



HAL
open science

Régénération des lésions osseuses maxillo-faciales : épidémiologie, stratégies innovantes au service des patients, qualité et réflexions éthiques

Damien Offner

► **To cite this version:**

Damien Offner. Régénération des lésions osseuses maxillo-faciales : épidémiologie, stratégies innovantes au service des patients, qualité et réflexions éthiques. Ingénierie biomédicale. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ094 . tel-01588277

HAL Id: tel-01588277

<https://theses.hal.science/tel-01588277>

Submitted on 15 Sep 2017

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

INSERM UMR 1109

THÈSE

présentée par :

Damien OFFNER

soutenue le : **15 décembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Sciences de la Vie & de la Santé

Spécialité : Sciences Odontologiques

**Régénération des lésions osseuses maxillo-faciales :
épidémiologie, stratégies innovantes au service des patients,
qualité et réflexions éthiques**

THÈSE DIRIGÉE PAR :

Mme MUSSET Anne-Marie

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Mme BENKIRANE-JESSEL Nadia

Directeur de recherche, INSERM UMR1109, Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. WANG Xiong

Professeur des Universités, Université de Nancy

M. HAMEL Olivier

Maître de Conférences des Universités, Université de Toulouse

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. VALCARCEL Jean

Professeur des Universités, Université de Montpellier

M. HUCK Olivier

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Remerciements

À Mme Anne-Marie Musset

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Vous m'avez toujours accordé votre plus entière confiance dans chacune de mes entreprises, et m'avez dirigé, accompagné, et soutenu de la meilleure des manières. Quel bonheur de travailler à vos côtés au quotidien ! Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude pour ces années de travail commun et d'enthousiasme, et pour celles à venir.

À Mme Nadia Benkirane-Jessel

Directeur de recherche, INSERM UMR1109, Strasbourg

La confiance que vous m'avez portée dès mon arrivée au laboratoire reflète votre optimisme et la bonne ambiance avec lesquels vous dirigez votre équipe. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères pour le temps et le travail que vous m'avez consacrés.

À M. Xiong Wang

Professeur des Universités, Université de Nancy

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et je suis très honoré de l'intérêt que vous y portez. Je vous sais très impliqué dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, et j'espère que vous trouverez dans ces pages une contribution enrichissante à la recherche dans ce domaine, et aux conditions de mise en œuvre clinique des fruits de nos recherches.

À M. Olivier Hamel

Maître de Conférences des Universités, Université de Toulouse

Vous avez porté un intérêt particulier à mes travaux dès le premier jour, au Collège de Bordeaux, intérêt qui a su motiver la poursuite de mes projets. Pour votre bienveillance et l'enthousiasme immédiat avec lequel vous avez accepté d'être rapporteur de mon travail, veuillez trouver ici l'expression de tous mes remerciements.

À M. Jean Valcarcel

Professeur des Universités, Université de Montpellier

Vous m'avez toujours apporté de précieux conseils dans mon cheminement professionnel. Pour ceux-ci, pour votre accompagnement motivant, et pour l'honneur que vous me faites en participant à ce jury, veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

À M. Olivier Huck

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Vous avez toujours fait preuve d'entrain et m'avez encouragé à aller de l'avant et à élargir mes horizons. Pour la qualité de votre expertise et pour avoir accepté de prendre part à ce jury, veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements.

à **Lucien Brisset**, merci de m'avoir transmis votre passion pour l'hygiène, d'avoir été et d'être encore un pilier solide. J'essaye chaque jour d'être à la hauteur.

à **Laetitia Keller**, merci pour la patience avec laquelle tu m'as fait progresser dès mon arrivée au laboratoire, toujours avec le sourire. J'espère avoir été digne de ta supervision. Je te souhaite une carrière à la hauteur de tout ton travail et de ton humanité.

à **Quentin Wagner**, mon compagnon de labo, merci de m'avoir accompagné dans mes premiers pas. Même si nos chemins viennent à diverger, j'espère que nous aurons encore l'occasion de collaborer, et peut-être de nous rencontrer sur un parquet.

à **Catherine-Isabelle Gros, Agnès Bertrand, Jean-Marc Fritsch, Virginie Biringer, Florence Fioretti, Fabien Bornert, Fabienne Ott, aux membres du Copil, aux assistantes dentaires du Casu, et à mes collègues de la Faculté et du Pôle**, merci pour ces bons moments de travail. Je m'y rends toujours avec le sourire, et l'atmosphère que j'y trouve me le rend formidablement bien.

à **Mme le Doyen Corinne Taddéi**, merci de me faire confiance en soutenant mon projet de carrière à vos côtés.

à **l'équipe de l'unité 1109 avec qui j'ai pu évoluer, Ysia, David, Maxi, Sabine, Arielle, Pascale et Hervé**, merci de m'avoir si bien accueilli !

aux étudiants de la faculté de chirurgie dentaire, j'espère vous apporter autant que mes prédécesseurs m'ont apporté. Merci d'être le moteur de ma volonté d'amélioration jour après jour.

à **mes patients**, les liens que j'ai pu tisser lors des consultations au cabinet ou au pôle sont la meilleure expression de la satisfaction d'exercer ce beau métier.

À ma famille : Maman, Papa, Hervé, Elodie et Antoine

... quelle chance que celle du sang soit aussi celle du cœur !

Maman et Papa,

un merci ne suffirait pas pour tout ce que vous avez fait pour moi. Il n'y a plus de nuages dans notre ciel. Les avions filent à toute vitesse, et même si vous ne choisissez pas toujours la même destination, merci de comprendre mes soleils. J'espère vous rendre chaque jour un peu plus fiers.

Hervé,

je l'ai déjà dit mais c'est chaque jour encore plus vrai : merci de me faire comprendre tous les jours de notre vie, à travers toi, le vrai sens du mot *frère*. On continue, toujours.

Elodie,

merci pour ta complicité et toute la confiance que tu me portes. Je n'aurai pas pu avoir de meilleure belle-sœur.

Antoine,

trois ans que tu rythmes mes semaines avec ton énergie intarissable. J'espère au plus profond de moi que tu sauras la diriger vers ce qui te fera avancer et te passionnera.

À tous ceux qui rendent ma vie plus belle au quotidien,

à **Serge**, tous ces partages, ces rires, cette complicité. Que jamais notre amitié ne meure.

à **Béné**, ensemble on est invincibles. Il y a des personnes qui portent chance, qui nous portent tout court. Portons-nous encore longtemps.

à **Gilles**, j'espère que nous partagerons encore longtemps des moments comme ceux qui nous appartiennent déjà. Même la distance n'y peut rien, merci pour ton amitié sincère.

à **Fred**, on s'est connu, on s'est reconnu, on s'est perdu d'vue, on s'est r'perdu d'vue, on s'est retrouvés... et maintenant on va continuer cette belle amitié !

à **Dine**, ma partenaire contractuelle ! Merci pour ta complicité, toute ta bienveillance et ton humour si... particulier.

à **Benjamin**, même à l'autre bout de l'Alsace ! Que j'aime échanger sur nos projets, sur nos vies. Ta façon de voir les choses a toujours été des plus intéressantes, et j'espère que je continuerai d'en profiter longtemps.

à **mes filleul(e)s, Mathilde, Thomas et Marianne**. Même si c'est parfois d'un œil un peu lointain, c'est un bonheur de vous voir évoluer et grandir.

à **Amandine et Albin**, de l'Amérique à l'Alsace, c'est à chaque fois comme si on s'était vu la veille. La marque des amitiés invincibles.

à **Alex, Meyline, Boulie, Steph, Maf et Elo, Grobi et Paupau, Renaud et Anne, David et Fanny, Thieumz et Isa, Chris et Ben**, et ceux de l'ESW qui rendent mes weekends ~~transpirants~~ si conviviaux et si agréables !

à **Julie**, même après nos années coloc', je nous sens encore si proches. Qu'on ne perde jamais notre lien.

à **Sandrine**, les années fac sont finies, mais on continue de partager tant de choses de nos vies. Quel plaisir de te voir et de parler avec toi encore.

à **Angela, Christelle, Vanessa, Julie, Mathou, Alicia, Marion, Léa, Vincent...** les thésards ou étudiants qui au fil du temps sont devenus des amis. Merci pour ces belles soirées, ces rires et ces confidences.

à **mes amis de Mulhouse (oui, j'ai osé ... !), Luc, Mumu, Loïc et Perrine**. Une accroche si rapide, c'est forcément que nous partageons un peu la même folie douce. Pourvu que ça dure !

à **Maxime**, avançons côte à côte, le chemin est long, j'ai de l'endurance.

à **tous ceux que je n'ai pas cités mais que je n'oublie pas...**

Je ne remercie pas les Jeux Olympiques de Rio qui se sont déroulés pile pendant l'écriture de la thèse.

Liste des abréviations

ADA	American Dental Association
ADF	Association Dentaire Française
ARS	Agence Régionale de Santé
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumine
CASU	Consultations d'Accueil Santé Urgences
CDC	United States' Center for Disease Control and Prevention
DBM	Demineralized Bone Matrix
EC	Endothelial Cell
EOH	Equipe Opérationnelle d'Hygiène
ESB	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
FAR / HPC	Flore Aérobie Revivifiable / Heterotrophic Plate Count
FDA	Food & Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
HA	Hydroxyapatite
hESC	human Embryonic Stem Cell
HOB	Human Osteoblasts
HUS	Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IGF	Insulin-like Growth Factor
INVS	Institut National de Veille Sanitaire
LBL	Layer By Layer
LDLS / WDL	Laveur-Désinfecteur-Lubrificateur-Sécheur / Washer-Disinfectant-Lubricator-Dryer

MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MSC	Mesenchymal Stem Cell
NP	NanoParticle
NR	NanoReservoir
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PERV	Porcine Endogenous Retrovirus
PFA	Paraformaldéhyde
PID / HP	Porte-Instrument Dynamique / Handpiece
PLA	Acide Polylactique
PRP	Platelet Rich Plasma
rhBMP	recombinant human Bone Morphogenetic Protein
RIA	Reamer Irrigator Aspirator
TCP	Tricalcium Phosphate
TGF	Transforming Growth Factor
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
UFC / CFU	Unité Formant Colonie / Colony-Forming Unit
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des figures

- Figure 1 :** vue d'un os en coupe
- Figure 2 :** les cellules du tissu osseux
- Figure 3 :** le cycle de remodelage osseux
- Figure 4 :** la cicatrisation osseuse
- Figure 5 :** caractéristiques du biomatériau de substitution osseuse idéal
- Figure 6 :** différentes techniques de greffe
- Figure 7 :** principe de l'ingénierie tissulaire
- Figure 8 :** le « diamond concept »
- Figure 9 :** le dispositif d'electrospinning (ou *électrofillage*)
- Figure 10 :** pincipe de la fonctionnalisation par LBL

Table des matières

Remerciements	2
Liste des abréviations.....	6
Table des figures.....	7
Table des matières	8
Liste des publications et communications	9
Introduction générale.....	14
Chapitre 1 : Etat de l’art	18
I. Le tissu osseux.....	19
A. Anatomie du tissu osseux	19
B. Cellules du tissu osseux et matrice extra-cellulaire.....	21
C. Remodelage osseux et cicatrisation osseuse.....	26
II. Greffes et biomatériaux de substitution osseuse.....	29
A. Historique et définitions	29
B. Greffes.....	33
C. Biomatériaux de substitution osseuse dérivés d’un produit biologique (décellularisé).....	36
D. Biomatériaux de substitution osseuse synthétiques.....	38
III. L’ingénierie tissulaire osseuse.....	41
A. Définitions et principes	41
B. Développement de scaffolds par électrospinning.....	43
C. Fonctionnalisation des scaffolds.....	45
Chapitre 2 : Epidémiologie concernant les traitements des lésions osseuses par greffes .	48
I. Complications d’une autogreffe osseuse, et comparaison avec une allogreffe osseuse ou l’utilisation de BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)	49

Chapitre 3 : Développement de stratégies innovantes pour la régénération osseuse, et réflexions éthiques 83

I.	Implants nanostructurés avancés combinant des cellules mésenchymateuses et des nanoparticules de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) pour une amélioration de la vascularisation de tissus provenant de l'ingénierie tissulaire.....	84
II.	Des éponges de collagène comme support de vascularisation pour la médecine régénérative osseuse.....	97
III.	Réflexions éthiques sur le développement de stratégies innovantes pour la régénération osseuse.....	117
1	Nature et obtention des cellules utilisées.....	117
2	L'expérimentation animale.....	118
3	La responsabilité du chercheur face à la société.....	120
4	Sécurité à long terme et efficacité par rapport aux techniques actuelles.....	120
5	Ethique et déontologie du chercheur.....	121
6	Conclusions.....	123

Chapitre 4 : Qualité et sécurité de la mise en œuvre clinique des implants pour la régénération osseuse..... 124

I.	L'hygiène des tuyaux d'aspiration de l'unit dentaire.....	126
II.	Le nettoyage des porte-instruments dynamiques (PID).....	133
III.	Protocole d'entretien des units et fauteuils dentaires.....	144
IV.	Contamination de l'eau des units dentaires et systèmes de désinfection en continu.....	153
V.	Motiver et remotiver l'équipe soignante d'un cabinet dentaire à l'application des mesures d'hygiène par une expérience de pensée éthique.....	174
A.	Elaboration de la méthode.....	174
B.	Evaluation de la méthode.....	179

Conclusions générales et perspectives 187

Références 191

Annexes 199

Annexe A : La stérilisation des dispositifs médicaux réutilisables : nettoyage, performances et traçabilité.....	200
---	------------

Annexe B : Guide d'entretien des units et fauteuils dentaires	203
Annexe C : Integrating Microtissue in Nanofiber Scaffolds for Regenerative Nanomedicine	223
Annexe D : Active Nanomaterials to Meet the Challenge of Dental Pulp Regeneration	228
Liste des publications et communications	239

Liste des publications et communications

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes :

A. Publications

- **Offner D.** Motiver et remotiver l'équipe soignante d'un cabinet dentaire à l'application des mesures d'hygiène par une expérience de pensée éthique. *Ethique & santé* 2013, 10:18-21
- **Offner D,** Deboscker S, Belotti L, Brisset L, Lavigne T, Musset AM. Elaboration et évaluation d'un protocole d'entretien des unités et fauteuils dentaire (ADEC® et Planmeca®) aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. *HygieneS* 2013, 21(2):21–28
- **Offner D,** Iltis L, Bertrand A, Musset AM. L'hygiène des tuyaux d'aspiration de l'unité dentaire, étude comparative de l'impact de leur structure et entretien. *L'Information Dentaire* 2015, 18:12-17
- **Offner D***, Keller L*, Wagner Q*, Eap S, Musset AM, Arruebo M, Kelm JM, Schwinté P, Benkirane-Jessel N. Integrating Microtissues in Nanofiber Scaffolds for Regenerative Nanomedicine. *Materials* 2015, 8:6863-6867
- **Offner D***, Keller L*, Schwinté P, Morand D, Wagner Q, Gros CI, Bornert F, Bahi S, Musset AM, Benkirane-Jessel N, Fioretti F. Active nanomaterials to meet the challenge of dental pulp regeneration. *Materials* 2015, 8:7461-7471
- **Offner D,** Strub M, Rebert C, Musset AM. Evaluation of an ethical method aimed at improving hygiene rules compliance in dental practice. *Am J Infect Control*, 2016 44(6):666-70
- **Offner D***, Wagner Q*, Idoux-Gillet Y*, Saleem I, Satyanarayana Somavarapu S, Schwinté P, Benkirane-Jessel N, Keller L. Nanostructured implant Combining Mesenchymal Cells and VEGF Nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization. *Nanomedicine (Lond)*, 2016 11:2419-30
- **Offner D,** Brisset L, Musset AM. Cleaning of dental handpieces : a method to test its efficiency, and its evaluation with a washer-disinfector-lubricator-dryer. *Dent Open J*, 2016 3(1):10-16
- **Offner D,** Fioretti F, Musset AM. Contamination of dental unit waterlines: assessment of three continuous water disinfection systems. *BDJ Open*, 2016, in press

* ces auteurs ont contribué de manière égale à ce travail

B. Publications soumises

- **Offner D**, Wagner Q, Keller L, Benkirane-Jessel N, Musset AM. Complications d'une autogreffe osseuse, et comparaison avec une allogreffe osseuse ou l'utilisation de BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) : une revue systématique de la littérature. Le Journal de l'Orthopédie
- **Offner D***, Wagner Q*, Benkirane-Jessel N, Keller L. Collagen sponges as a support for vascularization for bone regenerative medicine. Bio-Medical Materials and Engineering.

* ces auteurs ont contribué de manière égale à ce travail

C. Publications en préparation

- **Offner D***, Wagner Q*, Benkirane-Jessel N, Keller L. Collagen sponges functionalized with heparin and VEGF nanoreservoirs to improve the quality and speed of bone regeneration.

* ces auteurs ont contribué de manière égale à ce travail

D. Communications orales

- **Offner D**. Contamination et entretien de l'unit dentaire. Congrès international de l'ADF, Paris, Novembre 2014
- **Offner D**. Une méthode éthique pour améliorer la compliance aux mesures d'hygiène. Congrès du Collège des chirurgiens-dentistes universitaires en Santé Publique, Montpellier, Mai 2016
- **Offner D**. Elaboration and evaluation of an ethical method aimed at improving hygiene rules compliance in dental practice. 17th World Congress on Oral Health and Dental Hygiene, Orlando, Novembre 2016

E. Communications affichées

- **Offner D**, Bigeard L, Bertrand A, Musset AM. Elaboration d'un protocole d'entretien des units et fauteuils dentaires (ADEC® et Planmeca®) pour une pratique plus sécurisée. Congrès du Collège des chirurgiens-dentistes universitaires en Santé Publique, Bordeaux, Mai 2013

- **Offner D**, Ittis L, Bertrand A, Musset AM. L'hygiène des tuyaux d'aspiration de l'unit dentaire : étude comparative de l'impact de leur structure, et entretien, Congrès du Collège des chirurgiens-dentistes universitaire en Santé Publique, Nice, Juin 2014
- **Offner D**, Bertrand A, Deboscker S, Musset AM. Protocole d'entretien et gestion de l'eau des units dentaires. 37èmes Journées Nationales d'Etudes sur la Stérilisation dans les Etablissements de Santé, Centre d'Etudes et de Formations Hospitalières (CEFH), Avril 2015
- **Offner D**, Brisset L, Musset AM. Internal and external cleaning of dental handpieces: a method to test its efficiency. 16th World Sterilization Congress, Lille, Octobre 2015
- **Offner D**, Brisset L, Musset AM. Le nettoyage des porte-instruments dynamiques dentaires : une méthode pour tester son efficacité, et son évaluation avec un laveur-désinfecteur-lubrificateur-sécheur. Congrès du Collège des chirurgiens-dentistes universitaires en Santé Publique, Montpellier, Mai 2016
- **Offner D**, Brisset L, Musset AM. Cleaning of dental handpieces : a method to test its efficiency, and its evaluation with a washer-disinfector-lubricator-dryer. 17th World Congress on Oral Care and Dental Hygiene, Orlando, Novembre 2016

Introduction générale

Les lésions osseuses maxillo-faciales sont des lésions soustractives d'os centrées sur les maxillaires et pouvant avoir des prolongements dans le secteur facial. Elles peuvent s'exprimer de différentes manières et auprès de profils de patients divers, et englobent différentes étiologies [1, 2] :

- pathologiques (bactériennes, tumorales, kystiques...)
- traumatiques
- chirurgicales (résections apicales, avulsions de dents incluses)
- congénitales
- physiologiques (résorption post-extractionnelle, sénescence des tissus)

Leurs conséquences peuvent être multiples : engagement du pronostic vital dans les cas les plus graves, déficit fonctionnel (expression orale, mastication, respiration...), déficit esthétique, douleurs et traumatismes psycho-sociaux. Leur prise en charge peut faire appel à différentes spécialités, parfois regroupées en une équipe pluridisciplinaire : chirurgien maxillo-facial, chirurgien plastique, chirurgien-dentiste, oncologue, psychiatre, psychologue, orthophoniste...

La résorption osseuse des maxillaires est accompagnée de son lot de difficultés lorsqu'il s'agit de réhabilitation prothétique. Le défaut osseux peut empêcher la pose d'implants du fait d'un moindre volume osseux de support, et puisqu'il peut créer une proximité accentuée avec des obstacles anatomiques (nerfs, fosses nasales, sinus) [3]. En outre, la résorption osseuse centripète au maxillaire et centrifuge à la mandibule amène à un décalage des bases osseuses maxillaires et mandibulaires qui rend la réhabilitation amovible plus complexe à mettre en oeuvre [4].

Que ce soit en orthopédie ou en chirurgie dentaire, le vieillissement de la population amène inévitablement une réduction de la quantité et de la qualité du tissu osseux, et des handicaps divers en découlent. L'amélioration des techniques de réhabilitation bucco-dentaire a emmené avec elle une amélioration parallèle de techniques de réparation osseuse. L'objectif en est de favoriser une néoformation osseuse. Ces techniques se déclinent en l'utilisation de greffes (autogreffes, allogreffes, xéno-greffes), de matériaux de substitution osseuse, ou bien par le biais du développement de l'ingénierie tissulaire. Les greffes et les matériaux de substitution osseuse présentent toutefois des inconvénients mécaniques ou biologiques [5], et leur application peut s'accompagner de complications non négligeables (douleurs, infections...) [6, 7].

La médecine régénérative et plus particulièrement l'ingénierie tissulaire sont deux grandes voies visant le développement pour les technologies appliquées à la santé. La médecine

régénérative est une stratégie thérapeutique encore en cours de développement, visant à réparer une lésion ou un organe malade grâce à des cellules souches qui vont se différencier pour remplacer les tissus lésés ou malades. Les pathologies osseuses sont naturellement concernées par le développement de la médecine régénérative. Elles représentent un réel problème de santé publique aujourd'hui puisque les greffes osseuses sont les deuxièmes transplantations de tissus les plus fréquentes après les transfusions sanguines. Dans le monde, ce sont plus de deux millions de greffes osseuses qui sont réalisées chaque année [5, 8].

L'ingénierie tissulaire a été développée dans le but de régénérer partiellement ou complètement des tissus ou des organes abîmés du corps humain, notamment le tissu osseux, en implantant un tissu ou un organe de remplacement au niveau des tissus endommagés. Cette stratégie n'est applicable à l'heure actuelle que pour des lésions de petite taille, voire de taille moyenne (jusqu'à 5 cm²). Les lésions plus étendues font appel aux matériaux de substitution osseuse, ou même à la prothèse dans le cas de lésions étendues ou d'ablation d'organe.

En premier lieu, il était donc nécessaire de développer des matériaux biocompatibles, c'est-à-dire devant être acceptés par l'organisme, non toxiques et ne provoquant aucune réaction inflammatoire ou allergique. Ces matériaux biocompatibles devaient ensuite être capables d'interagir avec les cellules du patient au site de l'implantation du matériau afin d'en aider sa fonction. La nécessité de développer des biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire devenait alors une évidence.

Mon travail de thèse se positionne comme les prémices d'une solution technologique ayant pour but la régénération osseuse. L'objectif de notre travail vise l'optimisation d'un implant synthétique bioactif utilisable à l'avenir en clinique pour des applications maxillo-faciales en médecine régénérative, pour des lésions de petites à moyennes tailles (jusqu'à 5cm²), cherchant à éviter d'atteindre le stade où l'utilisation de substituts osseux ou de prothèses s'avère indispensable. Parallèlement à la régénération osseuse, mon travail de thèse comporte des volets complémentaires et nécessaires pour une valorisation technologique de ces implants osseux nanostructurés et pour une utilisation future en clinique : il s'agit d'abord de recherches épidémiologiques visant à cerner plus précisément les complications liées aux traitements actuels des lésions osseuses afin de mieux pouvoir y pallier. Il s'agit ensuite de recherches portant sur la qualité de la mise en œuvre de ces traitements. Il faut en effet pouvoir les appliquer dans les meilleures conditions d'hygiène possibles, ceci étant un pendant inévitable de leur

succès. Il y a donc ici une exigence de qualité, comme dans tout domaine de soin. Enfin, l'optimisation de ces technologies régénératives est nécessairement accompagnée de réflexions éthiques à mener afin d'une part de cadrer les pratiques, et d'autre part de s'assurer que leur développement répond bien à un réel progrès dans l'intérêt du patient.

Ainsi, le premier chapitre portera sur l'état de l'art des traitements des lésions osseuses maxillo-faciales. Nous décrirons tout d'abord le tissu osseux, sa biologie et ses mécanismes de remodelage et de réparation. Nous nous intéresserons ensuite aux différents biomatériaux de substitution osseuse (greffes, substituts naturels ou synthétiques) pour terminer par des précisions concernant l'ingénierie tissulaire osseuse.

Le deuxième chapitre consistera en une recherche épidémiologique visant à mieux cerner les complications liées à la greffe osseuse autologue, technique majoritairement utilisée pour traiter les lésions osseuses et qualifiée de « gold standard », et à les comparer aux techniques d'allogreffe ou à l'utilisation complémentaire de BMP (Bone Morphogenetic Protein).

Le troisième chapitre sera dédié à l'optimisation d'un implant synthétique bioactif utilisable à l'avenir en clinique pour des applications maxillo-faciales en médecine régénérative, et au développement de stratégies régénératives pouvant trouver leur place rapidement au sein de l'arsenal thérapeutique des soignants concernant les lésions osseuses.

Enfin, le quatrième chapitre portera sur l'élaboration de protocoles d'entretien et d'évaluation de la qualité microbiologique qu'offrent les équipements intervenant dans le traitement des lésions osseuses maxillo-faciales. Nos recherches seront axées sur les points critiques d'hygiène constitués par le système d'aspiration de l'unit dentaire, l'eau circulant dans les canalisations de celui-ci, ainsi que par le traitement des porte-instruments dynamiques. Afin de compléter le pan technique de l'optimisation des conditions de sécurité microbiologique dans lesquelles sont effectués les traitements des lésions osseuses, nos recherches se porteront enfin sur l'élaboration et l'évaluation d'une méthode éthique de motivation des personnels à l'application des mesures d'hygiène.

Chacun de ces points sera observé sous une perspective éthique, afin d'en établir les problématiques et de lancer une réflexion dirigée sur ces sujets.

Chapitre 1

Etat de l'art

I. Le tissu osseux

Le tissu osseux est le composant du squelette humain. C'est un tissu conjonctif spécialisé avec une matrice extra-cellulaire en grande majorité collagénique qui a la capacité de se minéraliser, ce qui la rend solide. Il présente 4 fonctions majeures :

- Biomécanique : sa dureté et sa résistance permettant au tissu osseux de supporter de fortes contraintes mécaniques lui confèrent un rôle de soutien du corps et autorisent la locomotion.
- Protectrice : le tissu osseux agit comme une barrière protégeant des organes vitaux tels que les poumons par l'intermédiaire de la cage thoracique, ou le système nerveux central via la boîte crânienne.
- Métabolique : constamment remanié, le tissu osseux libère et stocke en continu des sels minéraux. Ceci assure un maintien de l'homéostasie phosphocalcique, conjointement avec les reins et l'intestin.
- Hématopoïétique : le tissu osseux est le siège de l'hématopoïèse chez l'adulte qui se déroule dans la moelle osseuse. Les cellules-souches de la moelle hématopoïétique sont à l'origine des 3 lignées de globules du sang (érythrocytes, leucocytes et plaquettes).

A. Anatomie du tissu osseux

Quatre variétés anatomiques d'os sont décrites :

- Les os longs composés d'un fût central appelé diaphyse et de deux extrémités appelées épiphyses (par exemple l'humérus et le fémur).
- Les os courts (par exemple les carpes)
- Les os plats (par exemple l'os pariétal ou les omoplates)
- Les os irréguliers (par exemple le sphénoïde ou les vertèbres)

Hormis au niveau de la zone articulaire, ces os sont entourés de périoste qui est composé de deux couches : une externe et fibreuse qui est le support des nerfs et des vaisseaux ; une interne ostéogène qui contient les cellules ostéoprogénitrices. Certaines fibres de collagène de la

couche externe (fibres de Sharpey) se regroupent en faisceaux et arriment le périoste à l'os. La cavité interne est recouverte d'endoste renfermant la moelle osseuse [9]. **(fig. 1)**

A l'âge adulte, le tissu osseux le plus largement retrouvé est le tissu lamellaire. Ce dernier est organisé par des fibres de collagène prenant la forme de lamelles, et est présent dans tous les types anatomiques osseux décrits. L'architecture du tissu osseux lamellaire se distingue en :

- Tissu osseux spongieux : son architecture formée de vastes espaces médullaires, inégaux et irréguliers, ressemble à la structure d'une éponge. Il est retrouvé dans les épiphyses des os longs, ainsi qu'au centre (diploé) des os plats, courts, et irréguliers. Il constitue le corps des os maxillaires et de l'os alvéolaire. [9, 10]
- Tissu osseux compact (ou Haversien) : il doit son nom aux systèmes de Havers qui le forment, unités cylindriques osseuses nommées aussi ostéons. Ce sont des cylindres disposés parallèlement les uns aux autres, de diamètre de 0.1 à 1 mm et dont la longueur ne dépasse pas 1 cm. Le canal de Havers traverse chaque ostéon et contient les capillaires sanguins et les fibres nerveuses. Des canaux transversaux, dits de Volkmann, effectuent une anastomose entre deux canaux de Havers et la surface, ce qui rend le tissu osseux vascularisé et innervé, et permet l'apport de nutriments et l'évacuation de déchets métaboliques. Le tissu osseux compact est retrouvé dans la diaphyse des os longs, et forme aussi la corticale de l'os basal des maxillaires. [9] **(fig.1)**

L'os spongieux est moins résistant que l'os compact. La contrainte à la rupture en compression atteint 150 MPa pour ce dernier, alors qu'elle n'est que de 1 à 7 MPa pour l'os spongieux. La fraction minérale représente 70% du tissu osseux et est composée par du phosphate de calcium de structure apatitique. Les valeurs moyennes retrouvées en masse sont de 35.5% pour le Calcium, et de 18.5% pour le Phosphore.

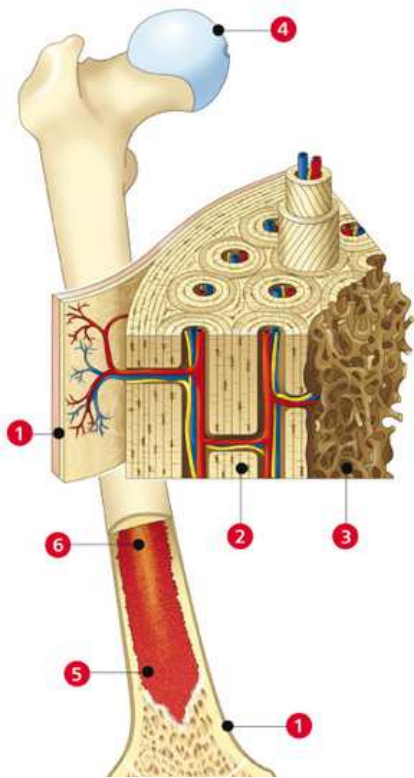


Figure 1 : vue d'un os en coupe

(source : www.lecorpshumain.fr)

1. périoste est une membrane fibreuse qui recouvre les os, à l'exception des articulations.

2. os compact, très dense et uniforme, est composé d'unités élémentaires cylindriques ou ostéones, constitués de lamelles juxtaposées comme dans un rouleau de papier.

3. os spongieux ressemble à une éponge avec ses lamelles osseuses délimitant d'innombrables cavités.

4. cartilage articulaire ou hyalin, qui recouvre les extrémités, apparaît au microscope comme une gelée rigide mais encore élastique.

5. moelle osseuse ou moelle rouge occupe toutes les cavités de l'os spongieux, produisant chaque jour 100 à 150 milliards de globules rouges et 1 à 30 milliards de globules blancs.

6. moelle jaune, masse grasseuse qui occupe le centre de la diaphyse des os longs chez l'adulte.

B. Cellules du tissu osseux et matrice extra-cellulaire

Le tissu osseux est composé de plusieurs types cellulaires que sont les ostéoclastes, les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes (**fig.2**).

1) Les ostéoclastes

Ils sont responsables de la résorption osseuse. Ce sont des cellules multinucléées dérivant de la lignée hématopoïétique monocytaire, localisées à la surface osseuse. Leur durée de vie moyenne avant apoptose est de deux semaines, et leur diamètre peut atteindre 100 μm . Afin d'amorcer les lacunes de résorption osseuse (lacunes de Howship), les ostéoclastes se lient au tissu osseux et secrètent des enzymes protéolytiques et des acides qui déminéralisent l'os et permettent au phénomène de résorption de se poursuivre. Les produits de déminéralisation seront dégradés à

l'intérieur de la cellule par les lysosomes. Les autres déchets sont relargués dans les vaisseaux sanguins voisins [11, 12, 13].

2) Les ostéoblastes

Ce sont les cellules ostéoformatrices. Elles synthétisent la matrice extra-cellulaire (MEC) comportant des fibres de collagène sous forme de lamelles ostéoïdes, et contrôlent sa calcification qui a lieu une dizaine de jours plus tard. Elles sécrètent des facteurs de croissance osseuse. Les ostéoblastes sont des cellules mononucléées de 20 µm de diamètre, de forme cubique, provenant de la différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse. Ils sont groupés en un tapis de cellules, le long du tissu osseux préexistant. Les ostéoblastes sont amenés à se transformer en ostéocytes ou en cellules à mesure que la sécrétion et la minéralisation de la MEC se poursuivent. Certains meurent par apoptose [9, 10, 14, 15]

3) Les ostéocytes

Certains ostéoblastes, enfermés dans une cavité (appelée ostéoplate) au sein de la matrice qu'ils ont synthétisée, se différencient en ostéocytes, cellules fusiformes avec une structure en étoile. Les prolongements canaliculaires qui forment les branches de cette étoile permet de relier les ostéocytes entre eux ainsi qu'aux cellules en surface (cellules bordantes et ostéoblastes). Les prolongements cellulaires sont en contact avec les vaisseaux sanguins avoisinants, ce qui permet un apport de nutriments aux cellules. Le rôle des ostéocytes est de participer au maintien des propriétés homéostatiques du tissu osseux concernant le métabolisme phosphocalcique. Ils assurent aussi le renouvellement et la maintenance de la MEC [9, 12].

4) Les cellules bordantes

Ce sont des ostéoblastes de forme allongée qui n'ont plus d'activité métabolique. Elles recouvrent la plupart des surfaces osseuses du squelette adulte lorsqu'aucun remaniement n'est actif. Elles n'ont pas d'activité de synthèse mais peuvent être réactivées en ostéoblastes actifs en cas de stimulation. Elles communiquent entre elles et avec les ostéocytes grâce à des jonctions communicantes (gap junctions) [9, 12, 16].

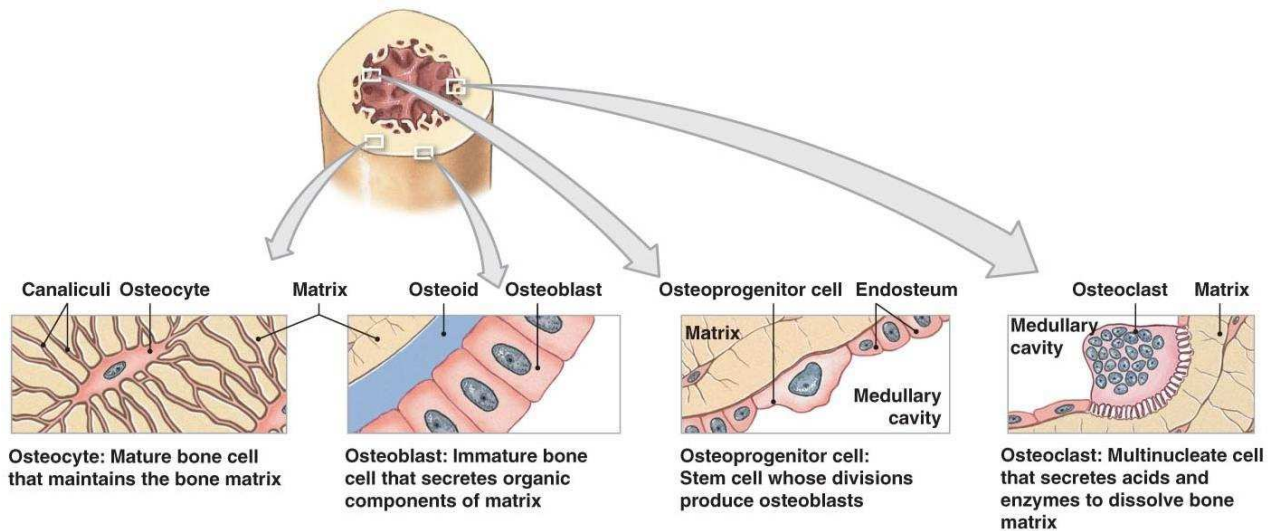


Figure 2 : les cellules du tissu osseux

(source : www.studyblue.com)

5) La matrice extra-cellulaire (MEC)

C'est une structure dure, minéralisée et extracellulaire qui entoure les ostéocytes. Elle est composée d'une phase organique conférant à l'os sa flexibilité, d'une phase minérale lui conférant sa dureté, et d'eau. Sa trame est majoritairement collagénique, et sur cette trame se déposent les minéraux inorganiques : phosphate de calcium sous forme d'hydroxyapatite et de carbonate de calcium.

Le tissu ostéoïde ou matrice organique est composé à 90% de fibres de collagène de type I, qui est une glycoprotéine. Ces fibres ont un rôle de soutien, autorisent leur minéralisation, et sont orientées selon des trajets hélicoïdaux dans l'os lamellaire. Les 10% restants sont composés d'une partie minoritaire de collagène de type III, mais surtout des glycoprotéines structurales non collagéniques, comme :

- les protéoglycanes : très hydrophiles, ils confèrent à l'os des propriétés viscoélastiques et peuvent avoir un rôle structural d'organisation des fibres de collagène.
- l'ostéocalcine : synthétisée par les ostéoblastes, elle est une protéine-marqueur de ceux-ci. Elle intervient dans le renouvellement osseux via l'activation des ostéoblastes.
- l'ostéonectine : protéine non collagénique la plus répandue dans l'os après le collagène, elle favorise la minéralisation du tissu en se liant à la fois aux fibres de collagène et aux cristaux d'hydroxyapatite.

- l'ostéopontine : elle permet aux ostéoclastes d'adhérer à la matrice, et a donc un rôle primordial dans le phénomène de résorption osseuse.

La phase minérale est composée en très grande partie par du calcium et du phosphore, principalement sous forme d'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, cristaux prenant la forme de plaques hexagonales.

6) Les facteurs de croissance

Sécrétés par les ostéoblastes et stockés dans la matrice osseuse, leur relargage pendant la phase de résorption stimule la production osseuse en agissant sur la prolifération des cellules et leur différenciation. Ce sont des peptides naturels de poids moléculaire peu élevé (6 à 30 kDa) qui se fixent sur des récepteurs spécifiques situés dans les cellules-cibles. Leur mode de diffusion est majoritairement autocrine (ils se lient aux mêmes types cellulaires qui les sécrètent) ou paracrine (ils se lient à des récepteurs de types cellulaires différents situés au voisinage) [17, 18]. Parmi ces facteurs de croissance, on retrouve :

- Le PDGF (platelet derived growth factor) : il a un effet mitogène sur les ostéoblastes mais inhibe la synthèse de collagène et accélère la résorption osseuse [19, 20]. Des études ont montré que le PDGF et l'IGF 1 ont une action symbiotique et favorisent la formation et la prolifération osseuse [21].
- L'IGF (insulin-like growth factor) : sécrétés par les ostéoblastes, IGF 1 et IGF 2 activent la prolifération des ostéoblastes, ce qui a pour but d'accroître la masse osseuse et la production de collagène [20, 22]. IGF 1 est majoritairement retrouvé au niveau des sites de fractures tandis que IGF 2 est présent en abondance dans la matrice osseuse. IGF 1 inhibe la dégradation du collagène en inhibant l'expression de la collagénase par les ostéoblastes.
- Le TGF- β (transforming growth factor) : il active la cicatrisation osseuse en favorisant la synthèse de collagène. C'est un régulateur majeur de la réplication et de la

différentiation cellulaire. Il peut aussi ralentir la résorption osseuse en inhibant la différenciation ostéoclastique [23].

- Les BMP (bone morphogenetic proteins) : ce sont des facteurs de croissance ostéo-inducteurs produits notamment par les ostéoblastes. Ils appartiennent à la superfamille des TGF- β , et interviennent dans la réparation du tissu osseux adulte. Ils favorisent la différenciation des cellules souches mésenchymateuses et peuvent à ce titre induire une néo-formation osseuse en un site non osseux (appelé site ectopique). Les BMP jouent un rôle dans le recrutement des cellules ostéoprogénitrices au niveau des sites de formation osseuse. Les BMP-2, 6 et 9 favorisent la différenciation des progéniteurs en préostéoblastes, tandis que les BMP-4 et 7 activent la différenciation des préostéoblastes en ostéoblastes. Le génie génétique a permis de synthétiser des BMP recombinantes (rhBMP-2 et rhBMP-7), qui peuvent être produites en grande quantité [24]. Cette production par voie chimique limite alors les risques de contaminations. Ces deux BMP recombinantes (rhBMP-2 et 7) sont autorisées par la FDA (Food and Drug Administration) pour des applications cliniques chez l'homme [13, 25].
- Les FGF (fibroblast growth factor) : ils favorisent la synthèse des protéines collagéniques et non collagéniques. Synthétisés notamment par les ostéoblastes et les cellules endothéliales, ils régulent l'activité des ostéoclastes par l'intermédiaire de l'ostéocalcine. FGF-1 possède une action angiogénique et stimule la formation de vaisseaux sanguins [26], alors que FGF-2 est un puissant facteur de cicatrisation osseuse. Leur action semble être dépendante de co-facteurs tels que les IGF ou TGF- β [20].

C. Remodelage osseux et cicatrisation osseuse

1) Remodelage osseux

Le tissu osseux est un tissu dynamique en remaniement constant. Ceci permet à la fois de préserver les propriétés biomécaniques de l'os, et de réguler l'homéostasie phosphocalcique. Un cycle de remodelage osseux dure entre 6 et 8 mois et se déroule en 6 étapes [27] (**fig. 3**) :

a) La phase d'activation

Elle correspond au recrutement des ostéoclastes provenant de la prolifération des cellules précurseurs, et à l'activation des cellules bordantes. Ces dernières, recouvrant la surface de l'os, empêchant les ostéoclastes d'accéder à la MEC. Leur activation par des facteurs ostéorésorbants tels que la vitamine D3 vont provoquer leur rétractation et l'adhésion des ostéoclastes à la MEC.

b) La phase de résorption

Elle correspond à l'activité des ostéoclastes et dure de 20 à 30 jours. La première étape se traduit par la dissolution de la phase minérale à l'aide d'acides, créant ainsi une lacune appelée lacune de Howship. La seconde étape est la dégradation de la matrice organique par des enzymes protéolytiques.

c) La phase d'inversion

C'est la transition entre la résorption ostéoclastique et l'apposition ostéoblastique. Les ostéoclastes se détachent de la paroi, remplacés par des macrophages qui permettent de lisser les bords de la lacune. Au fond de celle-ci, une ligne cémentante apparaît (matrice très minéralisée), témoin de l'activité de résorption qui vient de s'achever.

d) La phase de formation

Elle dure environ 5 mois. Pendant cette phase, les cellules progénitrices recouvrant la lacune se différencient en ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle MEC non minéralisée appelée tissu ostéoïde.

e) La phase de minéralisation

Elle se déroule suite au recrutement de calcium et de phosphate afin de créer des cristaux d'hydroxyapatite. Les ostéoblastes secrètent des vésicules matricielles, réservoirs de

calcium et de phosphate, ainsi que de phosphatase alcaline. C'est une enzyme qui va pouvoir libérer les ions phosphates. Ceux-ci vont se lier aux ions calcium extracellulaires recrutés par l'ostéocalcine, et les cristaux d'hydroxyapatite ainsi créés minéralisent le tissu ostéoïde en colonisant les espaces interfibrillaires.

f) La phase de quiescence

Durant cette phase, certains ostéoblastes se transforment en cellules bordantes, d'autres meurent par apoptose. Les cellules bordantes forment alors à nouveau une couche à la surface du tissu osseux qui empêche les ostéoclastes d'accéder à la MEC.

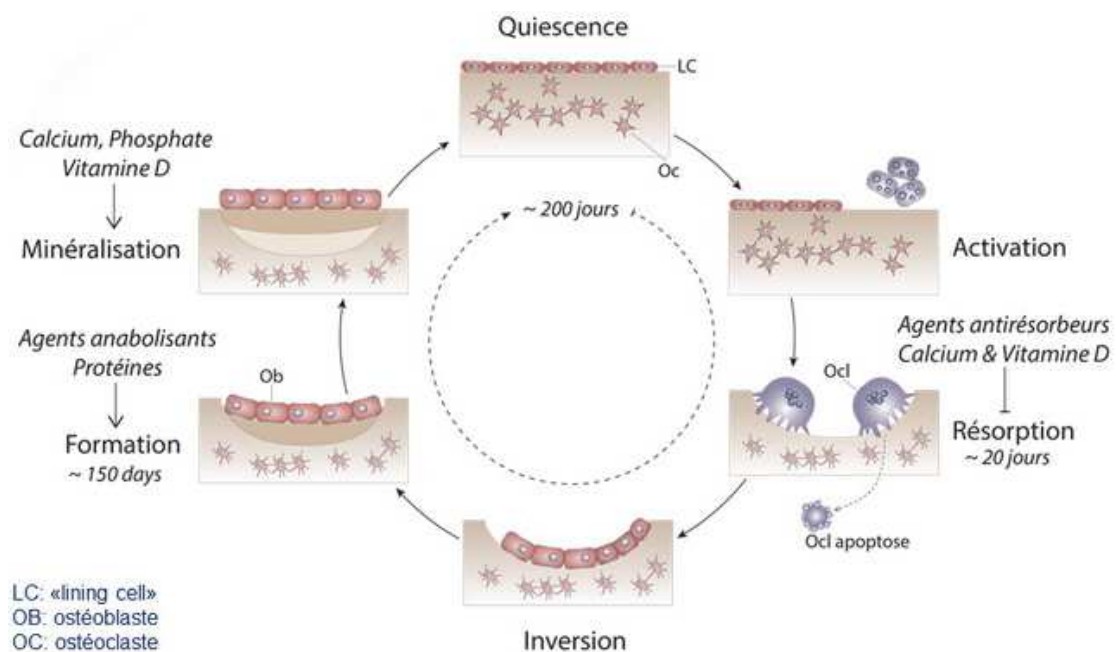


Figure 3 : le cycle de remodelage osseux

(source : Bonjour JP et al. , 2014)

2) Cicatrisation osseuse

Suite à une fracture osseuse, un phénomène physiologique de cicatrisation osseuse intervient pour réparer l'os. Dans un premier temps, un hématome apparaît au site de la fracture, accompagné d'une réaction inflammatoire locale. Afin d'éliminer les débris présents dans le tissu osseux, des macrophages et des ostéoclastes vont être recrutés via la sécrétion d'interleukines et de Tumor Necrosis Factor α (TNF α) [28].

Des facteurs de croissance (PDGF, IGF, FGF, TGF- β et BMP) sécrétés par les plaquettes jouent un rôle de recrutement et de différenciation de cellules souches mésenchymateuses [29], et des fibroblastes, chondroblastes et préostéoblastes vont alors coloniser l'hématome pour le remplacer par un cal fibro-cartilagineux. Celui-ci est petit à petit remplacé par un cal d'os spongieux et du tissu ostéoïde est créé avant d'être minéralisé. L'architecture histologique initiale de l'os sera retrouvée suite à un phénomène progressif de remodelage osseux, selon les charges et les contraintes qui lui seront appliquées [29]. (**fig.4**)

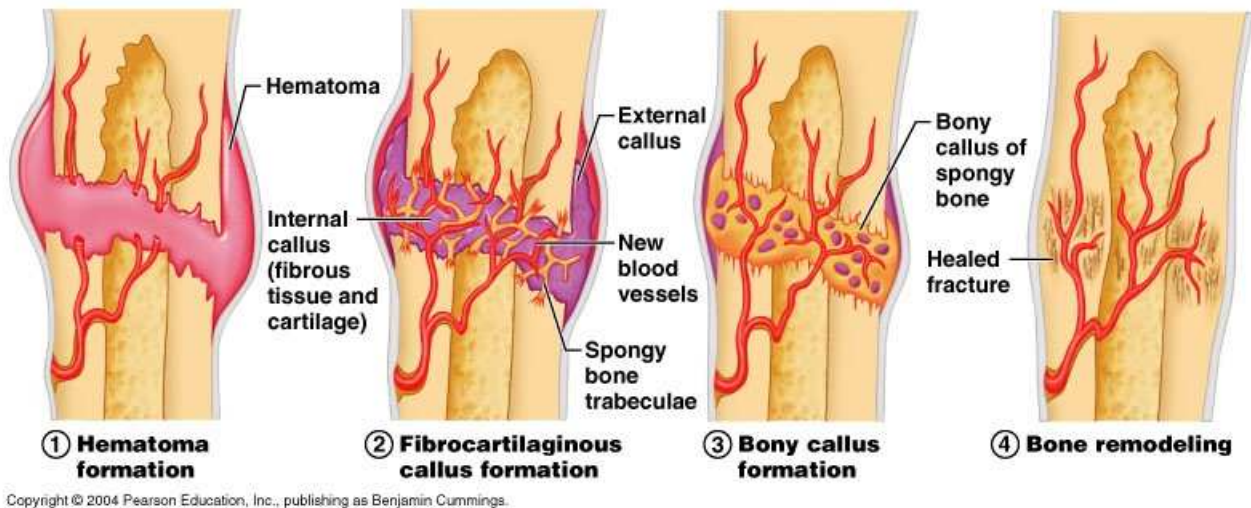


Figure 4 : la cicatrisation osseuse

(source : Benjamin Cummings, Pearson Education 2004)

II. Greffes et biomatériaux de substitution osseuse

A. Historique et définitions

L'idée de remplacer du tissu osseux manquant est très ancienne, et on en retrouve les premières traces dans les civilisations égyptiennes et précolombiennes de plusieurs siècles avant Jésus-Christ. Du bois ou de l'ivoire sont alors principalement utilisés. Ce n'est qu'au XVII^{ème} siècle que la première greffe réussie est documentée. Le chirurgien hollandais Job Van Meek' ren parvient à combler une perte de tissu osseux crânienne chez un soldat à l'aide d'un greffon d'origine animale (xénogreffe), un chien, en 1668. Le greffon doit toutefois être retiré sous les injonctions de l'Eglise. Le premier succès de greffe osseuse autologue documenté date lui de 1810, réalisé par Van Merren à Amsterdam. Des cas d'allogreffes osseuses sont aussi rapportés depuis la fin du XIX^{ème} siècle. C'est dans ce même siècle que des matériaux d'origine non osseuse sont à nouveau utilisés : c'est le retour du bois et de l'ivoire avec des résultats très peu convaincants. En 1892, Dreesman utilise du Plâtre de Paris (sulfate de calcium) et rencontre un succès thérapeutique.

L'utilisation de matériaux autres que les autogreffes et allogreffes ne s'est toutefois développé réellement que depuis moins d'un demi-siècle. [30]

1) Développement des biomatériaux de substitution osseuse

Une définition des biomatériaux a été proposée en 1986 lors de la conférence de Chester de la Société Européenne des Biomateriaux. Ce sont « des matériaux non vivants, utilisés dans un appareil médical et conçus pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'ils participent à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'un organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance fonctionnelle ». Les matériaux utilisés comme substitut osseux seront des matériaux implantables. Ceci suggère naturellement une biocompatibilité de ceux-ci, c'est-à-dire que les substituts osseux ne doivent pas provoquer de réaction inflammatoire, ni allergique, ni toxique. En 2007, l'association pour l'étude des greffes et substituts tissulaires orthopédiques de l'appareil locomoteur (GESTO) propose pour les substituts osseux la définition suivante : « tout biomatériau d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique, destiné à l'implantation chez l'homme, dans la perspective d'une reconstitution du stock osseux, et par le renforcement d'une structure osseuse ou le comblement

d'une perte de substance osseuse d'origine traumatique ou orthopédique ». Les biomatériaux utilisés comme substituts osseux ont été développés chronologiquement en trois générations :

- a) **La première génération** s'est dessinée dans les années 1960 et correspond à des matériaux bio-inertes destinés à une implantation permanente. Le défi de ces matériaux est de réduire la réponse biologique à leur contact. On s'intéresse ensuite principalement à leurs propriétés mécaniques, qui doivent être proches de celles du tissu à remplacer. L'interface biomatériau/tissu se matérialise par une fine capsule fibreuse acellulaire : l'implant n'est donc pas adhérent [31]. On peut citer comme exemple les prothèses de hanches réalisées en alumine (Al_2O_3) ou en zircone (ZrO_2).
- b) **La deuxième génération** s'est exprimée dans les années 1980. Les biomatériaux peuvent alors agir positivement avec le tissu environnant, suite aux recherches sur l'interface biomatériau/tissu. Ce sont des biomatériaux actifs qui intègrent le matériau au tissu nouvellement formé [32]. L'hydroxyapatite par exemple s'intègre parfaitement dans un environnement osseux. Elle est alors combinée comme revêtement aux parties métalliques des prothèses (hanches, genoux) par projection plasma sur la surface métallique. La surface obtenue, biologiquement active, est microporeuse et favorise la repousse osseuse.
- c) Les biomatériaux de première et deuxième génération sont utilisés comme implants stables. L'utilisation de matériaux biodégradables amène aux **biomatériaux de troisième génération**. La biodégradation est un processus de dégradation sous l'action d'enzymes, de bactéries ou par hydrolyse [33]. Ces matériaux de troisième génération sont bioactifs, biodégradables, voire cellularisés. Ils sont parfois qualifiés de biomatériaux « vivants ». Le défi de leur développement n'est plus de combler les défauts osseux, mais d'amener le tissu à se régénérer [34]. Ils correspondent donc à des supports bioactifs visant à favoriser la régénération tissulaire propre de l'hôte.

2) Caractéristiques des biomatériaux de substitution osseuse

Les biomatériaux de substitution osseuse, avec leur biocompatibilité, devraient présenter plusieurs caractéristiques pour être idéaux. Celles-ci sont : **(fig.5)**

- a) La biocompatibilité : c'est la tolérance et l'innocuité du matériau et de ses produits de dégradation au sein de milieu biologique receveur. Il s'agit du contrôle des effets du matériau sur l'hôte, et de l'hôte sur le matériau si bien qu'aucun des deux n'ait d'effet délétère (toxicité, cancérogénicité, allergie, hypersensibilité...) sur l'autre [35, 36].
- b) La porosité : c'est l'existence de volumes vides de matière au sein du biomatériau. Ces pores permettent à la fois la circulation de fluides biologiques et les échanges ioniques, ainsi que l'envahissement cellulaire et vasculaire nécessaire à l'ostéoconduction.
- c) L'ostéoconduction : c'est la capacité passive du biomatériau à favoriser la croissance osseuse par une invasion cellulaire des ostéoblastes du site receveur, ainsi que le développement d'un réseau vasculaire. Cette croissance ostéoïde est donc centripète, depuis les berges du site receveur vers le cœur de l'implant, et sera ensuite remplacée par de l'os mature [37].
- d) L'ostéoinduction : c'est la capacité active du biomatériau à induire une différenciation des cellules mésenchymateuses pluripotentes en ostéoblastes, à l'aide de facteurs de croissance appropriés (les BMP par exemple). Un matériau ostéoinducteur est donc capable d'être à l'origine d'une néoformation osseuse dans une zone ectopique [37, 38].
- e) La résorbabilité : c'est l'effet de la dissolution, de la phagocytose, et de la résorption par les cellules ostéoclastiques. La résorbabilité naturelle, ou biodégradabilité, évite au matériau de constituer un corps étranger au long terme, et permet au tissu osseux physiologique de le remplacer progressivement. La résorption ne doit pas être trop rapide pour que le matériau continue de servir de support le temps de la croissance osseuse, ni trop lente pour pouvoir disparaître totalement lors de l'organisation osseuse mature.
- f) L'état stérile : le matériau doit soit présenter un état stérile lors de son développement et une manipulation pouvant le préserver de toute contamination extemporanée, soit être traitable pour qu'il retrouve un état stérile avant utilisation. Ceci garantit grandement la sécurité de son utilisation auprès des patients.

- g) La malléabilité : elle permet la manipulation aisée du biomatériau et sa bonne adéquation avec les particularités anatomiques du site receveur, notamment pour les lésions cavitaires.
- h) La résistance mécanique : utilisé dans des zones de contraintes ou de charge, le biomatériau doit pouvoir garantir une résistance mécanique et une stabilité dimensionnelle qui assurent sa bonne tenue dans la lésion, plus particulièrement encore dans les premières semaines après l'intervention. Cette résistance et cette stabilité se font aussi à l'égard des tissus mous avoisinants, garants d'une cicatrisation de qualité.
- i) La disponibilité à coût raisonnable : c'est une caractéristique importante afin de pouvoir proposer les meilleurs traitements au plus grand nombre de patients. Cette notion d'économie de la santé rencontre le principe moral de l'utilitarisme.

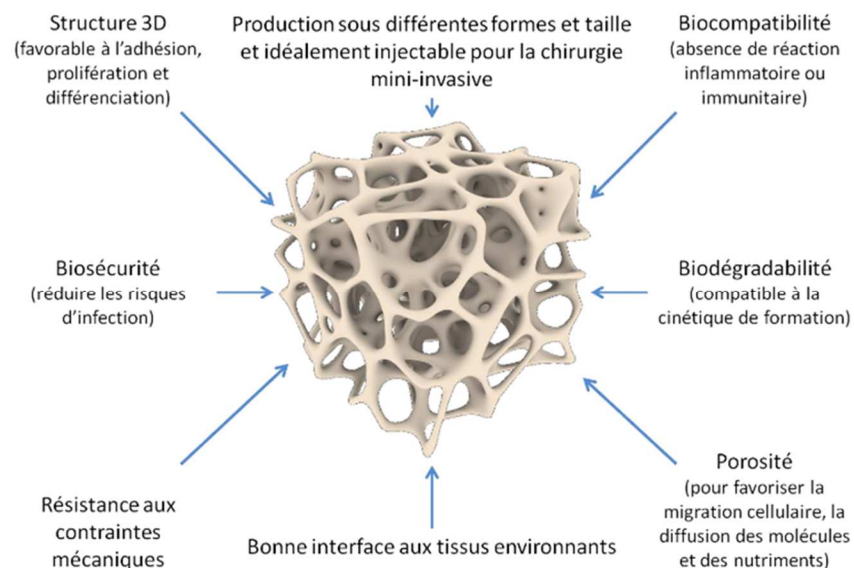


Figure 5 : caractéristiques du biomatériau de substitution osseuse idéal

(source : www.inserm.fr)

B. Greffes

Trois techniques principales de greffe peuvent être utilisées : l'autogreffe, l'allogreffe et la xéngreffe. Il en existe une quatrième, l'isogreffe, qui consiste en un greffon prélevé sur un individu différent de l'individu receveur, mais au même patrimoine génétique. Cette greffe est réalisable entre des jumeaux homozygotes, et est plutôt rare en pratique (**fig. 6**). Parfois, des techniques mixtes sont utilisées afin de gagner en volume du greffon : on peut par exemple associer du matériel xéno génique à de l'os autogène.

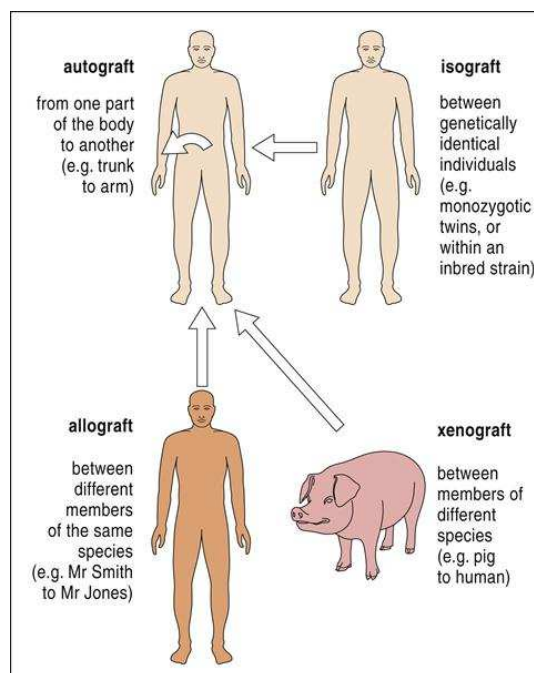


Figure 6 : différentes techniques de greffe

(source : www.clinicalgate.com)

1) Autogreffe

L'autogreffe est considérée comme le « gold standard » de la substitution osseuse [5, 39]. Elle consiste en un greffon osseux prélevé sur le même individu que le receveur, souvent au site de la crête iliaque, mais aussi à la fibula, au menton, aux côtes ou à la mandibule. Le tissu osseux récolté peut aussi l'être par un système d'alésage dans le canal intramédullaire des os longs suivi d'une aspiration (système RIA pour Reamer/Irrigator/Aspirator), mais ne présente alors

plus de fonction de support mécanique. L'autogreffe présente toutes les caractéristiques biologiques et mécaniques requises, mais présente toutefois quelques inconvénients.

a) Avantages :

- Immuno-compatibilité et élimination du risque de contamination (hors faute d'asepsie)
- Ostéoconduction, via la trame collagénique
- Ostéoinduction, via la présence de protéines et facteurs de croissance de la matrice osseuse
- Potentiel ostéogénique via la présence directe de cellules osseuses différenciées
- Bonnes propriétés mécaniques (sauf en cas d'obtention par alésage)

b) Inconvénients :

- Présence d'un site opératoire donneur secondaire
- Complications et morbidité liées à ce second site opératoire (douleurs post-opératoires, douleurs chroniques, infections, blessures neurovasculaires...)
- Temps opératoire plus long
- Limitation de la disponibilité de l'os pour les patients âgés et les enfants

2) Allogreffe

Elle consiste en un greffon provenant d'un autre individu que le receveur, mais de la même espèce que ce dernier. L'os est généralement prélevé dans les 24h après le décès de l'individu donneur et conservé dans des banques d'os. Naturellement, un risque d'infection n'est pas à écarter. Si de très rares cas documentés de transmission du VIH (2 cas depuis 1989 pour un risque de 1 sur 1.6 millions) [40, 41] ou des virus de l'hépatite B ou C (respectivement 1 cas et 2 cas depuis 1989) existent [5, 40], des cas de transmissions d'autres virus ne sont certainement pas à écarter [40, 42]. Afin de minimiser ces risques, le protocole de préparation comprend différentes précautions telles que l'exclusion des donneurs appartenant à des groupes à risque, des cultures sanguines, des sérologies VIH, hépatites et syphilis, ou l'histopathologie du tissu donneur. L'os subit ensuite des traitements de lyophilisation ou de congélation : il est déshydraté, lavé à l'éthanol et congelé à très basse température. Un rayonnement gamma assure sa stérilité. Ces techniques détruisent la totalité des cellules vivantes du greffon et suppriment son potentiel antigénique, mais en contrepartie elles lui ôtent son potentiel ostéoinducteur en éliminant les BMP, et altèrent ses propriétés mécaniques.

a) Avantages :

- Ostéoconduction
- Quantité importante disponible en une seule fois

b) Inconvénients :

- Nécessite un donneur ou une banque d'os
- Non ostéoinducteur
- Effets délétères des traitements du greffon sur les protéines osseuses et les propriétés mécaniques du greffon
- Risque infectieux potentiel
- Coût des procédures de traitement

3) Xéno greffe

Elle consiste en un greffon provenant d'une autre espèce que celle de l'individu receveur (bœuf, porc, corail...). Les techniques de préparation des greffons permettent d'éliminer la composante organique du tissu et de ne conserver que la trame minérale. La déprotéinisation supprime les protéines des xéno greffes, et par là tout leur potentiel ostéoinducteur. La stérilisation est obtenue par rayonnement gamma et le risque infectieux est alors considéré comme faible [43], même si des préoccupations existent quant au risque de transmission de zoonoses de l'animal vers l'humain telles que l'ESB (encéphalopathie spongiforme bovine) ou le PERV (rétrovirus endogène porcin) [5].

a) Avantages :

- Ostéoconduction
- Grande disponibilité
- Coût moindre
- Bons résultats en chirurgie dentaire

b) Inconvénients :

- Non ostéoinducteur
- Risque potentiel de zoonoses
- Résultats peu encourageants en orthopédie
- Probables problèmes d'acceptation par les patients

C. Biomatériaux de substitution osseuse dérivés d'un produit biologique (décellularisé)

1) Matrice osseuse déminéralisée (DBM)

Comme son nom l'indique, elle correspond à la matrice osseuse déminéralisée avec un pourcentage résiduel de calcium inférieur à 5%. La matrice collagénique mime alors l'architecture tridimensionnelle de l'os et agit comme un support pour la colonisation, la croissance, et la différenciation cellulaires, ainsi que pour le développement vasculaire.

a) Avantages :

- Ostéoconduction
- Présence de facteurs de croissance (IGF, TGF, FGF et BMP)

b) Inconvénients :

- Non ostéoinducteur
- Peu de disponibilité
- Grande variabilité du contenu en BMP [44]
- Très mauvaise résistance mécanique. Nécessité d'une association avec un support, ou utilisation en comblement de défauts lacunaires uniquement
- Peu d'études significatives sur leur utilisation seule [45]

2) Platelet rich plasma (PRP)

Partant de la richesse de facteurs de croissance contenus dans les plaquettes (PDGF, IGF et TGF notamment), le PRP est obtenu par centrifugation du sang autologue et déposé ou injecté au niveau de la blessure osseuse.

a) Avantages :

- Acquisition facile
- Biomaterériau autologue, pas de risque immunogène
- Présence de facteurs de croissance

b) Inconvénients :

- Ni ostéoconducteur, ni ostéoinducteur
- Aucune résistance mécanique
- Utilisé seulement en association avec d'autres techniques
- Résultats cliniques peu convaincants [46], pouvant être expliqués par un effet paradoxal d'inhibition des BMP-2 à haute concentration [47]

3) Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Ce sont des facteurs de croissance décrits au I.B.6) qui favorisent une différenciation des cellules mésenchymateuses pluripotentes en cellules ostéogéniques, et stimulent l'angiogenèse. Les BMP-2 et 7 sont autorisées par la FDA, mais il persiste des zones d'ombres sur leur utilisation dues à la variabilité de la dose nécessaire, patient- et site-dépendante.

a) Avantages :

- Différenciation des cellules en cellules ostéogéniques
- Stimulation de l'angiogenèse

b) Inconvénients :

- Aucune résistance mécanique
- Utilisé seulement en association avec d'autres techniques (par exemple un support de collagène)
- Coût élevé
- Effets adverses possibles liés au dosage

4) Substituts composites collagène-hydroxyapatite

Ces deux composants importants de la matrice osseuse jouent ensemble un rôle dans la différenciation ostéoblastique et accélèrent l'ostéogenèse [5]. La mimétique structurelle du biomatériau est un avantage certain pour son rôle de support de la croissance osseuse.

a) Avantages :

- Ostéoconduction
- Adhésion au rebord osseux
- Résorption lente
- Peut servir de support à l'ingénierie tissulaire
- Ductile, mise en place aisée

b) Inconvénients :

- Non ostéoinducteur
- Propriétés mécaniques limitées
- Comportement à long terme à valider par des études cliniques supplémentaires [5]

D. Biomatériaux de substitution osseuse synthétiques

1) Sulfate de calcium (dit plâtre de Paris)

Utilisé historiquement depuis très longtemps, il n'est vraiment introduit dans la pratique clinique en tant que substitut osseux qu'en 1959 avec Peltier [49]. Il a d'abord montré de bons résultats chez l'animal (souris, mouton, et chien) [50, 51] grâce à la croissance vasculaire qu'il permet liée à sa résorption. Cette dernière est toutefois trop rapide et les fluides trop riches en calcium qu'elle génère sont propices à des réactions inflammatoires.

a) Avantages :

- Résorption complète
- Coût très faible
- Malléabilité

b) Inconvénients :

- Ni ostéoconducteur, ni ostéoinducteur
- Résorption trop rapide pour servir de support tout au long du processus de formation du tissu osseux
- Réaction inflammatoire de l'hôte
- Résultats peu probants [52]

2) Ciments de phosphate de calcium

Ces substituts osseux synthétiques ont été inventés en 1986 par Chow et Brown [53]. Ils consistent en une pâte applicable dans le défaut osseux. La pâte durcit en 20 minutes et crée des nano-cristaux d'hydroxyapatite de façon isothermique et à pH physiologique.

a) Avantages :

- Ostéoconducteur
- Résorption lente et complète
- Malléabilité
- Faible coût

b) Inconvénients :

- Friabilité
- Mauvaise résistance mécanique

3) Céramiques (hydroxyapatite et phosphate tricalcique (HA+TCP))

Les substituts osseux céramiques sont généralement un mélange d'HA et de TCP. L'HA est maintenue dans les tissus pendant une période bien plus longue que le TCP qui est généralement résorbé en 6 semaines. L'HA apporte un soutien mécanique tandis que la résorption du TCP augmente la macroporosité initiale, permettant la formation osseuse au sein du biomatériau.

a) Avantages :

- Ostéoconduction
- Formes commerciales permettant différentes applications (blocs, granules, forme injectable)
- Réduction du temps opératoire et des complications post-opératoires [53]

b) Inconvénients :

- Résistance mécanique limitée et variable selon les concentrations en HA et en TCP

4) Bioverres

Ce sont des silicates couplés à du sodium, du potassium ou du lithium, qui peuvent être résorbables ou non. Une fois en place, en plus d'être ostéoconducteurs, ils créent une barrière physico-chimique retardant la migration des cellules épithéliales.

a) Avantages :

- Ostéoconductivité
- Retard de la migration épithéliale
- Résorbabilité possible

b) Inconvénients :

- Résistance mécanique limitée

5) Substituts à base de polymères

Bien qu'il existe des polymères naturels tels que le collagène, il sera question ici de polymères synthétiques. Ils peuvent être entièrement résorbables et permettent donc à l'os de remplacer à terme l'intégralité de leur volume (par exemple, l'acide polylactique PLA). Utilisés initialement comme extenseurs de greffe, des recherches sont actuellement menées sur les substituts osseux

polymériques synthétiques notamment dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. Des polyesters comme le poly-ε-caprolactone (PCL) par exemple peuvent être synthétisés en mimant la matrice collagénique, c'est-à-dire en présentant une porosité structurelle. Ils ont l'avantage d'être progressivement résorbables et de pouvoir servir de support à l'ingénierie tissulaire (fonctionnalisation par des molécules diverses, ensemencement cellulaire possible).

a) Avantages :

- Résorption progressive
- Selon les développements de l'ingénierie tissulaire, possible ostéoconductivité et ostéoinductivité
- Propriétés mécaniques meilleures par rapport aux polymères naturels

b) Inconvénients :

- Résistance mécanique limitée
- Matériaux et optimisations en cours de développement

Les biomatériaux de première et de deuxième génération ne peuvent pas prétendre à avoir les mêmes caractéristiques que le tissu à remplacer, et leur durée de vie ne dépasse souvent pas 20 ans, ce qui nécessite une réintervention chirurgicale [34]. Les allogreffes nécessitent des préparations plus longues et plus coûteuses, et parmi tous les types de greffes et de biomatériaux de substitution osseuse, on remarque que seule la greffe autogène présente toutes les caractéristiques biologiques et mécaniques requises pour être idéale, ce qui justifie sa caractérisation de « gold standard ». Elle n'est toutefois pas sans inconvénients non plus, ce qui amène les biomatériaux de troisième génération et l'ingénierie tissulaire sur le devant de la scène. Leur développement amène de grands espoirs quant à la qualité des traitements des défauts osseux, surtout parce que leur objectif n'est pas de remplacer l'os, mais de favoriser sa régénération.

III. L'ingénierie tissulaire osseuse

A. Définitions et principes

L'ingénierie tissulaire a pour objectif de restaurer, maintenir, et améliorer les fonctions tissulaires endommagées par des traumatismes ou des maladies en développant un substitut biologique [54]. Elle est à la croisée des chemins de la biotechnologie, de la science des matériaux, de la biologie cellulaire et moléculaire, de l'ingénierie, et est développée pour le domaine de la médecine et de la chirurgie.

L'ingénierie tissulaire osseuse consiste à former du tissu osseux en utilisant conjointement un biomatériau biodégradable vecteur de facteurs de croissance ou de molécules bioactives et/ou de cellules à potentiel ostéogénique. Les cellules peuvent être autologues ou allogéniques, mais ces dernières présentent des risques infectieux et immunitaires. Les cellules sont donc généralement prélevées sur le patient, etensemencées sur un support biodégradable muni des facteurs bioactifs voués à favoriser la croissance osseuse. Ce support (appelé scaffold, pour « échafaudage » en anglais) doit respecter les caractéristiques des biomatériaux visant à le rendre capable de guider la croissance et l'organisation cellulaires, de favoriser l'apport de nutriments et l'élimination des déchets, et de permettre la vascularisation et l'innervation si nécessaire. La culture des cellules est effectuée de manière extracorporelle, et une fois différenciées et aptes à synthétiser du tissu osseux, le bio-implant est implanté dans la lésion osseuse, et il se dégrade au fur et à mesure que le néotissu se forme [55] (**fig. 7**).

Ce principe est valable pour d'autres tissus que le tissu osseux, comme par exemple la peau, le cartilage, la cornée, ou le foie.

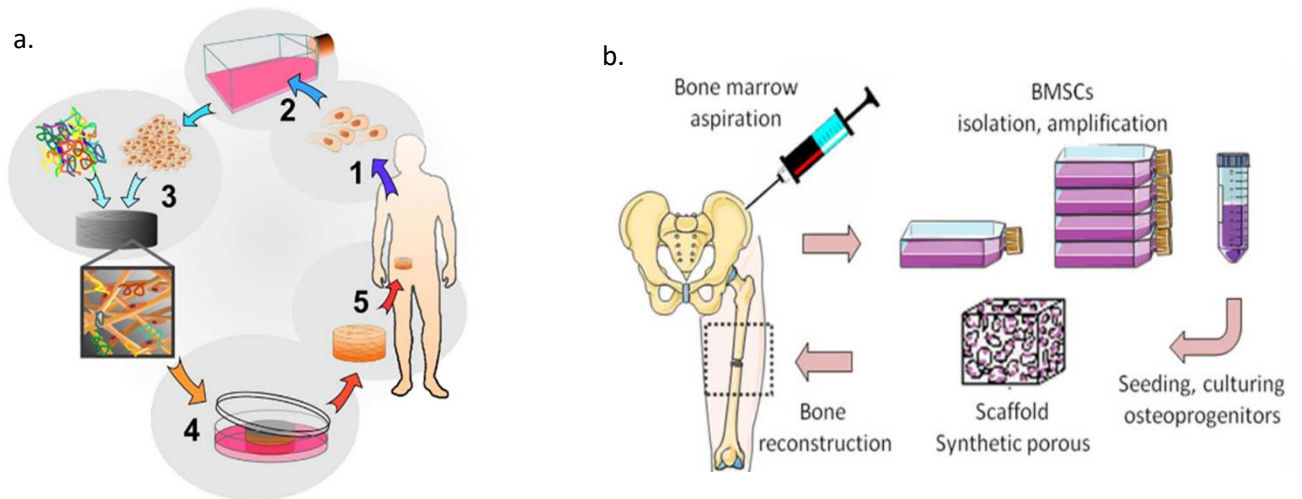


Figure 7 : principe de l'ingénierie tissulaire

(source : a. Blieterswijk & De Boer, *Tissue Engineering*, Academic Press 2014

b. www.reborne.org/introduction.html)

Selon Giannoudis et al. [56], plusieurs facteurs influent sur la régénération osseuse. Ils sont représentés dans le « diamond concept » (**fig. 8**), et le choix du scaffold ainsi que des cellules et des molécules bioactives qui lui seront adjointes se doit d'en tenir compte.

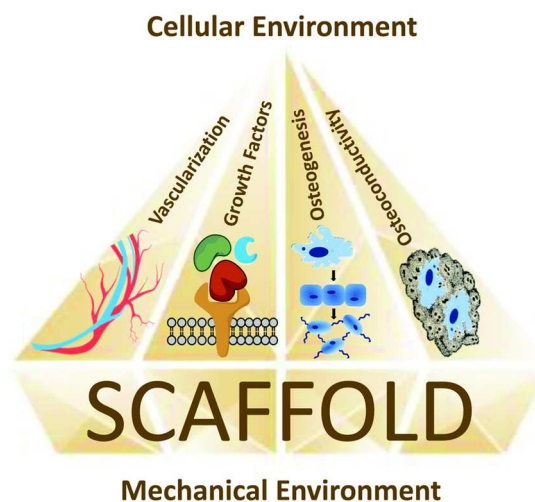


Figure 8 : le « diamond concept »

(source : Jahan K, Tabrizian M. *Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in bony defects. Biomater Sci* 2016 4(1):25-39

B. Développement de scaffolds par électrospinning

Plusieurs points apparaissent critiques dans le développement des scaffolds. Ils doivent présenter plusieurs qualités pour être utilisés en ingénierie tissulaire osseuse. Il s'agit notamment de :

- biocompatibilité et biodégradabilité
- propriétés mécaniques propres à supporter la néoformation du tissu osseux
- structure permettant l'adhésion et la prolifération cellulaire
- pores intrinsèques interconnectés pour l'acheminement des nutriments et des déchets ainsi que pour le développement vasculaire. En effet, sans vascularisation jusqu'au cœur de l'implant, les cellules qui s'y trouvent et *a fortiori* le tissu néoformé sont amenés à se nécroser.
- libération de molécules bioactives de façon contrôlée

Il existe différentes techniques de fabrication de scaffolds poreux, telles que l'émulsion lyophilisée ou la modélisation par dépôt de fil en fusion (fused-deposition modeling, ou FDM), mais seule la technique de l'électrospinning (ou « électrofilage ») parvient à fabriquer des membranes nanofibreuses et microporeuses à partir de polymères biodégradables.

1) Définition

Ce procédé « d'électrofilage » utilise les forces électriques pour créer des nanofibres de polymères microporeuses, qui se structurent en membranes. Les fibres obtenues ont un diamètre de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres. Ces fibres vont mimer la matrice collagénique du tissu osseux avec ses pores, rendant l'adhésion cellulaire favorable, ainsi que les échanges au sein du scaffold et la possibilité d'une vascularisation. Il existe plus d'une centaine de polymères que l'on peut électrospinner, et le procédé permet de déterminer l'architecture fibreuse souhaitée : fibres alignées ou désordonnées.

2) Procédé

Le dispositif se compose de plusieurs éléments (**fig. 9**) :

- Une seringue contenant le polymère sous sa forme liquide ou fondu, associé à un pousse-seringue automatisé
- Une aiguille conductrice associée à la seringue, ou reliée par un tuyau
- Une alimentation haute-tension
- Un collecteur conducteur sur lequel les fibres se déposent

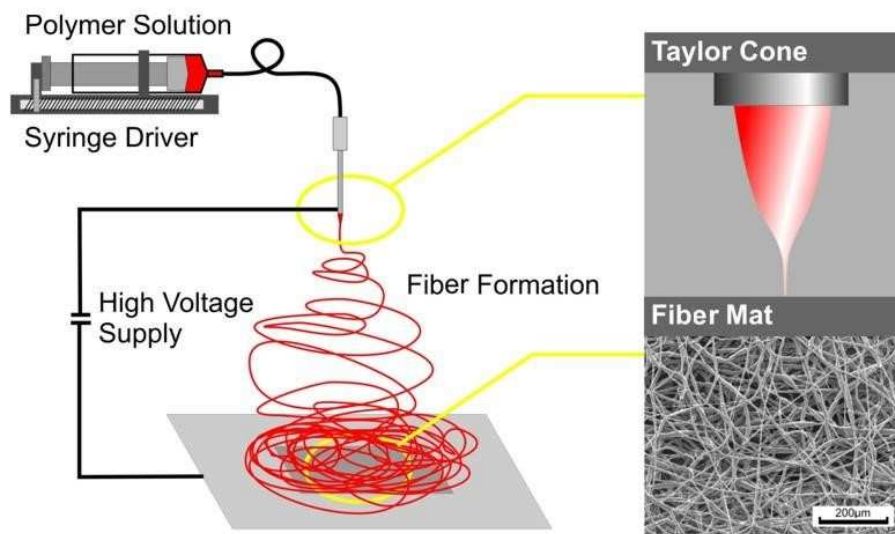


Figure 9 : le dispositif d'électrospinning (ou électrofilage)

(source : www.oxolutia.com/technology/electrospinning)

Une différence de potentiel est appliquée entre l'aiguille et le collecteur, créant un champ électrique. Ce dernier provoque une charge au niveau de la solution de polymère au sortir de l'aiguille, amenant le fluide à s'allonger et à former le cône de Taylor. Quand les forces de répulsion électrostatiques surpassent la tension de surface, un jet de polymère chargé est éjecté du cône vers le collecteur. Avant d'atteindre le collecteur, le solvant s'évapore et la fibre s'affine dans une zone d'instabilités dues aux interactions répulsives entre des charges identiques. Le jet n'est alors plus rectiligne, et cela permet à la fibre de sécher avant de se déposer sur le collecteur, de façon aléatoire ou bien de façon ordonnée selon le type de collecteur choisi [57].

C. Fonctionnalisation des scaffolds

La biocompatibilité et la biorésorbabilité étant déterminées par le choix du polymère, et la structure poreuse et biomimétique de la structure collagénique étant obtenue à l'aide de l'électrospinning, il ne reste plus au scaffold qu'à être capable de libérer des molécules bioactives de façon contrôlée.

1) Méthodes de fonctionnalisation

Des premières approches ont consisté à imbiber le scaffold d'une solution contenant les molécules bioactives désirées. Cette technique simple présente toutefois un défaut majeur : le relargage local des molécules est trop rapide et peut donc provoquer un effet de surdosage et des effets adverses [58]. D'après Seeherman et al. [59], la délivrance de la moitié de la dose absorbée en BMP se fait en 5,6 jours, ce qui est bien trop court comparé à la durée du processus intégral de régénération osseuse. Pour éviter ces effets délétères, le scaffold doit être capable de fixer les molécules et de les libérer de façon progressive et contrôlée [58, 60].

Différentes techniques existent pour intégrer les molécules bioactives et les lier aux fibres de polymère [61], parmi lesquelles :

- L'insertion de la molécule dans la solution de polymère avant électrospinning conventionnel : dans le cas de facteurs de croissance ou de molécules thérapeutiques, cette technique n'est pas envisageable car le solvant utilisé et/ou la haute tension fournie lors du procédé ne permettent pas aux molécules de résister.
- L'électrospinning co-axial qui permet, à partir de deux solutions (polymère, molécule bioactive) d'obtenir une fibre cœur (de molécule bioactive) / écorce (de polymère) : cette technique n'est pas envisageable ici pour les mêmes raisons que la précédente.
- L'insertion de la molécule par liaisons chimiques : la molécule bioactive est liée de façon covalente à la fibre électrospinnée. Il peut en résulter une modification chimique et de conformation de la molécule, ce qui peut la rendre inactive. C'est notamment le cas pour les facteurs de croissance qui doivent pouvoir se lier à des récepteurs cellulaires spécifiques.

- L'insertion de la molécule par adsorption physique : la molécule bioactive est liée à la fibre électrospinnée grâce à des liaisons de faible énergie comme les liaisons hydrophobes, de van der Waals ou des interactions électrostatiques. Ces liaisons permettent un relargage plus aisé des molécules et ne sont pas délétères quant à leur nature et leur structure. C'est donc la technique de choix pour fonctionnaliser les scaffolds.

2) La fonctionnalisation par layer-by-layer (LBL)

Dans le cadre de l'insertion de la molécule par adsorption physique, la molécule peut être intégrée à l'intérieur d'un film nanostructuré qui s'adsorbe à la surface du scaffold. Ceci permet à la fois une protection de la molécule et un meilleur contrôle de son relargage. Des interactions de faible énergie peuvent être obtenues en fonctionnalisant le matériau par des couches successives (couche par couche, ou layer-by-layer LBL) de polyélectrolytes à charges opposées, la molécule bioactive pouvant être intégrée dans l'une de ces couches. C'est Decher et al. en 1997 qui décrit cette méthode pour les électrolytes [62] (**fig. 10**).

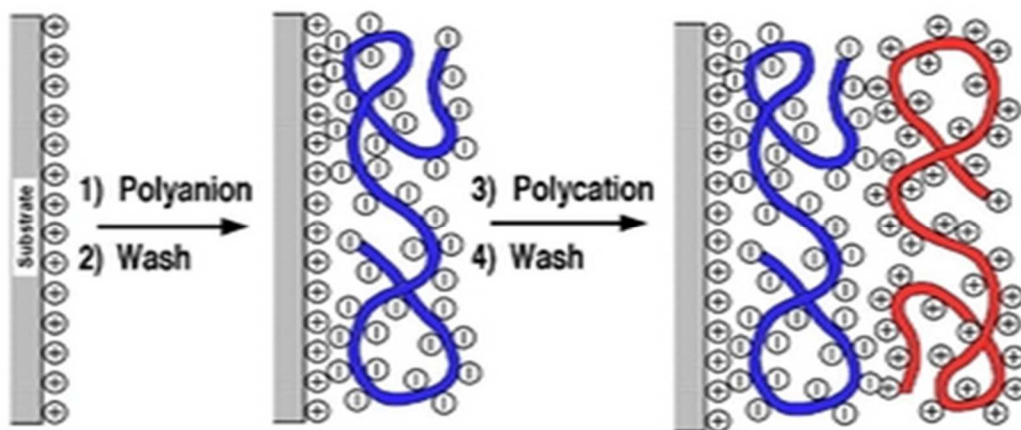


Figure 10 : principe de la fonctionnalisation par LBL

(source : Decher G, Science, 1997 [55])

Le substrat chargé est placé en contact d'une solution de charge opposée pendant quelques minutes. L'adsorption s'effectue à la surface du substrat, et les polycations ou polyanions non adsorbés sont éliminés par des rinçages successifs de quelques minutes. La surface ainsi chargée est prête à accueillir la solution suivante, de charge opposée à la première, suivi d'un rinçage et de la répétition des étapes précédentes.

Différentes méthodes permettent d'obtenir ces films multi-couches :

- Le spray-coating : il s'agit d'une nébulisation successive de solutions de polyanions et de polycations sur le substrat. C'est une technique extrêmement rapide mais qui aboutit à un taux de perte de produit conséquent, puisque 99% du polyélectrolyte est éliminé lors de la phase de rinçage [63]. Dans le cas d'intégration de facteurs de croissance dans les solutions, leur coût important ne permet pas de retenir cette technique.
- Le spin-coating : il s'agit de déposer une gouttelette de polyélectrolyte sur un substrat en rotation. Le temps de formation d'une bicouche est de l'ordre de la minute [64], mais cette méthode demande du matériel très spécifique.
- Le dip-coating : il s'agit de tremper le substrat successivement dans des solutions de polyélectrolytes de charges opposées, les trempages étant séparés par des phases de rinçage. Le temps de formation d'une bicouche est de l'ordre de 30 min. Si cette solution est la plus longue à mener à bien, c'est aussi la plus facile à mettre en œuvre.

Cette technique permet d'encapsuler la molécule bioactive dans des nano-réservoirs, et de la rendre disponibles aux cellules qui vont provoquer son relargage de façon contrôlée par dégradation, au rythme de leur prolifération au sein du scaffold. Des molécules de nature différentes peuvent ainsi fonctionnaliser le scaffold selon l'effet attendu : antibiotiques [65], facteurs de croissance [58, 66], anti-inflammatoires [67], etc.

Chapitre 2

Epidémiologie concernant les traitements des lésions osseuses par greffes

I. Complications d'une autogreffe osseuse, et comparaison avec une allogreffe osseuse ou l'utilisation de BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)

L'objectif de ce chapitre est de mieux cerner les complications liées à la greffe osseuse autologue, technique majoritairement utilisée pour traiter les lésions osseuses et qualifiée de «gold standard», et à les comparer aux techniques d'allogreffe ou à l'utilisation complémentaire de BMP (Bone Morphogenetic Protein).

Le travail effectué a consisté en une recherche épidémiologique prenant la forme d'une méta-analyse réalisée sur la base de données provenant d'une bibliographie aussi exhaustive que possible, entre 2000 et 2016.

Ce volet confirme et précise les complications liées aux greffes, et assoit la problématique générale de ce travail de thèse, à savoir de trouver des moyens pour améliorer la qualité et la sécurité du traitement des lésions osseuses, notamment dans le secteur maxillo-facial, en préservant une adéquation indispensable avec l'éthique du soin, et l'éthique de la recherche.

Ceci a donné lieu à un article soumis dans Le Journal de l'Orthopédie (**article 1**).

Complications d'une autogreffe osseuse, et comparaison avec une allogreffe osseuse ou l'utilisation de BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) : une revue systématique de la littérature

(Complications following a bone autograft, and comparison with a bone allograft or the use of BMPs (Bone Morphogenetic Proteins):
a systematic review)

(article 1, soumis dans Le Journal de l'Orthopédie)

Damien Offner^{a,b,c,}, Quentin Wagner^{a,b}, Laetitia Keller^{a,b},
Nadia Benkirane-Jessel^{a,b}, Anne-Marie Musset^{a,b,c}*

^a INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), laboratoire de 'Nanomédecine Régénérative Ostéoarticulaire et Dentaire', UMR 1109, Faculté de Médecine, F-67085 Strasbourg Cedex. FMTS

^b Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 8 rue Ste Elisabeth, F-67000 Strasbourg

^c Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), 1 place de l'Hôpital, F-67000 Strasbourg

* Correspondance should be addressed to Damien Offner, E-mail: doffner@unistra.fr

Résumé : (250 mots)

Objectifs : évaluer les complications d'une greffe d'os autologue, technique largement pratiquée et qualifiée de gold standard, les comparer aux complications d'autres techniques (allogreffe, adjonction de BMPs), et aux complications d'autogreffe en secteur maxillo-facial. **Méthode :** recherche par mots-clés et recherche manuelle dans la littérature, recueil des données documentées concernant les complications. **Résultats :** 77 articles sélectionnés, dont 68 concernant l'autogreffe osseuse pour un total de 4329 patients et 976 (22.55%) complications : 349 cas de douleurs chroniques (supérieures à 6 mois) (8.06% du nombre total de patients), 296 cas de dysesthésie (6.84%), 83 cas d'infection (1.92%). Concernant l'allogreffe, 9 études analysées pour 2877 patients et 1034 (35.94%) complications : 464 non-unions (16.13%), 395 fractures (13.73%), 175 cas d'infection (6.08%). Concernant l'utilisation adjuvante de BMPs, 4 études analysées pour 111 patients et 59 (53.15%) complications : 22 non-unions (19.82%), 19 cas d'infection (17.12%), 8 cas de douleurs chroniques (7.21%). **Conclusions :** l'autogreffe, gold standard au regard de ses propriétés biologiques, présente nombre d'effets adverses. Leur prévalence apparaît moindre quand on la compare à celle liée à l'allogreffe ou l'utilisation de BMPs. Certaines techniques chirurgicales permettraient de minorer les complications majoritaires que montre cette revue de la littérature : douleurs chroniques post-opératoires supérieures à 6 mois, dysesthésies, infection. Un bon contrôle des paramètres d'hygiène est une mesure cruciale pour améliorer la sécurité des pratiques. Le développement de nanotechnologies pour la régénération osseuse est une piste intéressante afin améliorer la qualité des soins lors de la prise en charge de défauts osseux.

Abstract :

Objectives: evaluate the complications following a bone autograft, widely practiced technique and characterized as a gold standard, compare them to the complications of other graft techniques (allograft, addition of BMPs), and to the specific complications following autografts as a treatment of maxillofacial bone defects. **Method:** search by keywords and manual search in the literature, collection of documented data regarding complications. **Results:** 77 articles selected, including 68 dealing with autogenous bone graft for a total of 4329 patients and 976 (22.55%) complications. These mainly consist of 349 cases of chronic pain (longer than 6 months) (8.06% of the total number of patients), 296 cases of dysesthesia (6.84%), 83 cases of infection (1.92%). Concerning allograft 9 studies analyzed for 2877 patients and 1034 (35.94%) complications: 464 non-unions (16.13%), 395 fractures (13.73%), 175 cases of infection (6.08%). Concerning the use of BMPs, 4 studies analyzed for 111 patients and 59 (53.15%) complications: 22 non-unions (19.82%), 19 cases of infection (17.12%), 8 cases of chronic pain (7.21%). **Conclusions:** autograft is the gold standard according to its biological properties, but many adverse effects are described. The prevalence of these appears yet lesser when compared to the allograft or the use of BMPs related prevalences. Some surgical techniques could reduce

the major complications showed in this review: post-operative chronic pain longer than 6 months, dysesthesia, infection. Good control of hygiene parameters is a crucial measure to improve the safety of practices. The development of nanotechnologies towards bone regeneration seems to be a very interesting option to improve the quality of care for the treatment of bone defects.

Mots-clés : morbidité, lésion osseuse, greffe ; morbidity, bone defect, grafts

Introduction :

Les défauts osseux (*bone defects* en anglais) sont des lésions soustractives d'os qui peuvent présenter différentes étiologies (bactériennes, traumatiques, tumorales...). Afin de traiter un défaut osseux, il existe plusieurs techniques utilisées en clinique ou en cours de développement. On peut ainsi faire appel à l'autogreffe, à l'allogreffe, à la xéno greffe, ou à des matériaux de substitution osseuse tels que les céramiques phosphocalciques ou des substituts à base de polymères. On peut aussi avoir recours à l'utilisation de facteurs de croissance comme les BMP-2 et 7 autorisés par la FDA (Food and Drug Administration) [1] ou ceux contenus dans le PRP (platelet rich plasma) [2, 3, 4, 5]. Il convient de préciser que ces facteurs de croissance sont très généralement utilisés de façon adjuvante à une greffe ou à l'utilisation de matériaux de substitution osseuse.

Chacune de ces techniques présente des avantages et des inconvénients, mais en comparant ceux-ci, il apparaît que l'autogreffe reste encore le gold standard [2, 3, 6, 7, 8] eu égard aux propriétés ostéoinductrices et ostéoconductrices qu'elle présente, ainsi qu'à la présence de cellules ostéogéniques dans le greffon lorsqu'elle est pratiquée. Les greffes osseuses sont les deuxièmes transplantations de tissus les plus fréquentes après les transfusions sanguines. Dans le monde, ce sont plus de deux millions de greffes osseuses qui sont réalisées chaque année [2, 9]. Pourtant, ces techniques de greffe ne sont pas sans danger. Outre les risques associés à l'anesthésie avant d'entamer la procédure, on peut citer des dangers intrinsèques aux techniques comme des infections, des hématomes, des fractures, des problèmes esthétiques, des douleurs chroniques ou des lésions nerveuses [6, 10].

Le but de cette revue de la littérature est d'évaluer les complications liées à la greffe d'os autologue, technique largement pratiquée et qualifiée de gold standard, et de les comparer aux complications liées à d'autres techniques de greffe quand cela est possible (allogreffe, adjonction de BMP), ainsi qu'aux complications propres à l'autogreffe réalisée dans le cadre du traitement de défauts osseux maxillo-faciaux. Les résultats de cette revue permettront d'identifier les points faibles de ces différentes techniques et de mieux axer les recherches à venir, notamment sur le développement de nano-implants biofonctionnalisés pour favoriser la régénération osseuse [11, 12, 13].

Matériel et Méthode :

Recherche dans la littérature

La recherche d'articles a été réalisée dans la base de données PubMed, en utilisant les mots-clés suivants : complication, morbidity ; *et* : autologous bone graft, bone autograft, allogenic bone graft, bone allograft, bmp graft. Les références des articles identifiés dans cette recherche ont été manuellement analysées, et les références pertinentes ont ensuite été recherchées.

Critères d'inclusion

Les articles sélectionnés respectaient les critères suivants : a) l'article relatait le suivi post-opératoire d'une technique de greffe osseuse telle que l'autogreffe, l'allogreffe, et/ou l'utilisation de BMP ; b) l'article présentait les complications (site donneur et/ou receveur) des pratiques, qui étaient documentées et exploitables ; c) l'article était publié à partir de l'année 2000 ; d) le texte intégral de l'article était accessible ; e) l'article ne traitait pas de la présentation d'un cas clinique isolé ou particulier.

Recueil et traitement des données

A l'image de la revue systématique de la littérature effectuée par Dimitriou et al. en 2011 [6], les informations retenues ont été l'année de publication des articles, le nom des auteurs, le nombre de patient inclus, le nombre de complications documentées, ainsi que le détail de celles-ci (infection, hématome, douleur chronique, lésion nerveuse, dysesthésie, fracture, etc.). Ces informations ont été intégrées dans un tableur afin de déterminer le taux de complications. L'analyse statistique, quand elle était possible, a été réalisée grâce au test de Fischer (en utilisant BiostaTGV sur <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>, développé par l'INSERM).

Résultats :

Après la recherche dans la littérature, 77 articles ont été sélectionnés pour cette revue, respectant les critères d'inclusion [14-90].

Concernant l'autogreffe, 68 études [14-81] ont été analysées pour un total de 4329 patients et de 976 complications documentées, soit un taux moyen de complications de 22.55% (tableau 1). Sur ces 68 études, 8 se rapportent spécifiquement au secteur maxillo-facial [17, 23, 31, 40, 57, 59, 61, 72] pour un total de 553 patients et de 94 complications documentées, soit un taux de complications de 17% (tableau 2).

Concernant l'allogreffe, 9 études [18, 82-89] ont été analysées pour un total de 2877 patients et de 1034 complications documentées, soit un taux moyen de complications de 35.94% (tableau 3).

Concernant l'utilisation de BMPs, 4 études [18, 20, 77, 90] ont été analysées pour un total de 111 patients et de 59 complications documentées, soit un taux moyen de complications de 53.15% (tableau 4).

Autogreffe

Sur les 4329 patients ayant bénéficié d'une autogreffe, les 976 complications se répartissent comme suit : 349 cas de douleurs chroniques (supérieures à 6 mois) (8.06% du nombre total de patients), 296 cas de dysesthésie (6.84%), 83 cas d'infection (1.92%), 75 hématomes (1.73%), 63 problèmes esthétiques (1.46%), 41 lésions nerveuses (0.95%), 16 séromes (0.37%), 10 cas de déhiscence (0.23%), 8 fractures (0.18%), 7 cas de cicatrice hypertrophique (0.16%), et 1 lésion vasculaire (0.02%). (tableau 5)

Autogreffe – secteur maxillo-facial

Sur les 553 patients ayant bénéficié d'une autogreffe liée au secteur maxillo-facial, les 94 complications se répartissent comme suit : 33 cas de douleurs chroniques (supérieures à 6 mois) (5.97% du nombre total de patients), 20 hématomes (3.62%), 13 lésions nerveuses (2.35%), 8 cas d'infection (1.45%), 3 cas de dysesthésie (0.54%), 3 cas de déhiscence (0.54%), 2 fractures (0.36%), 1 sérome (0.18%), et 1 cas de cicatrice hypertrophique (0.18%),.. (tableau 6)

Allogreffe

Sur les 2877 patients ayant bénéficié d'une autogreffe, les 1034 complications se répartissent comme suit : 464 non-unions (16.13% du nombre total de patients), 395 fractures (13.73%), 175 cas d'infection (6.08%), et 5 cas de déhiscence (0.17%). (tableau 7)

Utilisation de BMPs

Sur les 111 patients ayant bénéficié d'une greffe avec adjonction de BMPs, les 59 complications se répartissent comme suit : 22 non-unions (19.82% du nombre total de patients), 19 cas d'infection (17.12%), 8 cas de douleurs chroniques (supérieures à 6 mois) (7.21%), et 5 hématomes (4.50%). (tableau 8)

Analyse statistique

L'analyse statistique montre des différences significatives entre les taux d'infection liés 1) à l'autogreffe et à l'allogreffe ($p < 0.001$) ; 2) à l'autogreffe et à l'utilisation de BMPs ($p < 0.001$) ; et 3) à l'allogreffe et à l'utilisation de BMPs ($p < 0.001$). Une différence significative est également montrée entre le taux de patients souffrant de dysesthésie après avoir bénéficié d'une autogreffe de façon générale (tableau 5), et après avoir bénéficié d'une autogreffe spécifiquement dans le secteur maxillo-facial (tableau 6) ($p < 0.001$). Les différences trouvées entre le taux de patients présentant une douleur chronique après autogreffe ou utilisation de BMPs ($p = 0.7$), et le taux de non-unions pour une allogreffe ou l'utilisation de BMPs ($p = 0.3$) ne sont pas significatives. Il en est de même pour les autres complications.

Discussion :

La revue de la littérature effectuée ici a l'avantage de présenter des résultats actualisés, et pour un nombre important de patients ayant bénéficié de greffes osseuses. L'autogreffe restant le gold standard en matière de traitement de lésions osseuses, le nombre d'articles traitant de cette technique était plus important que pour les autres techniques. Si les résultats apparaissent meilleurs pour certains types de complications quand ils sont comparés à des études plus anciennes, d'autres sont en revanche bien moins bons. Concernant l'autogreffe, nous trouvons ici un taux d'infection de 1.92% quand Younger et al. [10] trouvaient un taux de 2.5% en 1989, sur une étude rétrospective de 243 cas. De même, le taux d'hématome retrouvé ici est de 1.73% contre 3.3% dans l'étude de Younger [10]. A contrario, la proportion de patients souffrant de douleurs chroniques est ici de 8.06% contre seulement 2.5% dans l'étude de Younger [10]. Il est toutefois bon de rappeler que la grande diversité des études analysées peut favoriser un risque de biais dans les résultats. En effet, selon les lieux et les périodes de réalisation des études, les critères d'appréciation de certains items tels que les dysesthésies et les douleurs chroniques par exemple, pourraient varier. D'autres items sont moins sujets à variation, puisque moins subjectifs : c'est le cas des infections, des lésions nerveuses ou des fractures par exemple. Dans une revue de la littérature effectuée par Reininger et al. [91] en 2016 et dont 3 des études analysées font partie de notre revue de la littérature [19, 48, 69], les auteurs ont précisé que l'ensemble des études faisant partie de leurs travaux présentaient un fort potentiel de risques de biais. Concernant la documentation des complications, il faut aussi garder en tête que, quand aucune mention n'en était faite, certaines études se sont peut-être concentrées sur certaines complications et ne les ont pas toutes collectées de manière exhaustive. Ceci revient à dire que les résultats présentés ici sont peut-être légèrement sous-estimés par rapport à la réalité des pratiques. L'analyse de complications telles que les non-unions n'a pas été réalisée concernant les autogreffes, car une partie des études faisant partie de la revue se concentraient uniquement sur le site donneur, ce qui n'était pas le cas pour les études concernant l'allogreffe ou l'utilisation de BMPs.

Infection

Notre revue de littérature montre que le taux d'infection pour les autogreffes en général (1.92%) est bien inférieur aux taux d'infection pour les allogreffes (6.08%) et pour l'utilisation de BMPs (17%). Ces différences sont significatives ($p < 0.001$). Il faut souligner que les BMPs ne sont

pas utilisés seuls, mais en association avec un support de collagène ou en association avec du matériel osseux autologue ou allogénique [2].

Notre revue de littérature rejoint les données que l'on peut trouver dans la littérature concernant le risque infectieux plus élevé en cas d'allogreffe, ce qui reste un problème majeur malgré les procédures de traitement et de stérilisation des tissus [92]. Si de très rares cas documentés de transmission du VIH (2 cas depuis 1989 pour un risque de 1 sur 1.6 millions) [92, 93] ou des virus de l'hépatite B ou C (respectivement 1 cas et 2 cas depuis 1989) existent [2, 92], des cas de transmissions d'autres virus ne sont certainement pas à écarter [83, 92, 94]. Les cas d'infection peuvent provenir de défauts du respect des mesures d'hygiène lors de la procédure chirurgicale, mais aussi d'une évaluation insuffisante du statut du donneur ou de dysfonctionnements lors des procédures de traitement des greffons [94, 95]. Une étude menée par Schubert et al. en 2012 [95], retraçant l'activité d'une banque de tissu osseux et tendineux sur 22 ans et pour 474 dons de tissu, a montré un taux global de contamination bactérienne de ces dons de 3.6% après désinfection. Les micro-organismes en cause étaient des *Staphylococcus* (71.5%), des *Micrococcus* (9.3%), mais aussi des *Streptococcus* (2.5%), *Acinetobacter* (2.5%) ou encore *Escherichia coli* (1.9%). Concernant la possibilité de combler les défauts osseux en utilisant des greffons d'origine xénogéniques, et en considérant le risque infectieux, celui-ci serait à risque faible [96], même si des préoccupations existent quant au risque de transmission de zoonoses de l'animal vers l'humain telles que l'ESB (encéphalopathie spongiforme bovine) ou le PERV (rétrovirus endogène porcine) [2]. Une étude rétrospective menée par Charalambides et al. en 2005 [97] à propos des complications d'une association de greffons autologues et xénogéniques sur 27 patients n'a montré qu'un seul cas d'infection profonde, et 3 cas de rejet de greffe sans signe infectieux apparent, considérés alors comme des « pseudo infections ».

Douleurs chroniques et dysesthésie

Concernant les douleurs chroniques de plus de 6 mois, elles n'étaient pas documentées dans les articles traitant de l'allogreffe. La faible différence retrouvée entre la proportion de patients souffrant de douleurs chroniques faisant suite à une autogreffe (8.06%) et celle faisant suite à l'utilisation de BMPs (7.21%) n'est pas significative ($p = 0.7$), la différence entre celle faisant suite à l'autogreffe en général et à l'autogreffe spécifiquement en secteur maxillo-facial (5.97%) n'est que faiblement significative ($p < 0.1$). Avec la proportion de complications la plus élevée pour les autogreffes, la prise en charge de la douleur post-opératoire apparaît comme

un élément crucial du suivi des patients. Des équipes se penchent sur la question, mais aucune autre méthode que la prise d'antalgiques classique n'a pour le moment émergé. Dans une étude menée par Puri et al. en 2000 [98] sur 13 patients ayant bénéficié d'une autogreffe avec prélèvement sur la crête iliaque antérieure, le groupe de patients ayant reçu de la bupivacaïne en injection locale par voie de cathéter n'a pas ressenti moins de douleurs que le groupe témoin, pour qui une solution saline fut injectée. Suivant la même procédure, une étude menée par Morgan et al. en 2006 [99] sur 60 patients a montré les mêmes résultats. Les interventions chirurgicales utilisant des greffons allogéniques seraient à l'origine de moins de douleurs post-opératoires dans le temps pour les patients [100, 101]. Ceci peut s'expliquer facilement par la suppression d'un deuxième site opératoire nécessaire à collecter l'os autogène dans le cas d'une autogreffe, et donc l'évitement des complications associées.

Il est intéressant de remarquer que la différence entre la proportion de patients présentant une dysesthésie suite à une autogreffe en général (6.84%) et suite à une autogreffe spécifiquement en secteur maxillo-facial (0.54%) est importante et significative ($p < 0.001$). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la cicatrisation muqueuse, revêtement tissulaire plus présent dans le secteur maxillo-facial, est plus rapide que la cicatrisation cutanée [102], réduisant le taux de ce type de complications dans une zone pourtant richement innervée.

Technique chirurgicale

Un autre point important concernant les complications de greffes osseuses est que celles-ci peuvent certes être dues au type de greffe pratiquée, mais aussi à la technique chirurgicale utilisée. Ceci est notamment le cas pour l'autogreffe, avec l'existence de différentes techniques de collecte du greffon au site donneur. Depuis le début des années 2000, le système RIA (Reamer/Irrigator/Aspirator) a fait son apparition. Développé initialement pour réduire la pression intramédullaire [6, 103], ce système permet de collecter du tissu osseux depuis le canal intramédullaire du fémur ou du tibia, par un alésage des parois du canal et une aspiration du tissu ainsi détaché. Cette technique permet de limiter les complications au niveau du site donneur [6, 15, 18, 104], tout en récoltant des quantités de tissu supérieures par rapport à la technique classique de prélèvement au niveau de la crête iliaque [6, 18, 37, 103, 105]. Une étude menée par Dawson et al. en 2014 [106] sur 113 patients n'a pas montré de différence entre les deux techniques concernant le taux d'infection, mais une douleur moindre en post-opératoire et sur le long terme avec la technique RIA. Une revue de la littérature menée par Dimitriou et al.

en 2011 [6] et s'intéressant aux complications au niveau du site donneur après une collecte de tissu osseux par le système RIA, a montré 14 complications pour 233 patients (soit un taux moyen de 6.01%). Les complications consistaient en 4 cas de douleurs chroniques (1.7%), 4 cas de fractures (1.7%), 1 cas de lésion vasculaire (0.43%), et 5 complications liées à la plaie (2.14%). Aucun cas d'infection n'a été documenté. Ces résultats apparaissent meilleurs que les résultats globaux de notre revue de littérature, ce qui fait du système RIA une alternative très intéressante à la technique classique de prélèvement au niveau de la crête iliaque [6], et dont la documentation des complications mérite d'être suivie à plus grande échelle.

Utilisation de BMPs

L'utilisation des BMPs associés à du matériel osseux ou des substituts osseux part du principe que ces protéines majoreraient la qualité de la régénération osseuse. Il est difficile de trouver des études dans des revues référencées documentant leurs effets adverses, car leur utilisation est bien plus récente que la pratique de l'autogreffe ou de l'allogreffe, et car l'histoire de leur évaluation sur le plan de la sécurité des pratiques a été mouvementée. En 2009, une revue systématique de la littérature menée par Agarwal et al. [107] et comprenant 17 études pour un total de 1342 patients concluait que l'utilisation de BMP-2 était associée à une réduction significative du risque de non-union par rapport à l'autogreffe d'os provenant de la crête iliaque. L'utilisation de BMP-7 par contre ne montrait pas de différence significative pour le risque de non-union. Dans cette même revue, les auteurs avançaient qu'aucun effet adverse qui avait pu apparaître n'était lié à l'utilisation de BMPs, et ce sur 1342 patients. Notre revue de la littérature montre un taux global de complications de 53.15%.

Deux ans plus tard en 2011, Carragee et al. [108] rapportent des signalements croissants de complications liés à l'utilisation de BMP-2. En 2008, et sur une période de plus de 4 ans, la FDA avait reçu plus de 38 rapports de complications liés à l'utilisation de BMP-2 [109]. Dans leurs travaux, Carragee et al. [108] mènent une comparaison de 13 études antérieures à 2009 sponsorisées par le milieu de l'industrie et portant sur 780 patients ayant reçu des BMP-2 avec 0% de complications, avec les données de la FDA. Ces travaux ont permis de mettre en lumière des résultats non publiés portant spécifiquement sur les complications liées à l'utilisation des BMP-2 [108]. Les auteurs estiment le risque de complications associées aux BMP-2 de 10 à 50 fois supérieur que ce qui était avancé dans les études analysées. Ces mêmes études présentaient en comparaison un taux global de complications liées à l'autogreffe de 40 à 60% [109] quand

notre revue de la littérature en montre 22.55%. D'autres effets adverses apparaissent alors petit à petit : ossification hétérotrophique, ostéolyse, infection, éjaculation rétrograde, cancer [109]. Des études de confiance à très grande échelle portant sur les complications de l'utilisation de BMP-2 n'ont pas encore été réalisées. Pourtant, et en dehors des effets adverses potentiels, ces protéines montrent de bons résultats en termes de résolution des non-unions [107], et de baisse du temps opératoire et du saignement lors de l'intervention [20, 77]. Les études de Friedlaender et al. [77] et de Tressler et al. [20] montrent respectivement des temps opératoires moyens de 169 min et de 168.9 min pour l'utilisation des BMP contre 178 min et 257.9 min pour l'autogreffe provenant de la crête iliaque. De même, elles montrent des pertes de sang de respectivement 254 mL et 331 mL pour l'utilisation des BMPs contre 345 mL et 554 mL pour l'autogreffe.

Réflexions éthiques

Les résultats de cette revue de littérature amènent à se poser des questions d'ordre éthique. Si le risque infectieux apparaît ici plus faible pour l'autogreffe, cette dernière nécessite toutefois un deuxième site opératoire, ce qui augmente le risque théorique de complications. De même, la douleur post-opératoire est rapportée comme moindre pour l'allogreffe comparée à l'autogreffe [100, 101]. Certains auteurs se posent alors la question de savoir s'il ne faudrait pas privilégier d'autres techniques que l'autogreffe pour éviter l'existence d'un second site opératoire [110] quand d'autres auteurs apportent directement leur réponse en mettant en avant l'allogreffe [10,18]. La xélogreffe aussi permettrait l'absence d'un second site opératoire, mais cette technique pose la question de son acceptabilité par les patients eu égard à leurs croyances [111], et au risque potentiel de transmission de zoonoses [2]. Le taux important de patients souffrant de douleurs chroniques (8.06% pour l'allogreffe, 7.21% pour l'utilisation de BMPs) doit amener à réfléchir à l'élaboration d'autres procédures permettant de réduire les souffrances des patients et de gagner en qualité et en sécurité des pratiques [111].

Des alternatives à l'autogreffe

L'autogreffe reste encore le gold standard pour traiter un défaut osseux. Elle présente des avantages techniques certains (ostéoconduction, ostéoinduction, pas de risque immunogène), et

notre revue de littérature montre des taux de complications inférieurs à l'allogreffe et à l'utilisation de BMPs sur la plupart des points. Le risque théorique de non-union est moindre car le tissu utilisé est d'origine autogène [18, 112, 113], mais l'allogreffe donne dans notre revue de bons résultats aussi avec un taux de fusion de 83.87%. Des recherches sont menées actuellement pour développer les nanotechnologies à visée régénérative [11, 12, 13] et pourraient à terme permettre de pallier à plusieurs difficultés. La nature du matériau utilisée pour combler le défaut osseux pourrait ne plus être d'origine biologique, mais synthétique et résorbable, permettant simplement de constituer un support aux cellules de l'hôte [13]. De plus, ce support pourrait être fonctionnalisé, c'est-à-dire porteur de nanoréservoirs aptes à délivrer des facteurs de croissance ou d'autres types de molécules (anti-inflammatoires, antibiotiques, antalgiques...) au rythme de la prolifération des cellules ostéogénitrices sur le support [11, 12, 13, 114].

Conclusions :

La greffe osseuse est une pratique chirurgicale qui comporte des risques de complications. L'autogreffe est le gold standard au regard des propriétés biologiques que le tissu autologue présente, mais de nombreux effets aderses sont décrits. La prévalence de ceux-ci apparaît pourtant moindre quand on la compare à celle liée à l'allogreffe ou à l'utilisation de BMPs. La prévalence des complications d'une autogreffe quand elle est liée au secteur maxillo-facial apparaît encore inférieure à celle de l'autogreffe en général. Certaines techniques (par exemple le système RIA) permettraient de minorer encore les complications majoritaires que mettent en lumière cette revue de la littérature : douleurs chroniques post-opératoires supérieures à 6 mois, dysesthésies, infection.

Au regard du problème non négligeable de suites infectieuses et douloureuses après une procédure de greffe osseuse, un bon contrôle des paramètres et des mesures d'hygiène lors des interventions apparaît comme une mesure cruciale pour améliorer les pratiques et réduire le risque de survenue de complications. D'autre part, le développement de nanotechnologies à but de régénération osseuse paraît être une piste très intéressante pour améliorer la sécurité et la qualité des soins lors de la prise en charge de défauts osseux.

Financement : ce travail n'a bénéficié d'aucun financement spécifique

Conflit d'intérêt : aucun

Références :

1. Burks MV, Nair L. Long term effects of bone morphogenetic protein-based treatments in humans. *J Long Term Eff Med Implants*. 2010 20(4):277-93
2. Campana V, Milano G, Pagano E, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery : from basic science to clinical practice. *J Mater Sci : Mater Med*. 2014 25:2445-61
3. Blokhuis TJ, Calori GM, Schmidmaier G. Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions : what is the evidence ? *Injury*. 2013 44(Suppl 1):S40-2
4. Bauermeister A, Maatz R. A method of bone maceration results of animal experiment. *J Bone Joint Surg Am*. 1957 39(1):153-66
5. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices*. 2006 3(1):49-57
6. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, et al. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA : a systematic review. *Injury*, 2011 42(Suppl 2):S3-15
7. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials, An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 371:10-27
8. Jensen AT, Jensen SS, Worsaae N. Complications related to bone augmentation procedures of localized defects in the alveolar ridge. A retrospective clinical study. *Oral Maxillofac Surg*. 2016 20:115-22
9. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone graft substitutes : facts, fictions and applications. *J Bone Joint Surg AM*. 2001 83:98-103
10. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*. 1989 3(3):192-5
11. Eap S, Ferrand A, Schiavi J, Keller L, Kokten T, Fioretti F, Mainard D, Jadam G, Benkirane-Jessel N. Collagen implants equipped with 'fish scale'-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine*. 2014 9(8):1253-61
12. Ferrand A, Eap S, Richert L, et al. Osteogenetic properties of Electrospun Nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol Biosci*. 2014 14(1):45-55
13. Wagner Q, Offner D, Saleem I, et al. Nanostructured implant combining mesenchymal cells and VEGF nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization. *Nanomedicine*. 2016, in press.
14. Micev AJ, Kalainov DM, Slikker III W, et al. Comparing morbidities of bone graft harvesting from the olecranon process and the distal radius. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2016 194):2

15. Han F, Peter L, Lau ET, et al. Reamer Irrigator Aspirator bone graft harvesting : complications and outcomes in an Asian population. *Injury*. 2015(46):2042-51
16. Iwasaki K, Ikedo T, Hashikata H, Toda H. Autologous clavicle bone graft for anterior cervical discectomy and fusion with titanium interbody cage. *J Neurosurg Spine*. 2014 21(5):761-8
17. Riachi F, Naaman N, Tabarani C, et al. Comparison of morbidity and complications of harvesting bone from the iliac crest and calvarium : a retrospective study. *J Int Oral Health*. 2016 6(3):32-35
18. Flierl MA, Smith WR, Mauffrey C, et al. Outcomes and complication rates of different bone grafting modalities in long bone fracture nonunions : a retrospective cohort study in 182 patients. *J Orthop Surg Res*. 2013 8:33
19. Cordaro L, Torsello F, Miuccio MT, et al. Mandibular bone harvesting for alveolar reconstruction and implant placement : subjective and objective cross-sectional evaluation of donor and recipient site up to 4 years. *Clin Oral Implants Res*. 2011 22:1320-6
20. Tressler MA, Richards JE, Sofianos D, et al. Bone morphogenetic protein-2 copared to autologous iliac crest bone graft in the treatment of long bone nonunion. *Orthopedics*. 2011 34(12):e877-84
21. Ito Z, Matsuyama Y, Sakai Y, et al. Bone union rate with autologous iliac bone versus local bone graft in posterior lumbar interbody fusion. *Spine*. 2010 62(21):E1101-5
22. Kloen P, Wiggers JK, Buijze GA. Treatment of diaphyseal non-unions of the ulna and radius. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2010 130(12):1439-45
23. Schaaf H, Lendeckel S, Howaldt HP, Streckbein P. Donor site morbidity after bone harvesting from the anterior iliac crest. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 109(1):52-8
24. Kolomvos N, Iatrou I, Theologie-Lygidakis N, et al. Iliac crest morbidity following maxillofacial bone grafting in children : a clinical and radiographic prospective study. *J Craniomaxillofac Surg*. 2010 38(4):293-302
25. Schizas C, Triantafyllopoulos D, Kosmopoulos V, Stafylas K. Impact of iliac crest bone graft harvesting on fusion rates and postoperative pain during instrumented posterolateral lumbar fusion. *Int Orthop*. 2009 33(1):187-9
26. Schwartz CE, Martha JF, Kowalski P, et al. Prospective evaluation of chronic pain associated with posterior autologous iliac crest bone graft harvest and its effect on postoperative outcome. *Health Qual Life Outcomes*. 2009 7:49
27. Lerner T, Bullmann V, Schulte TL, et al. A level-1 pilot study to evaluate of ultraporous beta-tricalcium phosphate as a graft extender in the posterior correction of adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*. 2009 18(2):170-9
28. Borrelli Jr J, Leduc S, Gregush R, Ricci WM. Tricortical bone grafts for treatment of malaligned tibias and fibulas. *Clin Orthop Relat Res*. 2009 467(4):1056-63
29. Heneghan HM, McCabe JP. Use of autologous bone graft in anterior cervical decompression : morbidity & quality of life analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2009 10:158

30. Dimar JR, Glassman SD, Burkus JK, et al. Two-year fusion and clinical outcomes in 224 patients treated with a single-level instrumented posterolateral fusion with iliac crest bone graft. *Spine J.* 2009 9:880-5
31. Baqain ZH, Anabtawi M, Karaky AA, Malkawi Z. Morbidity from anterior iliac crest bone harvesting for secondary alveolar bone grafting : an outcome assessment study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 67:570-5
32. Pieske O, Wittmann A, Zaspel J, et al. Autologous bone graft versus demineralized bone matrix in internal fixation of ununited long bones. *J Trauma Manag Outcomes.* 2009 3:11
33. Ulucay C, Altintas F, Ozkan NK, et al. Surgical treatment for calcaneal intraosseous lipomas. *Foot.* 2009 19(2):93-7
34. Singh JR, Nwosu U, Egol KA. Long-term functional outcome and donor-site morbidity associated with autogenous iliac crest bone grafts utilizing a modified anterior approach. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2009 67(4):347-51
35. Putzier M, Strube P, Funk JF, et al. Allogenic versus autologous cancellous bone in lumbar segmental spondylodesis : a randomized prospective study. *Eur Spine J.* 2009 18(5):687-95
36. Kim DH, Rhim R, Li L, Martha J, et al. Prospective study of iliac crest bone graft harvest site pain and morbidity. *Spine J.* 2009 9(11):886-92
37. Belthur MV, Conway JD, Jindal G, et al. Bone graft harvest using a new intramedullary system. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 466(12):2973-80
38. Ekrol I, Hajducka C, Court-Brown C, McQueen MM. A comparison of RhBMP-7 (OP-1) and autogenous graft for metaphyseal defects after osteotomy of the distal radius. *Injury.* 2008 39(suppl.2):S73-82
39. Palmer W, Crawford-Sykes A, Rose RE. Donor site morbidity following iliac crest bone graft. *West Indian Med J.* 2008 57(5):490-2
40. Rawashdeh MA. Morbidity of iliac crest donor site following open bone harvesting in cleft lip and palate patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008 37:223-7
41. Pollock R, Alcelik I, Bhatia C, et al. Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion : a comparison between minimally invasive and open techniques. *Eur Spine J.* 2008 17:845-52
42. Dai LY, Jiang LS. Single-level instrumented posterolateral fusion of lumbar spine with β -tricalcium phosphate versus autograft : a prospective randomized study with 3-year follow-up. *Spine.* 2008 33(12):1299-304
43. Buttermn GR. Prospective nonrandomized comparison of an allograft with bone morphogenic protein versus an iliac-crest autograft in anterior cervical discectomy and fusion. *Spine J.* 2008 8(3):426-35
44. Bapat MR, Chaudhary K, Garg H, Laheri V. Reconstruction of large iliac crest defects after graft harvest using autogenous rib graft : a prospective controlled study. *Spine.* 2008 33(23):2570-5
45. Mobbs RJ, Rao P, Chandran NK. Anterior cervical discectomy and fusion :analysis of surgical outcome with and without plating. *Clin Neurosci.* 2007 14(7):639-42
46. Dolan CM, Henning JA, Anderson JG, et al. Randomized prospective study comparing tri-cortical iliac crest autograft to allograft in the lateral column

- lengthening component for operative correction of adult acquired flatfoot deformity. *Foot Ankle Int.* 2007 28(1):8-12
47. Delawi D, Dhert WJ, Castelein RM, Verbout AJ, Oner FC. The incidence of donor site pain after bone graft harvesting from the posterior iliac crest may be overestimated : a study on spine fracture patients. *Spine.* 2007 32(17):1865-8
 48. Raghoobar GM, Meijndert L, Kalk WWI, Vissink A. Morbidity of mandibular bone harvesting : a comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007 22:359-65
 49. Brawley SC, Simpson RB. Results of an alternative autogenous iliac crest bone graft harvest method. *Orthopedics.* 2006 29(4):342-6
 50. Thomé C, Leheta O, Krauss JK, Zevgaridis D. A prospective randomized comparison of rectangular titanium cage fusion and iliac crest autograft in patients undergoing anterior cervical discectomy. *Neurosurg Spine.* 2006 4(1):1-9
 51. Tamble AD, Cutler L, Murali SR, Trail IA, Stanley JK. In scaphoid non-union, does the source of graft affect outcome ? Iliac crest versus distal end of radius bone graft. *J Hand Surg Br.* 2006 31(1):47-51
 52. Sengupta DK, Truumees E, Patel CK, et al. Outcome of local bone versus autogenous iliac crest bone graft in the instrumented posterolateral fusion of the lumbar spine. *Spine.* 2006 31:985-91
 53. Rogachefsky RA, Ouellette EA, Sun S, Applegate B. The use of tricortico cancellous bone graft in severely comminuted intra-articular fractures of the distal radius. *J Hand Surg.* 2006 31:623-32
 54. Kitchel SH. A preliminary comparative study of radiographic results using mineralized collagen and bone marrow aspirate versus autologous bone in the same patients undergoing posterior lumbar interbody fusion with instrumented posterolateral lumbar fusion. *Spine J.* 2006 6(4):405-12
 55. Kager AN, Marks M, Bastrom T, Newton PO. Morbidity of iliac crest bone graft harvesting in adolescent deformity surgery. *J Pediatr Orthop.* 2006 26:132-4
 56. Hierolzer C, Sama D, Toro JB, Peterson M, Helfet DL. Plate fixation of ununited humeral shaft fractures : effect of type of bone graft on healing. *J Bone Joint Surg Am.* 2006 88:1442-7
 57. Freilich MM, Sandor GKB. Ambulatory in-office anterior iliac crest bone harvesting. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 101:291-8
 58. Dimar JR, Glassman SD, Burkus KJ, Carreon LY. Clinical outcomes and fusion success at 2 years of single-level instrumented posterolateral with recombinant human bone morphogenetic protein-2/compression resistant matrix versus iliac crest bone graft. *Spine.* 2006 31:2534-9
 59. Swan MC, Goodacre TE. Morbidity at the iliac crest donor site following bone grafting of the cleft alveolus. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2006 44(2):129-33
 60. Rajan GP, Fornaro J, Trentz O, Zellweger R. Cancellous allograft versus autologous bone graft for repair of comminuted distal radius fractures : a prospective, randomized trial. *J Trauma.* 2006 60(6):1322-9
 61. Donkor P, Bankas DO, Boakye G, et al. The use of free autogenous rib grafts in maxillofacial reconstruction. *Ghana Med J.* 2006 40(4):127-31

62. Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, et al. A 2-year follow-up pilot study evaluating the safety and efficacy of op-1 putty (rhbmp-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions. *Eur Spine J.* 2005 14:623-9
63. Sasso RC, LeHuec JC, Shaffrey C. Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion. A prospective patient satisfaction outcome assessment. *J Spinal Disord Technol.* 2005 18(suppl. 1):S77-81
64. De Orio JK, Farber DC. Morbidity associated with anterior iliac crest bone grafting in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Int.* 2005 26(2):147-51
65. Kessler P, Thorwarth M, Bloch-Birkholz A, et al. Harvesting of bone from the iliac crest – comparison of the anterior and posterior sites. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2005 43:51-6
66. Thomé C, Krauss JK, Zevgaridis D. A prospective clinical comparison of rectangular titanium cages and iliac crest autografts in anterior cervical discectomy and fusion. *Neurosurg Rev.* 2004 27:34-41
67. Bezer M, Kocaoglu B, Aydin M, Güven O. Comparison of traditional and intrafascial iliac crest bone-graft harvest in lumbar spinal surgery. *Int Orthop.* 2004 28:325-8
68. Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, et al. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine.* 2003 28(2):134-9
69. Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation : comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003 5:154-60
70. McConnell JR, Freeman BJC, Debnath UK, et al. A prospective randomized comparison of coralline hydroxyapatite with autograft in cervical interbody fusion. *Spine.* 2003 28:31723
71. David R, Folman Y, Pikarsky I, et al. Harvesting bone graft from the posterior iliac crest by less traumatic, midline approach. *J Spinal Disord Technol.* 2003 16(1):27-30
72. Cricchio G, Lundgren S. Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003 5(3):161-9
73. Gibson S, McLeod I, Wardlaw D, Urbaniak S. Allograft versus autograft in instrumented posterolateral lumbar spinal fusion. A randomized control trial. *Spine.* 2002 27:1599-603
74. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone graft in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 84(5):716-20
75. Westrich GH, Geller DS, O'Malley MJ, Deland JT, Helfet DL. Anterior iliac crest bone graft harvesting using the corticocancellous reamer system. *J Orthop Trauma.* 2001 15(7):500-6
76. Robertson PA, Wray AC. Natural history of posterior iliac crest bone graft donation for spinal surgery. A prospective analysis of morbidity. *Spine.* 2001 26:1473-6
77. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in the treatment of tibial nonunions : a prospective, randomized clinical trial comparing rhOP-1 with fresh bone autograft. *J Bone Joint Surg Am.* 2001 83-A Suppl 1(Pt2):S151-S158

78. Skaggs DL, Samuelson MA, Hale JM, Kay RM, Tolo VT. Complications of posterior iliac crest bone grafting in spine surgery in children. *Spine*. 2000 25:2400-2
79. Brodsky JW, Ptaszek AJ, Morris SG. Salvage first MTP arthrodesis utilizing ICBG : clinical evaluation and outcome. *Foot Ankle Int*. 2000 21(4):290-6
80. Eufinger H, Leppaenen H. Iliac crest donor site morbidity following open and closed methods of bone harvest for alveolar cleft osteoplasty. *J Craniomaxillofac Surg*. 2000 28(1):31-8
81. Mirovsky Y, Neuwirth MG. Comparison between the outer table and intracortical methods of obtaining autogenous bone graft from the iliac crest. *Spine*. 2000 25(13):1722-5
82. Deluiz D, Oliveira L, Fletcher P, et al. Fresh-frozen bone allografts in maxillary alveolar augmentation : analysis of the complications, adverse outcomes and implant survival. *J Periodontol*. 2016 1:1-13 [Epub ahead of print]
83. Delloye C, van Cauter M, Dufrane D, et al. Local complications of massive bone allografts : an appraisal of their prevalence in 128 patients. *Acta Orthop Belg*. 2014 80:196-204
84. Aponte-Tinao L, Farfalli GL, Ritacco LE, Ayerza MA, Muscolo DL. Intercalary femur allografts are an acceptable alternative after tumor resection. *Clin Orthop Relat Res*. 2012 470:728-34
85. Hannah SA, Sewell MD, Aston WJ, et al. Femoral diaphyseal endoprosthesis reconstruction after segmental resection of primary bone tumours. *J Bone Joint Surg Br*. 2010 92:867-74
86. Krieg AH, Davidson AW, Stalley PD. Intercalary femoral reconstruction with extracorporeal irradiated autogenous bone graft in limb-salvage surgery. *J Bone Joint Surg Br*. 2007 89:366-71
87. Donati D, DiBella C, Col angeli M, Bianchi G, Mercuri M. The use of massive bone allografts in bone tumour surgery of the limb. *Current Orthopaedics*. 2005 19:393-9
88. Sorger JI, Hornicek FJ, Zavatta M, et al. Allograft fractures revisited. *Clin Orthop Relat Res*. 2001 382:66-74
89. Hornicek FJ, Gebhardt MC, Tomford WW, et al. Factors affecting nonunions of the allograft-host junction. *Clin Orthop Relat Res*. 2001 382:87-98
90. Brannan PS, Gaston RG, Loeffler BJ, Lewis DR. Complications with the use of BMP-2 in scaphoid nonunion surgery. *J Hand Surg Am*. 2016 41(5):602-8
91. Reininger D, Cobo-Vázquez C, Monteserin-Matesanz M, López-Quiles J. Complications in the use of the mandibular body, ramus and symphysis as donor sites in bone graft surgery. A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016 21(2):e241-9
92. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011 42(suppl. 2):S16-21
93. Khan SN, Cammisa FPJ, Sandhu HS, et al. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005 13(1):77-86
94. Mroz TE, Joyce MJ, Steinmetz MP, Lieberman IH, Wang JC. Musculoskeletal allograft risks and recalls in the United States. *J Am Acad Orthop Surg*. 2008 16(10):559-65

95. Schubert T, Bigaré E, Van Isacker T, Gigi G, Delloye C, Cornu O. Analysis of predisposing factors for contamination of bone and tendon allografts. *Cell Tissue Bank*. 2012 13:421-9
96. Laurencin CT, El-Amin SF. Xenotransplantation in orthopaedic surgery. *J Am Acad Orthop Surg*. 2008 16(1):4-8
97. Charalambides C, Beer M, Cobb AG. Poor results after augmenting autograft with xenograft (Surgibone) in hip revision surgery. *Acta Orthopaedica*. 2005 76(4):544-9
98. Puri R, Moskovich R, Gusmorino P, Schott S. Bupivacaine for postoperative pain relief at the iliac crest bone graft harvest site. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2000 29(6):443-6
99. Morgan SJ, Jeray KJ, Saliman LH, et al. Continuous infusion of local anesthetic at iliac crest bone-graft sites for postoperative pain relief. A randomized, double-blind study. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 88(12):2606-12
100. Jia YH, Sun PF. Comparison of Clinical Outcome of Autograft and Allograft Reconstruction for Anterior Cruciate Ligament Tears. *Chin Med J*. 2015 128(23):3163-66
101. Cho SW, Kim DH, Lee GC, Lee SH, Park SH. Comparison between autogenous bone graft and allogeneous cancellous bone graft in medial open wedge high tibial osteotomy with 2-year follow-up. *Knee Surg Relat Res*. 2013 25(3):117-25
102. Guyot L, Seguin P, Benateau H. *Techniques en chirurgie maxillo-faciale et palstique de la face*. Editions Springer-Verlag, France, Paris, 2010 p.100
103. Kovar FM, Wozasek GE. Bone graft harvesting using the RIA (reaming irrigation aspirator) system - a quantitative assessment. *Wien Klin Wochenschr*. 2011 123(9-10):285-90
104. Conway JD. Autograft and nonunions : morbidity with intramedullary bone graft versus iliac crest bone graft. *Orthop Clin North Am*. 2010 41(1):75-84
105. Newman JT, Stahel PF, Smith WR, et al. A new minimally invasive technique for large volume bone graft harvest for treatment of fracture nonunions. *Orthopedics*. 2008 31(3):257-61
106. Dawson J, Kiner D, Gardner W, et al. The Reamer Irrigator Aspirator (RIA) as a device for harvesting bone graft compared with Iliac Crest Bone Graft (ICBG) : union rates and complications. *J Orthop Trauma*. 2014 28(10):584-90
107. Agarwal R, Williams K, Umscheid CA, Welch WC. Osteoinductive bone graft substitutes for lumbar fusion : a systematic review. *J Neurosurg Spine*. 2009 11(6):729-40
108. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery : emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J*. 2011 11(6):471-91
109. Epstein NE. Complications due to the use of BMP/INFUSE in spine surgery : the evidence continues to mount. *Surg Neurol Int*. 2013 4(Suppl. 5):S343-52
110. Baiguera S, Ribatti D. Endothelialization approaches for viable engineered tissues. *Angiogenesis*. 2013 16:1-14
111. De Vries RBM, Oerlemans A, Trommelmans L, Dierickx K, Gordijn B. Ethical aspects of tissue engineering : a review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008 14(4):367-75

112. Christopher G, Finkemeier MD. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 84(3):454-64
113. Lu ML, Tsai TT, Chen LH, et al. Comparison of fusion rates between autologous iliac bone graft and calcium sulfate with laminectomy bone chips in multilevel posterolateral spine fusion. *Open Journal of Orthopedics.* 2013 3:119-27
114. Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S, et al. Smart hybrid materials equipped with nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano.* 2012 6(1) :483-90

Tableaux :

Tableau 1 : détail des études portant sur l'autogreffe intégrées à la revue

	AUTEUR	ANNEE	NOMBRE DE PATIENTS	NOMBRE DE COMPLICATIONS
1	Micev	2016	44	10
2	Han	2015	57	4
3	Iwasaki	2014	16	2
4	Riachi	2014	180	40
5	Flierl	2013	105	13
6	Cordaro	2011	78	6
7	Tressler	2011	74	12
8	Ito	2010	54	0
9	Kloen	2010	24	2
10	Schaaf	2010	75	10
11	Kolomvos	2010	36	2
12	Schizas	2009	35	1
13	Schwartz	2009	170	41
14	Lerner	2009	20	0
15	Borrelli	2009	17	4
16	Heneghan	2009	29	13
17	Dimar	2009	194	16
18	Baqain	2009	24	3
19	Pieske	2009	10	2
20	Ulucay	2009	21	0
21	Singh	2009	32	6
22	Putzier	2009	22	8
23	Kim	2009	104	51
24	Belthur	2008	40	12
25	Ekrol	2008	16	8
26	Palmer	2008	30	8
27	Rawashdeh	2008	64	4
28	Pollock	2008	76	29
29	Dai	2008	30	4
30	Buttermann	2008	36	2
31	Bapat	2008	36	52
32	Mobbs	2007	242	6
33	Dolan	2007	15	0
34	Delawi	2007	71	52
35	Raghoobar	2007	45	10
36	Brawley	2006	34	0
37	Thomé	2006	50	6
38	Tamble	2006	44	11
39	Sengupta	2006	36	7
40	Rogachefsky	2006	12	0

41	Kitchel	2006	25	7
42	Kager	2006	71	1
43	Hierholzer	2006	45	6
44	Freilich	2006	39	2
45	Dimar	2006	45	0
46	Swan	2006	72	11
47	Rajan	2006	46	17
48	Donkor	2006	29	3
49	Vaccaro	2005	12	0
50	Sasso	2005	202	111
51	DeOrio	2005	129	61
52	Kessler	2005	127	15
53	Thome	2004	18	4
54	Bezer	2004	117	13
55	Silber	2003	187	64
56	Clavero	2003	53	16
57	McConnell	2003	16	3
58	David	2003	107	36
59	Cricchio	2003	70	21
60	Gibson	2002	32	5
61	Ahlman	2002	88	10
62	Westrich	2001	170	10
63	Robertson	2001	97	45
64	Friedlaender	2001	61	39
65	Skaggs	2000	87	7
66	Brodsky	2000	12	0
67	Eufinger	2000	26	3
68	Mirovsky	2000	48	9
	Total :		4329	976
	Taux :		100%	22,55%

Tableau 2 : détail des études portant sur l'autogreffe liée au secteur maxillo-facial intégrées à la revue

	AUTEUR	ANNEE	NOMBRE DE PATIENTS	NOMBRE DE COMPLICATIONS
1	Riachi	2014	180	40
2	Schaaf	2010	75	10
3	Baqain	2009	24	3
4	Rawashdeh	2008	64	4
5	Freilich	2006	39	2
6	Swan	2006	72	11
7	Donkor	2006	29	3
8	Cricchio	2003	70	21
	Total :		553	94
	Taux :		100%	17,00%

Tableau 3 : détail des études portant sur l'allogreffe intégrées à la revue

	AUTEUR	ANNEE	NOMBRE DE PATIENTS	NOMBRE DE COMPLICATIONS
1	Deluiz	2016	58	18
2	Delloye	2014	128	73
3	Flierl	2013	38	10
4	Aponte- Tinao	2012	83	35
5	Hannah	2010	23	4
6	Krieg	2007	16	4
7	Donati	2005	540	324
8	Sorger	2001	1046	331
9	Hornicek	2001	945	235
	Total :		2877	1034
	Taux :		100%	35,94%

Tableau 4 : détail des études portant sur l'utilisation de BMPs intégrées à la revue

	AUTEUR	ANNEE	NOMBRE DE PATIENTS	NOMBRE DE COMPLICATIONS
1	Brannan	2016	6	7
2	Flierl	2013	23	8
3	Tressler	2011	19	1
4	Friedlaender	2001	63	43
	Total :		111	59
	Taux :		100%	53,15%

Tableau 5 : détail des complications liées à l'autogreffe

<i>étude</i>	<i>infection</i>	<i>hématome</i>	<i>Sérome</i>	<i>douleur chronique > 6mois</i>	<i>fracture</i>	<i>lésion nerveuse</i>	<i>lésion vasculaire</i>	<i>cicatrice hypertrophique</i>	<i>dysesthésie</i>	<i>déhiscence</i>	<i>problème esthétique</i>	<i>autre</i>
1	1								8	1		
2	3				1							
3				1							1	
4	2	7		25								6
5	13											
6									6			
7	12											
8												
9	1					1						
10		4		3	1	1			1			
11						1		1				
12		1										
13									41			
14												
15												4
16	1			12								
17	1			14						1		
18						2						1
19				1				1				
20												
21		1		3				2				
22		5		3								
23				17					30		4	
24	3	1							8			
25		8										
26				5					2		1	
27	3									1		
28	4	2				2		1	18		2	
29		3										1
30	1				1							
31	1		1	14				1	21	1	13	
32				6								
33												
34				16					26		10	
35				8					2			
36												
37				5								1
38	4			5	2							
39			2	2					3			
40												
41				7								
42	1											
43	1			3	1				1			

44					1						1	
45												
46	2			5				1	2		1	
47		5	2	6	1	2					1	
48									2		1	
49												
50				79							32	
51	1	6	6	6		3			38	1		
52	1	9	4			1						
53				4								
54	3			3		6			1			
55	5			35					21	3		
56									16			
57	1			1					1			
58				22					14			
59	1	9	1			1	9					
60				5								
61		2		1		2			5			
62	1	4							5			
63	1			11		10			23			
64	12	8		9								
65	2			3			1		1			
66												
67	1								2			
68				9								
Total :	83	75	16	349	8	41	1	7	296	10	63	17
Taux :	1,92%	1,73%	0,37%	8,06%	0,18%	0,95%	0,02%	0,16%	6,84%	0,23%	1,46%	0,39%
	<i>infection</i>	<i>hématome</i>	<i>sérome</i>	<i>douleur chronique > 6mois</i>	<i>fracture</i>	<i>lésion nerveuse</i>	<i>lésion vasculaire</i>	<i>cicatrice hypertrophique</i>	<i>dysesthésie</i>	<i>déhiscence</i>	<i>problème esthétique</i>	<i>autre</i>

Tableau 6 : détail des complications liées à l'autogreffe en secteur maxillo-facial

études	infection	hématome	sérome	douleur chronique > 6 mois	fracture	lésion nerveuse	cicatrice hypertrophique	dysesthésie	déhiscence	autre
1	2	7		25						6*
2		4		3	1	1		1		
3						2				1**
4	3								1	
5						1				1***
6	2			5			1	2		1****
7									2	1*****
8	1	9	1		1	9				
Total :	8	20	1	33	2	13	1	3	3	10
Taux :	1,45%	3,62%	0,18%	5,97%	0,36%	2,35%	0,18%	0,54%	0,54%	1,81%

* hémorragies / oedèmes

** ostéophyte

*** hernie abdominale

**** détachement de l'insertion du gluteus maximus

***** résorption anticipée de l'os

Tableau 7 : détail des complications liées à l'allogreffe

<i>étude</i>	<i>infection</i>	<i>fracture</i>	<i>déhiscence</i>	<i>non-union</i>	<i>autre</i>
1	6		5		7
2	7	21		45	
3	10			12	
4	1	14		20	
5	1	3			
6		1		3	
7	47	129		148	
8	73	185		73	
9	30	42		163	
Total :	175	395	5	464	7
Taux :	6,08%	13,73%	0,17%	16,13%	0,24%

Tableau 8 : détail des complications liées à l'utilisation complémentaire de BMPs

<i>études</i>	<i>infection</i>	<i>hématome</i>	<i>douleur chronique > 6 mois</i>	<i>non-union</i>	<i>autre</i>
<i>1</i>				2	5
<i>2</i>	4			4	
<i>3</i>	1				
<i>4</i>	14	5	8	16	
<i>Total :</i>	19	5	8	22	5
<i>Taux :</i>	17,12%	4,50%	7,21%	19,82%	4,50%

Chapitre 3

Développement de stratégies innovantes pour la régénération osseuse, et réflexions éthiques

L'objectif de ce chapitre est d'optimiser un implant synthétique bioactif utilisable à l'avenir en clinique pour des applications maxillo-faciales en médecine régénérative, et à développer des stratégies régénératives pouvant trouver leur place rapidement au sein de l'arsenal thérapeutique des soignants concernant les lésions osseuses.

- I. Implants nanostructurés avancés combinant des cellules mésenchymateuses et des nanoparticules de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) pour une amélioration de la vascularisation de tissus provenant de l'ingénierie tissulaire

Objectif : le succès de la réparation de tissus vascularisés et fonctionnels dépend de l'existence d'un support vasculaire, et représente toujours un défi. Notre objectif a été de développer un implant nano-actif, majorant l'activité des cellules endothéliales, en particulier pour l'ingénierie tissulaire osseuse dans le champ de la médecine régénérative.

Matériels et méthodes : nous avons développé une nouvelle stratégie d'implants tridimensionnels basée sur le relargage contrôlé et cellule-dépendant de nanoparticules de VEGF. Ces nanoparticules sont réparties de façon homogène et sous forme de nanoréservoirs sur le scaffold poreux, avec une réorganisation plus rapide des cellules endothéliales. L'activité de cet implant actif sur les cellules a aussi été modulé par l'adjonction de cellules ostéoblastiques.

Résultats et conclusions : cette stratégie innovante et sophistiquée devrait potentialiser l'efficacité des implants thérapeutiques actuels pour la réparation osseuse, permettant d'éviter d'avoir recours à des substitus osseux.

Ce travail a donné lieu à un article publié dans Nanomedicine (**article 2**).



Advanced nanostructured medical device combining mesenchymal cells and VEGF nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization

Aim: Success of functional vascularized tissue repair depends on vascular support system supply and still remains challenging. Our objective was to develop a nanoactive implant enhancing endothelial cell activity, particularly for bone tissue engineering in the regenerative medicine field. **Materials & methods:** We developed a new strategy of tridimensional implant based on cell-dependent sustained release of VEGF nanoparticles. These nanoparticles were homogeneously distributed within nanoreservoirs onto the porous scaffold, with quicker reorganization of endothelial cells. Moreover, the activity of this active smart implant on cells was also modulated by addition of osteoblastic cells. **Results & conclusion:** This sophisticated active strategy should potentiate efficiency of current therapeutic implants for bone repair, avoiding the need for bone substitutes.

First draft submitted: 29 April 2016; Accepted for publication: 20 July 2016; Published online: 16 August 2016

Keywords: endothelial cells • nanoreservoirs • VEGF nanoparticles

Surgical reconstructive procedures frequently require the use of additional tissues (autograft, xenograft, allograft) to restore the physiological functionality of damaged tissues. To overcome the complications associated with these methodologies (site morbidity, limited availability and host tissue reactivity), cell-based tissue-engineering strategies using sophisticated biomaterials have been developed. In the recent years, a plethora of advanced biomaterials mimicking extracellular matrix were designed, based on the micro- and nanoscale environment of tissues, using nanotechnologies such as graphene, nanogrooves and carbon nanotubes [1–8]. More recently, and with the development of the third-generation materials, there has been an increasing interest in developing nanoparticles (NPs) and nanoreservoirs containing active molecules able to bioactivate scaffolds [9–14].

Bone regeneration is a complex, well-orchestrated physiological process, which occurs

during normal healing of fractures, and is involved in continuous remodeling throughout adult life. In the past, a lot of active materials have been developed to improve bone tissue repair *in vivo* [15–18]. The first generation of biomaterials developed involved inert materials without any interaction with other components (prostheses...). Second-generation biomaterials (bioactive coating, biomimicking materials) were developed to promote biological activity while supporting implant functions, and were either resorbable or bioactive. The third-generation biomaterials are a combination between medical device and biological components (bioactive protein coating, endothelialization) and possess both bioresorbable and bioactive properties [19,20].

Applications for bone tissue engineering are various and depend on the severity of injuries to repair. The prosthesis domain aims at the replacement of bone after ablation due to severe injuries. The bone substitutes domain targets the substitution of bone-by-bone sub-

Quentin Wagner^{1,2}, Damien Offner^{1,2}, Ysia Idoux-Gillet^{1,2}, Imran Saleem³, Satyanarayana Somavarapu⁴, Pascale Schwinté^{1,2}, Nadia Benkirane-Jessel^{1,2} & Laetitia Keller^{1,2}

¹INSERM (French National Institute of Health & Medical Research),

"Osteoarticular & Dental Regenerative Nanomedicine" Laboratory, UMR 1109, Faculté de Médecine, F-67085 Strasbourg Cedex, FMTS, France

²Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 place de l'Hôpital, F-67000 Strasbourg, France

³School of Pharmacy & Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, Liverpool, L3 3AF, UK

⁴Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, University College London, 29-39 Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK

*Author for correspondence:

Tel.: +33 368 853 376
nadia.jessel@inserm.fr

[†]These authors contributed equally

stitute in the case of important lesions (up to 60 cm³), to prevent ablation. This domain needs materials that mimic the mechanical properties of healthy bone. More recently, the domain of regenerative medicine was developed to operate at an early stage, and promote the tissue regeneration by materials totally replaced by a functional and biological tissue without clear high mechanical properties. The aim is to avoid reaching the stage of filling by substitute. During the last few years, sophisticated biomaterials for bone regenerative medicine were developed in clinic, for example, in treatment of nonunion fractures or with guided tissue regeneration in the periodontal disease treatment. Those materials can be made bioactive by adding living cells or active growth factors. Among these strategies for bone tissue regeneration, two kinds of active materials can be considered: materials combined with active molecules targeting bone tissue regeneration (BMP-2, BMP-7) [15–18,21–26]; or active materials indirectly acting on bone repair through combination with angiogenic factors (VEGF, Ang1) [27–32], which have gained increased attention recently.

Indeed, vascularization of biomaterials prior to their implantation is a key feature for tissue repair as establishment of a vascular network provides nutrients, soluble factors, phosphate and calcium necessary for the bone healing process. For healthy tissue repair, the formation of blood vessels in 3D-engineered biomaterials still remains challenging today [27–29,33]. In order to increase vascularization within the implanted site, several active angiogenic materials were developed with majority based on cell activities [34–36] or added factors activity [30–32]. One of the main growth factors involved in angiogenesis is VEGF₁₆₅, which acts as an initiator and a modulator of the signaling cascade resulting in proliferation and migration of endothelial cells toward formation of new blood vessels [37,38]. Moreover, VEGF possesses a pivotal role during bone healing [38], and the sustained release of this growth factor was shown to promote the efficacy of bone regeneration [30]. Not only does VEGF activate proliferation and migration of endothelial cells, but it also recruits mononuclear and macrophage cells, which produce additional angiogenic factors [39]. Consequently, during the last few years, tridimensional scaffolds associated with endothelial cells were developed for the cell-based strategy with the goal to promote biomaterials vascularization [33–36]. Various studies have reported the development of VEGF-loaded NPs for bone regeneration, wound-healing angiogenesis, or inhibition of the graft shrinkage [40–43]. Most of these models offer a controlled release of VEGF, depending on various parameters (temperature, pH, ...). Herein, *via* entrapping VEGF-NPs in active nanoreservoirs,

we obtain cell contact-dependent access of NPs, depending solely on cells biological needs, avoiding short-lived effect and instability [44]. Moreover, this strategy of nanoreservoirs with chitosan allows keeping NPs with the biomaterials into the site of damage, and protects them from degradation activity due to their short life span, contrary to a passive release and diffusion *in situ*. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) are easily extractable and expanded to large numbers. These cells are frequently used for *in vitro* studies of angiogenesis since they are able to spontaneously organize into capillary-like structures without the help of additional angiogenic growth factors, and can spontaneously anastomosis with the host vasculature [29,45,46].

Recently, we developed by some electrospinning method a thick porous 3D nanofibrous poly(ϵ -caprolactone) (3D-PCL) scaffold able to accelerate the regeneration of a robust mineralized bone [22,23,47]. Herein, we have developed a double strategy combining both HUVECs and VEGF-NPs-active 3D nanofibrous scaffold to improve vascularization in tissue engineering for regenerative medicine applications focusing on bone regeneration. VEGF-NPs were used and integrated to the scaffold employing the layer-by-layer (LbL) technology, enabling an active cell-dependent release of the active molecule [14,48]. Moreover, mesenchymal cells (HOBs) were used to increase the efficiency of the designed nanoactive 3D scaffold, first by adhesion of endothelial cells (HUVECs), and then by improving endothelial cells activity.

Materials & methods

3D nanofibrous PCL scaffold preparation

PCL 80 kDa, analytical grade, was obtained from Perstorp (Malmö, Sweden). The PCL solution was prepared as previously described [22,23,47]: a solution of PCL (23% w/v in dimethylformamide: methylene chloride 1:1 v/v) was electrospun at high voltage (20 kV at the beginning), which was increased during the process (ending at 26 kV). The electrospinning device (EC-DIG electrospinning apparatus; IME Technologies, Eindhoven, Netherlands) delivered the solution at a constant rate of 1.2 ml/h in a 35% humidity and 30°C atmosphere. The distance between the needle and the collector was set at 16 cm. The electrospun jet was focused in a 25 mm hole within a 2.5 mm thick poly(methyl methacrylate) mask plate placed over the conductor. The electrospinning process was stopped when the designed material reached a thickness around 10 mm. Pieces of 3 mm diameter and 700 μ m of thickness were then cut for the experiments. The 3D electrospun nanofibrous membranes were kept in a desiccator at 45°C to remove residual solvents.

Preparation of VEGF-NPs & VEGF-NPs (hyaluronic acid)

Chitosan hydrochloride (CS; 30–400 kDa, HEPPE medical chitosan GmbH (HMC⁺), Germany) NPs were produced using an ionotropic gelling method. Sodium tripolyphosphate (TPP) (85%, Sigma-Aldrich Co., MO, USA) solution (1 mg/ml) was added dropwise to CS solution (1 mg/ml) at a ratio of 1:5 w/w under constant stirring at room temperature. The resultant NPs suspension was left under stirring for 20 min to ensure complete particle formation. hVEGF₁₆₅-loaded NPs were obtained using the same method incorporating VEGF (VEGF-NPs) 200 μ l (0.05% w/v) with TPP solution. Chitosan/hyaluronic acid (HA) NPs were prepared by the same ionotropic gelling method, with modifications. HA (10–20 kDa, Lifecore Biomedical, Chaska, Minnesota, USA; 0.625 mg/ml) was dissolved in ultrapure water and mixed with TPP solution (1 mg/ml) at a ratio 3.75:1 w/w under constant stirring at room temperature. This polyanionic phase was then added dropwise to CS (1 mg/ml) at a ratio of 1:1.80 w/w (HA/TPP: CS) under constant stirring at room temperature. VEGF-NPs (HA) were obtained using the same method incorporating VEGF (VEGF-NPs [HA]) 200 μ l (0.05% w/v) with TPP/HA solution. To obtain dry powders, all were freeze-dried. Samples were frozen at -80°C, 24 h with trehalose at ratio 1:8 (Trehalose: CS) and then freeze-dried for 28 h (Virtis Advantage, SP Scientific, PA, USA).

Nanoparticles' size characterization

Particle size analyses of freeze-dried samples were performed using dynamic light scattering (Zetasizer Nano series DTS 1060, Malvern Instruments Ltd, UK). Two milligrams of VEGF-NPs and VEGF-NPs (HA) were dispersed in 2 ml of 2-N-morpholino ethane sulfonic acid (MES) buffer (Sigma-Aldrich Co., 0.04 M MES, 0.15 M NaCl, pH 5.5), loaded into a cuvette and data recorded at 25°C (n = 3 suspensions).

Poly-lysine fluorescein-isothiocyanate staining of VEGF-NPs

Glass slides were treated with poly-glutamic acid (Sigma-Aldrich) (500 μ m/ml) for 15 min, rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min followed by addition with VEGF-NPs (3 mg/ml) for 15 min at room temperature. Finally, samples were rinsed in PBS for 15 min and then with poly-lysine fluorescein-isothiocyanate for 15 min. Glass slides were then observed under an epifluorescent microscope (LEICA DM 4000 B, Leica Microsystems, France).

Transmission electron microscopy observation

For visualization of VEGF-NPs and VEGF-NPs (HA), freeze-dried sample was dispersed in water and applied

to an electronic microscopy copper grid and stained with 2% phosphotungstic acid solution. The NPs were imaged by transmission electron microscopy (TEM) using an FEI CM 120 BioTwin transmission electron microscope (Philips Electron Optics BV, Netherlands) using acceleration voltage 120.0 kV (CM120, Philips Co., The Netherlands).

VEGF-NPs nanoreservoirs formation on 3D-PCL scaffold

VEGF-NPs were dissolved at 2 mg/ml in MES buffer (pH 5.5) and chitosan was added at a concentration of 0.5 mg/ml (Protasan UP CL 113, Novamatrix, Sandvika, Norway). The creation of nanoreservoirs containing VEGF-NPs on the nanofibers was carried out using the LbL technology: briefly the 3D electrospun scaffold was dipped six-times during 15 min alternately in solutions of NPs and bovine serum albumin (BSA) gold (Aurion, Binnenhaven, Wageningen, The Netherlands) or BSA (200 ng/ml; Euromedex, Souffelweyersheim, France). Each bath was followed by a rinsing step with MES buffer.

Scanning electron microscopy observation

To analyse the morphology of the functionalized 3D-PCL scaffolds, samples were fixed in paraformaldehyde 4% for 10 min at 4°C, then dehydrated and observed with a scanning electron microscope (SEM Hitachi TM 1000 or FEG Sirion XL; FEI) in conventional mode (high vacuum) by collecting either secondary electrons or a combination of secondary and retro-diffused electrons.

Cell culture

HUVECs and human primary osteoblasts (HOBs) were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany). The cells were cultured in specific growth medium (endothelial cell growth medium, osteoblast growth medium, respectively, PromoCell). The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. When cells reached confluence, they were harvested with trypsin (Ozyme, France) and subcultured.

HUVECs culture in collagen gel

HUVECs culture medium was mixed with collagen I (2 mg/ml; Institut de biotechnologie Jacques Boy, Reims, France), and NaOH (0.1 M) was added to adjust the pH of the preparation. The cellular suspension of HUVECs, containing or not VEGF-NPs (2 mg/ml), was added and the final solution was seeded on 3D-PCL scaffolds or in small Petri dishes, in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂ to polymerize the collagen gel. Cells in collagen gel on scaffolds were

then cultured in their corresponding growth medium in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂.

Cell viability

Alamar Blue® (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) was used to assess cell metabolic activity over time. In this study, 4×10^4 human osteoblasts were first seeded on 3D-PCL scaffolds containing or not nanoreservoirs of VEGF-NPs. After 7 days, 4×10^4 HUVECs were seeded on this precoated scaffold, and samples were cultured during a total of 28 days in a proliferative medium consisting of 50% HOB medium/50% HUVEC medium. Analyses were performed at days 7, 9, 14, 21 and 28 by culturing cells with a solution of 10% Alamar Blue/Dulbecco's Modified Eagle's Medium without phenol red (Lonza, Levallois-Perret, France) during 4 h in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. The same experiments were performed with HUVECs cells in collagen gel seeded on 3D-PCL equipped or not with VEGF-NPs (days 3, 7, 14, 21 and 28). Optical density of supernatants was measured at 575 and 590 nm in order to determine the percentage of Alamar Blue reduction. Statistical analyses were obtained by *t*-paired Student test.

Subcutaneous *in vivo* implantation in nude mice

All procedures regarding animals and tissues were designed in agreement with the recommendations of the EU (2010/63/EU), and were performed according to authorized investigator Dr N Jessel (Director of the Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine team), holder of a personal license from Préfecture du Bas-Rhin (number 67–315), who oversaw experiments done on mice. All experiments were performed in the Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine de Strasbourg with the approval number A 67–482–35 from the Veterinary Public Health Service of the Préfecture du Bas-Rhin, representing the French Ministry of Agriculture, Department of Veterinary Science.

The study involved nude male mice (Crl: NIH-Foxn1tm; Charles River, L'Arbresle, France) 6 weeks of age. The mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of 100 mg/kg of ketamine (VIRBAC Santé Animale; Centravet, Nancy, France) and injection of 10 mg/kg of Xylazine (Rompun® 2%, VIRBAC Santé Animale; Centravet, France) and animals were placed in a ventral decubitus position on a heating plate, under strict aseptic conditions. After skin incision, 3 mm long 3D-PCL scaffolds, with and without VEGF-NPs nanoreservoirs, which had been seeded with HOBs and HUVECs for 2 weeks (14 days), were subcutaneously implanted in the mice. The skin was then sealed with sutures and the mice' behavior was

observed after waking up and during the incubation time. The mice were sacrificed with an intraperitoneal injection of a lethal dose of ketamine and the samples were extracted after 4 and 8 days of implantation.

Immunofluorescence staining

Samples were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 10 min at 4°C and permeabilized with a 0.1% Triton X-100 solution for an hour at room temperature. To specifically label the surface of endothelial cells, samples were incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti-CD31 (1/400, Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA), followed by 1 h incubation at room temperature with the secondary anti-IgG of mouse coupled to Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Fisher Scientific, France). Samples were then incubated for 20 min in a solution of Alexa fluor 546-conjugated phalloidin (1/200, Life Technologies, Fisher Scientific). After this step, a solution of 200 nM DAPI (Sigma-Aldrich) was added to mark the nuclei of exposed cells. Observation of the samples was carried out using an epifluorescence microscope (Leica DM 4000 B).

Results

VEGF-NPs to design a nanoactive 3D biomaterial

To increase the efficiency of tissue repairing *in vivo*, we developed an active tridimensional biomaterial equipped with VEGF-NPs. Our team previously developed a 3D porous PCL scaffold (Figure 1A) by the electrospinning method, for bone regeneration [22,23,47]. As previously described, this 3D-PCL implant (Figure 1B) presents a superposition of spaced stratified layers of PCL nanofibers, facilitating macropores formation. This is an interconnected microporous/macroporous scaffold, constituted of nanofibers (700 µm of thickness; fibers of 689 ± 45 nm in diameter) able to mimic the collagen present in the extracellular matrix of healthy bone tissue, in favor of blood vessel colonization [22,23,47]. In this study, to make this 3D nanofibrous scaffold active, we first manufactured VEGF-NPs, and then added these to our 3D biomaterial. The VEGF-NPs are composed of chitosan forming the shell of the NPs, and VEGF encapsulated within the NPs. These VEGF-NPs were obtained by inotropic gelling and freeze-drying method (Figure 1C). These NPs have a mean size of 175.4 ± 4.1 nm for VEGF-NPs and 167.5 ± 10.6 nm for VEGF-NPs containing HA (VEGF-NPs [HA]) (Figure 1D). These observations, together with transmission electron microscopy observations (Figure 1E & F), did not show significant differences in size between the two types of VEGF-NPs. Then, we functionalized the 3D scaffold (Figure 2) by depositing VEGF-NPs. To this end, we employed our nanores-

ervoirs technology using the LbL technique [14]. After having tested different concentrations of VEGF-NPs to form the nanoreservoirs with chitosan solutions, we have found that the optimal condition to obtain a homogeneous deposition of NPs all along nanofibers of the scaffold, and throughout all the thickness of our 3D nanofibrous PCL, was a VEGF-NPs concentration of 2 mg/ml (data not shown). The LbL (BSA/VEGF-NPs)₆-treated nanofibers (Figure 2B) showed a more homogeneous deposition of VEGF-NPs encapsulated within nanoreservoirs all along the fibers (Figure 2B), confirmed by co-localization with gold-labeled BSA LbL (Figure 2C), compared with a single adsorption of VEGF-NPs (Figure 2A). Hence, we were able to design a porous tridimensional scaffold mimicking extracellular matrix (ECM) and homogeneously equipped with VEGF-NPs, ready to receive endothelial cells.

VEGF-NPs active 3D scaffold effect on endothelial cells

As endothelial cells require collagen motifs to adhere to a biomaterial, we used collagen gel to increase endothelial cells adhesion to the 3D-PCL scaffold. Behavior of endothelial cells in the presence of VEGF-NPs was first analyzed and results were observed by fluorescence staining. In the presence of VEGF-NPs, endothelial cells showed regular linear, tubule-like, cell organization (Figure 3C), compared with HUVECs cultured without additional VEGF-NPs (Figure 3B). As the endothelial cells organization in the presence of VEGF-NPs was confirmed in the collagen gel, we next analyzed the behavior of endothelial cells on the VEGF-NPs-active 3D-PCL scaffold. In this condition, Alamar Blue test showed no significant difference between cells cultured on VEGF-NPs scaffold and nonfunctionalized scaffold at each time point (Figure 3A), showing biocompatibility of VEGF-NPs nanofibrous scaffold with endothelial cells. However, significant difference was found for the nonfunctionalized scaffold between days 3 and 28. This result could be explained by a loss of collagen gel containing endothelial cells, during the incubation time. Endothelial cells reorganization was also observed in this active tridimensional material (Figure 3E). Hence, we showed that our 3D-PCL scaffold equipped with VEGF-NPs was active, and biocompatible for rapid endothelial cells activity and reorganization.

Double effect of VEGF-NPs active 3D-PCL & osteoblasts on endothelial cells

We sequentially used mesenchymal cells (HOBs) as a coating of VEGF-NPs active 3D-PCL, for the adhesion of endothelial cells.

We first investigated the biocompatibility of our 3D VEGF-NPs-active nanofibrous material preseeded with

HOBs during 7 days, and then covered by endothelial cells. Analysis showed an increase in the metabolic activity all along the culture and after seeding of endothelial cells on HOBs (Figure 4A). Interestingly, the metabolic activity was more important when endothelial cells were seeded on an HOB precoated VEGF-NPs active scaffold (Figure 4A) compared with cells seeded in collagen gel (Figure 3). At day 14, a significant difference occurred with cells cultured on VEGF-NPs biomaterials, showing more significant metabolic activity than cells without VEGF-NPs ($p = 0.018$) (Figure 4A). Moreover, at day 28, more tubule-like endothelial structures were observed on the VEGF-NPs 3D-PCL scaffold (Figure 4C). These results were observed by indirect immunofluorescence against endothelial-specific marker CD31 (Figure 4B & C). Endothelial cells (visible in green) were first able to adhere to the scaffold without any collagen gel (Figure 4B) and second, they were able to form tubule-like and linear structures on this double active implant (Figure 4C). We then subcutaneously implanted our double active scaffold in nude mice to observe its influence on host endothelial cells (Supplementary Figure 1). After 4 and 8 days *in vivo*, the macroscopic view of the implant revealed that when equipped with VEGF-NPs nanoreservoirs (NRs), it was able to increase the host vasculature recruitment (host endothelial cells) toward implant by 20% compared with nonfunctionalized one (Supplementary Figure 1). These results show the potential double activity of our scaffold with regard to endothelial cells. The effect of our implant on tubule-like structures formation was obtained by the addition of VEGF-NPs and improved by the precoating with human osteoblast cells HOBs.

Discussion

VEGF-NPs encapsulated in nanoreservoirs on a 3D scaffold to accelerate implant vascularization

In the last decade, a large variety of active biomaterials have been developed for tissue engineering [1,12–14,21–26,49–60]. Focusing on either cartilage or bone tissue regeneration and controlled and active release of growth factor, our team has developed several active nanofibrous materials equipped with active nanoreservoirs of BMP-2 and BMP-7 [14,21–26]. These natural collagen (Bio-Gide®, Geistlich Pharma, France SA) or polymeric (PCL) implants showed great potential in regenerative nanomedicine for bone regeneration with primary autologous cells (human mesenchymal stem cells, HOBs) [14,21–26]. The tridimensional electrospun PCL nanofibrous scaffold appeared to be promising due to its biomimicking architecture, with high porosity and enhanced pore interconnectivity, improving cell colonization and infiltration [22,23]. Particularly for bone tissue

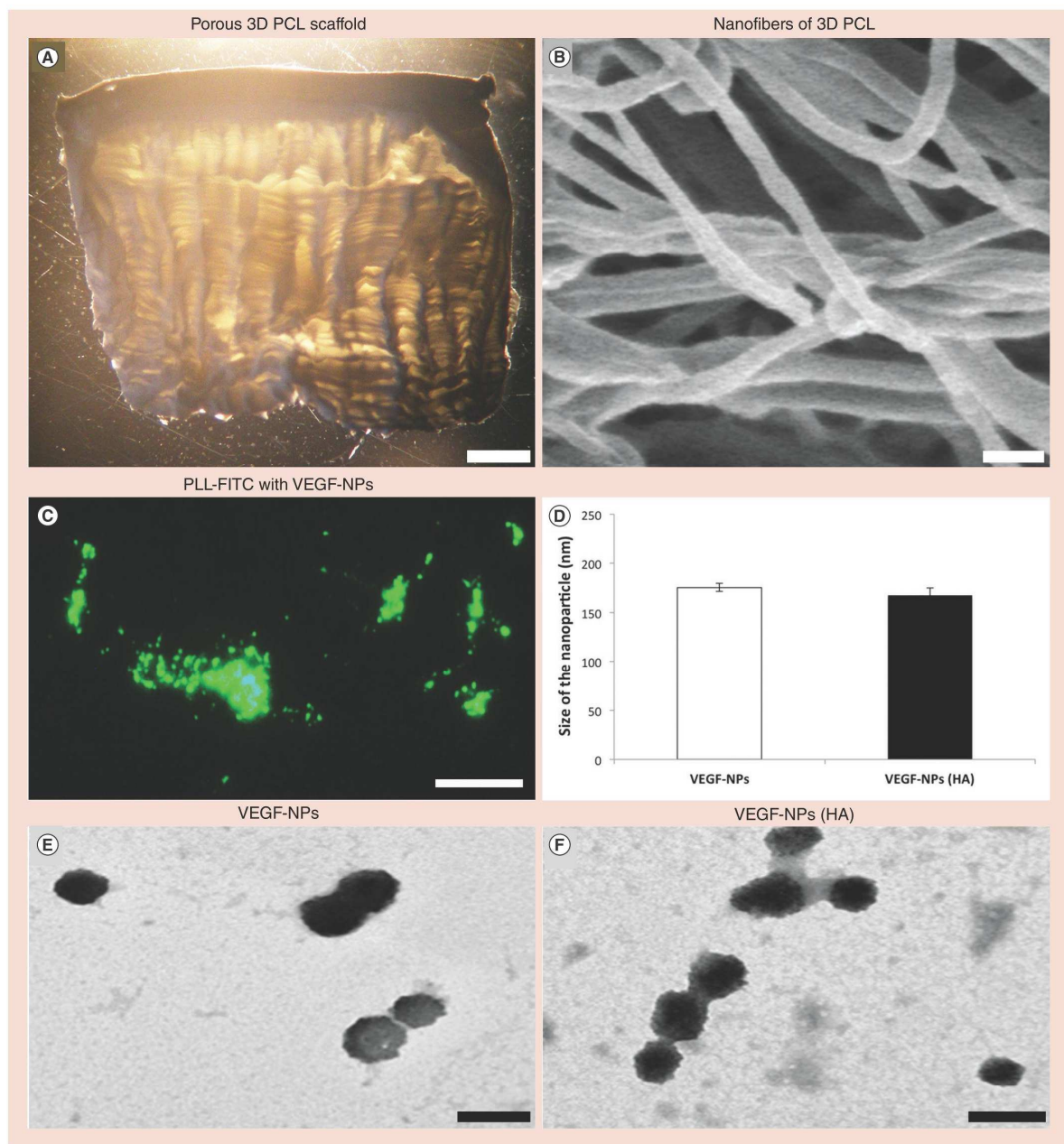


Figure 1. (A) Macroscopic view of the tridimensional nanofibrous PCL porous scaffold. (B) SEM image of nanofibers forming the 3D-PCL scaffold. (C) Fluorescence visualization of the VEGF-NPs, coated with PLL-FITC after adsorption on glass. (D) Size measurement of the VEGF-NPs (designed with chitosan or a mixture of chitosan/hyaluronic acid) determined by dynamic light scattering ($n = 3$). All values are expressed as mean \pm SEM. (E & F) TEM pictures of the VEGF-NPs confirming their size and shape. Scale bars: (A) 2 mm, (B) 400 nm, (C) 1 μ m, (E & F) 200 nm. FITC: Fluorescein isothiocyanate; HA: Hyaluronic acid; NP: Nanoparticle; PCL: Poly(ϵ -caprolactone); PLL: Poly-L-lysine.

engineering and blood supply during the early stages of postimplantation, it is necessary to provide a fast and sufficient blood perfusion within implants for calcium and phosphorus distribution, nutrients and oxygen dif-

fusion, and elimination of wastes. Bone healing can be improved by adjusting the speed of vascularization, and during the last 5 years, attempts have been made to increase vascularization in the tissue-engineering field [27–29,33,38,39]. Hence, basic strategies using scaffolds focused first on the use of cells (HUVEC, EPC) [30–32], and second on the use of active molecules (VEGF, AngI.) operating on endothelial cells [34–36] to promote proliferation, migration, sprouting and establishment of functional blood vessel. In our strategy, we chose to use not only VEGF active molecules (VEGF-NPs), but also endothelial and mesenchymal cells. VEGF plays a pivotal role in bone healing and remodeling. Moreover, if a local excessive dose of VEGF is released over a short time period, this leads to generation of nonfunctional and leaky blood vessels. To this end, a more sustained release over time is required to promote angiogenesis [30], which is the case in our strategy of nanoreservoirs. Hence, the effects of VEGF on biological processes are dose dependent. Our technology of nanoreservoirs created by LbL allowed a homogeneous distribution of VEGF-NPs all over the scaffold and enabled an active and controlled release of VEGF-NPs, dependent on the cells contact to the nanoreservoirs [14,48]. In our strategy, HUVECs cells will recognize and adhere to chitosan, whether it is present on NPs or in our nanoreservoirs functionalization. In the case of active nanoreservoirs, cells will degrade nanoreservoirs by enzymatic reaction and will have an access to the NPs containing VEGF. Moreover, encapsulated active molecules represent a major advantage considering the short half-life of the VEGF (50 min). Our nanoreservoir technology overcomes potential damages that can occur to VEGF by protecting it within nanoreservoirs.

Double effect of VEGF-NPs & mesenchymal cells (HOBs) on endothelial cells organization

Our nanofibrous scaffold was obtained from polycaprolactone by electrospinning. This nanostructured material has already shown its efficacy in terms of bone regeneration with mesenchymal stem cells and primary human osteoblastic cells [14,21–23]. Moreover, this 3D material leads to a homogeneous attachment of osteoblastic cells [14,21–23]. When dotted with chitosan-growth factor nanoreservoirs, 3D-PCL allows cell adhesion specifically in clusters onto the nanoreservoirs, contrary to nonfunctionalized PCL. The adherence of osteoblastic cells in clusters will further create a cluster of endothelial cells adhesion, where these cells will reorganise, thanks to the angiogenic environment provided by osteoblastic cells. However, adhesion of endothelial cells requires collagen moieties [61,62]. Hence, in this study we used a collagen gel to improve endothelial cells adhesion. In these condi-

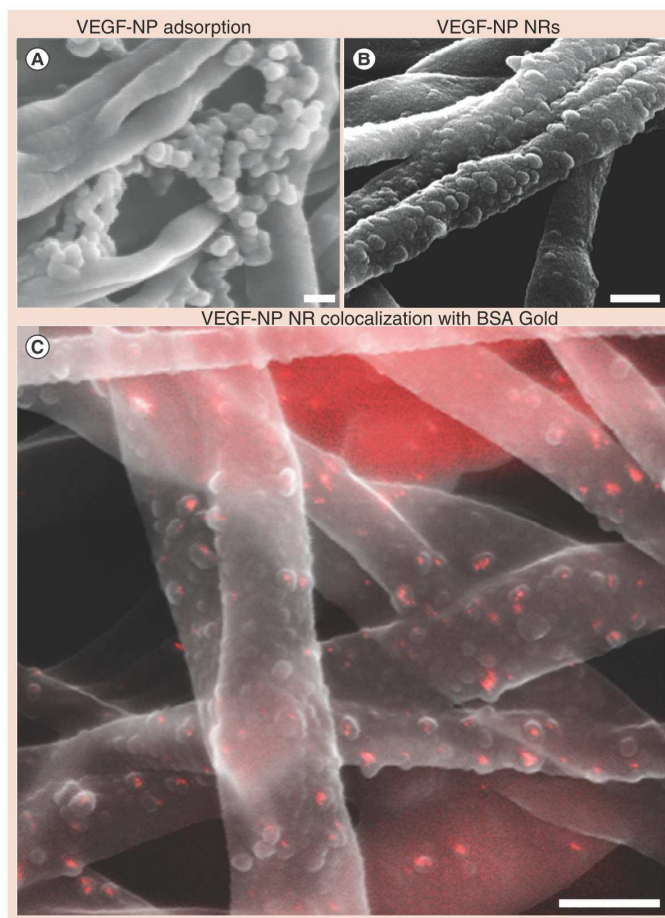


Figure 2. SEM visualization of the active VEGF-NPs on 3D-PCL nanofibers. (A) Simple adsorption of VEGF-NPs (1 mg, overnight) onto the 3D-PCL scaffold. (B & C) VEGF-NP functionalization of the 3D-PCL using NR technology (LbL): (B) Homogeneous repartition of the VEGF-NP NRs all along the nanofibres, and (C) co-localization of the same NRs when gold-labeled BSA replaced BSA. Scale bars: 400 nm.

BSA: Bovine serum albumin; NP: Nanoparticle; NR: Nanoreservoir

tions, HUVECs were able to reorganize linearly, in the presence of VEGF-NPs directly in collagen gel or onto the 3D-PCL scaffold. However, the use of collagen with 3D-PCL scaffold presents technical limitations. Hence, in this study we adapted another alternative to improve endothelial cells adhesion to PCL, with the use of functionalized PCL scaffolds precoated with mesenchymal cells. In our study, the sequential seeding, with mesenchymal osteoblastic cells prior to endothelial cells, leads to a primo-access of mesenchymal cells to VEGF. These cells will serve as anchor to endothelial cells attachment to the biomaterial; and secretor of growth factor for activation/reorganization of endothelial cells.

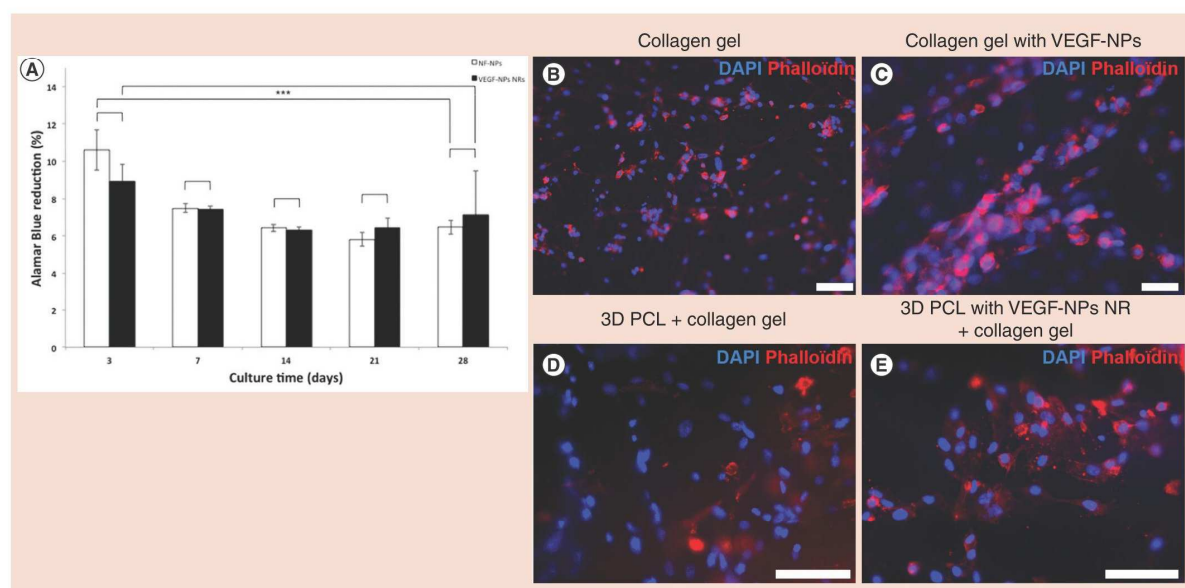


Figure 3. *In vitro* biocompatibility of VEGF-NPs with endothelial cells. (A) An Alamar Blue® test was performed on a 3D-PCL scaffold functionalized with VEGF-NPs nanoreservoirs, embedded in a collagen gel containing endothelial cells. This test was performed at 3, 7, 14, 14, 21 and 28 days post-embedding (n = 3). All values are expressed as mean ± SEM. Differences were considered significant at 95% CI. (B–E) Cells organization visualized by fluorescence staining (Blue DAPI staining for the nuclei, red phalloidin staining for actin cytoskeleton). HUVECs were seeded in a collagen gel without VEGF-NPs (B) or with VEGF-NPs (C) and cultured on a 3D-PCL scaffold containing VEGF-NPs nanoreservoirs (E) or not (D). Scale bars: (B–E) 100 μm. *p < 0.1 = significant; **p < 0.05 = very significant; ***p < 0.01 = extremely significant. NP: Nanoparticle; NR: Nanoreservoir; PCL: Poly(ε-caprolactone).

In this study we developed an active scaffold able to improve and accelerate endothelial cells organization in tubule-like structures and host vasculature recruitment in the implant after implantation to ameliorate tissue-engineering efficacy. After showing the efficiency of VEGF-NPs on HUVECs behavior, we used HOBs to improve their adhesion on PCL scaffold. Actually, cells of mesenchymal origin, either by their capacity to secrete extracellular matrix (decellularized matrix) or by their own particular nature, were exploited to improve cell attachment on noncollagen materials [48,63,64]. Processes of angiogenesis and bone formation are thought to be in close interaction in bone healing. Moreover HOBs and mesenchymal stem cells are known to increase the stability of *in vitro* and *in vivo* tubule-like structure formation by endothelial cells [29,65]. Recently, much attention has been implemented in endothelial cells as mediators of osteogenic differentiation, since the combined use of mesenchymal cells (HOBs, mesenchymal stem cells) significantly enhanced the ability of osteogenic differentiation tissue *in vitro* [22,23,66–68]. With the combination of the two strategies in one material (VEGF-NPs and the use of HOBs), we were able to accelerate host vascularization of the implant *in vivo*. These results could be explained

by the fact that VEGF was not only available *via* our NPs for exogenic endothelial cells added to the scaffold, but also that HOBs and HUVECs used synergistically secrete more angiogenic factors compared with HUVECs alone [69]. Moreover, the access of HOBs to the VEGF-NPs can increase the secretion of angiogenic factors in the implant, resulting in the VEGF molecules acting directly on osteoblasts proliferation and migration [70]. Thus, in our double strategy, endothelial cells will adhere to the VEGF-NPs material *via* the prior matrix secretion of HOBs. HOBs, degrading nanoreservoirs by enzymatic reaction, will have an access to the VEGF-NPs, and will secrete angiogenic factor used by HUVECs. Based on the capacity of exogenous endothelial cells to anastomose with host vasculature [29], we subcutaneously implanted our double active implant and observed an enhanced initiation of host vasculature in the implant containing VEGF-NPs compared with the nonfunctionalized scaffold. Controlled drug release is an important field for human health. In most cases, the materials developed for regenerative medicine, using VEGF [40–43], lead to a high-dose passive release with overdoses, side effects and the progression of tumors [71], particularly in regeneration of tissues damaged after irradiation. With our double strategy,

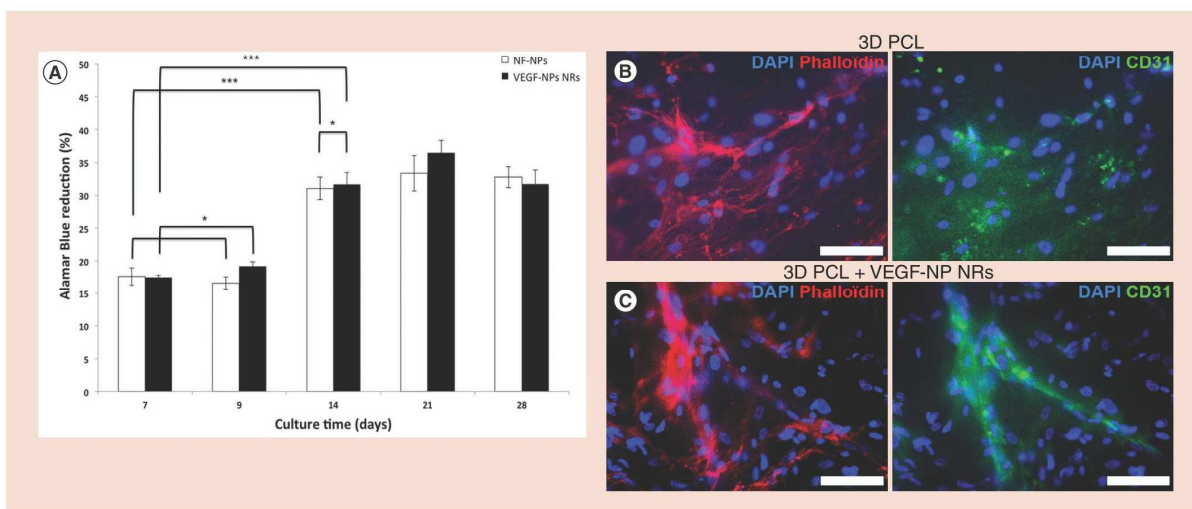


Figure 4. *In vitro* behavior of HUVECs cultured on the double active VEGF-NPs 3D-PCL scaffold. Active VEGF- NPs PCL was first pre-coated with osteoblasts (HOBs) (cultured during 7 days) and then seeded with HUVECs and cultured during a total of 28 days. **(A)** Alamar Blue® test was performed on a 3D-PCL scaffold functionalized with empty-NPs (chitosan nanoparticle, VEGF free, noted as NF-NPs) nanoreservoirs or with VEGF-NPs NRs at D7 (prior to HUVECs addition), D9, D14, D21 and D28 (n = 3). All values are expressed as mean ± SEM. Differences were considered significant at 95% CI. **(B & C)** Cells organization visualized by fluorescence staining at D28. In blue, DAPI staining for the nuclei; in red, phalloidin staining for actin cytoskeleton and in green, CD31 for the specific staining of endothelial cells. Scale bars: 100 μm.

*p < 0.1 = significant; **p < 0.05 = very significant; ***p < 0.01 = extremely significant.

CD31: Cluster of differentiation 31; NF: Nonfunctionalized; NP: Nanoparticle; NR: Nanoreservoir; PCL: Poly(ε-caprolactone).

VEGF release is sustained and dependent on cells adhesion and contact, and reliant on their own needs. Moreover, the growth factor release is localized at the desired site, avoiding thus side effects.

Conclusion

In the last few years, new tissue-engineering strategies for bone repair have focused on vascularization to improve the quality of repaired tissues. In this work, our aim was to develop a new strategy of active implant leading to improve endothelial cells organization. This strategy can improve vascularization *in situ* and can enhance the repair potential of tissues *in vivo*. In this study, we developed a 3D biodegradable and polymeric scaffold, highly porous, active for endothelial cells organization and improving the speed of cell reorganization by incorporating VEGF-NPs. This scaffold was active toward endothelial cells not only *via* the incorporation of VEGF-NPs, but also *via* incorporation of osteoblast cells as pre-coating on our 3D-PCL nanofibrous scaffold. This work highlights the nanofibrous implant potential, offering an active and sustained release of angiogenic growth factor for regenerative medicine application. The double effect obtained *in vivo* with this living implant can be transferred to the clinic, taking advantage of the therapeutic potential of mesenchymal stem cells.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/nnm-2016-0189

Acknowledgements

The authors thank J-L Weickert and V Demais for their help with SEM acquisition, and J-S Remy and B Frisch for the use of the zetasizer device.

Financial & competing interests disclosure

Q Wagner, L Keller and D Offner are indebted to Faculté de Chirurgie Dentaire for the financial support. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Executive summary

Design of a tridimensional active material for regenerative medicine

- We have developed here a VEGF-active tridimensional polymeric material containing a homogeneous repartition of nanoparticles with a cell contact-dependant active release.
- The entrapment of VEGF nanoparticles in nanoreservoirs is able to have an effect on endothelial cells behavior.
- This material offers an active and sustained release of angiogenic growth factor for regenerative medicine application.

Double strategy to promote endothelial cell reorganization for regenerative medicine

- The adhesion of mesenchymal cells onto the VEGF nanoreservoirs material enables to potentiate its own capacity to act on endothelial cells behavior.
- The use of mesenchymal cells and VEGF nanoparticles can increase the endothelial cells reorganization.
- This double strategy can promote angiogenesis after implantation and can potentiate the current implants used in regenerative medicine.

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest.

- 1 Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat. Nanotechnol.* 6(1), 13–22 (2011).
- 2 Gusić N, Ivković A, VaFaye J *et al.* Nanobiotechnology and bone regeneration: a mini-review. *Int. Orthop.* 38(9), 1877–1884 (2014).
- 3 Kane R, Mai PX. Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone. *Mater. Today (Kidlington)* 16(11), 418–423 (2013).
- 4 Lim JY, Loisel AE, Lee JS, Zhang Y, Salvi JD, Donahue HJ. Optimizing the osteogenic potential of adult stem cells for skeletal regeneration. *J. Orthop. Res.* 29(11), 1627–1633 (2011).
- 5 Metzger W, Schwab B, Miro MM *et al.* Induction of osteogenic differentiation by nanostructured alumina surfaces. *J. Biomed. Nanotechnol.* 10(5), 831–845 (2014).
- 6 Nayak TR, Andersen H, Makam VS *et al.* Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS Nano* 5(6), 4670–4678 (2011).
- 7 Watari S, Hayashi K, Wood JA *et al.* Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves. *Biomaterials* 33(1), 128–136 (2012).
- 8 Gong T, Xie J, Liao J, Zhang T, Lin S, Lin Y. Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Res.* 10(3), 15029 (2015).
- 9 Zhang S, Uludağ H. Nanoparticulate systems for growth factor delivery. *Pharm. Res.* 26(7), 1561–1580 (2009).
- 10 Wang X, Wenk E, Zhang X, Meinel L, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. *J. Control. Release* 134(2), 81–90 (2009).
- 11 Fioretti F, Mendoza-Palomares C, Helms M *et al.* Nanostructured assemblies for dental application. *ACS Nano* 4(6), 3277–3287 (2010).
- 12 Facca S, Cortez C, Mendoza-Palomares C *et al.* Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(8), 3406–3411 (2010).
- 13 Facca S, Lahiri D, Fioretti F *et al.* In vivo osseointegration of nano-designed composite coatings on titanium implants. *ACS Nano* 5(6), 4790–4799 (2011).
- 14 Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S *et al.* Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 6(1), 483–490 (2012).
- Describes the methodology and the interest of the nanoreservoirs technology built up on nanofibrous materials.
- 15 Giannoudis PV, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury.* 40(Suppl. 3), S1–S3 (2009).
- 16 Jimi E, Hirata S, Osawa K, Terashita M, Kitamura C, Fukushima H. The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. *Int. J. Dent.* 2012, e148261 (2012).
- 17 Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 9(1), 66 (2011).
- 18 Nyberg E, Holmes C, Witham T, Grayson WL. Growth factor-eluting technologies for bone tissue engineering. *Drug Deliv. Transl. Res.* 6(2), 184–194 (2016).
- 19 Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40(5), 363–408 (2012).
- 20 Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 295(5557), 1014–1017 (2002).
- 21 Ferrand A, Eap S, Richert L *et al.* Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol. Biosci.* 14(1), 45–55 (2014).
- 22 Eap S, Ferrand A, Palomares CM *et al.* Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering. *Biomed. Mater. Eng.* 22(1–3), 137–141 (2012).
- Describes the methodology and efficient parameters to assess the design of a thick tridimensional nanofibrous material by electrospinning process.
- 23 Eap S, Keller L, Schiavi J *et al.* A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and

- stem cells for bone regeneration. *Int. J. Nanomedicine* 10, 1061–1075 (2015).
- Describes the advantage of a tridimensional nanofibrous poly(e-caprolactone) material with living stem cells and growth factor for bone regenerative medicine.
- 24 Schiavi J, Keller L, Morand D-N *et al.* Active implant combining human stem cell microtissues and growth factors for bone-regenerative nanomedicine. *Nanomedicine (Lond.)* 10(5), 753–763 (2015).
 - 25 Eap S, Ferrand A, Schiavi J *et al.* Collagen implants equipped with “fish scale”-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine (Lond.)* 9(8), 1253–1261 (2014).
 - 26 Eap S, Keller L, Ferrand A *et al.* Nanomechanical properties of active nanofibrous implants after *in vivo* bone regeneration. *Nano LIFE* 4(1), 1450001–1450010 (2013).
 - 27 Kaully T, Kaufman-Francis K, Lesman A, Levenberg S. Vascularization – the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15(2), 159–169 (2009).
 - 28 Mercado-Pagán ÁE, Stahl AM, Shanjani Y, Yang Y. Vascularization in bone tissue engineering constructs. *Ann. Biomed. Eng.* 43(3), 718–729 (2015).
 - 29 Tsigkou O, Pomerantseva I, Spencer JA *et al.* Engineered vascularized bone grafts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(8), 3311–3316 (2010).
 - 30 Wernike E, Montjovent M-O, Liu Y *et al.* VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation *in vivo*. *Eur. Cell Mater.* 19, 30–40 (2010).
 - 31 Wang K, Chen X, Pan Y *et al.* Enhanced vascularization in hybrid PCL/gelatin fibrous scaffolds with sustained release of VEGF. *Biomed. Res. Int.* 2015, 865076–865086 (2015).
 - 32 Lenze U, Pohlig F, Seitz S *et al.* Influence of osteogenic stimulation and VEGF treatment on *in vivo* bone formation in hMSC-seeded cancellous bone scaffolds. *BMC Musculoskelet. Disord.* 15, 350–360 (2014).
 - 33 Baiguera S, Ribatti D. Endothelialization approaches for viable engineered tissues. *Angiogenesis* 16(1), 1–14 (2013).
 - 34 Sasaki J-I, Hashimoto M, Yamaguchi S *et al.* Fabrication of biomimetic bone tissue using mesenchymal stem cell-derived three-dimensional constructs incorporating endothelial cells. *PLoS ONE* 10(6), e0129266 (2015).
 - 35 Guerrero J, Carros S, Derkaoui S-M *et al.* Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater.* 9(9), 8200–8213 (2013).
 - 36 McFadden TM, Duffy GP, Allen AB *et al.* The delayed addition of human mesenchymal stem cells to pre-formed endothelial cell networks results in functional vascularization of a collagen-glycosaminoglycan scaffold *in vivo*. *Acta Biomater.* 9(12), 9303–9316 (2013).
 - 37 Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(5), 359–371 (2006).
 - 38 Kleinheinz J, Stratmann U, Joos U, Wiesmann H-P. VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 63(9), 1310–1316 (2005).
 - 39 Grunewald M, Avraham I, Dor Y *et al.* VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124(1), 175–189 (2006).
 - 40 Geng H, Song H, Qi J, Cui D. Sustained release of VEGF from PLGA nanoparticles embedded thermo-sensitive hydrogel in full-thickness porcine bladder acellular matrix. *Nanoscale Res. Lett.* 6(1), 312–320 (2011).
 - 41 Subbiah R, Hwang MP, Van SY *et al.* Osteogenic/angiogenic dual growth factor delivery microcapsules for regeneration of vascularized bone tissue. *Adv. Healthc. Mater.* 4(13), 1982–1992 (2015).
 - 42 Mohandas A, Anisha BS, Chennazhi KP, Jayakumar R. Chitosan–hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 127, 105–113 (2015).
 - 43 Jiang X, Xiong Q, Xu G *et al.* VEGF-loaded nanoparticle-modified BAMAs enhance angiogenesis and inhibit graft shrinkage in tissue-engineered bladder. *Ann. Biomed. Eng.* 43(10), 2577–2586 (2015).
 - 44 Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S *et al.* Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 6(1), 483–490 (2012).
 - 45 Arnaoutova I, Kleinman HK. *In vitro* angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat. Protoc.* 5(4), 628–635 (2010).
 - 46 Dickinson LE, Moura ME, Gerecht S. Guiding endothelial progenitor cell tube formation using patterned fibronectin surfaces. *Soft Matter.* 6(20), 5109–5119 (2010).
 - 47 Eap S, Morand D, Claus F *et al.* Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce bone. *Biomed. Mater. Eng.* 25(0), 79–85 (2015).
 - 48 Tang Z, Wang Y, Podsiadlo P, Kotov NA. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. *Adv. Mater.* 18(24), 3203–3224 (2006).
 - 49 Chatterjea A, Meijer G, van Blitterswijk C, de Boer J. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells International* (2010). <https://www.hindawi.com/journals/sci/2010/215625/abs/>
 - 50 Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials. *Science* 263(5154), 1715–1720 (1994).
 - 51 Hubbell JA. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (NY)* 13(6), 565–576 (1995).
 - 52 Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 428(6982), 487–492 (2004).
 - 53 Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science* 295(5557), 1009–1014 (2002).
 - 54 Chaikof EL, Matthew H, Kohn J, Mikos AG, Prestwich GD, Yip CM. Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. *Ann. NY Acad. Sci.* 961, 96–105 (2002).
 - 55 Yang C, Hillas PJ, Báez JA *et al.* The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs* 18(2), 103–119 (2004).

- 56 Kumar G, Tison CK, Chatterjee K et al. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials* 32(35), 9188–9196 (2011).
- 57 Pullela SR, Andres C, Chen W, Xu C, Wang L, Kotov NA. Permselectivity replication of artificial glomerular basement membranes in nanoporous collagen multilayers. *J. Phys. Chem. Lett.* 2(16), 2067–2072 (2011).
- 58 Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng. Part B Rev.* 14(1), 61–86 (2008).
- 59 Choi J-Y, Jung H-J, Park B-J, Joung Y-K, Park K-D, Han D-K. Adhesion behavior of chondrocyte and osteoblast on surface-modified biodegradable PLLA films and scaffolds. *Polymer Korea* 36(3), 357–363 (2012).
- 60 Shah NJ, Hong J, Hyder MN, Hammond PT. Osteophilic multilayer coatings for accelerated bone tissue growth. *Adv. Mater. Weinheim* 24(11), 1445–1450 (2012).
- 61 de Mel A, Jell G, Stevens MM, Seifalian AM. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. *Biomacromolecules* 9(11), 2969–2979 (2008).
- 62 Lin Q, Ding X, Qiu F, Song X, Fu G, Ji J. In situ endothelialization of intravascular stents coated with an anti-CD34 antibody functionalized heparin-collagen multilayer. *Biomaterials* 31(14), 4017–4025 (2010).
- 63 Xu Y, Yan M, Gong Y, Chen L, Zhao F, Zhang Z. Response of endothelial cells to decellularized extracellular matrix deposited by bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7(12), 4997–5003 (2014).
- 64 Moroni F, Mirabella T. Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering. *Am. J. Stem Cells* 3(1), 1–20 (2014).
- 65 Pill K, Hofmann S, Redl H, Holthöner W. Vascularization mediated by mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: a comparison. *Cell Regen. (Lond.)* 4, 8 (2015).
- 66 Pedersen TO, Blois AL, Xing Z et al. Endothelial microvascular networks affect gene-expression profiles and osteogenic potential of tissue-engineered constructs. *Stem Cell Res. Ther.* 4(3), 52–62 (2013).
- 67 Grellier M, Bordenave L, Amédée J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 27(10), 562–571 (2009).
- Describes the importance of reciprocal interactions between osteoblastic and endothelial cells, occurring during bone development, and its importance to generate a vascularized construct for bone regeneration.
- 68 Brennan M, Davaine J-M, Layrolle P. Pre-vascularization of bone tissue-engineered constructs. *Stem Cell Res. Ther.* 4(4), 96–99 (2013).
- 69 Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CPD. Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 214(2), 537–544 (2008).
- 70 Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *J. Biol. Chem.* 282(37), 26746–26753 (2007).
- 71 Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 102(8), 898–901 (2000).

II. Des éponges de collagène comme support de vascularisation pour la médecine régénérative osseuse

Le temps nécessaire à l'obtention d'un tissu osseux régénéré fonctionnel dépend de l'existence d'un support vasculaire fiable. Les techniques actuelles utilisées en clinique, par exemple après une extraction dentaire, ne permettent pas de regagner ou de préserver le volume osseux initial. Notre but est de développer un implant actif cellularisé de troisième génération, équipé de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs) pour améliorer la qualité de la vascularisation de l'implant. Nous avons ensemencé un implant collagénique retrouvé dans le commerce avec des hMSCs puis avec des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVECs). Nous avons analysé la biocompatibilité et le comportement des cellules endothéliales avec cet implant. Nous avons observé une biocompatibilité de l'implant actif et une réorganisation des cellules endothéliales en réseaux groupés. Ce travail montre la possibilité de développer un implant de troisième génération, support de vascularisation, améliorant la prise en charge des patients.

Ce travail a donné lieu à un article soumis dans *Bio-Medical Materials and Engineering* (**article 3**).

Collagen sponges as a support for vascularization for bone regenerative medicine

(article 3, soumis dans Bio-Medical Materials and Engineering)

Damien Offner^{a,b,c, 1}, Quentin Wagner^{a,b, 1}, Nadia Benkirane-Jessel^{a,b,*}, and Laetitia Keller^{a,b}

^a INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), ‘Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine’ laboratory, UMR 1109, Faculté de Médecine, F-67085 Strasbourg Cedex. FMTS

^b Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 8 rue Ste Elisabeth, F-67000 Strasbourg

^c Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), 1 place de l’Hôpital, F-67000 Strasbourg

¹ These authors have equally contributed to this work

* Correspondance should be addressed to Nadia Jessel, E-mail: nadia.jessel@inserm.fr, Phone: +33 368853376

Abstract. The time needed to obtain functional regenerated bone tissue depends on the existence of a reliable vascular support. Current techniques used in clinic, for example after tooth extraction, do not allow regaining or preserving the same bone volume. Our aim is to develop a cellularized active implant of the third generation, equipped with human mesenchymal stem cells to improve the quality of implant vascularization. We seeded a commercialized collagenic implant with human mesenchymal stem cells (hMSCs) and then with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). We analyzed the biocompatibility and the behavior of endothelial cells with this implant. We observed a biocompatibility of the active implant, and a re-organization of endothelial cells into clustered networks. This work shows the possibility to develop an implant of the third generation supporting vascularization, improving the medical care of patients.

Keywords: Collagenic implant, vascularization, mesenchymal stem cells, endothelial cells

1. Introduction

These recent years, into the regenerative medicine field, a plethora of biomaterials based on polymeric (PLA (poly lactic acid), PGA (polyglycolic acid), PCL (poly- ϵ -caprolactone) or natural (collagen, alginate, fibrin, chitosan) components were developed, aiming to offer an ideal environment supporting tissue regeneration after implantation. More particularly for bone tissue engineering, the implantation of collagenic implants in a bone defect is a practice which aim is hemostasis [1], commonly used after a tooth extraction for example. Collagen promotes the formation of a stable clot and helps reduce post-operative bleeding [2]. Moreover, the clinical use of collagenic biomaterials in dental surgery promotes guided bone regeneration, inter alia by means of tissue exclusion [3]. However, none of the techniques currently used in clinic to preserve or regain a good quality of bone or its initial volume (bone substitutes, allografts, xenografts, membranes of collagen for guided bone regeneration) gives satisfaction [4]. Furthermore, some xenografts have disadvantages such as high cost and low presence of autogenous bone in the rebuilt tissue volume, due to the low adsorbability of the material [5].

The deposit of a simple collagen implant into bone defects does not provide satisfactory results, compared to natural bone healing [6-10]. Thus, during these last decades, several kinds of active materials were developed [11-16]. These materials can be active by the addition of growth factors, or by the addition of living cells, to create a material of the third generation, which is specifically the case for regenerative medicine. Indeed, for bone regenerative medicine, collagen sponges have the advantage to be able to locally deliver active molecules (growth factors, antibiotics...) [17-20]. Studies have shown that the addition of bone morphogenetic protein (BMP) to collagen sponges significantly improved bone regeneration [21-24]. However, this technique also presents a major inconvenient: the local release of the molecules is too fast and thus, causes overdosing and adverse effects [18].

Another way to influence the quality and speed of bone regeneration is the ability to facilitate the development of a vascular network in the bone tissue during regeneration.

This network will provide the nutrients and minerals necessary for cells, conveying cellular waste [25-27], and therefore avoid the potential necrosis in the middle of bone defects of a moderate size. Nowadays, with the development of materials of the third generation, the single use of cells can be associated to the materials to increase efficiency of materials and tissue repair. The important use of human mesenchymal stem cells in regenerative medicine comes from their important therapeutic effects [28, 29]. These cells are not only able to directly participate to tissue healing and repair by bone tissue differentiation, but also indirectly via paracrine secretion of angiogenic, neurogenic and anti-apoptotic factors [30]. Moreover, and particularly for the formation of vascular network, it was well demonstrated that these cells present the potential to form functional blood vessels [31, 32].

Our aim is to develop active materials of the third generation offering an ideal environment for vascularization. In this work, we used a porous collagen sponge, and we associated human mesenchymal stem cells to human endothelial cells in culture. We analyzed their biocompatibility and their behavior *in vitro*.

2. Material and methods

2.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Collagen sponges (Pangen, Resorbable haemostatic collagen compress, Urgo Medical) were cut in pieces and fixed in paraformaldehyde (PFA) 4% for 10 minutes at 4°C. They were then dehydrated, and observed with a scanning electron microscope (SEM Hitachi TM 1000 or FEG Sirion XL; FEI) in conventional mode (high vacuum) with a secondary electron detector.

2.3. Cell culture

Collagen sponges (Pangen, Resorbable haemostatic collagen compress, Urgo Medical) were cut (5mm of diameter) and placed in multiwall pates. They were then sterilized by 30-min exposure to UV light (254 nm, 30W, distance 20 cm), and equilibrated in contact with 1 mL of serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) prior to cell culture. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and Human mesenchymal stem cells (hMSCs) were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany). The cells were cultured in specific growth medium supplemented with supplement mix (respectively endothelial cell growth medium, and mesenchymal stem cells growth medium, PromoCell). The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. When cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin and subcultured.

2.4. Biocompatibility

Alamar Blue® (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) was used to assess cell metabolic activity over time. The Alamar Blue® test is a water-soluble, non-toxic, colorimetric redox indicator that changes color in response to cell metabolism. 15×10^3 MSCs were seeded on each collagen sponge. 7 days after, 55×10^3 HUVECs were seeded on the same sponges, and samples were cultured during a total of 21 days in a proliferative medium consisting of half MSC-medium, and half HUVECs-medium (n=4). At D3, D14, and D21, cells were incubated in 10% Alamar Blue® / D-MEM without phenol red (Lonza, Levallois-Perret, France) solution in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. After 4 h, incubation medium was transferred to 96-well plates and absorbances at 570 and 595 nm were measured to determine the percentage of Alamar Blue® reduction. Statistical analysis was obtained by t Student test. A probability p-value < 0.05 was considered significant to reject the null hypothesis.

2.5. Immunofluorescence

After 21 days of culture, samples were fixed with 4% PFA during 10 min at 4°C, rinsed with PBS, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 1h. Indirect immunostaining was performed after the fixation. To visualize specifically the surface of endothelial cells, samples were incubated overnight at 4°C using Rb Anti-CD31 (1/400, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA). Alexa Fluor 488 anti-Rb (1/200, Life Technologies) was then applied to samples for 2 hours. After rinses with PBS, samples were incubated for 20 min with a solution of Alexa Fluor 546-conjugated phalloidin (1/200, Molecular Probes, Life Technologies, Fisher Scientific, Illkirch, France). Finally, for nuclear staining, samples were incubated during 10 minutes with a solution of 200 nM DAPI (Sigma-Aldrich). Samples were then observed with a microscope equipped for epifluorescence (LEICA DM4000B).

3. Results

The SEM observation of the collagen sponge showed a biomaterial appearing porous and with a smooth surface (Figure 1). These observations demonstrated a great environment for cell colonization, recruitment and proliferation. To verify next the biocompatibility of the collagen sponge with human mesenchymal stem cells and with endothelial cells, we analyzed the evolution of their metabolic activity during the co-culture *in vitro*. This follow-up was performed using Alamar Blue® (Figure 2). These tests showed a significant increase of cells metabolic activity from day 3 to day 14. Moreover this metabolic activity stabilized from day 14 to day 21. These results are not only consistent with the fact that this collagen implant equipped with mesenchymal stem cells is biocompatible for endothelial cells, but also for a cell reorganization. To next analyze the behavior of endothelial cells on the hMSCs coated collagen sponge, we performed a specific staining of HUVECs by indirect immunofluorescence against CD-31. After 21 days of culture, we observed a reorganization of endothelial cells as “cluster” (Figure 3). Taking together, these results show clearly the ability of the collagen sponge to

support the reorganization of endothelial cells in the presence of human mesenchymal stem cells.

4. Discussion

For efficient tissues repair, the formation of a functional vascular network plays an essential role for biomaterials host integration, providing essential nutrients necessary for the healing process. Different strategies are aiming at improving vascularization and formation of more healthy tissues construct [33]. These strategies focus on the modeling of adequate scaffold morphology, the addition of growth factors, and/or the use of living cells [33]. In this work, we showed that the Urgo collagenic implant combined with human mesenchymal stem cell represents a biocompatible material of the third generation able to support the endothelial cells reorganization. This reorganization can be assigned to the great therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. Indeed, these last years, it was well demonstrated and established that adult mesenchymal stem cells have an intrinsic angiogenic role [27]. Moreover, it has been shown that there is an interaction between MSCs and endothelial cells (EC) within a co-culture [34-38], causing an increase in the secretion of growth factors [26, 34, 39] such as VEGF [27, 40], and an increase in the osteogenic potential [26, 41]. In our work, we chose to exploit the therapeutic effects of human mesenchymal stem cells, acting as maintainer of endothelial cells, and we were able to observe that a network reorganization of cells occurred without any additional input of VEGF.

The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a protein involved in angiogenesis. VEGF is a pro-angiogenic factor inducing stem cell differentiation into endothelial cells [42-44]. Moreover, VEGF allows the recruitment of macrophages and mononuclear producing additional angiogenic factors [45]. New bone regeneration strategies are specifically focused on its use coupled with active materials [40, 46]. In previous works, we validated a strategy of

nanocontainers using FDA-approved molecules, for an accelerated bone regeneration using BMP-7 or BMP-2, and adult mesenchymal stem cells [47-50]. This nanostrategy leads to a local delivery, cell-contact dependent of the growth factors, avoiding side effects after implantation [16]. More specifically for vascularization in bone tissue healing, we transferred this technology to a polymeric tridimensional implant equipped with VEGF nanoparticles able to promote endothelial cells reorganization and host blood vessels recruitment after implantation [51]. By using this double strategy of active functionalized-materials releasing a local dose of angiogenic growth factors, combined with the use of adult mesenchymal stem cells, the resulted created cellular environment is expected to favor vascularization in case of tissue repair. Today, our aim is to meet the demand from clinicians by developing a technique to enhance the quality and speed of bone regeneration, using FDA-approved molecules. This could ensure a good quality of bone support and reduce the time before an implant surgery in dentistry for example, time during which the patient remains toothless or bearer of a potentially uncomfortable removable prosthodontics.

5. Conclusion

The current bone regeneration techniques used in clinic, for example after a tooth extraction, do not allow preserving or regaining the same volume and the same quality of bone. Natural bone healing process offers for example a usable dental implant support, but it happens that the volume of bone after healing is insufficient, and that the time before a possible implant surgery is crippling for the patient. We showed here that the combined use of a collagen sponge with human mesenchymal stem cells could represent a great support to endothelial cells reorganization. This promising approach of bioactive implant of the third generation was biocompatible and permitted an organization of endothelial cells in networks. To combine this

strategy with the release of angiogenic molecules could represent a real advantage for revascularization in bone tissue repair.

Acknowledgments

The authors thank Arielle Ferrandon and Valérie Demais for their work with SEM experiments.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References:

1. L. Ardekian, R. Gaspar, M. Peled, B. Brener, D. Laufer, Does low-dose aspirin therapy complicate oral surgical procedures? *J Am Dent Assoc.* **131** (2000), 331-5
2. A. Scarano, G. Murmura, A. Di Cerbo, B. Palmieri, V. Pinchi, L. Mavriqi, et al., Anti-hemorrhagic agents in oral and dental practice: an update, *Int J Immunopathol Pharmacol.* **26** (2013), 847-54
3. G. Avila-Ortiz, S. Elangovan, KWO. Kramer, D. Blanchette, DV. Dawson, Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: a systematic review and meta-analysis, *J Dent Res.* **93** (2014), 950-8
4. RE. Jung, A. Philipp, BM. Annen, L. Signorelli, D. Thoma, CHF. Hämmerla, et al., Radiographic evaluation of different techniques for ridge preservation after tooth extraction: a randomized controlled clinical trial, *J Clin Periodontol.* **40** (2013), 90-8
5. T. Traini, P. Valentini, G. Iezzi, A. Piattelli, A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure, *J Periodontol.* **78** (2007), 955-61
6. JP. Fiorellini, TH. Howell, D. Cochran, J. Malmquist, LC. Lilly, D. Spagnoli, et al., Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation, *J Periodontol.* **76** (2005), 605-13
7. Y. Takahashi, E. Marukawa, K. Omura, Application of a new material (β -TCP / collagen composites) in extraction socket preservation: an experimental study in dogs, *Int J Oral Maxillofac Implants.* **28** (2013), 444-52
8. C. Mannai, D. Leake, A. Pizzoferrato, G. Ciapetti, C. Sangiorgi, Histologic evaluation of purified bovine tendon collagen sponge in tooth extraction sites in dogs, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **61** (1986), 315-23

9. MD. Finn, SR. Schow, ED. Schneiderman, Osseous regeneration in the presence of four common hemostatic agents, *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* **50** (1992), 608-12
10. H. Zigdon, D. Lewinson, T. Bick, EE. Machtei, Vertical bone augmentation using different osteoconductive scaffolds combined with barrier domes in the rat calvarium, *Clin Implant Dent Relat Res.***16** (2014), 138-44
11. S. Zhang, H. Uludağ, Nanoparticulate systems for growth factor delivery, *Pharm. Res.* **26** (2009), 1561-80
12. X. Wang, E. Wenk, X. Zhang, L. Meinel, G. Vunjak-Novakovic, DL. Kaplan, Growth factor gradients via microsphere delivery 22 in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering, *J. Control. Release* **134** (2009), 81–90
13. F. Fioretti, C. Mendoza-Palomares, M. Helms, et al., Nanostructured assemblies for dental application, *ACS Nano* **4** (2010), 3277–3287
14. S. Facca, C. Cortez, C. Mendoza-Palomares, et al., Active multilayered capsules for in vivo bone formation, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107** (2010), 3406–3411
15. S. Facca, D. Lahiri, F. Fioretti, et al., In vivo osseointegration of nano-designed composite coatings on titanium implants, *ACS Nano* **5** (2011), 4790–4799
16. C. Mendoza-Palomares, A. Ferrand, S. Facca, et al., Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics, *ACS Nano* **6** (2012), 483–490
17. I. Yetim, OV. Ozkan, A. Dervişoğlu, K. Erzurumlu, E. Canbolant, Effect of gentamicin-absorbed collagen in wound healing in pilonidal sinus surgery: a prospective randomized study, *J Int Med Res.* **38** (2010), 1029-33
18. S. Eap, A. Ferrand, J. Schiavi, L. Keller, T. Kokten, F. Fioretti, D. Mainard, G. Jadam, N. Benkirane-Jessel, Collagen implants equipped with ‘fish scale’-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration, *Nanomedicine* **9** (2014), 1253-61

19. A. Ferrand, S. Eap, L. Richert, et al., Osteogenetic properties of Electrospun Nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors, *Macromol Biosci.* **14** (2014), 45-55
20. K. Kurpinski, J. Stephenson, RRR. Janairo, H. Lee, S. Li, The effect of fiber alignment and heparin coating on cell infiltration into nanofibrous PLLA scaffolds, *Biomaterials* **31** (2010), 3536-42
21. S-H. Choi, C-K. Kim, K-S. Cho, J-S. Huh, RG. Sorensen, JM. Wozney, et al., Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs, *J Periodontol.* **73** (2002), 63-72
22. H-C. Chiu, C-Y Chiang, H-P. Tu, UM. Wikesjö, C. Susin, E. Fu, Effects of bone morphogenetic protein-6 on periodontal wound healing/regeneration in supraalveolar periodontal defects in dogs, *J Clin Periodontol.* **40** (2013), 624-30
23. UM. Wikesjö, P. Guglielmoni, A. Promsudthi, KS. Cho, L. Trombelli, KA. Selvig, et al., Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment, *J Clin Periodontol.* **26** (1999), 392-400
24. NM. Blumenthal, G. Koh-Kunst, MEAF. Alves, D. Miranda, RG. Sorensen, JM. Wozney, et al., Effect of surgical implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bioabsorbable collagen sponge or calcium phosphate putty carrier in intrabony periodontal defects in the baboon, *J Periodontol.* **73** (2002), 1494-506
25. D. Puppi, F. Chiellini, AM. Piras, E. Chiellini, Polymeric materials for bone and cartilage repair, *Prog Polym Sci.* **35** (2010), 403-440
26. J. Guerrero, S. Catros, SM. Derkaoui, C. Lalande, R. Siadous, et al., Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem

- cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis, *Acta Biomater.* **9** (2013), 8200-13
27. SSI. Edwards, G. Zavala, CP. Prieto, M. Elliott, et al., Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in dermal regeneration, *Angiogenesis* **17** (2013), 851-66
28. LL. Hench, JM. Ploack, Third-generation biomedical materials, *Science* **295** (2002), 1014-7
29. J. Henkel, MA. Woodruff, DR. Epari, et al., Bone regeneration based on tissue engineering conception – a 21st century perspective, *Bone Res.* **1** (2013), 216-48
30. X. Wei, X. Yang, ZP. Han, FF. Qu, L. Shao, YF. Shi, Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy, *Acta Pharmacologica Sinica* **34** (2013), 747-54
31. O. Tsigkou, I. Pomerantseva, JA. Spencer, et.al., Engineered vascularized bone grafts, *PNAS* **107** (2010), 3311-16
32. P. Au, LM. Daheron, DG. Duda, et. Al., Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels, *Blood* **111** (2008), 1302-05
33. S. Baiguera, D. Ribatti, Endothelialization approaches for viable engineered tissues, *Angiogenesis* **16** (2013), 1-14
34. QH. Chen, AR. Liu, HB. Qiu, Y. Yang, Interaction between mesenchymal stem cells and endothelial cells restore endothelial permeability via paracrine hepatocyte growth factor in vivo, *Stem Cell Res Ther.* **6** (2015), 44
35. C. Premer, A. Blum, MA. Bellio, IH. Schulman, et al., Allogeneic mesenchymal stem cells restore endothelial function in heart failure by stimulating endothelial progenitor cells, *EBioMedicine* **2** (2015), 467-475

36. KM. Fish, RJ. Hajjar, Mesenchymal Stem Cells & Endothelial Function, *EBioMedicine* **2** (2015), 376-377
37. K. Phil, S. Hofmann, H. Redl, W. Holnthoner, Vasularization mediated by mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: a comparison, *Cell Regen (Lond)*. **4** (2015), 8
38. NK. Paschos, WE. Brown, R. Eswaramoorthy, JC. Hu, KA. Athanasiou, Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture, *J Tissue Eng Regen Med*. **9** (2015), 488-503
39. CE. Clarkin, RJ. Emery, AA. Pitsillides, CPD. Wheeler-Hones, Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells, *J Cell Physiol*. **214** (2008), 537-44
40. T. Kaully, K. Kaufman-Francis, A. Lesman, S. Levenberg, Vascularization – the conduit to viable engineered tissues, *Tissue Eng Part B Rev*. **15** (2009), 159-69
41. M. Grellier, L. Bordenave, J. Amédée, Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering, *Trends Biotechnol*. **27** (2009), 562-71
42. M. Jazayeri, A. Allameh, M. Soleimani, SH. Jazayeri, A. Piryaee, S. Kazemnejad, Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells, *Cell Biol Int*. **32** (2008), 1183–1192
43. AK. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger, L. Claesson-Welsh, VEGF receptor signaling – in control of vascular function, *Nat Rev Mol Cell Biol*. **7** (2006), 359-71
44. J. Kleinheinz, U. Stratmann, U. Joos, HP. Wiesmann, VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration, *J Oral Maxillofac Surg*. **63** (2005), 1310-16
45. M. Grunewald, I. Avraham, Y. Dor, et al., VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells, *Cell* **124** (2006), 175-189

46. U. Lenze, F. Pohlig, S. Seitz, et al., Influence of osteogenic stimulation and VEGF treatment on in vivo bone formation in hMSC-seeded cancellous bone scaffolds, *BMC Musculoskelet Disord.* **15** (2014), 350
47. J. Schiavi, L. Keller, DN. Morand, et al., Active implant combining human stem cell microtissues and growth factors for bone-regenerative nanomedicine, *Nanomedicine* **10** (2015), 753-63
48. S. Eap, L. Keller, J. Schiavi, et al., A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration, *Int J Nanomedicine* **10** (2015), 1061-75
49. L. Keller, Q. Wagner, M. Pugliano, et al., Bi-layered nano active implant with hybrid stem cell microtissues for tuned cartilage hypertrophy, *J Stem Cell Res Ther* **1** (2015), 0004
50. L. Keller, P. Schwinté, E. Gomez-Barrena, M. Arruebo, N. Benkirane-Jessel, Smart implants as a novel strategy to regenerate well-founded cartilage, *Trends Biotechnol.* (2016) in press. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.05.008>
51. Q. Wagner, D. Offner, Y. Idoux-Gillet, et al., Advanced nanostructured medical device combining mesenchymal cells and VEGF nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization, *Nanomedicine (Lond)* **11** (2016), 2419-30

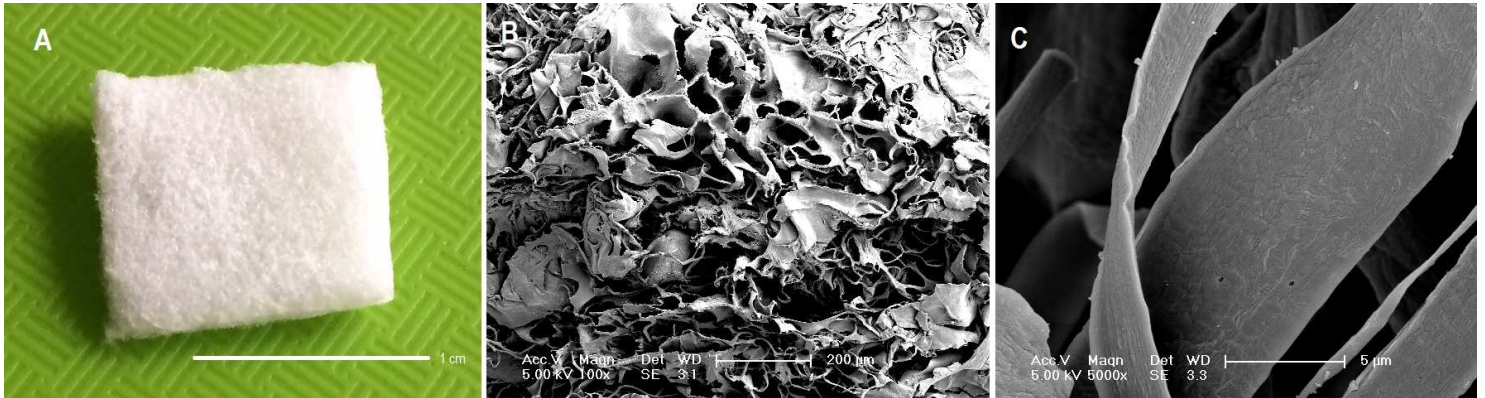


Figure 1: Urgo native collagen sponge. A : macroscopic view. B and C : SEM image of collagen fibers. (scale bars: A. 1cm ; B. 200μm ; C. 5μm).

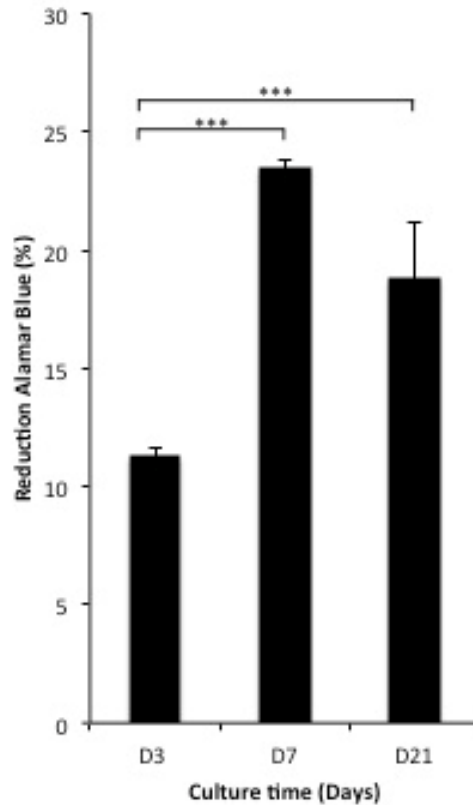


Figure 2. Biocompatibility of the collagen implant with human mesenchymal stem cells and human endothelial cells. The metabolic activity of cells was analyzed (at D3, D14, D21) *in vitro* by an Alamar Blue® test during the culture period time. (n=4) Statistical analysis was obtained by t- Student test. All values are expressed as mean \pm SEM. Differences were considered significant at 95% CI. *p < 0.1 = significant; **p < 0.05 = very significant; ***p < 0.01 = extremely significant.

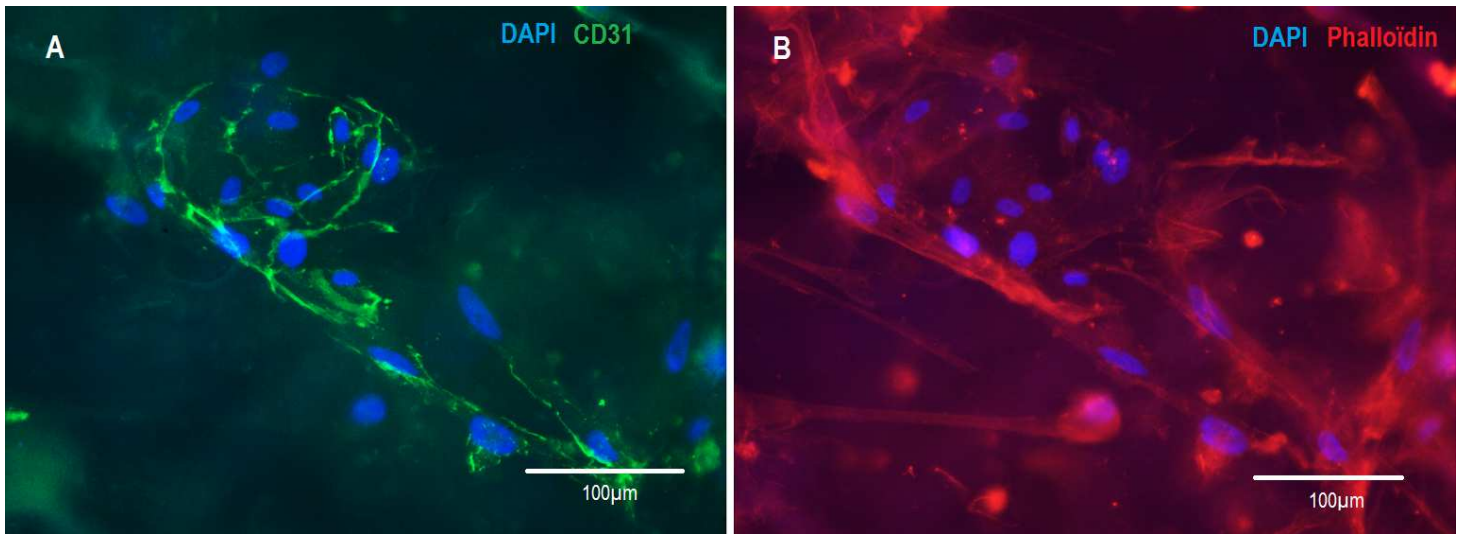


Figure 3. Behavior of endothelial cells in collagen implant of the third generation. Collagen sponges (Urgo medical) were seeded with human mesenchymal stem cells and cultured during 7 days. After 7 days, human endothelial cells (HUVECs) were seeded on the same sample. The culture was maintained during a total of 21 days. **(A)** After 21 days, endothelial cells were observed by a specific immunostaining against CD31 (in green). **(B)** The total cells were also observed in red by phalloidin for actin and in blue by DAPI staining of the nuclei.

Scale bar: 100µm

III. Réflexions éthiques sur le développement de stratégies innovantes pour la régénération osseuse

Nous avons vu dans le chapitre 2 que l'autogreffe nécessite un deuxième site opératoire, ce qui augmente le risque théorique de complications et de douleurs pour le patient. Trouver un moyen de minorer ces complications et d'éviter les douleurs liées au second site opératoire [54, 68] apparaît alors résolument comme une entreprise d'ordre, entre autres, éthique. L'allogreffe paraît immédiatement être une solution [7, 69], tout comme la xéno greffe. Si cette dernière pose la question de son acceptabilité par les patients eu égard à leurs croyances [70], et au risque potentiel de transmission de zoonoses [5], l'allogreffe présente elle aussi un risque infectieux non négligeable, et ces deux techniques ont montré des limites biologiques (voir chapitre 1). Une autre voie de recherche a pour objectif de gagner en qualité et en sécurité des soins concernant les lésions osseuses, c'est l'ingénierie tissulaire osseuse. Son développement amène plusieurs considérations éthiques. En 2008, deVries et al. [70] ont effectué une revue de la littérature en s'intéressant aux articles sur le thème de l'ingénierie tissulaire qui présentaient un questionnement éthique : leur recherche a fait apparaître pas moins de 203 articles.

1) Nature et obtention des cellules utilisées

Les cellules utilisées pour le développement de l'ingénierie tissulaire osseuse sont de différents types. Il peut s'agir d'ostéoblastes (HOB), de cellules-souches mésenchymateuses (MSC), de cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC)... Les principales problématiques concernant la nature des cellules sont celles liées aux cellules provenant d'embryons (hESC pour human Embryonic Stem Cells) ou de fœtus [71, 72]. Les débats sur le statut de l'embryon sont encore d'actualité, et au-delà encore du seul statut de ce dernier, ce qui pose problème est le mode d'acquisition des cellules. En effet, la source première de celle-ci est l'avortement, qui en soi est sujet à controverse [73, 74, 75]. Certains auteurs y trouvent une manière dangereuse de légitimer la pratique de l'avortement, ou y voient le danger de grossesses ayant lieu spécifiquement pour obtenir des cellules fœtales [71].

L'utilisation de cellules xénogéniques peut aussi être source de discussion. Les problématiques qui y sont liées sont les mêmes que celles liées à la xéno greffe, à savoir principalement le risque de transmission d'agents pathogènes [76, 77, 78] et l'acceptation par le public sur la base de préceptes culturels ou religieux [70, 79].

Les cellules peuvent aussi être collectées par don. Dans ce cas, et de prime abord, la notion de consentement apparaît primordiale : le donneur doit être informé du devenir et de l'utilisation de ses cellules [80, 81]. Comment s'assurer que l'information est claire et comprise, alors que le domaine de l'ingénierie tissulaire est difficilement appréhendable pour le grand public ? Le don de cellules peut encore poser des problèmes dans certains pays tels que les Etats-Unis, où il ne s'agit pas toujours d'un don à proprement parler, mais où l'obtention de cellules peut être rémunérée, ce qui amène des discussions sur la propriété des éléments du corps quand ils n'y sont plus liés [82, 83, 84], et plus largement encore, sur le fait de déterminer s'il est possible d'imaginer des droits de propriété sur le corps humain. Imaginer de tels droits amènerait à une forme de marchandisation du corps humain ou de ses éléments, et certains auteurs craignent par là une exploitation des personnes les plus pauvres sur la base de leur intégrité physique [84]. En France, le fait que les dons soient obligatoirement non rémunérés et anonymisés ne soulève pas ces questionnements. D'un autre côté toutefois, ceci amène peut-être moins de donneurs potentiels, c'est là le dilemme.

2) L'expérimentation animale

C'est un des piliers de la recherche biomédicale. Les expérimentations validées *in vitro* doivent généralement faire leur preuve *in vivo* pour asseoir leur pertinence. Comme certains animaux peuvent subir quelques désagréments [85, 86], les expérimentations animales ne devraient avoir lieu seulement quand aucune alternative n'est possible.

Les débuts de l'expérimentation animale remontent à plusieurs siècles. Louis Pasteur a lui-même testé son vaccin contre la rage sur un chien avant de l'injecter à un patient humain. En 1865, Claude Bernard écrit : « A-t-on le droit de faire des expériences et des vivisections sur les animaux ? Quant à moi, je pense qu'on a ce droit d'une manière entière et absolue. Il serait bien étrange, en effet, qu'on reconnût que l'homme a le droit de se servir des animaux pour tous les usages de la vie, pour ses services domestiques, pour son alimentation, et qu'on lui défendît de s'en servir pour s'instruire dans l'une des sciences les plus utiles à l'humanité » [87]. La question des liens qui unissent l'homme aux autres espèces de la planète fait toujours débat, et c'est d'autant plus vrai de nos jours avec la montée du végétarisme et des modes de vie véganes. Quelle légitimité aurait l'humain pour se servir, comme le disait Claude Bernard, des animaux ? Qu'est-ce qui le justifie ? Depuis le temps de Claude Bernard, la bienveillance à l'égard des animaux a largement évolué, et l'expérimentation animale est aujourd'hui soumise à des règles strictes (articles R214-87 à R214-137 du code rural) [88] :

a) Les espèces

L'expérimentation animale n'est possible que sur certaines espèces animales particulières : les vertébrés, leurs formes larvaires autonomes ou fœtales évoluées, et les céphalopodes. Les poissons, oiseaux, et mammifères sont concernés, mais pas les insectes. L'utilisation de grands singes (par exemple les chimpanzés) est interdite, et ne peut être autorisée qu'en cas d'extrême urgence sanitaire.

b) L'origine des animaux

Seuls des élevages ou des fournisseurs agréés peuvent proposer des animaux en vue d'expérimentation animale. Les animaux errants ne peuvent pas constituer des bases d'expérimentation animale.

c) La licéité

L'expérimentation animale n'est licite que si elle est nécessaire et irremplaçable, et qu'elle est rattachée à des domaines précis de la recherche : santé humaine ou animale, protection de l'environnement, enseignement supérieur, enquêtes médico-légales. Le principe des « 3R » doit être respecté, c'est-à-dire :

- Remplacement : l'expérimentation animale doit être remplacée par une méthode ne nécessitant pas d'animaux si cela est possible
- Réduction : le nombre d'animaux utilisés doit être réduit au strict minimum
- Raffinement : les protocoles doivent être établis de manière rigoureuse avant de débiter l'expérimentation, et le choix des méthodes les plus douces doit être effectué

d) La douleur

Quand le geste effectué présente un risque de douleur pour l'animal, une anesthésie doit être effectuée, sauf dérogation documentée (études portant spécifiquement sur la douleur par exemple). La mort comme donnée d'observation doit être évitée autant que possible.

e) Administration

- Les établissements fournisseurs, éleveurs, ou utilisateurs doivent être agréés. L'agrément est donné pour 6 ans et est soumis à des inspections vétérinaires.
- Les projets de recherche doivent faire l'objet d'une évaluation éthique favorable délivrée par un comité d'éthique agréé, et d'une autorisation délivrée par le ministère de la recherche.

- Une commission nationale de l'expérimentation animale existe, et émet des propositions et des avis. Un comité national de réflexion établit un bilan annuel des activités des comités d'éthique agréés et formule des recommandations.

3) La responsabilité du chercheur face à la société

Cet aspect de la recherche est vrai pour différents domaines. Il s'applique néanmoins très bien à celui de l'ingénierie tissulaire et des nanotechnologies. En février 2008, la Commission Européenne a adopté un code de bonne conduite pour une recherche responsable en nanosciences et en nanotechnologies [89]. Même si ce code ne possède aucune valeur contraignante, il y est écrit que « les chercheurs et les organismes de recherche demeurent responsable de l'impact de leur travail sur la société, sur l'environnement, et sur la santé humaine ». Il n'est ici plus question de dissocier une certaine neutralité des activités de recherche avec leurs applications pratiques, comme ce fut le cas historiquement. Ce texte invite donc les chercheurs à mener une réflexion sur les applications des expérimentations qu'ils mènent, en amont même de commencer leurs recherches [90].

Les produits de l'ingénierie tissulaire peuvent avoir de vastes applications. Différents tissus sont concernés : os, cornée, peau, foie... Il appartient au chercheur de se demander si le fruit de ses recherches va servir à lutter contre la maladie et ses effets délétères, ou à lutter contre le vieillissement en régénérant des tissus naturellement abîmés par leur sénescence ? [91, 92] Quelle place donnons-nous alors au vieillissement ? Est-il considéré comme une maladie à part entière, ou cherchons-nous vraiment à cibler uniquement les pathologies qui lui sont liées ? [93, 94] Est-il moralement désirable d'utiliser l'ingénierie tissulaire pour améliorer les capacités humaines ? [70, 92, 95] Un article de Mummery paru en 2004 [96] propose d'ailleurs comme titre provocateur : « Stem cell research: immortality or a healthy old age ? ».

4) Sécurité à long terme et efficacité par rapport aux techniques actuelles

L'ingénierie tissulaire présente certaines particularités. Ses produits présentent par définition des variabilités de réponse biologique, puisque les cellules vivantes qu'ils comportent sont destinées à être en interaction avec l'environnement extracellulaire, variable d'un individu à l'autre. De plus, l'implantation d'un produit de l'ingénierie tissulaire tels que les scaffolds que nous avons développés, est un processus qui n'est pas réversible dans sa totalité [97]. En effet, les composants du scaffold vont interagir avec l'organisme receveur, et ne vont pas dans leur

intégralité se confiner à la zone lésée. Ces particularités amènent à plusieurs réflexions. D'une part, il est difficile de prédire totalement l'innocuité de tout traitement, même en passant par les étapes nécessaires d'expérimentation *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. La sécurité à long terme de ces produits est encore relativement floue [70]. D'autre part, cela suggère que des études de plus grande ampleur et sur une durée de suivi plus longue doivent être menées, et que jusqu'à cet instant, il est difficile d'établir une analyse bénéfice/risque précise pour le patient. C'est pourtant de celle-ci que la réflexion éthique peut se nourrir : comment amener, de façon la plus sûre possible, le meilleur traitement au patient ?

5) Ethique et déontologie du chercheur

Outre la responsabilité du chercheur face à la société, d'autres points viennent étayer l'éthique et la déontologie du chercheur. Le droit de la recherche étant largement lacunaire [90] et axé sur les activités les plus sensibles (notamment l'expérimentation animale dont il était question ci-avant), un corpus de règles énoncées dans des chartes, des guides, des articles scientifiques, ou des codes de bonnes pratiques forment une normativité parallèle que l'on peut appeler *softlaw* [90]. Les termes d'éthique et de déontologie y sont mentionnées indistinctement, bien que certaines pensées, loin de faire consensus, les distinguent de différentes manières. Ainsi l'éthique serait associée à la fois aux réflexions menées en amont des actions, et à l'analyse de leurs conséquences. Elle se questionne d'une certaine manière sur les fondements et les conséquences des actions morales. La déontologie (*de ontos* : ce qui doit être) est plus souvent associée à des codes professionnels, ou à des directives d'action.

Cette *softlaw* constitue une normativité dans le sens où elle découle des chercheurs eux-mêmes qui, conscients de la nécessité d'instaurer un cadre éthique autour de leurs travaux, ont mené des réflexions pour en trouver les composants. Aucun code d'éthique émanant d'un établissement particulier n'a de valeur contraignante au regard de la loi, mais tous ces textes se rejoignent sur de nombreux points et sont naturellement intégrés par les chercheurs qui les perçoivent comme des référentiels de conduite au sein de la communauté scientifique qu'ils constituent [90]. Le respect de ces normes a deux avantages majeurs : d'une part il donne une certaine conscience à la science (et comme l'a écrit Rabelais : « science sans conscience n'est que ruine de l'âme ») et permet une meilleure acceptabilité sociale de la science, d'autre part il favorise la qualité des résultats scientifiques en participant à la fiabilité de la façon dont sont menées les recherches [90].

Le code de bonne conduite pour une recherche responsable en nanosciences et en nanotechnologies [89], par exemple, met en avant différents principes comme la signification, la précaution, la durabilité, l'inclusion, l'excellence, l'innovation et la responsabilité. Ce code se destine à être un guide pour le chercheur, en précisant que « les activités de recherche en nanosciences et nanotechnologies doivent être compréhensibles par le public. Elles respectent les droits fondamentaux et leur conception, leur mise en œuvre, leur diffusion, et leur exploitation servent le bien-être des personnes et de la société ». Des notions environnementales y sont aussi associées, en rappelant que les recherches « sont sûres, respectent les principes éthiques et contribuent au développement durable. Elles ne nuisent ni aux personnes, ni aux animaux, ni aux végétaux, ni à l'environnement et ne constituent pas une menace à leur égard, à l'heure actuelle comme à l'avenir ». D'autres points portent sur la responsabilité du chercheur, comme il en était question au point 3).

D'autres textes renforcent le cadre éthique de la recherche. C'est le cas notamment de la Charte européenne du chercheur [98] qui se veut être un « ensemble de principes généraux et de conditions de base qui spécifie les rôles, les responsabilités et les prérogatives des chercheurs et des employeurs et/ou bailleurs de fond des chercheurs ». Les principes énoncés par la charte sont ceux de liberté de la recherche (qui devrait être centrée sur le bien de l'humanité et l'extension des frontières de la connaissance scientifique), de la responsabilité, de la diffusion et de l'exploitation des résultats, etc.

Si l'ensemble de ces textes a une visée résolument bonne dans l'accompagnement du chercheur et de ses recherches, il est dommage que chaque structure présente son propre code – et même si les contenus se rejoignent globalement – plutôt que d'en unifier réellement les contenus. Ceci pourrait faire émerger un ensemble de règles plus légitime et plus accessible au plus grand nombre de chercheurs, car aujourd'hui, ces nombreux textes ne sont pas parvenus, et ne peuvent pas parvenir à leur connaissance. Il ne s'agit pas de cumuler des recommandations, mais d'en faire une étude qualitative permettant de faire naître des consensus réfléchis.

6) Conclusions

L'ingénierie tissulaire transporte bon nombre de questionnements éthiques. Certains sont déjà encadrés par des règles et des lois, d'autres sont appréhendés par une éthique générale, et d'une certaine manière naturelle, de la recherche. Il paraît important de noter que les réflexions éthiques autour de la recherche ne doivent pas avoir lieu uniquement lorsque le produit de celle-ci est déterminé, mais bien en amont de l'initiation du processus de recherche, car il en découle une notion de responsabilité. S. Thirion en parle d'ailleurs : « Entre celui qui pense et celui qui applique, qui est responsable ? Peut-on se dégager de toute responsabilité sous la seule raison qu'on n'est pas celui qui a appliqué quelque chose que l'on a conçu ? Est-ce que les physiciens qui ont inventé la bombe atomique sont responsables aussi de ce qui s'est passé à Hiroshima ? C'est un problème éthique profond et j'estime que la réponse se trouve dans la notion de coresponsabilité » [99]. Le nombre important d'articles scientifiques traitant de problématiques éthiques quant à l'ingénierie tissulaire apparaissant dans la revue de deVries et al. [70] montre un intérêt, si ce n'est une certaine forme d'inquiétude, des chercheurs par rapport à ces sujets. Les auteurs concluent d'ailleurs en invitant les éthiciens à s'engager dans le débat éthique sur l'ingénierie tissulaire, mais en étroite collaboration avec les scientifiques afin que le fruit de leur réflexion ait un écho profond, pertinent et non abstrait à la fois pour les éthiciens et pour les scientifiques (ou pour ceux qui combinent les deux compétences) [70]. Concernant la notion « d'éthicien », il s'agit toutefois d'une conception anglo-saxonne éloignée de la conception qui nous est proche, cette dernière préférant la sensibilisation éthique et la responsabilisation des scientifiques.

Chapitre 4

**Qualité et sécurité de la mise en œuvre
clinique des implants
pour la régénération osseuse**

Le chapitre 2 (épidémiologie concernant les traitements des lésions osseuses par greffes) nous a montré qu'il existe de nombreuses complications liées aux traitements des lésions osseuses par greffes. Bon nombre d'entre elles sont représentées par des infections (1.92% pour l'autogreffe, 6.08% pour l'allogreffe, et 17.12% pour l'utilisation complémentaire de BMPs). Aussi, pour approfondir notre démarche qui consiste en l'amélioration de la qualité et de la sécurité du traitement des lésions osseuses, notamment dans le secteur maxillo-facial, il est primordial de consacrer un volet de ce travail de thèse au bon contrôle des paramètres et des mesures d'hygiène lors des interventions chirurgicales (notamment de greffe ou de mise en place des implants), ainsi qu'à l'élaboration de procédures d'hygiène et à leur évaluation. De plus, les interventions en milieu hospitalier nécessitent des précautions accrues afin de toujours mieux lutter contre les infections associées aux soins.

En effet, même avec les technologies avancées que représentent les implants nano-actifs, si la procédure chirurgicale se déroule dans de mauvaises conditions, les chances de succès seront minorées, comme le montre le risque infectieux non négligeable des traitements de lésions osseuses par greffes. Il y a donc une exigence de qualité, comme dans tout domaine de soin. Si l'instrumentation utilisée lors de la réalisation des actes thérapeutiques peut facilement répondre aux exigences de stérilité (prédésinfection, nettoyage, rinçage, séchage, conditionnement et autoclavage à 134°C pendant 18min (= cycle prion)), il n'en est pas tout à fait de même concernant l'unit dentaire, support de travail du chirurgien-dentiste, et les porte-instruments dynamiques (PID) (Annexe A).

Les contaminations peuvent avoir lieu à différents niveaux. Tout d'abord externe, lors de l'aérosolisation et du dépôt de particules contaminées, que l'on peut éliminer en désinfectant les surfaces. Et puis au niveau interne, premièrement par le biais du système d'aspiration de l'unit dentaire, puis par l'utilisation des PID, et enfin par la qualité microbiologique de l'eau circulant dans les units.

I. L'hygiène des tuyaux d'aspiration de l'unit dentaire

Le système d'aspiration de l'unit dentaire est un élément essentiel à la pratique du chirurgien-dentiste. Quand il offre un bon fonctionnement, il constitue la première barrière contre l'aérosolisation de particules pathogènes. Toutefois, un phénomène de reflux du contenu des tuyaux a aussi été décrit. De ce fait, le maintien de son efficacité et son bon entretien sont des garants de la réduction des risques de contamination croisée. L'étude suivante, réalisée dans le Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (France) se propose de comparer l'impact de la structure de tuyaux dentaires (lisses, annelés) sur la formation d'un biofilm lorsqu'ils sont soumis à un protocole d'entretien rigoureux. Les prélèvements réalisés à J 0, J+ 15 jours puis J+ 5 semaines montrent une absence de germes dans les deux types de tuyaux, menant à la conclusion qu'il n'existerait pas de différence entre les tuyaux lisses et annelés concernant le développement d'un biofilm, et que le protocole d'entretien de l'unit dentaire mis en œuvre est efficace de par la manière et les produits dont il est mis en œuvre.

Ce travail a donné lieu à un article publié dans l'Information Dentaire (**article 4**).



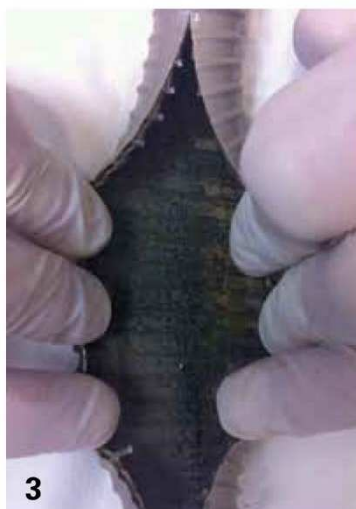
L'hygiène des tuyaux d'aspiration *de l'unit dentaire*

Etude comparative de l'impact de leur structure, et entretien

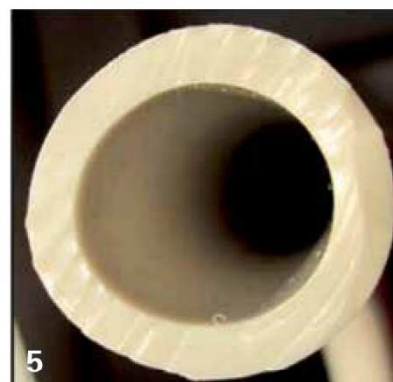
Damien Offner, Loan Ittis, Agnès Bertrand, Anne-Marie Musset

Le système d'aspiration de l'unit dentaire est un élément essentiel à la pratique du chirurgien-dentiste. Quand il offre un bon fonctionnement, il constitue la première barrière contre l'aérosolisation de particules pathogènes. Toutefois, un phénomène de reflux du contenu des tuyaux a aussi été décrit. De ce fait, le maintien de son efficacité et son bon entretien sont des garants de la réduction des risques de contamination croisée.

Le fauteuil dentaire, support de l'activité du chirurgien-dentiste, constitue la pièce maîtresse du cabinet dentaire. Le système d'aspiration est l'un des maillons essentiels de ce poste de travail pour le confort qu'il apporte au praticien, ainsi que pour son rôle dans l'hygiène des soins et la sécurité des pratiques (fig. 1). Toutefois, et malgré de grandes avancées technologiques durant les trente dernières années, il reste l'un des points faibles majeurs de l'unit, dans le champ de l'hygiène. Traversés par plusieurs fluides biologiques (salive, sang, pus...), les systèmes d'aspiration offrent en effet des conditions idéales au développement de micro-organismes (bactéries, virus...) [1,2], favorisé par l'humidité et la chaleur, et un rapport surface/volume propice au développement de biofilms [3]. Une utilisation intermittente du fauteuil et un entretien négligent sont des facteurs additionnels



1. Fauteuil dentaire et aspiration.
2. L'aspiration en bouche.
3. Coupe d'un tuyau annelé en place depuis 2 ans. On remarque la présence d'un dépôt noirâtre.
4. Tuyau annelé, plastique.
5. Tuyau lisse, silicone.



en faveur du potentiel développement d'un biofilm [4]. De plus, de nombreuses études relatent que dans certaines conditions, il existe un phénomène de reflux du contenu du tuyau dans la cavité buccale. En effet, lorsque le patient ferme la bouche sur la canule d'aspiration, il crée une dépression dans sa cavité orale, supérieure à la dépression engendrée par la pompe à salive, à l'origine alors du phénomène de reflux (fig. 2). Ces mêmes études suggèrent qu'un mauvais entretien des systèmes d'aspiration associé à un reflux de leur contenu dans la cavité buccale présenterait un risque de contamination croisée [5-10].

À l'observation, lors du démontage des embouts d'aspiration pour leur entretien, un dépôt noirâtre a été observé à l'intérieur des tuyaux en place (fig. 3). Plusieurs questionnements ont alors été formulés :

- le protocole d'entretien mis en place est-il aussi efficace pour les tuyaux d'aspiration ?
- les produits utilisés dans ce protocole sont-ils efficaces (des doutes ont été émis quant à l'utilisation d'ammoniures quaternaires) ?
- l'hypothèse selon laquelle la surface des tuyaux annelés (fig. 4) serait plus propice aux dépôts et à la maturation

d'un biofilm que la surface de tuyaux lisses (fig. 5) a été posée.

Le bon entretien et le maintien de l'efficacité des tuyaux d'aspiration sont donc primordiaux [1, 11], car, en plus du risque de reflux, ces systèmes constituent la première barrière contre l'aérosolisation d'agents potentiellement pathogènes. L'aspiration des particules dès leur libération en bouche prévient en grande partie la diffusion dans l'atmosphère des aérosols et débris chargés d'agents contaminants : c'est le principal moyen de prévention de l'aérobiocontamination [5].

L'amélioration de l'hygiène et de l'ergonomie de ces systèmes est indispensable tant pour des questions de sécurité que pour des questions de santé publique. Différents types de tuyaux d'aspiration existent dans le commerce, présentant divers matériaux constitutifs (plastique, silicone), et différentes structures (lisses, annelés).

De ce fait, une étude a été menée au sein du Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaire des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), afin d'observer les différences potentielles pouvant exister entre ces différents types de tuyaux et étudier l'existence éventuelle d'un impact sur la formation d'un biofilm.

Matériel et méthodes

L'étude a consisté en l'analyse de prélèvements dans des tuyaux d'aspiration en place après l'application d'un protocole d'entretien rigoureux et identique sur tous les fauteuils. Ce protocole d'entretien des unités et fauteuils est celui qui est appliqué depuis plusieurs mois dans le Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaire des HUS [12]. Des études préalables portant sur la gestion du risque infectieux lié à l'eau circulant dans l'unité ont été menées et ont prouvé son efficacité [12]. Il s'articule en différents points :

- purge du robinet chaque matin pendant 2 minutes pour l'eau froide puis 2 minutes pour l'eau chaude ;
- remplissage du flacon d'eau réserve indépendant avec de l'eau filtrée chaque matin ;
- désinfection et nettoyage (à l'Orotol®) des aspirations chaque matin, chaque soir et entre chaque patient ;
- purge des seringues air/eau et des fouets qui seront reliés aux porte-instruments dynamiques (PID) pendant 30 secondes, chaque matin et chaque soir ; et entre chaque patient avec les PID encore en place ;

- lavage et désinfection des embouts directs des tubulures d'aspiration (supports des embouts jetables) chaque soir (laveur-désinfecteur à 55 °C) ;
- nettoyage du filtre d'aspiration et du support de filtre chaque soir ;
- nettoyage et désinfection des surfaces de l'unité chaque matin, chaque soir, et entre chaque patient à l'aide d'un détergent-désinfectant ;
- passage hebdomadaire d'un nettoyant concentré pour aspirations (MD 555 cleaner®).

Ce protocole est en grande partie similaire aux points décrits dans la Grille technique d'évaluation pour la prévention des infections associées aux soins [1], document de référence, définie par les instances professionnelles des chirurgiens-dentistes, notamment à la suite d'une demande de l'ARS. Il présente toutefois quelques différences :

- la purge des robinets, des fouets, et des seringues air/eau se fait pendant 5 minutes chaque matin ;
- l'eau utilisée n'est pas forcément filtrée. Un système de traitement de l'eau en continu est conseillé ;

Tableau 1 – Résultats des contrôles microbiologiques, recherche de bactéries sur les surfaces (source : données du laboratoire d'analyse)

Jour du prélèvement	J0	J0 + 15 jours	J0 + 5 semaines
Points de prélèvement	Recherche (Absence / Présence)	Recherche (Absence / Présence)	Recherche (Absence / Présence)
Technique : Frottis de surfaces			
BOX 1			
Anciens tuyaux cannelés			
1. Entrée du tuyau d'air cannelé	Absence	/	/
2. Sortie du tuyau d'air cannelé	Absence	/	/
3. Milieu du tuyau d'air cannelé	Absence	/	/
Nouveau tuyau cannelé			
1. Entrée du tuyau d'air cannelé	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative <i>Bacillus sp.</i>	Absence	Absence
2. Sortie du tuyau d'air cannelé	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative <i>Bacillus sp.</i>	Absence	Absence
BOX 2			
Nouveau tuyau lisse			
1. Entrée du tuyau d'air lisse	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative <i>Micrococcus sp.</i>	Absence	Absence
2. Sortie du tuyau d'air lisse	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative <i>Micrococcus sp.</i>	Absence	Absence

- les aspirations sont nettoyées entre chaque patient à l'aide d'un verre d'eau. La désinfection s'effectue après un acte sanglant;
- une préférence est accordée aux filtres d'aspiration à usage unique.

Ces différences s'expliquent par les contraintes spécifiques liées à l'environnement hospitalier du centre de soins. Nous nous sommes conformés à une instruction institutionnelle de notre Équipe Opérationnelle d'Hygiène (EOH) qui, après validation de la qualité de l'eau et des circuits, nous a recommandé :

- une purge de 2 minutes du robinet d'eau froide et 2 minutes du robinet d'eau chaude sur nos circuits;
- l'utilisation d'eau filtrée uniquement, cela après plusieurs problèmes de contamination relevés sur des fauteuils du centre de soins;
- une désinfection de l'aspiration après chaque patient. Il s'agit d'une mesure de précaution liée à l'environnement spécifique et à haut risque infectieux du centre de soins.

L'étude s'est déroulée sur une période de cinq semaines sur deux fauteuils de la marque ADEC® installés depuis deux ans et demi (BOX 1 et BOX 2). Ils se trouvent dans la même structure interne du Pôle (CASU: Consultations d'Accueil, Santé, Urgences) et ont donc été soumis aux mêmes types d'actes, au même rythme d'utilisation, et à la même fréquentation de patients (environ 15 par jour, soit une fréquentation proche de celle d'un cabinet libéral).

Sur le premier a été mis en place un tuyau d'aspiration annelé (en plastique), et sur le second un tuyau lisse (en silicone). L'étude a été ciblée sur la tuyauterie de gros diamètre: 1,6 cm.

Le protocole d'entretien mentionné ci-dessus a été appliqué et les produits utilisés pour celui-ci ont été l'Orotol® en usage journalier et le MD 555 cleaner® en usage hebdomadaire (Dürr Dental).

Pour le bon déroulement de l'étude et de l'entretien futur des fauteuils, une feuille de traçabilité de l'entretien a été réalisée, permettant chaque opérateur un autocontrôle des mesures à prendre. Cette feuille a également permis de s'assurer qu'un entretien identique était appliqué aux deux fauteuils et systèmes d'aspiration durant l'étude.

Trois séries de prélèvements ont été réalisées à J0, J0 +15 jours et J0 +5 semaines.

La première a eu pour but de réaliser des prélèvements sur les tuyaux annelés en place depuis deux ans ainsi que sur les tuyaux neufs (lisse et annelé).

La deuxième session a été l'occasion de prélever des échantillons sur les tuyaux lisses et annelés en place depuis 15 jours.

La troisième et dernière session de prélèvements, identique à la seconde, a été réalisée à J +5 semaines.

Pour tous les prélèvements, deux techniques ont été mises en œuvre: des frottis de surfaces et des analyses de l'eau en sortie de tuyaux, cela afin de recueillir un maximum de l'éventuel biofilm à tous les niveaux des tuyaux.

Enfin, ces prélèvements ont été analysés par le laboratoire d'hygiène hospitalière des HUS.

Résultats

Prélèvements par frottis

Les analyses des prélèvements par frottis donnent sont détaillées dans le [tableau 1](#).

Une absence de bactéries au niveau des tuyaux mis en place deux ans auparavant a été observée, malgré le dépôt noir visible à l'œil nu ([fig. 3](#)).

À l'inverse, à J0, des germes ont été trouvés au niveau des tuyaux neufs, germes présents naturellement dans l'environnement, qui ont sans doute été apportés lors du transport et/ou de la manipulation des tuyaux (ce qui confirme, s'il en était besoin, l'importance du port de gants lors de l'entretien et de la manipulation des dispositifs liés à l'unit/au fauteuil).

A l'analyse des prélèvements J0 + 15 jours et J0 + 5 semaines, une absence de germes a été constatée. Les micro-organismes présents à J0 dans les tuyaux neufs ont donc été éliminés lors de la mise en pratique du protocole d'entretien, tout comme de nouveaux micro-organismes n'ont pu se fixer.

Analyses d'eau

Lors des analyses d'eau, les niveaux-cibles utilisés ont été définis d'après le guide technique de l'eau dans les établissements de santé du ministère de la Santé [13, 15, 16]. Les analyses des prélèvements d'eau sont détaillées dans le [tableau 2](#).

L'analyse des prélèvements donne des résultats de présence de micro-organismes quasiment nuls. Le seul prélèvement "particulier" est celui de J0 + 15 jours sur le nouveau tuyau cannelé, qui présente un résultat de 4 UFC/ml (sur le même tuyau, le prélèvement suivant montre un résultat < 1 UFC/ml). Toutefois, ce résultat reste inférieur au niveau cible. L'ensemble des résultats est donc considéré comme conforme.

Discussion

Après analyse des résultats en technique de frottis et prélèvement d'eau, il a été constaté que ces derniers apparaissent conformes aux niveaux-cibles. À J0 + 5 semaines, une absence de germes est observée. L'ensemble des germes apportés initialement (J0 en technique frottis) ont été éliminés par l'application rigoureuse du protocole.

L'étude permet donc de répondre aux questionnements de départ. Elle montre l'efficacité du protocole d'entretien pour les tuyaux d'aspiration, et celle des produits utilisés pour celui-ci. D'autre part, elle permet de comparer l'impact de la structure des tuyaux d'aspiration sur la formation d'un biofilm à l'intérieur de ceux-ci. Cette étude apporte de nombreuses pistes, d'autant plus

Tableau 2 – Résultats des contrôles microbiologiques – Eau pour soins standard (Source : données du laboratoire d'analyse)

	Résultats à J0	Résultats à J0 + 15 jours	Résultats à J0 + 5 semaines	Niveau cible
Eau d'entrée – eau du robinet				
- Flore aérobie revivable à 37 °C	< 1 UFC/ml			≤ 10 UFC/ml
- Flore aérobie revivable à 22 °C	< 1 UFC/ml			≤ 100 UFC/ml
- Coliformes totaux	< 1 UFC/100 ml			< 1 UFC/100 ml
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 1 UFC/100 ml			< 1 UFC/100 ml
Ancien tuyau d'air d'aspiration cannelé				
- Flore aérobie revivable à 37 °C	< 1 UFC/ml			≤ 10 UFC/ml
- Flore aérobie revivable à 22 °C	< 1 UFC/ml			≤ 100 UFC/ml
- Coliformes totaux	< 1 UFC/100 ml			< 1 UFC/100 ml
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 1 UFC/100 ml			< 1 UFC/100 ml
Eau avant adoucisseur				
- Flore aérobie revivable à 37 °C	7 UFC/ml			≤ 10 UFC/ml
- Flore aérobie revivable à 22 °C	1 UFC/ml			≤ 100 UFC/ml
- Coliformes totaux	< 1 UFC /100 ml			< 1 UFC/100 ml
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 1 UFC/100 ml			< 1 UFC/ 100 ml
Nouveau tuyau cannelé – BOX 1				
- Flore aérobie revivable à 37 °C		4 UFC/ml*	< 1 UFC/ml	≤ 10 UFC/ml
- Flore aérobie revivable à 22 °C		< 1 UFC/ml	< 1 UFC/ml	≤ 100 UFC/ml
- Coliformes totaux		< 1 UFC /100 ml	< 1 UFC /100 ml	< 1 UFC/100 ml
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		< 1 UFC/100 ml	< 1 UFC/100 ml	< 1 UFC/100 ml
Nouveau tuyau lisse – BOX 2				
- Flore aérobie revivable à 37 °C		< 1 UFC/ml	< 1 UFC/ml	≤ 10 UFC/ml
- Flore aérobie revivable à 22 °C		< 1 UFC/ml	< 1 UFC/ml	≤ 100 UFC/ml
- Coliformes totaux		< 1 UFC /100 ml	< 1 UFC /100 ml	< 1 UFC/100 ml
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		< 1 UFC/100 ml	< 1 UFC/100 ml	< 1 UFC/100 ml
Eau du robinet avec filtre				
- Flore aérobie revivable à 37 °C		< 1 UFC/ml	< 1 UFC/ml	≤ 10 UFC/ml
- Flore aérobie revivable à 22 °C		< 1 UFC/ml	< 1 UFC/ml	≤ 100 UFC/ml
- Coliformes totaux		< 1 UFC /100 ml	< 1 UFC /100 ml	< 1 UFC/100 ml
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		< 1 UFC/100 ml	< 1 UFC/100 ml	< 1 UFC/ 100 ml

* Nous observons la présence de *Stenotrophomonas maltophilia* (Bacille à Gram négatif répandue dans l'environnement, opportuniste) [14].

qu'aucune évaluation expérimentale du contenu des tuyaux d'aspiration n'a été établie à ce jour. Toutefois, l'une des limites de l'étude a été le nombre réduit de fauteuils supports. Il serait intéressant de s'étendre sur un parc de fauteuil plus conséquent.

Une observation importante a été constatée lors de l'utilisation : les tuyaux annelés présentent un plus grand confort de travail. En effet, leur armature permet de réduire l'épaisseur du tuyau et les rend ainsi plus souples. À risque de formation de biofilm égal (à savoir nul si, comme c'est le cas ici, un protocole rigoureux et efficace est suivi), les tuyaux annelés pourront être préférés en avançant un argument ergonomique.

Conclusion

L'étude menée pendant cinq semaines aux HUS a été très intéressante en ce qu'elle nous amène à différentes conclusions.

Dans un premier temps, elle montre que les produits utilisés sont efficaces de la manière dont ils sont utilisés. La conclusion la plus importante à en déduire est donc l'efficacité du protocole [12] mis en place au cours de l'étude, liée aux produits de détergence/désinfection qui en font partie.

L'hypothèse de potentielles différences entre les tuyaux lisses et les tuyaux annelés (ainsi qu'entre les matériaux qui les constituent, respectivement silicone et plastique) quant à la formation d'un biofilm avait été avancée. Après confrontation des résultats, nous observons l'absence de différences entre ces deux types de tuyaux.

Une application rigoureuse et stricte d'un protocole efficace permet donc un entretien optimal des tuyaux d'aspiration et, de ce fait, diminue considérablement le risque de contamination au cabinet dentaire, ainsi que la survenue de risques techniques.

Damien Offner

*Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg,
Hôpitaux Universitaire de Strasbourg (HUS)
INSERM, Unité Mixte de Recherche 1121, Strasbourg*

Loan Ittis

*Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg,
Hôpitaux Universitaire de Strasbourg (HUS)*

Agnès Bertrand

*Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg,
Hôpitaux Universitaire de Strasbourg (HUS)*

Anne-Marie Musset

*Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg,
Hôpitaux Universitaire de Strasbourg (HUS)
INSERM, Unité Mixte de Recherche 1121, Strasbourg*

Bibliographie

1. Grille technique d'évaluation pour la prévention des infections associées aux soins, ADF, novembre 2013
2. Deutsche Arbeitskreis für Hygiene in der Zahnmedizin (DAHZ), Hygieneleitfaden, 2014. Consultable sur : www.dahz.org
3. Barbeau J. Biofilm formation in dental equipment, janvier 2002. Galerie de photographies de biofilm commentées, consultable sur : www.microbelibrary.org/library/biofilm/2688-biofilm-formation-in-dental-equipment-
4. Payment P, Barbeau J, Gauthier C. Biofilms, infectious agents, and dental unit waterline: a review. *Can J Microbiol* 1998; 44: 1019-1028.
5. Reybrouck G. Hygiène en pratique dentaire : Recommandation du conseil supérieur d'hygiène, mars 1997 – Sortie presse en mars 1999. Consultable sur : <http://www.md.ucl.ac.be/didac/hosp/cours/detdentb.htm#p6>
6. Govoni M. Cleaning or disinfection: whats right for the suction-lines?, mars 2013. Consultable sur : <http://www.dentaleconomics.com/articles/print/volume-103/issue-3/practice/cleaning-or-disinfection-whats-right-for-the-suction-lines.html>
7. Barbeau J, Ten Bokum L, Gauthier C, Presvost AP. Cross-contamination potential of saliva ejectors used in dentistry. *J Hosp Infect* 1998; 40 (4): 303-311.
8. Mann GL, Campbell TL, Crawford JJ. Backflow in low-volume suctionlines: The impact of pressure changes. *J AM Dent Assoc* 1996; 127 (5): 611-615.
9. Watson CM, Whitehouse RL. Possibility of cross-contamination between dental patients by means of the saliva ejector. *J AM Dent Assoc* 1993; 124 (4): 77-80.
10. Center for disease control and Prevention (CDC), Infection Control: Is backflow possible when using a saliva ejector?, juillet 2013. Consultable sur : <http://www.cdc.gov/oral-health/infectioncontrol/faq/saliva.htm>
11. Guide de prévention des infections liées aux soins en chirurgie dentaire et stomatologie. Ministère de la santé, DGS, juillet 2006.
12. Offner D, Deboscker S, Bellotti L, Brisset L, Lavigne T, Musset AM. Elaboration et évaluation d'un protocole d'entretien des unités et fauteuils dentaires (ADEC® et Planmecca®) aux hôpitaux universitaires de Strasbourg, *Hygiènes* 2013; 21 (2): 21-28.
13. Guide technique de l'eau dans les établissements de santé, 2005. Consultable sur : <http://www.sante.gouv.fr/eau-dans-les-etablissements-de-sante.html>
14. Sougakoff W, Trystram D. Stenotrophomonas maltophilia (Xanthomonas), février 2003. Consultable sur : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/resistlacta/POLY.Chp.16.html>
15. Directive n° 98/83/CE du 03/11/98 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.
16. Décret n° 2001-1220 du 20/12/01 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles. *Epidemiol* 2006; 5: 504-509.

Correspondance

*Damien Offner, Faculté de chirurgie dentaire
de Strasbourg, 8 rue Ste Elisabeth, 67000 Strasbourg*

Les auteurs ne déclarent aucun lien d'intérêt.

II. Le nettoyage des porte-instruments dynamiques (PID)

Objectifs : Lors de l'utilisation de porte-instruments dynamiques dentaires (PID), un phénomène de reflux peut entraîner une salissure et une contamination externes et internes du PID, en particulier dans les fines tubulures air/eau. Pour éviter toute contamination croisée, les PID doivent être stérilisés après un nettoyage approfondi. Ce travail a pour but d'établir une méthode pour tester leur nettoyage. En effet, il existe une lacune méthodologique concernant la validation de ce nettoyage en raison de l'architecture complexe des PID.

Matériel et méthode : Cette méthode se décline en un protocole utilisant des souillures artificielles et des tests à la ninhydrine. Son évaluation avec un laveur-désinfecteur-lubrificateur-sécheur (Bioda© de la marque vr2m) en 2 cycles avec chacun 6 PID et après des essais témoins de nettoyage, a pour but de valider sa pertinence et de démontrer l'efficacité des opérations de nettoyage fournies.

Résultats : Après chaque cycle, les PID étaient extérieurement propres. Notre méthode a également montré une propreté interne à l'exception de 2 PID pour lesquels le moteur de l'automate de traitement était défectueux.

Conclusion : Ce travail s'inscrit dans l'amélioration de la gestion du risque infectieux dans les cabinets dentaires. C'est la première méthode jamais proposée pour contrôler le nettoyage interne des PID sans avoir à les détruire, et ce travail démontre la nécessité pour le PID d'être mis en rotation interne pendant le nettoyage. Cette méthode comble les lacunes méthodologiques concernant le nettoyage des PID et permet d'évaluer les résultats des laveurs-désinfecteurs dédiés. Concernant le nettoyage des PID, la méthode pourrait être utilisée pour les étapes initiales de la qualification opérationnelle et des performances, selon la norme NF EN ISO15883.

Ce travail a donné lieu à un article publié dans Dentistry Open Journal (**article 5**).

Research

*Corresponding author

Damien Offner, MD, PhD, DDS, DMD

Faculté de Chirurgie Dentaire de
Strasbourg
Hôpitaux Universitaire de Strasbourg
1 place de l'hôpital
67000 Strasbourg, France
Tel. 0033 6 73 60 57 13
E-mail: damien.offner@hotmail.fr

Volume 3 : Issue 1

Article Ref. #: 1000DOJ3129

Article History:

Received: May 5th, 2016

Accepted: October 18th, 2016

Published: October 18th, 2016

Citation

Offner D, Brisset L, Musset A-M. Cleaning of dental handpieces: A method to test its efficiency, and its evaluation with a washer-disinfector-lubricator-dryer. *Dent Open J*. 2016; 3(1): 10-16. doi: [10.17140/DOJ-3-129](https://doi.org/10.17140/DOJ-3-129)

Copyright

©2016 Offner D. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cleaning of Dental Handpieces: A Method to Test its Efficiency, and its Evaluation With a Washer-Disinfector-Lubricator-Dryer

Damien Offner, MD, PhD, DDS, DMD^{1,2*}; Lucien Brisset, MD, PhD, DDS, DMD¹; Anne-Marie Musset, MD, PhD, DDS, DMD¹

¹Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, Hôpitaux Universitaire de Strasbourg, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche 1109, Faculté de Médecine, 67085 Strasbourg Cedex, France

ABSTRACT

Objectives: When using dental handpieces (HP), a phenomenon of backflow leads to an external and internal soiling and contamination of HP, especially in their narrow air/water pipes. To prevent any cross-infection, HP need to be sterilized after a thorough cleaning. This work aims to establish and assess a method for testing their cleaning. Indeed, there is a methodological gap concerning its validation because of their complex architecture.

Materials and Methods: This method is declined into a protocol using artificial soilings and ninhydrin tests. Its evaluation with a washer-disinfector-lubricator-dryer (WDL) within 2 cleaning cycles with each 6 HP and after control tests, heads to validate its relevance and to demonstrate the effectiveness of the cleaning provided.

Results: After each cycle, all HP were externally clean. Our method also showed an internal cleanliness except for 2 HP whose engines in the automaton were defective.

Conclusion: This work fits with the improvement of infection control in dental practices. It is the first method developed to control the internal cleaning of HP without having to break them, and it demonstrates the need for HP to be put into an internal rotation during their cleaning. It fills the methodological gaps concerning their cleaning and allows assessing HP cleaning from dedicated WDL. According to standard NF EN ISO15883, the method could be used for initial steps of operational or performances qualifications concerning HP cleaning.

KEYWORDS: Dentistry; Infection control; Sterilization.

ABBREVIATIONS: WDL: Washer-disinfector-lubricator-dryer; HP: Handpieces; InVS: Institut de Veille Sanitaire.

INTRODUCTION

Historically, dental rotary instruments were used along with foot-powered dental drills.¹ Now-a-days, they are inserted into dental handpieces (HP), and they are put into action with the help of electric motors. These HP are coupled with narrow pipes bringing air and water to cool down the cutting instrument. During a dental surgeon's procedure, the head of the HP is right in the patient's mouth exposing the instruments to the dental organ and soft tissues and in direct contact with saliva or other biological fluids (blood, pus) in a real septic environment. HP is heat-sensitive, and they are classified as semi-critical reusable medical devices according to the Spaulding classification.²⁻⁴ Therefore, they should follow a complete sterilization cycle before their reutilization.

Moreover, when the HP stops working while performing dental procedure, a physical

phenomenon of backflow occurs.⁵⁻¹¹ Since the head of the HP is running in a septic environment, a retro-contamination and an internal soiling (Figure 1) of the HP occurs, consequently causing external contamination and soiling. This contamination takes place at different levels of the head and body of the HP,¹⁰⁻¹⁷ and the narrow pipes dedicated to bring air and water to the dynamic instrument.^{18,19}



Figure 1: Dismantled HP with inner and outer soiling (Courtesy of Dr. JP Mangion).

Indeed, the head of the HP is not isolated from its body, neither in a watertight nor in an airtight way. This clearly appears by applying compressed air at one end of the head and observing an air outlet to the other end.

This internal contamination can spread to the engine that puts the HP in action, and the contamination of the air/water pipes can spread to the entire unit waterline.^{6,8} The latter can then constitute a secondary reservoir of microorganisms which are aggregated in biofilms. These biofilms could potentially grow from microorganisms that come from the mouth of patients and from the general water supply network. Far from being trivial, the contamination of a unit waterline can lead to serious infections, and even death of patients.²¹ Therefore, the risk of infection is real, and the management of this risk should be seriously integrated in the context of the safety of the procedures.²²

If the contaminated HP does not follow an adequate treatment, it can then become a source of cross-infection endangering the health of the following patients and the health of the healthcare team by exposing them to an increasing risk of infections.^{5,6,14,19,20} Contamination of HP can be of various kinds; many pathogens were found in the HP, such as hepatitis B virus,¹³ or *Pseudomonas spp* and *Staphylococcus aureus*.¹⁹ A mathematical modeling conducted by the Institut de Veille Sanitaire (InVS) in 2009 shows that each year in France, the neglected treatment of HP would be responsible for 200 contaminations caused by the virus of hepatitis B, 2 contaminations by the virus of hepatitis C, and one by HIV.¹¹

To expose patients to this infectious risk while there are ways to minimize it, including a correct treatment of HP, is

ethically unacceptable.^{2,5,23} In order to be in good standing with the regulations concerning the treatment of semi-critical medical devices in dentistry, it is necessary, essential and mandatory to sterilize HP between each patient.^{2-5,8-10,14,15,17,18,24-27} To ensure a complete and efficient sterilization of HP and any other instrument, and to ensure that the steam can reach the whole surface that has to be sterilized, the instruments must previously be cleaned.^{3,4,14,20,21,28-30} Many studies also emphasized this point that it is essential that HP benefit from an optimal cleaning to ensure the effectiveness of their sterilization.^{10,12,27,32-34} On one side, the external cleaning of HP does not raise problems. On the other side, great difficulties remain to realize internal cleaning effectively^{22,31,35} mainly because of the complex internal architecture of HP, and the very reduced dimensions of the air/water pipes.^{22,28,34,36}

Many manufacturers have tried to develop an automaton to perform a thorough cleaning of HP, both external and internal. They were faced with the difficulty to develop such an automaton,^{31,33,37,38} because residues still remain on the surfaces which should appear clean, even if the cleaning machine is more effective than the manual cleaning.³¹ Moreover, it is difficult to assess the good internal cleaning of HP because they are fragile and mostly designed not to be dismantled. Literature also raises the question of a proven method to control the good internal cleaning of HP which is a problem concerning HP that are not meant to be dismantled.^{15,28,35} Indeed, the standards for the general requirements of washer-disinfectors performances³⁹ advocates a visual validation of the good cleaning of instruments required to ensure a complete and effective sterilization cycle. If this validation does not raise problems for full instruments, it is not the case for the hollow instruments, neither is it for the ones that should not be dismantled.

OBJECTIVE

The aim of this original study is to develop a validation method of the external and internal cleaning of HP without being destructive. The secondary objective is to assess the method by applying it with a washer-disinfector-lubricator-dryer (WDL) dedicated to HP.

MATERIALS AND METHODS

Tests have been thought for the operator to be able to visualize the inside of the HP. Since the task is accurate and meticulous, the tests cannot be considered as a routine, and they participate in the originality of our work. The tests took place within 2 cycles according to the following protocol, after having performed control experiments.

Soil Test[®] (Browne/STERIS, Le Haillan, France) was used, and tests with Ninhydrin (CleanTrace[®], 3M, Cergy, France) were also performed in order to assess the presence or absence of protein residues, and therefore validate the surfaces

cleanliness. The WDL used during these tests was the Bioda® (vr2m, Semoy, France).

The Protocol

1. Dismantle the HP (Figure 2).
2. Stain the outside (body of the HP) and inside (air/water pipes, gears) using Soil Test®. Also, stain the load racks (block support for the HP, sides of the tank). Soil Test® was chosen because of the good adaptability of the form in which it is presented to the protocol that is described, and its adequacy with biological fouling.⁴⁰
The head of the HP is stained using a Soil Test® syringe. The air/water pipes are stained using a Soil Test® syringe whose mouthpiece is suitable for their diameter. The pressure on the plunger of the syringe will be made until the Soil Test® comes out by the other side of the pipe.
3. Reassemble the HP.
4. Connect the HP in the automaton (Figure 3), and run a cycle with inactivation of the disinfection phase (as specified in the standard NF EN ISO 15883-1 for washing tests).³⁹
5. Visually observe the presence/absence of soiling residues on the outside of the HP. Perform a test with Ninhydrin (CleanTrace®) in case of absence.
6. Dismantle the HP.
7. Visually observe the presence/absence of residues of soiling. Push a 0.7 mm diameter nylon thread through the air/water pipes over a clean plate. The thread is adjusted to the diameter of the pipe and will displace any remaining residual soiling that will be observable upon its release. Observe the pres-

ence of soiling on the end and/or on the body of the thread under the microscope. Observe the presence of deposits on the plate. Perform a test with Ninhydrin (CleanTrace®) on the thread in case of absence.

8. Reassemble the HP/start again at point 2. for a new cycle.

Control Experiments

1. Control tests were performed on an artificially soiled HP according to the steps described in this protocol, but without the cleaning step (Step 4).
2. Steps 5 to 8 of the protocol were followed on a HP which was naturally soiled during a normal use in dental surgery practice and treated routinely with a manual cleaning.

First Cycle

The first tests cycle was carried out on 6 universal-fitting HP (valid for HP from brands such as WH®, BienAir®, MicroMega®, Mont Blanc®, etc.). The cleaning cycle has been set to 15 minutes, using Deconex® (Borer Chemie AG, Zuchwil, Switzerland) as detergent at 8 ml/L of water. During the start-up of the cycle, 2 HP were turning on themselves, showing an absence of rotation of the internal bearings. The engine examination of the support brackets confirmed that they were defective.

Second Cycle

The second cycle was carried out on the same 6 universal-fitting HP, previously cleaned before being soiled again using Soil Test®. The cleaning cycle has been set to 4 minutes, using the

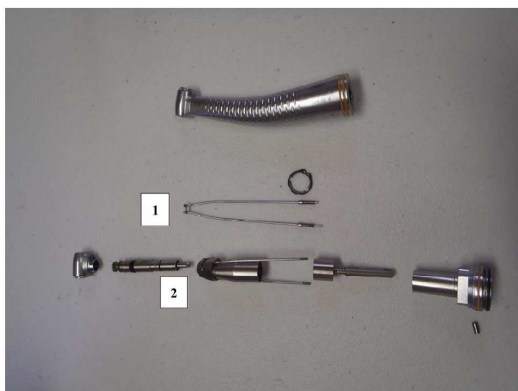


Figure 2: Dismantle of the HP.

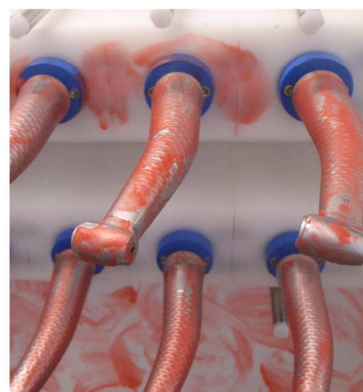


Figure 3: Connection of the soiled HP in the automaton. Soiled load racks and tank sides.

VR-DYME® (vr2m, Semoy, France) as detergent. The engines were changed and during the cycle, the entire HP has shown in internal rotation.

RESULTS

Control Tests

1. The control tests confirm the presence of Soil Test® in the air/water pipes and validate the relevance of pushing the nylon thread through these, because the thread highlights the internal staining of these pipes (Figure 4).
2. The control test on the HP stained during a normal use and treated manually in routine shows residues inside the head of the HP (Figure 1) and the air/water pipes. Ninhydrin tests have been performed by swabbing the thread in both situations, and the results were positive (turning to purple) (Table 1).

First cycle

At the end of the washing cycle (15 minutes), HP have been disconnected from the WDL and handled with gloves. Visual examination showed a lack of residual soiling on the body of the

HP as well as on the load racks.

After dismantling the HP, the areas likely to be soiled in a usual dental surgeon’s practice appeared to be clean on the 4 HP for which the motor worked properly. The nylon thread in the pipes showed neither deposit on the thread itself nor on the plate over which it was conducted (Figure 5). Ninhydrin tests were performed on these soilless surfaces, and the results were negative. Concerning the 2 HP which had not been put into an internal rotation, a residual soiling was apparent on the half of the surface of one gear, the other half appeared clean (Table 1). This is shown on Figure 6 through the blue marker and demonstrates the importance of the internal rotation of the HP during the cleaning cycle.

Second cycle

At the end of the washing cycle (4 minutes), the HP have been disconnected from the WDL and handled with gloves. Visual examination showed a lack of residual soiling on the body of the HP as well as on the load racks.

After having dismantled the HP, the areas likely to be soiled in a usual dental surgeon’s practice appeared to be clean.

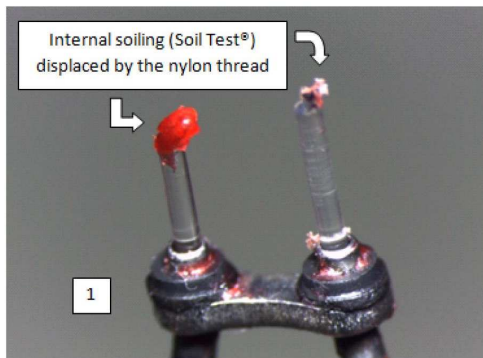


Figure 4: Highlighted interest of pushing a nylon thread through the air/water pipes.

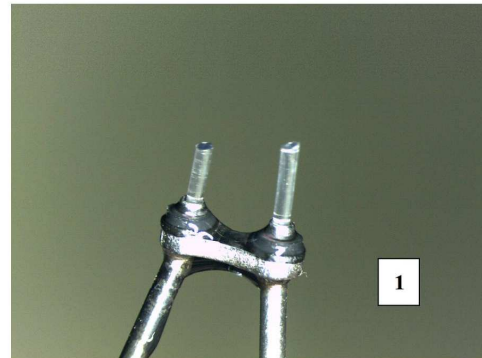


Figure 5: Highlighted cleanliness of the air/water pipes of the HP.

Experiment	Type of soiling	Number of HP	Protocol steps	Cleaning modalities	Results
Control test 1	Soil Test®	1	All but 4	No cleaning	External and internal soiling
Control test 2	Soiling during normal use in dental practice	1	5 to 8	Manual cleaning	External cleanliness Internal soiling
1 st cycle	Soil Test®	6	1 to 8	WDL with Deconex®	External cleanliness Internal cleanliness except for 2 HP whose engine on the support brackets were defective
2 nd cycle	Soil Test®	6	1 to 8	WDL with VR-DYME®	External and internal cleanliness

Table 1: Modalities and results of the tests.

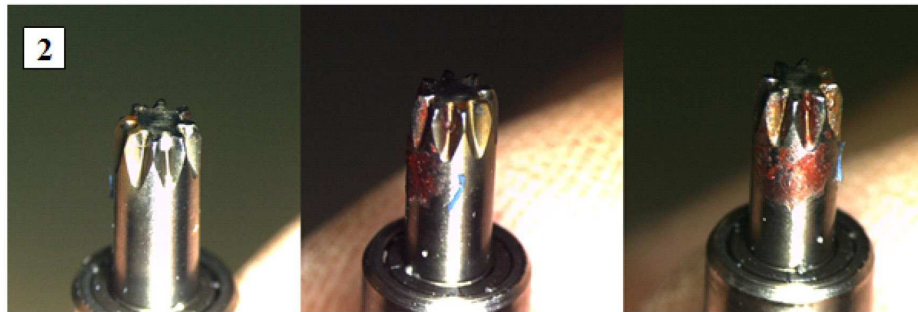


Figure 6: Highlighted soiling on the half of the same gear, due to the non-internal rotation of the HP.

Ninhydrin tests were performed on these soiless surfaces and were negative.

The nylon thread in the pipes showed no deposit on the thread itself, or on the plate over which it was conducted. Ninhydrin tests were performed on the nylon threads, and the results were negative (Table 1).

DISCUSSION

This protocol is the first protocol proposed to control the internal cleaning of the HP without having to destroy them. Such a method of evaluation can easily be used in the initial steps of an operational qualification or a qualification of the performance of a WDL. Indeed, the standard for the general requirements of washer-disinfectors performances³⁹ demands a primary validation of the cleaning of the HP using an artificial soiling before their use in an actual practice.

In two cycles, the tests show the effectiveness of the cleaning. Indeed, the HP and the load racks appear clean after the two cycles (15 minutes, and even after a shorter cycle of 4 minutes). Disassembly also shows a cleaning efficiency in the visible areas beneath the body of the HP and into the air/water pipes as well. Finally, the results of these tests are confirmed by the absence of reaction with Ninhydrin.

The tests also show that it is essential that the HP kept in internal rotation (as it is when they are used by the dental surgeon as he is working in the patient's mouth) during the cleaning process. Indeed, a lack of internal rotation, as it was the case for 2 HP in the first cycle produces an incomplete cleaning because fluids cannot reach all the surfaces.

This validation method is consistent with the initial applications of standard NF EN ISO 15883 concerning the cleaning of the instruments. However, some limits should be mentioned; since the final validation of the cleaning is based on a visual assessment (as required in the standard NF EN ISO 15883), it is impossible to scientifically ensure the good cleaning inside the parts of bearing without damaging the equipment, because they are not removable and are not accessible to swabs or ny-

lon threads. The protocol appears to be meticulous to achieve, and the manipulations are very delicate because they were made on HP that are not designed to be disassembled and once items are removed, they are easily breakable. It may very well find its place into the initial qualifications of an automaton dedicated to the treatment of the HP, but it seems hardly applicable to periodic requalification of these automata in a routinely dental practice.

Other tests may be performed in the future in order to strengthen the relevance of this method in order to optimize the automaton washing time and to assess the performances of any other WDL.

CONCLUSION

HP's are reusable semi-critical medical devices that generate soilings and contaminations through the backflow phenomenon inter alia located on the outer surface, inner surface and in the narrow air and water pipes. This initial contamination can become the source of cross-contaminations. Additionally, the good treatment of HP is a regulatory obligation that must follow a sterilization process between each patient, preceded by an effective cleaning.

The validation method of the cleaning of the HP presented in this article clearly fits with an approach of improving the safety of practices, and the management of the risk of infection in dental care procedures, both for patients and for the healthcare team. It fills the methodological gaps concerning the cleaning of the HP as required in the standard NF EN ISO 15883. Although its implementation is meticulous and accurate, it allows at lower cost to assess the HP cleaning.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Guillermo Tejada and Maxime Schall for their help in proofreading.

CONFLICTS OF INTEREST

All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

FINANCIAL SUPPORT: None reported.

REFERENCES

- Société Française de l'Histoire de l'Art Dentaire (SFHAD), *Histoire de l'aménagement opératoire du cabinet dentaire*, on-line information. Web site. www.biusante.parisdescartes.fr/sfhad. Accessed May 4, 2015.
- Brisset L, Lécolier MD. *Hygiène et asepsie au cabinet dentaire* [In French]. Issy-les-Moulineaux, France: Masson; 1997: 198.
- Ministère de la Santé, DGS. *Guide de prévention des infections liées aux soins en chirurgie dentaire et en stomatologie* [In French]. 2006. Web site. http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Guide_de_prevention_des_infections_liees_aux_soins_en_chirurgie_dentaire_et_en_stomatologie.pdf. Accessed May 4, 2015.
- Association Dentaire Française (ADF). *Grille technique d'évaluation pour la prévention des infections associées aux soins* [In French]. 2013. Web site. http://www.fncs.org/sites/default/files/pdf/GRILLE_DEVALUAT_DES_CAB_DENTAIRES_oct_2011.pdf. Accessed May 4, 2015.
- Pankhurst CL, Johnson NW, Woods RG. Microbial contamination of dental unit waterlines: The scientific argument. *Int Dent J*. 1998; 48: 359-368. doi: [10.1111/j.1875-595X.1998.tb00697.x](https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.1998.tb00697.x)
- Sacchetti R, Baldissarri A, De Luca G, Lucca P, Stampi S, Zanetti F. Microbial contamination in dental unit waterlines: comparison between Er: Yag laser and turbine lines. *Ann Agric Environ Med*. 2006; 13: 275-279.
- Petti S, Moroni C, Messano GA, Polimeni A. Detection of oral streptococci in dental unit water lines after therapy with air turbine handpiece: Biological fluid retraction more frequent than expected. *Future Microbiol*. 2013; 8(3): 413-421. doi: [10.2217/fmb.12.151](https://doi.org/10.2217/fmb.12.151)
- Chin JR, Miller CH, Palenik CJ. Internal contamination of air-driven low-speed handpieces and attached prophylaxis angles. *J Am Dent Assoc*. 2006; 137(9): 1275-1280. doi: [10.14219/jada.archive.2006.0386](https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0386)
- Chin JR, Westerman AE, Palenik CJ, Eckert SG. Contamination of handpieces during pulpotomy therapy on primary teeth. *Pediatr Dent*. 2009; 31(1): 71-75. Web site. <http://www.ingentaconnect.com/content/aapd/pd/2009/00000031/00000001/art00011>. Accessed May 4, 2016.
- Checchi L, Montebugnoli L, Samaritani S. Contamination of the turbine air chambre: A risk of cross-infection. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(8): 607-611. doi: [10.1111/j.1600-051X.1998.tb02495.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02495.x)
- Institut de Veille Sanitaire (INVS). Analyse du risque infectieux lié à la non-stérilisation entre chaque patient des portements rotatifs en chirurgie dentaire [In French]. 2009. Web site. http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2009/risques_chirurgie_dentaire/index.html. Accessed May 4, 2016.
- Hu T, Meng X, Zuo Y, Zhou X. A study on bacterial contamination of dental handpieces. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2001; 19(2): 93-4, 98.
- Deng XH, Sun Z, Qiao H, Deng HY, Xiao X, Su J. The possibility of hepatitis B virus transmission through dental handpieces. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2005; 39(3): 199-202.
- Larsen T, Andersen HK, Fiehn NE. Evaluation of a new device for sterilizing dental high-speed handpieces. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997; 84(5): 513-516. doi: [10.1016/S1079-2104\(97\)90268-7](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(97)90268-7)
- Ojajärvi J. Prevention of microbial contamination of the dental unit caused by suction into the turbine drive air lines. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996; 81: 50-52. doi: [10.1016/S1079-2104\(96\)80147-8](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(96)80147-8)
- Smith A, Smith G, Lappin DF, Baxter HC, Jones A, Baxter RL. Dental handpiece contamination: A proteomics and surface analysis approach. *Biofouling*. 2014; 30(1): 29-39. doi: [10.1080/08927014.2013.839782](https://doi.org/10.1080/08927014.2013.839782)
- Herd S, Chin J, Palenik CJ, Ofner S. The in-vivo contamination of air-driven low-speed handpieces with prophylaxis angles. *J Am Dent Assoc*. 2007; 138(10): 1360-1365. doi: [10.14219/jada.archive.2007.0053](https://doi.org/10.14219/jada.archive.2007.0053)
- Dreyer AG, Hauman CH. Bacterial contamination of dental handpieces. *SADJ*. 2001; 56(11): 510-512. Web site. <http://europepmc.org/abstract/med/11885426>. Accessed May 4, 2016.
- Smith G, Smith A. Microbial contamination of used dental handpieces. *Am J Infect Control*. 2014; 42(9): 1019-1021. doi: [10.1016/j.ajic.2014.06.008](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.06.008)
- Lewis DL, Boe RK. Cross infection risks associated with current procedures for using high-speed dental handpieces. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(2): 401-406.
- Ricci ML, Fontana S, Pinci F, et al. Pneumonia associated with a dental unit waterline. *Lancet*. 2012; 379(9816): 684. doi: [10.1016/S0140-6736\(12\)60074-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60074-9)
- Weightman NC, Lines LD. Problems with the decontamination of dental handpieces and other intra-oral dental equipment in hospitals. *J Hosp Infect*. 2004; 56(1): 1-5. doi: [10.1016/j.jhin.2003.09.006](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2003.09.006)
- Offner D. Motiver et remotiver l'équipe soignante d'un cab-

- inet dentaire à l'application des mesures d'hygiène par une expérience de pensée éthique [In French]. *Ethique et Santé*. 2013; 10: 18-21. doi: [10.1016/j.etiqe.2012.11.001](https://doi.org/10.1016/j.etiqe.2012.11.001)
24. Hauman CH. Crossinfection risks associated with high-speed dental handpieces. *J Dent Assoc S Afr*: 1993; 48(7): 389-391.
25. Samaranyake L. Handpiece and water line decontamination and HIV transmission: A critique. *Dent Update*. 1993; 20(2): 53-4, 56.
26. Deng XH, Sun Z, Su J. Current status of disinfection and sterilization for dental handpieces in the hospitals. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2004; 38(6): 365-368.
27. Young JM. Keys to successful handpiece maintenance. *Tex Dent J*. 1997; 114(12): 15-19.
28. Perrin D. *Les Instruments Dynamiques*. *Clinic*. 1999; 20(7).
29. Thiveaud D. Du nettoyage à la stérilisation. Le lavage: l'étape essentielle [In French]. *Hygienes*. 2: 27-34.
30. Arbeitskreis Instrumentenaufbereitung. *Traitement correct des instruments de chirurgie* [In French]. 8th ed. 2004. Web site. www.a-k-i.org. Accessed January 2015.
31. Zhou X, Huang H, He X, Chen H, Zhou X. Effect of manual cleaning and machine cleaning for dental handpieces. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2013; 31(4): 369-371.
32. Chassot E. *Le nettoyage en priorité, 3^{ème} symposium international de Bâle* [In French]. 2006. Web site. www.sssh.ch. Accessed January 2015.
33. Smith GW, Smith AJ, Creanor S, Hurrell D, Bagg J, Lappin DF. Survey of the decontamination and maintenance of dental handpieces in general dental practice. *Br Dent J*. 2009; 207(4): 160-161. doi: [10.1038/sj.bdj.2009.761](https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2009.761)
34. Musso P. Le lavage des dispositifs médicaux en stérilisation dans les établissements de santé: évolution, aspects techniques et réglementaires [In French]. *IRBM News*. 2007; 28(4): 24-31.
35. Kudhail R. Can oil lubricated dental handpiece be sterilized?: part 2. Literature review. *Dent Update*. 2013; 40(8): 630-632.
36. Arbeitskreis Instrumentenaufbereitung. *Traitement correct des instruments dans les cabinets dentaires* [In French]. 3rd ed. 2005. Web site. www.a-k-i.org. Accessed January 2015.
37. Walker J, Kingston R, Chell K. Evaluation of washer disinfectant for use in dental practices. The preliminary program for IADR General Session – poster. 2010.
38. Simonetti D'Arca AS, Petti S, Tomassini E, Polimeni A. A new device for the disinfection of handpieces and turbines. *Minnerva Stomatol*. 1995; 44(7-8): 369-375.
39. *Norme NF EN ISO 15883 parties 1 et 2 relatives aux exigences générales des performances des laveurs-désinfecteurs* [In French]. 2009.
40. Association Française de Stérilisation (AFS). *Qualification et requalification des laveurs-désinfecteurs* [In French]. 2009. Web site. www.afs.asso.fr. Accessed January 2015.

Lors de l'usage quotidien des unités dentaires, des problèmes infectieux récurrents mettant en danger la sécurité des pratiques ont été objectivés par des prélèvements microbiologiques. Afin de maîtriser le risque infectieux, nous avons élaboré un protocole d'entretien des fauteuils et des unités dentaires. Ce protocole est fondé sur les conclusions des travaux précédents concernant la gestion du risque infectieux. Ce risque peut être lié aux contaminations externes d'une part, et internes provenant du système d'aspiration et de la rétro-contamination liée à l'utilisation des PID, d'autre part. Ce protocole s'est avéré efficace, et le travail d'évaluation a ensuite fait l'objet de l'édition d'un « Guide d'entretien des unités et fauteuils dentaires » diffusé au sein des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (Annexe B).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la gestion du risque infectieux lié à la qualité microbiologique de l'eau circulant dans les unités, au moyen de systèmes de désinfection en continu de celle-ci.

III. Protocole d'entretien des units et fauteuils dentaires

L'activité médico-chirurgicale bucco-dentaire est une des situations où l'eau est entrée dans le champ du soin de manière indirecte (afin de permettre l'utilisation de matériel rotatif provoquant des échauffements locaux, ainsi que dans un but de rinçage) et représente un risque notamment infectieux. Actuellement, le niveau de qualité auquel doit répondre cette eau n'est pas normé en odontologie, mais le risque sanitaire (et donc infectieux) lié à l'eau circulant dans les units dentaires est une préoccupation émergente pour les professionnels de santé concernés. Ceux-ci, comme le chirurgien-dentiste ou l'assistante dentaire, sont exposés aux microorganismes présents dans l'eau des units en même temps que le patient. Il est possible de limiter ce risque infectieux grâce à des mesures de prévention et d'action.

L'ouverture du nouveau Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) a constitué le cadre idéal, après mise en évidence par prélèvements d'un problème lié à des micro-organismes présents dans l'eau circulant dans les units, de la mise en place d'une politique de prévention du risque infectieux. Pour ce faire, nous avons élaboré un protocole d'entretien des units et des fauteuils dentaires, ainsi qu'un processus d'évaluation.

Ce travail a donné lieu à un article publié dans HygieneS (**article 6**).

Elaboration et évaluation d'un protocole d'entretien des units et fauteuils dentaires (ADEC® et Planmeca®) aux hôpitaux universitaires de Strasbourg

D. Offner¹, S. Deboscker², L. Belotti³, L. Brisset¹, T. Lavigne², A.-M. Musset¹

1- Laboratoire d'épidémiologie et de santé publique en odontologie

2- Service d'hygiène hospitalière

3- Laboratoire Hygiène environnement

Hôpitaux universitaires de Strasbourg

Dr Damien Offner – Laboratoire d'épidémiologie et de santé publique en odontologie – Hôpitaux universitaires de Strasbourg
1, place de l'hôpital – 67000 Strasbourg – E.mail : damien.offner@hotmail.fr

L'activité médico-chirurgicale bucco-dentaire est une des situations où l'eau est entrée dans le champ du soin de manière indirecte (afin de permettre l'utilisation de matériel rotatif provoquant des échauffements locaux, ainsi que dans un but de rinçage) et représente un risque notamment infectieux. Actuellement, le niveau de qualité auquel doit répondre cette eau n'est pas normé en odontologie, mais le risque sanitaire (et donc infectieux) lié à l'eau circulant dans les units dentaire est une préoccupation émergente pour les professionnels de santé concernés. Ceux-ci, comme le chirurgien-dentiste ou l'assistante dentaire, sont exposés aux microorganismes présents dans l'eau des units en même temps que le patient. Il est possible de limiter ce risque infectieux grâce à des mesures de prévention et d'action. L'ouverture du nouveau pôle de médecine et de chirurgie bucco-dentaires des hôpitaux universitaires de Strasbourg (HUS) a constitué le cadre idéal, après mise en évidence par prélèvements d'un problème lié à des microorganismes présents dans l'eau circulant dans les units, de la mise en place d'une politique de prévention du risque infectieux.

Pour ce faire, nous avons élaboré un protocole d'entretien des units et des fauteuils dentaires, ainsi qu'un processus d'évaluation.

L'unit dentaire et les risques

L'unit est un dispositif médical complexe intégrant les circuits de distribution d'eau, d'air, et d'électricité qui alimentent les instruments (porte-instruments rotatifs [PIR], détartreurs, seringues air/eau), et un circuit d'évacuation des eaux usées. Des cordons souples multicanalaires (fouets) permettent de conduire l'eau et l'air vers les instruments. L'eau circule dans les circuits internes de l'unit, et sa qualité est directement corrélée à la qualité d'eau d'approvisionnement qui peut provenir, soit du réseau municipal, soit d'un réservoir indépendant. Dans les deux cas, il existe un risque de contamination, à savoir :

- Dans le premier cas :
 - par une augmentation de la température de l'eau lors de son passage dans les circuits ;
 - par le fait qu'une eau riche en minéraux favorise le développement d'un biofilm ;

RÉSUMÉ

L'eau est un adjuvant nécessaire à l'activité médico-chirurgicale bucco-dentaire. Elle est devenue indispensable, eu égard à ses nombreux avantages, mais présente aussi un risque infectieux. L'ouverture du nouveau pôle de médecine et de chirurgie bucco-dentaires des hôpitaux universitaires de Strasbourg a constitué le cadre idéal, après mise en évidence par prélèvements d'un problème lié à des microorganismes présents dans l'eau circulant dans les units, de la mise en place d'une politique de prévention du risque infectieux. Celle-ci passe par l'élaboration d'un protocole d'entretien des units et des fauteuils dentaires efficace, rigoureux et détaillé, et par son évaluation permise à la fois par la feuille de traçabilité qui l'accompagne et par des prélèvements biologiques réguliers au niveau de l'eau des units.

MOTS-CLÉS Protocole d'Entretien – Unit dentaire.

ABSTRACT

Drawing up and evaluating a protocol for cleaning dental units and dental chairs (ADEC® and PLANMECA®) at the Strasbourg teaching hospitals

Water is essential in dental units. It is indispensable as it is used for many different purposes but also presents a risk of infection. When the new Dental Medicine and Surgery Center in the Strasbourg teaching hospitals was opened, sampling revealed contamination by microorganisms in the water supply to the dental units. This was the ideal opportunity for implementing measures to prevent the risk of infection. An effective, strict, detailed protocol for cleaning the units and dental chairs was drawn up. The protocol was evaluated using the accompanying traceability form and regular biological sampling of the water in the units.

KEYWORDS Protocol of Maintenance – Dental Unit.

- par une prolifération des microorganismes dans les résines humides qui composent les adoucisseurs.

- Dans le second cas :
 - une contamination par les microorganismes cutanés lors de la manipulation des réservoirs indépendants (des études ont montré la présence possible de *Staphylococcus epidermidis* ou encore *S. aureus* [1]).

Ce risque de contamination est d'ailleurs avéré, puisqu'on rapporte le décès, en Italie, d'une patiente de 82 ans victime d'une légionellose à la suite d'une contamination des circuits internes d'eau d'un unit dentaire [2]. En plus de ces risques, il existe une probable rétrocontamination par un mécanisme d'aspiration de liquide buccal par reflux lors de l'arrêt de la rotation des instruments. On peut alors mettre en place des vannes anti-rétractions dont l'efficacité a toutefois déjà été remise en question [3-6]. De même, le rapport surface/volume élevé du circuit de distribution (longs tuyaux fins) et la présence d'un flux d'eau laminaire peuvent favoriser la formation d'un biofilm [7-9]. Les valeurs des concentrations en bactéries dans l'eau des units varient considérablement dans la littérature. Une contamination pouvant atteindre 10⁵ UFC/ml a déjà été rapportée [10]. L'utilisation intermittente (non-utilisation le soir, le week-end...) conduit à une stagnation de l'eau, permettant le développement du biofilm, réservoir qui peut à lui seul entretenir la contamination de l'eau. Il existe trois voies d'exposition aux microorganismes :

- l'ingestion directe (par le patient),
- le contact cutané-muqueux (pour le patient et l'équipe soignante),
- l'inhalation d'aérosols contaminés (pour le patient et l'équipe soignante).

En France comme aux États-Unis, on estime que l'eau de sortie des units dentaires doit au moins répondre aux critères de qualité de l'eau d'entrée de l'unit. En effet, même si cette eau n'est pas destinée à la consommation humaine, le patient peut en ingérer pendant les soins dentaires [11]. Ces critères correspondent aux normes données par l'*American Dental Association* (ADA) en 2004 [12], soit une concentration de flore aérobie inférieure à 500 UFC/ml. Pour les soins chirurgicaux bucco-dentaires, il est recommandé de n'utiliser que de l'eau stérile [11]. Les mesures existantes alors pour lutter contre le risque infectieux lié à l'utilisation de l'eau des units sont les suivantes :

- Les purges : 5 minutes le matin, 20 à 30 secondes entre chaque patient. Ces purges vont réduire le nombre de bactéries en suspension, elles concernent les circuits d'eau de la seringue air/eau et des PIR. Leur intérêt n'est pas remis en cause, mais leur efficacité apparaît limitée, car il n'y a pas d'action sur le biofilm [9,13,14].
- La désinfection du circuit d'eau : en prenant garde à son efficacité, à son innocuité et à sa compatibilité avec le matériel. La chloration par exemple est un principe de désinfection largement utilisé de façon courante sur l'alimentation centrale en eau. De façon exceptionnelle, des

chocs chlorés à concentration très importante (15 mg/l, 50 mg/l, voire 100 mg/l) peuvent être appliqués à des units non utilisés pour les soins (la cause évidente est la toxicité pouvant être induite).

- Les valves anti-reflux.
- La filtration : en sachant qu'il existe une recontamination bactérienne en 24 heures. Les filtres seront alors à changer chaque jour, ou à stériliser [15]. Ils n'ont pas d'effet sur le biofilm en amont, et leur efficacité clinique n'est pas encore démontrée.
- L'utilisation d'un système indépendant d'eau propre : sous condition de nettoyages et de désinfections réguliers, avec précautions lors de la manipulation [1].

Matériel et méthode

Le contrôle microbiologique de l'eau potable dans les établissements de santé comprend plusieurs conditions d'ensemencement selon le type d'analyses souhaitées ainsi que des fréquences de prélèvements. Ces conditions d'ensemencement ainsi que les normes utilisées sont énumérées dans le **tableau I**.

Vu l'hétérogénéité des recommandations européennes et américaines concernant la qualité que doit présenter l'eau des units, l'équipe opérationnelle d'hygiène (EOH) des HUS a décidé de prendre comme niveau cible le niveau de qualité de l'eau potable détaillé dans la directive européenne de 1998 [16], et repris dans le décret d'application de 2001 [17]. Comme niveau d'action, le niveau de qualité proposé par l'ADA en 1996 a été choisi. Le niveau cible représente le niveau de qualité que l'eau de sortie doit satisfaire dans les conditions normales de fonctionnement. Le niveau d'action représente le niveau qui doit immédiatement déclencher la mise en place de mesures correctives. Les prélèvements d'eau se font systématiquement au niveau de l'eau d'entrée de l'unit dentaire, au niveau du crachoir, et au niveau du dernier fouet du bloc multiplex (le plus éloigné de l'entrée d'eau), afin de déterminer rapidement si le problème est lié à une non-conformité de l'eau d'entrée (contamination du réseau d'eau qui alimente l'unit) ou à une contamination des circuits internes de l'unit (**Tableau II**). Selon la concentration en flore aérobie à 22 °C et la présence de germes pathogènes (*Pseudomonas aeruginosa*, entérocoques, *Escherichia coli*), les résultats sont rendus conformes, acceptables, ou non conformes. Les seuils d'interprétation sont résumés dans le **tableau III** en ce qui concerne les units destinés aux soins standards.

En cas de résultats « conformes » aux valeurs attendues, le protocole d'entretien en place (nettoyage, purges...) sera poursuivi. En cas de résultats « acceptables », ce protocole sera renforcé, poursuivi avec plus de rigueur pour que les prochains prélèvements montrent une amélioration. Si cette amélioration n'est pas atteinte, et que les résultats sont « non conformes », l'EOH recommande d'interdire l'usage de l'unit jusqu'à normalisation des résultats. Une maintenance curative de type désinfec-

Tableau I – Conditions d'analyse des différents critères de qualité de l'eau à usage alimentaire.

Microorganismes recherchés	Volume analysé	Durée maximale de conservation avant analyse (heures)	Température (° C) de conservation avant analyse	Conditions d'ensemencement des échantillons	Norme
FAR ¹ à 22 °C	1 ml	12	5 ± 3	72 h à 22 °C sur gélose PCA ² par inclusion ou filtration	NF EN ISO ³ 6222 (1999)
FAR à 36 °C	1 ml	12	5 ± 3	48 h à 36 °C sur gélose PCA par inclusion ou filtration	NF EN ISO 6222 (1999)
Coliformes et <i>E. coli</i>	100 ml	6	Ambiante (≤ 25 °C)	24 h à 36 °C sur gélose TTC ⁴ par filtration sur membrane	NF EN ISO 9308-1 (2000)
	100 ml	24	5 ± 3	2 ^e lecture à 48 h	
Entérocoques	100 ml	6	Ambiante (≤ 25 °C)	48 h à 36 °C sur gélose Slanetz par filtration sur membrane	NF EN ISO 7899-2 (2000)
	100 ml	24	5 ± 3		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 ml	NC ⁵	NC	48 h à 36 °C sur gélose au cétrimide par filtration sur membrane	NF EN ISO 16266 (2008)

FAR: Flore aérobie revivifiable. PCA: Plate Count Agar = gélose pour le dénombrement des microorganismes aérobies revivifiables. 3- NF EN ISO: Normes internationales (International Organization Standardisation) reprises en Europe (European Norm) et en France (Norme Française). 4- TTC: Tergitol = milieu de recherche et de dénombrement des coliformes. 5- NC: non concerné.

tion des conduites d'eau internes de l'unité est demandée. Pour les fauteuils de la marque PLANMECA®, ceci consiste en un traitement interne au DIALOX® qui est réalisé par les agents de la direction des équipements. Pour les fauteuils de la marque ADEC®, la démarche est la suivante :

- retirer les instruments dynamiques ;
 - passez une solution à 0,1 % de chlore actif, c'est-à-dire, en utilisant des comprimés de chlore effervescents, mettre un comprimé dans un litre d'eau puis remplir le bidon du fauteuil ADEC® (700 ml) ;
 - passer le bidon de 700 ml rempli de cette solution ;
 - laisser agir 30 minutes ;
 - rincer abondamment par passage de deux bidons de 700 ml remplis d'eau filtrée. Entre les deux rinçages, passer de l'air comprimé (en plaçant une bouteille vide) afin d'aider au décrochage de particules organiques.
- Une fois ces mesures effectuées, de nouveaux prélèvements de contrôle sont faits pour décider de la libération ou non de l'unité. Après une première alerte sur l'eau des unités, une maintenance préventive pour tous les unités des HUS a été déterminée, début mai 2010. Les mesures suivantes sont mises en place :
- purge des tubulures en début de journée et entre chaque patient,
 - désinfection périodique (deux fois par an) au DIALOX®,
 - contrôle systématique (au moins une fois par an),
 - inclusion au plan de surveillance « légionnelles » des HUS,
 - mise en place de valves anti-retour au niveau des PIR, détartreurs, et seringues air/eau sur les unités qui n'en ont pas encore.

Le 17 janvier 2011 a lieu l'ouverture du nouveau pôle de médecine et de chirurgie bucco-dentaires sur le site de l'hôpital civil de Strasbourg, présentant 96 unités dont 29

Tableau II – Seuils microbiologiques retenus pour les unités dentaires des hôpitaux universitaires de Strasbourg.

Type de recherche	Niveau cible	Niveau d'action
Flore aérobie revivifiable à 22°C	≤ 100 UFC/ml	≥ 200 UFC/ml
<i>Escherichia coli</i>	< 1 UFC/100 ml	≥ 1 UFC/100 ml
Entérocoques	< 1 UFC/100 ml	≥ 1 UFC/100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 1 UFC/100 ml	≥ 1 UFC/100 ml

Tableau III – Seuils d'interprétation des résultats de prélèvements de l'eau des unités dentaires aux hôpitaux universitaires de Strasbourg (soins standards).

Résultats	Interprétation
Flore aérobie à 22°C ≤ 100 UFC/ml et absence de germes pathogènes	→ Résultats conformes aux valeurs attendues
Flore aérobie à 22°C > 100 UFC/ml Flore aérobie à 22°C < 200 UFC/ml et absence de germes pathogènes	→ Résultats acceptables
Flore aérobie à 22°C ≥ 200 UFC/ml ou Présence de germes pathogènes : • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Entérocoques • <i>Escherichia coli</i>	→ Résultats non conformes → Interdire l'usage de l'unité

nouveaux (ADEC®, et PLANMECA® pour les anciens). L'EOH a prescrit des contrôles d'eau à des points pertinents afin de s'assurer de la conformité microbiologique de l'eau avant l'ouverture. Des contrôles réguliers et des actions d'assainissement (purge de l'eau du bâtiment, désinfection complète des circuits d'eau, mise en place d'un système d'adjonction de chlore en amont de l'adoucisseur d'eau qui alimente l'ensemble du bâtiment jusqu'à l'ouverture du centre de soins) ont été nécessaires d'octobre

2010 à janvier 2011, afin d'assurer l'ouverture du nouveau pôle dans de bonnes conditions. Celles-ci s'objectivent par une qualité microbiologique de l'eau admise comme conforme à l'entrée du bâtiment [18].

Près de trois mois après l'ouverture, de nouveaux prélèvements au niveau des unités sont effectués, le 7 mars 2011. Ces prélèvements montrent de mauvais résultats avec de très nombreux points non conformes (27 points sur 34 testés, incluant une flore revivifiable à 22 °C importante, et parfois la présence de *Pseudomonas aeruginosa*), et appuient l'existence d'un dysfonctionnement dans le protocole de maintenance et d'entretien. Ces mauvais résultats ont permis d'effectuer des rappels sur la nécessité

de la mise en place des purges quotidiennes des lavabos et pluriquotidiennes des unités, de renforcer la motivation et l'information sur les mesures correctives mises en place auprès des personnels, et surtout d'élaborer un protocole clair et accompagné d'une feuille de traçabilité pour chaque unité permettant à chaque opérateur d'avoir un autocontrôle des mesures à prendre. Après la mise en place de ces mesures, de nouveaux prélèvements seront effectués pour suivre et contrôler le risque de contamination. Il a été décidé de procéder à des prélèvements réguliers sur l'ensemble des unités du pôle sélectionnés aléatoirement, l'objectif étant d'avoir prélevé l'ensemble des fauteuils dans l'année.

Le protocole établi

Unit Adec®

1- Purge du robinet de box: chaque matin, laisser couler l'eau chaude pendant 2 minutes, puis l'eau froide pendant 2 minutes.

1b- Réserve d'eau: chaque matin, remplir le flacon réserve d'eau indépendant après un nettoyage quotidien au laveur-désinfecteur (A0 = 600), au robinet d'eau avec filtre. Y ajouter une pastille d'ADec-ICX® pour 700 ml d'eau.

2- Désinfection des aspirations: chaque matin, chaque soir et entre deux patients, ouvrir les aspirations pour permettre le passage du désinfectant (OROTOL®), et brancher les aspirations sur les embouts du bouchon jaune, l'aspiration du liquide désinfectant est automatique.

3- Purge des seringues air/eau: chaque matin, chaque soir et entre deux patients, purge du côté aspiration pendant 30 secondes, durant le temps de rinçage des aspirations; du côté unit pendant 30 secondes.

Purge des instruments: chaque matin, chaque soir et entre deux patients, rassembler les fouets des instruments à angle droit dans la main gauche, appuyer sur le bouton PUSH de la main droite.

4- Lavage/désinfection des embouts d'aspiration: chaque soir, démontage et désinfection de l'embout de l'aspire-salive, passage au laveur-désinfecteur, programme basse température (55 °C) afin de ne pas altérer les pièces; démontage et désinfection de l'embout de l'aspiration chirurgicale, sans démonter le raccord qui fait le contact, ni la tige métallique qui permet de maintenir le diamètre, passage au laveur-désinfecteur, programme basse température (55 °C).

5a- Nettoyage du filtre de l'aspiration: chaque soir, dévisser le bouchon, sortir le filtre, pré-désinfecter et nettoyer.

Figure 1 – Protocole établi pour l'unit Adec® en images.



5b- Nettoyage du support du filtre de l'aspiration: chaque soir, démonter le support du filtre, pré-désinfecter et nettoyer.

6- Nettoyage et désinfection de l'unit: chaque matin, chaque soir et entre deux patients, traitement des surfaces du haut vers le bas sans oublier les dessous d'accoudoir et de siège,

application du désinfectant mousse sur un papier d'essuyage et répartition de la mousse sur la surface à traiter pendant 15 minutes, laisser sécher.

7- Chaque soir, placer les pédales de chaque côté du socle du fauteuil pour permettre le bionettoyage du sol.

1- Composants actifs :

Percarbonate de sodium	6,96 %
n-Alkyl (60 % C14, 30 % C16, 5 % C12, 5 % C18) dimethyl benzyl ammonium chloride	0,85 %
n-Alkyl (68 % C12, 32 % C14) dimethyl ethylbenzyl ammonium chloride	0,85 %
Nitrate d'argent	0,14 %

Unit ADEC® (Figures 1 et 2)

1- Purge du robinet de box : chaque matin, laisser couler l'eau chaude pendant 2 minutes, puis l'eau froide pendant 2 minutes.

Unit PLANMECA® (Figures 2 et 3)

1- Purge du robinet de box : chaque matin, laisser couler l'eau chaude pendant 2 minutes, puis l'eau froide pendant 2 minutes.

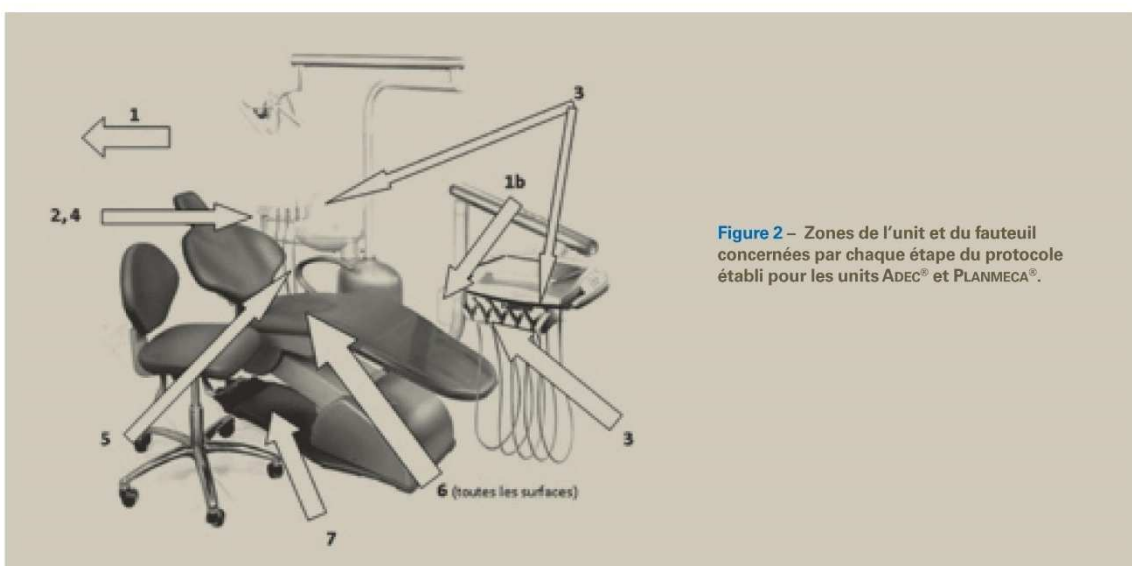


Figure 2 – Zones de l'unit et du fauteuil concernées par chaque étape du protocole établi pour les units ADEC® et PLANMECA®.

Le protocole établi

Unit PLANMECA®

1- Purge du robinet de box : chaque matin, laisser couler l'eau chaude pendant 2 minutes, puis l'eau froide pendant 2 minutes.

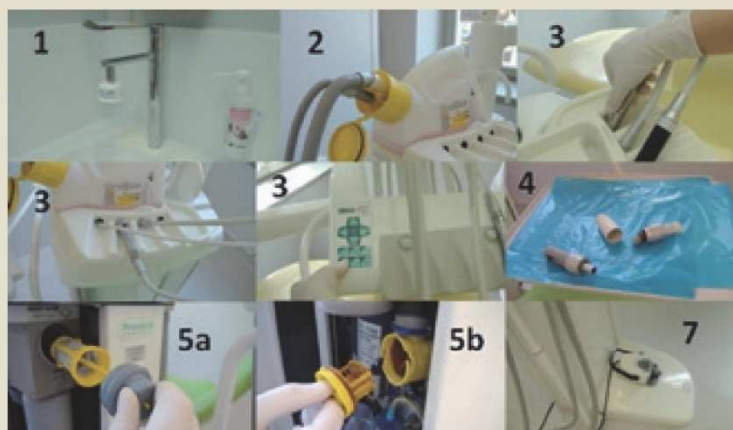
2 et 3- Désinfection des aspirations et des instruments : chaque matin, chaque soir et entre deux patients, installer le support de l'OROcup sur le crachoir, placer l'OROcup dans la loge du support, insérer les aspirations sur le pot de rinçage OROcup contenant le désinfectant (OROTOL®), et insérer les instruments dans les loges du support ; appuyer sur la touche Spray jusqu'au deuxième bip long.

4- Désinfection des embouts d'aspiration : chaque soir, démontage des aspirations et passage au laveur-désinfecteur programme basse température (55 °C)

5a- Nettoyage des filtres de l'aspiration : chaque soir, démonter le filtre primaire, sortir le filtre primaire, le désinfecter. Le changer chaque semaine.

5b- Nettoyage des filtres de l'aspiration :

Figure 1 – Protocole établi pour l'unit PLANMECA® en images.



chaque semaine, démonter le filtre « fines particules » situé au-dessous, le vider, le pré-désinfecter, le rincer.

6- Nettoyage et désinfection de l'unit : chaque matin, chaque soir et entre deux patients, traitement des surfaces du haut vers le bas sans oublier les dessous d'accouder et de siège,

application du désinfectant mousse sur un papier d'essuyage et répartition de la mousse sur la surface à traiter pendant 15 minutes, laisser sécher.

7- Chaque soir, placer la pédale sur le socle du fauteuil pour permettre le bionettoyage du sol. Ne jamais poser la pédale sur le crachoir.

Résultats

Un mois après les derniers prélèvements qui déclenchèrent le renforcement du protocole d'entretien des units, son application rigoureuse et une discussion avec les personnels en charge de cet entretien, soit fin mars et début avril 2011, de nouveaux prélèvements sont effectués, dont les résultats apparaissent tous conformes. Un suivi est alors mis en place par des prélèvements réguliers, dont certains résultats sont exposés sur la **figure 4** (unit PLANMECA® avec prélèvements effectués au niveau du crachoir et du fouet), et sur les **figures 5 et 6** (units ADEC® avec prélèvements effectués au niveau de la bouteille d'eau – réservoir indépendant et du fouet).

- Le 1^{er} septembre 2011, les prélèvements montrent à nouveau quatre fauteuils pour lesquels les résultats sont non conformes. Un renforcement de l'application rigoureuse du protocole d'entretien est préconisé.
- Fin septembre 2011, les résultats des prélèvements sont à nouveau conformes.
- Les mois suivants, les prélèvements réguliers montrent des résultats conformes avec de très rares incidents ponctuels (flore aérobie revivifiable à 37 °C > 200 UFC/ml au niveau des fouets), c'est-à-dire moins de un prélèvement par mois qui apparaît non conforme, et ce jusqu'à fin janvier 2012, incidents qui sont résolus par un respect rigoureux du protocole d'entretien des units (**Figure 7**).

Discussion

La gestion du risque correspond à la connaissance et à l'identification des risques. Malheureusement, la connaissance des risques est encore assez pauvre et contro-

Figure 4 – Suivi des prélèvements de l'eau de l'unit 8607 – box2 (en UFC/ml).

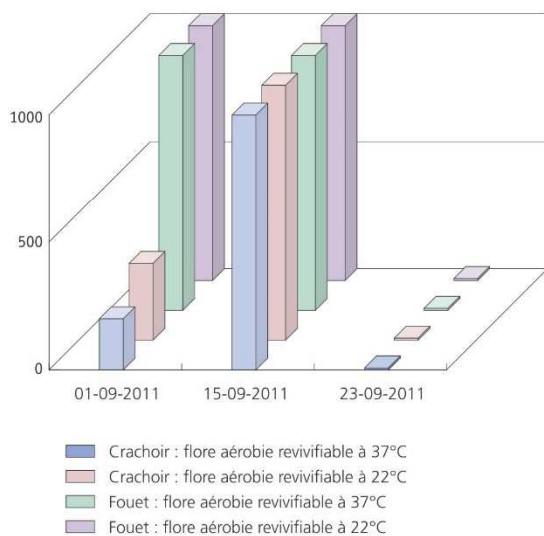


Figure 5 – Suivi des prélèvements de l'eau de l'unit 8601 – box1 (en UFC/ml).

Figure 6 – Suivi des prélèvements de l'eau de l'unit 8604 – box14 (en UFC/ml).

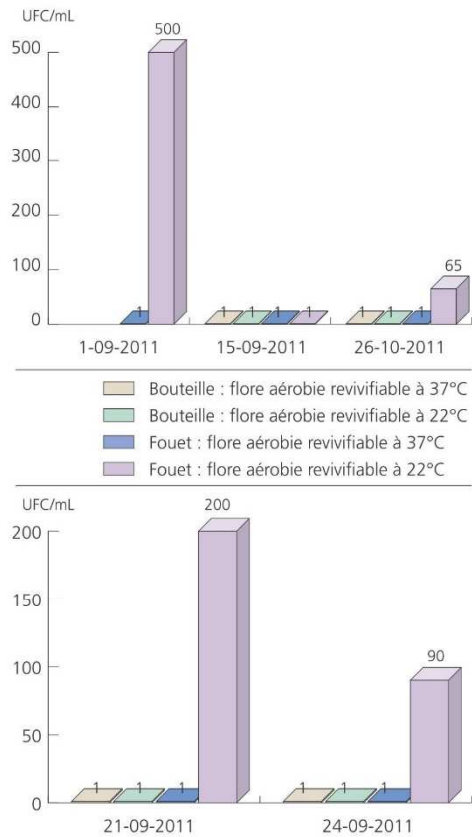


Figure 7 – Evolution des résultats des prélèvements dans le temps, relative au nombre total de prélèvements.

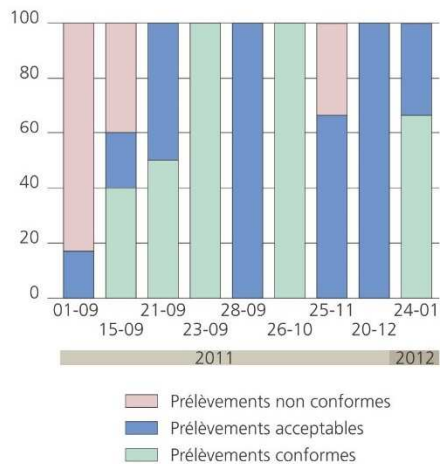


Figure 8 – Feuille de traçabilité de l'entretien de l'unit dentaire pour la journée du lundi, pouvant être étendue aux autres jours de la semaine.

Fiche de suivi de l'entretien de l'unit dentaire			Lundi		Mardi		Mercredi		Jeudi		Vendredi		CASU	
H.U.S.	N° inventaire:		matin	x soir	matin	x soir	matin	x soir	matin	x soir	matin	x soir	samedi	
PLANMECA	QUAND	COMMENT												
DU (ADEC)	matin et fin de vac.	1.purge eau ch 2', froid 2', box de soins												
		2.préparer 2 litres d'eau dans Oro Cup												
		3.installer aspi/bouchon jaune Oro Cup												
		4.aspirer les 2 litres d'eau pour rinçage												
		5.puis le désinfectant OROTOL/Oro Cup												
	matin, entre deux patients et soir	6.bouteille pastille ICX, eau filtrée (ADEC)												
		7.Oro Cup /support crachoir (guéridon pr ADEC)												
		8.cordons instrum.tirer à 90°/haricot (ADEC)												
		9.appui sur clé 6 pans, 30 sec (ADEC)												
		10.purge seringue air/eau 30 sec												
		11.Démonter/désinfecter aspi.chir. (ADEC)												
		12.désinfection du scalytique (1 lingette/unit)												
		13.désinfection du fauteuil												
		14.désinfection du siège opérateur												
		15.enlever la bouteille, purger seringue air/eau												
	soir	16.démonter/désinfecter aspi.saliv.(ADEC)												
		17.démonter/désinfecter filtre primaire												
		18.arrêt de l'unit												
		19.pédale sur socle (de chaque côté pr ADEC)												
		20.laveur 55°- filtres, embouts, bouteille (ADEC)												
habibomazine	21. Désinfection au MD 555													
QUI	Assistante dentaire : matin/soir	matin	x soir	matin	x soir	matin	x soir	matin	x soir	matin	x soir	matin		
QUI	Etudiant : matin/soir	matin	x soir	matin	x soir	matin	x soir	matin	x soir	matin	x soir	matin		
version 2012	x : fin de vacation du matin													

versée pour ce qui est de l'eau des units dentaires, dispositif médical très particulier et complexe. La gestion du risque implique la tentative d'élimination des risques, point délicat à aborder, car il faut pouvoir trouver l'origine du problème, souvent multifactorielle, et appliquer des procédures efficaces pour y remédier. Les résultats qui apparaissent suite à l'application du protocole présenté dans cet article sont très encourageants. En effet, maintenir un niveau de conformité des prélèvements presque maximal sur plusieurs mois prouve que le protocole a nettement montré son efficacité, et ce, à moindre coût. Ces pratiques ont été revues, améliorées et mises en place au courant de l'année 2011 suite aux prélèvements présentés qui, en plus d'étayer le protocole en amont, permettent en aval un contrôle de celui-ci en feedback. Les récurrences des contaminations visibles sur les résultats des prélèvements s'expliquent par le mode de réalisation de ceux-ci: en effet, ils ont lieu aléatoirement sur l'ensemble du parc des fauteuils et units du pôle. Aussi, on arrivera progressivement à contrôler – et à corriger le cas échéant – tous les fauteuils, et à asseoir une maintenance efficace. Les efforts sont toutefois à poursuivre, car si l'application de ce protocole simple mais rigoureux suffit amplement à obtenir des résultats conformes, le moindre relâchement peut entraîner le retour des pro-

blèmes. Aussi, il faut veiller à une bonne motivation à son application, car la lourdeur des mesures quotidiennes implique la nécessité d'une motivation importante des opérateurs, qui peut être maintenue par l'autocontrôle que permet la feuille de traçabilité (Figure 8). Celle-ci est remplie et signée par l'agent et l'opérateur utilisateur du fauteuil, puis vérifiée par le cadre d'hygiène. Ceci permet en outre de l'autocontrôle un double contrôle de l'observance du protocole. Cette même feuille permettra de compléter un carnet de vie pour chaque unit, gage d'une bonne traçabilité de l'exécution rigoureuse du protocole par le personnel en charge, ainsi que des pannes et réparations pouvant éventuellement survenir sur les units et/ou fauteuils.

Conclusion

L'utilisation de l'eau dans l'activité médico-chirurgicale bucco-dentaire présente bon nombre d'avantages, mais s'accompagne aussi de risques, notamment infectieux. Des mesures ont été mises en place pour limiter ce risque, mais souvent incomplètes ou floues. Le protocole d'entretien des units et des fauteuils dentaires élaboré et présenté a l'avantage de s'accompagner d'une feuille de traçabilité permettant un autocontrôle de l'opérateur, d'être détaillé et rigoureux, d'être applicable à moindre

coût, et surtout d'avoir montré son efficacité dans la lutte contre le risque infectieux sur plusieurs mois, comme les résultats des prélèvements l'ont montré. Pour toutes ces raisons, il est éminemment applicable. La seule contrainte qui se pose encore est l'accompagnement de son application rigoureuse et régulière, dans un souci constant de prise de conscience des enjeux sanitaires et de motivation.

RÉFÉRENCES

- 1- COLEMAN DC, O'DONNELL MJ, SHORE AC, RUSSELL RJ. Biofilm problems in dental unit water systems and its practical control. *J Appl Microbiol* 2008, 5: 1424-1437.
- 2- RICCI ML, FONTANA S, PINCI F, FIUMANA E, *et al.* Pneumonia associated with a dental unit waterline. *Lancet* 2012; 379: 684.
- 3- COLEMAN DC, O'DONNELL MJ, SHORE AC, SWAN J, RUSSELL RJ. The role of manufacturers in reducing biofilms in dental chair waterlines. *J Dent* 2007; 9: 701-711.
- 4- BERLUTTI F, TESTARELLI L, VAIA F, DE LUCA M, DOLCI G. Efficacy of anti-retraction devices in preventing bacterial contamination of dental unit water lines. *J Dent* 2003; 2: 105-110.
- 5- PETTI S, TARSITANI G. Detection and quantification of dental unit water line contamination by oral streptococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 5: 504-509.
- 6- CCLIN SUD-OUEST. Recommandations pour la prévention du risque infectieux au niveau des cabinets dentaires en milieu hospitalier. 1996. Accessible sur : http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/cclin/cclinSudOuest/1996_odontologie_CCLIN.pdf (Consulté le 23-02-2013.)
- 7- SHEARER BG. Biofilm and the dental office. *J Am Dent Assoc* 1996; 2: 18-19.
- 8- WIRTHLIN MR, MARSHALL GW JR, ROWLAND RW. Formation and decontamination of biofilms in dental unit waterlines. *J Periodontol* 2003; 11: 1595-1609.
- 9- MILLS SE. The dental unit waterline controversy: defusing the myths, defining the solutions. *J Am Dent Assoc* 2000; 10: 1427-1441.
- 10- BARBEAU J, GAUTHIER C, PAYMENT P. Biofilms, infectious agents, and dental unit waterline : a review. *Can J Microbiol* 1998; 44: 1019-1028.
- 11- DGS. Guide de prévention des infections liées aux soins en chirurgie dentaire et en stomatologie. Accessible sur : http://www.fsd.fr/docs/guide_prevention_infection.pdf 2006. Vol. Deuxième édition (Consulté le 10-12-12).
- 12- STATEMENT ON DENTAL UNIT WATERLINES. American Dental Association. 2004. [Citation : 09 07 2011.] Accessible sur : <http://www.ada.org/1856.aspx> (Consulté le 10-12-12).
- 13- SANTIAGO JI, HUNTINGTON MK, JOHNSTON MA. Microbial contamination of dental unit water lines: short and long-term effects of flushing. *Gen Dent* 1994; 45: 528-535.
- 14- WALKER JT, BRADSHAW DJ, FULFORD MR, MARSH PD. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl Environ Microbiol* 2003; 6: 3327-3332.
- 15- MURDOCH-KINCH CA, ANDREWS NL, ATWAN S, JUDE R, GLEASON MJ, MOLINARI JA. Comparison of dental water quality management procedures. *J Am Dent Assoc* 1997; 9: 1235-1243.
- 16- Directive n° 98/83/CE du 03/11/98 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.
- 17- Décret n° 2001-1220 du 20/12/01 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles.
- 18- JOURNÉE RÉGIONALES D'HYGIÈNE HOSPITALIÈRE DE STRASBOURG 2011, session 3. Risque infectieux lié à l'eau des unités dentaires : Expérience des hôpitaux universitaires de Strasbourg, Dr S. Deboscker, EOH, HUS Communication orale. Accessible sur : www.jrhh.org (Consulté le 10-12-12).

Conflit potentiel d'intérêts : aucun

IV. Contamination de l'eau des unités dentaires et systèmes de désinfection en continu

Objectifs : Evaluer l'efficacité de trois systèmes de désinfection en continu de l'eau des unités dentaires, en conditions réelles de soins.

Conception de l'étude : Etude prospective menée de 45 jours à 20 mois sur la qualité microbiologique de l'eau des unités dentaires ayant bénéficié de trois systèmes de traitement de l'eau différents : 2 systèmes de traitement chimique (IGN EVO / Calbenium / IGN® Cartridge, et Sterispray®), et un système de traitement physique (BacTerminator®).

Items étudiés : 6 unités dentaires du Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), France.

Résultats : Les systèmes IGN EVO / Calbenium / IGN® Cartridge et Sterispray® ont montré une efficacité immédiate et à long terme sur l'eau d'unités dentaires contaminées. Toutefois, le premier système offre des avantages ergonomiques (système automatique, action sur l'eau du réseau). Le système BacTerminator® a mis plus longtemps à exprimer son efficacité et a été moins efficace que les deux autres systèmes.

Ce travail a donné lieu à un article accepté pour publication dans le British Dental Journal Open (**article 7**).

Contamination of dental unit waterlines: assessment of three continuous water disinfection systems

(article 7, accepté pour publication dans le British Dental Journal Open)

D. Offner^{1,2,3}, F. Fioretti^{1,2,3}, A.-M. Musset^{2,3}

1 – French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), Osteoarticular and Dental, Regenerative Nanomedicine, UMR 1109, 11 Rue Humann 67000 Strasbourg, France

2 – University Hospital of Strasbourg (HUS), 1 place de l'Hôpital 67000 Strasbourg, France

3 – Faculty of Dental Surgery – University of Strasbourg (UDS), 8 rue Ste Elisabeth 67000 Strasbourg, France

Corresponding author :

Dr Damien OFFNER
Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
1 place de l'Hôpital
67000 Strasbourg – France
doffner@unistra.fr
+0033 (0) 6 73 60 57 13

Word count: 2841

Key words: infection control ; dental unit waterlines ; water disinfection ; continuous disinfection

Abstract:

Objective: To assess the efficacy of three continuous water disinfection systems for dental units under real conditions of dental care. **Study design:** A prospective study carried out from 45 days to 20 months on the water quality of the dental units which benefited from three different systems: two chemical treatment systems (IGN EVO / Calbenium / IGN® Cartridge, and Sterispray®), and one physical treatment system (BacTerminator®). **Studied items:** Six dental units of the Dental Medicine and Oral Surgery Center within the University Hospital of Strasbourg (HUS), France. **Results:** The IGN EVO / Calbenium / IGN® Cartridge and Sterispray® systems showed an immediate and long-term efficacy on contaminated dental unit waterlines. However, the first system offers ergonomic advantages (automatic system, action on the water from the water supply network). The BacTerminator® system took longer to be effective and was less effective than the other two.

Key words: infection control ; dental unit waterlines ; water disinfection ; continuous disinfection

Introduction:

Dental medicine and oral surgery, as many medico-surgical practices, must be associated with a good infectious risk management, allowing one to control sources and vectors of cross-contamination, including water contamination [1, 2]. As water is used to cool down rotary instruments and clean the surgical site, monitoring its microbiological quality can be done using samples collected from the unit water system. These samples can reveal the presence of a planktonic or sessile bacterial flora, either in the water supply network [2], or as the result of a back-contamination of dental unit waterlines caused by a backflow of oral fluids when rotary instruments stop [3, 4, 5]. A level of contamination up to 10^5 CFU/mL has already been reported in literature [6]. The elevated surface-to-volume ratio of dental unit waterlines (which are long thin pipes), as well as the presence of laminar water flow, can promote biofilm formation [7, 8, 9]. Consequently, there is a distinct risk for the patient and the dental team, who are in direct contact with contaminated water. In Italy, the death of an 81-year-old female patient has been reported after she contracted Legionnaire's disease due to contaminated water in the internal dental unit waterlines [2].

In France, the microbiological quality of the output water from dental unit waterlines is not regulated. However, at the University Hospital of Strasbourg (HUS), quality standards have been set. The output water must at least meet the input water quality standards, which corresponds to the American Dental Association (ADA) requirements of 1995 (maximum heterotrophic plate count (HPC) at 22°C of 200 UFC/mL) [10], although the ADA followed the United States' Center for Disease Control and Prevention (CDC) in 2004, recommending a maximum HPC of 500 CFU/mL. Furthermore, the target value of the microbiological quality of the dental units water set at the HUS meets the European Union's standard for potable water with an HPC of less than 100 UFC/mL [11].

If these criteria are not respected, the use of the dental chair will be suspended and remedial actions will be undertaken along with the strengthening of the maintenance protocol implementation and the use of a sheet of traceability. In some cases, remedial maintenance such as the disinfection of the internal dental unit waterlines will be undertaken as well [12].

In 2013, 28% out of the samples collected at the Dental Medicine and Oral Surgery Center of the HUS were non-compliant. Remedial actions undertaken for these units consisted in the treatment of the internal dental unit waterlines using Dialox® (a disinfectant made from peracetic acid, hydrogen peroxide and acetic acid). The efficiency level of this treatment was of 75%, which was considered as insufficient. Consequently, the Dental Medicine and Oral

Surgery Center decided to carry out actions in order to increase this efficiency level. As a result, continuous water treatment systems (IGN EVO / Calbenium / IGN® Cartridge, Sterispray®, and BacTerminator®) were set on the contaminated units resisting the Dialox® disinfection treatment, along with a regular inspection of sampling results.

Materials and Methods:

- Scope of the continuous water treatment systems tested

The continuous water treatment systems tested were the following: IGN EVO / Calbenium / IGN® Cartridge, Sterispray®, and BacTerminator®. They have been attached upstream from the dental unit waterline. The first two systems are both chemical treatment systems, that is to say that a disinfectant is injected from an independent reservoir into the dental unit waterline. The third system is a physical treatment system, which means that the input water goes through several treatment phases, such as filtration and ionization. The water used within the dental care center is of potable quality regarding the European Union's standard [11], which means that it is under microbiological monitoring to present an heterotrophic plate count (HPC) at 22 °C below 100 CFU/mL, an heterotrophic plate count (HPC) at 37 °C below 10 CFU/mL, and coliform bacteria as well as *Pseudomonas aeruginosa* below 1 CFU/mL.

- **IGN EVO / Calbenium / IGN® Cartridge** (referred as IGN EVO Calbenium® later in the text): This system, used in accordance with the manufacturer's recommendations, includes an *IGN device*, which is an automatic dilution system diluting a liquid disinfectant concentrate called *CALBENIUM* in the water supply network. The IGN is attached to the water supply network going under the unit, in compliance with the manufacturer's recommendations. A cartridge of IGN ensures the decrease of diatoms loads in water. The appropriate dose of Calbenium is automatically injected in the water flow going onto the unit shelf. The level of Calbenium is constantly monitored with an audio-visual detection system. The Calbenium solution is composed of EDTA, *benzalkonium chloride*, sodium tosylchloramide, allantoin, aspartame, sorbitol and spearmint flavor. Proportions of products are not disclosed by the manufacturer.
- **Sterispray®** has been used in accordance with the manufacturer's recommendations and attached to the units. The system is designed as an independent water reservoir which works with compressed air and delivers water into the sprays. This is a manual

filling system which must contain only either distilled or demineralized water to dilute the disinfectant product Sterispray®. This product is manually added each time the system is filled. It may be necessary to fill it several times on a daily basis. The solution is composed of EDTA, *benzalkonium chloride*, chloramine-T, glycerin, aspartame, sorbitol, flavors and thyme essential oil. Proportions of these products are not disclosed by the manufacturer.

- **BacTerminator®** has been used in accordance with the manufacturer’s recommendations and attached to the dental units waterlines supplied with water of hospital quality. In addition to various filtration levels and ion-exchange processes, which allow, according to the manufacturer, to “remove calcium from water”, an electrochemical process produces hypochlorous acid and hypochlorite. These two biocidal compounds should affect the bacteria of the input water within BacTerminator®. According to the BacTerminator®’s manufacturer, the output water is “free from micro-organisms and loaded with free residual chlorine (0.5 to 1ppm) that ensures biocidal action”.

▪ Units covered in this study

This study focused on contaminated dental units which were resistant to the internal treatment using Dialox®. Consequently, samples revealing the contamination of the dental unit waterlines stand for reference samples.

Three groups of two units respectively were formed. Each group was equipped with one of the three systems studied (table 1): the IGN EVO Calbenium® system for units 1 and 2, the Sterispray® system for units 3 and 4 and the BacTerminator® system for units 5 and 6.

Table 1: Water treatment systems assigned to the units groups

units	1 and 2	3 and 4	5 and 6
system	IGN EVO Calbenium®	Sterispray®	BacTerminator®
type of water	water of hospital quality	distilled water	water of hospital quality
dosing system	automatic	manual	no dosage

All of these dental units underwent the same daily maintenance, matching the professional guidelines [13, 14] and formalized in a specific sheet of traceability. Part of the maintenance protocol relevant to the disinfection management of the dental unit water lines is described below:

- **Every morning:**
 - Installation of the independent water reservoir, if required
 - Purge of the handpiece hoses for five minutes (water sampling site)
 - **Between each patient:**
 - Purge of the handpiece hoses for 20 s to 30 s before unplugging and treating the handpieces
 - **Every evening:**
 - Purge of the handpiece hoses once the last patient has been taken care of, for 20 s to 30 s, before unplugging and treating the handpieces
 - Rinse of the independent water reservoir with tap water, cleaning and disinfection using a washer-disinfector at 55°C
-
- Study protocol
 - Initial samples collection of the output water from the selected units which were resistant to the Dialox® treatment.
 - Installation of the continuous water treatment system on these units.
 - Sampling the day after system installation (D+1)
 - Sampling 15 days after system installation (D+15)
 - Sampling during a period of time ranging from 40 days to 20 months after system installation.

All the samples were collected of the output water in the morning, after the purge and before the first patient. Water samples culture conditions as well as the standards used are described in table 2.

Table 2: Culture conditions of the output water samples collected from the unit and standards used [11]

Microorganisms sought	Volume analyzed	Maximum storage duration before analysis (hours)	Storage temperature (°C) before analysis	Samples seeding conditions	Standards
HPC¹ at 22 °C	1 mL	12	5 ± 3	72 h at 22 °C on agar PCA ² by inclusion or filtration	ISO 6222 [15]
HPC¹ at 36 °C	1 mL	12	5 ± 3	48 h at 36°C on agar PCA by inclusion or filtration	ISO 6222 [15]
Coliform bacteria and <i>E. coli</i>	100 mL	6	Ambient (≤ 25°C)	24 h at 36 °C on agar TTC ³ by membrane filtration	ISO 9308-1 [16]
	100 mL	24	5 ± 3	2 nd inspection after 48 h	
Enterococci	100 mL	6	Ambient (≤ 25°C)	48 h at 36 °C on Slanetz agar by membrane filtration	ISO 7899-2 [17]
	100 mL	24	5 ± 3		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 mL	Undisclosed	Undisclosed	48 h at 36 °C on cetrimide agar by membrane filtration	ISO 16266 [18]

¹ HPC : Heterotrophic Plate Count

² PCA : Plate Count Agar = agar used to count revivifiable aerobic microorganisms

³ TTC : Tergitol = medium used for the search and count of coliform bacteria

In reference to national technical guidelines, microbiological water quality levels and interpretation thresholds of sampling results are defined [19] and outlined in table 3. The aim was to obtain the same water quality both for the output and input water. In this case, the sample would be considered as compliant with the requirements.

Table 3 : Levels of microbiological water quality and interpretation of the output water sampling results from the unit [11]

RESULTS	INTERPRETATION
<ul style="list-style-type: none"> • HPC at 22 °C ≤ 100 CFU/mL • HPC at 37 °C ≤ 10 CFU/mL • Absence of pathogenic germs 	<ul style="list-style-type: none"> • Results COMPLIANT with the expected values
<ul style="list-style-type: none"> • HPC at 22 °C > 100 UFC/mL and < 200 UFC/mL • HPC at 27 °C > 10 UFC/mL and < 30 UFC/mL • Absence of pathogenic germs 	<ul style="list-style-type: none"> • ACCEPTABLE results <p>The unit can be used. A new sampling procedure is scheduled at D+3</p>
<ul style="list-style-type: none"> • HPC at 22 °C ≥ 200 UFC/mL • HPC at 37 °C ≥ 30 UFC/mL <p>or</p> <ul style="list-style-type: none"> • Presence of pathogenic germs: ✓ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ✓ Enterococci ✓ <i>Escherichia coli</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • NON COMPLIANT results <p>SUSPEND THE USE of the unit and initiate Dialox® treatment. A new sampling is scheduled at D+15 after Dialox® treatment, until results are compliant</p>

The methods used in this study did not follow those described in the EN ISO 16954 standard regarding test methods used for biofilm treatment in dental unit waterlines [20, 21], as these methods are only applied under laboratory conditions. Yet, the aim of this study was to assess the results of the water treatment systems obtained in the actual clinical context. However, the methods used in this study met standards on several aspects:

- A control group was not required, as samples collected before systems installation showed contamination of the waterlines.
- Two units at least were included in each test group (table 1).
- Tests were carried out over more than 4 weeks.
- Count of colonies on the culture medium was performed in compliance with the standards referenced in table 2.

Results:

Concerning the units equipped with the IGN EVO Calbenium® and Sterispray® systems (fig. 1 and 2), primary samples collected prior to the Dialox® treatment revealed levels of contamination of the output water up to 360 CFU/mL for the heterotrophic plate count (HPC) at 37 °C.

Samples collected 15 days after the Dialox ® treatment on each unit showed persistent water contamination with levels up to 500 CFU/mL for HPC at 37 °C and at 22 °C.

The very next day after installation of the IGN EVO Calbenium® and Sterispray® systems, at D+1, samples revealed compliant results, with levels below 1 CFU/mL for the HPC at 37 °C and 22 °C. Inspection done at D+15 and D+12 months or D+20 months showed that there was no more HPC in samples, and that this compliant result was lasting (fig. 1 and 2).

As for units 5 and 6 equipped with the BacTerminator® system (fig 3 and 4), primary samples collected before the Dialox® treatment, and control samples collected 15 days after the treatment showed levels of contamination of the output water up to 200 CFU/mL for the HPC at 37 °C.

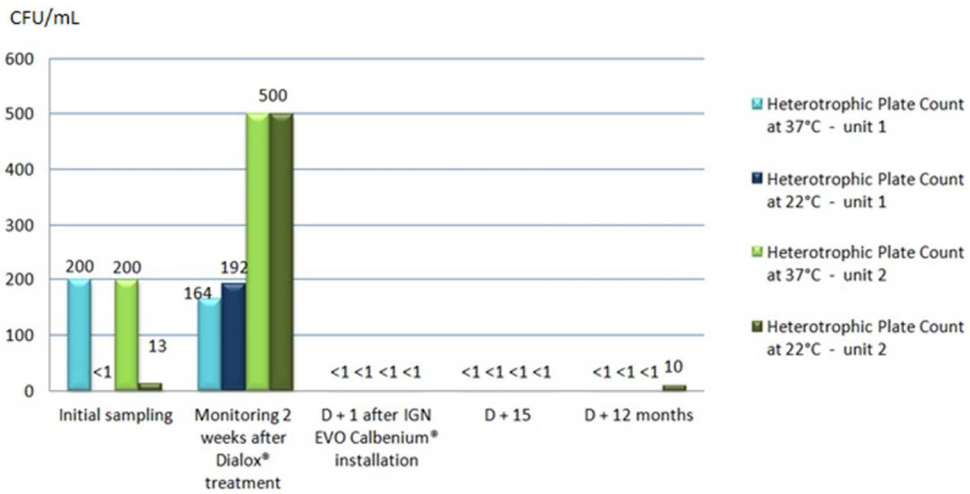


Fig.1: Microbiological monitoring of the output water from units 1 and 2 equipped with the IGN EVO Calbenium® system

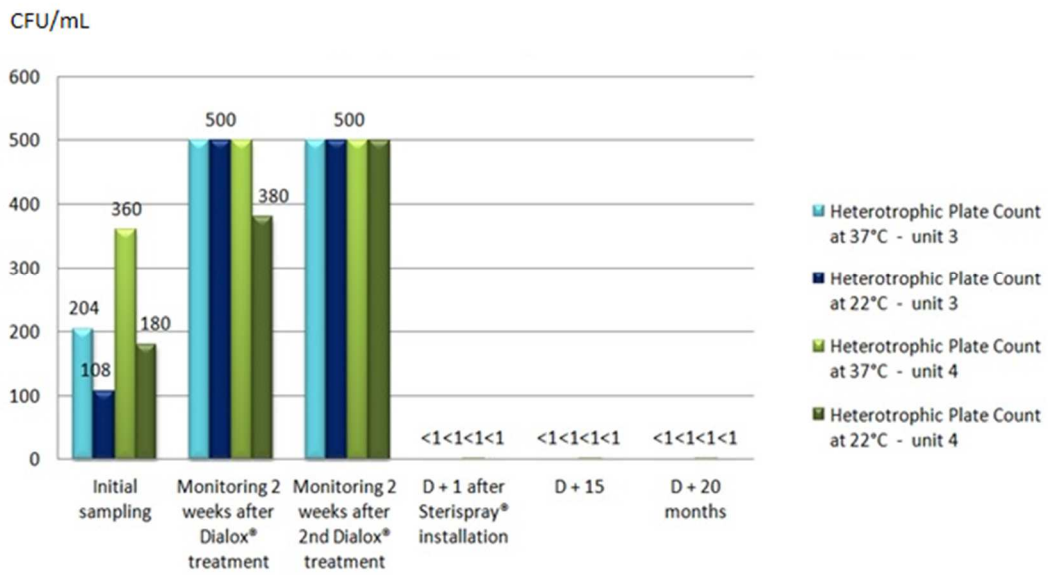


Fig.2: Microbiological monitoring of the output water from units 3 and 4 equipped with the Sterispray®

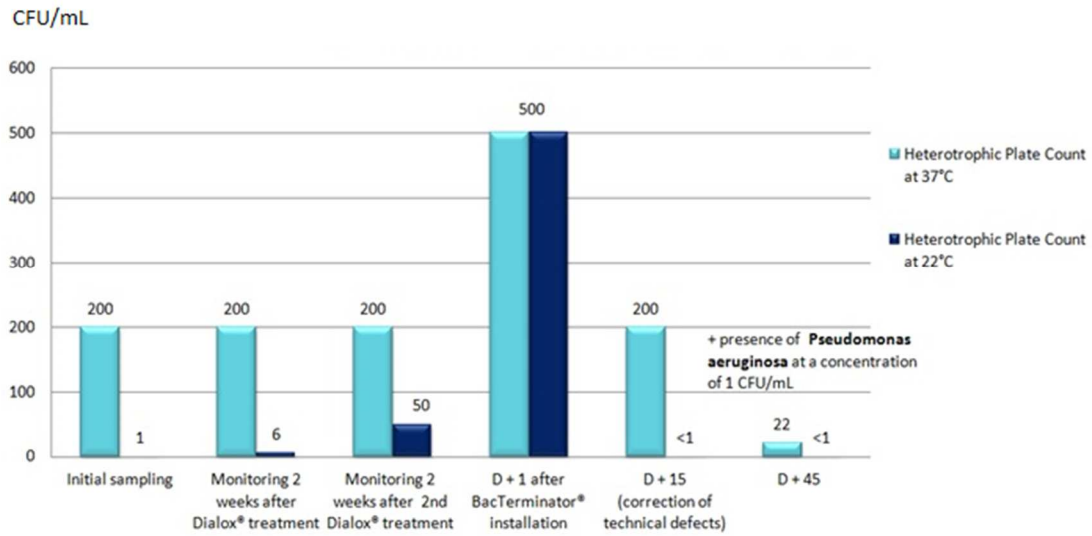


Fig.3: Microbiological monitoring of the output water from unit 5 equipped with the BacTerminator® system, showing the correction of technical defects after samples collection at D+ 15

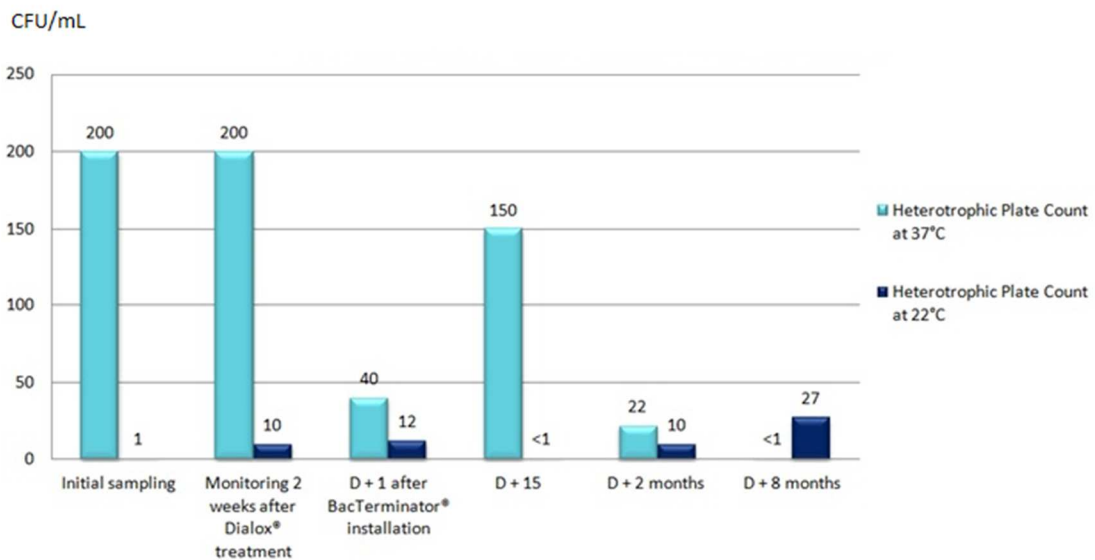


Fig.4: Microbiological monitoring of the output water from unit 6 equipped with the BacTerminator® system

Concerning unit 5, samples collected the day after BacTerminator® installation showed a non-compliant result, with a concentration of 500 CFU/mL of HPC at 37 °C and 22 °C. An inspection of the system revealed that it was technically malfunctioning, which consequently increased water contamination. After correction of these defects, samples collected at D+15 showed improvements, but still non-compliant results, with levels up to 200 CFU/mL for a HPC at 37 °C. At last, samples collected at D+45 still showed non-compliant results, as it revealed a concentration of 1 CFU/100mL of *Pseudomonas aeruginosa*.

As for unit 6, the contamination level decreased at D+1 and went from 200 to 40 CFU/mL of HPC at 37 °C after BacTerminator® installation. However, the system had no impact on the HPC at 22 °C (from 10 to 12 CFU/mL). At D+15, the level increased up to 150 CFU/mL for the HPC at 37 °C, but not for the HPC at 22 °C. It was only at D+2 months that the HPC at 37 °C decreased and went down to 22 CFU/mL, which, in comparison with the samples collected at D+1, represents a decrease but still is not a compliant result. Finally, at D+8 months, the sampling inspection revealed that the level of the HPC at 22 °C increased up to 27 CFU/mL, which remains an acceptable result, but not a compliant result.

Discussion:

The continuous water treatment systems tested in this study were installed on units from which the output water samples collected showed high contamination levels. Bacteria were resistant to routine treatments done at the Dental Medicine and Oral Surgery Center of Strasbourg [12]. Consequently, these poor conditions constituted a suitable environment to assess the efficacy of the systems tested in this study.

Sampling results after systems installation showed the efficacy of the IGN EVO Calbenium® and Sterispray® systems on contaminated water in the units, on which they had an immediate and long-lasting impact.

Regarding the BacTerminator® system, the samples collected showed irregular results with a sudden rise of the contamination level. After 15 days, the samples were still non-compliant with the expected results. Consequently, water circulating in the waterlines still presents a potential infectious risk. A longer term study is necessary to demonstrate the possible efficacy of this system. Nevertheless, in the presence of other dental units water lines disinfection

systems in the market that are proven to be efficient, and for the safety of patients, it would not be ethical to continue using systems that are of questionable efficacy.

The differences found could be explained by the mechanisms of action of the different systems. Chemical disinfection applies for planktonic bacteria and outer layers of biofilm that the water flow may remove. However, chemical disinfection does not directly impact deep layers of biofilm. Yet, biofilm bacteria are much more resistant to disinfectants than planktonic bacteria, and the biofilm could remain as a potential reservoir for bacterial contamination within the unit pipes.

Physical action of the BacTerminator® system takes effect upstream the input water in the unit. Consequently, even if the water in the waterlines is supposed to be bacteria-free, it could detach residual biofilm fragments without having a disinfecting effect. Indeed, the concentration of residual biocide compounds (free chlorine) may be too low. This could explain the less satisfactory results obtained with this system, which has already been hypothesized in literature [22].

In order to support the results, a complete removal of the biofilm from the waterlines should be considered [23] before using continuous treatment systems. To perform this tricky operation on biofilm [24], the efficacy of biofilm removal solutions should be assessed, such as enzymatic detergents currently developed, to be used in association with disinfectants once biofilm has been deteriorated.

The results of our study show that it is possible to obtain a microbiological quality of the output water which is compliant with the target levels recommended, by using a water treatment system connected to the water supply network. This is the reason why we chose, at the Dental Medicine and Oral Surgery Center of Strasbourg, not to use treated water in the future (distilled, osmosis or sterile water), contrary to other health care centers [22]. Choosing not to use treated water has the following advantages: 1) no constraints regarding the storage of bottles or cans, 2) no risk linked to the manipulation of bottles or cans, and 3) besides the results showing an equal efficacy of the IGN EVO Calbenium® and Sterispray® systems, the fact that the IGN EVO Calbenium® system is more ergonomic must be underlined, as it offers an automatic dosing system and use only tap water (table 1). This system presents the

following advantages: no manipulation or dilution performed by the dental team, and the concentration of the product delivered in the waterlines remains unchanged.

When compared to other studies about the efficacy of dental units water lines disinfection systems, it appears that IGN EVO Calbenium® and Sterispray® are a part of the best systems. Indeed, a 2010 study led by RAC Chate [25] about the efficacy of Alpron® system showed compliant results (HPC <100 CFU/mL) for 80,9% of 52 dental units tested after a one-month utilization of the system. A 2002 study by AJ Smith [26] showed that compliant results (HPC <100 CFU/mL) were maintained on 6 units during 6 weeks using Alpron®, but these low microbial counts were maintained for 13 weeks in only four of the six units. Finally, a 2006 study across the European Union led by AJ Schel [24], in which a compliant result was HPC <200UFC/mL, showed various results for different disinfection systems applied during 8 weeks. Compliant results were found in 87% of 37 dental units treated with Alpron®; 74% of 26 dental units treated with BioBlue®; 91% of 11 dental units treated with Dentosept®; 91% of 15 dental units treated with Oxygenal®; 83% of 30 dental units treated with Sanosil®; 78% of 10 dental units treated with Sterilex Ultra®. The results of our study show compliant results (HPC <100 CFU/mL) for all the dental units tested for IGN EVO Calbenium® and Sterispray® systems up to 12 and 20 months.

Conclusions:

The continuous water treatment systems with chemical action displayed in this study (IGN EVO Calbenium® and Sterispray®) showed an immediate and long-term efficacy in the treatment of contaminated dental unit waterlines. This efficacy does not seem to rely on a former waterlines treatment, and as for the IGN EVO Calbenium® system, seems compatible with the use of the water from the water supply network. It therefore has organizational and financial benefits. As for the continuous water treatment system with physical action used in this study (BacTerminator®), it appeared as less effective and took longer to be effective. These differences could be explained by the presence of biofilm in the waterlines before installation of the systems. A full treatment of biofilm before systems installation should be considered, according to the mode of action of the continuous water treatment systems.

Acknowledgments: All the authors report no conflicts of interest relevant to this article, and report no financial support.

References:

1. Coleman DC, O'Donnell MJ, Shore AC, Russell RJ. Biofilm problems in dental unit water systems and its practical control. *J Appl Microbiol* 2008;106:1424-37.
2. Ricci ML, Fontana S, Pinci F, Fiumana E, Pedna MF, Farolfi P, et al. Pneumonia associated with a dental unit waterline. *Lancet* 2012;379:684
3. Smith G, Smith A. Microbial contamination of used dental handpieces. *Am J Infect Control* 2014;42:1019-21
4. Petti S, Moroni C, Messano GA, Polimeni A. Detection of oral streptococci in dental unit water lines after therapy with air turbine handpiece : biological fluid retraction more frequent than expected. *Future Microbiol* 2013;8:413-21
5. Chin JR, Miller CH, Palenik CJ. Internal contamination of air-driven low-speed handpieces and attached prophylaxis angles. *J Am Dent Assoc* 2006;137:1275-80
6. Barbeau J, Gauthier C, Payment P. Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines : a review. *Can J Microbiol* 1998;44:1019-28
7. Shearer BG. Biofilm and the dental office. *J Am Dent Assoc* 1996;127:18-9
8. Wirthlin MR, Marshall GW Jr, Rowland RW. Formation and decontamination of biofilms in dental unit waterlines. *J Periodontol* 2003 ;74:1595-609
9. Nikaeen M, Hatamzadeh M, Sabzevari Z, Zareh O. Microbial quality of water in dental unit waterlines. *J Res Med Sci* 2009;14:297-300.
10. Statement on Dental Unit Waterlines. *American Dental Association*. 2004 [On line] [Citation : 10 20 2015] <http://www.ada.org/1856.aspx>.
11. Council directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Off J Eur Commun* 1998;L330: 32-54

12. Offner D, Deboscker S, Belotti L, Brisset L, Lavigne T, Musset AM. Elaboration et évaluation d'un protocole d'entretien des unités et fauteuils dentaire (ADEC® et Planmeca®) aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. *HygieneS* 2013;21:21-28
13. Guide de prévention des infections liées aux soins en chirurgie dentaire et en stomatologie, Ministère de la Santé, DGS, 2006
14. Grille technique d'évaluation pour la prévention des infections associées aux soins. Association Dentaire Française (ADF), 2013
15. ISO 6222. Water quality — Enumeration of culturable micro-organisms — Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium. International Standard Organization; 1999.
16. ISO 9308-1. Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. International Standard Organization; 2014.
17. ISO 7899-2. Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci — Part 2: Membrane filtration method. International Standard Organization; 2000.
18. ISO 16266. Water quality — Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* — Method by membrane filtration. International Standard Organization; 2006.
19. Guide technique de l'eau dans les établissements de santé, Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005. Available from:
http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Guide_technique_de_l_eau_dans_les_etablissements_de_sante_-_edition_2005.pdf. Accessed October 21, 2015.
20. ISO 16954. Dentistry — Test methods for evaluating antibacterial biofilm treatment methods for dental unit water delivery systems. International Standard Organization; 2015.
21. Patel M, Desai J, Owen PC. The efficacy of disinfectants in the decontamination of dental unit water lines : an in vitro laboratory study. *BDJ Open* 2, Article number: 16003 (2016) doi:10.1038/bdjopen.2016.3

22. Lizon J, Florentin A, Martrette JM, et al. Microbial control of dental unit water: feedback on different disinfection methods experience. *Am J Infect Control* 2015, in press.
23. Lin SM, Svoboda KK, Giletto A, Seibert J, Puttaiah R. Effects of hydrogenperoxide on dental unit biofilms and treatment water contamination. *Eur JDent* 2011;5:47-59.
24. Schel AJ, Marsh PD, Bradshaw DJ, Finney M, Fulford MR, Frandsen E, et al. Comparison of the efficacies of disinfectants to control microbial contamination in dental unit water systems in general dental practices across the European Union. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1380-7.
25. Chate RAC. An audit improves the quality of water within the dental unit water lines of general dental practices across the East of England. *Br Dent J* 2010;209:E11
26. Smith AJ, McHugh S, Aitken I, Hood J. Evaluation of the efficacy of Alpron disinfectant for dental unit water lines. *Br Dent J* 2002;193:593-6

Les différentes voies de contamination de l'unit dentaire peuvent donc être efficacement contrôlées. Pour les cas de traitements des lésions osseuses maxillo-faciales intra-buccales, il n'est malheureusement pas possible d'en conclure pour autant qu'aucune complication infectieuse n'aura lieu, car la cavité buccale est un milieu naturellement septique. Mais la mise en œuvre de toutes ces précautions permettra de diminuer le risque infectieux, et d'identifier les complications infectieuses endogènes.

Pour terminer, une autre partie importante du respect de la qualité environnementale des interventions cliniques est consacrée à la partie éthique attenante au respect des bonnes mesures d'hygiène dans le cadre des soins. Ceci s'applique notamment à la bonne utilisation d'un laveur-désinfecteur-lubrificateur-sécheur, et au respect des mesures d'hygiène telles que la bonne réalisation du protocole d'entretien, ainsi qu'aux responsabilités légales et morales qui en découlent. Ce pan éthique s'intéresse plus particulièrement à la mise en place et à l'évaluation d'une méthode éthique de motivation des personnels à l'application des mesures d'hygiène.

En effet, si l'automate le plus efficace du monde existait, le bon traitement des dispositifs médicaux serait quand même soumis à des facteurs humains (manipulation, démarches de contrôle, application des protocoles, etc.). Ainsi, pour assurer ce traitement, la partie "humaine" est donc tout aussi importante que la partie "technique". C'est pourquoi il est important d'élaborer des méthodes de motivation qui, bien plus qu'une simple sensibilisation, mettent en jeu au travers d'une démarche éthique réfléchie des valeurs morales de responsabilité, d'intuition, de respect, et des implications psychologiques pour la bonne utilisation des dispositifs et le respect des mesures d'hygiène.

V. Motiver et remotiver l'équipe soignante d'un cabinet dentaire à l'application des mesures d'hygiène par une expérience de pensée éthique

A. Elaboration de la méthode

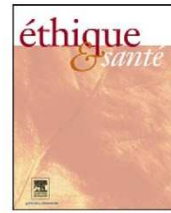
Les infections nosocomiales restent encore aujourd'hui un phénomène qu'il n'est pas rare de rencontrer. Des mesures d'hygiène efficaces ont pourtant été établies afin de les limiter, mais ce n'est pas tant dans leur efficacité qu'il faut chercher le problème, mais dans la motivation et la prise de conscience de la nécessité de leur application. On se propose dans cet article de motiver et de remotiver l'équipe soignante d'un cabinet dentaire à l'application de ces mesures par le biais d'une expérience de pensée éthique originale qui fera ressortir les intuitions morales des personnels, et, renforcées par une discussion sur la responsabilité de chacun quant aux conséquences d'une non-application des mesures d'hygiène, l'évocation de ces intuitions morales pourrait permettre une prise de conscience et une motivation majorées de la nécessité d'appliquer les mesures d'hygiène.

Ce travail a donné lieu à un article publié dans *Ethique & Santé* (**article 8**).



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



DÉMARCHES ET OUTILS : PÉDAGOGIE

Motiver et remotiver l'équipe soignante d'un cabinet dentaire à l'application des mesures d'hygiène par une expérience de pensée éthique

Motivate and re-motivate the medical team of a dentist's surgery to care of the measures of hygiene by an experiment of ethical thought

D. Offner

Laboratoire d'épidémiologie et santé publique en odontologie, CSERD, faculté de chirurgie dentaire, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France

MOTS CLÉS

Hygiène ;
Éthique ;
Motivation

Résumé Les infections nosocomiales restent encore aujourd'hui un phénomène qu'il n'est pas rare de rencontrer. Des mesures d'hygiène efficaces ont pourtant été établies afin de les limiter, mais ce n'est pas tant dans leur efficacité qu'il faut chercher le problème, mais dans la motivation et la prise de conscience de la nécessité de leur application. On se propose dans cet article de motiver et de remotiver l'équipe soignante d'un cabinet dentaire à l'application de ces mesures par le biais d'une expérience de pensée éthique originale qui fera ressortir les intuitions morales des personnels, et, renforcées par une discussion sur la responsabilité de chacun quant aux conséquences d'une non-application des mesures d'hygiène, l'évocation de ces intuitions morales pourrait permettre une prise de conscience et une motivation majorées de la nécessité d'appliquer les mesures d'hygiène.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Hygiene;
Ethics;
Motivation

Summary The hospital-borne infections remain even today a phenomenon, which it is not rare to meet. Nevertheless, effective measures of hygiene were established to limit them, but it is not really in their efficiency that we should look for the problem, but in the motivation and the awareness of the necessity of their application. In this article, we suggest to motivate and re-motivate the medical team of a dentist's surgery to care of these measures by an experiment of ethical thought which will highlight the moral intuitions of the staffs, and, strengthened by a discussion about the responsibility of each into the consequences of a non-application of the

Adresse e-mail : damien.offner@hotmail.fr

1765-4629/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.etiqe.2012.11.001>

measures of hygiene, the evocation of these moral intuitions could allow an increased awareness and motivation of the necessity of applying the measures of hygiene.
© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

De nombreuses études attestent que le taux de patients contractant une infection nosocomiale à l'hôpital reste encore aujourd'hui élevé [1,2]. Ce taux, même si aucune étude récente n'a été menée dans les cabinets de pratique dentaire libéraux ou même en milieu hospitalier pour des pathogènes autres que le VIH, VHB ou VHC [3], pourrait hypothétiquement être retrouvé aussi dans ces environnements de soin. Or, les facteurs de risque ont été analysés et reconnus, et des recommandations de mesures préventives souvent simples ont pu être formulées. Ce n'est alors pas tant au sein même de ces mesures d'hygiène dont l'efficacité a été avérée qu'il faut chercher le problème, mais plutôt dans une question de motivation et de prise de conscience [4–9]. Une prise de conscience éthique d'abord, puisque des actes qui seraient effectués avec des instruments ou dans des conditions ne permettant pas de minimiser au maximum les risques d'infection nosocomiale, alors que les moyens d'y parvenir existent, sont contraires aux exigences d'un exercice bienfaisant ou non-malfaisant, et contraires à bien d'autres notions éthiques ou réglementaires qui peuvent fonder pour partie le soin. Pourquoi alors ne pas tenter de comprendre et de faire comprendre la nécessité des mesures d'hygiène en odontologie, justement par leurs implications éthiques? Cette démarche pourrait passer par une expérience de pensée [10] cherchant à placer le sujet (praticien, assistant[e] dentaire ou personnel amené à devoir respecter des mesures d'hygiène) dans une situation certes imaginaire, mais concrètement plus directe, c'est-à-dire une situation où les conséquences apparaissent plus simplement, et où la responsabilité des actes de chacun peut ensuite être mieux discutée. Afin d'obtenir une sensibilisation accrue aux problèmes de motivation et de prise de conscience des enjeux sanitaires et éthiques du respect des mesures d'hygiène, ce schéma pourrait s'appliquer aux environnements de soins où leur application fait malheureusement encore défaut. En effet, le fait de confronter les professionnels de santé et/ou les assistantes dentaires à ces problèmes via une expérience de pensée peut-être directement plus représentative dans l'imaginaire des sujets concernés pourrait les amener à une conscientisation des enjeux, et par là à améliorer leur pratique dans leur exercice futur, dans un souci constant de sécurité pour le patient. Et c'est bien ce que nous cherchons.

Fondements éthiques et réglementaires

L'hygiène et les soins peuvent être considérés comme une pratique quotidienne de l'éthique. En effet, dès la naissance de la médecine, celle-ci a été considérée comme un art bienfaiteur, visant à réduire les souffrances et à soulager le malheur. Pratiquer les soins et l'hygiène en minimisant au maximum le risque de transmission de nouvelles pathologies est donc en accord total avec le fondement d'un

exercice bienfaisant ou au moins non-malfaisant. Pourtant, en France, 7,6% des patients hospitalisés contractent une infection nosocomiale [2], et leur mortalité est située entre 6 et 15% des décès [1]. Dans le domaine de l'odontologie, les chiffres apparaissent moins élevés pour les pathogènes étudiés (VIH, VHB et VHC) mais on compte tout de même, selon une étude de l'INVS de 2009 [3], un cas par an de transmission du VIH, 200 cas par an de transmission du VHB, et trois cas par an de transmission du VHC, majoritairement dus à des problèmes de stérilisation au niveau des porte-instruments rotatifs. Ces problèmes ont été étudiés et des mesures préventives d'hygiène ont été mises en place. Souvent très simples, elles ne sont pas toujours respectées pour des raisons de moindre prise de conscience ou de moindre motivation. On citera l'exemple du lavage des mains, mesure préventive la plus simple, la moins coûteuse et certainement l'une des plus efficaces. Or le respect du lavage des mains est très partiel, et la compliance au lavage des mains est devenu le cheval de bataille des hygiénistes du monde entier [4–9].

Pourtant, l'éthique fonde et encadre nos actes les plus techniques (et souvent les plus coûteux). Pourquoi ne fonderait-elle pas nos actes les plus simples (et souvent les moins coûteux) en amont même des nécessités médicales induites que sont ces premiers actes? En suivant une éthique du bien, chaque praticien, et a fortiori ses collaborateurs ou assistants, se donne comme fin le bien du malade qui s'est confié à lui. L'attitude préventive est alors la meilleure illustration du « au moins ne pas nuire » hippocratique de sa prise en charge [11].

Et cette attitude a justement été reprise dans des textes fondant l'exercice quotidien. On citera le code de Santé Publique à l'article L. 1142-1: « Les établissements, services et organismes (...) sont responsables des dommages résultant d'infections nosocomiales » [12] ou encore le code de Déontologie des chirurgiens-dentistes à l'article R. 4127-204: « Le chirurgien-dentiste ne doit en aucun cas exercer sa profession dans des conditions susceptibles de compromettre (...) la sécurité des patients (...) et doit prendre et faire prendre par ses adjoints ou assistants, toutes dispositions propres à éviter la transmission de quelque pathologie que ce soit » [12], et enfin le code du Travail qui stipule « qu'une faute peut être la conséquence d'une attitude active, mais aussi d'une abstention ou d'une omission » des mesures d'hygiène par exemple, et que « l'exécution défectueuse de la prestation de travail traduit aussi un comportement fautif même s'il est involontaire » [13]. L'hygiène est certainement aussi une question de respect du patient et de sa personnalité, comme on peut le lire dans la charte du patient hospitalisé [14].

Outre les enjeux sanitaires évidents du respect des mesures d'hygiène, on peut donc y associer d'importants enjeux éthiques, qui, à bien y regarder, paraissent certainement évidents eux aussi. Avons-nous pris la résolution de ne jamais manquer de volonté pour exécuter toutes les choses que l'on jugera être les meilleures? [15] « L'éthique, c'est

avant tout une façon de se conduire et une règle de conduite (...). On fait, ou on essaye de faire, ce que l'on doit faire. Ce n'est pas facile et on ne le fait pas toujours, parce que nous sommes des hommes, mais il faut toujours avoir ce modèle, ce surmoi comme dirait Freud, face à soi, sinon c'est la décadence et la décrépitude morale » (Hayoun) [16]. Est-ce qu'il existe un moyen de se défaire de cette difficulté de faire ce que l'on doit faire? Un moyen d'obtenir une prise de conscience suffisante? Une expérience de pensée pourrait-elle éclairer ces consciences?

L'expérience de pensée éthique

Les expériences de pensée, délibérément simples, ont été inventées spécialement pour susciter la perplexité morale afin d'identifier les facteurs qui influencent nos jugements moraux [10], ou de mieux mettre en lumière des évidences morales. Si certains pensent qu'elles sont trop éloignées de la réalité, on pourra souligner le fait que le but des expériences de pensée éthiques n'est pas en rapport avec une réalité physique, mais une réalité morale que nous ne sommes pas prêts à quitter (il est en effet difficile d'entrer dans un monde où l'on pend des enfants pour le plaisir par exemple) [17], et qui nous laisse libres de révéler nos intuitions morales [18].

L'expérience de pensée suivante va servir à sensibiliser les sujets à une situation, en la confrontant à une situation similaire, afin de mettre en évidence le non-fondé de certains actes ou oublis délibérés en rappelant des notions telles que la bienfaisance, la responsabilité ou le respect : imaginez que vous avez devant vous 13¹ seringues à l'aspect identique. Sur ces 13 seringues, vous devez injecter le contenu d'une seule à une personne. Mais sur ces 13 seringues, il y en a une qui inoculerait sans appel un pathogène à la personne si elle était choisie.

Deux possibilités s'offrent à vous :

- vous choisissez une seringue et en injectez le contenu directement ;
- a raison d'un sacrifice d'une dizaine de minutes et d'un effort modéré, vous pouvez multiplier par 100² le nombre de seringues en en gardant toujours une seule contenant le pathogène. Le risque étant alors réduit à une valeur beaucoup plus proche de zéro, vous injectez le produit.

Qu'allez-vous choisir? Gagner du temps pour soi et s'épargner un effort mais conserver un risque de transmission du pathogène pour l'autre plus conséquent, ou bien donner un peu de son temps et de son énergie pour minimiser le risque pour l'autre?

Si l'on choisit la deuxième, alors il faut aussi choisir de bien réaliser la stérilisation des instruments et de se soumettre correctement aux mesures d'hygiène courantes, car pour un « sacrifice » de quelques minutes, on peut réduire considérablement le risque d'infection nosocomiale. Ce sont là des cas similaires qui appellent des réponses similaires [10,19].

¹ Nombre choisi en relation avec le taux moyen de patients contractant une infection nosocomiale à l'hôpital, soit 7,6% [2].

² Nombre choisi arbitrairement, illustrant simplement le fait de réduire le risque à une valeur proche de zéro.

Cette expérience de pensée fait appel à deux notions : l'intuition et la règle. Pour la première, on se dira « qu'augmenter les risques d'infection pour autrui alors que l'on a le pouvoir de les réduire est immoral (et irrespectueux) », et pour la deuxième « qu'il faut traiter les cas similaires de façon similaire » [10,19]. S'il est donc immoral de risquer d'infecter une personne alors que l'on a les moyens de réduire considérablement le risque lié à l'acte, alors il est immoral de ne pas prendre quelques minutes pour réaliser correctement les mesures d'hygiène.

La question morale qui peut alors subsister est la suivante : est-il aussi grave de ne pas aider quelqu'un (en ne multipliant pas le nombre de seringues) que de lui causer un tort (en injectant le contenu de la seringue)? Et cette question nous amène à discuter des responsabilités liées à l'expérience de pensée, et par conséquent de celles liées à un défaut de réalisation des mesures d'hygiène.

Une question de responsabilités

Dans le cas exposé ci-dessus, les responsabilités se scindent en deux (notion d'acte passif, et d'acte actif). D'un côté, on est l'injecteur, et d'un autre côté le préparateur des produits qui se trouvent dans les seringues. Calqué sur la réalité, l'injecteur serait le chirurgien-dentiste, le préparateur des produits l'assistante dentaire (parfois le chirurgien-dentiste s'il réalise lui-même la stérilisation des instruments par exemple, ou s'il s'assure comme il le faudrait que son assistante s'en acquitte correctement). La responsabilité paraît différente qualitativement, mais pourrait se trouver à un même niveau si l'on devait la quantifier. Dans l'expérience de pensée, l'assistante dentaire est volontairement assimilée à l'injecteur pour tenter d'augmenter la conscience de responsabilité dans la mesure où cette expérience serait proposée à des assistantes dentaires en vue d'une prise de conscience accrue. Parfois, le manquement aux mesures d'hygiène (par exemple un oubli de désinfection ou un mauvais programme de stérilisation) même involontaire peut engager une responsabilité négative, mais une responsabilité quand même [19].

Dans le cas de cette expérience retranscrite dans le cadre d'un cabinet dentaire, on peut ajouter qu'un acteur a un pouvoir de contrôle sur l'autre (le chirurgien-dentiste est l'injecteur mais aussi le contrôleur des préparateurs) qui se traduit par une relation de confiance qu'il faut préserver, car on devrait pouvoir penser que « les actions immorales que les autres font en profitant de nos engagements moraux ne peuvent pas être mises à notre débit moral personnel » [10]. Mais plutôt que de parler de responsabilité négative ou de contrôle d'un acteur sur l'autre, ne serait-il pas plus judicieux de retrouver dans ce cas là la notion de coresponsabilité, comme l'expose Thirion dans cet exemple : « entre celui qui pense et celui qui applique, qui est responsable? Peut-on se dégager de toute responsabilité sous la seule raison qu'on n'est pas celui qui a appliqué quelque chose que l'on a conçu? Est-ce que les physiciens qui ont inventé la bombe atomique sont aussi responsables de ce qui s'est passé à Hiroshima? C'est un problème éthique profond et j'estime que la réponse se trouve dans la notion de coresponsabilité » [16]. La comparaison est certes caricaturale, mais l'idée du préparateur et de l'injecteur s'y retrouve

dans une situation similaire du point de vue de la répartition des responsabilités. La coresponsabilité pourtant ne doit pas être admise comme une division quantitative de la responsabilité. En effet, la responsabilité morale de chacun dans la survenue d'une infection nosocomiale se situe dans le cadre d'une action collective, et c'est une des raisons qui pourrait expliquer la minoration du sentiment de responsabilité des acteurs de santé lorsqu'ils ne suivent pas correctement les mesures d'hygiène. Une autre raison de cette minoration pourrait être le fait que l'abord scientifique des phénomènes d'infections nosocomiales semble prémunir les acteurs à l'égard du sentiment pénible d'une culpabilité possible [20].

Conclusions

Ce qui est recherché, c'est une compliance accrue des personnels de soins dentaires aux mesures d'hygiène qui reposent de façon plutôt évidente sur des fondements notamment éthiques. Les causes probables d'un défaut de compliance pourraient bien être un manque de motivation et une trop faible prise de conscience des enjeux sinon sanitaires, mais au moins éthiques. Le but de l'élaboration d'une expérience de pensée simple comme celle qui est présentée dans cet article, est de pouvoir sensibiliser ces personnels via des introspections sur les notions de responsabilité et de valeur morale. On pourrait soumettre ce type d'expérience aux acteurs de soin comme un appel, une incitation à l'éthique et à l'hygiène, parfois de manière insidieuse, par la technique psychologique du « pied dans la porte » décrite par Joule pour susciter une réflexion éthique, un examen de conscience [21]; et répéter l'expérience lorsqu'un relâchement pourrait se faire sentir, afin de leur rappeler leurs intuitions éthiques et de les remotiver aux mesures d'hygiène, à l'image de ce que disait Cotteau : « L'éthique modèle entièrement ma vie. Cela ne veut pas dire que je sois parfait, pas du tout : cela permet de confronter constamment, quelquefois avec douleur, quelquefois avec irritation contre soi-même, le décalage qui existe entre ce que je sais, ou ce que je sens, et ce que je fais, ou ce que je me laisse aller à faire » [16].

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Bailly P, Gbaguidi Haore D, Crenn D, et al. Mortalité hospitalière imputable aux infections nosocomiales : mise en place d'un observatoire dans un centre hospitalier universitaire. *Med Mal Infect* 2004;34:76–82.
- [2] RAISIN (Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales), Enquête nationale de prévalence nationale 2001 : résultats, 2003, INVS 1-85.
- [3] <http://lemegalodon.net/a9069-risques-et-discriminations-le-palmares-des.html>. (Discussion des résultats d'une enquête de l'INVS 2009).
- [4] Sharir R, Teitler N, Lavi I, et al. High-level handwashing compliance in a community teaching hospital: a challenge that can be met. *J Hosp Infect* 2001;49(1):55–8.
- [5] Pittet D. Improving compliance with hand hygiene in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;21(6):381–6.
- [6] Rickard NA. Hand hygiene: promoting compliance among nurses and health-workers. *Br J Nurs* 2004;13(7):404–10.
- [7] Wendt C, Knautz D, Von Baum H. Differences in hand hygiene behavior related to the contaminated risk of the healthcare activities in the different groups of healthcare. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25(3):203–6.
- [8] Jeanes A. Establishing a system to improve hand hygiene compliance. *Nurs Times* 2004;100(8):49.
- [9] Jenner EA, Mackintosh C, Scott GM. Infection control: evidence into practice. *J Hosp Infect* 1999;42(2):91–104.
- [10] Ogien R. L'influence de l'odeur des croissants chauds sur la bonté humaine et autres questions de philosophie morale et expérimentale. Paris: Éd. Grasset; 2011.
- [11] Nicolas F. Aspects éthiques des infections nosocomiales. *Ann Fr Anesth Reanim* 1998;17:415–22.
- [12] www.legifrance.gouv.fr
- [13] Code du Travail, droits et sanctions disciplinaires: la faute. Fiche pratique du code du Travail Tissot.
- [14] <http://www.sante.gouv.fr/fichiers/bo/2006/06-04/a0040012.htm>
- [15] Le Bihan C. Les grands problèmes de l'éthique. Paris: Éd. Seuil; 1997.
- [16] Hayoun MR, Thirion S, Cotteau G, et al. L'éthique, ils en parlent. Asnières-sur-Seine: Fondation Ostad Elahi éthique et solidarité humaine; 2010.
- [17] Gendler TS. The puzzle of imaginative resistance. *J Philos* 2000;97(2):55–81.
- [18] Appiah KA. Experiments in ethics. Cambridge: Harvard University Press; 2008, p. 78–82.
- [19] Singer P. Sauver une vie. Agir maintenant pour éradiquer la pauvreté. Paris: Éd. Michel Lafon; 2009, p. 17–26.
- [20] Bosi C. Hygiène et soins : pratique quotidienne de l'éthique? 2004, mémoire du DIU d'éthique et pratiques médicales, faculté de médecine de Marseille, consultable sur: <http://www.2em.org/memoire/BOSI-DIU-2004.pdf>
- [21] Joule RV. Petit traité de manipulation à l'égard des honnêtes gens. Grenoble: Presses Universitaires de Grenoble; 2004.

B. Evaluation de la méthode

Contexte : une étude a été menée afin de déterminer l'efficacité d'une méthode éthique basée sur une expérience de pensée éthique concernant la compliance aux règles d'hygiène pour les membres d'une équipe de soins dentaire.

Méthode : il s'agit d'une étude prospective visant à évaluer la compliance aux règles d'hygiène avant et après une expérience de pensée éthique, au moyen de 2 questionnaires. L'étude comprend 130 participants, étudiants cliniciens en chirurgie dentaire aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS).

Résultats : les résultats mettent en lumière une meilleure application des règles d'hygiène après l'expérience de pensée éthique, en comparant les fréquences relatives d'items réalisés, en relation avec l'hygiène. Un test des rangs signés de Wilcoxon montre une différence significative entre les résultats du premier questionnaire et du second, réalisé après l'expérience de pensée ($p < 0.001$).

Conclusions : cette méthode éthique est efficace sur la compliance aux mesures d'hygiène, ce qui la rend bénéfique à mettre en œuvre. Toutefois, loin d'être une méthode unique et absolue, cette expérience de pensée éthique s'inscrit comme une méthode originale, supplémentaire et complémentaire à d'autres méthodes.

Ce travail a donné lieu à un article publié dans le American Journal of Infection Control **(article 9)**.



Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Infection Control

journal homepage: www.ajicjournal.org



Major article

Evaluation of an ethical method aimed at improving hygiene rules compliance in dental practice



Damien Offner ^{a,b,c,*}, Marion Strub ^{a,b}, Christelle Rebert ^{a,b}, Anne-Marie Musset ^{a,b}

^a Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^b Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^c French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), Osteoarticular and Dental, Regenerative Nanomedicine, UMR 1109, Faculté de Médecine and FMTS, Strasbourg, France

Key Words:

Hygiene rules compliance
ethics
prospective observational study
medical team
dentistry

Background: The objective of this study is to determine the efficiency of an ethical method, based on a thought experiment in ethics, on hygiene rules compliance for dental health care team members.

Methods: This is a prospective study that assesses hygiene compliance in dental practice before and after a thought experiment in ethics, using 2 questionnaires. Participants included 130 clinician students in dentistry at Strasbourg University Hospital, France.

Results: The results emphasize a better implementation of hygiene rules after the thought experiment in ethics, when comparing the relative frequencies of completed hygiene items. A Wilcoxon signed-rank test shows significant differences between the first questionnaire and the second one after the thought experiment in ethics ($P < .001$).

Conclusions: This ethical method provides efficiency on hygiene rules compliance, which makes it beneficial to implement. However, far from being an absolute unit method, this thought experiment in ethics appears to be an original, supplemental, and complementary method.

© 2016 Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

In 2008, a study led by the National Institute for Prevention and Health Education showed that 50% of the French population were afraid of contracting a chronic infectious disease (eg, HIV, hepatitis B virus) during their life.¹ Transmissions can occur when taking care of patients, for both patients and the medical team. Indeed, transmissions are more likely to occur if hygiene rules are not or only partially respected.

Dentists work every day for their patients with their instruments coming into contact with biologic fluids (blood, saliva, or pus) in a deeply septic environment. Their practice, and more generally any care practice, is concerned with contamination. In the environment of medical teams, several sources and vectors of contamination can be found.^{2,3}

The effectiveness of simple current hygiene rules has been proven. However, every year, new patients are victims of care-associated infections.^{4–6} The cause is therefore more closely related to a lack of motivation or awareness of ethical, health, and even regulatory issues rather than the appropriateness of the rules.^{7–12}

Indeed, each medical team member's responsibility in the occurrence of a health care-associated infection is usually presented in the context of a collective action. This may explain why medical teams have a lower sense of responsibility when they do not correctly follow hygiene rules. Hygiene and asepsis should result from an ethical mind-set because they are the cornerstone of the Hippocratic rule at least do no harm (*primum non nocere*).¹³

This study aims at evaluating the effectiveness of an ethical method of motivation for the application of the hygiene rules in dental practice. It consists in a thought experiment in ethics, designed in a deliberately simple manner to better highlight ethical and health issues. It will also point out the responsibilities related to the misapplication of hygiene rules.¹³

MATERIAL AND METHODS

Study design

The study design is a prospective study that assesses hygiene rules compliance in dental practice. It consists of a first questionnaire (Q1), a thought experiment in ethics, a second questionnaire (Q2), and an analysis and comparison of the answers.

* Address correspondence to Damien Offner, Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 8 rue Ste Elisabeth, 67000 Strasbourg, France.

E-mail address: damien.offner@hotmail.fr (D. Offner).

Conflicts of interest: None to report.

Study subjects

Subjects included 130 clinician students in dentistry of the Strasbourg University Hospital, France. The subjects are chosen because of their same institutional level of hygiene and ethics knowledge (fifth and sixth year of study in dentistry) and because it is essential to give young practitioners good habits in hygiene and ethics, especially during their learning and training processes.

Study genesis

The daily observation of clinician student's hygiene rules compliance shows items that present some difficulties. These difficulties are not so much related to the effectiveness of hygiene rules than to the awareness and motivation of the need for their application. For the purpose of continuously developing the safety of care, it appeared necessary to imagine a method to improve these points. The method needed to be applicable in an academic context, which means that it had to offer a clear educational facet and had to be implementable to a wide audience.

In a desire to deviate from punitive methods and with awareness that hygiene rules compliance is intimately associated with a strongly ethics-founded practice, we tried to motivate the medical team members via a method based on conceptual underpinnings, such as charity, responsibility, or dignity. We believe that these strong concepts will remain for a longer time in the students' mind.

Questions were developed regarding the clinician students' hygiene habits and then submitted to a panel of 10 students to evaluate their relevance, as a pilot test. Once validated, the study could begin.

Questionnaire and study chronology

Participants were informed that their responses would remain anonymous and that their participation was not mandatory but voluntary. The objectives of the study are explained.

The questionnaires focus on points of less observance of hygiene rules and are submitted through Google Docs (Google, Mountain View, CA), which allows the students to answer comfortably at home.

Q1

For Q1, a total of 14 questions were submitted to each participant, dealing with the following themes:

- No nail polish or false nails
- No jewellery or watch
- Hand hygiene before and after care
- No mask handling with gloves during procedures
- No putting on the mask with gloves
- No sterile equipment handling with soiled gloves
- Disinfection of particular devices (polymerization lamp or teeth shade guide)
- Unit and spittoon cleaning and disinfection
- Total immersion during pre-disinfection of instruments
- Waste disposal
- Needle handling security

Thought experiment in ethics

The thought experiment in ethics is aimed at making the participants aware of a given situation, confronting them with a similar situation to highlight the inequitable dimension of some deliberated acts or omissions. To do so, some concepts, such as charity, responsibility, or respect, are recalled.^{14,15}

The experience is as follows¹³: Imagine that you have 13¹ syringes before you of identical appearance. You have to inject the content of 1 of these 13 syringes to a person. However, among these 13 syringes, one could inoculate a pathogen to the person.

Two options are available to you: (1) you choose a syringe and directly inject the content or (2) with a sacrifice of 10 minutes and a moderate effort, you can multiply by 100² the number of syringes and still keep the single one containing the pathogen. The risk is then reduced to a value much closer to zero, and you inject the product.

What are you going to choose? Save some time and effort but keep a higher risk of transmission of the pathogen, or give a little of your time and energy to minimize the risk for the other person? If you choose solution 2, you must also choose to correctly achieve the sterilization of the instruments and properly follow hygiene rules. Indeed, for a sacrifice of a few minutes, you can significantly reduce the risk of care-associated infection. There are similar cases which require similar responses.^{14,16} The term sacrifice is voluntarily chosen because a better situation is expected after the action. Therefore, a sacrifice does not basically imply either a waste of time or a waste of money.

After responding to Q1, participants are invited to browse a 3-page Web site summarizing the thought experiment in ethics. The first page of this site describes the experience and the 2 options available to the participants, such as the situation previously described. The next page asks the participant to make a choice between the 2 options by clicking on the option of their choice. To underline the time needed for the reduction of the risk of contamination, clicking on solution 2 is only available after 30 seconds of waiting.

The last page of the Web site is specific to the chosen option. When the participant has chosen the first solution, the readers are reminded that they are responsible for their patients' health and that it is unethical not to take a few extra minutes to reduce the risk associated with the procedure if they are able to do so. The readers are invited to become aware of the consequences of their actions. When the participant has chosen the second solution, it is explained that this is exactly what should be done in accordance with current hygiene rules and that it is harmful to risk infecting a patient while you are able to significantly reduce the risk of care-associated infection.

Q2

After the thought experiment in ethics, 15 days are given for reflection time and regular work in the hospital. Then the original questionnaire is submitted a second time (Q2). The following 2 supplemental questions are added to this second round: (1) Did this thought experiment in ethics have an impact on your hygiene habits? (only 1 possible answer) (Fig 1); and (2) What is (are) the reason(s) leading to an impediment to hygiene measures? (several possible answers) (Fig 2).

The students are invited to reply only on the basis of the attitudes and decision-making they have followed during the last 15 days of work, meaning the time from their participation to the thought experiment in ethics.

Processing data

The results were generated by Google Docs in the form of tables. Relative frequencies were then given. Moreover, for each question, 5 answers were possible, and a score was assigned to each of them

¹Number chosen in relation to the average rate of patients contracting a nosocomial infection at the hospital (7.6%).⁵

²Arbitrarily chosen number, simply highlighting the fact that the risk is significantly decreased.

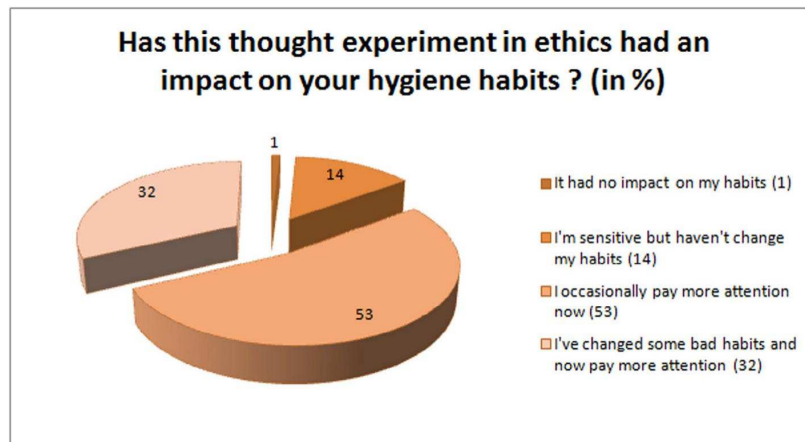


Fig 1. Impact of the thought experiment in ethics on hygiene habits.

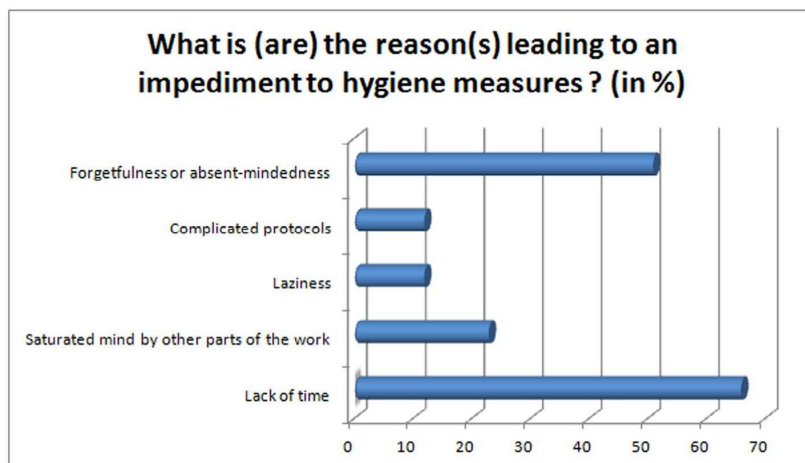


Fig 2. Reasons leading to an impediment in hygiene measures.

(5 = always; 4 = very frequently; 3 = often; 2 = sometimes; and 1 = never). An average score between 1 and 5 was obtained for each question. A high score indicates well respected hygiene rules by the students, whereas a low score reflects a minor respect of these rules. The average scores were then compared before and after the thought experiment in ethics to analyze the significance of the results.

Statistical analysis

To compare the data obtained after Q1 and those obtained after Q2, a Wilcoxon signed-rank test was used ($\alpha = 0.05$). Statistical analysis was performed using biostaTGV (INSERM, Paris, France).

RESULTS

For Q1, 130 students responded. For Q2, after attending the thought experiment in ethics, the number of respondents was 87, corresponding to 72% of the initial number of participants (the number of nonrespondents was then 43, corresponding to 28% of the initial number of participants).

Raw results show a better implementation of hygiene rules after the thought experiment in ethics (Table 1). These good results apply on every one of the 14 items submitted in the questionnaires.

With a Wilcoxon signed-rank test we obtained $P = .00012$. Significant differences were found between Q1 and Q2, with $P < .001$.

According to the answers to the supplemental questions of Q2 about the relevance of the thought experiment in ethics, 85% of the participants answered they are sensitive to the method and pay more attention to hygiene issues (Fig 1), even if it is occasionally (53%).

Regarding the causes of any failure to the application of hygiene rules (Fig 2), it appears that it is mostly because of a lack of time (66% of the respondents) or forgetfulness (51%) and for a lesser extent because of a saturated mind by other parts of work (23%) or laziness or complicated protocols (12% each).

DISCUSSION

Several difficulties were encountered during this study. The first was to motivate the participants to respond to the 2 questionnaires and encourage them to seriously play the game of the thought

Table 1
Relative frequencies of the answers to the questionnaires

Questions	Answers									
	Always		Very frequently		Often		Sometimes		Never	
	Q1	Q2	Q1	Q2	Q1	Q2	Q1	Q2	Q1	Q2
No nail polish or false nails	85.38	90.8	9.23	6.9	3.85	0	0	2.3	1.54	0
No jewelry or watch	76.15	79.31	12.31	17.24	6.15	2.3	3.08	1.15	2.31	0
Hand hygiene before care	30.77	45.98	52.31	47.13	10.77	2.3	6.15	3.45	0	1.15
Hand hygiene after care	49.23	60.92	36.92	32.18	7.69	6.9	6.16	0	0	0
No mask handling with gloves during procedures	33.08	33.33	26.15	33.33	17.7	13.79	19.23	14.94	3.85	4.6
No putting on the mask with gloves	30.78	47.13	39.23	34.48	18.46	11.49	10.77	5.75	0.77	1.15
No sterile equipment handling with soiled gloves	32.31	52.87	53.85	36.78	8.46	6.9	5.38	3.45	0	0
Polymerization lamp disinfection	82.31	85.06	13.08	10.34	3.85	3.45	0.77	1.15	0	0
Teeth shade guide disinfection	56.15	62.07	30.77	29.89	9.23	5.75	3.08	2.3	0.77	0
Spittoon cleaning	55.39	63.22	33.08	26.44	6.92	9.2	4.61	1.15	0	0
Total immersion during pre-disinfection	17.69	25.29	39.23	43.68	20.77	16.09	6.92	3.45	15.38	11.49
Waste disposal	46.92	60.92	36.92	31.03	13.85	6.9	2.31	1.15	0	0
Needle handling security	48.46	50.57	26.92	32.18	6.92	4.6	14.62	9.2	3.08	3.45
Unit maintenance (purge)	29.23	36.78	50	42.53	14.62	12.64	5.38	5.75	0.77	2.3

Q1, answers to the first questionnaire; Q2, answers to the second questionnaire.

experiment. Despite many oral and written reminders, 28% were nonresponders. However, it would be hardly conceivable that nonresponders to the 2nd questionnaire would have taken worse hygiene habits between the 2 questionnaires. These habits simply would not have been improved.

This study highlights the fact that hygiene practices are overall well respected, even though no point achieved 100%. We have to keep in mind that the questionnaire is deliberately focused on points of less observance among hygiene rules and that even if they are perfectible, the results are very encouraging. For example, no question targets the wearing of gloves during procedures because the daily clinical observations show that this compulsory measure is respected in most cases, or even 100% of cases.

The relative frequencies between Q1 and Q2 (Table 1) show that this thought experiment gives good results regarding compliance with hygiene rules. It would be interesting to examine the reasons why some points did not improve. This could be done by implementing a feedback device for hardware problems or organizational or logistical dysfunction to enter a process of continuous improvement. Another action would be to simplify some procedures or practice supports. A dental unit maintenance guide, with a sheet of traceability, has been redesigned regarding these issues.

Our work fits in an original setting because many studies relate the problems of hygiene and motivation, but only a few attempt to find solutions.^{17,18} Even if the present results do not show an absolute effectiveness of this method, when used alone, it is useful to set up a complementary method to other established methods and experience it objectively. This ethical method allows the improvement of compliance with hygiene rules. It is a first step that may inspire other ideas. Finally, it has been pointed out that even though effective hygiene rules exist, the problem is very primarily the motivation of their application. Indeed, the results are very close to other rare actions aimed at improving the knowledge and motivation of the medical team.¹⁹⁻²² The results show the inherent difficulty in the motivation of medical team members to comply with hygiene rules.

CONCLUSIONS

Via the evaluation presented in this article, the thought experiment provides, on the one hand, an interesting panorama on hygiene habits, and on the other hand, an efficiency that makes it beneficial to implement. Indeed, the relative frequencies obtained as results show a progression on each of the issues discussed. On an educational perspective, it is important to emphasize that it is at the

training stage of young practitioners that hygiene behavior can be quickly, effectively, and sustainably improved.

Far from being an absolute unique method, this thought experiment in ethics appears to be an efficient, original, supplemental, and complementary method, especially for dental practice. It can be a first step toward other ethical methods to improve hygiene compliance and awareness to ethical and health issues. Indeed, medical ethics is not a purely philosophical concept, but it should be closely associated with the practice to ensure the quality, safety, and sustainability of care.

Acknowledgments

We thank Sylvie Kleinberg for her help on proofreading.

References

- Gautier A, Jauffret-Roustide M, Jestin C. Enquête Nicolle 2006. Connaissances, attitudes et comportements face au risque infectieux. Saint-Denis, France: INPES, Coll. Etudes santé; 2008.
- Smith A, Smith G, Lappin DF, Baxter HC, Jones A, Baxter RL. Dental handpiece contamination: a proteomics and surface analysis approach. *Biofouling* 2014;30:29-39.
- Institut de Veille Sanitaire (INVS). Analyse du risque infectieux lié à la non-stérilisation entre chaque patient des porte-instruments rotatifs en chirurgie dentaire. 2009. Available from: http://www.invs.sante.fr/publications/2009/risques_chirurgie_dentaire/. Accessed February 5, 2016.
- Bailly P, Gbaguidi Haore D, Crenn D. Mortalité hospitalière imputable aux infections nosocomiales: mise en place d'un observatoire dans un centre hospitalier universitaire. *Med Mal Infect* 2004;34:76-82.
- RAISIN (Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales). Enquête nationale de prévalence nationale 2001: résultats. 2003. INVS 1-85. Available from: http://www.invs.sante.fr/publications/2003/raisin_enp_2001/. Accessed February 5, 2016.
- Institut de Veille Sanitaire (INVS). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, 2012. Available from: <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2013/Enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-France-mai-juin-2012>. Accessed February 5, 2016.
- Sharir R, Teitler N, Lavi I, Raz R. High-level handwashing compliance in a community teaching hospital: a challenge that can be met. *J Hosp Infect* 2001;1:55-8.
- Pittet D. Improving compliance with hand hygiene in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;21:381-6.
- Rickard NA. Hand hygiene: promoting compliance among nurses and healthworkers. *Br J Nurs* 2004;13:404-10.
- Wendt C, Knautz D, Von Baum H. Differences in hand hygiene behavior related to the contaminated risk of the healthcare activities in the different groups of healthcare. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:203-6.
- Jeanes A. Establishing a system to improve hand hygiene compliance. *Nurs Times* 2004;100:49.

12. Jenner EA, Mackintosh C, Scott GM. Infection control: evidence into practice. *J Hosp Infect* 1999;42:91-104.
13. Offner D. Motiver et remotiver l'équipe soignante d'un cabinet dentaire à l'application des mesures d'hygiène par une expérience de pensée éthique. *Ethique & Santé* 2013;10:18-21.
14. Ogien RG, editor. L'influence de l'odeur des croissants chauds sur la bonté humaine et autres questions de philosophie morale et expérimentale. Paris, France: Grasset; 2011.
15. Appiah KA. Experiments in ethics. Cambridge (MA): Harvard University Press; 2008. p. 78-82.
16. Singer P. Sauver une vie. Agir maintenant pour éradiquer la pauvreté. Paris, France: Michel Lafon; 2009. p. 17-26.
17. Gluyas H. Understanding non-compliance with hand hygiene practices. *Nurs Stand* 2015;29:40-6.
18. Jeanes A, Coen PG, Wilson AP, Drey NS, Gould DJ. Collecting the data but missing the point: validity of hand hygiene audit data. *J Hosp Infect* 2015;90:156-62.
19. Robelet A, Sorrieul J, Brunet M, Lebellet-Dehaut AV. Evaluation un an après la mise en place d'un outil pédagogique pour la formation continue des aides-soignantes de stérilisation: le Stérilisation Pursuit. 2015. Available from: http://www.cefh-ceps.com/actualite/frames_jns.htm. Accessed February 5, 2016.
20. Cunningham D, Brilll RJ, McClead RE Jr, Davis JT The safety stand-down: a technique for improving and sustaining hand hygiene compliance among health care personnel. *J Patient Saf*; in press.
21. Biswal M, Rajpoot S, Dhaliwal N, Appanavar SB, Taneja N, Gupta AK. Evaluation of the short-term and long-term effect of a short series of hand hygiene campaigns on improving adherence in a tertiary care hospital in India. *Am J Infect Control* 2014;42:1009-10.
22. D'Egidio G, Patel R, Rashidi B, Mansour M, Sabri E, Milgram P. A study of the efficacy of flashing lights to increase the salience of alcohol-gel dispensers for improving hand hygiene compliance. *Am J Infect Control* 2014;42:852-5.

Conclusions générales et perspectives

Les traitements actuels des lésions osseuses, particulièrement dans le secteur maxillo-facial, comportant aussi bien les greffes biologiques que les substituts osseux dérivés de tissus biologiques ou synthétiques, ont aujourd'hui été éprouvés. Il en résulte qu'à ce jour, seule la greffe autogène (ou autogreffe) présente les propriétés biologiques et biomécaniques idéales, mais montre des inconvénients liés notamment à la présence d'un second site opératoire : douleurs chroniques post-opératoires, dysesthésies, infection... Si l'allogreffe et la xéno greffe peuvent éviter un second site opératoire, ces techniques présentent elles aussi des complications douloureuses et infectieuses (**article 1**). De plus, certains comblements proposés actuellement ne permettent pas une néoformation vasculaire en leur sein, garante de la viabilité des tissus régénérés pour des lésions de taille importante.

Le défi à relever est alors double. D'une part, il faut pouvoir développer des implants capables de fournir les caractéristiques recherchées. D'autre part, il faut pouvoir trouver les moyens de lutter efficacement contre le risque infectieux. Ces deux actions combinées amènent à améliorer la qualité et la sécurité des soins dans le cas des traitements des lésions osseuses maxillo-faciales.

Durant mon travail de thèse, on a montré qu'il est possible de fabriquer des implants nanofibreux mimant la MEC du tissu osseux. Ces implants, dotés d'une porosité favorable à une formation vasculaire, peuvent être fonctionnalisés par des facteurs de croissance comme le VEGF, et être porteurs de cellules. A ce titre, et forts de la validation de leur activité angiogénique et ostéogénique *in vitro* et *in vivo*, ils constituent un réel espoir dans l'amélioration des traitements des lésions osseuses (**article 2**).

Pendant mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux implants de troisième génération fonctionnalisés non seulement par des molécules thérapeutiques mais aussi par des cellules souches. C'est dans ce cadre là que nos travaux se sont intéressés au comportement de cellules mésenchymateuses et endothélialesensemencées sur une membrane de collagène retrouvée dans le commerce. La biocompatibilité qui a été observée, ainsi que la réorganisation des cellules endothéliales en réseaux sont favorables au développement d'implants pouvant soutenir une revascularisation. Ces travaux ouvrent la voie à des applications cliniques dans un futur proche (**article 3**).

Pour que ces avancées constituent toutefois de réels progrès dans l'intérêt des patients, il est capital de mener une réflexion éthique sur leur développement d'une part, mais aussi sur leurs

applications. En effet, il n'est pas demandé aux chercheurs d'aujourd'hui d'être uniquement des techniciens, mais des professionnels conscients de leurs responsabilités sur le monde de demain. Une réflexion des scientifiques devrait être menée pour cerner les enjeux et guider les pratiques de l'ingénierie tissulaire et de la nanomédecine régénérative.

Mon travail de thèse a montré qu'il est possible d'améliorer la sécurité des soins dans le traitement des lésions osseuses maxillo-faciales. Si l'on ne peut pas exclure d'éventuelles contaminations endogènes aux tissus utilisés lors des greffes par exemple, on ne peut pas non plus exclure que les complications infectieuses peuvent provenir de défauts d'asepsie. Le développement d'équipements et la mise en place de procédures visant à évaluer leur efficacité dans le champ de l'hygiène paraissent alors incontournables.

L'unit dentaire peut être contaminé par différentes voies : la voie externe par aérosolisation des particules ; et la voie interne - celle qui peut poser problème - au niveau du système d'aspiration, d'une rétro-contamination des tubulures internes de l'unit par l'utilisation de PID, et de la qualité microbiologique de l'eau circulant dans l'unit. D'un point de vue « technique », les fautes d'asepsie peuvent alors être limitées, puisque nous avons mis en évidence que le protocole d'entretien que nous avons élaboré empêche les contaminations du système d'aspiration (**article 4**). Nous avons aussi proposé une méthode de validation du traitement des PID avant réutilisation qui devrait éviter le risque de contamination croisée lors de leur utilisation (**article 5**). La qualité microbiologique de l'eau peut elle aussi être tracée par des prélèvements réguliers et contrôlée à l'aide de systèmes de traitement de l'eau en continu qui s'avèrent efficaces rapidement et dans la durée (**articles 6 et 7**). L'ensemble de ces résultats nous a permis de créer un guide d'entretien des units et fauteuils dentaires pertinent, diffusé au sein des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (Annexe B).

Enfin, au-delà du point de vue « technique », les fautes d'asepsie liées à « l'humain » peuvent elle aussi être partiellement évitées. Des moyens efficaces existent, mais c'est souvent la compliance aux procédures d'hygiène et d'aspsie qui fait défaut. Nous avons élaboré une méthode de motivation éthique (**article 8**), et l'avons évaluée. Les résultats ont montré qu'elle est efficace et simple à mettre en œuvre (**article 9**). Toutefois, cette méthode n'est pas absolue, et elle devrait être combinée à d'autres méthodes complémentaires pour mener à bien le travail de fond qu'est l'amélioration de la compliance aux mesures d'hygiène.

Ce travail de thèse amène ainsi des éléments intéressants à l'amélioration de la qualité et de la sécurité des traitements des lésions osseuses maxillo-faciales.

Les perspectives de recherches suite à ces travaux sont vastes. Celles concernant l'optimisation des nano-implants (une nouvelle génération de substituts osseux nano-actifs) vont se poursuivre pour pouvoir répondre encore plus précisément aux demandes cliniques, et plus particulièrement limiter l'utilisation des allogreffes. Il s'agira de développer des nano-implants toujours plus performants et, peut-être, vecteurs d'autres types de molécules en plus de facteurs de croissance, telles que des antalgiques, des anti-inflammatoires ou des anti-cancéreux. De plus, à l'heure actuelle, l'implantation *in vivo* des implants qui ont été développés a été effectuée en sous-cutané. Une implantation en site osseux (site mandibulaire chez la souris) permettrait de valider ces résultats. Des tests pré-cliniques de notre nouvelle génération de substituts osseux vascularisés pourront ensuite être effectués dans un modèle canin.

D'autre part, des voies de recherche nouvelles pourront s'ouvrir avec le développement d'implants pouvant mimer non seulement la phase minérale de la MEC mais aussi l'organisation tridimensionnelle des cellules elles-mêmes au sein de cette matrice, l'amélioration de la réponse cellulaire avec l'ensemencement de micro-tissus (cellules de forme sphéroïde) sur les scaffolds plutôt que des cellules isolées (Annexe C), ou l'application de ces stratégies à d'autres domaines, notamment la possibilité d'une régénération dentaire pulpaire (Annexe D), ou d'une régénération parodontale.

Parallèlement à la recherche concernant la nanomédecine régénérative, d'autres recherches épidémiologiques seront à mener dans le but de suivre et d'évaluer les apports de ces nouvelles technologies, notamment par la mise en place d'un essai contrôlé randomisé.

Les questionnements éthiques soulevés par ces technologies devront eux aussi être sources de réflexion et de recherches, afin de garantir un cadre éthique et un réel progrès dans l'intérêt du patient concernant ces nouvelles avancées.

Enfin, des progrès restent à faire pour encadrer toujours mieux les soins en matière d'hygiène, et donc de sécurité des soins. Ceci pourra se faire par des travaux d'évaluation des méthodes proposées visant à une amélioration continue des pratiques, notamment dans le cadre du traitement des dispositifs médicaux critiques ou semi-critiques et de la maîtrise du risque infectieux lié aux unités et à l'environnement des soins. La méthode d'évaluation du traitement des PID étant proposée, on pourra envisager de s'en servir pour développer un automate qui donnera entière satisfaction.

Références

1. Harris D. Advanced surgical procedures : Bone augmentation. Dent Update 1997 24:332-37
2. Dies F. Régénération osseuse guidée par membrane PTFE-e : intérêt de l'association d'une greffe autogène ou d'un biomatériau. J Parodont Impl Orale 1997 16(1):15-30
3. Flanagan D. Should the implant fit the patient or should the patient fit the implant ?. The Journal of Oral Implantology 2012 38(5):547
4. Mckenna G, Burke FM. Age-related oral changes. Dent Update 2010 37(8):519-23
5. Campana V , Milano G, Pagano E, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery : from basic science to clinical practice. J Mater Sci : Mater Med. 2014 25:2445-61
6. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, et al. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA : a systematic review. Injury, 2011 42(Suppl 2):S3-15
7. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. J Orthop Trauma. 1989 3(3):192-5
8. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone graft substitutes : facts, fictions and applications. J Bone Joint Surg AM. 2001 83:98-103
9. Poirier J, Ribadeau Dumas JL, Catala M, et al. Histologie : les tissus. Médecine 1ère année. 2ème éd. Paris, éd. Masson, 2002
10. Bresse G. Le tissu osseux. Arch Anat Histol Embryol 1954 37(4/8):37-45
11. Heersche JN. Mechanism of osteoclastic bone resorption : a new hypothesis. Calcif Tissue Res 1978 26(1):81-84
12. Dadoune JP. Histologie. 2ème éd. Paris, éd. Flammarion, 2000
13. Porter JR, Ruckh TT, Papat KC. Bone tissue engineering : a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. Biotechnology Progress 2009 25(6):1539-60
14. Giudicelli J, Souberbielle JC. Le remodelge osseux et l'exploration de l'ostéoporose. Revue de l'ACOMEN 1998 4(3):251-72
15. Tortora G, Derrickson B. Principes d'anatomie et de physiologie. 4ème éd. Louvain-la-neuve, éd. De Boeck Université, 2007
16. Miller SC, Jee WS. The bone lining cell : a distinct phenotype ? Calcif Tissue Int 1987 45(1):1-5
17. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth : IGF, TGF(beta) and BMP. Bone 1996 19(1, Supplement 1):1-12

18. Diss A, Hitzig C, Charbit Y, Salsou B. Les facteurs de croissance, les protéines actives impliquées dans la formation osseuse. *J Parosontol Implantol Orale* 2003 22(1):5-15
19. Hughes FJ, Aubin JE, Heersche JN. Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet – derived growth factor and transforming growth factor beta. *Bone Miner* 1992 19(1):63-74
20. Degat MC, Ferreira E, Logeart-Avramoglou D. Utilisation de facteurs de croissance pour la réparation osseuse. *Pathologie Biologie* 2005 53(3):131-41
21. Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho S-C. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts : three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002 22(1):45-53
22. Stron DD, Beachler AL, Wergedal JE, Linkhart TA. Insulinlike growth factor II and transforming growth factor beta regulate collagen expression in human osteoblastlike cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1991 6(1):15-23
23. Derynck R, Jarrett JA, Chen E, et al. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985 316(6030):701-705
24. Cochran DL, Schenk R, Buser D, Wozney JM, Jones AA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *J Periodontol* 1999 70(2):139-50
25. Burks MV, Nair L. Long term effects of bone morphogenetic protein-based treatments in humans. *J Long Term Eff Med Implants*. 2010 20(4):277-93
26. Lynch SE, Trippel SB, Finkelman RD, et al. The combination of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I stimulates bone repair in adult Yucatan miniature pigs. *Wound Repair and Regeneration* 1994 2(3):182-90
27. Bonjour J-P, Kohrt W, Levasseur R, et al. Biochemical markers for assessment of calcium economy and bone metabolism: application in clinical trials from pharmaceutical agents to nutritional products. *Nutrition Research Reviews* 2014 27(2):252-67
28. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992 200(2):165-70
29. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 1995 77(6):940-56
30. Mainard D, Delagoutte J-P. Les substituts osseux. In: D Mainard, M Merle, J-P Delagoutte, J-P Louis (Ed.) *Actualités en biomatériaux*, Paris Romilliat 1990 128-176

31. Hench LL, Thompson I. Twenty-first century challenges for biomaterials. *J R Soc Interface* 2010 7(Suppl 4):S379-91
32. Cao W, Hench LL. Bioactive materials. *Ceram Int* 1996 22(6):493-507
33. Gross RA, Kalra B. Biodegradable polymers for the environment. *Science* 2002 297(5582):803-7
34. Hench LL. The challenge of orthopaedic materials. *Current Orthopaedics* 2000 14(1):7-15
35. Muster D, Vouillot JL, Dubruille JH. Biomatériaux, biomatériels et bio-ingénierie en chirurgie orale et maxillofaciale. *Encycl Méd Chir (Paris), Chirurgie orale et maxillofaciale*, 1999
36. Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 5ème éd. Oxford, éd. Blackwell Munksgaard, 2008
37. Colombier M, Lesclous P, Tulasne JF. La cicatrisation des greffes osseuses. *Rev Stomatol Chir Maxillo-fac* 2005 106(3):157-64
38. Tulasne JF. Greffe de sinus : os autogène ou substitut osseux ? Titane 2005 2(1):49-53
39. Chiarello E, Cadossi M, Tedesco G, et al. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. *Aging Clin Exp Res* 2013 25(Suppl 1):S101-3
40. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury* 2011 42(suppl. 2):S16-21
41. Khan SN, Cammisa FPJ, Sandhu HS, et al. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005 13(1):77-86
42. Mroz TE, Joyce MJ, Steinmetz MP, Lieberman IH, Wang JC. Musculoskeletal allograft risks and recalls in the United States. *J Am Acad Orthop Surg* 2008 16(10):559-65
43. Laurencin CT, El-Amin SF. Xenotransplantation in orthopaedic surgery. *J Am Acad Orthop Surg* 2008 16(1):4-8
44. Grabowski G, Cornett CA. Bone graft and bone graft substitutes in spine surgery. Current concepts and controversies. *J Am Acad Orthop Surg* 2013 21(1):51-60
45. Kinney RC, Ziran BH, Hirshorn K, Schlatterer D, Ganey T. Demineralized bone matrix for fracture healing : fact or fiction ? *J Orthop Trauma* 2010 24(Suppl 1):S52-5
46. Kitoh H, Kawasumi M, Kaneko H, Ishiguro N. Differential effects of culture-expanded bone marrow cells on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings. *J Pediatr Orthop* 2009 29(6):643-9

47. Tsai CH, Hsu HC, Chen YJ, Lin MJ, Chen HT. Using the growth factors-enriched platelet glue in spinal fusion and its efficiency. *J Spinal Disord Tech* 2009 22(4):246-50
48. Xie J, Baumann MJ, McCabe LR. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *J Biomed Mater Res A* 2004 71(1):108-17
49. Peltier LF. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. *Clin Orthop* 1961 21:1-31
50. Huff W, Grisoni B. Mechanical integrity of rat bone after autograft and calcium sulfate graft. In : *Fifth world biomaterials congress, Toronto 1996* pp52-53
51. Hadjipavlou AG, Simmons JW, Yang J, et al. Plaster of Paris as an osteoconductive material for interbody vertebral fusion in mature sheep. *Spine* 2000 25(1):10-15
52. Petruskevicius J, Nielsen S, Kaakund S, et al. No effects of Osteoset, a bone graft substitute, on bone healing in humans : a prospective randomized double-blind study. *Acta Orthop Scand* 2002 73(5):575-8
53. Lerner T, Bullmann V, Schulte TL, Schneider M, Liljenqvist U. A level-1 pilot study to evaluate of ultraporous beta-tricalcium phosphate as a graft extender in the posterior correction of adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J* 2009 18(2):170-9
54. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993 260(5110):920-6
55. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002 295(5557):1014-17
56. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing : the diamond concept. *Injury* 2007 38(Suppl 4):S3-6
57. Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostatics* 1995 35:151-60
58. Eap S, Ferrand A, Schiavi J, Keller L, Kokten T, Fioretti F, Mainard D, Jadam G, Benkirane-Jessel N. Collagen implants equipped with 'fish scale'-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine* 2014 9(8):1253-61
59. Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 16(3):329-45
60. Chiron P. Les protéines inductrices de l'os. *Rev Chir Orthopédique Traumatol.* 2004 90(6)
61. Yoo HS, Kim TG, Park TG. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2009 61(12):1033-42
62. Decher G. Fuzzy nanoassemblies : toward layered polymeric multicomposites. *Science* 1997 277(5330):1232-7

63. Izquierdo A, Ono SS, Voegel JC, Schaaf P, Decher G. Dipping versus spraying : exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly. *Langmuir* 2005 21(16):7558-67
64. Lee SS, Hong JD, Kim CH, et al. Layer-by-layer deposited multilayer assemblies of ionene-type polyelectrolytes based on the spin-coating method. *Macromolecules* 2001 34(16):5358-60
65. Yetim I, Ozkan OV, Dervişoglu A, Erzurumlu K, Canbolant E. Effect of gentamicin-absorbed collagen in wound healing in pilonidal sinus surgery: a prospective randomized study. *J Int Med Res* 2010 38(3):1029-33
66. Ferrand A, Eap S, Richert L, et al. Osteogenetic properties of Electrospun Nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol Biosci.* 2014 14(1):45-55
67. Morand DN, Huck O, Keller L, Jessel N, Tenenbaum H, Davideau JL. Active nanofibrous membrane effects on gingival cell inflammatory response. *Materials* 2015 8(10):7217-29
68. Baiguera S, Ribatti D. Endothelialization approaches for viable engineered tissues. *Angiogenesis.* 2013 16:1-14
69. Flierl MA, Smith WR, Mauffrey C, et al. Outcomes and complication rates of different bone grafting modalities in long bone fracture nonunions : a retrospective cohort study in 182 patients. *J Orthop Surg Res.* 2013 8:33
70. De Vries R, Oerlemans A, Trommelmans L, Dierickx K, Gordijn B. Ethical aspects of tissue engineering : a review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008 14(4):367-75
71. Daar AS, Bhatt A, Court E, Singer PA. Stem cell research and transplantation : science leading ethics. *Transplant Proc* 2004 36(8):2504-6
72. Yoshimura Y. Bioethical aspects of regenerative and reproductive medicine. *Human Cell* 2006 19(2):83-6
73. McKenna G. On abortion : a lincolnian position. *The Atlantic Monthly* 1995 276(3).
Accessible sur : <http://www.theatlantic.com/magazine/archive/1995/09/on-abortion-a-lincolnian-position/309050/> (consulté le 25.08.2016)
74. Fauza D. Amniotic fluid and placenta stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004 18(6):877-91
75. Abouna GM. Ethical issue in organ transplantation. *Med Princ Pract* 2003 12(1):54-69
76. Garner JP. Tissue Engineering in surgery. *Surgeon* 2004 2(2):70-8

77. Lowenheim H, Dazert S, Bucheler M, Guntinas-Lichius O. Regenerative medicine/cellular engineering for diseases of the head and neck. *DNA and Cell Biology* 2003 22(9):547-8.
78. Longley D, Lawford P. Engineering human issue and regulation : confronting biology and law to bridge the gaps. *Med Law Int* 2001 5(2):101-15
79. Enoch S, Shaaban H, Dunn KW. Informed consent should be obtained from patients to use products (skin substitutes) and dressings containing biological material. *J Med Ethics* 2005 31(1):2-6
80. Cogle CR, Guthrie SM, Sanders RC, Allen WL, Scott EW, Petersen BE. An overview of stem cell research and regulatory issues. *Mayo Clin Proc* 2003 78(8):993-1003
81. Tsang L. Legal and ethical status of stem cells as medicinal products. *Adv Drug Deliv Rev* 2005 57(13):1970-80
82. Trommelmans L, Selling J, Dierickx K. A critical assesment of the directive on tissue engineering of the European union. *Tissue Eng* 2007 13(4):667-72
83. Gunning J. Umbilical cord cell banking – implications for the future. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005 207(Suppl 2):538-43
84. Smith DS. The government’s role in advancing regenerative medicine and tissue engineering – science, safety, and ethics. *Periodontol* 2000 2006 41:16-29
85. Madeddu P, Emanuelli C, Spillmann F, et al. Murine models of myocardial and limb ischemia: diagnostic end-points and relevance to clinical problems. *Vascul Pharmacol* 2006 45(5):281-301
86. Nordgren A. Moral imagination in tissue engineering research on animal models. *Biomaterials* 2004 25(9):1723-34
87. Bernard C. Introduction à l’étude de la médecine expérimentale (1865). Accessible sur http://classiques.uqac.ca/classiques/bernard_claude/intro_etude_medecine_exp/intro_medecine_exper.pdf (consulté le 25.08.2016)
88. www.legifrance.gouv.fr (consulté le 25.08.2016)
89. http://europa.eu/rapid/press-release_IP-08-193_fr.htm?locale=fr (consulté le 25.08.2016)
90. Vergès E. Ethique et déontologie de la recherche scientifique, un système normatif communautaire. In : *Qu’en est-il du droit de la recherche ?* dir. J. Larrieu, éd. LGDJ 2009
91. Black J. Thinking twice about « tissue engineering ». *IEEE Eng Med Biol Mag* 1997 16(4):102-4

92. Satava RM. Biomedical, ethical and moral issues being forced by advanced medical technologies. Proc Am Philos Soc 2003 147(3):246-58
93. Partridge B, Hall W. The search for Methuselah : should we endeavour to increase the maximum human lifespan ? EMBO Rep 2007 8(10):888-91
94. Stock G, Callahan D. Debate : the effects of life extension. Rejuvenation Res 2007 10(3):407-16
95. Chan S, Harris J. Cognitive regeneration or enhancement : the thical issues. Regen Med 2006 1(3):361-6
96. Mummery C. Stem cell research : immortality or a healthy old age ? Eur J Endocrinol 2004 151(Suppl 3):U7-12
97. Trommelmans L, Selling J, Dierickx K. Ethical issues in tissue engineering. European Ethical-Legal Papers 2007 N°7, Leuven
98. http://ec.europa.eu/euraxess/pdf/brochure_rights/eur_21620_en-fr.pdf (consulté le 25.08.2016)
99. Thirion S, et collectif. L'éthique, ils en parlent. Fondation Ostad Elahi éthique et solidarité humaine, accessible sur : www.fondationostadelahi.fr/wp-content/upload/PDF/1-ethique-ils-en-parlent.pdf (consulté le 25.08.2016)

Annexes

Annexe A :

(article rédigé à la demande de l'Information Dentaire, pour publication prochaine)

La stérilisation des dispositifs médicaux réutilisables : nettoyage, performances et traçabilité

Après la parution de plusieurs articles dans l'Information Dentaire concernant la stérilisation des dispositifs médicaux réutilisables, leur nettoyage et la traçabilité de leur traitement, le but de celui-ci est d'établir une synthèse pratique des travaux précédents. D'après le guide de la DGS établi en 2006, en pratique de médecine bucco-dentaire, tout dispositif médical réutilisable semi-critique ou critique doit être stérilisé entre chaque patient. C'est l'assurance pour le patient et pour le praticien de la sécurité des soins et de la bonne gestion du risque infectieux. Outre cet aspect sécuritaire microbiologique, il y a indéniablement un aspect sécuritaire au regard des bonnes pratiques, de la loi, et la satisfaction de rencontrer les engagements moraux et professionnels que nous nous sommes promis de rechercher en embrassant une activité de chirurgien-dentiste, de soignant. Le « au moins ne pas nuire » hippocratique (*primum non nocere*).

Pour ce faire, nous avons à disposition une arme redoutable : la stérilisation. Un cycle de 18 minutes à 134°C qui détruit les micro-organismes. Mais cette arme repose sur deux piliers qui, s'ils sont délaissés, font s'effondrer toute la puissance du dispositif : le nettoyage, ainsi que les performances et leur traçabilité.

Le nettoyage :

C'est le garant d'une stérilisation efficace. En laissant des souillures sur les instruments, l'agent actif qu'est la vapeur d'eau ne pourra pas entrer en contact avec l'intégralité des surfaces à stériliser.

Le nettoyage intervient dans la chaîne de stérilisation juste après la pré-désinfection, et doit être suivi d'un rinçage et d'un séchage.

On distingue deux types d'instruments à nettoyer. Premièrement, concernant les instruments non dynamiques, le nettoyage peut être manuel, mais demande alors plus de temps et la présence d'un(e) assistant(e) qui ne pourra pas être au fauteuil durant ce temps. Idéalement, le nettoyage sera effectué dans un laveur-désinfecteur conforme à la norme NF EN ISO 15883. Ceci permettra généralement une plus grande efficacité du nettoyage, sa reproductibilité, ainsi qu'un rinçage et un séchage automatisés en plus d'un gain de temps.

Deuxièmement, concernant les porte-instruments dynamiques (PID), la complexité de leur architecture interne empêche un nettoyage manuel complet. On sait pourtant que ce nettoyage est indispensable à garantir leur bon traitement, car la contamination de ces dispositifs médicaux n'est pas seulement externe, mais aussi interne. Leur immersion dans une solution détergente/désinfectante est déconseillée par les fabricants des PID et n'assure pas un traitement optimal. Il est donc indispensable de traiter les PID dans un laveur-désinfecteur-lubrificateur-sécheur dédié. Ce traitement peut être effectué directement après leur utilisation, ou, si le traitement est différé, après les avoir conservés dans une boîte hermétique contenant des lingettes humides

imbibées d'une solution détergente/désinfectante afin d'éviter que les souillures ne sèchent sur et dans les instruments. L'utilisation de tels automates permet un meilleur nettoyage externe et interne, et permet d'automatiser l'étape de lubrification, garante de la longévité des instruments. Le choix de cet automate doit être réfléchi en fonction des performances garanties par celui-ci, en conformité avec la norme NF EN ISO 15883 : compatibilité multi-marques, nombre de PID traitables par cycle, étapes du traitement réalisées...

Pour tout laveur-désinfecteur, dédié aux PID ou non, il est préférable de s'orienter vers ceux qui offrent une désinfection thermique (en général avec un palier à 90°C pendant 5 minutes) plutôt que chimique, pour des questions d'ergonomie, de sécurité, et de protection de l'environnement.

Les performances et leur traçabilité :

La traçabilité des performances de l'autoclave s'effectue à plusieurs niveaux : la qualification et requalification de l'autoclave, les tests de routine, et la traçabilité des instruments stérilisés.

Concernant les autoclaves utilisés en cabinet dentaire, ils doivent être de classe B et répondre à la norme NF EN IO 13060. Dès réception par le chirurgien-dentiste, responsable de la stérilisation, ils doivent subir une qualification opérationnelle sur site avant leur utilisation. Celle-ci, suite de tests techniques, est effectuée par un technicien spécialisé. Ce dernier peut être employé par le fabricant de l'autoclave ou dépendre d'un organisme agréé. Le rapport de qualification est à conserver dans un dossier de stérilisation. Une requalification est nécessaire dès lors qu'une modification de l'autoclave ou de ses réglages peut compromettre l'efficacité du traitement. En dehors de ce cas, il paraît raisonnable d'effectuer une requalification tous les 1000 cycles ou tous les 2 ans, au premier des deux échu.

Concernant les tests de routine, ils se composent de tests Hélix de pénétration de la vapeur d'eau, de tests de vide, et de tests prion (de classe 6).

- Le test Hélix est à réaliser au minimum tous les 6 cycles ou 1 fois par semaine. Sa conception le rend plus pertinent à utiliser en pratique de chirurgie dentaire que le test Bowie-Dick. Il doit être utilisé dans un autoclave non chargé, avec un cycle comportant un plateau à 134°C pendant 3.5 minutes.
- Le test de vide est réalisé chaque semaine à l'aide des instruments de mesure présents dans l'autoclave, et permet de s'assurer que la cuve de l'autoclave ne présente pas de fuite d'air.

Les résultats de ces deux tests sont à conserver dans le cahier de stérilisation pendant 20 ans.

- Le test prion permet de justifier la montée en température et le temps suffisants pour une élimination du risque prion. Il est admis que le ticket du cycle produit par l'autoclave est suffisant mais, conformément à la grille de l'ADF, il est conseillé de l'utiliser à chaque cycle.

Enfin, la traçabilité des instruments stérilisés prend la forme d'une fiche de traçabilité. Celle-ci contient le ticket produit par l'autoclave et s'accompagne d'un code-barres ou d'étiquettes permettant de relier le cycle de stérilisation aux instruments utilisés pour les soins du patient, lien à consigner dans le dossier du patient. Les systèmes automatisés facilitent grandement la gestion de la traçabilité et de ses éléments qu'il faut conserver 20 ans. De même, l'organisation du travail en cassettes d'instruments selon l'acte à effectuer, en plus d'organiser la prise en charge du patient selon le plan de traitement établi en amont, permet de simplifier la traçabilité et de gagner en ergonomie.

La stérilisation donc, cette arme puissante à condition de respecter ses prérequis, attend du chirurgien-dentiste qu'il prenne les dispositions propres à lui donner tout son sens et toute sa force. Le praticien est fortement invité à donner à la stérilisation les moyens d'exprimer son efficacité car « sans maîtrise, la puissance n'est rien ».

Dr Damien OFFNER

AHU – Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg

Références :

- ADF. Grille technique d'évaluation pour la prévention des infections associées aux soins. 2015
- DGS, Guide de prévention des infections liées aux soins en chirurgie dentaire et stomatologie. Ministère de la santé, juillet 2006
- Comident. Guide de traitement des Porte-Instruments Dynamiques avant stérilisation. 2013

Annexe B :



GUIDE D'ENTRETIEN DES UNITS ET FAUTEUILS DENTAIRES



**AU PÔLE DE MEDECINE ET CHIRURGIE BUCCO-DENTAIRES
DE STRASBOURG**

Version 10 : 09.2016

Elaboré par : Dr Damien OFFNER, Dr Stéphanie DEBOSCKER, Pr Anne-Marie MUSSET

Validé par : Pr Anne-Marie MUSSET, Chef de Pôle

Table des matières

Introduction et vue d'ensemble du protocole d'entretien quotidien	3
I. Maintenance préventive en période d'utilisation des units dentaires	4
A. Chaque matin	4
B. Entre chaque patient	7
C. Chaque soir	8
D. Chaque semaine	10
II. Désinfection de l'eau des units en continu	11
III. Procédure après une période prolongée de non utilisation des units	12
IV. Contrôle microbiologique de l'eau des units dentaires	13
V. Maintenance curative des units dentaires	15
Annexes : feuilles de traçabilité	17
Références	20

Les units et fauteuils dentaires constituent des sources et des vecteurs de contamination, tant pour l'équipe soignante que pour le patient. A ce titre, leur entretien est capital. Il doit rigoureusement suivre des étapes précises pour leur utilisation quotidienne et lors de l'arrêt prolongé de leur utilisation. Ces étapes sont décrites dans ce guide, et en accord avec les recommandations professionnelles.

Leur réalisation doit être reportée à chaque fois sur la feuille de traçabilité.

Etapas du protocole d'entretien quotidien :

✓ Chaque matin :

- Purge du robinet d'eau chaude du box pendant 2 min minimum
- Mise en place du réservoir d'eau indépendant le cas échéant. Le remplir en diluant le produit adéquat avec l'eau du réseau
- Mise en place du filtre du système d'aspiration nettoyé et désinfecté ou à usage unique. Mise en place des embouts d'aspiration nettoyés et désinfectés
- Rinçage de l'aspiration avec 1L d'eau, à l'aide de l'OroCup©
- Purge du crachoir, des fouets et des sprays de l'unit pendant 5min
- Nettoyage / désinfection des surfaces en 1 temps

✓ Entre chaque patient :

- Rinçage de l'aspiration à l'eau (1L avec l'OroCup©), ou désinfection à l'Orotol© (2 bouchons pour 2L d'eau) en cas d'acte sanglant
- Purge du crachoir, des sprays et des fouets de l'unit 20 à 30s. avant de déconnecter et traiter les porte-instrument dynamiques (pièces à mains, turbines, ...)
- Nettoyage / désinfection des surfaces en 1 temps

✓ Chaque soir :

- Nettoyage et désinfection de l'aspiration à l'Orotol©, avec l'OroCup©
- Purge du crachoir, des sprays et des fouets de l'unit après le dernier patient 20 à 30s. avant de déconnecter et traiter les porte-instruments dynamiques
- Prédésinfection et nettoyage du filtre et des embouts du système d'aspiration, ou changement du filtre à usage unique
- Nettoyage et désinfection des surfaces en 3 temps
- Rinçage et désinfection du réservoir d'eau indépendant et des embouts du système d'aspiration en laveur-désinfecteur à 55°C. Placer un réservoir propre et vide sur l'unit

✓ Chaque semaine :

- Nettoyage des tubulures d'aspiration au MD555© (50mL de MD555© dans 950mL d'eau, aspirer et laisser agir 30min minimum sans dépasser 2 heures)

I. MAINTENANCE PREVENTIVE EN PERIODE D'UTILISATION DES UNITS

A. CHAQUE MATIN

- 1) **Robinet du box** : purge à l'eau chaude pendant 2 min minimum



- 2) **Réservoir d'eau indépendant** (pour les units qui en possèdent un) : remplissage en diluant le produit adéquat avec l'eau du réseau, et mise en place



- 3) **Aspiration** : mise en place du filtre nettoyé et désinfecté (ou filtre à usage unique). Mise en place des embouts d'aspiration nettoyés et désinfectés



- 4) **Aspiration** : rinçage avec 1L d'eau, à l'aide de l'OroCup©



- 5) **Crachoir, fouets et seringues air/eau** : purge de 5 min



- 6) **Surfaces** : nettoyage / désinfection (fauteuil, unit, tablette, scialytique, siège, plan de travail) en 1 temps à l'aide d'un produit détergent / désinfectant

Les étapes du nettoyage se font du haut vers le bas, sans oublier les dessous des accoudoirs, et la zone de l'unit recevant le filtre d'aspiration



B. ENTRE CHAQUE PATIENT

- 1) **Aspiration** : après un acte non sanglant, rinçage à l'eau (1L avec l'OroCup®)

Après un acte sanglant, désinfection à l'Orotol® (selon les recommandations du fabricant, 2 bouchons pour 2L d'eau)



- 2) **Crachoir, fouets et seringues air/eau** : purge pendant 30 s. avant de déconnecter et traiter les porte-instruments dynamiques (pièces à mains, turbines, ...)



- 3) **Surfaces** : nettoyage / désinfection en 1 temps

C. CHAQUE SOIR

- 1) **Aspiration** : Nettoyage et désinfection à l'Orotol©, avec l'OroCup© (selon les recommandations du fabricant, 2 bouchons pour 2L d'eau)



- 2) **Crachoir, fouets et seringues air/eau** : purge pendant 30 s. avant de déconnecter et traiter les porte-instruments dynamiques (pièces à mains, turbines, ...)



- 3) **Filtre et embouts du système d'aspiration** : prédésinfection et nettoyage (ou changement du filtre s'il est à usage unique)



- 4) **Surfaces** : nettoyage *et* désinfection des surfaces (fauteuil, unit, tablette, scialytique, siège, plan de travail) = bionettoyage en 3 temps : nettoyage à l'aide d'un détergent, rinçage, puis désinfection à l'aide d'un désinfectant.

Eteindre le fauteuil

- 5) **Réservoir d'eau indépendant et embouts du système d'aspiration** : rinçage puis désinfection en laveur-désinfecteur à **55°C**. Placer un réservoir propre et vide sur l'unit.



D. CHAQUE SEMAINE

Aspiration :

- nettoyage des tubulures d'aspiration au MD555©
- selon les recommandations du fabricant : dans l'OroCup©, diluer 50mL de MD555© dans 950mL d'eau, aspirer et laisser agir 30 min minimum, sans dépasser 2 heures. Rincer en aspirant de l'eau avant de réutiliser l'unit
- peut idéalement être effectué pendant la pause de la mi-journée



II. DESINFECTION DE L'EAU DES UNITS EN CONTINU

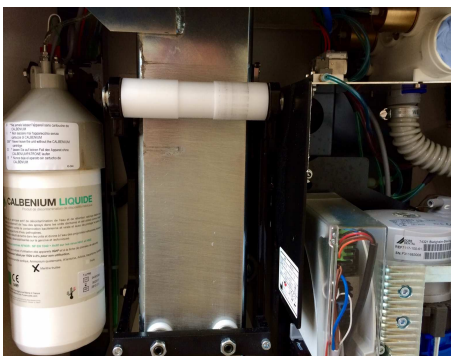
Afin de garantir une meilleure qualité microbiologique de l'eau circulant dans les unités dentaires, il est préférable d'avoir recours à un système de désinfection de l'eau en continu. **Ce système ne dispense pas d'effectuer les purges décrites précédemment et ne substitue pas à la stérilisation des instruments dynamiques.**

Différents systèmes existent et correspondent généralement en l'injection dans les conduites de l'unité d'un produit désinfectant prêt à l'emploi (bouteille d'IGN Calbénum®), ou après dilution manuelle dans de l'eau du réseau (Sterispray®).

Le produit doit présenter un marquage CE et répondre aux normes NF EN 1040 (ou NF T 72-152) obligatoires sauf en cas de norme de bactéricidie de phase 2 étape 1 et NF EN 13727 (ou NF 726176).

Pour les unités équipés de ces systèmes :

- vérifier régulièrement que les produits sont en quantité suffisante
- recharger le produit en cas de manque (alarme sonore pour l'IGN Calbénum® / manque d'eau à la sortie des fouets pour le Sterispray®)



Système IGN Calbénum® intégré à l'unité



Système IGN Calbénum® attaché à l'unité



Système Sterispray® attaché à l'unité

III. PROCEDURE APRES UNE PERIODE PROLONGEE

DE NON UTILISATION DES UNITS

➤ **Lavabos**

- **3 jours consécutifs avant la réouverture de l'unit et le matin de la réouverture,** purger tous les points d'usage (eau chaude et eau froide) en laissant couler l'eau pendant 2 min minimum

➤ **Units reliés à l'eau du réseau**

- Fermeture de l'unit comme chaque soir
- **3 jours consécutifs avant la réouverture de l'unit et le matin de la réouverture**
 - Purge du crachoir : 6 cycles
 - Purge des fouets : 6 cycles de 90 secondes

➤ **Units reliés à un réservoir d'eau indépendant**

- Lors de la dernière fermeture avant la période de non-utilisation, placer une bouteille propre et vide sur l'unit comme à chaque fermeture. Vidanger les circuits à l'air, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'eau qui ressorte des fouets et des sprays
- **3 jours consécutifs avant la réouverture de l'unit et le matin de la réouverture,** effectuer 2 cycles de purge habituelle avec le contenu du réservoir (eau du réseau + produit de désinfection en continu adéquat)

IV. CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE DE L'EAU DES UNITS DENTAIRES

Pour la réalisation d'actes chirurgicaux, l'utilisation d'eau stérile est recommandée.

Dans le cadre de l'amélioration de la sécurité des soins, il est justifié d'utiliser pour des soins dentaires une eau dont les caractéristiques correspondent au moins aux critères de potabilité.

- **Points contrôlés**

- L'eau à la sortie du fouet
- L'eau au niveau du crachoir s'il existe
- Selon les cas, l'eau du robinet adjacent à l'unit reflétant l'eau d'entrée et l'eau du réseau

Afin d'identifier si le problème est lié à une non conformité de l'eau d'entrée (contamination du réseau d'eau qui alimente le fauteuil) ou une contamination des circuits internes de l'unit.

- **Fréquence des prélèvements**

- En routine, chaque unit est contrôlé 1 fois/an dans la mesure du possible
- Après non-conformité ou réparation
- Après installation et avant toute première utilisation

- **Seuils microbiologiques retenus pour les units dentaires**

La qualité microbiologique retenue pour l'eau à l'entrée et à la sortie des units dentaires est celle de l'eau pour soins standards.

Type de recherche (eau pour soins standards)	Niveau cible ¹	Niveau d'action ²
Flore aérobie revivable à 37°C	≤ 10 UFC/mL	≥ 200 UFC/mL
Flore aérobie revivable à 22°C	≤ 100 UFC/mL	≥ 200 UFC/mL
Coliformes totaux à 36°C (si positif recherche de <i>E. coli</i>)	< 1 UFC/100mL	≥ 1 UFC/100mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 1 UFC/100mL	≥ 1 UFC/100mL

¹ **niveau cible** : niveau vers lequel l'établissement doit tendre dans les conditions normales de fonctionnement

² **niveau d'action** : niveau qui doit immédiatement déclencher, la mise en place de mesures correctives

Les niveaux cible et d'action ont été retenus d'après la circulaire française de 2005, qui propose un niveau cible en flore aérobie ≤10 UFC/mL et ≤100 UFC/mL et d'après l'ADA qui le propose <200 UFC/mL.

- **Interprétation des résultats**

RESULTATS	INTERPRETATION
<ul style="list-style-type: none"> • Flore aérobie revivifiable à 37°C <=10 UFC/ml • Flore aérobie à 22°C <=100 UFC/ml • Et absence de germes pathogènes 	Résultats CONFORMES aux valeurs attendues
<ul style="list-style-type: none"> • Flore aérobie revivifiable à 37°C entre 10 et 200 UFC/ml • Flore aérobie à 22°C entre 100 et 200 UFC/ml • Et absence de germes pathogènes 	Résultats ACCEPTABLES
<ul style="list-style-type: none"> • Flore aérobie à 22°C et à 37°C >=200 UFC/ml <p><u>Ou</u> présence de germes pathogènes :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ▪ <i>Escherichia coli</i> 	Résultats NON CONFORMES ⇨ INTERDIRE L'USAGE de l'unit dentaire ⇨ Maintenance curative

V. MAINTENANCE CURATIVE DES UNITS DENTAIRES

- **Résultats non conformes au niveau du fouet (et du crachoir) sans anomalie sur l'eau d'entrée**

- ⇒ Interdire l'utilisation de l'unit dentaire jusqu'à normalisation des résultats
- ⇒ Réaliser une désinfection des conduites d'eau de l'unit
 - Différentes méthodes de désinfection existent selon le type de fauteuil et son alimentation en eau (tableau 1)
 - Plusieurs cycles peuvent parfois être nécessaires
- ⇒ Relancer les prélèvements de contrôle au niveau du fouet et du crachoir, 72 heures après la mise en place de ces mesures correctives

Si les résultats restent non conformes malgré plusieurs traitements :

- Installer un système de désinfection continue des circuits des instruments si celui n'est pas encore en place et interdire l'utilisation du crachoir pour remplir le gobelet du patient (utiliser de l'eau embouteillée si nécessaire)
- Si un système de désinfection continue est déjà en place, contacter le fournisseur

Remarque : si non-conformité au niveau du crachoir seulement, ne pas interdire l'utilisation de l'unit dentaire mais interdire l'utilisation du crachoir pour remplir le gobelet du patient (utiliser de l'eau embouteillée si nécessaire).

- **Résultats non conformes au niveau de l'eau d'entrée et de l'unit dentaire**

Si l'eau d'entrée est d'emblée non conforme, il convient de trouver l'origine de cette contamination

- ⇒ Interdire l'utilisation de l'unit jusqu'à normalisation des résultats
- ⇒ Travailler avec la Direction des Infrastructures et des Travaux pour trouver l'origine de la contamination
- ⇒ S'il s'agit d'eau adoucie, un entretien de l'adoucisseur peut être nécessaire
- ⇒ Le dosage du chlore avant et après l'adoucisseur doit être réalisé

Tableau 1. Désinfection de l'unit dentaire selon les différentes configurations

	Unit dentaire avec crachoir sans système de désinfection continue	Unit dentaire avec crachoir munis d'un système de désinfection continue	Unit dentaire sans crachoir munis d'un système de désinfection continue
Comment	Au Dialox ou produit équivalent	1) Si crachoir contaminé Au Dialox 2) Si crachoir non contaminé Choc à l'aide du produit de désinfection (voir recommandations du fournisseur)	Choc à l'aide du produit de désinfection (voir recommandations du fournisseur)
Par qui	Direction des Equipements (car unit relié à l'eau du réseau)	Direction des Equipements (cas 1) ou personnel du service concerné (cas 2)	Personnel du service concerné

ANNEXES : FEUILLES DE TRAÇABILITE

Traçabilité entretien unit (ADEC)						
	LUNDI	MARDI	MERCREDI	JEUDI	VENDREDI	SAMEDI
Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-dentaires (HUS) n° inventaire : UF : semaine n° : Box :	① MATIN					
	purger le robinet du box 2 min minimum remplir le réservoir à partir du robinet muni d'un filtre + produit adéquat mettre le réservoir en place mettre les filtres et les embouts d'aspiration en place rincer l'aspiration (1L d'eau dans l'OroCup) purger 5 min (fouets, sprays, crachoir) nettoyer/désinfecter les surfaces (fauteuil, unit, tablette, scialytique, siège, plan de travail) en 1					
<i>Etudiant :</i>						
<i>Assistante :</i>						
② ENTRE LES PATIENTS						
rincer l'aspiration avec 1L d'eau dans l'OroCup <i>!! Si acte sanglant, rajouter de l'Orotol !!</i> PID en place, purge de 30 sec, puis déconnexion purge de la seringue air/eau (30 sec.) nettoyer/désinfecter les surfaces (fauteuil, unit, tablette, scialytique, siège, plan de travail) en 1						
③ SOIR						
passer Orotol avec l'OroCup dans les aspirations (2bouchons / 2L d'eau) PID en place, purge de 30 sec. puis déconnexion purge de la seringue air/eau (30 secondes) enlever les filtres et les embouts d'aspiration, prédésinfection nettoyer et désinfecter les surfaces (fauteuil, unit, tablette, scialytique, siège, plan de travail) en 3 enlever et vider le réservoir d'eau de l'unit, y placer un monter le fauteuil, poser les pédales sur les côtés, éteindre le fauteuil						
<i>Etudiant :</i>						
<i>Assistante :</i>						
④ CHAQUE SEMAINE (nettoyage au MD555)						

Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-dentaires (HUS) n° inventaire : UF : semaine n° : Box :		Traçabilité entretien unit (PLANMECA)				
		LUNDI	MARDI	MERCREDI	JEUDI	VENDREDI
① MATIN						
purger le robinet du box 2 min minimum						
mettre les filtres et les embouts d'aspiration en place						
installer le support crachoir et l'OroCup						
rincer l'aspiration (1L d'eau dans l'OroCup)						
purger 5 min (crachoir, fouets, sprays)						
nettoyer/désinfecter les surfaces (fauteuil, unit, tablette, scialytique, siège, plan de travail) en 1 temps						
<i>Etudiant :</i>						
<i>Assistante :</i>						
② ENTRE LES PATIENTS						
rincer l'aspiration (1L d'eau dans l'OroCup)						
<i>!! Si acte sanglant, rajouter de l'Orotol !!</i>						
PID en place, purge de 30 sec. puis déconnexion						
purge de la seringue air/eau (30 secondes)						
nettoyer/désinfecter les surfaces (fauteuil, unit, tablette, scialytique, siège, plan de travail) en 1 temps						
③ SOIR						
passer Orotol avec l'OroCup dans les aspirations (2bouchons / 2L d'eau)						
PID en place, purge de 30 sec. puis déconnexion						
purge de la seringue air/eau (30 secondes)						
enlever les filtres et les embouts d'aspiration, pré-désinfection						
nettoyer et désinfecter les surfaces (fauteuil, unit, tablette, scialytique, siège, plan de travail) en 3 temps						
monter le fauteuil, poser les pédales sur les côtés, éteindre le fauteuil						
<i>Etudiant :</i>						
<i>Assistante :</i>						
④ CHAQUE SEMAINE (nettoyage au MD555)						

Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-dentaires (HUS) n° inventaire : UF : semaine n° : Box :		Traçabilité entretien unit (QUETIN)				
		LUNDI	MARDI	MERCREDI	JEUDI	VENDREDI
① MATIN						
purger le robinet du box 2 min minimum						
mettre les filtres et les embouts d'aspiration en place						
rincer l'aspiration (1L d'eau dans l'OroCup)						
purger 5 min (fouets, sprays)						
nettoyer/désinfecter les surfaces (fauteuil, unit, tablette, scialytique, siège, plan de travail) en 1 temps						
<i>Etudiant :</i>						
<i>Assistante :</i>						
② ENTRE LES PATIENTS						
rincer l'aspiration (1L d'eau dans l'OroCup) <i>!! Si acte sanglant, rajouter de l'Oratol !!</i>						
PID en place, purge de 30 sec. puis déconnexion						
purge de la seringue air/eau (30 secondes)						
nettoyer/désinfecter les surfaces (fauteuil, unit, tablette, scialytique, siège, plan de travail) en 1 temps						
③ SOIR						
passer Oratol avec l'OroCup dans les aspirations (2bouchons / 2L d'eau)						
PID en place, purge de 30 sec. puis déconnexion						
purge de la seringue air/eau (30 secondes)						
enlever les filtres et les embouts d'aspiration, prédésinfection						
nettoyer et désinfecter les surfaces (fauteuil, unit, tablette, scialytique, siège, plan de travail) en 3 temps						
monter le fauteuil, poser les pédales sur les côtés, éteindre le fauteuil						
<i>Etudiant :</i>						
<i>Assistante :</i>						
④ CHAQUE SEMAINE (nettoyage au MD555)						

REFERENCES :

- Association Dentaire Française (ADF). Grille technique d'évaluation pour la prévention des infections associées aux soins. 2015
- Direction Générale de la Santé (DGS). Guide de prévention des infections liées aux soins en chirurgie dentaire et en stomatologie. 2006
- CCLIN Sud-Ouest. Recommandations pour la prévention du risque infectieux au niveau des cabinets dentaires en milieu hospitalier. 1996
- D Offner, S Deboscker, L Belotti, L Brisset, T Lavigne, AM Musset : Elaboration et évaluation d'un protocole d'entretien des units et fauteuils dentaire (ADEC® et Planmeca®) aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, HygieneS , 2013, 21(2):21-28
- D Offner, L Iltis, A Bertrand, AM Musset : L'hygiène des tuyaux d'aspiration de l'unit dentaire, étude comparative de l'impact de leur structure et entretien, L'Information Dentaire, 2015, 18:12-17
- ISO 16954. Médecine bucco-dentaire – Méthodes d'essais pour le traitement du biofilm dans les conduites d'eau de l'unit dentaire
- Circulaire DHOS/E4/DGS/SD7A n° 2005-417 du 9 septembre 2005 relative au guide technique sur l'eau dans les établissements de santé
- ADA Statement on Dental Unit Waterlines. JADA. 2 janv 1996, 127(2):185-6



Communication

Integrating Microtissues in Nanofiber Scaffolds for Regenerative Nanomedicine

Laetitia Keller ^{1,2,†}, Quentin Wagner ^{1,2,†}, Damien Offner ^{1,2,3,†}, Sandy Eap ^{1,2,†},
Anne-Marie Musset ^{1,2,3}, Manuel Arruebo ⁴, Jens M. Kelm ⁵, Pascale Schwinté ^{1,2,*} and
Nadia Benkirane-Jessel ^{1,2,3,*}

Received: 26 August 2015 ; Accepted: 28 September 2015 ; Published: 9 October 2015

Academic Editor: Dusan Losic

¹ INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), “Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine” laboratory, UMR 1109, Faculté de Médecine, Strasbourg Cedex F-67085, France; lkeller@unistra.fr (L.K.); wagner.quentin@gmail.com (Q.W.); doffner@unistra.fr (D.O.); sandyeap@yahoo.fr (S.E.); musset@unistra.fr (A.-M.M.)

² Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 place de l’Hôpital, Strasbourg F-67000, France

³ Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), Strasbourg F-67000, France

⁴ Department of Chemical Engineering and Aragon Nanoscience Institute, University of Zaragoza, C/Mariano Esquillor, s/n, Zaragoza 50018, Spain; arruebom@unizar.es

⁵ InSphero AG, Wagistrasse 27, Schlieren 8952, Switzerland; jens.kelm@insphero.com

* Correspondences: nadia.jessel@inserm.fr (N.B.-J.); pswinte@unistra.fr (P.S.);
Tel.: +33-368-853-376 (N.B.-J.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: A new generation of biomaterials focus on smart materials incorporating cells. Here, we describe a novel generation of synthetic nanofibrous implant functionalized with living microtissues for regenerative nanomedicine. The strategy designed here enhances the effectiveness of therapeutic implants compared to current approaches used in the clinic today based on single cells added to the implant.

Keywords: nanofibrous implant; microtissues; regenerative nanomedicine; bone regeneration

1. Introduction

Bone regeneration is a complex, well-orchestrated physiological process, which occurs during normal healing of fractures, and is involved in continuous remodeling throughout adult life. In the clinic, bone regeneration can be required in large quantities [1], such as for skeletal reconstruction of large bone defects resulting from trauma, tumor resection or cases in which the regenerative process is compromised (non-unions, osteoporosis). Current processes promoting bone-regeneration, including the free fibula vascularized graft, autologous bone graft, allograft implantation, and use of growth factors are unsatisfactory as they induce insufficient quantities of bone [2]. Current cell-based tissue engineering techniques often involve the use of 3D scaffold materials with appropriate mechanical and structural properties, to trigger the regenerative response of cells. Such scaffolds have been developed through various fabrication techniques [3] (electrospinning, microfabrication, lithography, *etc.*).

The key for a clinically transferable tissue engineering approach is the fast maturation of the tissue throughout the whole scaffold to support healing processes as shown for the bone, or to replace dysfunctional tissue. Most 3D models combine a small number of cells with a large amount of scaffold (natural or synthetic), maximizing cell-to-scaffold interactions, but in most *in vivo* tissues, cell-to-cell interactions are the most important [4]. The use of cell microtissues without external extracellular

matrix is largely used for drug screening however, for regenerative medicine, single cells combined with scaffolds are still the predominant dogma.

Here we report a novel approach in bone tissue engineering leading to bone induction, combining nanofibrous poly(ϵ -caprolactone) (PCL) scaffolds [5,6] together with preformed tridimensional bone microtissues from osteoblasts.

2. Results and Discussion

A 700 μm thick electrospun PCL nanofibrous scaffold was manufactured to generate the tissue engineered bone graft (Figure 1). Electrospun nanofibers have an extremely high specific surface area, due to small fiber diameters, mimicking the collagen extracellular matrix [7].



Figure 1. Light micrograph of 700 μm thick PCL (poly(ϵ -caprolactone)) electrospun-nanofiber scaffold.

Our aim was to investigate the capacity of osteoblasts cultivated as 3D microtissues to colonize the thick matrix and to lead to mineralization (bone formation). Thus, we followed *in vitro* the cell infiltration potency of osteoblasts (OB) microtissues seeded on the scaffold, by fluorescence confocal microscopy, and traced mineralization through Alizarin Red staining histology.

After microtissue adherence onto the scaffold, cells began to spread after 3 days of culture, exhibiting osteoblast migration along the nanofibers (Figure 2).

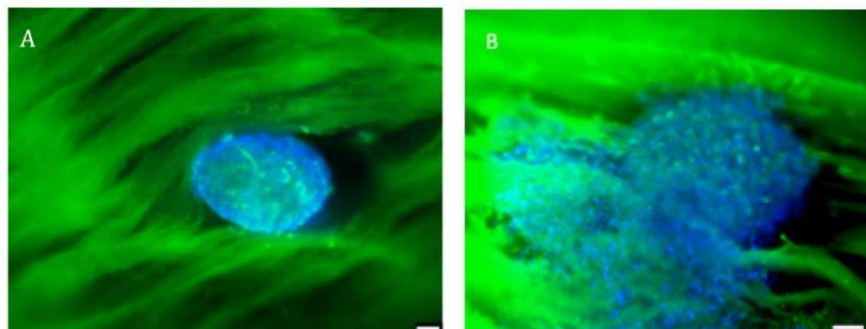


Figure 2. Fluorescence confocal microscopy visualization of human primary osteoblasts microtissues seeded onto the scaffold, and stained with DAPI (showing DNA) and PLL-FITC (showing the nanofibers). (A) Microtissue nesting in the scaffold at day 0; (B) Microtissue at day 3 of *in vitro* culture in the scaffold. Scale bar = 100 μm . $n = 3$.

Staining by Alizarin Red to check the formation of neo-calcified tissue revealed high bone formation within the core of the thick PCL scaffold seeded with OB microtissues after 28 days (Figure 3).

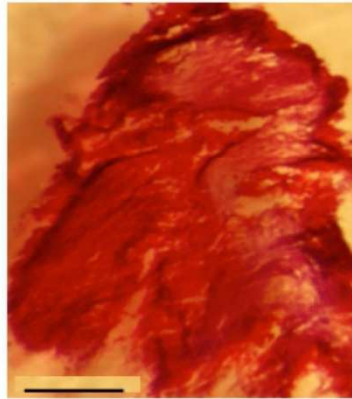


Figure 3. Alizarin Red staining of PCL scaffold seeded with Osteoblasts microtissues: *In vitro* bone induction and mineralization on the PCL electrospun nanofibers seeded with microtissues after 28 days of *in vitro* culture. Scale bar = 1 mm. *n* = 3.

In vivo, subcutaneous implantation of the hybrid 3D implant was performed on nude mice. Implants were recovered after four weeks, cut in sections and stained with Mallory coloration. The histological sections clearly demonstrate that cells originating from the microtissues migrated and colonized the whole scaffold (Figure 4).

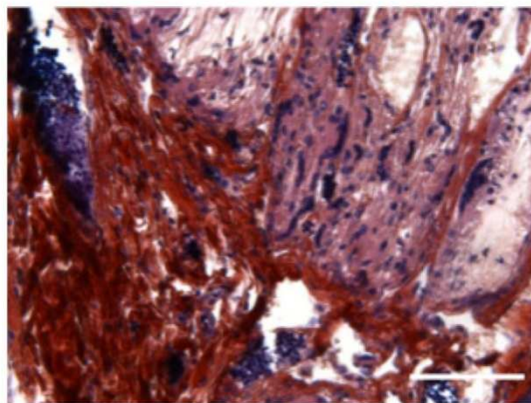


Figure 4. Subcutaneous implantation of hybrid 3D electrospun-nanofibrous implant in mice leads to bone formation: *In vivo* bone induction in PCL 3D scaffold with human primary osteoblasts microtissues 4 weeks after subcutaneous implantations in nude mice. Scale bar = 100 μ m. *n* = 5 mice.

Here we demonstrate that combining two conceptual different tissue-engineering strategies, PCL nanofibers scaffolds (3D biomaterial) seeded with bone microtissues (3D cell aggregate), leads to bone tissue formation observed *in vitro* and *in vivo*, after subcutaneous implantation, without even any need of growth factors.

Some recent study has shown that the release of BMP-2 growth factor from capsules together with injection of embryonic stem cells without the presence of a hydrogel matrix did not induce

bone regeneration, but it did when a scaffold was additionally implanted [8]. Recently, in our group, we have shown that by using the present thick 3D PCL nanofibrous scaffold, combined with single cells, the cell colonization and mineralization of the implant occur but without any bone induction in the core of the implant (submitted manuscript). Thus the implantation of this kind of scaffold is not enough in the case of large lesions, even with injection of single cells: To favor maturation of the tissue throughout the entire scaffold, the optimization of cell-cell-interactions (and not solely cell-scaffold interactions) as they prevail in natural tissues, is an important factor [3,9]. In consequence, the second strategy consisting in seeding cell microtissues in the scaffold appears most relevant.

3. Experimental Section

Chemicals. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL), analytical grade (MW 80000), was obtained from Perstorp (Sweden). PCL was dissolved in a mixture of dichloromethane/dimethylformamide (DCM/DMF 40/60 *v/v*) at 27% *w/v* and was stirred overnight before use.

Electrospinning. A standard electrospinning set-up apparatus EC-DIG purchased from IME Technologies (Eindhoven, Netherlands) was used to fabricate the PCL 3D nanofibrous scaffolds. The PCL solution was poured into a 5 mL syringe and ejected through a 21G needle of 0.8 mm outer diameter at a flow rate of 1.2 mL/h via a programmable pump (ProSense). The electrospun jet was focused by the use of a poly(methyl methacrylate) (PMMA) 2.5 mm thick mask drilled with a hole (diameter of 25 mm) placed over the conductive collector. The collector was placed at a 16 cm distance from the needle. A voltage of +15 kV was applied on the needle, whereas -5 kV was applied on the collector during the electrospinning process.

Cell culture. Human primary osteoblasts were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany). Osteoblasts were cultured in a specific osteoblast growth medium together with complement and $50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ penicillin, $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ streptomycin, $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ amphotericin B. The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . When cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin and sub-cultured.

Microtissue culture. Osteoblasts were seeded in GravityPLUS™ plate (InSphero AG, Zürich, Switzerland) to produce microtissues. 1×10^4 cells per microtissue were seeded in these plates and cultivated during 5 days. For bone formation, osteoblast microtissues were then seeded onto the PCL 3D scaffolds for *in vitro* studies and *in vivo* implantations.

***In vitro* analysis of mineralization using Alizarin Red S staining.** Alizarin Red S powder was dissolved in distilled water at a concentration of 2 g for 100 mL. The samples were incubated in the Alizarin Red solution for 20 min and then rinsed with distilled water several times. The samples were embedded in Tissue-Tek OCT™ Compound to be cut in sections ($35 \mu\text{m}$) with a cryostat (LEICA JUNG CM 3000). The sections were then observed under the optical microscope (LEICA DM 4000 B). Number of experiments $n = 3$.

Confocal microscopy. Human osteoblast single cells or microtissues were seeded onto PCL 3D electrospun scaffolds and cultivated for 1 and 21 days before fixation with PFA 4%. Then, cell nuclei were stained with DAPI and nanofibers were stained with PLL-FITC. Fluorescence microscopy was performed with a confocal microscope Zeiss LSM 700.

***In vivo* subcutaneous implantation in nude mice.** All procedures were designed in compliance with the recommendations of the European Union (2010/63/EU) for the care and use of laboratory animals. Ethics statement: Experiments followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU), and were performed according to authorized investigator N. Jessel (Director of the “Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine” Team), holder of a personal license from “Préfecture du Bas-Rhin” (No. 67-315), who oversaw experiments done on mice. All experiments were done in the “Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine de Strasbourg” with the approval number: A 67-482-35 from the Veterinary Public Health Service of the “Préfecture du Bas-Rhin”, representing the French Ministry of Agriculture, Department of Veterinary Science. All surgery was performed under Ketamine and Xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

The study was run with Nude male mice (CrI: NIH-Foxn1^{nu} Charles River, France) 6 weeks of age. The mice were anesthetized with an intra-peritoneal injection of 100 mg/kg of ketamin (VIRBAC Santé Animale, Centravet, Italy) and 10 mg/kg of Xylazin (Rompun[®] 2%, Centravet, Italy). Mice were anesthetized and implanted with a PCL 3D implant seeded with osteoblast microtissues. The samples were implanted between skin and muscles behind the mice ears. $n = 5$ mice were used. After 4 weeks of implantation, mice were sacrificed and the samples extracted for analysis.

Histological analysis. The implants were fixed with Bouin Hollande solution during 2 days. Then, they were dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations, cleared with toluene and embedded in paraffin wax. Sections were cut at 7 μm using a sledge microtome and mounted on glass slides. After the removal of paraffin wax, sections of subcutaneous implants were stained using Mallory coloration during 2 days. Number of experiments $n = 3$.

4. Conclusions

Here we report the development and therapeutic impact of advanced bone implants combining nanostructured biomaterials with cell microtissues. We suggest reconsidering the current tissue-engineering approach, by seeding cell microtissues instead of single cells onto scaffolds. By using nanofibrous scaffolds, we believe that this strategy could lead to a new generation of higher-quality engineered tissues, with accelerated production times and potentially lower costs. This concept is not limited to bone tissue engineering and might operate also for other tissues such as skin tissue engineering.

Acknowledgments: This work was supported by the project NanoOSCAR from the “Agence Nationale de la Recherche, ANR”. N.J., L.K., P.S. is indebted to SATT Conectus for the financial support. We are indebted to Hervé Gegout for his help on histology. We are indebted to Arielle Ferrandon for her technical support.

Author Contributions: Laetitia Keller, Quentin Wagner, Damien Offner and Sandy Eap have equally contributed to this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Salgado, A.J.; Coutinho, O.P. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 743–765. [CrossRef] [PubMed]
2. Chatterjea, A.; Meijer, G. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells Int.* **2010**, *2010*. [CrossRef] [PubMed]
3. Kim, H.N.; Jiao, A. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 536–558. [CrossRef] [PubMed]
4. Kale, S.; Biermann, S. Three-dimensional cellular development is essential for *ex vivo* formation of human bone. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 954–958. [PubMed]
5. Hench, L.L.; Polak, J.M. Third-generation biomedical materials. *Science* **2002**, *295*, 1014–1017. [CrossRef] [PubMed]
6. Mendoza-Palomares, C.; Ferrand, A. Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* **2012**, *6*, 483–490. [CrossRef] [PubMed]
7. Sell, S.; Barnes, C. Extracellular matrix regenerated: Tissue engineering via electrospun biomimetic nanofibers. *Polym. Int.* **2007**, *56*, 1349–1360. [CrossRef]
8. Facca, S.; Cortez, C. Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 3406–3411. [CrossRef] [PubMed]
9. Kelm, J.M.; Fussenegger, M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 195–202. [CrossRef] [PubMed]



© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Review

Active Nanomaterials to Meet the Challenge of Dental Pulp Regeneration

Laetitia Keller^{1,2,†}, Damien Offner^{1,2,3,†}, Pascale Schwinté^{1,2}, David Morand^{1,2},
Quentin Wagner^{1,2}, Catherine Gros^{1,2,3}, Fabien Bornert^{1,2,3}, Sophie Bahi^{1,2,3},
Anne-Marie Musset^{2,3}, Nadia Benkirane-Jessel^{1,2,3} and Florence Fioretti^{1,2,3,*}

Received: 28 August 2015 ; Accepted: 19 October 2015 ; Published: 5 November 2015

Academic Editor: Marco Salerno

- ¹ French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), Osteoarticular and Dental, Regenerative Nanomedicine, UMR 1109, Faculté de Médecine de l'Université de Strasbourg and FMTS, 11 rue Humann, Strasbourg 67000, France; lkeller@unistra.fr (L.K.); damien.offner@hotmail.fr (D.O.); pschwinte@unistra.fr (P.S.); davidnicolas.morand@gmail.com (M.D.); wagner.quentin@gmail.com (Q.W.); catherine-isabelle.gros@chru-strasbourg.fr (C.G.); bornertfabien@gmail.com (F.B.); sophie.bahi@wanadoo.fr (S.B.); nadia.jessel@inserm.fr (N.B.-J.)
- ² Faculté de Chirurgie Dentaire de l'Université de Strasbourg, 8 rue Ste Elisabeth, Strasbourg 67000, France; anne.marie.musset@chru-strasbourg.fr
- ³ Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), Université de Strasbourg, Strasbourg 67000, France
- * Correspondence: f.fioretti@unistra.fr; Tel.: +33-3-68-85-33-76
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: The vitality of the pulp is fundamental to the functional life of the tooth. For this aim, active and living biomaterials are required to avoid the current drastic treatment, which is the removal of all the cellular and molecular content regardless of its regenerative potential. The regeneration of the pulp tissue is the dream of many generations of dental surgeons and will revolutionize clinical practices. Recently, the potential of the regenerative medicine field suggests that it would be possible to achieve such complex regeneration. Indeed, three crucial steps are needed: the control of infection and inflammation and the regeneration of lost pulp tissues. For regenerative medicine, in particular for dental pulp regeneration, the use of nano-structured biomaterials becomes decisive. Nano-designed materials allow the concentration of many different functions in a small volume, the increase in the quality of targeting, as well as the control of cost and delivery of active molecules. Nanomaterials based on extracellular mimetic nanostructure and functionalized with multi-active therapeutics appear essential to reverse infection and inflammation and concomitantly to orchestrate pulp cell colonization and differentiation. This novel generation of nanomaterials seems very promising to meet the challenge of the complex dental pulp regeneration.

Keywords: regenerative nanomedicine; dental pulp; endodontic regeneration; electrospun nanofibrous membrane

1. Dental Pulp Vitality

The dental pulp located in the heart of the tooth (endodontic area) allows its vitality. The main endodontic tissue is a soft connective tissue that is well innervated and vascularized, and composed of collagen fibers, fibroblasts and dental stem cells. In its periphery, layers of odontoblasts are differentiated cells producing dentin. The whole pulp can sense the slightest mechanical, chemical and thermal stimuli and pulp cells can defend against various oral aggressions and microorganisms.

After a significant aggression, as any other connective tissue, the pulp responds with an inflammation process in order to eliminate pathogens and to allow repair. Due to its confinement in a hard chamber and its unique blood irrigation and lymphatic circulation, pulp inflammation (pulpitis)

is a complex and painful process that is difficult to control and dissipate. Generally, it results in pulp necrosis (Figure 1).

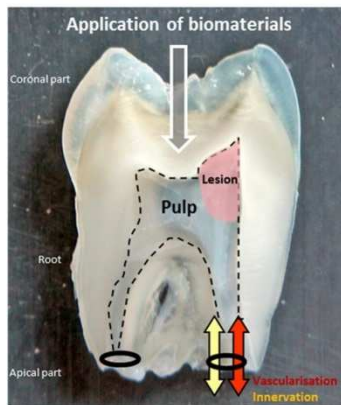


Figure 1. Section of an extracted tooth. The pulp is in the endodontic space delimited by the odontoblast layer (dotted line). Its inflammation is a complex process difficult to dissipate due to its confinement in a hard chamber and its unique blood irrigation and lymphatic circulation from the apical part. Biomaterials can be applied by the coronal side to regenerate the injured tissue of the lesion.

Pulpitis is often so painful and clinically irreversible that the surgical removal of the whole pulp from the tooth is required. All the cellular and molecular content is removed, whatever its regenerative potential, to be replaced by an inert polymer material (a natural latex named gutta percha), leaving the tooth without defenses.

This inflammation is considered to be clinically irreversible because to date there are not enough suitable biomaterials to properly control its different features.

The vitality of the pulp is so fundamental to the functional life of the tooth that new and smart biomaterials are required to avoid this current drastic treatment and to regenerate the lost endodontic tissues. Biomaterials functionalized through different nanotechnologies could be absolutely strategic [1].

2. Dental Pulp Regeneration

Regeneration of the pulp tissue is the dream of many generations of dental surgeons and will revolutionize clinical practice. The potential of regenerative medicine suggests that it would be possible to meet the challenge of this complex regeneration.

There are three crucial steps for this regeneration: (i) damaged tissues must be safely disinfected and all microorganisms must be eliminated by well-targeted antimicrobials [2]; (ii) the control of inflammation must occur at different levels of the tissue, meaning that the inflammatory phenotype of cells, the destructive exudation and damaged extracellular matrix must disappear; (iii) the regeneration of lost pulp tissue must take place, developing the type I collagen matrix with fibroblasts, innervation, vascularization and the odontoblast layer. For this final step, the endodontic regenerative active biomaterials must promote colonization and proliferation of the different competent cells at the tissue injury [1,3] (Figure 2).

The strategies of regeneration depend on the state of the dental pulp: the stage of inflammation and volume of damaged and infected tissues. For less important lesions, it is possible to perform an indirect or direct capping on the pulp with the biomaterials [4]. For more significant lesions, drilling to access the endodontic space is needed to apply the biomaterials in the coronal part or deeper in

the root pulp. When the tooth is immature, the induction of a calcified barrier becomes required to close the incompletely formed injured root (apexification). The most applied regenerative strategy is to encourage continuous physiological development and formation of the root, which means to promote apexogenesis [5].

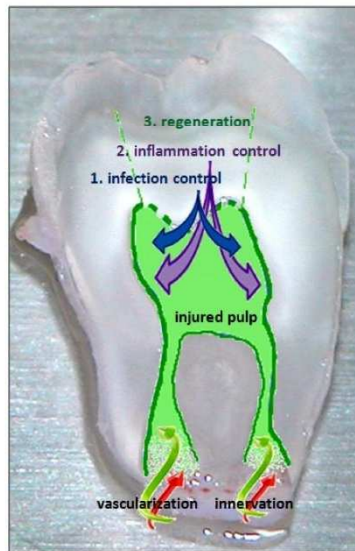


Figure 2. The three crucial steps of endodontic regeneration: (1) control of infection; (2) control of inflammation; and finally (3) regeneration of the injured pulp tissues: the type I collagen matrix with fibroblasts, innervation, vascularization and the odontoblast layer.

3. Regenerative Medicine for Dental Pulp

For dental pulp regeneration, a very promising procedure is root revascularization. After disinfection by local triple antibiotics, a broach is inserted into the root canal beyond its length in order to make the blood arise from the vessels of the surrounding bone to the root. Thus, by this procedure, teeth can recover vitality and apexification or apexogenesis can be obtained [6,7]. This procedure, providing clot fibrin and cells in the necrotic pulp tissue, needs to be supplemented by smart biomaterials in order to increase reproducibility and to promote a whole, well-orchestrated regeneration [8,9].

In order to carry the dental pulp regeneration, different kinds of postnatal stem cells have been isolated and studied from different tissues, including brain, skin, hair follicles, skeletal muscle, bone marrow and dental tissue [10,11]. Three types of dental mesenchymal stem cells were isolated and characterized: (i) from the pulp of permanent teeth, dental pulp stem cells (DPSC) [12]; (ii) from primary teeth, immature dental stem cells (IDPS) and stem cells of human exfoliated teeth (SHED) [13,14]; and (iii) from surrounding pulp tissues, periodontal ligament stem cells (PDLSC), stem cells from apical papilla (SCAP) and dental follicle progenitor cells (DFPC) [15–18].

The DPSC and the SHED are able to regenerate dental pulp [19,20]. The ability of SHED to differentiate *in vivo* into endothelial cells may contribute to pulp vascularization [21]. The SCAP showing capacity for dentin regeneration and for the expression of neurogenic markers can produce vascularized pulp-like tissue *in vivo* in root canals [16,22,23].

Procurement and multiplication of these dental stem cells is more complicated than for BMSC (bone marrow stem cells). When there is whole pulp necrosis, a lot of exogenous competent cells are needed [6,7,24]. Thus, adding proper nanomaterials supporting the exogenous cells can be very

interesting. Whatever the number of cells in the endodontic pulp, it is possible to get some autologous cells from the apical part of the tooth by the technique of root revascularization.

After a root revascularization of immature teeth, the SCAP may be responsible for the root edification and the more fragile DPSC remaining may contribute to pulp regeneration and differentiation into odontoblasts-like cells [25]. These capabilities of competent cells by the “cell homing” technique can be optimized by functionalized biomaterials. Nanomaterials specifically able to attract DPSC to the injured site from the healthy part of the pulp can also be very interesting to develop [6,7,19,20].

Some authors showed that SFD-1 (stromal cell-derived factor-1) and bFGF (basic fibroblast growth factor) are good molecules to induce this “cell homing” of DPSC [26]. PDGF (platelet-derived growth factor) and bFGF also promote the recruitment of local host competent cells for dental pulp regeneration [27].

The bone morphogenetic proteins also play an important role in the biology of pulp cells. Studies have shown that the expression of Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) is increased during terminal differentiation of odontoblasts and that BMP-7 promotes the formation of reparative dentin mineralization *in vivo* [28–30]. BMP-2 derived from dentin is required for the differentiation of SHED into odontoblasts [31]. The growth factors BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 and Gdf11 are important molecules for stem cell differentiation and their ability to induce dentinogenesis [28,32–34]. Expression of BMP receptors BMPR-IA, BMPR-IB and BMP-II was demonstrated on dental pulp cells as SHED, DPSC, and pulp fibroblasts [31]. Bone sialoprotein (BSP) is also important for stimulating the differentiation of pulp cells that are able to secrete mineralizable matrices after pulp exposure [30,35].

Enough nutriment and oxygen is critical for sustaining the activity of regenerative cells. To enhance neovascularization is a challenge for pulp regeneration considering the anatomical characteristics of endodontic confinement. Adding to the revascularization technique [6,7], different growth factors are able to promote vascular network formation. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a pro-angiogenic factor inducing stem cell differentiation into endothelial cells [21,36]. VEGF induces dental pulp stromal stem cells (DP-SC) to acquire endothelial cell-like features when they are cultured in a fibrin scaffold [37]. VEGF enhances the differentiation of SHED cultured in collagen lattices into vascular endothelial cells [21]. A case report shows that the root revascularization can be optimized by the endodontic use of PRP (platelet rich plasma) [38].

Whatever the competent cells selected, a biodegradable colorless scaffold is necessary to control their colonization and their regenerative activity. Some aberrant pulp mineralization was observed after endodontic injection of stem cells without scaffold. The probability of producing a new functional tissue pulp by exclusively injecting stem cells without matrix or signaling molecules is very low [1,39,40].

The most suitable for dental pulp regeneration are three-dimensional (3D) implantable or injectable scaffolds [1,19]. Pulp is a soft tissue protected mechanically by hard tissue, so a rigid scaffold is not necessary. The difficulty is the access to the narrow canals of the root. Thus, 3D implantable scaffolds must be flexible enough.

Several scaffolds have been studied [23,41]. Hydrogels of natural or synthetic polymers are suitable biomaterials for dental pulp regeneration because they can be injected and their water content offers a suitable viscosity and flexibility [3,27,41]. Self-assembled peptide hydrogels have been proposed [42]. A peptide matrix composed of multiple sequences of RADA (arginine-alanine-aspartate-alanine) has been shown to promote cell growth and differentiation of DPSC [11,43–45]. An injectable and light-curing drug delivery vehicle of Poly (Ethylene Glycol) Maleate Citrate (PEGMC) hydrogel was proposed for direct pulp capping and showed promising results with a proper cell viability and control of the calcium hydroxide incorporated [46]. Hyaluronic acid hydrogels show good results to carry endodontic regeneration but inhibit the innervation [47].

The quantity and the size of pores inside the hydrogels, crucial for diffusion of nutrients, active biomolecules, and cellular waste transport, are determined by the quantity and the size of the particles than can be incorporated [48]. The minimal size of pores for tissue regeneration must be 100 μm [49]. The influence of the size of the pores on proliferation and differentiation on dental pulp stem cells has been studied on poly(L-lactic acid) scaffolds [50]. Different technologies were proposed in order to create this favorable porosity in hydrogels [51]. The disadvantages in the use of hydrogels are the long fabrication process (particularly self-assembled peptide hydrogels) and the limited incorporation of nanofibers [52–55].

4. Nanomaterials for Dental Pulp Regeneration

Nanomaterials for dental pulp regeneration can be used alone, or with growth factors, drugs or stem cells. To build biomaterials at the nanoscale level is very crucial for dental pulp regeneration. It allows the concentration of many different functions in a small volume and presents the advantage of increasing the quality of targeting while controlling the cost and delivery of the active molecules.

These endodontic nanomaterials can be reservoirs of antibacterial and anti-inflammatory molecules and they deliver growth factors guiding the migration, proliferation, and differentiation of the different pulp cells: fibroblasts, vascular and nervous cells, and odontoblasts.

Nano-assemblies targeting the first step of dental pulp regeneration have been built with two polymers carrying an anti-inflammatory hormone: Poly-L-Lysine Dendrigraft (DGL), Poly-Glutamic Acid (PGA) and α -Melanocyte Stimulating Hormone (alpha MSH). PGA-alpha-MSH induces the reduction of inflammation of pulp connective tissue, acting on fibroblasts, monocytes and macrophages. DGLG4-PGA- α -MSH nano-assemblies promote the initiation of the regeneration of pulp connective tissue, providing adhesion and multiplication of pulp fibroblasts [56]. In endodontic infections, some bacteria always remain and can grow again. The long-term action of these reservoirs built by layer-by-layer nanotechnology could be needed to prevent inflammation aggravation and to let tissue regeneration occur [24].

Nanotechnologies also allow the construction of biomimetic scaffolds. Scaffolds of natural nanofibers are known to support endodontic regeneration. The root revascularization can be optimized by the use of type I collagen scaffolds [57]. Collagen scaffolds are appropriate for cell homing induced by FGF-b [26].

Nanofibrous and microporous membranes are very promising to promote dental pulp regeneration as a mimetic extracellular matrix [58]. By electrospinning, matrices of different synthetic and natural polymers are built, with nanofibers of diameters closest to the size of collagen nanofibers (50 to 500 nm). The electrospun randomized nanofiber network and the created micropores (diameter inferior to 100 μm) mimic the pattern of the connective tissue matrix [55,59] (Figure 3A). Electrospun matrices of PCL (poly(ϵ -caprolactone)) show favorable results for connective tissue regeneration [60,61]. The capacity of these matrices to be functionalized may also allow success in the different steps of the complex endodontic regeneration (Figure 3B).

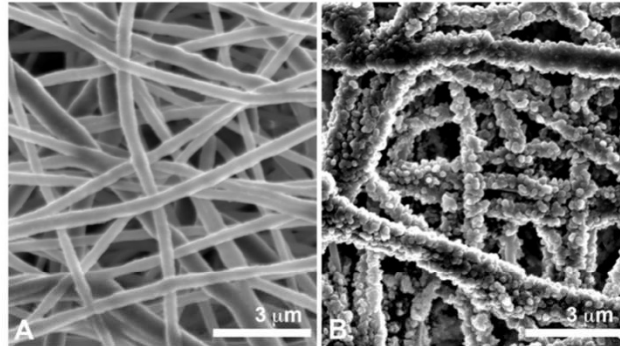


Figure 3. Scanning Electron Microscopy (SEM) observations. (A) Nanofibrous polycaprolactone membrane with an electrospun nanofiber network that mimics the pattern of the connective tissue matrix (B) Nanofibrous polycaprolactone membrane functionalized with nanoreservoirs of growth factors.

The functionalization by active molecules incorporated in scaffolds is the best drug delivery system. Different strategies of functionalization of electrospun nanofibers are possible: by plasma or wet chemical treatment, by surface graft polymerization, and by incorporation into the polymer solution to electrospin [62]. This last technique, named co-axial electrospinning, leads to an encapsulation of the bioactive molecule inside the nanofibers for a delayed action. Antioxidants and antibiotics were incorporated inside PCL nanofibers [63]. The association of electrospinning and electrospaying is used to functionalize nanofibers during their production. Nanofibers of PMMA (poly(methyl methacrylate)) were well functionalized by alpha acid lipoic or by sodium fluorides [64].

The strategy of functionalization of nanofibers by nanoreservoirs of BMP-2 or BMP-7 shows a great efficiency for bone regeneration and increases the differentiation of MSC (mesenchymal stem cell), accelerating the tissue regeneration *in vivo* [65–67].

Different nanofibrous microporous scaffolds provide an excellent environment for dentin regeneration. Electrospun PCL/gelatin scaffolds with nano-hydroxyapatite enhance the differentiation of DPSC towards an odontoblast-like phenotype [68]. Nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds functionalized by BMP-7 and dexamethasone promote dentin regeneration [69,70].

The mineralization of electrospun PCL scaffolds is particularly attractive for dentin tissue engineering by promoting the growth and odontogenic differentiation of HDPC (human dental pulp cells) [71]. The incorporation of mesoporous bioactive glass nanoparticles inside nanofibrous PCL-gelatin matrices also enhances this odontogenic differentiation of HDPC [72]. Nanofibrous gelatin/magnesium phosphate scaffolds provide a controlled release of metallic ions, which enhances dentin regeneration by DPSCs [73].

Nanofibrous PCL membranes are also suitable scaffolds for the regeneration of the bone-tooth unit. These nanomaterials functionalized with BMP-4 and Noggin increase bone tissue regeneration and favorably control the root development after an immature tooth implantation in a mice model [74]. Thus, they can be considered as the first promising nanomaterials for apexogenesis [75].

The functionalization of nanofibrous PCL membranes by NGF (neural growth factor) promotes innervation ascending from the root to the coronal part of the pulp *in vivo*, which is a particularly strategic point for dental pulp regeneration [76].

These electrospun nanofibrous scaffolds can also optimize the disinfection by local antibiotics. Electrospun nanofibrous scaffolds of polydioxanone containing two antibiotics of the revascularization technique (metronidazole and ciprofloxacin) [6,7] show their antimicrobial capacity and their cytocompatibility and constitute a biologically safe antimicrobial drug delivery system for endodontic regeneration [77,78].

5. Conclusion

Nanotechnologies optimize the distribution of active molecules and the extracellular mimetic structure of scaffolds. Thus, they appear essential to control/inhibit infection and inflammation and to orchestrate pulp cell colonization and differentiation. In the future, nanotechnologies would be able to build temporally and spatially controlled drug delivery systems of several crucial bioactive molecules. These multi-functionalized nanomaterials would help to meet the challenge of complex dental pulp regeneration.

Acknowledgments: We are indebted to Faculty of Dental Surgery (University of Strasbourg, UDS) for supporting Laetitia Keller, David Morand and Quentin Wagner. We thank Satt Conectus Alsace for supporting Pascale Schwinté.

Author Contributions: Laetitia Keller, Damien Offner, Anne-Marie Musset, Nadia Benkirane-Jessel and Florence Fioretti wrote the paper and answer to reviewers. Pascale Schwinté provided her expertise and references about electrospun scaffolds and hydrogels. David Morand and Quentin Wagner provided their expertise and references about bioactive molecules. Catherine Gros, Fabien Bornert and Sophie Bahi contributed to the figures.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Murray, P.E.; Garcia-Godoy, F.; Hargreaves, K.M. Regenerative endodontics: A review of current status and a call for action. *J. Endod.* **2007**, *33*, 377–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fouad, A.F. The microbial challenge to pulp regeneration. *Adv. Dent. Res.* **2011**, *23*, 285–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sun, H.H.; Jin, T.; Yu, Q.; Chen, F.M. Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering. *J. Tissue Eng. Reg. Med.* **2011**, *5*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Komabayashi, T.; Zhu, Q. Innovative endodontic therapy for anti-inflammatory direct pulp capping of permanent teeth with a mature apex. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* **2010**, *109*, 75–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lin, L.M.; Rosenberg, P.A. Repair and regeneration in endodontics. *Int. Endo. J.* **2011**, *44*, 889–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Iwaya, S.I.; Ikawa, M.; Kubota, M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent. Traumatol.* **2001**, *17*, 185–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Thibodeau, B.; Teixeira, F.; Yamauchi, M.; Caplan, D.J.; Trope, M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J. Endod.* **2007**, *33*, 680–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Reynolds, K.; Johnson, J.D.; Cohenca, N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: A case report. *Int. Endod. J.* **2009**, *42*, 84–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Simon, S.R.; Tomson, P.L.; Berdal, A. Regenerative endodontics: Regeneration or repair? *J. Endod.* **2014**, *40*, 267–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Volponi, A.A.; Pang, Y.; Sharpe, P.T. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 715–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Demarco, F.F.; Conde, M.C.; Cavalcanti, B.N.; Casagrande, L.; Sakai, V.T.; Nör, J.E. Dental pulp tissue engineering. *Braz. Dent. J.* **2011**, *22*, 3–13. [[PubMed](#)]
12. Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahim, J.; Robey, P.G.; Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 13625–13630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kerkis, I.; Kerkis, A.; Dozortsev, D.; Stukart-Parsons, G.C.; Gomes Massironi, S.M.; Pereira, L.V.; Caplan, A.I.; Cerruti, H.I. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* **2006**, *184*, 105–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Miura, M.; Gronthos, S.; Zhao, M.; Lu, B.; Fisher, L.W.; Robey, P.G.; Shi, S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 5807–5812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Seo, B.M.; Miura, M.; Gronthos, S.; Bartold, P.M.; Batouli, S.; Brahim, J.; Young, M.; Robey, P.G.; Wang, C.Y.; Shi, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **2004**, *364*, 149–155. [CrossRef]
16. Sonoyama, W.; Liu, Y.; Fang, D.; Yamaza, T.; Seo, B.M.; Zhang, C.; Zhang, C.; Liu, H.; Gronthos, S.; Wang, C.-Y.; *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE* **2006**, *1*. [CrossRef] [PubMed]
17. Sonoyama, W.; Liu, Y.; Yamaza, T.; Tuan, R.S.; Wang, S.; Shi, S.; Huang, G.T.-J. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study. *J. Endod.* **2008**, *34*, 166–171. [CrossRef] [PubMed]
18. Morsczeck, C.; Gotz, W.; Schierholz, J.; Zeilhofer, F.; Kuhn, U.; Mohl, C.; Sippl, C.; Hoffmann, K.H. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* **2005**, *24*, 155–165. [CrossRef] [PubMed]
19. Casagrande, L.; Cordeiro, M.M.; Nör, S.A.; Nör, J.E. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* **2011**, *99*, 1–7. [CrossRef] [PubMed]
20. Iohara, K.; Nakashima, M.; Ito, M.; Ishikawa, M.; Nakasima, A.; Akamine, A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J. Dent. Res.* **2004**, *83*, 590–595. [CrossRef] [PubMed]
21. Sakai, V.T.; Zhang, Z.; Dong, Z.; Neiva, K.G.; Machado, M.A.A.M.; Shi, S.; Santos, C.F.; Nör, J.E. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 791–796. [CrossRef] [PubMed]
22. Huang, G.T.; Gronthos, S.; Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* **2009**, *88*, 792–806. [CrossRef] [PubMed]
23. Huang, G.T.; Yamaza, T.; Shea, L.D.; Djouad, F.; Kuhn, N.Z.; Tuan, R.S.; Shi, S. Stem/progenitor cell-mediated *de novo* regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an *in vivo* model. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 605–615. [CrossRef] [PubMed]
24. Fioretti, F.; Mendoza-Palomares, C.; Avoaka-Boni, M.C.; Ramarosan, J.; Bahi, S.; Richert, L.; Granier, F.; Benkirane-Jessel, N.; Haikel, Y. Nano-odontology: Nanostructured assemblies for endodontic regeneration. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2011**, *7*, 471–475. [CrossRef] [PubMed]
25. Huang, G.T. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: Conservation of stem cells for regeneration. *J. Dent.* **2008**, *36*, 379–386. [CrossRef] [PubMed]
26. Suzuki, T.; Lee, C.H.; Chen, M.; Zhao, W.; Fu, S.Y.; Qi, J.J.; Chotkowski, G.; Eisig, S.B.; Wong, A.; Mao, J.J. Induced migration of dental pulp stem cells for *in vivo* pulp regeneration. *J. Dent. Res.* **2011**, *90*, 1013–1018. [CrossRef] [PubMed]
27. Kim, J.Y.; Xin, X.; Muioli, E.K.; Chung, J.; Lee, C.H.; Chen, M.; Fu, S.Y.; Koch, P.D.; Mao, J.J. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 3023–3031. [CrossRef] [PubMed]
28. Nakashima, M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol.* **1994**, *39*, 1085–1089. [CrossRef]
29. Nakashima, M.; Reddi, A.H. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1025–1032. [CrossRef] [PubMed]
30. Decup, F.; Six, N.; Palmier, B.; Buch, D.; Lasfargues, J.J.; Salih, E.; Goldberg, M. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin. Oral Investig.* **2000**, *4*, 110–119. [CrossRef] [PubMed]
31. Casagrande, L.; Demarco, F.F.; Zhang, Z.; Araujo, F.B.; Shi, S.; Nör, J.E. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 603–608. [CrossRef] [PubMed]
32. Rutherford, R.B.; Wahle, J.; Tucker, M.; Rueger, D.; Charette, M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol.* **1993**, *38*, 571–576. [CrossRef]
33. Jepsen, S.; Albers, H.K.; Fleiner, B.; Tucker, M.; Rueger, D. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *J. Endod.* **1997**, *23*, 378–382. [CrossRef]
34. Six, N.; Decup, F.; Lasfargues, J.J.; Salih, E.; Goldberg, M. Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2002**, *13*, 225–232. [CrossRef] [PubMed]

35. Six, N.; Lasfargues, J.J.; Goldberg, M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Biol.* **2002**, *47*, 177–187. [CrossRef]
36. Jazayeri, M.; Allameh, A.; Soleimani, M.; Jazayeri, S.H.; Piryaei, A.; Kazemnejad, S. Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol. Int.* **2008**, *32*, 1183–1192. [CrossRef] [PubMed]
37. Marchionni, C.; Bonsi, L.; Alviano, F.; Lanzoni, G.; Di Tullio, A.; Costa, R.; Montanari, M.; Tazzari, P.L.; Ricci, F.; Pasquinelli, G.; et al. Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2009**, *22*, 699–706. [PubMed]
38. Torabinejad, M.; Turman, M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: A case report. *J. Endod.* **2011**, *37*, 265–268. [CrossRef] [PubMed]
39. Bansal, R. Regenerative endodontics: A state of the art. *Indian J. Dent. Res.* **2011**, *22*, 122–131. [CrossRef] [PubMed]
40. Iohara, K.; Zheng, L.; Ito, M.; Ishizaka, R.; Nakamura, H.; Into, T.; Matsushita, K.; Nakashima, M. Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31⁺/CD146⁺ side population cells from a canine tooth. *Regen. Med.* **2009**, *4*, 377–385. [CrossRef] [PubMed]
41. Luo, Y.; Shoichet, M.S. A photolabile hydrogel for guided three-dimensional cell growth and migration. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 249–253. [CrossRef] [PubMed]
42. Galler, K.M.; Cavender, A.; Yuwono, V.; Dong, H.; Shi, S.; Schmalz, G.; Hartgerink, J.D.; D'Souza, R.N. Self-assembling peptide amphiphile nanofibers as a scaffold for dental stem cells. *Tissue Eng. Part A.* **2008**, *14*, 2051–2058. [CrossRef] [PubMed]
43. Misawa, H.; Kobayashi, N.; Soto-Gutierrez, A.; Chen, Y.; Yoshida, A.; Rivas-Carrillo, J.D.; Navarro-Alvarez, N.; Tanaka, K.; Miki, A.; Takei, J.; et al. PuraMatrixTM facilitates bone regeneration in bone defects of calvaria in mice. *Cell Transplant.* **2006**, *15*, 903–910. [CrossRef] [PubMed]
44. Narmoneva, D.A.; Oni, O.; Sieminski, A.L.; Zhang, S.; Gertler, J.P.; Kamm, R.D.; Lee, R.T. Self-assembling short oligopeptides and the promotion of angiogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4837–4846. [CrossRef] [PubMed]
45. Thonhoff, J.R.; Lou, D.I.; Jordan, P.M.; Zhao, X.; Wu, P. Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials *in vitro*. *Brain Res.* **2008**, *1187*, 42–51. [CrossRef] [PubMed]
46. Komabayashi, T.; Wadajkar, A.; Santimano, S.; Ahn, C.; Zhu, Q.; Opperman, L.A.; Bellinger, L.L.; Yang, J.; Nguyen, K.T. Preliminary study of light-cured hydrogel for endodontic drug delivery vehicle. *J. Invest. Clin. Dent.* **2014**. [CrossRef] [PubMed]
47. Kitamura, C.; Nishihara, T.; Terashita, M.; Tabata, Y.; Washio, A. Local regeneration of dentin-pulp complex using controlled release of FGF-2 and naturally derived sponge-like Scaffolds. *Inter. J. Dent.* **2012**, *2012*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
48. Puppi, D.; Chiellini, F.; Piras, A.M.; Chiellini, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 403–440. [CrossRef]
49. Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5474–5491. [CrossRef] [PubMed]
50. Conde, C.M.; Demarco, F.F.; Casagrande, L.; Alcazar, J.C.; Nör, J.E.; Tarquinio, S.B. Influence of poly-L-lactic acid scaffold's pore size on the proliferation and differentiation of dental pulp stem cells. *Braz. Dent. J.* **2015**, *26*, 93–98. [CrossRef] [PubMed]
51. Betz, M.W.; Yeatts, A.B.; Richbourg, W.J.; Caccamese, J.F.; Coletti, D.P.; Falco, E.E.; Fisher, J.P. Macroporous hydrogels upregulate osteogenic signal expression and promote bone regeneration. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1160–1168. [CrossRef] [PubMed]
52. Barnes, C.P.; Sell, S.A.; Boland, E.D.; Simpson, D.G.; Bowlin, G.L. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 1413–1433. [CrossRef] [PubMed]
53. Holzwarth, J.M.; Ma, P.X. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2011**, *32*, 9622–9629. [CrossRef] [PubMed]
54. Smith, I.O.; Liu, X.H.; Smith, L.A.; Ma, P.X. Nano-structured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1*, 226–236. [CrossRef] [PubMed]
55. Ma, P.X. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater. Today* **2004**, *7*, 30–40. [CrossRef]

56. Fioretti, F.; Mendoza-Palomares, C.; Helms, M.; Al Alam, D.; Richert, L.; Arntz, Y.; Rinckenbach, S.; Garnier, F.; Haïkel, Y.; Gangloff, S.C.; *et al.* Nanostructured assemblies for dental application. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3277–3287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Yamauchi, N.; Yamauchi, S.; Nagaoka, H.; Duggan, D.; Zhong, S.; Lee, S.M.; Teixeira, F.B.; Yamauchi, M. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *J. Endod.* **2011**, *37*, 390–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Albuquerque, M.T.; Valera, M.C.; Nakashima, M.; Nör, J.E.; Bottino, M.C. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *J. Dent. Res.* **2014**, *93*, 1222–1231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Beachley, V.; Wen, X. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 868–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Mendoza-Palomares, C.; Ferrand, A.; Facca, S.; Fioretti, F.; Ladam, G.; Kuchler-Bopp, S.; Regnier, T.; Mainard, D.; Benkirane-Jessel, N. Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* **2012**, *6*, 483–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Eap, S.; Morand, D.; Clauss, F.; Huck, O.; Stoltz, J.F.; Lutz, J.C.; Benkirane-Jessel, N.; Keller, L.; Fioretti, F. Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce bone. *Biomed. Mater. Eng.* **2015**, *25*, 79–85. [[PubMed](#)]
62. Yoo, H.S.; Kim, T.G.; Park, T.G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1033–1042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Huang, Z.M.; He, C.L.; Yang, A.; Zhang, Y.; Han, X.J.; Yin, J.; Wu, Q. Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2006**, *77*, 169–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Park, C.H.; Kim, K.H.; Lee, J.C.; Lee, J. *In-situ* nanofabrication via electrohydrodynamic jetting of countercharged nozzles. *Polym. Bull.* **2008**, *61*, 521–528. [[CrossRef](#)]
65. Ferrand, A.; Eap, S.; Richert, L.; Lemoine, S.; Kalaskar, D.; Demoustier-Champagne, S.; Atmani, H.; Mély, Y.; Fioretti, F.; Schlatter, G.; *et al.* Osteogenic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 45–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Li, G.; Zhang, T.; Li, M.; Fu, N.; Fu, Y.; Ba, K.; Deng, S.; Jiang, Y.; Hu, J.; Peng, Q.; *et al.* Electrospun fibers for dental and craniofacial applications. *Curr. Stem Cell. Res. Ther.* **2014**, *9*, 187–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Eap, S.; Keller, L.; Schiavi, J.; Huck, O.; Jacomine, L.; Fioretti, F.; Gauthier, C.; Sebastian, V.; Schwinté, P.; Benkirane-Jessel, N. A Living thick nanofibrous implant bi-functionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 1061–1075.
68. Yang, X.; Yang, F.; Walboomers, X.F.; Bian, Z.; Fan, M.; Jansen, J.A. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *93*, 247–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Wang, J.; Liu, X.; Jin, X.; Ma, H.; Hu, J.; Ni, L.; Ma, P.X. The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds *in vitro* and *in vivo*. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3856–3863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Wang, J.; Ma, H.; Jin, X.; Hu, J.; Liu, X.; Ni, L.; Ma, P.X. The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7822–7830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Kim, J.J.; Bae, W.J.; Kim, J.M.; Kim, J.J.; Lee, E.J.; Kim, H.W.; Kim, E.C. Mineralized polycaprolactone nanofibrous matrix for odontogenesis of human dental pulp cells. *J. Biomater. Appl.* **2014**, *28*, 1069–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Kim, G.H.; Park, Y.D.; Lee, S.Y.; El-Fiqi, A.; Kim, J.J.; Lee, E.J.; Kim, H.W.; Kim, E.C. Odontogenic stimulation of human dental pulp cells with bioactive nanocomposite fiber. *J. Biomater. Appl.* **2015**, *29*, 854–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Qu, T.; Jing, J.; Jiang, Y.; Taylor, R.J.; Feng, J.Q.; Geiger, B.; Liu, X. Magnesium-containing nanostructured hybrid scaffolds for enhanced dentin regeneration. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20*, 2422–2433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Keller, L.; Kuchler-Bopp, S.; Mendoza, S.A.; Poliard, A.; Lesot, H. Tooth engineering: Searching for dental mesenchymal cells sources. *Front. Physiol* **2011**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Kuchler-Bopp, S.; Bécavin, T.; Kökten, T.; Fioretti, F.; Benkirane-Jessel, N.; Keller, L. Nanostructured hybrid materials for bone-tooth unit regeneration. *Open J. Reg. Med.* **2013**, *2*, 47–52. [[CrossRef](#)]

76. Eap, S.; Bécavin, T.; Keller, L.; Kökten, T.; Fioretti, F.; Weickert, J.L.; Deveaux, E.; Benkirane-Jessel, N.; Kuchler-Bopp, S. Nanofibers implant functionalized by neural growth factor as a strategy to innervate a bioengineered tooth. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3*, 386–391. [CrossRef] [PubMed]
77. Palasuk, J.; Kamocki, K.; Hippenmeyer, L.; Platt, J.A.; Spolnik, K.J.; Gregory, R.L.; Bottino, M.C. Bimix antimicrobial scaffolds for regenerative endodontics. *J. Endod.* **2014**, *40*, 1879–1884. [CrossRef] [PubMed]
78. Bottino, M.C.; Kamocki, K.; Yassen, G.H.; Platt, J.A.; Vail, M.M.; Ehrlich, Y.; Spolnik, K.J.; Gregory, R.L. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J. Dent. Res.* **2013**, *92*, 963–969. [CrossRef] [PubMed]



© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Liste des publications et communications

A. Publications

- **Offner D.** Motiver et remotiver l'équipe soignante d'un cabinet dentaire à l'application des mesures d'hygiène par une expérience de pensée éthique. *Ethique & santé* 2013, 10:18-21 (**article 8, p.175**)
- **Offner D,** Deboscker S, Belotti L, Brisset L, Lavigne T, Musset AM. Elaboration et évaluation d'un protocole d'entretien des unités et fauteuils dentaire (ADEC® et Planmeca®) aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. *HygieneS* 2013, 21(2):21–28 (**article 6, p.145**)
- **Offner D,** Iltis L, Bertrand A, Musset AM. L'hygiène des tuyaux d'aspiration de l'unité dentaire, étude comparative de l'impact de leur structure et entretien. *L'Information Dentaire* 2015, 18:12-17 (**article 4, p.127**)
- **Offner D***, Keller L*, Wagner Q*, Eap S, Musset AM, Arruebo M, Kelm JM, Schwinté P, Benkirane-Jessel N. Integrating Microtissues in Nanofiber Scaffolds for Regenerative Nanomedicine. *Materials* 2015, 8:6863-6867 (**annexe C, p.223**)
- **Offner D***, Keller L*, Schwinté P, Morand D, Wagner Q, Gros CI, Bornert F, Bahi S, Musset AM, Benkirane-Jessel N, Fioretti F. Active nanomaterials to meet the challenge of dental pulp regeneration. *Materials* 2015, 8:7461-7471 (**annexe D, p.228**)
- **Offner D,** Strub M, Rebert C, Musset AM. Evaluation of an ethical method aimed at improving hygiene rules compliance in dental practice. *Am J Infect Control*, 2016 44(6):666-70 (**article 9, p.181**)
- **Offner D***, Wagner Q*, Idoux-Gillet Y*, Saleem I, Satyanarayana Somavarapu S, Schwinté P, Benkirane-Jessel N, Keller L. Nanostructured implant Combining Mesenchymal Cells and VEGF Nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization. *Nanomedicine (Lond)*, 2016 11:2419-30 (**article 2, p.85**)
- **Offner D,** Brisset L, Musset AM. Cleaning of dental handpieces : a method to test its efficiency, and its evaluation with a washer-disinfector-lubricator-dryer. *Dent Open J*, 2016 3(1):10-16 (**article 5, p.135**)
- **Offner D,** Fioretti F, Musset AM. Contamination of dental unit waterlines: assessment of three continuous water disinfection systems. *BDJ Open*, 2016, in press (**article 7, p.155**)

* ces auteurs ont contribué de manière égale à ce travail

B. Publications soumises

- **Offner D**, Wagner Q, Keller L, Benkirane-Jessel N, Musset AM. Complications d'une autogreffe osseuse, et comparaison avec une allogreffe osseuse ou l'utilisation de BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) : une revue systématique de la littérature. Le Journal de l'Orthopédie (**article 1, p. 51**)
- **Offner D***, Wagner Q*, Benkirane-Jessel N, Keller L. Collagen sponges as a support for vascularization for bone regenerative medicine. Bio-Medical Materials and Engineering (**article 3, p.99**)

* ces auteurs ont contribué de manière égale à ce travail

C. Publications en préparation

- **Offner D***, Wagner Q*, Benkirane-Jessel N, Keller L. Collagen sponges functionalized with heparin and VEGF nanoreservoirs to improve the quality and speed of bone regeneration.

* ces auteurs ont contribué de manière égale à ce travail

D. Communications orales

- **Offner D**. Contamination et entretien de l'unit dentaire. Congrès international de l'ADF, Paris, Novembre 2014
- **Offner D**. Une méthode éthique pour améliorer la compliance aux mesures d'hygiène. Congrès du Collège des chirurgiens-dentistes universitaires en Santé Publique, Montpellier, Mai 2016
- **Offner D**. Elaboration and evaluation of an ethical method aimed at improving hygiene rules compliance in dental practice. 17th World Congress on Oral Health and Dental Hygiene, Orlando, Novembre 2016

E. Communications affichées

- **Offner D**, Bigeard L, Bertrand A, Musset AM. Elaboration d'un protocole d'entretien des units et fauteuils dentaires (ADEC® et Planmeca®) pour une pratique plus sécurisée. Congrès du Collège des chirurgiens-dentistes universitaires en Santé Publique, Bordeaux, Mai 2013

- **Offner D**, Iltis L, Bertrand A, Musset AM. L'hygiène des tuyaux d'aspiration de l'unit dentaire : étude comparative de l'impact de leur structure, et entretien, Congrès du Collège des chirurgiens-dentistes universitaire en Santé Publique, Nice, Juin 2014
- **Offner D**, Bertrand A, Deboscker S, Musset AM. Protocole d'entretien et gestion de l'eau des units dentaires. 37èmes Journées Nationales d'Etudes sur la Stérilisation dans les Etablissements de Santé, Centre d'Etudes et de Formations Hospitalières (CEFH), Avril 2015
- **Offner D**, Brisset L, Musset AM. Internal and external cleaning of dental handpieces: a method to test its efficiency. 16th World Sterilization Congress, Lille, Octobre 2015
- **Offner D**, Brisset L, Musset AM. Le nettoyage des porte-instruments dynamiques dentaires : une méthode pour tester son efficacité, et son évaluation avec un laveur-désinfecteur-lubrificateur-sécheur. Congrès du Collège des chirurgiens-dentistes universitaires en Santé Publique, Montpellier, Mai 2016
- **Offner D**, Brisset L, Musset AM. Cleaning of dental handpieces : a method to test its efficiency, and its evaluation with a washer-disinfector-lubricator-dryer. 17th World Congress on Oral Care and Dental Hygiene, Orlando, Novembre 2016



Damien OFFNER

Régénération des lésions osseuses maxillo-faciales :
épidémiologie, stratégies innovantes
au service des patients,
qualité et réflexions éthiques



École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
S T R A S B O U R G

Résumé

Les traitements actuels des lésions osseuses, particulièrement dans le secteur maxillo-facial, ont aujourd'hui été éprouvés. A ce jour, seule la greffe autogène présente les propriétés biologiques et biomécaniques idéales, mais montre des inconvénients liés notamment à la présence d'un second site opératoire : douleurs chroniques post-opératoires, dysesthésies, infection... Certains comblements proposés actuellement ne permettent pas une néoformation vasculaire en leur sein, garante de la viabilité des tissus régénérés pour des lésions de taille importante. Il faut alors pouvoir développer des implants capables de fournir les caractéristiques recherchées, et trouver les moyens de lutter efficacement contre le risque infectieux.

Ce travail de thèse présente les résultats de recherches menées sur la fabrication d'implants nanofibreux mimant la MEC du tissu osseux, dotés d'une porosité favorable à une formation vasculaire, et pouvant être fonctionnalisés par des facteurs de croissance comme le VEGF, et par des cellules.

Ce travail propose également une réflexion éthique sur le développement de ces avancées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse d'une part, mais aussi sur leurs applications, afin de garantir que ces avancées constituent un réel progrès dans l'intérêt des patients.

De plus, ce travail de thèse montre qu'il est possible d'améliorer la sécurité des soins dans le traitement des lésions osseuses maxillo-faciales, par le développement d'équipements dans le champ de l'hygiène et par la mise en place de procédures visant à évaluer leur efficacité. Ces actions paraissent incontournables dans la mise en œuvre clinique des stratégies innovantes issues de l'ingénierie tissulaire.

Mots-clés : ingénierie tissulaire osseuse, régénération osseuse, hygiène, éthique, épidémiologie

Abstract

Current treatments of bone defects, especially in the maxillofacial sector, have now been proven. To date, only the autogenous graft presents the ideal biological and biomechanical properties but shows particular complications associated with the presence of a second surgical site: post-operative chronic pain, dysesthesia, infection... Some bone filling techniques that are currently available do not allow the formation of blood vessels, guaranteeing the sustainability of the regenerated tissue for large lesions. It is then necessary to develop implants in that way, and to find ways to fight effectively the risk of infection.

This work presents the results of research conducted on the fabrication of nanofibrous implants mimicking the ECM of bone tissue, with a porosity that is favorable to a vascular formation. These implants can be functionalized with growth factors such as VEGF, and cells.

This thesis also provides an ethical reflection on the development of these advances in the field of bone tissue engineering, but also on their applications, to ensure that these developments constitute a real progress in the interest of patients.

Moreover, this work shows that it is possible to improve the safety of care in the treatment of maxillofacial bone defects, with the development of equipment in the field of hygiene and the establishment of procedures to assess their effectiveness. These measures appear essential in the clinical implementation of innovative strategies developed by mean of tissue engineering.

Key words: bone tissue engineering, bone regeneration, hygiene, ethics, epidemiology