchi, K. Ishikawa, Y. Oshima, K. Akashi, T. Ishibashi, M2 Macrophages Enhance Pathological Neovascularization in the Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 56 (2015) 4767–4777. https://doi.org/10.1167/iovs.14-16012.
- [78] E.A. Ayaub, A. Dubey, J. Imani, F. Botelho, M.R.J. Kolb, C.D. Richards, K. Ask, Overexpression of OSM and IL-6 impacts the polarization of pro-fibrotic macrophages and the development of bleomycin-induced lung fibrosis, Sci Rep. 7 (2017) 13281. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13511-z.
- [79] A. Lukic, P. Larssen, A. Fauland, B. Samuelsson, C.E. Wheelock, S. Gabrielsson, O. Radmark, GM-CSF– and M-CSF–primed macrophages present similar resolving but distinct inflammatory lipid mediator signatures, The FASEB Journal. 31 (2017) 4370–4381. https://doi.org/10.1096/fj.201700319R.
- [80] J. Svensson, M.C. Jenmalm, A. Matussek, R. Geffers, G. Berg, J. Ernerudh, Macrophages at the Fetal–Maternal Interface Express Markers of Alternative Activation and Are Induced by M-CSF and IL-10, J.I. 187 (2011) 3671–3682. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100130.
- [81] J.W. Godwin, A.R. Pinto, N.A. Rosenthal, Macrophages are required for adult salamander limb regeneration, Proceedings of the National Academy of Sciences. 110 (2013) 9415–9420. https://doi.org/10.1073/pnas.1300290110.
- [82] L.J. Raggatt, M.E. Wullschleger, K.A. Alexander, A.C. Wu, S.M. Millard, S. Kaur, M.L. Maugham, L.S. Gregory, R. Steck, A.R. Pettit, Fracture healing via periosteal callus

formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification, The American Journal of Pathology. 184 (2014) 3192–3204.

- [83] C. Schlundt, T. El Khassawna, A. Serra, A. Dienelt, S. Wendler, H. Schell, N. van Rooijen, A. Radbruch, R. Lucius, S. Hartmann, G.N. Duda, K. Schmidt-Bleek, Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification, Bone. (2015). https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.10.019.
- [84] R. Zhang, Y. Liang, S. Wei, M2 macrophages are closely associated with accelerated clavicle fracture healing in patients with traumatic brain injury: a retrospective cohort study, Journal of Orthopaedic Surgery and Research. 13 (2018). https://doi.org/10.1186/s13018-018-0926-7.
- [85] P. Guihard, Rôle des monocytes/macrophages dans les processus d'ossification physiopathologique, Université de Nantes, 2012.
- [86] X.-T. He, X. Li, Y. Yin, R.-X. Wu, X.-Y. Xu, F.-M. Chen, The effects of conditioned media generated by polarized macrophages on the cellular behaviours of bone marrow mesenchymal stem cells, Journal of Cellular and Molecular Medicine. (2017). https://doi.org/10.1111/jcmm.13431.
- [87] Y. Zhang, T. Böse, R.E. Unger, J.A. Jansen, C.J. Kirkpatrick, J.J.J.P. van den Beucken, Macrophage type modulates osteogenic differentiation of adipose tissue MSCs, Cell and Tissue Research. 369 (2017) 273–286. https://doi.org/10.1007/s00441-017-2598-8.
- [88] L. Gong, Y. Zhao, Y. Zhang, Z. Ruan, The Macrophage Polarization Regulates MSC Osteoblast Differentiation in vitro, 46 (2016) 7.
- [89] L. Vi, G.S. Baht, H. Whetstone, A. Ng, Q. Wei, R. Poon, S. Mylvaganam, M. Grynpas, B.A. Alman, Macrophages Promote Osteoblastic Differentiation In Vivo: Implications in Fracture Repair and Bone Homeostasis: MACROPHAGES PROMOTE OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION, Journal of Bone and Mineral Research. 30 (2015) 1090–1102. https://doi.org/10.1002/jbmr.2422.
- [90] M.E. Bernardo, W.E. Fibbe, Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation, Cell Stem Cell. 13 (2013) 392–402. https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006.
- [91] M. Sun, L. Sun, C. Huang, B. Chen, Z. Zhou, Induction of Macrophage M2b/c Polarization by Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells, Journal of Immunology Research. 2019 (2019) 1–12. https://doi.org/10.1155/2019/7059680.
- [92] T. Lin, J. Pajarinen, A. Nabeshima, L. Lu, K. Nathan, E. Jämsen, Z. Yao, S.B. Goodman, Preconditioning of murine mesenchymal stem cells synergistically enhanced immunomodulation and osteogenesis, Stem Cell Research & Therapy. 8 (2017). https://doi.org/10.1186/s13287-017-0730-z.
- [93] B. Chen, Y. Ni, J. Liu, Y. Zhang, F. Yan, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Exert Diverse Effects on Different Macrophage Subsets, Stem Cells International. 2018 (2018) 1–9. https://doi.org/10.1155/2018/8348121.
- [94] A.B. Vasandan, S. Jahnavi, C. Shashank, P. Prasad, A. Kumar, S.J. Prasanna, Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism, Sci Rep. 6 (2016) 38308. https://doi.org/10.1038/srep38308.
- [95] H. Shegarfi, O. Reikeras, Review Article: Bone Transplantation and Immune Response,JOrthopSurg(HongKong).17(2009)206–211.https://doi.org/10.1177/230949900901700218.
- [96] O. Faour, R. Dimitriou, C.A. Cousins, P.V. Giannoudis, The use of bone graft substitutes in large cancellous voids: Any specific needs?, Injury. 42 (2011) S87–S90. https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.020.

- [97] T. Ibrahim, L. Mercatali, D. Amadori, Bone and cancer: the osteoncology, Clin Cases Miner Bone Metab. 10 (2013) 121–123.
- [98] A. Misaghi, A. Goldin, M. Awad, A.A. Kulidjian, Osteosarcoma: a comprehensive review, SICOT-J. 4 (2018) 12. https://doi.org/10.1051/sicotj/2017028.
- [99] Cancer des os Tout sur le cancer osseux, Doctissimo. (n.d.). http://www.doctissimo.fr/html/dossiers/cancer/articles/15550-cancer-os.htm (accessed September 17, 2019).
- [100] Key Statistics for Bone Cancer, (n.d.). https://www.cancer.org/cancer/bone-cancer/about/key-statistics.html (accessed September 17, 2019).
- [101] Statistiques du cancer des os Ooreka, Ooreka.fr. (n.d.). //cancer-desos.ooreka.fr/comprendre/statistiques-cancer-des-os (accessed September 17, 2019).
- [102] E. Luo, H. Liu, Q. Zhao, B. Shi, Q. Chen, Dental-craniofacial manifestation and treatment of rare diseases, Int J Oral Sci. 11 (2019) 9. https://doi.org/10.1038/s41368-018-0041-y.
- [103] M. Larhant, S. Sourice, F. Grimaud, L. Cordoba, S. Leveau, P. Huet, P. Corre, R.H. Khonsari, Giant canine with dentine anomalies in oculo-facio-cardio-dental syndrome, Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 42 (2014) 321–324. https://doi.org/10.1016/j.jcms.2013.05.020.
- [104] J.-M. Mercier, J.-P. Perrin, J. Longis, L. Arzul, P. Corre, Les asymétries faciales à composante squelettique, Revue de Stomatologie, de Chirurgie Maxillo-faciale et de Chirurgie Orale. 115 (2014) 219–228. https://doi.org/10.1016/j.revsto.2014.07.004.
- [105] Q. Hennocq, H. Person, M. Hachani, H. Bertin, P. Corre, V. Gorbonosov, A. Ivanov, R.H. Khonsari, Quality of life and nasal splints after primary cleft lip and nose repair: Prospective assessment of information and tolerance, Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 46 (2018) 1783–1789. https://doi.org/10.1016/j.jcms.2018.07.022.
- [106] B.L. Foster, M.S. Ramnitz, R.I. Gafni, A.B. Burke, A.M. Boyce, J.S. Lee, J.T. Wright, S.O. Akintoye, M.J. Somerman, M.T. Collins, Rare Bone Diseases and Their Dental, Oral, and Craniofacial Manifestations, J Dent Res. 93 (2014) 7S-19S. https://doi.org/10.1177/0022034514529150.
- [107] A. Lenormand, R. Khonsari, P. Corre, J.P. Perrin, C. Boscher, M. Nizon, O. Pichon, A. David, C.L. Caignec, H. Bertin, B. Isidor, Familial autosomal dominant severe ankyloglossia with tooth abnormalities, American Journal of Medical Genetics Part A. 176 (2018) 1614–1617. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38690.
- [108] K.K.H. Gundlach, C. Maus, Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world-wide, Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 34 (2006) 1–2. https://doi.org/10.1016/S1010-5182(06)60001-2.
- [109] Ph. Jourdan, Éléments de balistique lésionnelle., (1995). http://spiralconnect.univlyon1.fr/spiral-files/download?mode=inline&data=6718323.
- [110] B. Rouvier, B. Lenoir, S. Rigal, Les traumatismes balistiques, (n.d.) 17.
- [111] B. Jean-David, PRESERVATION ET AUGMENTATION DE CRETE PAR GREFFE ALLOGENIQUE, (n.d.) 91.
- [112] O. Saad, Les substituts osseux allogéniques et xénogéniques: utilisation en chirurgie préimplantaire, (n.d.) 183.
- [113] B. Calvet, Place des blocs allogéniques dans les greffes préimplantaires, (n.d.) 103.
- [114] O. Ozgul, B. Altay, F. Atıl, M.E. önder, U. Tekin, S. Yılmaz, I.D. Kocyigit, Allogenic versus Autogenous Bone Rings in Dental Implant Surgery: Guidance of Stress Analysis-Part II, J Biomater Tissue Eng. 8 (2018) 448–453. https://doi.org/10.1166/jbt.2018.1763.
- [115] A. Sakkas, F. Wilde, M. Heufelder, K. Winter, A. Schramm, Autogenous bone grafts in oral implantology—is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients

with 456 clinical procedures, Int J Implant Dent. 3 (2017) 23. https://doi.org/10.1186/s40729-017-0084-4.

- [116] A. Tuchman, D.S. Brodke, J.A. Youssef, H.-J. Meisel, J.R. Dettori, J.-B. Park, S.T. Yoon, J.C. Wang, Autograft versus Allograft for Cervical Spinal Fusion: A Systematic Review, Global Spine Journal. 7 (2017) 59–70. https://doi.org/10.1055/s-0036-1580610.
- [117] J. Urrutia, N. Thumm, D. Apablaza, F. Pizarro, A. Zylberberg, F. Quezada, Autograft versus allograft with or without demineralized bone matrix in posterolateral lumbar fusion in rabbits. Laboratory investigation, J Neurosurg Spine. 9 (2008) 84–89. https://doi.org/10.3171/SPI/2008/9/7/084.
- [118] G. Daculsi, B.H. Fellah, T. Miramond, M. Durand, Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes, IRBM. 34 (2013) 346–348. https://doi.org/10.1016/j.irbm.2013.07.001.
- [119] T. Albrektsson, C. Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, (n.d.) 6.
- [120] M.A. Pogrel, P. Anthony, A Comparison of Vascularized and Nonvascularized Bone Grafts for Reconstruction of Mandibular Continuity Defects, (n.d.) 7.
- [121] M.D. Wells, Mandibular reconstruction using vascularized bone grafts, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 54 (1996) 883–888. https://doi.org/10.1016/S0278-2391(96)90542-X.
- [122] G.K.B. Sándor, D.K. Lam, L.P. Ylikontiola, V.T. Kainulainen, K.S. Oikarinen, C.M.L. Clokie, Autogenous Bone Harvesting Techniques, (n.d.) 22.
- [123] G. Idrontino, N.A. Valente, Intraoral and extraoral autologous bone block graft techniques: A review of the recent literature, (n.d.) 5.
- [124] D.F. Williams, European Society for Biomaterials, eds., Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986, Elsevier, Amsterdam; New York, 1987.
- [125] D.F. Williams, There is no such thing as a biocompatible material, Biomaterials. 35 (2014) 10009–10014. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.035.
- [126] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, Biomaterials. 29 (2008) 2941–2953. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- [127] D.F. Williams, On the nature of biomaterials, Biomaterials. 30 (2009) 5897–5909. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
- [128] W. Schlickewei, C. Schlickewei, The Use of Bone Substitutes in the Treatment of Bone Defects – the Clinical View and History, Macromol. Symp. 253 (2007) 10–23. https://doi.org/10.1002/masy.200750702.
- [129] K. Flégeau, R. Pace, H. Gautier, G. Rethore, J. Guicheux, C. Le Visage, P. Weiss, Toward the development of biomimetic injectable and macroporous biohydrogels for regenerative medicine, Advances in Colloid and Interface Science. 247 (2017) 589–609. https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.012.
- [130] Bronkhorstlaan 10, building 48, 3723 MB Bilthoven, the Netherlands, R. Duan, L. van Dijk, D. Barbieri, F. de Groot, H. Yuan, J. de Bruijn, Accelerated bone formation by biphasic calcium phosphate with a novel sub-micron surface topography, ECM. 37 (2019) 60–73. https://doi.org/10.22203/eCM.v037a05.
- [131] M. Morra, G. Giavaresi, M. Sartori, A. Ferrari, A. Parrilli, D. Bollati, R.R.Y. Baena, C. Cassinelli, M. Fini, Surface chemistry and effects on bone regeneration of a novel biomimetic synthetic bone filler, Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 26 (2015). https://doi.org/10.1007/s10856-015-5483-6.
- [132] A. Petersen, A. Princ, G. Korus, A. Ellinghaus, H. Leemhuis, A. Herrera, A. Klaumünzer, S. Schreivogel, A. Woloszyk, K. Schmidt-Bleek, S. Geissler, I. Heschel, G.N. Duda, A

biomaterial with a channel-like pore architecture induces endochondral healing of bone defects, Nat Commun. 9 (2018) 4430. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06504-7.

- [133] C. Deng, J. Chang, C. Wu, Bioactive scaffolds for osteochondral regeneration, Journal of Orthopaedic Translation. 17 (2019) 15–25. https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.11.006.
- [134] M. Stiller, E. Kluk, M. Bohner, M.A. Lopez-Heredia, C. Müller-Mai, C. Knabe, Performance of β-tricalcium phosphate granules and putty, bone grafting materials after bilateral sinus floor augmentation in humans, Biomaterials. 35 (2014) 3154–3163. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.068.
- [135] A. De Mori, M. Peña Fernández, G. Blunn, G. Tozzi, M. Roldo, 3D Printing and Electrospinning of Composite Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering, Polymers (Basel). 10 (2018). https://doi.org/10.3390/polym10030285.
- [136] A. Hasan, B. Byambaa, M. Morshed, M.I. Cheikh, R.A. Shakoor, T. Mustafy, H. Marei, Advances in osteobiologic materials for bone substitutes, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. (2018). https://doi.org/10.1002/term.2677.
- [137] D. Baranes, G.M. Kurtzman, Biphasic Calcium Sulfate as an alternative grafting material in various dental applications, J Oral Implantol. (2019). https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-18-00306.
- [138] S. Ranganathan, K. Balagangadharan, N. Selvamurugan, Chitosan and gelatin-based electrospun fibers for bone tissue engineering, Int. J. Biol. Macromol. (2019). https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.115.
- [139] X. Li, Y. Wang, Z. Wang, Y. Qi, L. Li, P. Zhang, X. Chen, Y. Huang, Composite PLA/PEG/nHA/Dexamethasone Scaffold Prepared by 3D Printing for Bone Regeneration, Macromolecular Bioscience. (2018) 1800068. https://doi.org/10.1002/mabi.201800068.
- [140] A. Yelten, S. Yilmaz, Comparison of Naturally and Synthetically Derived Hydroxyapatite Powders, Acta Physica Polonica A. 131 (2017) 55–58. https://doi.org/10.12693/APhysPolA.131.55.
- [141] G. Daculsi, Smart scaffolds: the future of bioceramic, Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 26 (2015). https://doi.org/10.1007/s10856-015-5482-7.
- [142] E. Cunningham, N. Dunne, G. Walker, C. Maggs, R. Wilcox, F. Buchanan, Hydroxyapatite bone substitutes developed via replication of natural marine sponges, Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 21 (2010) 2255–2261. https://doi.org/10.1007/s10856-009-3961-4.
- [143] G. Daculsi, O. Laboux, O. Malard, P. Weiss, Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics, Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 14 (2003) 195–200.
- [144] X. Xu, Cao, Deng, Wei, Su, Yang, Wei, Yu, Encapsulation of plasmid DNA in calcium phosphate nanoparticles: stem cell uptake and gene transfer efficiency, International Journal of Nanomedicine. (2011) 3335. https://doi.org/10.2147/IJN.S27370.
- [145] H. Jung, S.A. Kim, Y.G. Yang, H. Yoo, S.-J. Lim, H. Mok, Long chain microRNA conjugates in calcium phosphate nanoparticles for efficient formulation and delivery, Archives of Pharmacal Research. 38 (2015) 705–715. https://doi.org/10.1007/s12272-014-0451-0.
- [146] K. Lee, M.H. Oh, M.S. Lee, Y.S. Nam, T.G. Park, J.H. Jeong, Stabilized calcium phosphate nano-aggregates using a dopa-chitosan conjugate for gene delivery, International Journal of Pharmaceutics. 445 (2013) 196–202. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.014.
- [147] C. Schlickewei, T.O. Klatte, Y. Wildermuth, G. Laaff, J.M. Rueger, J. Ruesing, S. Chernousova, W. Lehmann, M. Epple, A bioactive nano-calcium phosphate paste for insitu transfection of BMP-7 and VEGF-A in a rabbit critical-size bone defect: results of

an in vivo study, J Mater Sci: Mater Med. 30 (2019) 15. https://doi.org/10.1007/s10856-019-6217-y.

- [148] Y. Cao, L. Xiao, Y. Cao, A. Nanda, C. Xu, Q. Ye, 3D printed β-TCP scaffold with sphingosine 1-phosphate coating promotes osteogenesis and inhibits inflammation, Biochemical and Biophysical Research Communications. 512 (2019) 889–895. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.132.
- [149] Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, Saarland University, Kirrberger Strasse 1, D-66421 Homburg/Saar, Germany, M. Orth, N. Kruse, B. Braun, C. Scheuer, J. Holstein, A. Khalil, X. Yu, W. Murphy, T. Pohlemann, M. Laschke, M. Menger, BMP-2-coated mineral coated microparticles improve bone repair in atrophic non-unions, European Cells and Materials. 33 (2017) 1–12. https://doi.org/10.22203/eCM.v033a01.
- [150] R. Elimelech, N. Khoury, T. Tamari, I. Blumenfeld, Z. Gutmacher, H. Zigdon-Giladi, Use of transforming growth factor-β loaded onto β-tricalcium phosphate scaffold in a bone regeneration rat calvaria model, Clin Implant Dent Relat Res. (2019). https://doi.org/10.1111/cid.12775.
- [151] fr\_bse\_carte: OIE World Organisation for Animal Health, (n.d.). https://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/statuts-officiels-desmaladies/esb/fr-bse-carte/ (accessed September 20, 2019).
- [152] Situation de l'ESB dans le monde et taux d'incidence annuel: OIE World Organisation for Animal Health, (n.d.). https://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/situation-de-lesb-dans-le-monde-et-taux-dincidence-annuel/ (accessed September 20, 2019).
- [153] Statuts sanitaires officiels: OIE World Organisation for Animal Health, (n.d.). https://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/statuts-officiels-desmaladies/esb/statuts-sanitaires-officiels/ (accessed September 20, 2019).
- [154] O. Cornu, X. Banse, P.L. Docquier, S. Luyckx, C. Delloye, Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone, Journal of Orthopaedic Research. 18 (2000) 426–431. https://doi.org/10.1002/jor.1100180314.
- [155] A.J. Hamer, J.R. Strachan, M.M. Black, C.J. Ibbotson, I. Stockley, R.A. Elson, BIOMECHANICAL PROPERTIES OF CORTICAL ALLOGRAFT BONE USING A NEW METHOD OF BONE STRENGTH MEASUREMENT: A COMPARISON OF FRESH, FRESH-FROZEN AND IRRADIATED BONE, The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume. 78-B (1996) 363–368. https://doi.org/10.1302/0301-620X.78B3.0780363.
- [156] A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri, N. Maffulli, Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions, (2014) 27.
- [157] C.S. Moucha, R.L. Renard, A. Gandhi, S.S. Lin, R.S. Tuan, Bone Allograft Safety and Performance, in: F. Bronner, M.C. Farach-Carson, A.G. Mikos (Eds.), Engineering of Functional Skeletal Tissues, Springer London, London, 2007: pp. 46–54. https://doi.org/10.1007/978-1-84628-366-6\_3.
- [158] A. Rasch, H. Naujokat, F. Wang, A. Seekamp, S. Fuchs, T. Klüter, Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality, PLoS ONE. 14 (2019) e0218404. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218404.
- [159] L.F. Coutinho, J.B. do Amaral, É.B. dos Santos, E.F. Martinez, V.A.M. Montalli, J.L.C. Junqueira, V.C. de Araújo, M.H. Napimoga, Presence of Cells in Fresh-Frozen Allogeneic Bone Grafts from Different Tissue Banks, Braz. Dent. J. 28 (2017) 152–157. https://doi.org/10.1590/0103-6440201701206.

- [160] P. Hernigou, Bone transplantation and tissue engineering, part III: allografts, bone grafting and bone banking in the twentieth century, International Orthopaedics. 39 (2015) 577–587. https://doi.org/10.1007/s00264-015-2669-y.
- [161] M. Nevins, S. Parma-Benfenati, U. Janke, A. Kleyer, G. Rasperini, C. Tinti, P. Schupbach, D. Kim, The Efficacy of Mineralized Allograft Cortical and Cancellous Chips in Maxillary Sinus Augmentations, Int J Periodontics Restorative Dent. 34 (2014) 789–793. https://doi.org/10.11607/prd.1720.
- [162] M. Del Fabbro, T. Testori, Systematic Review of Survival Rates for Implants Placed in the Grafted Maxillary Sinus, Int J Periodontics Restorative Dent. (n.d.).
- [163] P. Hernigou, A. Dubory, F. Roubineau, Y. Homma, C.H. Flouzat-Lachaniette, N. Chevallier, H. Rouard, Allografts supercharged with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells possess equivalent osteogenic capacity to that of autograft: a study with long-term follow-ups of human biopsies, International Orthopaedics. 41 (2017) 127–132. https://doi.org/10.1007/s00264-016-3263-7.
- [164] B.D. Boyan, D.M. Ranly, J. McMillan, M. Sunwoo, K. Roche, Z. Schwartz, Osteoinductive Ability of Human Allograft Formulations, J Periodontol. 77 (2006) 9.
- [165] M.J. Eagle, P. Rooney, J.N. Kearney, Production of an osteoinductive demineralised bone matrix powder without the use of organic solvents, Cell Tissue Bank. 16 (2015) 433–441. https://doi.org/10.1007/s10561-014-9487-0.
- [166] S.T. Moore, J.M. Katz, R.M. Zhukauskas, R.M. Hernandez, C.S. Lewis, P.R. Supronowicz, E. Gill, S.M. Grover, N.S. Long, R.R. Cobb, Osteoconductivity and osteoinductivity of Puros(R) DBM putty, J Biomater Appl. 26 (2011) 151–171. https://doi.org/10.1177/0885328210366061.
- [167] Z. NaPier, L.E.A. Kanim, S. Thordarson, M.A. Kropf, J.M. Cuéllar, J.D. Glaeser, H.W. Bae, Demineralized Bone Matrix Bone Biology and Clinical Use, Seminars in Spine Surgery. 28 (2016) 196–216. https://doi.org/10.1053/j.semss.2016.08.003.
- [168] H. Bae, L. Zhao, D. Zhu, L. Kanim, J. Wang, R. Delamarter, Variability Across Ten Production Lots of a Single Demineralized Bone Matrix Product, The Journal of Bone & Joint Surgery. 92 (2010) 427–435. https://doi.org/10.2106/JBJS.H.01400.
- [169] B. Wildemann, A. Kadow-Romacker, A. Pruss, N.P. Haas, G. Schmidmaier, Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods, Cell Tissue Banking. 8 (2007) 107–114. https://doi.org/10.1007/s10561-006-9021-0.
- [170] R. Bardonnet, Method for Treating Bone Tissue and Implantable Biomaterials, WO2005082432 (A1), 2005.
- [171] Annales de chimie et de physique, XXI (1822) 462.
- [172] Y. Goudaroulis, Searching for a name: the development of the concept of the critical point (1822-1869)/A la recherche d'un nom : le développement du concept de point critique (1822-1869), Rhs. 47 (1994) 353–380. https://doi.org/10.3406/rhs.1994.1210.
- [173] Supercritical CO2: A Green Solvent Chemical Engineering, (n.d.). https://www.chemengonline.com/supercritical-co2-a-green-solvent/?printmode=1 (accessed September 16, 2019).
- [174] J. Fages, H. Lochard, E. Rodier, J.-J. Letourneau, M. Sauceau, La génération de solides divisés par fluides supercritiques, Can. J. Chem. Eng. 81 (2008) 161–175. https://doi.org/10.1002/cjce.5450810201.
- [175] R. Parhi, P. Suresh, SUPERCRITICAL FLUID TECHNOLOGY: A REVIEW, JAPST. 1 (2013) 13–36. https://doi.org/10.14302/issn.2328-0182.japst-12-145.
- [176] K.K. Darani, M.R. Mozafari, Supercritical fluids technology in bioprocess industries: A review, (2009) 10.

- [177] R.S. Mohamed, G.A. Mansoori, The Use of Supercritical Fluid Extraction Technology in Food Processing, 20 (2002) 15.
- [178] R.S. Mohamed, G.A. Mansoori, CO2 supercritique, (n.d.) 5.
- [179] C.M. Hill, Q.K. Kang, C. Wahl, A. Jimenez, M. Laberge, M. Drews, M.A. Matthews, Y.H. An, Biocompatibility of supercritical CO2-treated titanium implants in a rat model, Int J Artif Organs. 29 (2006) 430–433.
- [180] N. Ribeiro, G.C. Soares, V. Santos-Rosales, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, C.A. García-González, A.L. Oliveira, A new era for sterilization based on supercritical CO 2 technology, J Biomed Mater Res. (2019) jbm.b.34398. https://doi.org/10.1002/jbm.b.34398.
- [181] A. Md Sikin, S. S.H. Rizvi, Recent Patents on the Sterilization of Food and Biomaterials by Super-critical Fluids, FNA. 3 (2011) 212–225. https://doi.org/10.2174/2212798411103030212.
- [182] G. Ruphuy, M. Souto-Lopes, D. Paiva, P. Costa, A.E. Rodrigues, F.J. Monteiro, C.L. Salgado, M.H. Fernandes, J.C. Lopes, M.M. Dias, M.F. Barreiro, Supercritical CO 2 assisted process for the production of high-purity and sterile nano-hydroxyapatite/chitosan hybrid scaffolds, J. Biomed. Mater. Res. 106 (2018) 965–975. https://doi.org/10.1002/jbm.b.33903.
- [183] H.S. Park, J. Yang, H.J. Choi, K.H. Kim, Effective inactivation of Candida albicans biofilms by using supercritical carbon dioxide, Bioprocess Biosyst Eng. 38 (2015) 1731– 1737. https://doi.org/10.1007/s00449-015-1414-7.
- [184] G.C. Soares, D.A. Learmonth, M.C. Vallejo, S.P. Davila, P. González, R.A. Sousa, A.L. Oliveira, Supercritical CO2 technology: The next standard sterilization technique?, Materials Science and Engineering: C. 99 (2019) 520–540. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.121.
- [185] T. Baldini, K. Caperton, M. Hawkins, E. McCarty, Effect of a novel sterilization method on biomechanical properties of soft tissue allografts, Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 24 (2016) 3971–3975. https://doi.org/10.1007/s00167-014-3221-0.
- [186] A. Jiménez, J. Zhang, M.A. Matthews, Evaluation of CO<sub>2</sub> -based cold sterilization of a model hydrogel, Biotechnol. Bioeng. 101 (2008) 1344–1352. https://doi.org/10.1002/bit.21983.
- [187] GulerSelcan, AslanBahar, HosseinianPezhman, A. Murat, Supercritical Carbon Dioxide-Assisted Decellularization of Aorta and Cornea, Tissue Engineering Part C: Methods. (2017). https://doi.org/10.1089/ten.tec.2017.0090.
- [188] J. Faces, B. Poirier, Y. Barbier, P. Frayssinet, M.-L. Joffret, W. Majewski, G. Bonel, D. Larzul, Viral Inactivation of Human Bone Tissue Using Supercritical Fluid Extraction:, ASAIO Journal. 44 (1998) 289–293. https://doi.org/10.1097/00002480-199807000-00009.
- [189] J. Fages, A. Marty, C. Delga, J.-S. Condoret, D. Combes, P. Frayssinet, Use of supercritical CO2 for bone delipidation, Biomaterials. 15 (1994) 650–656. https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90162-7.
- [190] D. Mitton, J. Rappeneau, R. Bardonnet, Effect of a supercritical CO2 based treatment on mechanical properties of human cancellous bone, Eur J Orthop Surg Traumatol. 15 (2005) 264–269. https://doi.org/10.1007/s00590-005-0250-x.
- [191] L. You, X. Weikang, Y. Lifeng, L. Changyan, L. Yongliang, W. Xiaohui, X. Bin, *In vivo* immunogenicity of bovine bone removed by a novel decellularization protocol based on supercritical carbon dioxide, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 46 (2018) 334–344. https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1457044.
- [192] J. Fages, E. Jean, P. Frayssinet, D. Mathon, B. Poirier, A. Autefage, D. Larzul, Bone allografts and supercritical processing: effects on osteointegration and viral safety, The

Journal of Supercritical Fluids. 13 (1998) 351–356. https://doi.org/10.1016/S0896-8446(98)00071-0.

- [193] L. Vastel, C. Masse, P. Mesnil, E. Crozier, F. Padilla, P. Laugier, D. Mitton, J.P. Courpied, Comparative ultrasound evaluation of human trabecular bone graft properties after treatment with different sterilization procedures, J. Biomed. Mater. Res. 90B (2009) 430–437. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31302.
- [194] L. Vastel, A. Meunier, H. Siney, L. Sedel, J.-P. Courpied, Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts, Biomaterials. 25 (2004) 2105–2110. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.067.
- [195] L. Vastel, C. Masse, E. Crozier, F. Padilla, P. Laugier, D. Mitton, R. Bardonnet, J.-P. Courpied, Effects of gamma irradiation on mechanical properties of defatted trabecular bone allografts assessed by speed-of-sound measurement, Cell Tissue Banking. 8 (2007) 205–210. https://doi.org/10.1007/s10561-006-9030-z.
- [196] B. Raphaël, B. Ana, Method for Producing a Bone Paste, WO2015/162372 A1, 2018.
- [197] E.E. Golub, K. Boesze-Battaglia, The role of alkaline phosphatase in mineralization:, Current Opinion in Orthopaedics. 18 (2007) 444–448. https://doi.org/10.1097/BCO.0b013e3282630851.
- [198] H. Orimo, The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease, J Nippon Med Sch. 77 (2010) 4–12. https://doi.org/10.1272/jnms.77.4.
- [199] C. Wennberg, L. Hessle, P. Lundberg, S. Mauro, S. Narisawa, U.H. Lerner, J.L. Millán, Functional Characterization of Osteoblasts and Osteoclasts from Alkaline Phosphatase Knockout Mice, J Bone Miner Res. 15 (2000) 1879–1888. https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.10.1879.
- [200] K.N. Fedde, L. Blair, J. Silverstein, S.P. Coburn, L.M. Ryan, R.S. Weinstein, K. Waymire, S. Narisawa, J.L. Millán, G.R. Macgregor, M.P. Whyte, Alkaline Phosphatase Knock-Out Mice Recapitulate the Metabolic and Skeletal Defects of Infantile Hypophosphatasia, J Bone Miner Res. 14 (1999) 2015–2026. https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.12.2015.
- [201] V. Hivernaud, F. Grimaud, J. Guicheux, S. Portron, R. Pace, P. Pilet, S. Sourice, S. Wuillem, H. Bertin, R. Roche, F. Espitalier, P. Weiss, P. Corre, Comparing "intra operative" tissue engineering strategies for the repair of craniofacial bone defects, Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery. (2019) S2468785519300023. https://doi.org/10.1016/j.jormas.2019.01.002.
- [202] P. Corre, C. Merceron, J. Longis, R.H. Khonsari, P. Pilet, T.N. thi, S. Battaglia, S. Sourice, M. Masson, J. Sohier, F. Espitalier, J. Guicheux, P. Weiss, Direct comparison of current cell-based and cell-free approaches towards the repair of craniofacial bone defects A preclinical study, Acta Biomaterialia. 26 (2015) 306–317. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.013.
- [203] P. Bléry, P. Corre, O. Malard, S. Sourice, P. Pilet, Y. Amouriq, J. Guicheux, P. Weiss, F. Espitalier, Evaluation of new bone formation in irradiated areas using association of mesenchymal stem cells and total fresh bone marrow mixed with calcium phosphate scaffold, J Mater Sci: Mater Med. 25 (2014) 2711–2720. https://doi.org/10.1007/s10856-014-5282-5.
- [204] P. Bléry, F. Espitalier, A. Hays, E. Crauste, C. Demarquay, P. Pilet, S. Sourice, J. Guicheux, O. Malard, M. Benderitter, P. Weiss, N. Mathieu, Development of mandibular osteoradionecrosis in rats: Importance of dental extraction, Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 43 (2015) 1829–1836. https://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.08.016.

- [205] F. Espitalier, N. Durand, S. Rémy, P. Corre, S. Sourice, P. Pilet, P. Weiss, J. Guicheux, O. Malard, Development of a Cyclosporin-A-Induced Immune Tolerant Rat Model to Test Marrow Allograft Cell Type Effects on Bone Repair, Calcif Tissue Int. 96 (2015) 430–437. https://doi.org/10.1007/s00223-015-9970-z.
- [206] G. Michel, P. Blery, M. Henoux, J. Guicheux, P. Weiss, S. Brouard, O. Malard, F. Espitalier, Bone marrow cell extract promotes the regeneration of irradiated bone, PLoS ONE. 12 (2017) e0178060. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178060.
- [207] G. Michel, P. Blery, P. Pilet, J. Guicheux, P. Weiss, O. Malard, F. Espitalier, Micro-CT Analysis of Radiation-Induced Osteopenia and Bone Hypovascularization in Rat, Calcif Tissue Int. 97 (2015) 62–68. https://doi.org/10.1007/s00223-015-0010-9.
- [208] A. Thery, P. Bléry, O. Malard, P. Pilet, S. Sourice, P. Corre, J. Guicheux, P. Weiss, F. Espitalier, Role of the stromal vascular fraction from adipose tissue in association with a phosphocalcic scaffold in bone regeneration in an irradiated area, Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 43 (2015) 1169–1176. https://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.05.014.
- [209] J.M. Carbonell, I.S. Martín, A. Santos, A. Pujol, J.D. Sanz-Moliner, J. Nart, High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: a literature review, International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 43 (2014) 75–84. https://doi.org/10.1016/j.ijom.2013.05.017.
- [210] Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. PubMed NCBI, (n.d.). https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/pubmed/27834419 (accessed October 2, 2019).
- [211] Utilization of d-PTFE Barriers for Post-Extraction Bone Regeneration in Preparation for Dental Implants. - PubMed - NCBI, (n.d.). https://www-ncbi-nlm-nihgov.gate2.inist.fr/pubmed/26247440 (accessed October 2, 2019).
- [212] T.R. Chan, P.J. Stahl, Y. Li, S.M. Yu, Collagen–gelatin mixtures as wound model, and substrates for VEGF-mimetic peptide binding and endothelial cell activation, Acta Biomaterialia. 15 (2015) 164–172. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.01.005.
- [213] M. Pfaff, M. Aumailley, U. Specks, J. Knolle, H.G. Zerwes, R. Timpl, Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI, Exp. Cell Res. 206 (1993) 167–176. https://doi.org/10.1006/excr.1993.1134.
- [214] M. Barczyk, S. Carracedo, D. Gullberg, Integrins, Cell Tissue Res. 339 (2010) 269–280. https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6.
- [215] A.A. Sawyer, D.M. Weeks, S.S. Kelpke, M.S. McCracken, S.L. Bellis, The effect of the addition of a polyglutamate motif to RGD on peptide tethering to hydroxyapatite and the promotion of mesenchymal stem cell adhesion, Biomaterials. 26 (2005) 7046–7056. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.006.
- [216] Y. Suwa, K. Nam, K. Ozeki, T. Kimura, A. Kishida, T. Masuzawa, Thermal denaturation behavior of collagen fibrils in wet and dry environment: Thermal Denaturation Behavior of Collagen Fibrils in Wet and Dry Environment, J. Biomed. Mater. Res. 104 (2016) 538–545. https://doi.org/10.1002/jbm.b.33418.
- [217] M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, Nature. 309 (1984) 30–33. https://doi.org/10.1038/309030a0.
- [218] M.C. Porté-Durrieu, F. Guillemot, S. Pallu, C. Labrugère, B. Brouillaud, R. Bareille, J. Amédée, N. Barthe, M. Dard, C. Baquey, Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti–6Al–4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion, Biomaterials. 25 (2004) 4837–4846. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.037.

- [219] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, Biomaterials. 24 (2003) 4385–4415. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00343-0.
- [220] A.V. Taubenberger, M.A. Woodruff, H. Bai, D.J. Muller, D.W. Hutmacher, The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation, Biomaterials. 31 (2010) 2827–2835. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.051.
- [221] J. Mauney, V. Volloch, Collagen I matrix contributes to determination of adult human stem cell lineage via differential, structural conformation-specific elicitation of cellular stress response, Matrix Biology. 28 (2009) 251–262. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.04.002.
- [222] R. Detsch, I. Dieser, U. Deisinger, F. Uhl, S. Hamisch, G. Ziegler, G. Lipps, Biofunctionalization of dispense-plotted hydroxyapatite scaffolds with peptides: Quantification and cellular response, Journal of Biomedical Materials Research Part A. 92A (2010) 493–503. https://doi.org/10.1002/jbm.a.32386.
- [223] P.-H. Chua, K.-G. Neoh, E.-T. Kang, W. Wang, Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion, Biomaterials. 29 (2008) 1412– 1421. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.019.
- [224] P. Pozarowski, Z. Darzynkiewicz, Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry, in: Checkpoint Controls and Cancer, Humana Press, New Jersey, 2004: pp. 301–312. https://doi.org/10.1385/1-59259-811-0:301.
- [225] C. Wu, Focal Adhesion, Cell Adh Migr. 1 (2007) 13–18.
- [226] M. Jaguin, N. Houlbert, O. Fardel, V. Lecureur, Polarization profiles of human M-CSFgenerated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin, Cellular Immunology. 281 (2013) 51– 61. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.010.
- [227] I. Drosse, E. Volkmer, S. Seitz, H. Seitz, R. Penzkofer, K. Zahn, U. Matis, W. Mutschler, P. Augat, M. Schieker, Validation of a Femoral Critical Size Defect Model for Orthotopic Evaluation of Bone Healing: A Biomechanical, Veterinary and Trauma Surgical Perspective, Https://Home.Liebertpub.Com/Tec. (2008). https://doi.org/10.1089/tec.2007.0234.
- [228] E. Vögelin, N.F. Jones, J.I. Huang, J.H. Brekke, J.R. Lieberman, Healing of a Critical-Sized Defect in the Rat Femur with Use of a Vascularized Periosteal Flap, a Biodegradable Matrix, and Bone Morphogenetic Protein, JBJS. 87 (2005) 1323. https://doi.org/10.2106/JBJS.C.00913.
- [229] X.-M. Xu, G. Zhang, F. Wang, X.-Z. Wei, M. Li, Bone Graft Options for Spine Fusion in Adolescent Patients with Idiopathic Scoliosis:, Chinese Medical Journal. 129 (2016) 105–107. https://doi.org/10.4103/0366-6999.172605.
- [230] R. Kolerman, H. Tal, Clinical Radiographic and Histomorphometrical Analysis of Maxillary Sinus Augmentation Using Synthetic Bone Substitute 4Bone., (n.d.) 2.
- [231] J.L. Rouvillain, F. Lavallé, H. Pascal-Mousselard, Y. Catonné, G. Daculsi, Clinical, radiological and histological evaluation of biphasic calcium phosphate bioceramic wedges filling medial high tibial valgisation osteotomies, The Knee. 16 (2009) 392–397. https://doi.org/10.1016/j.knee.2008.12.015.
- [232] Y. Xie, D. Chopin, C. Morin, P. Hardouin, Z. Zhu, J. Tang, J. Lu, Evaluation of the osteogenesis and biodegradation of porous biphasic ceramic in the human spine, Biomaterials. 27 (2006) 2761–2767. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.12.011.
- [233] L. Claes, S. Recknagel, A. Ignatius, Fracture healing under healthy and inflammatory conditions, Nature Reviews Rheumatology. 8 (2012) 133–143. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.1.

- [234] O.H. Sandberg, L. Tätting, M.E. Bernhardsson, P. Aspenberg, Temporal role of macrophages in cancellous bone healing, Bone. 101 (2017) 129–133. https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.04.004.
- [235] Y. Liu, G. Wang, Y. Cai, H. Ji, G. Zhou, X. Zhao, R. Tang, M. Zhang, *In vitro* effects of nanophase hydroxyapatite particles on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, Journal of Biomedical Materials Research Part A. 90A (2009) 1083–1091. https://doi.org/10.1002/jbm.a.32192.
- [236] X. Zhao, S. Ng, B.C. Heng, J. Guo, L. Ma, T.T.Y. Tan, K.W. Ng, S.C.J. Loo, Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent, Archives of Toxicology. 87 (2013) 1037–1052. https://doi.org/10.1007/s00204-012-0827-1.
- [237] M. Epple, Review of potential health risks associated with nanoscopic calcium phosphate, Acta Biomaterialia. 77 (2018) 1–14. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.036.
- [238] M. Hannig, C. Hannig, Nanomaterials in preventive dentistry, Nature Nanotech. 5 (2010) 565–569. https://doi.org/10.1038/nnano.2010.83.
- [239] A. Peetsch, M. Epple, Characterization of the solid components of three desensitizing toothpastes and a mouth wash, Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik. 42 (2011) 131–135. https://doi.org/10.1002/mawe.201100744.
- [240] Z. Wang, Y. Sa, S. Sauro, H. Chen, W. Xing, X. Ma, T. Jiang, Y. Wang, Effect of desensitising toothpastes on dentinal tubule occlusion: A dentine permeability measurement and SEM in vitro study, Journal of Dentistry. 38 (2010) 400–410. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.01.007.
- [241] T. Peitsch, M. Matthes, V. Brandenburg, M. Epple, An in vitro crystallization setup to assess the efficiency of different phosphate binders in nephrology: quantitative analytical considerations, Anal. Methods. 2 (2010) 901. https://doi.org/10.1039/b9ay00325h.
- [242] H. Sinnecker, T. Krause, S. Koelling, I. Lautenschläger, A. Frey, The gut wall provides an effective barrier against nanoparticle uptake, Beilstein J. Nanotechnol. 5 (2014) 2092– 2101. https://doi.org/10.3762/bjnano.5.218.
- [243] S. Bellmann, D. Carlander, A. Fasano, D. Momcilovic, J.A. Scimeca, W.J. Waldman, L. Gombau, L. Tsytsikova, R. Canady, D.I.A. Pereira, D.E. Lefebvre, Mammalian gastrointestinal tract parameters modulating the integrity, surface properties, and absorption of food-relevant nanomaterials, Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 7 (2015) 609–622. https://doi.org/10.1002/wnan.1333.
- [244] Z. Zhang, J.T. Egaña, A.K. Reckhenrich, T.L. Schenck, J.A. Lohmeyer, J.T. Schantz, H.-G. Machens, A.F. Schilling, Cell-based resorption assays for bone graft substitutes, Acta Biomaterialia. 8 (2012) 13–19. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.020.
- [245] S. Wenisch, J.-P. Stahl, U. Horas, C. Heiss, O. Kilian, K. Trinkaus, A. Hild, R. Schnettler, In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: Fine structural microscopy, Journal of Biomedical Materials Research Part A. 67A (2003) 713–718. https://doi.org/10.1002/jbm.a.10091.
- [246] D. Busenlechner, S. Tangl, B. Mair, G. Fugger, R. Gruber, H. Redl, G. Watzek, Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model, Biomaterials. 29 (2008) 3195–3200. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.021.
- [247] V. Hruschka, S. Tangl, Y. Ryabenkova, P. Heimel, D. Barnewitz, G. Möbus, C. Keibl, J. Ferguson, P. Quadros, C. Miller, R. Goodchild, W. Austin, H. Redl, T. Nau, Comparison of nanoparticular hydroxyapatite pastes of different particle content and size in a novel scapula defect model, Scientific Reports. 7 (2017) 43425. https://doi.org/10.1038/srep43425.

- [248] F.-X. Huber, I. Berger, N. McArthur, C. Huber, H.-P. Kock, J. Hillmeier, P.J. Meeder, Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste and a solid hydroxyapatite ceramic for the treatment of critical size bone defects (CSD) in rabbits, J Mater Sci: Mater Med. 19 (2008) 33–38. https://doi.org/10.1007/s10856-007-3039-0.
- [249] C.K.G. Spies, S. Schnürer, T. Gotterbarm, S. Breusch, The efficacy of Biobon<sup>™</sup> and Ostim<sup>™</sup> within metaphyseal defects using the Göttinger Minipig, Arch Orthop Trauma Surg. 129 (2009) 979–988. https://doi.org/10.1007/s00402-008-0705-8.
- [250] F.P. Strietzel, P.A. Reichart, H.-L. Graf, Lateral alveolar ridge augmentation using a synthetic nano-crystalline hydroxyapatite bone substitution material (Ostim®). Preliminary clinical and histological results, Clinical Oral Implants Research. 18 (2007) 743–751. https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01416.x.
- [251] B.O. Oyajobi, A. Lomri, M. Hott, P.J. Marie, Isolation and Characterization of Human Clonogenic Osteoblast Progenitors Immunoselected from Fetal Bone Marrow Stroma Using STRO-1 Monoclonal Antibody, Journal of Bone and Mineral Research. 14 (1999) 351–361. https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.3.351.
- [252] P. Held, Using Phenol Red to Assess pH in Tissue Culture Media, (n.d.) 7.
- [253] J. Michl, K.C. Park, P. Swietach, Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems, Commun Biol. 2 (2019) 144. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0393-7.
- [254] Primary Cells, Culture Media, Reagents, Stem Cells and Gene Expression Products | Alizarin Red S Staining Quantification Assay, (n.d.).
- [255] D.B. Ettensohn, P.G. Duncan, The role of human alveolar macrophages in the allogeneic and autologous mixed leucocyte reactions, (n.d.) 6.
- [256] Alveolar Macrophage Stimulation of T-Cell Proliferation in Autologous Mixed Lymphocyte Reactions | Role of HLA-DR Antigens1–3 | American Review of Respiratory Disease, (n.d.). https://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/arrd.1986.133.1.78 (accessed October 21, 2019).

Annexes

# AVIS DU COMITÉ D'ÉTHIQUE

(à transmettre au secrétariat autorisation de projet : autorisation-projet@recherche.gouv.fr)

Date : 18 avril 2017

Référence du dossier : 2016111513349765 / APAFIS 8560 v11 Titre du Projet : Étude de l'association de différents adjuvants aux biomatériaux dans la réparation osseuse : application aux pertes de substances de calvaria.

1- Avis éthique sur le projet : Favorable

Défavorable

Motif(s) en cas d'avis défavorable :

2- Proposition de reclassement des procédures expérimentales selon le degré de gravité indiqué par le responsable de projet : □ oui ■ non

Procédure(s) reclassée(s) et proposition de reclassement :

- procédure n° :
- reclassement :

(le bloc Procédure(s) reclassée(s) et proposition de reclassement est à reproduire le cas échéant)

3- En application de l'article R.214-120 du décret n°2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013, le projet devra t'il bénéficier d'une appréciation rétrospective à l'issue de sa réalisation : ■ oui □ non

4- Le cas échéant (cf point 4.3 du dossier), avis sur la réutilisation d'un animal pour autant que l'animal n'ait pas été utilisé, préalablement à ce projet, plus d'une fois dans une procédure expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente (article R.214-113 du décret n°2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013) :

□ Favorable □	Défavorable
---------------	-------------

Motif(s) en cas d'avis défavorable :

CEEA-PdL n°06 Pr Jean-Claude Desfontis

# AVIS DU COMITÉ D'ÉTHIQUE

(à transmettre au secrétariat autorisation de projet : autorisation-projet@recherche.gouv.fr)

# Date : 19 juin 2018

Référence du dossier : 2018020215215582 / APAFIS 15410 v4 Titre du Projet : Étude II de l'association d'adjuvant aux biomatériaux phosphocalcique dans la réparation osseuse : application aux pertes de substances de calvaria

1- Avis éthique sur le projet : E Favorable

Défavorable

Motif(s) en cas d'avis défavorable :

2- Proposition de reclassement des procédures expérimentales selon le degré de gravité indiqué par le responsable de projet : □ oui ■ non

Procédure(s) reclassée(s) et proposition de reclassement :

- procédure n° :
- o reclassement :

(le bloc Procédure(s) reclassée(s) et proposition de reclassement est à reproduire le cas échéant)

3- En application de l'article R.214-120 du décret n°2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013, le projet devra t'il bénéficier d'une appréciation rétrospective à l'issue de sa réalisation : □ oui ■ non

4- Le cas échéant (cf point 4.3 du dossier), avis sur la réutilisation d'un animal pour autant que l'animal n'ait pas été utilisé, préalablement à ce projet, plus d'une fois dans une procédure expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente (article R.214-113 du décret n°2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013) :

□ Favorable □ Défavorable

Motif(s) en cas d'avis défavorable :

Dr Joél Eyer



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR, DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Paris, le 28 mars 2019

#### Objet : Notification de décision relative à l'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro APAFIS#18616-2019012313017323 v1
- ayant pour titre : Étude III de l'association d'adjuvant aux biomatériaux phosphocalcique dans la réparation osseuse : application aux pertes de substances de calvaria
- déposé par l'établissement utilisateur : UTE IRS2, numéro d'agrément A44279, dont la responsable est Madame Pascale JOLLIET,
- et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par : Monsieur Pierre WEISS, Monsieur Pierre TOURNIER,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'établissement utilisateur, pour une durée de 5 ans à compter de la présente notification.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le comité d'éthique en expérimentation animale n°006 et a reçu un avis favorable.

Ce projet ne fera pas l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective.

Pour la ministre et par délégation l'adjoint au chef du service de la performance, du financement et de la contractualisation avec les organismes de recherche

Damien ROUSSET

Direction générale de la recherche et de l'innovation

Service de la performance, du financement et de la contractualisation avec les organismes de recherche

Département des pratiques de recherche réglementées

Cellule Animaux utilisés à des Fins Scientifiques - AFIS -

Affaire suivie par Véronique Delassault Responsable administrative de la cellule AFIS

Tél : 01 55 55 97 27 veronique.delassault @recherche.gouv.fr

autorisation-projet @recherche.gouv.fr

1 rue Descartes 75231 Paris Cedex 05

jeudi 05 septembre 2019



# Attestation de Formation

TOURNIER PIERRE

127 rue des pavillons

44100 NANTES

N° étudiant : 16G873W Ecole Doctorale : Biologie-Santé UBL Etablissement : Université de Nantes

### Formation Professionnelle

Libellé court	Intitulé	Année d'acquisition	Nombre d'heures	Ects
CDNA11	La Recherche et l'Entreprise (colloque)	2016	12:00	0.0
BS12	Vulgarisation scientifique : modalités et enjeux à NANTES	2016	32:00	18.0
EE-EDD-05	Journée 1 : INNOVER - Découvrir les enjeux, les acteurs et les stratégies d'innovation	2017	06:00	2.0
IST-PDNA-12	Utiliser Zotero pour gérer ses références et produire sa bibliographie : approfondissement (Sciences/Santé)	2018	03:00	0.0
			53:00	20.0

### Formation Scientifique

Libellé court	Intitulé	Année d'acquisition	Nombre d'heures	Ects
BS46	BIOSTATISTIQUES I: (NANTES)	2016	14:00	9.0
BS52	FORMATION A L EXPERIMENTATION ANIMALE	2017	28:00	18.0
			42:00	27.0

#### Dispense

	Nombre	Ects
	5:00	0.0
Total général des formations		
	Nombre	Ects
	100:00	47.0



L'Université Nantes Angers Le Mans, Communautés d'Universités et Etablissements (CUE) Immeuble MANNY, 19 bis rue La Nouë Bras de Fer, 44200

Unité de Pharmacologie et Toxicologie Département de Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment	et d'évaluation des acquís de la formation à érimentation Animale &	) du 07/02/2013), relatif à la réglementation e chargé de l'Agriculture sous le n° R44-ENVN-F1-11 - Rongeurs, lapins (validité e aux « personnes concevant ou réalisant les procédures expérimentales » et la ile de base dispensé en Octobre 2017 à Oniris, et du Module complémentaire à Oniris,	VI ET D'EVALUATION DES ACQUIS DE LA FORMATION ) CONCEPTEUR – « RONGEURS - LAPINS»	i y sont attachés. Responsitives pédagogiques de la formation Pr Jean-Claude DISFONTIS Dr M. Yassipe MALLEM The Pr Jean-Claude DISFONTIS Dr M. Yassipe MALLEM The Pr Jean-Claude DISFONTIS Dr M. Yassipe MALLEM and lui sont confiées, que dans le(s) secteur(s) pricisé(s) sur l'attestation de suivi en outre, réaliser 3 jours de formation continue tous les six ans afin de maintenir 3).
École Nationale Véréfrinaire, Agroatimentaire et de l'Alimentation	cos Attestation de suíví l'Exp	<ul> <li>* Vu le décret et les arrêtés du 01 Février 2013 ()</li> <li>* Vu l'approbation de la formation par le Ministèl jusqu'au 14/09/2021)</li> <li>* Vu le suivi de la Formation spécifique destiné réussite aux contrôles de connaissances du Modi « Rongeurs - Lapins» dispensé en Octobre 2017</li> </ul>	L'ATTESTATION DE SUI NIVEA	est conférée à <b>M. Pierre TOURNIER</b> pour en jouir avec les droits et prérogatives qu Fait à Nantes, La Directrice Générale le Mme Domínique BUZONI-GATEL 24/11/2017 24/11/2017 La personne compétente ne peut exercer les mission et d'évaluation des acquis de la formation. Elle doit, ses compétences (Article 5 de l'arrêté du 01/02/201

F


# Tailored 3D-printed triply periodic calcium phosphate implants: a preclinical study for craniofacial bone repair.

A. Paré <sup>a,b,c,d,1</sup>, B. Charbonnier<sup>e,1</sup>, P. Tournier<sup>a,d</sup>, C. Vignes<sup>a</sup>, J. Veziers<sup>a</sup>, J. Lesoeur<sup>a</sup>, B.Laure<sup>b,c</sup>, H. Bertin<sup>d,f</sup>, G. De Pinieux<sup>c,g</sup>, G. Cherrier<sup>c,g</sup>, J. Guicheux<sup>a,d</sup>, O. Gauthier<sup>a,d,h</sup>, P. Corre<sup>a,d,f</sup>, D. Marchat<sup>e,1</sup>, P. Weiss<sup>a,d,\*,1</sup>.

<sup>*a*</sup> INSERM, U 1229, Laboratoire Regenerative Medicine and Skeleton, RMeS, Nantes F - 44042, France

<sup>b</sup> Service de Chirurgie Maxillo faciale, Plastique et Brulés, Hôpital Trousseau, CHU de Tours, Tours F – 37000, France

<sup>c</sup> Université de Tours, UFR Médecine, F - 37000 Tours, France

<sup>d</sup> Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes F - 44042, France

 $^e$  Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiose, Centre CIS, F - 42023 Saint-Etienne France

<sup>f</sup> Service de chirurgie Maxillo-faciale et stomatologie, CHU de Nantes, Nantes F - 44093, France

<sup>*g*</sup> Service d'Anatomo-cyto-pathologie, Hôpital Trousseau, CHU de Tours, Tours F – 37000, France

<sup>h</sup> ONIRIS Nantes-Atlantic College of Veterinary Medicine, Centre de recherche et d'investigation préclinique (CRIP), Nantes F - 44300, France

\*Corresponding author: Pierre Weiss, INSERM UMR 1229 - Regenerative Medicine and Skeleton (RMeS) Dental Faculty, Alexis Ricordeau 44042 Nantes cedex 1 Phone: +33240412982 Fax: + 33240412914 Email: pierre.weiss@univ-nantes.fr

<sup>1</sup>These authors contributed equally to the work acting as co-first or co-last authors **Funding:** This study was supported by the Fondation de L'Avenir (AP-RM-17-017) and the Fondation des Gueules Cassées (N°66-2017). **Disclosure:** No conflict of interest

#### ABSTRACT

Finding alternative strategies for the regeneration of craniofacial bone defects (CSD), such as combining a synthetic ephemeral calcium phosphate (CaP) implant and/or active substances and cells, would contribute to solving this reconstructive roadblock. However, CaP's architectural features (i.e., architecture and composition) still need to be tailored, and the use of processed stem cells and synthetic active substances (e.g., recombinant human bone morphogenetic protein 2) drastically limits the clinical application of such approaches. Focusing on solutions that are directly transposable to the clinical setting, biphasic calcium phosphate (BCP) and carbonated hydroxyapatite (CHA) 3D-printed disks with a triply periodic minimal structure (TPMS) were implanted in calvarial critical-sized defects (rat model) with or without addition of total bone marrow (TBM). Bone regeneration within the defect was evaluated, and the outcomes were compared to a standard-care procedure based on BCP granules soaked with TBM (positive control). After 7 weeks, de novo bone formation was significantly greater in the CHA disks + TBM group than in the positive controls (3.33 mm<sup>3</sup> and 2.15 mm<sup>3</sup>, respectively, P=0.04). These encouraging results indicate that both CHA and TPMS architectures are potentially advantageous in the repair of CSDs and that this one-step procedure warrants further clinical investigation.

Key words: Bone tissue engineering, Bioceramics, Calcium phosphates, 3D printing, Bone marrow, Calvaria

#### **1. Introduction**

The ability to repair large and critical-sized craniofacial bone defects (CSD) in both pediatric and adult populations today remains limited. The number of patients living with craniofacial osseous deficiencies will continue to grow because craniectomy remains the clinical care standard in treating the entire age range of patients with traumatic head injuries, stroke, and resection of tumors. Despite the well-known limitations associated with autologous bone graft (BG) transplantation (e.g., damaging a healthy bone, resorption, morbidity, infection), it remains the most preferred technique in repairing skull defects, especially in growing patients (where synthetic, nonvital implants are contraindicated) and compromised wound beds (poor soft tissue coverage, previous radiotherapy or infection) [1–7].

To contribute to solving this reconstructive roadblock, the search for innovative solutions based on synthetic materials, serving as ephemeral scaffold for the growth of new bone, has been extensive. Synthetic calcium phosphate bone substitutes (BS) such as hydroxyapatite (HA), beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) and calcium phosphate cements (CPC) have demonstrated considerable potential for the regeneration of CSD given their biocompatibility and osteoconductive features [8,9] but are often insufficient [10,11]. Experimentally, many attempts to enhance the regenerative capacity of BS to induce or augment cranial repair have been made with the addition of expended stem cells [12,13], growth factors [10], or cytokines, alone or in combination (i.e., tissue engineering strategies) [14–16]. While tissue engineering might have a bright future in the reconstructive field, significant drawbacks such as the lack of reliable efficacy, high costs, potential side effects of the synthetic bioactive substances (e.g., ectopic bone formation), potential safety risks (e.g., tumors) and ethical issues hinder its current implementation to clinical cases [17,18]. Safer alternatives to these processed stem cells and synthetic active substances, based on dispensable tissues that can be harvested from the patient in large quantities without causing significant harm (e.g., bone marrow, bone marrow cell extract) are already routinely clinically used with clear success [19].

Another way of improvement lies in the optimization of synthetic scaffolds to enhance the biological response. Indeed, both scaffold architecture and composition are known to modulate cell behavior directly and indirectly, and thus could significantly affect CSD repair once implanted: the success of the clinical procedure is mainly determined by the ability of the implant to keep endogenous and exogenous cells alive and functional. This requires the scaffold to have micron-scale pores and roughness (< 10  $\mu$ m, ideally > 1  $\mu$ m) for osteogenic cell adherence and bone formation, as well as a macroscopic porous network (> 100  $\mu$ m) for cell colonization, mass transport and blood vessel guidance [20]. Triply-periodic minimal surfaces (TPMS) are a promising tool for designing the macroscale pore architecture of biomaterials. These open periodic porous structures, which have zero mean curvature, show higher intrinsic features than conventional semi-random porous architectures (e.g., salt-leached scaffold), such as the surface-to-volume ratio and permeability, both playing a critical role in the conduction of chemical (e.g., nutrients) and biochemical (e.g., cytokines) species, cells and tissues [21– 23]

Ideally, scaffold biodegradation and bone formation should also occur concurrently at a matching rate. However, clinically used calcium phosphates, as pure phase (e.g., HA) or as biphasic calcium phosphates (BCP), displayed a limited *in vivo* degradation, i.e., low solubility (chemical property) and resorbability (from cellular activity). Ionic substitutions or insertion within the apatite lattice (e.g., carbonate, silicate) have been shown to modulate the biodegradation of the implant, coupled with a stimulation of bone and vascular ingrowth. [24–31]

Designing and producing implants with a controlled composition and architecture, tailored to the craniofacial defect to repair, is now possible with the development of additive manufacturing technologies and associated software. Although they allow for the accurate

production of metal [32] and polymer [21,33] scaffolds with biologically relevant structures (e.g., TPMS), additive manufacturing technologies are still very limited for the production of calcium phosphate bioceramics. Stereolithography, robocasting, selective lase sintering or even powder 3D-printing technologies may suffer from the following drawbacks: limited design capability, lack of flexibility (e.g., HA only), low resolution or architectural control, CaP degradation during the process, and high cost [20,34]. Therefore, adapting the existing additive manufacturing technologies for CaP phases may unveil new prospects for the regeneration of CSDs.

The study reported herein investigates the regeneration of calvarial rat CSDs and compared CSD repair when filled with BCP granules (as the reference material) and custommade BCP and carbonated hydroxyapatite (CHA) disks, with or without addition of total bone marrow aspirate (TBM). BCP and CHA disks were designed with a TPMS produced through an indirect, flexible and reliable additive manufacturing process. This will indicate the potential of this architecture and composition for the regeneration of craniofacial CSD.

# 2. Materials and Methods

# 2.1. MBCP granules

MBCP® ceramic granules measuring 0.5–1.0 mm in diameter were provided by Biomatlante SA (Vigneux-de-Bretagne, France). They were defined as micro-macroporous biphasic calcium phosphate composed of 58% hydroxyapatite (HA) and 42%  $\beta$  tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP), exhibiting a specific surface area (SSA) of 2.5 m<sup>2</sup>/g [35]. The total porosity volume has been evaluated between 70 and 75% and consists mainly of macropores ( $\approx$  30% v/v) and micropores ( $\approx$  70% v/v) ranging from 100 µm to 500 µm and 0.1 µm to 1 µm, respectively [8,35–37]. Tubes containing granules (0.015 g each) were double-packed and autoclave-sterilized at 121 °C for 20 min.

# 2.2. Tailored TPMS CaP disks

# 2.2.1. Powder preparation

HA, apatitic tricalcium phosphate (TCPap) and B-type carbonated hydroxyapatite (CHA) powders were synthesized by a conventional aqueous precipitation method using a fully automated synthesis station (MAR07 [38], DES03 [39], LAF08 [40]). Briefly, a diammonium hydrogen phosphate solution ((NH4)2HPO4, 99%, Merck, Germany, [P]=1.2 mol/L), mixed, if applicable, with an ammonium hydrogen carbonate solution ((NH4)HCO<sub>3</sub>, 99%, Merck, [C]=0.1 mol/L) was added at 100 mL/min to a calcium nitrate solution Germany, (Ca(NO3)2, 4H<sub>2</sub>O, 99%, Merck, Germany, [Ca]=2.1 mol/L), maintained under stirring (500 rpm). Reagent ratios were calculated according to the following theoretical formula:  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ,  $Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH)$  and  $Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x(OH)_{2-x}$  with x=0.8 for HA, TCPap and CHA powders, respectively. The pH of the suspensions was adjusted to 7.0 (TCPap) or 8.0 (HA and CHA) by the addition of 28% ammonia solution (Merck, Germany) by means of a dosing pump (ProMinent, UK) coupled with a pH controller (Mettler Toledo M400, USA) and a pH-electrode (Mettler Toledo Inpro®4800/120/PT100, USA). The temperature was controlled and regulated automatically at 35 °C (TCPap) or 65 °C (HA and CHA) with an external T-probe connected to a cryothermostat (Huber, Germany). An argon flow (Air Products, 0.1 L/min) was maintained in the reactors to prevent any atmospheric uncontrolled carbonation throughout the synthesis process. After complete introduction of the phosphate solution, the suspension was matured for  $20 \pm 2$  h and finally centrifuged at 4000 rpm for 5 min (ThermoFisher Scientific, Sorvall<sup>™</sup> Legend XF). The wet powder agglomerates obtained were dried at 80 °C for 24 h, then ground in absolute ethanol (H3CCH2OH,>99.5%, VWR, Germany) by means of a planetary ball mill (PM400, Retsch, Germany) with zirconium oxide jars and balls and finally sieved at 25 µm (Russelfinex, Belgium).

Lastly, HA, TCPap and CHA powders were heat-treated to reduce their surface area as well as to transform TCPap into  $\beta$ -TCP according to the following general reaction:

 $Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5OH \rightarrow 3 Ca_3(PO_4)_2 + H_2O$ 

TCPap and HA powders were thus heat-treated at 900 °C and 1000 °C for 2 h under air (ramps 4 °C/min, Nabertherm, Germany), and CHA powder at 900 °C for 5 h under CO<sub>2</sub> (PCO<sub>2</sub> = 1 atm, ramps 5 °C/min, Nabertherm, Germany). The SSA of  $4.8 \pm 0.1 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $4.3 \pm 0.2 \text{ m}^2/\text{g}$  and  $4.7 \pm 0.1 \text{ m}^2/\text{g}$ , respectively, were finally achieved. These values were determined on powders, outgassed at 200 °C for 8 h, by means of the Brunauer-Emmett-Teller (BET) 5-point method using N2 adsorption isotherms (Micromeritics ASAP 2010, Germany).

## 2.2.2. Manufacturing process

Macroporous disk-shaped bioceramic implants were produced by a method detailed elsewhere based on the impregnation of wax molds [34], the latter being built layer by layer with a drop-on-demand 3D-printer (3Z Studio, Solidscape, Multistation, Dinard). The molds were designed as the negative structure of the intended implant and printed with a layer thickness of 25  $\mu$ m. Once printed and cleaned, molds were impregnated with a ceramic powder suspension (hereafter called slurry). After drying overnight at room temperature, the green bodies were cleaned of all excess dried slurry using a surgical blade (Swann-Morton, UK). Then they were heat-treated in a debinding furnace (Carbolite, UK) up to 500 °C, to eliminate the wax mold and the organic adjuvants, and finally sintered either at 1100 °C for 2 h under air (ramps 4 °C/min) or at 1050 °C for 2 h under CO<sub>2</sub> (PCO<sub>2</sub> = 1 atm, ramps 5 °C/min) to obtain the biphasic calcium phosphate (BCP: 60% HA and 40%  $\beta$ -TCP (w/w)) or the CHA bioceramics, respectively.

Slurries were prepared by blending 71.7% (w/w) powder (CHA) or powder blend (BCP: 60% HA and 40%  $\beta$ -TCP (w/w)), 27.7% (w/w) pure water, and 0.6% (w/w) dispersing agent (polyacrylate ammonium, Solvay, France) for 10 min at 170 rpm in a zirconia jar with zirconia balls 10 and 5 mm in diameter (PM400, Retsch, Germany). Before mold impregnation, an organic binder (1.9% (w/w), Duramax B-1000, Rohmand Haas, France) was mixed into the slurries at 140 rpm for 15 min using a propeller stirrer.

Macroporous disks were sterilized at 180 °C in a poupinel dry heat sterilizer for 30 min.

#### 2.2.3. Design of the macroporous bioceramic disk implants

Implants were designed to perfectly match the geometry of a rat calvarial defect 5.5 mm in diameter (Fig. 1) using ScanIP software (Simpleware, UK). The thickness of the implant was chosen not to exceed the height of the rat parietal bone  $\approx 1 \text{ mm}$  (Fig. 2). As regards its computer-aided design (CAD) model, the intended bioceramics should display a gyroid structure wherein a 300 µm sphere could freely move, for a total macroporosity of 40% (Fig. 2). For informative purposes, Fig. 2 also illustrates the link between the maximum size of a sphere that can go through a gyroid structure and the dimension of its fundamental unit for different porosity rates. The largest macropores of the gyroid architecture were purposely orientated along the height of the bioceramic, i.e., to face the animals' brain (Fig. 2).

As previously stated, molds were designed as the negative of the intended bioceramics with ScanIP software (Simpleware, UK). To obtain analogous bioceramics after sintering, independently of the ceramic phase, the dimensions of the molds and the parameters of the gyroid structure were adjusted: a shrinkage of 9.7% and 6.0% were considered for the BCP and CHA phases, respectively.

Figure 1. Calvarial bone defect in rat model.



(A) Diagram and (B) picture showing the two critical-sized calvarial defects performed on the left and right parietal bone of inbred Lewis rat (5.5 mm in diameter). Pictures showing the defects filled with (C) BCP granules and (D) macroporous disk-shaped bioceramics.

Figure 2. Design of the macroporous bioceramic disk.



3D images derived from Simpleware CAD software of (A) the macroporous disk with a 40% porosity volume, (B) cross section and top views of a 40% gyroid structure wherein a sphere 300  $\mu$ m in diameter can move freely and (C) the changes in the maximum diameter of a sphere that can go through the entire gyroid structure depending on the size of the gyroid's fundamental unit and its porosity.

## 2.2.4. Characterization of the macroporous bioceramic disk implants

The crystalline phases of the samples were identified by means of a Bruker D8 Advance  $\theta/\theta$  X-ray diffractometer (XRD) with a Lynx-Eye XE-T Detector (with a 2.93° aperture angle), using CuK $\alpha$  radiation and operating at 40 kV and 20 mA. XRD patterns were collected over the 2 $\theta$  range of 10–120° at a step size of 0.01° and counting time of 0.2 s per step. The crystalline phases were identified with Bruker Diffrac.EVA 4.0 software (Bruker AXS, Germany) and the PDF04+ database [41]. Rietveld method refinement was achieved with DIFFRAC.TOPAS v.5.0 software (*Bruker AXS*, Germany) using the Pawley algorithm and the following fundamental parameters for HA and  $\beta$ -TCP structures: PDF\_00-009-0432, space group P63/m (176) and PDF\_00-009-0169, space group R 3c (167), respectively. The XRD patterns were also used to determine the HA/ $\beta$ -TCP phase ratio of the BCP bioceramics according to a standard procedure [42].

Ground bioceramics were analyzed by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy using a Bruker VERTEX 70 spectrometer (Bruker Optics, France), equipped with a monolithic diamond ATR crystal (Quest ATR diamond, Specac, USA). The spectra, obtained by signal averaging of 64 successive scans, were recorded from 4000 to 400 cm<sup>-1</sup> at a resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. A curve-fitting analysis in the  $v_2$  (900–840 cm<sup>-1</sup>) and  $v_3$  (1600–1300 cm<sup>-1</sup>) carbonate domains of the FTIR spectra (dedicated in-house method [43]) was performed by means of OriginPro 2018b software (OriginLab, USA). Carbon content in CHA bioceramics was also determined by an elemental analyzer, using an infrared detector (LECO CS-444, USA).

Morphometric analyses of the bioceramics produced were carried out at various scales. Each bioceramic was first imaged using a Nanotom S X-ray computed tomography system (Phoenix, AZ, USA) with a voltage of 80 kV (tungsten target), an integration time of 750 ms and a 3.5-mm voxel resolution. For reconstruction of the volume data, a proprietary implementation based on the Feldkamps cone beam-reconstruction algorithm was used. VG Studio software (Volume Graphics, Heidelberg, Germany) was used for the 3D visualization of the volume data and the data set export in .DICOM format for image analysis.

Once imported into Simpleware, the .DICOM images allowed for the reconstruction of a 3D model of the bioceramic, which was exported in .stl format. After manual gross superimposition of the bioceramic model with its original CAD design, .stl files were imported in CloudCompare freeware (EDF R&D, France) for further comparison. A dedicated algorithm allowed for the fine superimposition of the two models. The "cloud to mesh" algorithm was used to compare the 3D printed bioceramic to its CAD model, the latter serving as the reference.

The ceramics were also examined by scanning electron microscopy (SEM, JEOL JSM-6500F, USA) by applying a gold coating (about 10 nm) using the sputtering technique (Quorum, Q150R ES, UK). The porosity at the samples' surface was quantified from SEM images using ImageJ freeware (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Additionally, the minimum (xF,min) and maximum (xF,max) Feret diameter of the micropores, as well as three morphological factors, aspect ratio (A.R.) sphericity (S) and roundness (R.), were evaluated (N = 3 SEM image analyzed per sample \_ N = 2 samples per macroporous bioceramic) [34,44].

Finally, the ceramics SSA was determined as described previously using the BET 5-point method (five ceramics/measurement in triplicate).

# 2.3. Animals

Twenty-four adult inbred Lewis 1A-haploype RT1a rats were obtained from a certified breeding center (Janvier Labs, LeGenest-Saint-Isle, France) and acclimatized for 2 weeks to the conditions of the local vivarium. Animal experiments were conducted according to the European directive 2010/63/EU and were approved by the French Ministry of Research and Education (APAFIS 18616-V1) and by the Pays de la Loire Ethics Committee (France).

### 2.4. Bone marrow harvesting

Three rats were specifically designated as TBM donors. The animals were anesthetized using inhaled isoflurane (Forene; Abott, Rungis, France) and sacrificed via intracardiac overdose of sodium thiopental (Nesdonal; Rhône-Merieux, Lyon, France). TBM was isolated from femurs, humeri and tibias for extemporaneous grafting. Briefly, the ends of each bone were cut, and 1 mL of TBM mixed with saline was obtained through an intramedullary bone flush procedure performed with a 26-gauge needle. After pooling, the TBM was seeded into the CaP biomaterial, which was immediately implanted in the calvarial defect.

## 2.5. Implant preparation and study groups

The animals were randomly assigned to one of the following groups: BCP granules; BCP granules +TBM; BCP disk; BCP disk +TBM; CHA disk; CHA disk +TBM and Empty defect. Empty defect and BCP granules + TBM were used as a negative and positive control, respectively. Each group had a sample size of n = 6.

## 2.6. Surgery

All procedures were performed under general anesthesia and lasted 20 min. After local subcutaneous xylocaine injection (0.1 mL, 0.1%), a 2 cm longitudinal incision was made on the head of each rat from the forehead to the neck. Skin and periosteum were lifted. Subsequently, critical-sized parietal defects (5.5 mm) were created bilaterally using a circular trephine (Komet Medical, Lemgo, Germany) under saline solution infusion. Each animal received two randomly assigned implants (n = 6) as detailed in Supplementary Table 1. The skin was then closed with nonabsorbable sutures (Ethylon 5.0, Ethicon©). Immediate postoperative analgesia was provided through subcutaneous injection of buprenorphine hydrochloride (Buprecare; Animalcare, Dunnington, UK) and maintained for 2 days. Seven weeks after implantation, the animals were sacrificed by sodium thiopental overdose.

Rat	Right defect	Left defect
1	BCP granule	BCP granule
2	BCP granule	BCP granule
3	BCP granule	BCP granule
4	BCP granule+TBM	BCP granule+TBM
5	BCP granule+TBM	BCP granule+TBM
6	BCP granule+TBM	BCP granule+TBM
7	BCP disk	BCP disk
8	BCP disk	BCP disk
9	BCP disk	BCP disk
10	BCP disk +TBM	BCP disk +TBM
11	BCP disk +TBM	BCP disk +TBM
12	BCP disk +TBM	BCP disk +TBM
13	CHA disk	CHA disk
14	CHA disk	CHA disk
15	CHA disk	CHA disk
16	CHA disk +TBM	CHA disk +TBM
17	CHA disk +TBM	CHA disk +TBM
18	CHA disk +TBM	CHA disk +TBM
19	Empty	Empty
20	Empty	Empty
21	Empty	Empty

Supplementary Table 1. Animal experiment design for CSD reconstruction

Table showing the seven experimental groups including reconstruction with BCP granules alone, BCP granules+TBM (positive control), BCP macroporous bioceramics±TBM, CHA macroporous bioceramics±TBM and empty defect as an untreated group (negative control). Abbreviations: total bone marrow, TBM.

#### 2.7. Microcomputed tomography analysis

Qualitative analysis of total mineral and newly formed bone contents was performed at the time of necropsy using the SkyScan-1272 high-resolution 3D X-ray micro-computed tomography (micro-CT) system for small-sample imaging (Brucker, Belgium). The scanner was equipped with a 20- to 100 kV (10 W) X-ray source and an 11-mega-pixel X-ray detector. Each sample was placed on a holder with the sagittal suture oriented parallel to the X-ray detector and scanned using a 0.5-mm aluminum filter, 18-µm isotropic voxels, a 0.71 °rotation step, and frame averaging of 4. For 3D reconstruction (NRecon software, Bruker) without smoothing, a ring artifact correction beam hardening correction wand the absorption coefficient was set to 4, 20%, and from 0.005 to 0.1. Standard 3D morphometric parameters (CTAn software, Bruker) were determined in the region of interest (5.5 mm circle; 100 cuts) and put on the defect. Representative 3D images were created using CTvox software (Bruker) for each implant to assess bone formation in control and treated animals. The overall augmented contour was evaluated in the 3D reconstructed view and calculated in CTan. Boundaries were set to standardize the region of the augmented volume to be analyzed. Bone volume (BV; mm<sup>3</sup>) was calculated as the volume occupied by bone within the region of interest.

# 2.8. Histology

To observe the newly formed bone and osteoblastic cells, double staining was performed. In short, specimens were fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde and then dehydrated through a graded series of ethanol treatments. Nondecalcified bone specimens were infiltrated and embedded in glycol-methyl-methacrylate (GMMA; Technovit 9100, Kulzer, Germany). For each sample, a craniocaudal section was performed at the maximum diameter of each implant using a circular diamond saw (SP1600; Leica, Wetzlar, Germany) and serial 5-µm sections were cut using a hard tissue microtome (Polycut SM 2500; Leica, Wetzlar, Germany). The sections were stained with Goldner's trichrome and hematoxylin-eosin-safran and then examined using a light microscope (Leica-DM 4000 B, Wetzlar, Germany).

## 2.9 Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) was performed to evaluate the vessel formation in biomaterials and the empty defect. Sections measuring 5  $\mu$ m were cut from GMMA-embedded blocks and then stained. A rabbit polyclonal anti-CD 31 antibody (Abcam 28364, dilution 1:100) was used for endothelial staining and vessel visualization. A negative control was performed without primary antibody CD31. Quantitative analysis of the vessel formation was performed by a pathologist using a light microscope (Leica-DM 4000 B, Wetzlar, Germany): the vessel count was performed for each reconstruction including 10 fields per defect with a ×40 magnification.

## 2.10. Statistical analysis

Each result was expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of six samples. A oneway ANOVA followed by a post hoc test (Fisher's protected least significant difference) was performed. *P*-values <0.05 were considered to be statistically significant.

#### 3. Results

#### 3.1 Analysis of the macroporous disk-shaped bioceramics

Figure 3 shows the XRD patterns and FTIR spectra of BCP and CHA ground bioceramics, centered on the range  $10\ge 2\theta\ge 46^\circ$ , and  $3620\ge v\ge 3540 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1600\ge v\ge 1350 \text{ cm}^{-1}$  and  $1200\ge v\ge 500 \text{ cm}^{-1}$ , as well as images of the macroporous disk-shaped bioceramics.



Figure 3. Characteristics of macroporous bioceramics.

(A) XRD patterns and (B) IR spectra of the BCP and CHA ground scaffolds assessing the scaffold composition. " $CO_3^{2^-}$  (B)" and " $CO_3^{2^-}$  (A)" correspond to vibrations of carbonate ions in the positions occupied by phosphate and hydroxide ions in the HA lattice, respectively. (C) Pictures, and 3D images of the (D) BCP and (E) CHA bioceramics obtained by X-ray  $\mu$ tomography. SEM micrographs showing the macro- and micro-architecture of (F) BCP and (G) CHA bioceramics including 300  $\mu$ m macropores and submicron micropores.

Both the diffractogram (Fig. 3A) and the FTIR spectrum (Fig. 3B) of the BCP sample exhibited the characteristic diffraction lines or bands of HA and  $\beta$ -TCP phases (PDF 00-009-432 and 00-009-169, respectively) [45]. No other crystalline or amorphous phase was detected. The *a* and *c* lattice parameters of the HA (a=9.422 Å and c=6.882 Å) and  $\beta$ -TCP (a=10.437 Å and c=37.426 Å) phases detected in the BCP sample are equivalent to values reported in the ICDD PDF cards 00-009-432 (a=9.418 Å and c=6.884 Å) and 00-009-169 (a=10.429 Å and c=37.380 Å), respectively. Moreover, the percent by mass of crystalline phases HA and  $\beta$ -TCP in BCP implants was assessed at 55.9 ± 0.2% and 44.1 ± 0.2%, respectively.

The XRD pattern of the CHA implant (Fig. 3A) is typical of a hydroxyapatite structure (PDF 00-009-432). Lattice parameters *a* and *c* are equal to 9.455 Å and 6.890 Å, respectively. Both are significantly higher than those of HA (ICDD PDF cards 00-009-432), as is commonly observed when carbonate ions simultaneously substitute for phosphate (B-sites of the apatite structure) and hydroxide (A-sites of the apatite structure) ions in the HA lattice [46–48].

The infrared spectrum exhibits only the characteristic bands of AB-type carbonated hydroxyapatites (Fig. 3B) [40,48], confirming that the chemical composition of CHA implants can be illustrated with the following general formula:

Ca10-x(PO4)6-x(CO3)x(OH)2-x-2z(CO3)z Eq. 1

with  $0 \le x$  (B-type carbonate ions)  $\le 2$  and  $0 \le z$  (A-type carbonate ions)  $\le 2$ -x

The carbonate content of the CHA implants was evaluated at  $5.48\pm0.05\%$  w/w. The amounts of A-type and B-type carbonate ions, investigated by a curve-fitting method, were evaluated at  $0.78\pm0.19\%$  w/w and  $4.70\pm0.23\%$  w/w, respectively.

Figure 3C–3E shows pictures and X-ray  $\mu$ -tomography 3D images of the BCP and CHA macroporous disk-shaped bioceramics. Their final dimensions are equivalent and were assessed at  $\emptyset = 5.44\pm0.04$  mm and  $h = 827\pm41 \mu m$  (n=24), and at  $\emptyset = 5.44\pm0.05$  mm and  $h = 843\pm38 \mu m$  (n=18), respectively. Moreover, the CloudCompare comparison revealed that both BCP and CHA bioceramics were very similar to their initial CAD model with a distribution of the deviation centered on 0  $\mu m$ , with most of the deviations between -40 and +40  $\mu m$  (Supplementary Fig. 1).





Comparison of the (A) BCP bioceramics and (B) CHA bioceramics produced with their initial CAD model. 3D model of the bioceramic produced was obtained by micro-CT analysis. The bioceramics produced displayed excellent matching with their CAD model, with a deviation centered on 0  $\mu$ m.

The SEM images of the BCP and CHA bioceramics macro- to micro-structures (Fig. 3F and 3G) clearly reveal the printing orientation of the mold parallel to the surface of the disks as well as submicropores. As described in Table 1, the concentration of submicropores at the surface of the BCP and CHA bioceramics is about 10% and 14%, respectively. This small difference in concentration generates a difference less than 1 m<sup>2</sup>/g between the two types of

macroporous disks (see Table 1). The size (xF,min  $\approx 0.7 \,\mu\text{m}$  and xF,max  $\approx 1.3 \,\mu\text{m}$ ) and morphology of the submicropores are similar: the latter can be defined as domino-shaped micropores sub-rounded with a low sphericity.

	Sample	BCP		CHA	
		Average	SD	Average	SD
s/s	Amount	9.9%	2.2%	13.6%	2.7%
μm	xFmin /	0.7	0.5	0.7	0.6
μm	xFmax /	1.2	0.9	1.3	1.1
	AR	2.1	0.2	2.0	1.0
	R	0.5	0.2	0.5	0.2
	S	0.5	0.2	0.4	0.2
m² g	SSA /	1.4	0.1	2.3	0.2

Table 1. Microporosity of macroporous disk-shaped bioceramics.

Amount (surface/surface), dimension and morphology of the micropores constituting BCP and CHA macroporous ceramics from SEM image analysis and SSA values; AR (aspect ratio), R (roundness), S (sphericity), xF,min and xF,max corresponding to the shortest and longest Feret diameter, respectively; SD standard deviation.

# 3.2. Clinical findings

All animals survived the surgical procedure, 36 defects were healed with biomaterials and six were left empty. During the healing period, no reconstruction exposure or loss was observed, and no abnormal findings such as inflammation, infection or separation in the surgical wound were observed.

#### **3.3. Micro-CT findings**

As shown in micro-CT images after sacrifice at 7 weeks (Fig. 4A), the groups with the BCP and CHA disk presented homogeneous bone formation distributed over the entire surface of the bone defect, conversely to the groups with granules, which systematically presented a partial filling of the defect. The amount of bone was grown toward the center of the defect from adjacent host tissues in all groups (disks and granules with or without TBM).

The BCP granules and Empty defect groups had the lowest rate of newly formed bone (see Table 2 and Fig. 4B), which were significantly lower than for the BCP and CHA disk groups (p=0.03 and p=0.04, respectively). Addition of TBM prior to implantation systemically improved bone formation, independently of the bone substitute (e.g., 103% increase for Granule + TBM). Interestingly, bone content was comparable in the positive control (Granule + TBM) BCP and CHA disk groups without TBM. The greatest bone healing was observed in the CHA+TBM group, with approximately 55% more bone formed than in the positive control (Table 2, p=0.04). While not significant, the CHA disk + TBM group also showed greater bone formation than the BCP disk + TBM group, the latter displaying results comparable to the Granule + TBM group.

Figure 4. Micro-CT analysis of the critical-sized craniofacial bone defect (CSD) reconstruction.





(A) Images of the CSD reconstructions at 7 weeks showing calvarial 3D reconstruction, biomaterials + new bone as well as newly formed bone alone. CSD repair with BCP granules  $\pm$ TBM systemically had biomaterial loss and calvarial holes. (B) Graph showing the quantitative analysis of bone volume (BV,  $mm^3$ ) in the region of interest. Empty defect (negative control) and BCP Granule groups had the lowest rate of bone formation compared to others (p < 0.05). There was no statistical difference between BCP granule+TBM (positive control) and macroporous disks alone while the CHA+TBM group had significantly higher bone formation than BCP granule+TBM (p=0.0441).

J	8 9	
Group	Mean ± SD	Median
Empty	$1.242 \pm 0.6102$	1.263 <sup>b,d</sup>
BCP Granule	$1.055 \pm 0.9057$	0.7257 <sup>b,d</sup>
BCP Granule +TBM	$2.146 \pm 0.9746$	2.169 <sup>a,c,d</sup>
BCP disk	$2.515 \pm 0.6859$	2.183 <sup>a,c</sup>
BCP disk+TBM	$2.572\pm0.5426$	2.674 <sup>a,c</sup>
CHA disk	$2.258\pm0.6524$	2.271 <sup>a,c</sup>
CHA disk+TBM	$3.331 \pm 0.3031$	3.315 <sup>a,b,c</sup>

*Table 2: Bone volumetric analysis within the region of interest*  $(n = 6; mm^3)$ *.* 

<sup>a</sup> Significant difference compared to negative control group (empty defect) \*.

<sup>b</sup> Significant difference compared to positive control group (BCP Granule+TBM) \*.

<sup>c</sup> Significant difference compared to BCP Granule group\*.

<sup>d</sup> Significant difference compared to CHA disk+TBM group\*.

\* p < 0.05

Table showing the mean±SD and the median of the bone volume in CSD. Bone formation was significantly lower in the empty (negative control) and BCP Granule groups. No statistical difference was observed between BCP Granule+TBM (positive control) vs Macroporous disks (BCP and CHA) without TBM. CHA+TBM showed a higher rate of bone formation than BCP Granule+TBM.

Histologic findings Goldner's Masson trichrome staining is detailed in Fig. 5:



Figure 5. IHC of calvarial reconstruction using Goldner's Trichome staining.

Images showing the histological assessment at 7 weeks of CSD reconstruction with a magnification ( $\times$ 50) of a corresponding new bone formation area. The calvarial reconstructions using custom-made macroporous disks evenly restored the cranial vault compared to groups reconstructed by BCP granules. In groups using CaP biomaterials without TBM, more newly formed bone was observed in groups reconstructed by macroporous disks than by BCP granules. Live TBM cells were systematically observed in groups reconstructed by CaP biomaterials+TBM. A large amount of new bone was observed when biomaterials were combined with TBM. Abbreviations: new bone, Bo; BCP granule, Gr; macroporous disk, D; total bone marrow, TBM; fibrous tissues, Ft.

Notably, abundant bone formation was observed in disk  $\pm$  TBM groups, regardless of the disk composition, and the BCP granules + TBM groups.

The defect was mainly filled by fibrous tissue in both the BCP granules and Empty groups. A small amount of bone was observed, mainly close to the adjacent host bone. Uneven vault reconstruction was observed in the BCP Granule group.

In the BCP granules + TBM group, a large amount of bone was observed around the granules close to the adjacent host bone as well as in the center of the defect (especially in zones in contact with the dura). Although the distribution of granules was more homogeneous with TBM, the calvarial vault was nevertheless poorly and unevenly repaired (e.g., random thickness).

In the BCP and CHA disk groups, bone formation occurred from the defect edges to its center. Spicules penetrating the porous structure of the implant and merging in large bone islands were observed. A homogeneous distribution of a large amount of new bone was detected within the scaffolds in groups combining CaP disks, regardless of their composition, and TBM, with the center of the defect widely colonized by newly mineralized tissue (6/6 of CHA and 4/6 of BCP respectively).

Generally, anatomical calvarial vault reconstruction was carried out successfully in defects filled with macroporous disks, in contrast to the BCP granules groups. Bone marrow niches were created in groups including TBM with larger niches when custom-made disk-shaped CaP bioceramics were used.

Goldner staining was compared to HES staining (Supplementary Fig. 2) to evaluate bone maturity and the osteoid band in the samples. No difference was observed between BCP granules and macroporous disks, which for the most part had mature bone at 7 weeks.

Supplementary Figure 2. IHC of CSD repair at 7 weeks using HES and Goldner staining



Images showing the histological comparison of CSD reconstruction using Goldner's trichome and HES staining with a ×50 magnification. Mature lamellar bone was observed in all groups. Weak osteoid band staining was visible. Abbreviations: new bone, Bo; BCP granule, Gr; macroporous Disk, D; osteoid band, OI; total bone marrow, TBM; fibrous tissues, Ft.

# **3.5. Immunohistological findings**

Vessel formation was observed from the edge of the craniectomy, in surrounding fibrous tissue and into the scaffolds for all groups. The vessel arrangement showed a high fibrovascular network growing into the macroporous network of the disks or around the BCP granules. No difference in the number of vessels (about 10 per field, magnification  $\times$ 40) or vessel size was observed (Fig. 6).

Figure 6: Assessment of angiogenesis in craniofacial bone defect (CSD) reconstruction.



IHC images showing vessel formation in calvarial reconstruction with (A) BCP granules or (B) CHA macroporous bioceramic using endothelial cell immunostaining with anti-CD 31 antibody. (C) Graph and table of the vessel quantification (vessel count of 10 fields per CSD, magnification ×40) showing no significant difference between experimental groups. Abbreviations: Bo, new bone; v, vessel; Gr, granules; CHA, CHA macroporous bioceramic.

#### Discussion

In this study, we aimed to compare one-step and single reconstruction procedures including two types of customized CaP macroporous bioceramics with or without TBM on a rat model.

The design of the macroporous disk-shaped bioceramics was optimized to facilitate handling by the surgeon and to enhance their osteoconduction and osseointegration compared to a pile of granules. For this purpose, the porosity was set at 40% to prevent erosion of ceramics while avoiding sintering at an excessively high temperature, which in turn would reduce concentration in micropores. The size of the disks was proved to fit the bone defect volume closely with less than 60  $\mu$ m of space between the ceramic, centered in the defect, and the parietal bone. A gyroid macroporous structure was accurately patterned in the bioceramics to improve their permeability compared to a standard random macroscopic porous network [21]. A 300  $\mu$ m macropore size was specifically chosen to create sufficient confined areas to positively affect tissue growth and blood vessel guidance [49]. Controlling the microporosity of the implants at the submicron scale was also intended to improve their overall osseointegration dynamics [35,49].

The BCP macroporous disk-shaped bioceramics are composed of HA (56% w/w) and  $\beta$ -TCP (44% w/w) phases in equal proportion to that of the MBCP® granules (58%HA, 42%  $\beta$ -

TCP w/w). Assuming Eq.1 and the amounts of A-type and B-type carbonate ions in the HA lattice, CHA bioceramics is a monophasic AB-type carbonated hydroxyapatite that can be described by the following chemical formula:

Ca<sub>9.26</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>5.26</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>0.74</sub>(OH)<sub>1.02</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>0.12</sub> Eq.2

In our experimental conditions, we considered BCP granules extemporaneously mixed with TBM as a positive control of bone regeneration as previously described [16,50–54]. Indeed, its efficacy in an animal model has been documented in several studies. BCP granules have well-known osteoconductive properties repeatedly described for decades [8,55,56], and TBM naturally contains a large number of chemotactic and osteogenic factors as well mesenchymal and hematopoietic progenitor cells promoting bone formation. We previously showed that the mixtures of BCP granules and unprocessed TBM had osteogenic potential in vivo and a positive effect on bone ingrowth [53,54]. In addition, other studies confirmed enhancement of induced bone formation in ectopic and osseous sites [57–64]. Thus, we aimed to compare BCP granules + TBM to custom-made disk-shaped bioceramics consisting of a macroporous gyroid structure.

We tested a clinically relevant single-step procedure with no preoperative in vitro procedure such as osteogenic cell isolation. Seven experimental procedures were performed including the negative (defect maintained empty) and positive (BCP granules + TBM) controls.

Comparison of the new bone volume formed in BCP granules and CaP disks demonstrated the importance of the macroscopic shape and porous network of the implant on its osteoconductive properties: BCP granules had the same rate of new bone as the empty defect while CaP disks without TBM presented a bone volume equivalent to the positive control. This indicates that randomly arranged granules impeded spontaneous regeneration of the bone (vault reconstruction) while the gyroid structure guided it.

Osseointegration (i.e., fusion between the defect rim and the scaffold) and bone apposition (i.e., continuum of the mineral between bone and scaffold) were enhanced by the architecture of the 3D-printed bioceramics, whose shape perfectly matched the defect, thus allowing for an intimate bone-scaffold contact and whose internal macroporous gyroid structure provides an ideal environment for cell colonization, survival and physiological metabolism. For instance, the permeability of the gyroid structure is more than 10-fold greater than those with random pore architecture of comparable porosity and pore size [21], favoring mass transport (e.g., cells, nutrients, waste removal). Please refer to the review of Kapfer et al. [65] for more details on the potential of TPMS structure for biological applications. In addition, the micromotion of the disks due to the dura pulsation (nonideal conditions for bone recovery) is very limited in contrast to the BCP granules.

Interestingly, the synergistic effects of both scaffold composition and architecture were discovered in this study: although bone formation within BCP and CHA disks was comparable, it became significantly higher in the CHA + TBM group. While further investigations will be required to precisely understand the underlying mechanisms driving this phenomenon, this indicates that a concomitant modulation of the physicochemical and architectural features of the implant may improve the survival and metabolic activity of endogenous and exogenous cells, thus unveiling new opportunities for the regeneration of the craniofacial bone defect.

Although CaP disks alone are as effective as the positive control, the combination of ABtype CHA disk with TBM aspirate, which contribute essential chemotactic and osteogenic factors, was the most efficient procedure in this study.

To completely avoid autologous harvest, we could use other adjuvants promoting bone formation such as rhBMP-2 that have shown promising results when compared to autologous bone graft for the craniofacial area [66–68]. However, rhBMP2 procedures are expansive and can have potentially severe side effects. rhBMP-2 exposes the patient to the risk of wound complication such as breakdown, infection or significant local swelling with potential acute

respiratory failure when it is used too close to the airways [69–71]. Additionally, bone formation around the bone defect (e.g., ectopic ossification) is commonly described with BTE procedures using BMP [17,18]. This limits the added value of a custom-made implant except to replace the loading method by soaking BMP-2 in the carrier, leading to the burst-release of a supraphysiological dose of BMP-2 (e.g., several milligrams), by the grafting of BMP-2 molecules at specific sites at the CaP ceramic surface [72].

Materials should also enable vascular network formation for bone regeneration [73–76]. Scaffold porosity is a decisive factor for tissue permeation, angiogenesis and oxygen diffusion into the materials, which is a key factor for cell viability. Both osteogenesis and angiogenesis processes have to demonstrate a coordinated interplay to allow successful bone healing. Therefore, we designed and manufactured macroporous ceramics with a macroarchitecture including a 300 µm pore size and a gyroid structure to ensure blood vessel growth and good penetration of highly vascular connective tissues [20,77,78]. Contrary to our expectations, and although we observed greater bone formation with macroporous disks with or without TBM, no visible difference in vessel formation was observed in this study between tailored disks and granules. However, the large number of vessels in a bone construct is not always predictive of low or high bone formation. For example, a foreign body reaction can imply inflammation processes leading to angiogenesis and vessel formation without new bone formation. In addition, angiogenesis plays a particular key role at the early step during endochondral or immature bone formation [79,80]. When bone formation was observed in this study, histological exams showed mature and well-vascularized bone at 7 weeks. It would be relevant to analyze vessel formation at an earlier stage after material grafting, in order to investigate if greater and faster vessel formation is observed with macroporous ceramics.

This study was based on a small animal model with limited bone defect also limiting the size of the macropores constituting the scaffold. Nevertheless, the syngenic Lewis rat is considered a good model to evaluate the bony potential of materials. Among the different animal models of craniofacial bone defects, the critical-size calvarial defect in rat remains one of the most widely used, because it can be bilaterally, easily and safely performed [14,81,82]. Although the rat calvarial defect is only considered as a preliminary model for testing the clinical relevance of BTE strategies, it has allowed us to examine numerous regenerative approaches simultaneously, which would have been impossible in larger animal models due to cost, ethics and logistics. However, it could be assumed that larger bone reconstruction in larger animals or humans using our reconstruction method could also suffer from inadequate oxygen supply due to the greater bone volume to repair. Consequently, sustainable oxygen supply strategies should be developed to increase the O<sub>2</sub> concentration [74].

#### Conclusion

The first step towards the regeneration of calvarial CSD, based on 3D-printed CaP disks displaying a TPMS internal architecture, was reported in this study. A one-step surgical approach, making full use of a natural, dispensable and safe bioactive substance (bone marrow) and tailored bioceramics, was successfully implemented and should be seriously considered for further investigation as a relevant alternative to the current gold standards. Safer and cheaper than other promising tissue-engineering strategies based on synthetic active substances (e.g., rhBMP2), the clinical potential of this approach is to be confirmed in large animal models with human-sized relevant craniofacial defects.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank English Solutions (Voiron, France) for editing the manuscript.

# **References:**

1. Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: Should it still be the gold standard for treating nonunions? Injury. 2007;38:S75-80.

2. David L, Argenta L, Fisher D. Hydroxyapatite cement in pediatric craniofacial reconstruction. J Craniofac Surg. 2005;16:129-33.

3. Grant GA, Jolley M, Ellenbogen RG, Roberts TS, Gruss JR, Loeser JD. Failure of autologous bone-assisted cranioplasty following decompressive craniectomy in children and adolescents. J Neurosurg. 2004;100:163-8.

4. Honeybul S, Ho KM. How « successful » is calvarial reconstruction using frozen autologous bone? Plast Reconstr Surg. 2012;130:1110-7.

5. Honeybul S, Morrison DA, Ho KM, Lind CRP, Geelhoed E. A randomized controlled trial comparing autologous cranioplasty with custom-made titanium cranioplasty. J Neurosurg. 2017;126:81-90.

6. Matsuno A, Tanaka H, Iwamuro H, Takanashi S, Miyawaki S, Nakashima M, et al. Analyses of the factors influencing bone graft infection after delayed cranioplasty. Acta Neurochir (Wien). 2006;148:535-40; discussion 540.

7. Dünisch P, Walter J, Sakr Y, Kalff R, Waschke A, Ewald C. Risk factors of aseptic bone resorption: a study after autologous bone flap reinsertion due to decompressive craniotomy. J Neurosurg. 2013;118:1141-7.

8. Daclusi G. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physico- chemical characterization. J Biomed Mater Res. 1989;23:883–894.

9. Daclusi G, Layrolle P. Osteoinductive properties of micro macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics. Key Eng Mater. 2004;254:1005–1008.

10. Herberg S, Kondrikova G, Periyasamy-Thandavan S, Howie RN, Elsalanty ME, Weiss L, et al. Inkjet-based biopatterning of SDF-1 $\beta$  augments BMP-2-induced repair of critical size calvarial bone defects in mice. Bone. 2014;67:95-103.

11. De La Luz Sierra M, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, Yarchoan R, et al. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. Blood. 2004;103:2452-9.

12. Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. J Craniofac Surg. 2001;12:586-93; discussion 594-595.

13. Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. Transplantation. 1998;66:1272-8.

14. Inoda H, Yamamoto G, Hattori T. rh-BMP2-induced ectopic bone for grafting critical size defects: a preliminary histological evaluation in rat calvariae. Int J Oral Maxillofac Surg. 2007;36:39-44.

15. Brooker JE, Camison LB, Bykowski MR, Hurley ET, Yerneni SS, Campbell PG, et al. Reconstruction of a Calvarial Wound Complicated by Infection: Comparing the Effects of Biopatterned Bone Morphogenetic Protein 2 and Vascular Endothelial Growth Factor. J Craniofac Surg. 2019;30:260-4.

16. Shirasu N, Ueno T, Hirata Y, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, et al. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. Acta Histochem. 2010;112:270-7.

17. Leblanc E, Trensz F, Haroun S, Drouin G, Bergeron É, Penton CM, et al. BMP-9induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment. J Bone Miner Res. 2011;26:1166-77. 18. Cipitria A, Wagermaier W, Zaslansky P, Schell H, Reichert JC, Fratzl P, et al. BMP delivery complements the guiding effect of scaffold architecture without altering bone microstructure in critical-sized long bone defects: A multiscale analysis. Acta Biomater. 2015;23:282-94.

19. Tessier P, Kawamoto H, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, Wolfe SA. Complications of harvesting autogenous bone grafts: a group experience of 20,000 cases. Plast Reconstr Surg. 2005;116:72S-73S; discussion 92S-94S.

20. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. Bioact Mater. 2018;3:278-314.

21. Melchels FPW, Barradas AMC, van Blitterswijk CA, de Boer J, Feijen J, Grijpma DW. Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing. Acta Biomater. 2010;6:4208-17.

22. Vijayavenkataraman S, Zhang L, Zhang S, Hsi Fuh JY, Lu WF. Triply Periodic Minimal Surfaces Sheet Scaffolds for Tissue Engineering Applications: An Optimization Approach toward Biomimetic Scaffold Design. ACS Appl Bio Mater. 2018;1:259-69.

23. Blanquer SBG, Werner M, Hannula M, Sharifi S, Lajoinie GPR, Eglin D, et al. Surface curvature in triply-periodic minimal surface architectures as a distinct design parameter in preparing advanced tissue engineering scaffolds. Biofabrication. 2017;9:025001.

24. Supová M. Isolation and preparation of nanoscale bioapatites from natural sources: a review. J Nanosci Nanotechnol. 2014;14:546-63.

25. Shepherd JH, Shepherd DV, Best SM. Substituted hydroxyapatites for bone repair. J Mater Sci Mater Med. 2012;23:2335-47.

26. Landi E, celotti G, Logroscino G, Tampieri A. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. J Eur Ceram Soc. 2003;23:2931-7.

27. Patel N, Gibson IR, Hing KA, Best SM, Damien E, Revell PA. The in vivo response of phase pure hydroxyapatite and carbonate substituted hydroxyapaite granules of varying size ranges. Key Eng Mater. 2002;218-220:383-6.

28. Porter A, Patel N, Brooks R, Best S, Rushton N, Bonfield W. Effect of carbonate substitution on the ultrastructural characteristics of hydroxyapatite implants. J Mater Sci Mater Med. 2005;16:899-907.

29. Spence G, Patel N, Brooks R, Rushton N. Carbonate substituted hydroxyapatite: resorption by osteoclasts modifies the osteoblastic response. J Biomed Mater Res A. 2009;90:217-24.

30. Spence G, Patel N, Brooks R, Bonfield W, Rushton N. Osteoclastogenesis on hydroxyapatite ceramics: the effect of carbonate substitution. J Biomed Mater Res A. 2010;92:1292-300.

31. Spence G, Phillips S, Campion C, Brooks R, Rushton N. Bone formation in a carbonate-substituted hydroxyapatite implant is inhibited by zoledronate: the importance of bioresorption to osteoconduction. J Bone Joint Surg Br. 2008;90:1635-40.

32. Yuan L, Ding S, Wen C. Additive manufacturing technology for porous metal implant applications and triple minimal surface structures: A review. Bioact Mater. 2019;4:56-70.

33. Coelho PG, Hollister SJ, Flanagan CL, Fernandes PR. Bioresorbable scaffolds for bone tissue engineering: optimal design, fabrication, mechanical testing and scale-size effects analysis. Med Eng Phys. 2015;37:287-96.

34. Charbonnier B, Laurent C, Blanc G, Valfort O, Marchat D. Porous Bioceramics Produced by Impregnation of 3D-Printed Wax Mold: Ceramic Architectural Control and Process Limitations: Porous Bioceramics Produced by Impregnation of 3D-Printed Wax Mold.... Adv Eng Mater. 2016;18:1728-37. 35. Miramond T, Corre P, Borget P, Moreau F, Guicheux J, Daculsi G, et al. Osteoinduction of biphasic calcium phosphate scaffolds in a nude mouse model. J Biomater Appl. 2014;29:595-604.

36. Le Guehennec L, Goyenvalle E, Aguado E, Pilet P, Bagot D'Arc M, Bilban M, et al. MBCP biphasic calcium phosphate granules and tissucol fibrin sealant in rabbit femoral defects: the effect of fibrin on bone ingrowth. J Mater Sci Mater Med. 2005;16:29-35.

37. Seong KC, Cho KS, Daculsi C, Seris E, Guy D. Eight-Year Clinical Follow-Up of Sinus Grafts with Micro-Macroporous Biphasic Calcium Phosphate Granules. Key Eng Mater. 2013;587:321-4.

38. Marchat D, Bernache-Assollant D, Champion E. Cadmium fixation by synthetic hydroxyapatite in aqueous solution—Thermal behaviour. J Hazard Mater. 2007;139:453-60.

39. Destainville A, Champion E, Bernache-Assollant D, Laborde E. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. Mater Chem Phys. 2003;80:269-77.

40. Lafon JP, Champion E, Bernache-Assollant D. Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite Ca10-x(PO4)6-x(CO3)x(OH)2-x-2y(CO3)y ceramics with controlled composition. J Eur Ceram Soc. 2008;28:139-47.

41. International Centre for Diffraction Data (ICDD). International Centre for Diffraction Data—PDF4+ Relational Powder Diffraction File. Available online: http://www.icdd.com/index.php/pdf-4/.

42. Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Laval J-P. Determination of Calcium/Phosphorus Atomic Ratio of Calcium Phosphate Apatites Using X-ray Diffractometry. J Am Ceram Soc. 2004;84:359-66.

43. Charbonnier B. Développement de procédés de mise en forme et de caractérisation pour l'élaboration de biocéramiques en apatites phosphocalciques carbonatées [Internet]. [Lyon]; 2016. Disponible sur: http://www.theses.fr/2016LYSEM031

44. ISO 9276-6:2008. https://www.iso.org/standard/39389.html.

45. Marchat D, Zymelka M, Coelho C, Gremillard L, Joly-pottuz L, Babonneau F, et al. Accurate characterization of pure silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a new precipitation route. Acta Biomater. 2013;9:6992-7004.

46. LeGeros RZ, Trautz OR, Klein E, LeGeros JP. Two types of carbonate substitution in the apatite structure. Experientia. 1969;25:5-7.

47. Elliot JC. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. Elsevier Science. 1994.

48. Fleet ME. Carbonated Hydroxyapatite: Materials, Synthesis, and Applications. 2014.

49. Marchat D, Champion E. Ceramic devices for bone regeneration. Adv Ceram Biomater [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 19 mai 2019]. p. 279-311. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081008812000087

50. Jégoux F, Goyenvalle E, Cognet R, Malard O, Moreau F, Daculsi G, et al. Reconstruction of irradiated bone segmental defects with a biomaterial associating MBCP+(R), microstructured collagen membrane and total bone marrow grafting: an experimental study in rabbits. J Biomed Mater Res A. 2009;91:1160-9.

51. Jégoux F, Goyenvalle E, Cognet R, Malard O, Moreau F, Daculsi G, et al. Mandibular segmental defect regenerated with macroporous biphasic calcium phosphate, collagen membrane, and bone marrow graft in dogs. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;136:971-8.

52. Malard O, Espitalier F, Bordure P, Daculsi G, Weiss P, Corre P. Biomaterials for tissue reconstruction and bone substitution of the ear, nose and throat, face and neck. Expert Rev Med Devices. 2007;4:729-39.

53. Espitalier F, Vinatier C, Lerouxel E, Guicheux J, Pilet P, Moreau F, et al. A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. Biomaterials. 2009;30:763-9.

54. Corre P, Merceron C, Longis J, Khonsari RH, Pilet P, thi TN, et al. Direct comparison of current cell-based and cell-free approaches towards the repair of craniofacial bone defects – A preclinical study. Acta Biomater. 2015;26:306-17.

55. Moore DC, Chapman MW, Manske D. The evaluation of a biphasic calcium phosphate ceramic for use in grafting long-bone diaphyseal defects. J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc. 1987;5:356-65.

56. Nery EB, Eslami A, Van Swol RL. Biphasic calcium phosphate ceramic combined with fibrillar collagen with and without citric acid conditioning in the treatment of periodontal osseous defects. J Periodontol. 1990;61:166-72.

57. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. J Orthop Res. 1989;7:568-78.

58. Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, Inboue K, Senpuku N, Tamai S, et al. Bone formation processin porous calcium carbonate and hydroxyapatite. J Biomed Mater Res. 1992;26:885-95.

59. Bansal S, Chauhan V, Sharma S, Maheshwari R, Juyal A, Raghuvanshi S. Evaluation of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate mixed with bone marrow aspirate as a bone graft substitute for posterolateral spinal fusion. Indian J Orthop. 2009;43:234-9.

60. Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. Injury. 2005;36:203-6.

61. Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwekh J, et al. Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: A biomechanical, histological, and radiographic analysis. J Orthop Res. 1996;14:351-69.

62. Kettunen J, Mäkelä EA, Turunen V, Suomalainen O, Partanen K. Percutaneous bone grafting in the treatment of the delayed union and non-union of tibial fractures. Injury. 2002;33:239-45.

63. Khanal GP, Garg M, Singh GK. A prospective randomized trial of percutaneous marrow injection in a series of closed fresh tibial fractures. Int Orthop. 2004;28:167-70.

64. Moro-Barrero L, Acebal-Cortina G, Suarez-Suarez M, Perez-Redondo J, Murcia-Mazon A, Lopez-Muniz A. Radiographic Analysis of Fusion Mass Using Fresh Autologous Bone Marrow With Ceramic Composites as an Alternative to Autologous Bone Graft: J Spinal Disord Tech. 2007;20:409-15.

65. Kapfer SC, Hyde ST, Mecke K, Arns CH, Schröder-Turk GE. Minimal surface scaffold designs for tissue engineering. Biomaterials. 2011;32:6875-82.

66. Alonso N, Tanikawa DYS, Freitas R da S, Canan, Lady, Ozawa TO, Rocha DL. Evaluation of Maxillary Alveolar Reconstruction Using a Resorbable Collagen Sponge with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Cleft Lip and Palate Patients. Tissue Eng Part C Methods. 2010;16:1183-9.

67. Balaji SM. Use of recombinant human Bone Morphogenetic Protein (rhBMP-2) in reconstruction of maxillary alveolar clefts. J Maxillofac Oral Surg. 2009;8:211-7.

68. Balaji SM. Alveolar cleft defect closure with iliac bone graft, rhBMP-2 and rhBMP-2 with zygoma shavings: Comparative study. Ann Maxillofac Surg. 2011;1:8-13.

69. Neovius E, Lemberger M, Docherty Skogh Ac, Hilborn J, Engstrand T. Alveolar bone healing accompanied by severe swelling in cleft children treated with bone morphogenetic protein-2 delivered by hydrogel. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2013;66:37-42.

70. Shields LBE, Raque GH, Glassman SD, Campbell M, Vitaz T, Harpring J, et al. Adverse Effects Associated With High-Dose Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Use in Anterior Cervical Spine Fusion: Spine. 2006;31:542-7.

71. Woo EJ. Adverse Events Reported After the Use of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. J Oral Maxillofac Surg. 2012;70:765-7.

72. Damia C, Marchat D, Lemoine C, Douard N, Chaleix V, Sol V, et al. Functionalization of phosphocalcic bioceramics for bone repair applications. Mater Sci Eng C. 2019;95:343-54.

73. Sun J-L, Jiao K, Niu L-N, Jiao Y, Song Q, Shen L-J, et al. Intrafibrillar silicified collagen scaffold modulates monocyte to promote cell homing, angiogenesis and bone regeneration. Biomaterials. 2017;113:203-16.

74. Tian T, Zhang T, Lin Y, Cai X. Vascularization in Craniofacial Bone Tissue Engineering. J Dent Res. 2018;97:969-76.

75. Tian T, Liao J, Zhou T, Lin S, Zhang T, Shi S-R, et al. Fabrication of Calcium Phosphate Microflowers and Their Extended Application in Bone Regeneration. ACS Appl Mater Interfaces. 2017;9:30437-47.

76. Weigand A, Beier JP, Hess A, Gerber T, Arkudas A, Horch RE, et al. Acceleration of Vascularized Bone Tissue-Engineered Constructs in a Large Animal Model Combining Intrinsic and Extrinsic Vascularization. Tissue Eng Part A. 2015;21:1680-94.

77. Konopnicki S, Troulis MJ. Mandibular Tissue Engineering: Past, Present, Future. J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg. 2015;73:S136-146.

78. Walthers CM, Nazemi AK, Patel SL, Wu BM, Dunn JCY. The effect of scaffold macroporosity on angiogenesis and cell survival in tissue-engineered smooth muscle. Biomaterials. 2014;35:5129-37.

79. Schipani E, Wu C, Rankin EB, Giaccia AJ. Regulation of Bone Marrow Angiogenesis by Osteoblasts during Bone Development and Homeostasis. Front Endocrinol [Internet]. 2013 [cité 8 mai 2019];4. Disponible sur: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2013.00085/abstract

80. Zigdon-Giladi H, Michaeli-Geller G, Bick T, Lewinson D, Machtei EE. Human blood-derived endothelial progenitor cells augment vasculogenesis and osteogenesis. J Clin Periodontol. 2015;42:89-95.

81. Develioğlu H, Saraydin SÜ, Bolayir G, Dupoirieux L. Assessment of the effect of a biphasic ceramic on bone response in a rat calvarial defect model. J Biomed Mater Res A. 2006;77A:627-31.

82. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. J Craniofac Surg. 1998;9:310-6.

# Axially vascularized custom-made macroporous bioceramic for the reconstruction of segmental mandibular defect: a preclinical study in sheep.

A. Paré<sup>a,b,c,d,\*</sup>, B. Charbonnier<sup>e</sup>, P. Tournier<sup>a,d</sup>, J. Veziers<sup>a,</sup> C. Vignes<sup>a</sup>, A. Ngo-Van DO<sup>a</sup>, J. Lesoeur<sup>a</sup>, F. Autrusseau<sup>a</sup>, H. Bertin<sup>d,f</sup>, G. De Pinieux<sup>b,g</sup>, G. Cherrier<sup>b,g</sup>, B. Laure<sup>b,c</sup>, J. Guicheux<sup>a,d</sup>, J.D Kün Darbois, J. Flynn<sup>a,d,h</sup>, A. Bossart<sup>a,d,h</sup>, A. Saucet<sup>a,d,h</sup>, G. Touzot-Jourde<sup>a,d,h</sup>, P. Weiss<sup>a,d</sup>, P. Corre<sup>a,d,f</sup>, D. Marchat<sup>e</sup>, O. Gauthier<sup>a,d,h</sup>

<sup>*a*</sup> INSERM, U 1229, Laboratoire Regenerative Medicine and Skeleton, RMeS, Nantes F - 44042, France

<sup>b</sup> Service de Chirurgie Maxillo faciale, Plastique et Brulés, Hôpital Trousseau, CHU de Tours, Tours F – 37000, France

<sup>c</sup> Université de Tours, UFR Médecine, F - 37000 Tours, France

<sup>d</sup> Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes F - 44042, France

<sup>e</sup> Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiose, Centre CIS, F - 42023 Saint-Etienne France

<sup>*f*</sup> Service de chirurgie Maxillo-faciale et stomatologie, CHU de Nantes, Nantes F - 44093, France

<sup>*g*</sup> Service d'Anatomo-cyto-pathologie, Hôpital Trousseau, CHU de Tours, Tours F – 37000, France

<sup>h</sup> ONIRIS Nantes-Atlantic College of Veterinary Medicine, Centre de rechecherche et d'investigation préclinique (CRIP), Nantes F - 44300, France

# \*Corresponding author:

Arnaud Paré, MD Service de Chirurgie Maxillo faciale, Plastique et Brulés, Hôpital Trousseau, CHU de Tours, Tours F – 37000, France Phone: +33 234378954 Fax: + 33 247478529 Email: <u>arnaud.pare@univ-tours.fr</u> **Funding:** This study was supported by the Fondation de L'Avenir (AP PM 17 017) and the

**Funding:** This study was supported by the Fondation de L'Avenir (AP-RM-17-017) and the Fondation des Gueules Cassées (N°66-2017).

Disclosure: No conflict of interest

#### ABSTRACT

The treatment and regeneration of massive bone defects (MBD) is still today challenging, the gold standard being autologous vascularized bone flaps. Finding alternative strategies, such as combining active substances and/or cells to improve the regenerative capacity of synthetic calcium phosphates (CaP) bioceramics would contribute to solving this reconstructive roadblock. Despite significant progresses to produce personalized solutions, a fine tuning of the composition and architecture of CaP scaffold is required, and the lack of quick revascularization up to the implant core after implantation drastically limits the clinical application of such tissue engineering approaches. Focusing on solutions directly transposable to the clinical setting, the repair of  $\approx 15$  cm<sup>3</sup> segmental mandibular defect was attempted in a large animal model (sheep, N=5) by adapting traditional surgical standard. Macroporous biphasic calcium phosphate (BCP) scaffolds with an internal gyroid structure were designed then produced through an additive manufacturing technology to perfectly match the intended mandibular segmental defect. Upon implantation, BCP scaffolds were loaded with autologous total bone marrow and were axially perfused by an arteriovenous loop. Bone regeneration was assessed after 12 weeks of implantation, focusing on the amount of newly formed bone and the bridging of the MBD. De novo bone formation was systematically observed within the scaffold macroporosity and bridging occurred in 60% of the animals. These encouraging results at such early time point indicate that pairing tailored CaP bioceramics (e.g., triply periodic minimal surfaces) and intrinsic vascularization-based surgical strategies might be a clinically relevant 1-step approach for the treatment of segmental MBD.

**Key words:** Bone tissue engineering, Mandible reconstruction, Calcium phosphates Bioceramics, Additive manufacturing, Intrinsic vascularization, Total bone marrow

#### **1. Introduction**

Currently, vascularized bone transplant (VBT) is the treatment of choice for the regeneration of large segmental mandibular defects (SMD), especially when the surrounding soft and vascularized tissues have been compromised (poor soft tissue coverage, irradiation or infection) where autologous bone graft or alloplastic implants have a high failure rate [1–3]. Despite technical improvements (e.g. harvest refinements, computer assisted surgery) [4,5] which have clearly upgraded the functional and aesthetical outcomes, the prime disadvantage of VBT is that harvesting otherwise healthy bone from patients already suffering from oncological treatment or trauma is associated with considerable morbidity [6]. This is not insignificant: patients undergoing vascularized bone transplant as part of reconstruction are hospitalized for a mean of 14.3 days longer (range, 8 to 36 days) than patients undergoing equivalent procedures without VBT [7]. Furthermore VBT procedure suffers from other limitations such as bone limited availability, anatomical mismatch between donor and recipient site that often hinder the restoration of normal function, prolonged operative time and chronic pain [8–10].

Both surgeons and researchers have been seeking for alternative strategies to VBT. Tissue engineering and cell therapies approaches, based on synthetic (e.g., calcium phosphates CaP) or natural (e.g., coral) scaffolds, have demonstrated a promising potential for the regeneration of SMD [11–14], however they are limited by the inability to maintain cell viability until the creation of an adequate vascularization when the SMD size exceeds a few centimeters [15]. The axial insertion of an arteriovenous bundle (AVB) or of an arteriovenous loop (AVL) within a synthetic bone filler has been foreseen as a promising solution for the repair of large segmental bone defect (SBD). Indeed, AVL and AVB have the ability to generate *de novo* new capillary beds by luminal sprouting, which can ensure the survival of endogenous and exogenous cells up to the center of the implant, thus supporting the growth of a new bone tissue. Tanaka et al. proved that AVL angiogenic potential was  $\approx 2$  times greater than AVB [16], nonetheless no clear consensus about which intrinsic vascularization to choose has been reached: AVL requires complex and time-consuming microsurgery, whereas AVB seems less efficient. This intrinsic vascularization strategy, often used to ectopically generate bone in animal models following the ''in vivo bioreactor concept'' [17,18] with, in view, a 2 step procedure (bone prefabrication then transplant) and have been tried in clinics in single step or 2-step interventions [19,20]. However, most of the time, the scaffolds are not geometrically and mechanically adapted to the regeneration of large SBD (e.g., CaP granules, hydrogels) even more in load bearing sites as the mandible.

Rapidly emerging in the clinical field, additive manufacturing technologies allows for the personalized production of scaffolds that perfectly match the defect geometry thereby allowing an optimal osteointegration [21–23]. In addition, controlled macroporous structures can be generated, which unveil new possibilities to stimulate the colonization and development of new tissue within the scaffold [24,25]. For instance, the large class of triply periodic minimal surfaces, such as gyroid architectures, have arisen a strong interest for bone regeneration due to their high permeability, zero mean curvature, high surface/volume ratio and high mechanical properties [26-28]. However, direct additive manufacturing processes such as selective laser sintering, robocasting, 3D-printing or stereolythography do not allow yet the production of calcium phosphates bioceramics with complex marcoarchitectures due to technical limitations (e.g., non-conductive & heat sensitive raw materials, low control on fluid deposition, high powder content slurry elaboration). To work around these technical limits, promising method based on impregnation of 3D-printed wax mold was developed for the production of CaP scaffolds of tailored composition and architecture [29,30], with an overall resolution of  $\pm 20 \,\mu m$ with respect to the CAD model, thus unveiling new prospects for the reconstruction of large SBD.

To our knowledge, previous studies have evaluated the bone regeneration of segmental mandible defect in large preclinical model (e.g., sheep, minipig, nonhuman primate, dog) using a two- step procedures (prefabrication) and/or active substances or processed cells [18,31–36]. Going further, the following pilot-study investigates the one-step regeneration of segmental mandible defect in sheep model using a custom-made BCP bioceramic loaded with total bone marrow aspirate and hosting an AVL. This will indicate if a simple combination of materials and techniques already implemented in clinics have potential for the reconstruction of large SMD in a near future – the main upgrade being the design and production of customized CaP implants.

#### 2. Material and method

# 2.1. Tailored BCP implant manufacturing

BCP bioceramic implants were produced through the impregnation of 3D-printed wax molds by a calcium phosphate suspension, as detailed in Charbonnier et al. 2016 [29]. Briefly, molds, designed as the negative structure of the intended implant were built layer by layer (25 µm thickness) with a drop on demand 3D-printer (3Z Studio, Solidscape, Multistation, Dinard).

Once printed and cleaned, molds were impregnated with a BCP ceramic powder suspension (i.e., slurry). After drying overnight at room temperature, green bodies were cleaned of all excess dried slurry using a surgical blade (Swann-Morton, UK) then heat-treated in a debinding furnace (Carbolite, UK) up to 500 °C to remove the organic substances, and finally sintered at 1100 °C for 2h under air (ramps 4 °C/min, Nabertherm LH40/14, Germany).

BCP slurry was prepared by blending 42.8% (w/w) of hydroxyapatite powder (HA,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ), 28.6% w/w of  $\beta$  tricalcium phosphate powder ( $\beta$ -TCP,  $Ca_3(PO_4)_2$ ), 27.7% (w/w) of pure water, and 0.9% (w/w) of dispersing agent ((Darvan C-N,R. T. Vanderbilt Company Inc., USA)) for 10 min at 170 rpm in a zirconia jar with 10 and 5 mm diameter zirconia balls (PM400, Retsch, Germany). Before mold impregnation, an organic binder (1.9% (w/w), Duramax B-1000, Rohmand Haas, France) was mixed to the slurries at 140 rpm for 15 min using a propeller stirrer.

HA and  $\beta$ -TCP were prepared by conventional aqueous precipitation method followed by heat-treatments to adjust their physico-chemical properties; complete method is detailed in Paré et al. 2019 [37]. Their specific surface area was adjusted between 4 and 5 m<sup>2</sup>/g.

Implants were designed from a segmental mandibular bone defect virtually created using ScanIP software (Simpleware, UK) and scanner dataset of an ewe skull export in .DICOM format (Fig. 1A). The design of the implant has been refined to allow a perfect contact between the bioceramic and the adjacent host tissues, to accommodate an arteriovenous fistula, to avoid injuring the animal with angular parts and to facilitate the work of the surgeon (e.g., holes to fix suture or plastic pins (Fig. 1B). The macroporous architecture of the implants (e. g., curvature of the ceramic surface, macropore size) was designed to promote osteogenesis and blood vessel guidance by using a gyroïd internal structure [26,38,39] with a pore volume fraction of 40% and wherein a sphere of " $800^{\circ}\mu$ m" could freely move (Fig 1C); additional information available in Paré et al. manuscript [37].

As previously stated, molds were designed as the negative of the intended bioceramics with ScanIP software (Simpleware, UK). To obtain analogous bioceramics after sintering the dimensions of the molds and the parameters of the gyroid structure were adjusted considering an isotropic shrinkage of 9.0%. (Fig 1D). Fig. 1E shows the green materials after cleaning step.

Figure 1. Segmental mandibular bone defects in sheep model, implant design and manufacturing process.



3D images derived from Simpleware CAD software of (A) the sheep head with the selection of the volume to resect, (B) the general design of the implant with the vascular axis (red arrow) and (C) this design comprising  $a \ll 800 \mu m \gg Gyroid$  unit cell with a porosity volume of 40%. Pictures of (D) the 3D printed mold before wax support removing (red material), and (E) the green material (i.e., mold impregnated with the BCP slurry and dried at room temperature overnight).

Dimensions and architectural details of the final tailored BCP implants were exactly as defined in the CAD model with deviation lower than 80  $\mu$ m. Moreover, material surface was composed of submicron-scale pores ( $\approx 10\%$  s/s, N=5) and roughness (Fig. 2).

The composition of the BCP implants was assessed at 59.4  $\pm$  0.3% of HA and 40.6  $\pm$  0.3% of  $\beta$ -TCP by means of a standard procedure based on X-ray diffraction patterns (N=3) [40]. More information about the XRD procedure is detailed in Paré et al. [37]. No other crystalline or amorphous phase was detected.

Figure 2. Custom made BCP implant.



Pictures and SEM image showing final dimensions and architecture details of the final implant.

#### 2.2. Animals

Height adult sheep were obtained from a certified breeding center (GAEC Heas, Ligné, France) and acclimatized for 2 weeks before the surgical procedure. All sheep (Vendean strain) were female aged from 4 to 7 years old with an average weight of 80 kg (75-84 kg). Five sheep were used for the *in vivo* experiments, named Sh1 to 5 hereafter, and 3 for the cadaveric study. Animal experiments were conducted according to the European directive 2010/63/EU and were approved by the French Ministry of Research and Education (APAFIS 11192) and by the Pays de la Loire Ethics Committee (France).

# 2.3. Cadaveric study

Cadaveric study was first performed to precisely define the segmental mandible defect (e.g., size, location) and to gather realistic information about the vascular anatomy of the animals. In short, the most suitable vascular axis to perform an AVL and to predict its path through the custom-made bioceramic was investigated. 6 dissections (3 right and 3 left) from 3 fresh cadaveric adult sheep were performed. Cervical approach was performed to limit the oral contamination of the surgical site. The segmental defect involved the angle of the mandible to avoid teeth removal or mucosal wound that could impede the post-operative feeding and the functional outcomes. Neck incision in submandibular region allowed well exposure and easy dissection of the facial vein (FV). Due to the absence of facial artery in sheep model, the best vascular axis was the facial transverse artery (FTA) (Fig.3A). The extremity of the FV had an average length of 12 cm with a diameter close to the FTA (3.5 and 2.5 mm respectively). The average length of FTA was 5 cm allowing the AVL creation. The FTA was placed through the masseter muscle to maintain the AVL into the mandible defect (Fig. 3B).

Figure 3. cadaveric study of the mandibular region in sheep model.



Picture showing (A) the dissection of the left mandibular region and the feasibility of the AVL using the facial vein and the facial transverse artery. (B) Schema of the AVL showing its path into the angle region within the custom made bioceramic for the segmental mandible reconstruction. Abbreviation: facial vein, FV; facial transverse artery, TFA; facial nerve, FN; parotid fascia, PF; Internal jugular vein, IJV; U, up; F, front.

# 2.4. Bone marrow harvesting

Total bone marrow (TBM) was systematically harvested under general anesthesia during the surgical procedure, at the ipsilateral side of the mandible repair. A 2 cm longitudinal incision was made in front of the iliac crest and bone was exposed. A drilling of 2 mm was done and 5 mL of TMB was aspirated from the iliac crest using a 11 gauges Jamshidi needle (COVETO, La Guyonnière, France). The volume of 5 mL was immediately and uniformly poured on the scaffold which was implanted in the mandible defect. Donor site was closed using absorbable suture for the underskin (Vicryl 2.0, Ethicon, Somerville, USA) and the skin (Vicryl 3.0, Ethicon) closure.

## 2.5. Surgery

## 2.5.1. Anesthesia

General anesthesia was performed using an intra-jugular catheter (16 gauges). A premedication with Diazepam 0,25 mg/kg (VALIUM ROCHE NDH, 5mg/mL, Roche, Bâle, swisstzerland) and Morphin 0,5 mg/kg (MORPHINE COOPER, 10mg/mL, Cooper, Melun, France) were first administered. Then, the induction was based on ketamine 3 to 5 mg/kg (IMALGENE 1000D NDV, Merial, Lyon France) and propofol 5 to 6 mg/kg (PROPOVET MULTIDOSE NDV, 10mg/mL, Zoetis, Madison, USA) followed by endotracheal intubation. During procedure. maintenance general anesthesia the of was ensured by inhalational anaesthetic sevolflurane (SEVOFLO 100%, ABBOTT, Chicago, USA), in 100% oxygen, and normal saline perfusion of 10 mL/kg/h (RINGER LACTATE NDV, BRAUN, Melsungen, Germany) was administered. Intravenous Prophylactic antibiotic therapy was given pre and per operatively with amoxicilline 20mg/kg/2h (CLAMOXYL NDV, Zoetis Madison, USA).

### **2.5.2. Surgical Procedure**

In a right lateral decubitus with head extended, the mandibular region was shaved and disinfected using Chlorexidine-ethanol (CHLOREXIDINE ALCOOLIQUE 0.5%, Gilbert, Herouville-Saint-Pierre, France). A Neck incision of 10 cm was performed in submandibular area with preservation of the facial vein. The periosteum covering the angle of the mandible

was elevated with the masseter muscle. Analogous dissection of the medial pterygoid muscle was also carried out to expose the inner part of the mandible. Before the mandibulectomy, the osteosynthesis plate (2.7 mm, Stryker France, Lyon, France) was shaped and fixation holes were drilled in the mandible to avoid postoperative malocclusion. A segmental defect of the mandible angle of 3.5 x 5.5 cm was defined using the BCP bioceramic as surgical guide and then generated (Fig. 4A) using an oscillating saw (Stryker). Extra care was provided to the inferior alveaolar pedicle to preserve it as much as possible during the osteotomy – the latter was ligated before the complete removal of the bone. SMD was then stabilized by fixing the pre-shaped rigid plate with 3 ten millimeter-screws in the holes previously created in rostral and caudal sides of the mandible respectively. The BCP bioceramic, loaded with bone marrow (Fig 4B) was placed into the segmental bone defect and stabilized by a second plate (1.5 mm, Stryker France, Lyon, France) fixed at the lower edge of the scaffold using 2 ten millimeter-screws (Fig 4C) to limit its eventual motion under loading (e.g., mastication).

The FV and the FTA were then dissected. After an intravenous injection of heparin 50UI/KG (HEPARINE CHOAY NDH, Sanofi-Aventis, Paris, France), the anastomosis was performed using 8.0 polypropylene sutures (Prolene, Ethicon) and microsurgical loops to create the AVL which was positionned in the implant gutter (Fig. 4D). A permeability test of the AVL was conducted before the closure of the operative site. The masseter and medial pterygoid muscles were sutured to the lower plate to cover the reconstruction using Vicryl 2/0. Wound was closed by a bilayer suturing of the skin using Vicryl 3.0 (Etichon) The wound was cleaned with physiologic serum and covered with dry dressing. Meloxicam 0,5 mg/kg (METACAM NDV, Boeringher, Ingelheim am Rhein, Germany) was injected at the end of the procedure and animal was extubated.

*Figure 4. Surgical procedure of Segmental mandible reconstruction using the axially vascularized custom made bioceramic.* 



Pictures of the surgery showing (A) the segmental defect involving the mandible angle, (B) the TBM harvesting extemporaneously seeded into the biocermic, (C) the mandible reconstruction using the custom-made scaffold+TBM and the rigid fixation plates, (D) the AVL within the bone construct. Abbreviation: U, up; F, front; masseter muscle, m; pterygoid muscle, p; arteriovenous loop, AVL.

# **Postoperative management**

Intramuscular Meloxicam was daily administered for 5 days (METACAM 0.5 mg/kg, Zoetis) and Fentanyl patches for 3 days (DUROGESIC NDV, 100µg/h, Janssen-Cilag, Beerse, Belgium) as analgesic treatment. Amoxicillin-clavulanic acid was also provided 8 days post operatively (SYNULOX oral suspension, 1mL/20kg, Zoetis). Feeding was based on hay and wet granules the first days. Animals returned to normal diet after two weeks. Twelve weeks after implantation, animals were sacrificed via an IV overdose of de sodium pentorbital (20 ml of DOLETHAL NDV, Vétoquinol, Magny-Vernois, France) and the half-mandibles containing

the BCP bioceramic were explanted. Permeability of the AVL was verified by irrigation of the FTA using flexible catheter (22 gauges) and saline solution.

# **Computed tomography analysis**

CT scan were performed after the removal of the rigid fixation plate (2.7 mm) from the half-mandible (Aquilion 16, Toshiba, Tokyo, Japan; scanning parameters: tube voltage 120 kV, 120 mA, 0.5 mm slice) to assess the bone formation and the osseointegration of the axially vascularized BCP bioceramics. Images were exported in .DICOM format and analyzed via Horos Software to perform multiplanar(MPR) and 3-dimensional (3D) reconstruction for morphological analyses.

#### Micro-computed tomography analysis

MicroCT analyses of the BCP bioceramics were conducted after their explantation from the half-mandibles. Qualitative analysis of the total mineral and newly formed bone contents was performed using the SkyScan-1272 high resolution 3D X-ray micro-computed tomography (micro-CT) system for small sample imaging (Brucker, Belgium). The scanner was equipped with a 20 to 100kV (10W) X-ray source and an 11 mega-pixel X-ray detector. Each sample was placed on a holder with the sagittal suture oriented parallel to the X-ray detector and scanned using a 0.11 mm Copper filter, 26-µm isotropic voxels, a 0.9° rotation step, and frame averaging of 2. For 3-D reconstruction (NRecon software, Bruker) without smoothing, a ring artifact correction beam hardening correction wand the absorption coefficient was set to 5, 10%, and from 0 to 0.0.04. Standard 3-D morphometric parameters (CTAn software, Bruker) were determined in the region of interest (ROI) put on the defect. Representative 3-D images were created using CTvox software (Bruker) for each implant to assess bone formation in control and treated animals. The overall augmented contour was evaluated in the 3D reconstructed view and calculated in CTan. Boundaries were set to standardize the region of the augmented volume to be analyzed. Bone volume (BV; mm<sup>3</sup>) was calculated as the volume occupied by bone volume within ROI (TV, mm<sup>3</sup>).

#### Histology

To observe the newly formed bone and osteoblastic cells, double staining was performed. In short, specimens were fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde and then dehydrated through a graded series of ethanol treatments. Non-decalcified bone specimens were infiltrated and embedded in glycol-methyl-methacrylate (GMMA; Technovit 9100, Kulzer, Germany). For each sample, a sagittal section was performed in vascular gutter axis of each implant using a precision saw (Isomet 1000; Buehler, Uzwill, Swiss) and serial 5µm sections were cut using a hard tissue microtome (Polycut SM 2500; Leica, Wetzlar, Germany). Sections were stained with Goldner's Masson trichrome and hematoxylin eosin safran and then examined using a light microscope (Leica-DM 4000 B, Wetzlar, Germany).

## Scanning electron microscopy

CMB were sanded using a Metaserv 2000 (Buehler, Lake Bluff, USA) and subsequently coated with gold palladium. SEM micrographs were taken using backscattered electrons at 15 kV. The surface of the implant was captured through a series of contiguous high-resolution images, and a quantitative evaluation was performed using a semiautomatic image analyzer (Quantimeter 500, Leica, Cambridge, UK). First, the contours of the defects were traced. Areas of newly formed mineralized bone, CMBs and non-mineralized tissues were identified by their grey levels and expressed as a percentage of the total defect surface. In addition, the percentage of bone in direct contact with ceramic surfaces was calculated for each condition.
#### Results

### **3.1.** Clinical follow up findings

All animals survived the surgical procedure, 5 defects were healed with the BCP bioceramic. Each sheep returned to oral feeding the day of the surgical procedure and had a good restoration of the mandible contour. During the healing period, no reconstruction or plate exposure and no abnormal findings such as inflammation, infection or separation in the surgical wound were observed in Sh1, Sh2, Sh3 and Sh4. Sh5 had ipsilateral cheek inflammation without purulent flowage or fever at 5 days post operatively. The antibiotic prophylaxis was prolonged 7 days allowing complete symptom resolve. However, at the necropsy, Sh5 presented an isolated and encapsulated abscess into the masseter muscle traducing a chronic infection. All the AVL were checked and were permeable at the sacrifice.

### 3.2. CT tomographic findings

MPR and 3D reconstructions for the morphological analysis as well as the assessment of the osseointegration are detailed in Fig. 5. CT-images showed well-positioned scaffolds and an anatomical reconstruction of the angle region in all cases. BCP bioceramics systematically had splits without displacement or loss of materials. Axial and sagittal slides showed a right osseointegration of BCP bioceramics in Sh1, Sh2 and Sh3, i.e., close contact between the bony edges and the implant. In addition, 3D analyses showed bone ingrowth from the defect rim towards the center of the implant, that partially covered the implants at their inner, outer, lower and higher edges. An abundant bone formation was observed within the internal porous network of the BCP bioceramics, in Sh4 particularly.

The bone defect of the Sh3 was slightly larger than the scaffold, limiting its contact with the caudal edge. Osseointegration was weak and limited to the rostral side without visible bone within bone construct. CT-scan images of Sh5 showed no sign of osseointegration and no visible bone into the scaffold but periosteum appositions and demineralized bone that traduced a chronic osteitis.

Figure 5. Mandible CT scan assessing of the bone healing at 12 weeks.



Axial, sagittal and 3D reconstruction images of the 5 custom-made bioceramics showing osseointergration in Sh 1,2, 3 and abundant bone formation within in the sh4 particularly.

## **3.3. Micro-CT tomographic findings**

Fig.6A shows micro-CT images of the bone formation into the five BCP bioceramics. Results were consistent with the previous observations (Fig. 6A). A bone formation was visible in Sh1, Sh2 and Sh4 which had a large amount of peripheral new bone. Bone formation was also visible within the macroporous gyroid network of these BCP bioceramics and into the higher part of the scaffold's gutter. Sh3 and Sh5 had a small amount of visible bone with inconstant and weak signs of osseointegration.

As detailed in Fig. 6B, the volumetric measurements of bone formation (BV/TV) found a rate of bone formation of 23.0%, 25.3% and 23.1% for Sh1, Sh2 and Sh4 respectively. Lower new bone formation was observed in Sh3 (18.6%) and Sh5 (17.9%).





(A) 3D reconstruction of the custom made bioceramics assessing the osseointegration and the newly formed bone in the bone constructs. A lateral view (up) is represented with a white line corresponding to the axial slice (below.) New bone is represented in orange and the biomaterial in blue. (B) graph showing the quantitative analysis of the bone formation (BV, mm<sup>3</sup>) in the region of interest (TV, mm<sup>3</sup>) Abbreviation: Sheep, Sh; bone volume, BV; tissue volume, TV.

### 3.4. Histomorphometric findings

HES staining and SEM analysis are displayed in the Fig. 7. Abundant amount of new bone was identified in Sh2 and Sh4 particularly. New bone was observed from the edges of the host bone toward the center of BCP bioceramic (gutter region) enhancing the osteoconduction as well as their osseointegration (Fig.7A and 7B). Endochondral ossification (immature bone) and mature bone were both observed in the bone construct. No bone marrow niche was observed at 12 weeks. High magnification images revealed a large amont of blood vessels within the scaffold macroporous network surrounded newly formed bone (Fig 7B and 7C). The rest of the bioceramics was filled by fibrovascular tissue. A low amount of bone was observed in Sh1, with a lesser contact at the caudal edge than the rostral side. Some new bone areas were visible at the center of the bone construct. A small amount of new bone was visible in the scaffold of Sh3 which had a low osseointegration with a poor contact to the caudal mandible edge where the space was mainly filled by fibrous tissue. However, some areas of the new formed bone tissue are immature, especially at the rostral edge. Very small amount of new bone was observed in the scaffold of Sh5 as well as a weak osseointegration. At higher magnification, an important plasmocytic colonization and micro abscesses traduced the infection of the bone construct.

SEM analysis confirmed the IHC observations on osseointegration and bone formation (Fig. 7D and 7E). The quantification of the mineral contents showed a proportion of new bone in Sh1, Sh2 and Sh4 of 10.2%, 20.5% and 36.5% respectively (fig. 7F). Endochondral ossification was not visible and not assessed by the SEM quantification (Fig. 8).



Figure 7. Histological assessment of bone formation in BCP bioceramics.

(A) HES immune-staining of the bioceramic (Sc)(gray) of the Sh 2 showing formation of mature (red, lamellar ossification)) and immature (yellow, endochondral ossification)) bone arising from the mandible edges, (B) magnification x10 (large black frame) of the caudal bony edge showing osseointegration and large amount of new bone into the network of the bioceramic, (C) magnification x50 (small black frame) showing the vessel formation and the surrounding new bone (orange) and fibrovascular tissue (pink). (D) SEM Image of the Sh4 showing the bone formation within the scaffold network toward the center and the peripheral osseointegration, (E) magnification of the gutter region showing abundant bone formation and (F) Quantitative analysis of the mineral contents of the 5 BCP bioceramics showing an higher proportion of new bone in Sh2 (20,5%) and Sh4 (36,5%). Abbreviation: rm, rostral mandible edges; cm, caudal mandible edge; BMP scaffold, Sc; Ft, fibrovascular tissue; endochondral ossification, EO; bone, Bo; Vessel formation, V.

figure 8. Comparison of IHC HES staining and SEM analysis in Sh 1, 3 and 5.



(A) IHC of the sh1 showing higher osseointegration at the rostral edge, and mature (red) and immature (yellow) bone formation into the BCP bioceramic, (B) image from the Sh 3 showing poor contact between the BCP bioceramic and the mandible edges with low bone formation into the scaffold and higher formation of fibrous tissues, (C) assessment of the Sh5 showing the small amount of bone, the poor osteointegration and the infection process. SEM images corresponding to the IHC views of (D) Sh1, (E) Sh3 and (F) Sh5 with magnification showing the new bone formation and the no visible immature bone. Abbreviation rm, rostral mandible edges; cm, caudal mandible edge; BMP scaffold, Sc; Ft, fibrovascular tissue; endochondral ossification, EO; bone, Bo; abscess, Ab; Plasmocytic infiltration, P.

#### Discussion

In this study, a single-step procedure to repair a segmental mandible defect using axially vascularized custom made macroporous bioceramic combined with TBM aspirate in large animal model was investigated. Promising results in terms of bone regeneration and scaffold osseointergation with good functional and cosmetic outcomes were observed.

Custom-made bioceramic implants in BCP (59% HA and 41%  $\beta$ -TCP, w/w) with a gyroïd macroporous structure (40% porosity volume, "800  $\mu$ m » macropore size) were successfully made ant they actually helped avoid hurting animals, to facilitate the handling by surgeon, to promote the vessel guidance, the osteoconductive features and the osseointegration. Additionally, to ensure oxygen and nutrient supply, we opted for the inclusion of an AVL into the BCP bioceramic. Indeed, the use of intrinsic vascularization have shown to promote angiogenesis and bone formation in the center of largest bone constructs with also promising results in compromised clinical scenarios with low vascular or healing potential (e.g, irradiated tissues) [15,41–45]. Indeed, Extrinsic vascularization is suitable for perfusion of a 2-3 mm thick tissue while intrinsic vascularization aims to contend the cell hypoxia that could compromise bone tissue formation in the deep part of the scaffold [41,42].

Two main options of axially vascularized scaffold have been described for mandible reconstruction. Prelamination procedure involves the seeding of the prefabricated implant with

adjuvant (e.g, bone marrow, BMP) in vascularized ectopic site, commonly in a muscle (e,g, latissimus dorsi), to generate an extrinsic vascularized scaffold within an intrinsically vascularized territory [42,46]. Then, this vascularized scaffold is transferred with its pedicle to the bone defect area. Clinical applications have been described with successful bone formation for segmental mandible reconstruction. However, this procedure requires 2 surgical steps with a spaced-time of 7 weeks to 6 months before the transfer, and systematically induces donor site morbidity [47–49].

The second procedure entails the axial insertion of an arteriovenous bundle (AVB) or of an arteriovenous loop (AVL) within a synthetic bone filler. AVL showed valuable results in preclinical model at ectopic site or for non-segmental mandible reconstruction. This vascularization method lead to low donor site morbidity by simple transfer of the tissue construct with its pedicle or even a one-step procedure without donor site morbidity if the mandible defect is used as a primary recipient site as in our study [19,42,50,51].

We also opted for the extemporaneous combination of bone marrow (BM) with the BCP bioceramic to avoid preoperative in vitro procedure (e.g osteogenic cell isolation) and due to its natural contain of various chemotactic and osteogenic factors as well as mesenchymal and haematopoietic progenitor cells promoting the bone formation [52]. indeed, BM aspirate is a minimally invasive procedure and CaP materials + BM is a well-known association promoting bone formation in craniofacial area such as the mandible region [19,33,53–55]. In addition, we have previously described the potential of gyroid macropororous BCP bioceramic combined with TBM on bone regeneration in smaller animal model [37]. To completely avoid autologous harvest, we also could use others adjuvant such as BMPs widely described for mandible reconstruction [32,42,47,56]. However, BMPs procedures are expansive and can have potential severe side effects in craniofacial area. It exposed to risk of wound complication such as breakdown, infection or important local swelling with potential acute respiratory failure when it is used too close to airways [57–59]. Additionally, bone formation around the bone defect (e.g., ectopic ossification) is commonly described with BTE procedures using BMPs [60,61] that could cause uneven shape of the implant limiting the added value of a custom-made manufacture.

In our study, 3 sheep had moderate (Sh1) or poor osseointegration (Sh3 and Sh5) at 12 weeks. In Sh5, it was clearly due to a chronic infection as observed during the sacrifice (masseter muscle abscess) or histological examination (e.g., plasmocytic infiltration, micro abscesses). Surprisingly, the infection process was well tolerated without fever, feeding disorder, weight loss or materials exposure. In other cases, it was probably due to the poor contact between the bony mandible edges and the macroporous BCP bioceramic as well as the scaffold movements. Indeed, the gyroid bioceramics was designed to offer optimal osteoconductive features that required perfect contact with the host bone for osteogenic cell and vascular colonization. To resolve this problem, we could use computer assisted surgery (CAS) and personalized bony cutting guide to perform the mandibulectomies as it is routinely done in clinical settings. Indeed, CAS guides the bone excision and allows an on-measure reconstruction (e.g, osseous free flap shaping, bone drilling guides, customized fixation plates) [4,62–64]. However, adapting the BCP bioceramic for each sheep would have resulted in an additional cost and logistics for our experimental study (e.g, preoperative CT scan, cutting guide, fixation plates manufacture).

Interestingly, higher proportion of new bone was systematically observed with  $\mu$ CT compared to SEM analysis. Indeed, the immature bone and endochondral ossification were not quantifiable via SEM analysis that probably underestimated the overall new bone formation. In contrast, the ROI of the  $\mu$ CT analysis allowed a 3D overall assessment of the BCP bioceramic, and especially the surrounding bone apposition systematically observed with the CT or  $\mu$ CT scans.

Finally, histological analysis showed important amount of endochondral ossification within the BCP bioceramic as well as at the junction with the mandible edges. This observation enhanced the probable subsequent micromotions and the potential high strains levels that could trigger fibrocartilage formation [65]. It also suggested that the osseointegration and/or bone formation could not be totally achieved and should require later sacrifice for further investigation.

#### Conclusion

The first step towards the regeneration of segmental mandible defect, based on axially vascularized 3D-printed marcoporous BCP bioceramic, was reported in this pilot-study. A onestep surgical approach without any tissue transfer or donor site morbidity, making full use of a natural, dispensable and safe bioactive substance (i.e. bone marrow) and customized bioceramics, was successfully set up and should be seriously considered as a relevant alternative to the current gold standards. Safer and cheaper than other promising tissue engineering strategies based on synthetic active substances (e.g., rhBMP2) and/or 2 step surgey (e.g., preamination), the clinical potential of such an approach requires further investigations such as long-term assessment of the bone regeneration.

#### Acknowledgments

Authors would like to thank Stryker France (Lyon, France) for providing the mandibular fixation plates.

#### References

1. Kakarala K, Shnayder Y, Tsue TT, Girod DA. Mandibular reconstruction. Oral Oncol. 2018;77:111-7.

2. Tessier P, Kawamoto H, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, Wolfe SA. Complications of harvesting autogenous bone grafts: a group experience of 20,000 cases. Plast Reconstr Surg. 2005;116:72S-73S; discussion 92S-94S.

3. Pinsolle J, Majoufre C, Michelet V, Duroux S, Pinsolle V, Coustal B. [Mandibular reconstruction in oncology: discussion of indications]. Ann Chir Plast Esthet. 1995;40:358-62.

4. De Maesschalck T, Courvoisier DS, Scolozzi P. Computer-assisted versus traditional freehand technique in fibular free flap mandibular reconstruction: a morphological comparative study. Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg. 2017;274:517-26.

5. Foy J-P, Qassemyar Q, Assouly N, Temam S, Kolb F. [Harvesting technique of chimeric multiple paddles fibular flap for wide oromandibular defects]. Ann Chir Plast Esthet. 2016;61:292-7.

6. Molina CS, Stinner DJ, Obremskey WT. Treatment of Traumatic Segmental Long-Bone Defects: A Critical Analysis Review. JBJS Rev. 2014;2.

7. Pogrel MA, Podlesh S, Anthony JP, Alexander J. A comparison of vascularized and nonvascularized bone grafts for reconstruction of mandibular continuity defects. J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg. 1997;55:1200-6.

8. Ling XF, Peng X. What is the price to pay for a free fibula flap? A systematic review of donor-site morbidity following free fibula flap surgery. Plast Reconstr Surg. 2012;129:657-74.

9. Hidalgo DA, Rekow A. A review of 60 consecutive fibula free flap mandible reconstructions. Plast Reconstr Surg. 1995;96:585-96; discussion 597-602.

10. Lopez CD, Diaz-Siso JR, Witek L, Bekisz JM, Cronstein BN, Torroni A, et al. Three dimensionally printed bioactive ceramic scaffold osseoconduction across critical-sized mandibular defects. J Surg Res. 2018;223:115-22.

11. Daclusi G. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physico- chemical characterization. J Biomed Mater Res. 1989;23:883–894.

12. Daclusi G, Layrolle P. Osteoinductive properties of micro macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics. Key Eng Mater. 2004;254:1005–1008.

13. Corre P, Merceron C, Longis J, Khonsari RH, Pilet P, thi TN, et al. Direct comparison of current cell-based and cell-free approaches towards the repair of craniofacial bone defects – A preclinical study. Acta Biomater. 2015;26:306-17.

14. Konopnicki S, Troulis MJ. Mandibular Tissue Engineering: Past, Present, Future. J Oral Maxillofac Surg. 2015;73:S136-46.

15. Eweida AM, Horch RE, Marei MK, Elhammady HA, Etaby AN, Nabawi AS, et al. Axially vascularised mandibular constructs: Is it time for a clinical trial? J Cranio-Maxillofac Surg. 2015;43:1028-32.

16. Tanaka Y, Sung K-C, Tsutsumi A, Ohba S, Ueda K, Morrison WA. Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation? Plast Reconstr Surg. 2003;112:1636-44.

17. Huang R-L, Kobayashi E, Liu K, Li Q. Bone Graft Prefabrication Following the In Vivo Bioreactor Principle. EBioMedicine. 2016;12:43-54.

18. Tatara AM, Wong ME, Mikos AG. In Vivo Bioreactors for Mandibular Reconstruction. J Dent Res. 2014;93:1196-202.

19. Kokemueller H, Spalthoff S, Nolff M, Tavassol F, Essig H, Stuehmer C, et al. Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application. Int J Oral Maxillofac Surg. 2010;39:379-87.

20. Horch RE, Beier JP, Kneser U, Arkudas A. Successful human long-term application of in situ bone tissue engineering. J Cell Mol Med. 2014;18:1478-85.

21. Nishimura I. Genetic Networks in Osseointegration. J Dent Res. 2013;92:109S-118S.

22. Vandamme K, Holy X, Bensidhoum M, Logeart-Avramoglou D, Naert IE, Duyck JA, et al. In vivo molecular evidence of delayed titanium implant osseointegration in compromised bone. Biomaterials. 2011;32:3547-54.

23. Novaes AB, de Souza SLS, de Barros RRM, Pereira KKY, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration. Braz Dent J. 2010;21:471-81.

24. Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. Biomaterials. 1998;19:133-9.

25. Walthers CM, Nazemi AK, Patel SL, Wu BM, Dunn JCY. The effect of scaffold macroporosity on angiogenesis and cell survival in tissue-engineered smooth muscle. Biomaterials. 2014;35:5129-37.

26. Marchat D, Champion E. Ceramic devices for bone regeneration. Adv Ceram Biomater [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 19 mai 2019]. p. 279-311. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081008812000087

27. Blanquer SBG, Werner M, Hannula M, Sharifi S, Lajoinie GPR, Eglin D, et al. Surface curvature in triply-periodic minimal surface architectures as a distinct design parameter in preparing advanced tissue engineering scaffolds. Biofabrication. 2017;9:025001.

28. Gandy PJF, Bardhan S, Mackay AL, Klinowski J. Nodal surface approximations to the P,G,D and I-WP triply periodic minimal surfaces. Chem Phys Lett. 2001;336:187-95.

29. Charbonnier B, Laurent C, Blanc G, Valfort O, Marchat D. Porous Bioceramics Produced by Impregnation of 3D-Printed Wax Mold: Ceramic Architectural Control and Process Limitations: Porous Bioceramics Produced by Impregnation of 3D-Printed Wax Mold.... Adv Eng Mater. 2016;18:1728-37.

30. Charbonnier B, Laurent C, Marchat D. Porous hydroxyapatite bioceramics produced by impregnation of 3D-printed wax mold: Slurry feature optimization. J Eur Ceram Soc. 2016;36:4269-79.

31. Tatara AM, Shah SR, Demian N, Ho T, Shum J, van den Beucken JJJP, et al. Reconstruction of large mandibular defects using autologous tissues generated from in vivo bioreactors. Acta Biomater. 2016;45:72-84.

32. Arzi B, Verstraete FJM, Huey DJ, Cissell DD, Athanasiou KA. Regenerating Mandibular Bone Using rhBMP-2: Part 1-Immediate Reconstruction of Segmental Mandibulectomies. Vet Surg VS. 2015;44:403-9.

33. Jégoux F, Goyenvalle E, Cognet R, Malard O, Moreau F, Daculsi G, et al. Mandibular segmental defect regenerated with macroporous biphasic calcium phosphate, collagen membrane, and bone marrow graft in dogs. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;136:971-8.

34. Zhou M, Peng X, Mao C, Xu F, Hu M, Yu G. Primate mandibular reconstruction with prefabricated, vascularized tissue-engineered bone flaps and recombinant human bone morphogenetic protein-2 implanted in situ. Biomaterials. 2010;31:4935-43.

35. Terheyden H, Knak C, Jepsen S, Palmie S, Rueger DR. Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an

experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. Int J Oral Maxillofac Surg. 2001;30:373-9.

36. Terheyden H, Warnke P, Dunsche A, Jepsen S, Brenner W, Palmie S, et al. Mandibular reconstruction with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part II: transplantation. Int J Oral Maxillofac Surg. 2001;30:469-78.

37. Paré A, Charbonnier B, Tournier P, Vignes C, Veziers J, Lesoeur J, et al. Tailored 3D-printed triply periodic calcium phosphate implants: a preclinical study for craniofacial bone repair. submitted.

38. Bobbert FSL, Lietaert K, Eftekhari AA, Pouran B, Ahmadi SM, Weinans H, et al. Additively manufactured metallic porous biomaterials based on minimal surfaces: A unique combination of topological, mechanical, and mass transport properties. Acta Biomater. 2017;53:572-84.

39. Montazerian H, Davoodi E, Asadi-Eydivand M, Kadkhodapour J, Solati-Hashjin M. Porous scaffold internal architecture design based on minimal surfaces: A compromise between permeability and elastic properties. Mater Des. 2017;126:98-114.

40. Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Laval J-P. Determination of Calcium/Phosphorus Atomic Ratio of Calcium Phosphate Apatites Using X-ray Diffractometry. J Am Ceram Soc. 2004;84:359-66.

41. Weigand A, Beier JP, Hess A, Gerber T, Arkudas A, Horch RE, et al. Acceleration of Vascularized Bone Tissue-Engineered Constructs in a Large Animal Model Combining Intrinsic and Extrinsic Vascularization. Tissue Eng Part A. 2015;21:1680-94.

42. Eweida AM, Nabawi AS, Elhammady HA, Marei MK, Khalil MR, Shawky MS, et al. Axially vascularized bone substitutes: a systematic review of literature and presentation of a novel model. Arch Orthop Trauma Surg. 2012;132:1353-62.

43. Eweida AM, Nabawi AS, Marei MK, Khalil MR, Elhammady HA. Mandibular reconstruction using an axially vascularized tissue-engineered construct. Ann Surg Innov Res. 2011;5:2.

44. Arkudas A, Lipp A, Buehrer G, Arnold I, Dafinova D, Brandl A, et al. Pedicled Transplantation of Axially Vascularized Bone Constructs in a Critical Size Femoral Defect. Tissue Eng Part A. 2018;24:479-92.

45. Eweida A, Frisch O, Giordano FA, Fleckenstein J, Wenz F, Brockmann MA, et al. Axially vascularized tissue-engineered bone constructs retain their in vivo angiogenic and osteogenic capacity after high-dose irradiation. J Tissue Eng Regen Med. 2018;12:e657-68.

46. Pribaz JJ, Fine NA. Prelamination: defining the prefabricated flap--a case report and review. Microsurgery. 1994;15:618-23.

47. Warnke PH, Springer ING, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. Lancet Lond Engl. 2004;364:766-70.

48. Heliotis M, Lavery KM, Ripamonti U, Tsiridis E, di Silvio L. Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. Int J Oral Maxillofac Surg. 2006;35:265-9.

49. Orringer JS, Shaw WW, Borud LJ, Freymiller EG, Wang SA, Markowitz BL. Total mandibular and lower lip reconstruction with a prefabricated osteocutaneous free flap. Plast Reconstr Surg. 1999;104:793-7.

50. Eweida AM, Nabawi AS, Marei MK, Khalil MR, Elhammady HA. Mandibular reconstruction using an axially vascularized tissue-engineered construct. Ann Surg Innov Res [Internet]. 2011 [cité 23 mars 2019];5. Disponible sur: https://asir-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1164-5-2

51. Eweida AM, Nabawi AS, Abouarab M, Kayed M, Elhammady H, Etaby A, et al. Enhancing mandibular bone regeneration and perfusion via axial vascularization of scaffolds. Clin Oral Investig. 2014;18:1671-8.

52. Guerrero J, Oliveira H, Catros S, Siadous R, Derkaoui S-M, Bareille R, et al. The use of total human bone marrow fraction in a direct three-dimensional expansion approach for bone tissue engineering applications: focus on angiogenesis and osteogenesis. Tissue Eng Part A. 2015;21:861-74.

53. Shirasu N, Ueno T, Hirata Y, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, et al. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. Acta Histochem. 2010;112:270-7.

54. 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:e81599.

55. Jégoux F, Goyenvalle E, Cognet R, Malard O, Moreau F, Daculsi G, et al. Reconstruction of irradiated bone segmental defects with a biomaterial associating MBCP+(R), microstructured collagen membrane and total bone marrow grafting: an experimental study in rabbits. J Biomed Mater Res A. 2009;91:1160-9.

56. Ayoub A, Challa SRR, Abu-Serriah M, McMahon J, Moos K, Creanor S, et al. Use of a composite pedicled muscle flap and rhBMP-7 for mandibular reconstruction. Int J Oral Maxillofac Surg. 2007;36:1183-92.

57. Neovius E, Lemberger M, Docherty Skogh Ac, Hilborn J, Engstrand T. Alveolar bone healing accompanied by severe swelling in cleft children treated with bone morphogenetic protein-2 delivered by hydrogel. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2013;66:37-42.

58. Shields LBE, Raque GH, Glassman SD, Campbell M, Vitaz T, Harpring J, et al. Adverse Effects Associated With High-Dose Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Use in Anterior Cervical Spine Fusion: Spine. 2006;31:542-7.

59. Woo EJ. Adverse Events Reported After the Use of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. J Oral Maxillofac Surg. 2012;70:765-7.

60. Leblanc E, Trensz F, Haroun S, Drouin G, Bergeron É, Penton CM, et al. BMP-9induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment. J Bone Miner Res. 2011;26:1166-77.

61. Cipitria A, Wagermaier W, Zaslansky P, Schell H, Reichert JC, Fratzl P, et al. BMP delivery complements the guiding effect of scaffold architecture without altering bone microstructure in critical-sized long bone defects: A multiscale analysis. Acta Biomater. 2015;23:282-94.

62. Bouchet B, Raoul G, Julieron B, Wojcik T. Functional and morphologic outcomes of CAD/CAM-assisted versus conventional microvascular fibular free flap reconstruction of the mandible: A retrospective study of 25 cases. J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2018;119:455-60.

63. Paré A, Joly A, Queiros C, Goga D, Laure B. Computer-Assisted Bilateral Orbitozygomatic Reconstruction in a Patient With Treacher Collins Syndrome Using Bicortical Calvarial Graft. JAMA Facial Plast Surg. 2018;20:523-5.

64. Schlund M, Paré A, Joly A, Laure B. Computer-Assisted Surgery in Facial Bipartition Surgery. J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg. 2018;76:1094.e1-1094.e7.

65. Wazen RM, Currey JA, Guo H, Brunski JB, Helms JA, Nanci A. Micromotion-induced strain fields influence early stages of repair at bone–implant interfaces. Acta Biomater. 2013;9:6663-74.



# Titre: Caractérisation et amélioration des propriétés ostéogéniques d'un nouveau substitut osseux allogénique

**Mots clés:** déminéralisation partielle, pâte d'os allogénique, propriétés ostéogéniques, polarisation des macrophages, régénération osseuse intramembranaire

Résumé : Dans les défauts osseux de grande taille lorsque le tissu est incapable de se réparer de lui-même, la technique de régénération de référence est la greffe osseuse autologue. Néanmoins, le prélèvement d'os autologue présente des inconvénients majeurs comme le volume limité de greffon récoltable encore l'allongement du temps ou chirurgical, avec de nombreuses complications per- et post- opératoires décrites : douleurs, saignements, infections, cicatrices inesthétiques.... Parmi les alternatives à l'autogreffe, l'utilisation d'os allogénique est fiable et largement utilisé depuis des décennies. Ces greffons en blocs ou particulaires restent difficiles à utiliser des défauts osseux irréguliers ou difficiles d'accès, particulièrement en comblement osseux maxillo-faciaux ou en chirurgie dentaire post-extractionelle.

Un greffon osseux malléable sous forme de pâte a été développé par la banque d'os BIOBank grâce à une déminéralisation partielle de poudre d'os corticospongieuse. Cette pâte d'os est constituée de grains avec un centre minéralisé entouré de matrice osseuse déminéralisée, le tout baignant dans une gélatine de collagène de type I. Les objectifs de ce travail sont de caractériser et d'améliorer les propriétés ostéogéniques de cette pâte d'os allogénique. Ces propriétés ostéogéniques ont d'abord été démontrées in vitro au contact de cellules stromales mésenchymateuses et de monocytes humains, puis dans deux modèles in vivo de régénération osseuse intramembranaire, en régénération osseuse guidée et dans des défauts critiques de calvaria de rat. Enfin, l'association de nanocristaux d'hydroxyapatite à des doses croissantes à la pâte d'os dans deux modèles de défauts critiques de calvaria chez le rat n'a pas permis d'augmenter ses propriétés régénératrices où la repousse osseuse s'est montrée équivalente à celle induite par une autogreffe osseuse.

# **Title:** Characterization and improvement of the osteogenic properties of a novel allogeneic bone substitute

**Keywords:** partial demineralization, allogeneic bone paste, osteogenic properties, macrophage polarization, intramembranous bone regeneration

Abstract: In large bone defects where the tissue fails to repair itself, the "gold standard" is the bone grafting. Nevertheless, autologous the autologous bone harvesting exhibits serious drawbacks such as the limited volume harvestable or the lengthening of surgical time, with many perand post-operative complications described: pain, bleeding, infections, unsightly scars, etc..... Among the alternatives to autograft, the use of allogeneic bone is reliable and extensively used for decades. Block or particular grafts remain difficult to use irregular or hard-to-reach bone defects, especially in maxillofacial and dental post-extraction surgery. A malleable bone graft in paste form has been developed by the BIOBank bone bank through partial demineralization of cortico-spongious bone powder.

This bone paste consists of particles with a mineralized core surrounded by demineralized bone matrix, engulfed in a type I collagen gelatin. The objectives of this work are to caracterize and improve the osteogenic properties of this allogeneic bone paste. These osteogenic properties were first demonstrated in vitro in contact with mesenchymal stromal cells and human monocytes, then in two in vivo models of intramembranous bone healing, a guided bone regeneration model and a critical size defect model in rat calvaria. The combination of hydroxyapatite nanocrystals with increasing doses to the allogeneic bone paste in two models of critical size calvaria defects in rats did not increase its osteogenic properties where the bone formation was equivalent to that induced by the autologous bone graft.