



**HAL**  
open science

# Influence de l'architecture macroporeuse en phosphate de calcium sur le comportement cellulaire in vitro

Shaan Chamary

► **To cite this version:**

Shaan Chamary. Influence de l'architecture macroporeuse en phosphate de calcium sur le comportement cellulaire in vitro. Autre. Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambresis, 2018. Français. NNT : 2018VALE0006 . tel-01822768v1

**HAL Id: tel-01822768**

**<https://theses.hal.science/tel-01822768v1>**

Submitted on 25 Jun 2018 (v1), last revised 4 Jul 2018 (v2)

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

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

**Thèse de doctorat**  
**Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de**  
**VALENCIENNES ET DU HAINAUT-CAMBRESIS**

Discipline :  
**Molécules et matières condensées (EA 2443)**

**Présentée et soutenue par Shaan CHAMARY.**  
**Le 20/02/2018, à Maubeuge**

**École doctorale :**  
Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement (SMRE)

**Équipe de recherche, Laboratoire :**  
Laboratoire des Matériaux Céramiques et Procédés Associés (LMCPA)  
Bone lab, Faculty of Dental Medicine of the University of Porto - Portugal.

**INFLUENCE DE L'ARCHITECTURE MACROPOREUSE EN PHOSPHATE DE**  
**CALCIUM SUR LE COMPORTEMENT CELLULAIRE IN VITRO**

**JURY**

**Rapporteurs**

- CHAMPION, Eric. PU, Université de Limoges.
- COMBES, Christèle. PU, Institut National Polytechnique de Toulouse

**Examineurs**

- CAMBIER, Francis. PU, secrétaire de l'ECERS (président du jury)
- CHAI, Feng. Ingénieur de recherche, Université de Lille 2
- HORNEZ, Jean-Christophe. MCU, HDR, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambresis (co-directeur de thèse)
- MONTEIRO, Fernando-Jorge. PU, Instituto de Engenharia Biomédica, Porto (co-directeur de thèse)

**Invités**

- BOUCHART, Franck. MCU, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambresis (co-encadrant de thèse)
- LERICHE, Anne. PU, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambresis



## Résumé

Les phosphates de calcium tels que le  $\beta$ -TCP sont utilisés depuis des décennies comme substitut osseux synthétique. Leurs bonnes propriétés chimiques et leur comportement analogue au tissu osseux *in vivo* et *in vitro* peuvent être améliorés par la technique de mise en forme employée. Il est aujourd'hui largement admis qu'une architecture poreuse optimisée aura un impact positif sur la bioactivité du matériau. Cette étude vise à étudier les liens existant entre une structure macroporeuse en  $\beta$ -TCP et la prolifération et différenciation cellulaire. Le  $\beta$ -TCP est fabriqué par précipitation aqueuse. Les paramètres de synthèse sont optimisés afin d'avoir un produit répondant aux normes ISO 13175 et 13779. Trois méthodes de mise en forme ont été choisies pour leur aptitude à générer une macroporosité originale. L'imprégnation d'une structure polymérique par une suspension génère un réseau de pores sphériques (PS), la stéréolithographie génère des pores cubiques interconnectés (3D) et la congélation orientée produit un réseau de pores tubulaires ellipsoïdaux parallèles au sens de la congélation (CO). Deux tendances émergent des cultures de cellules souches mésenchymateuses humaines: PS et 3D favorisent la prolifération alors que CO favorise la pénétration cellulaire et l'activité de la phosphatase alcaline. Cette dernière est favorisée par le  $\beta$ -TCP et cette aptitude est améliorée par la congélation orientée. Cela pourrait s'expliquer par l'état d'avancement de la différenciation cellulaire: les cellules sur les échantillons CO semblent être à un stade de différenciation plus avancé. Des essais complémentaires sur l'expression de gènes clés sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

Mots clés: phosphates de calcium,  $\beta$ -TCP, macroporeux, stéréolithographie, congélation orientée, imprégnation d'une préforme polymérique par une suspension céramique, cellule souche mésenchymateuse humaine, différenciation cellulaire, *in vitro*.

## Abstract

Calcium phosphates such as  $\beta$ -TCP have been used for decades as synthetic bone substitutes. Its good chemical properties and its similar behavior to that of the bone *in vivo* and *in vitro* can be enhanced by the chosen shaping method. It is nowadays largely accepted that an optimized porous architecture will have a positive impact on the material's bioactivity. This study aims at studying the links between a porous architecture and cell proliferation and differentiation.  $\beta$ -TCP was manufactured by aqueous precipitation. Synthesis parameters were optimized in order to get a product complying with ISO 13779 and 13175 requirements. Three shaping methods were chosen for their ability to generate original structures. The impregnation of a polymeric scaffold yields a network of interconnected spherical pores (PS), stereolithography yields a network of interconnected cubical pores (3D) and ice templating yields a network of parallel ellipsoidal channel-like structure (CO). Two different trends emerged from the human mesenchymal stem cell culture: PS and 3D favored cell proliferation whereas CO promoted cell penetration and alkaline phosphatase activity. The latter is stimulated by  $\beta$ -TCP and this ability is enhanced by freeze casting. This could be explained by the state of cell differentiation: cells on CO samples seem to be far more differentiated than the other ones. However the study of key genes expression is needed to confirm this hypothesis.

Key words: calcium phosphate,  $\beta$ -TCP, stereolithography, ice templating, impregnation of a polymeric scaffold with a suspension, human mesenchymal stem cell, cell differentiation, *in vitro*.

**“Sometimes science is more art than science. A lot of people don’t get that.”**

**Rick Sanchez.**

## Remerciement.

Ce travail a été effectué au sein des locaux du Laboratoire des Matériaux Céramiques et Procédés Associés dans le cadre d'un co-financement entre la région Hauts de France et la société Valutec. Je souhaiterais remercier, Monsieur Jean Christophe HORNEZ pour cette opportunité et de m'avoir accompagné et guidé tout le long de cette thèse. De plus je souhaiterais remercier messieurs Fernando MONTEIRO, Professeur de l'université de Porto et co-directeur de cette thèse et Monsieur Franck BOUCHART, Maître de conférences de l'université de Valenciennes et co-encadrant de m'avoir accompagné et aidé durant ce travail. Je souhaite exprimer ma gratitude envers Madame Anne LERICHE, professeur de l'université de Valenciennes, membre du jury et directrice du laboratoire au moment de mon recrutement, de m'avoir ouvert les portes du laboratoire et soutenu tout le long de ce travail. J'aimerais poursuivre en remerciant Madame Christèle COMBES, Maître de conférences de l'université de Toulouse et Monsieur Éric CHAMPION, Professeur de l'université de Limoges de m'avoir fait l'honneur d'endosser le rôle de rapporteur. J'aimerais aussi remercier Madame Feng CHAI, Ingénieur d'étude à l'université de Lille d'avoir accepté de faire partie du jury. Merci à Monsieur Pascal LAURENT, responsable de la cellule transfert et valorisation, Valutec, pour le soutien financier de ce travail. Merci au JECS trust et au COST pour avoir financé mes déplacements au Portugal.

Je souhaiterais aussi remercier Madame Maria Helena FERNANDES, professeur de l'université de Porto, Portugal pour m'avoir chaleureusement accueillie dans son laboratoire à Porto. Je souhaiterais aussi remercier l'équipe technique portugaise et plus particulièrement Liliana GRENHO pour sa gentillesse et son expertise en culture cellulaire.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de la Belgian Ceramic Research Center en Belgique notamment, Messieurs Francis CAMBIER, directeur du BCRC et membre du jury, Dominique HAUTCOEUR, Laurent BOILET et Stéphane HOCQUET. Un grand merci aux techniciens qui m'ont assisté pour mes essais au BCRC.

Merci à Monsieur Vincent HORNEZ et sa société CryoCeram pour la fabrication des pièces et son expertise dans le domaine de la stéréolithographie.

J'aimerais en profiter pour remercier Monsieur Michel DESCAMPS, ancien Ingénieur de recherche, pour m'avoir introduit au monde de la céramique et Monsieur Hugues JOIRE, ancien technicien du laboratoire pour son aide, ses conseils et sa bonne humeur.

Je tiens aussi à remercier, pour leur aide, leur bonne humeur et les midis bière/fromage, l'ensemble de l'équipe du laboratoire : Benoit, Hilda, Carole, Mimi, Gégé, Rudy, Rémy, Mélanie, Éric, Yannick, Christelle, Mohamed, Jeff, Florian et Florian C. Un grand merci aux doctorants, notamment Mélanie, Marion, Kurt, Ghailen et Hugo.

Pour finir, j'aimerais remercier mes amis et colocataires (un peu gogol!) du 1 bis/GPC qui ont toujours su me faire oublier les tracas et travers du quotidien.

Enfin, je tiens à remercier mes parents et ma sœur pour leur affection et le soutien sans faille qu'ils m'apportent.

Merci à la musique lourde.

# Sommaire

Liste des abréviations.....	1
Introduction .....	4
Chapitre 1 : Étude bibliographique.....	9
1. Le tissu osseux.....	9
1.1. Classifications du tissu osseux .....	9
1.2. Composantes du tissu osseux .....	11
1.3. L'ostéogénèse .....	15
1.4. Différenciation ostéoblastique et ses marqueurs.....	20
1.5. Conclusion.....	24
2. Les substituts osseux en phosphates de calcium .....	26
2.1. Caractéristiques générales .....	26
2.2. Procédés de synthèse .....	28
2.3. Conclusion.....	32
3. La porosité.....	33
3.1. Impact de la porosité.....	34
3.2. Conclusion.....	44
4. Comportement du matériau en milieu physiologique.....	46
4.1. Le phosphate tricalcique beta .....	47
4.2. Conclusion.....	48
5. Procédés de mise en forme .....	49
5.1. Imprégnation d'une préforme en PMMA par une suspension de $\beta$ -TCP.....	53
5.2. Congélation orientée.....	57
5.3. Stéréolithographie.....	62
5.4. Conclusion.....	65
Chapitre 2 : Méthodes expérimentales, caractérisation et mise en forme du matériau.....	67
1. Synthèse, contrôles et caractérisation de la poudre.....	67
1.1. Synthèse par voie humide .....	67
1.2. Contrôles et caractérisations.....	68

1.3. Récapitulatif .....	82
2. Mise en forme de la poudre .....	83
2.1. Imprégnation d'une préforme en PMMA par une suspension.....	83
2.2. Congélation orientée.....	87
2.3. Stéréolithographie.....	89
2.4. Caractérisations des macroporeux.....	90
Chapitre 3 : Culture cellulaire et évaluation biologique .....	95
1. Matériels et méthodes expérimentales .....	95
1.1. Culture cellulaire .....	95
1.2. Étude de la morphologie des CSMH .....	96
1.3. Prolifération cellulaire et activité métabolique .....	97
1.4. Activité protéique : la phosphatase alcaline .....	98
2. Résultats .....	99
2.1. Étude de la morphologie cellulaire .....	101
2.2. Prolifération cellulaire.....	108
2.3. Activité protéique .....	109
Discussion et perspectives .....	112
Conclusions.....	116
Bibliographie .....	118
Normes .....	131
Liste des figures .....	132
Liste des tableaux .....	136
Annexes .....	138
1. Fiche signalétique du nitrate de calcium tetrahydraté.....	138
2. Fiche signalétique de l'hydrogénophosphate de diammonium .....	140
3. Pesée hydrostatique .....	141
4. Correction d'Abercrombie .....	142
5. Micrographies MEB .....	143
6. Liste des communications et publication .....	158



## Liste des abréviations

% m.: pourcentage massique

% vol.: pourcentage volumique

3D: échantillon obtenu par stéréolithographie

$\alpha'$ -TCP : phosphate tricalcique  $\alpha'$

$\alpha$ -MEM: milieu essentiel minimum alpha

$\alpha$ -TCP : phosphate tricalcique  $\alpha$

$\beta$ -TCP : phosphate tricalcique  $\beta$

ALP: phosphatase alcaline

ARNm: acide ribonucléique messenger

ATCP : phosphate tricalcique amorphe

ATG/ATD : analyse thermique gravimétrique/analyse thermique différentielle

BCP: phosphate de calcium biphasique, mélange d'HA et  $\beta$ -TCP

BET: théorie Brunauer, Emmett et Teller (Surface spécifique)

BMP(s): protéines de la morphogénétiques osseuses

CD 105, 146, 90, 45 et 44 : cluster de différenciations 105, 146, 90, 45 et 44

CO1, 4 et 7: échantillons obtenus par congélation orientée

CSMH: cellule souche mésenchymateuse humaine

D CPA : phosphate dicalcique anhydre

D CPD : phosphate dicalcique dihydraté

DRX : diffraction des rayons X

FGF: facteur de croissance des fibroblastes

FT-IR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

HA ou HAp : hydroxyapatite

ICP : spectrométrie à plasma à couplage inductif

Ks: produit de solubilité

MCPA : phosphate monocalcique anhydre

MCPM : phosphate monocalcique monohydraté

MEB : microscopie électronique à balayage

MEC: matrice extra cellulaire

MG63 : ostéoblastes MG63

MTT : sel de tetrazolium

OCP : phosphate octocalcique

PBS : tampon phosphate salin

PDGF: facteur de croissance dérivé des plaquettes

PEG : poly (éthylène glycol)

PLA: poly (acide lactique)

PMMA: poly (méthacrylate de méthyle)

PNP : para nitrophénol

PNPP : para nitrophényl de phosphate

PS: échantillon obtenu par imprégnation d'une préforme par une suspension stable

PTH: hormone para thyroïdienne

Ra : terme correspondant à la moyenne des valeurs absolues entre le profil et la ligne moyenne de ce profile. Il permet de caractériser la rugosité d'une surface.

RFU: unité de fluorescence relative

tpm: tours par minute

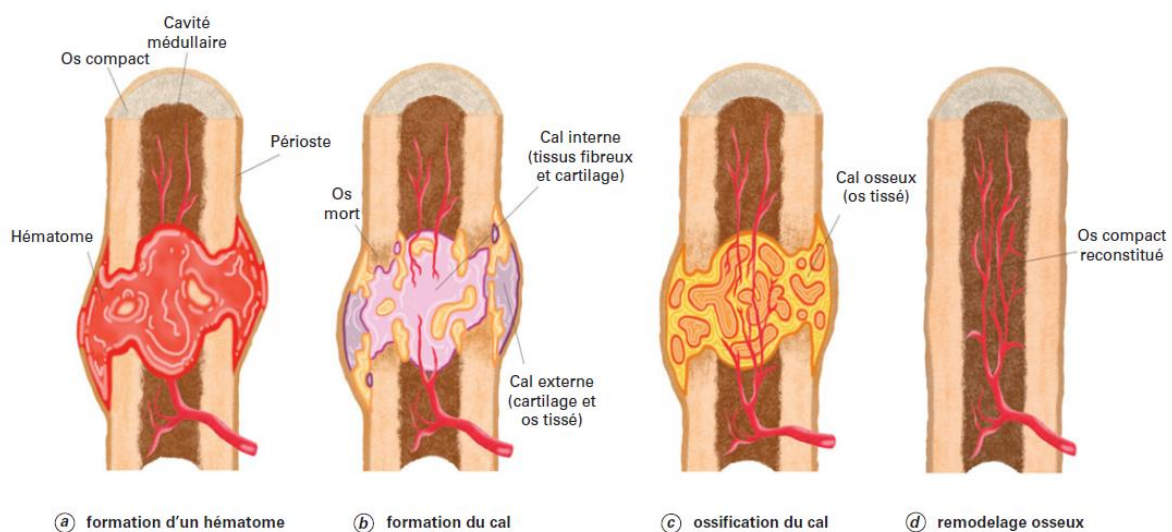
TTCP : phosphate tétracalcique

VEGF: facteur de croissance de l'endothélium vasculaire



## Introduction

De nombreux tissus de l'organisme, tels que les os, possèdent la capacité de se régénérer, de s'auto-réparer. En effet, suite à une lésion, comme une fracture, une réaction en chaîne est déclenchée afin de rétablir la continuité et les fonctions de l'os lésé. D'un point de vue biologique, la réparation osseuse est initiée par une réaction inflammatoire locale dont le but est de nettoyer la plaie. Cette dernière stimule l'angiogenèse<sup>1</sup> et le recrutement de cellules ostéocompétentes. Ce phénomène est appelé ostéoinduction<sup>2</sup> (ALB01). Le tout est suivi par une chaîne d'évènements, à l'origine de la formation d'un tissu ostéoïde, le cal osseux, qui sera par la suite minéralisé et remodelé par la composante cellulaire de l'os : c'est l'ostéoconduction<sup>3</sup> (Figure 1).



**Figure 1. Étapes de cicatrisation osseuse à la suite d'une fracture (DES15)**

Dans la plupart des cas, cette aptitude du tissu osseux à s'auto-réparer est suffisante pour que le rôle du praticien soit limité à la réduction de la fracture et à l'immobilisation de la zone lésée dans les positions physiologiques grâce à un plâtre et/ou à des éléments d'ostéosynthèse. Cependant ce n'est pas toujours le cas, si les conditions ne sont pas favorables, la réparation osseuse sera retardée, compromise ou tout simplement impossible.

<sup>1</sup> Angiogenèse : croissance de nouveaux vaisseaux sanguins par bourgeonnement à partir de vaisseaux préexistants.

<sup>2</sup> Ostéoinduction : processus de recrutement et de stimulation de cellules souches permettant leur orientation vers la lignée cellulaire ostéoblastique ce qui, *in fine*, conduit à une néoformation osseuse et ce même dans une zone ectopique.

<sup>3</sup> Ostéoconduction : propriété passive d'une surface à recevoir la repousse osseuse par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu receveur au contact de ce matériau.

Le Tableau 1 fait état des différents paramètres dépendants ou indépendants du patient pouvant avoir un impact négatif éventuel sur la réparation osseuse.

<b>Facteurs de risques</b>	
<b>Dépendant du patient</b>	<b>Indépendant du patient</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Âge</li> <li>• Sexe</li> <li>• Hygiène de vie (tabac, alcool...)</li> <li>• Maladie génétique</li> <li>• Maladie métabolique: diabète, maladie vasculaire, etc.</li> <li>• Déficiences nutritionnelles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infection</li> <li>• Qualité de la réduction de la fracture et de sa stabilisation</li> <li>• Géométrie de la fracture</li> <li>• Taille de la fracture, importance de la perte osseuse</li> <li>• Type de fracture: ouverte ou pas</li> </ul>

**Tableau 1. Récapitulatif des facteurs de risques à l'origine d'une réparation osseuse compromise (HAK14)**

Afin de pallier une perte de matière osseuse trop importante, le praticien a comme seul recours, la greffe. Dans un rapport sorti en 2013 (HAS13), la Haute Autorité de Santé comptabilise en France, en 2011, un peu moins de 43000 substituts osseux posés dans des établissements publics. Environ 60 % des implants sont d'origine synthétique. Toutefois, ces chiffres ne prennent pas en compte les substituts utilisés en dentisterie. Les principales applications sont les suivantes : les maladies du système ostéoarticulaire (arthrose) et les traumatismes (fractures). On peut rajouter à cette liste, mais dans une moindre mesure, les maladies liées au système nerveux, aux tumeurs, aux malformations congénitales, aux maladies de l'oreille et de l'apophyse mastoïdienne (partie de l'os temporale).

La technique de référence actuelle, le *gold standard*, est l'autogreffe. Cette technique consiste à prélever le greffon chez le patient lui-même. Le principal site de prélèvement est la crête iliaque, cependant, des prélèvements peuvent aussi être effectués au niveau des côtes flottantes et de la fibula. Ce greffon a l'avantage d'être histocompatible, non immunogène, ostéoinducteur et ostéoconducteur. Cependant de nombreux inconvénients sont inhérents à cette technique (LER09). On compte tout d'abord, 2 sites d'intervention : le site de prélèvement et le site d'implantation. Cela implique une intervention contraignante qui débouche très souvent sur des séjours hospitaliers prolongés et donc un coût associé, plus élevé. Cette technique est limitée par la qualité et la quantité de matière osseuse pouvant être prélevée. En effet, la qualité du greffon ne peut être garantie, on note ainsi une morbidité qui touche à la fois ce dernier et son site de prélèvement. Il existe aussi un risque d'atteinte nerveuse ce qui peut dans certains cas, déboucher sur des douleurs chroniques. Le prélèvement de matière va entraîner la fragilisation du site, augmentant ainsi les risques de fracture. Enfin dans certains cas une dégradation trop rapide du greffon va compromettre la guérison de la zone critique, *i.e.* le site d'implantation (GIA05).

Il existe, en marge de la méthode de référence, d'autres sources de substituts osseux :

- l'allogreffe, où le donneur et le receveur font partie de la même espèce mais sont 2 individus distincts ;
- la xéno greffe, où le donneur et le receveur ne font pas partie de la même espèce ;
- les substituts osseux synthétiques.

Dans le cas de l'allogreffe, les praticiens puisent dans des banques de tissus osseux. Les greffons proviennent de cadavres et subissent un traitement visant à éliminer les cellules ainsi que toutes les molécules organiques potentiellement immunogènes. Les greffons sont par la suite stérilisés. Toutefois des risques de transmission de maladies et des phénomènes de rejet sont toujours possibles.

Les xéno greffes du marché sont d'origine bovine et corallienne pour la plupart. Elles subissent comme les allogreffes un traitement visant à réduire leur potentiel immunogène et à les rendre stériles.

Les substituts osseux synthétiques sont issus de divers types de matériaux. On retrouve des produits fabriqués en polymères résorbables, tel que le poly (acide lactique) ou PLA et non résorbable tel que le poly (méthacrylate de méthyle) ou PMMA. On retrouve aussi parmi les synthétiques, des substituts à base de céramiques. On distingue au sein des céramiques 2 classes: les céramiques inertes telles que l'alumine ou la zircone et les céramiques bioactives telles que les bioverres, les vitrocéramiques et les phosphates de calcium. Toutefois, il existe un problème majeur concernant les substituts inertes qui subissent *in vivo* une encapsulation dans une coque fibreuse ne permettant plus aucune interaction avec l'organisme. La bioactivité, quant à elle, se caractérise par une interaction « positive » entre le matériau et son environnement immédiat. Le matériau initie chez l'organisme receveur une série de réactions favorisant son intégration aux tissus environnants, sans formation de coque fibreuse. Ce phénomène est aussi connu sous le nom d'ostéointégration. Hench (HEN71) fut le premier à noter cette interaction positive entre un bioverre ( $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ ) et le tissu osseux.

Les substituts osseux synthétiques permettent ainsi de réduire le nombre d'interventions sur le même patient, de prévenir la transmission de maladies et de limiter les phénomènes de rejets liés aux incompatibilités immunologiques. Un autre avantage de taille est la constance des propriétés physico-chimiques du matériau et leurs relatives abondances.

Les premiers substituts osseux avaient un rôle de soutien mécanique. Au fur et à mesure des découvertes et des changements de paradigmes scientifiques, l'élaboration des

substituts osseux s'est de plus en plus inspirée de la nature. Les céramiques phosphocalciques de par leurs compositions chimiques se sont vite imposées comme des matériaux de référence (Tableau 2).

Nom	Formule chimique	Utilisations
Hydroxyapatite (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Ciments, dépôts, céramiques, composites
Phosphate tricalcique $\beta$ ( $\beta$ -TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Ciments, biocéramique résorbable, composites
Phosphate monocalcique monohydraté (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4), \text{H}_2\text{O}$	En solution: phase liquide de certains ciments
Phosphate monocalcique anhydre (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	En solution : phase liquide de certains ciments
Phosphate dicalcique dihydraté (DCPD)	$\text{CaHPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	Ciments, dépôts, composites
Phosphate dicalcique anhydre (DCPA)	$\text{CaHPO}_4$	Ciments, dépôts, composites
Phosphate tricalcique amorphe ( $\alpha$ -TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2, \text{NH}_2\text{O}$	Ciments, dépôts, composites
Phosphate octocalcique (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2, 5\text{H}_2\text{O}$	Ciments
Phosphate tricalcique $\alpha$ ( $\alpha$ -TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Ciments, biocéramique résorbable, composites
Phosphate tétracalcique (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	Ciments

Tableau 2. Tableau récapitulatif des principaux phosphates de calcium utilisés comme biomatériaux (COM13) (BER15a)

Les phosphates de calcium, notamment l'hydroxyapatite (HA) et le phosphate tricalcique  $\beta$  ( $\beta$ -TCP), présentent une composition chimique très proche de celle de la phase minérale osseuse. En effet, l'os est une association de matériaux organiques et de matériaux minéraux essentiellement composés de phosphate et de calcium. On retrouve ces composés synthétiques dans le commerce sous forme de céramiques frittées, de revêtements (sur céramique ou métal) ou de composites. Ils s'utilisent, aujourd'hui, comme substituts permanents ou résorbables, dans ce dernier cas le matériau est progressivement remplacé par un tissu osseux néoformé.

Ces composés sont ostéoconducteurs et, pour certains, ostéoinducteurs. Leurs bonnes performances sont dues premièrement à leur composition chimique et deuxièmement à leurs caractéristiques morphologiques. Il est, aujourd'hui, largement admis qu'une architecture favorable va considérablement aider à la réparation osseuse. Par exemple, une macroporosité interconnectée a une influence sur la formation osseuse *in vivo* (KAR05) (MUR10). Des pores ouverts, de forme favorable, interconnectés et de dimensions adaptées vont favoriser la pénétration cellulaire et la circulation de fluides biologiques au sein de l'implant. D'autre part, mais à une échelle différente, la topographie d'un matériau a un impact sur le comportement cellulaire (SKO17) et notamment sa sensibilité envers les

molécules régulatrices (BOY98). C'est-à-dire, qu'une fois détectées par la cellule, les caractéristiques physiques du substrat vont être traduites par des changements de la biologie interne de celle-ci. Les cellules sont mécanosensibles (SKO17) (CUR97) et ce phénomène est connu sous le nom de la mécanotransduction. Il est donc possible d'améliorer le potentiel curatif d'un matériau grâce à une mise en forme adaptée.

Malgré l'abondance d'études sur l'impact d'une architecture poreuse sur la cellule, aucun consensus n'a été admis. En effet seules de grandes lignes se dégagent et elles ne permettent pas de garantir l'efficacité de l'implant dans toutes les situations envisageables.

Les objectifs de ce travail sont les suivants :

- fabriquer une poudre de céramique phosphocalcique répondant aux critères des normes encadrant l'utilisation de céramique comme biomatériaux ;
- mettre en forme cette poudre par des techniques permettant de générer une macroporosité interconnectée avec des caractéristiques architecturales spécifiques et originales ;
- évaluer, *in vitro*, d'un point de vue biologique les échantillons, *i.e.* étudier l'impact de l'architecture sur le comportement cellulaire.

Ce travail s'articule autour de 4 chapitres. Le premier chapitre de ce travail est une revue bibliographique. Elle se focalisera sur le tissu osseux, ces propriétés chimiques, histologiques et biologiques. Les phosphates de calcium, leurs méthodes de synthèse ainsi que leurs propriétés physico-chimiques seront aussi passées en revue. L'importance de la porosité sera traitée au même titre que les différentes méthodes de mise en forme qui permettent de générer des céramiques macroporeuses. Le deuxième chapitre fera l'objet de la synthèse et du contrôle de la poudre céramique et de sa mise en forme. Le troisième chapitre détaillera les tests biologiques et leurs résultats. Enfin, j'aborderai la discussion des résultats, les perspectives d'études et la conclusion.



# Chapitre 1 : Étude bibliographique

## 1. Le tissu osseux

D'un point de vue des sciences des matériaux, le tissu osseux est un assemblage de nanocomposites minéraux et organiques formant une structure hiérarchisée multi-échelle. D'un point de vue biologique, l'os est un tissu conjonctif spécialisé caractérisé par la présence de minéral riche en calcium et en phosphate. C'est-à-dire qu'on y trouve des cellules séparées les unes des autres par une matrice extracellulaire (MEC) minéralisée. C'est un assemblage complexe de macromolécules secrétées localement par les cellules. En plus d'avoir un rôle de soutien, elle joue un rôle complexe dans la régulation de l'activité cellulaire. La MEC du tissu osseux est composée d'une phase polymérique essentiellement constituée de fibres dures : le collagène de type I. La composante minérale est constituée d'un phosphate de calcium apatitique de structure hexagonale fortement lacunaire.

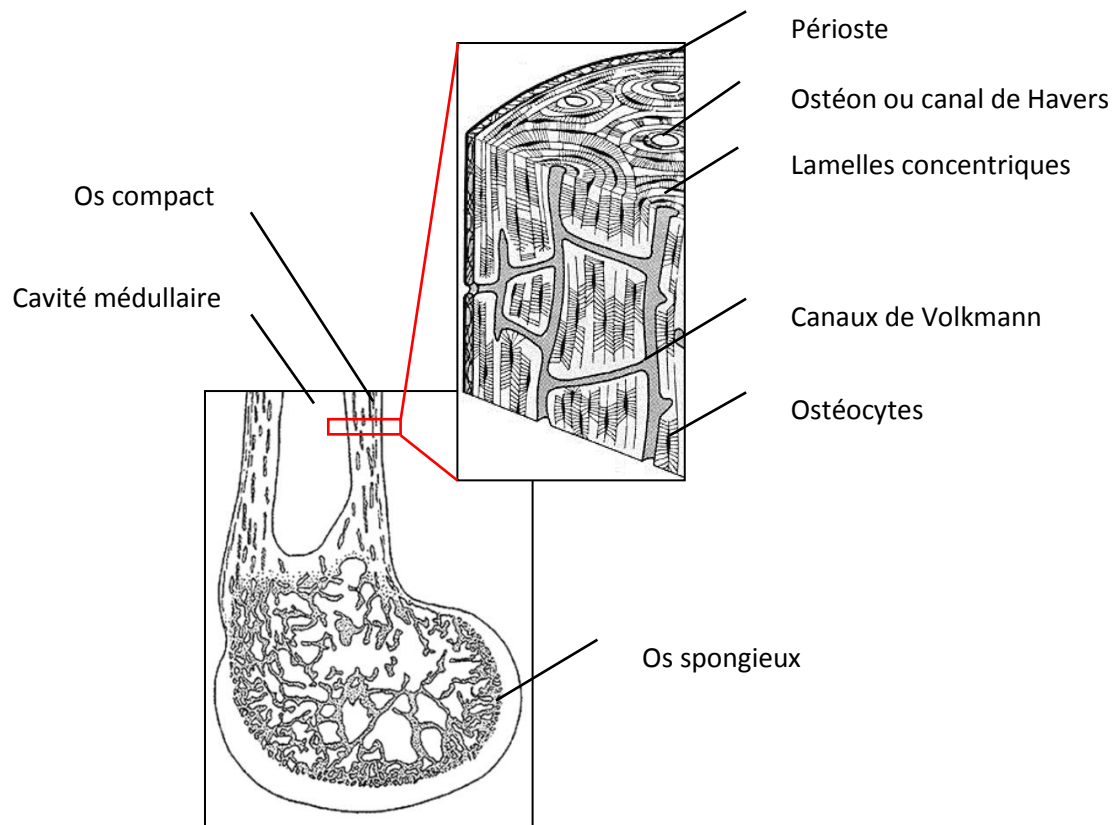
L'assemblage des os forme le squelette qui a un rôle de soutien et de protection. De plus, l'os joue un rôle métabolique important : son remodelage constant permet de maintenir l'homéostasie ionique de l'organisme notamment de minéraux essentiels à la vie tels que le calcium, le phosphore et le magnésium. La moelle osseuse, contenue dans les os, participe à la fonction hématopoïétique, *i.e.* la production de cellules sanguines et immunitaires.

### 1.1. Classifications du tissu osseux

Macroscopiquement, on distingue 2 types d'os (LAU10):

- l'os trabéculaire ou spongieux caractérisé par 30 à 90 % de porosité et des pores de 200 à 600  $\mu\text{m}$  de diamètre ;
- l'os cortical ou compact caractérisé par 5 à 30 % de porosité et des pores de 10 à 50  $\mu\text{m}$  et de 100 à 300  $\mu\text{m}$  de diamètre.

On retrouve l'os trabéculaire au niveau des os plats (sternum, scapula...) et aux extrémités des os longs (tibia, fémur...). La porosité osseuse est interconnectée et elle contient, au même titre que la cavité médullaire, la moelle osseuse (Figure 2). L'os compact est composé de différentes structures: les canaux de Havers dans lesquels se trouvent des capillaires sanguins ( $\approx 50 \mu\text{m}$  de diamètre) et les canaux de Volkmann, perpendiculaires au système haversien et dans lesquelles sont présents nerfs et capillaires sanguins. L'os est un tissu richement vascularisé. Les lamelles concentriques autour du canal d'Havers forment l'ostéon. L'os est recouvert d'une enveloppe extérieure exclue des sites d'insertion des tendons ou des ligaments : le périoste.



**Figure 2. Schéma d'une coupe sagittale d'une extrémité d'os long et d'un fragment d'os compact**

Toutefois d'autres classifications existent. Le tissu osseux peut être classé en fonction de la disposition des fibres de collagène :

- l'os fibreux réticulé: os immature contenant des fibres aléatoirement organisées. Cet os de faible résistance est retrouvé chez le fœtus et lors de la guérison d'une fracture ;
- l'os fibreux fasciculé : les fibres de collagène sont organisées en fagots et se confondent avec les fibres des ligaments et des tendons ;
- l'os lamellaire : os mature dans lequel les fibres de collagène sont organisées en lamelles concentriques, les ostéons.

Le tissu osseux peut aussi être classé en fonction de son origine embryologique:

- endomembraneuse : voir page 16 ;
- endochondrale : voir page 16.

La dernière classification abordée est celle qui se base sur le moment d'apparition du tissu:

- primaire : tissu osseux fibreux réticulé embryonnaire ;
- secondaire ou de renouvellement : tissu dans lequel les fibres de collagènes sont davantage orientées ;

- tertiaire : tissu issu du remodelage du tissu osseux secondaire et est caractérisé par l'apparition de canaux de Havers.

## 1.2. Composantes du tissu osseux

### 1.2.1. La composante cellulaire

Le tissu osseux n'est pas immuable, il est en remodelage constant. À l'origine de cette dynamique on retrouve de nombreuses cellules. Ces cellules ont des fonctions et des origines différentes (KAR04) (AUB01) :

- les cellules souches mésenchymateuses ou CSMH sont des cellules pluripotentes. En fonction des stimuli, une cellule mésenchymateuse peut devenir un ostéoblaste (cellule osseuse), un myoblaste (cellule musculaire), un chondroblaste (cellule du cartilage) ou un adipocyte (cellule graisseuse). Chaque voie de différenciation est sous-tendue par une cascade de réactions biologiques qui lui est propre ;
- les ostéoblastes sont des cellules actives de forme cubique. Le noyau est excentré et le cytoplasme compte de nombreux organites<sup>4</sup> impliqués dans la synthèse et la sécrétion de molécules de la MEC telles que les collagènes. L'ostéoblaste est régulé par de nombreux facteurs de façon locale ou systémique et a un rôle crucial dans le remodelage et la synthèse osseuse ;
- les ostéocytes sont des ostéoblastes à l'état de repos que l'on retrouve à la surface des os ou emprisonnés au sein de la matrice calcifiée, dans une petite cavité, la lacune osseuse ou ostéoplaste. Ces cellules ne sont pas isolées les unes des autres et communiquent entre elles grâce à un réseau de petits canaux, les canalicules. Ces cellules forment ainsi un lacis cellulaire dans l'ensemble du squelette. Ces cellules mécanosensibles participent activement au maintien de l'homéostasie calcique et de la masse osseuse (KLE12) (KLE15) (LAU10) ;
- les ostéoclastes ne partagent pas la même origine que les ostéoblastes ou les ostéocytes. Elles proviennent de cellules souches hématopoïétiques que l'on retrouve dans la moelle osseuse. Les précurseurs sont libérés dans le sang sous forme de monocytes et de mastocytes qui conglomèrent vers les zones de résorption osseuse où elles fusionnent pour donner des ostéoclastes. Ces cellules polarisées, multinucléées secrètent un mélange acide d'enzymes à l'origine de la résorption osseuse (composante organique et minérale). Les zones de résorption sont appelées

---

<sup>4</sup> Organites : compartiment cellulaire ou complexe macromoléculaire souvent entouré d'une membrane, qui a une structure, une composition et une fonction distinctes. Le noyau ou la mitochondrie sont des organites.

lacunes de Howship. Au même titre que l'ostéoblaste, cette cellule est lourdement régulée par des hormones et des cytokines<sup>5</sup> (HUR04).

Sous l'influence de nombreux éléments de régulation et de contrôle, ces cellules interagissent entre elles pour maintenir, tout au long de notre vie, une balance entre résorption et néoformation osseuse.

### 1.2.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire osseuse constitue 92 à 95 % vol. tissulaire. On considère qu'environ 20 % m. de cette matrice est organique alors que 70 % m. est inorganique (Figure 3) (DES15). Elle est hydratée à hauteur de 10 % m. Toutefois ce taux varie avec l'âge et le degré de minéralisation.

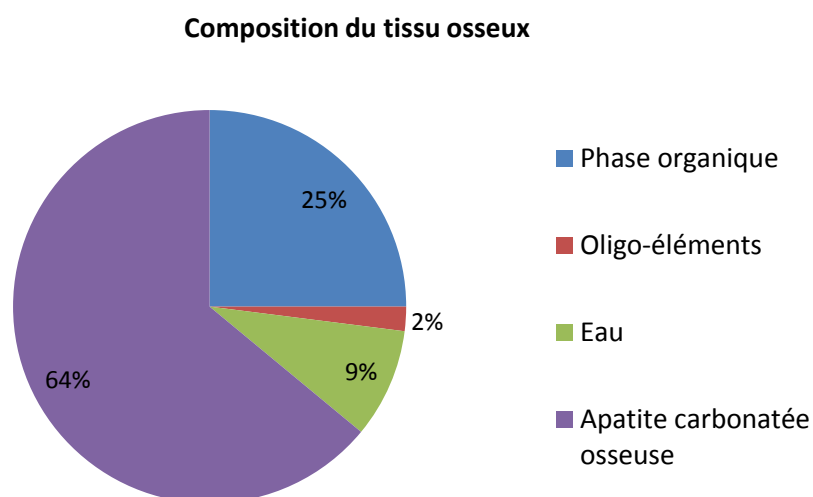


Figure 3. Composition du tissu osseux (% m.)

La MEC est constituée d'un réseau complexe de polysaccharides<sup>6</sup> et de protéines sécrétés par les cellules (ALB11). Ces protéines peuvent avoir plusieurs rôles :

- elles servent de soutien aux cellules et permettent leur régulation ;
- une fois associées à l'apatite phosphocalcique, elles confèrent à l'os ses bonnes propriétés mécaniques.

La MEC permet de réguler l'activité des cellules osseuses (AUB01). Le dialogue entre MEC et cellule peut se faire de manière directe, via les protéines d'adhésion cellulaire (mécanotransduction) ou de manière indirecte via les facteurs de croissance et autres

<sup>5</sup> Cytokines: protéine de petite taille impliquées dans la signalisation cellulaire.

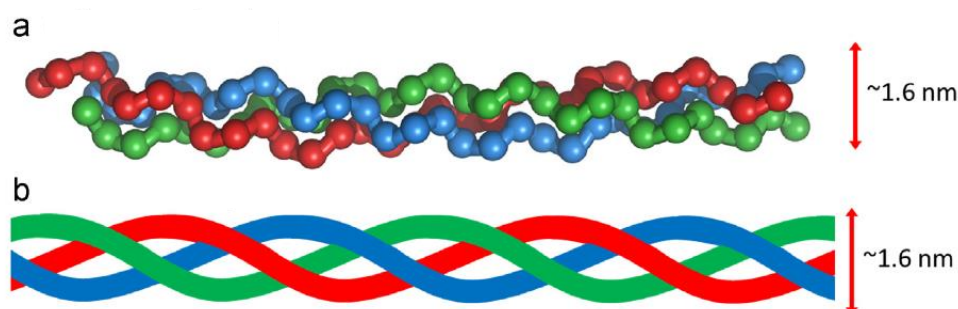
<sup>6</sup> Polysaccharides: ou glycanes sont des polymères composés d'oses liés entre eux par des liaisons osidiques.

cytokines (ALF15). En plus de cette activité de régulation, la MEC est un élément clé contribuant aux propriétés mécaniques osseuses.

La phase organique est principalement constituée de collagène de type I mais on y retrouve aussi, dans une moindre mesure, les collagènes de type III, IV et V (PUZ04) et des molécules non-collagéniques, telles que les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes.

Le collagène de type I, appartient à la classe des collagènes fibrillaires. Cette protéine est essentielle à l'os. En effet, des mutations au niveau des gènes codant pour le collagène causent des maladies osseuses telle que l'ostéogenèse imparfaite aussi connue sous le nom de la maladie des os de verre (LIM17). Elle se caractérise par une fragilité excessive des os et donc un risque accru de fractures.

Le procollagène est une triple hélice protéique (Figure 4) qui une fois excrétée dans le milieu extracellulaire s'assemble en fibrilles de 10 à 300 nm de diamètre et de plusieurs centaines de  $\mu\text{m}$  de long.



**Figure 4. Schéma de l'assemblage en triple hélice du procollagène (SHE15)**

Elles s'agrègent ensuite en faisceaux de plusieurs micromètres de diamètre. Les fibrilles de collagène d'un os adulte sont agencées en couches régulières. Les fibrilles d'une même couche sont parallèles entre elles mais perpendiculaires à celles de la couche suivante. Souvent relégué au rang de protéine structurelle, le collagène de type I pourrait être un pré requis intervenant dans la régulation positive de l'expression de certains marqueurs ostéoblastiques précoces tels que la phosphatase alcaline (ALP) ou l'ostéopontine (CEL98).

Les substituts osseux ont souvent été élaborés selon une démarche biomimétique même si historiquement, leur principale fonction était de rétablir et de maintenir la stabilité mécanique d'une zone critique. La structure et la composition de ces composés sont, pour certains, très proches du tissu osseux et cela dans le but de favoriser l'intégration aux tissus environnants et la reconstruction osseuse afin de rétablir les fonctions physiologiques. Le tissu osseux peut aussi contenir à l'état de traces des éléments toxiques. En effet notre exposition

## Chapitre 1 : Étude bibliographique

croissante à des polluants tels que les métaux lourds (cadmium, plomb, mercure...) va favoriser leur incorporation par l'organisme et notamment dans les tissus minéralisés (GDU04). Le Tableau 3 fait état de la composition de différents tissus minéralisés et phosphates de calcium synthétiques.

Éléments (% m.)	Email	Dentine	Os compact	HA	β-TCP
<b>(Ca/P)</b>	1,620	1,590	1,610	1,667	1,5
Calcium	36,1	35,0	35,5	39,89	38,76
Phosphore	17,3	17,1	17,1	18,499	19,97
Dioxyde de carbone	3,0	4,0	4,4	-	-
Magnésium	0,5	1,2	0,9	-	-
Sodium	0,2	0,2	1,1	-	-
Potassium	0,3	0,07	0,1	-	-
Chlore	0,3	0,03	0,1	-	-
Fluor	0,016	0,017	0,015	-	-
Soufre	0,1	0,2	0,6	-	-
Zinc	0,016	0,018	-	-	-
Silicium	0,03	-	0,04	-	-

**Tableau 3. Composition chimique (pourcentages massiques) des constituants minéraux de différents tissus calcifiés, de l'HA et du β-TCP (MON80). Le rapport atomique Ca/P permet de caractériser les phosphates de calcium**

Le tissu osseux, en remodelage constant, à une composition chimique qui varie en fonction de l'âge et de l'os. L'apatite lacunaire osseuse est principalement substituée par des groupements carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) et dans une moindre mesure, par le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) et le sodium ( $\text{Na}^+$ ) (Tableau 4). L'apatite dentaire contient du fluor ( $\text{F}^-$ ). Certains ions ou groupements ioniques stabiliseront la structure cristalline (Exemple : le fluor dans le cas de la fluoroapatite de l'émail dentaire) alors que d'autres favoriseront sa déstabilisation et donc, un produit de solubilité,  $K_s$ , plus élevé. Le Tableau 4 compare les produits de solubilité de quelques composés dans l'eau à 25°C.

Produit de solubilité dans de l'eau	Formule chimique	$K_s$ (25°C)
Phosphate tricalcique	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$2,83 \cdot 10^{-30}$
Hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	$2,34 \cdot 10^{-59}$ à $6,62 \cdot 10^{-126}$
Fluoroapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	$3,16 \cdot 10^{-60}$ à $6,30 \cdot 10^{-137}$

**Tableau 4. Produit de solubilité de quelques phosphates de calcium (du plus soluble au moins soluble) dans de l'eau à 25°C (adapté de (BER15a))**

A pH physiologique (pH 7,4) le β-TCP est plus susceptible de se dissoudre que l'hydroxyapatite (Figure 5).

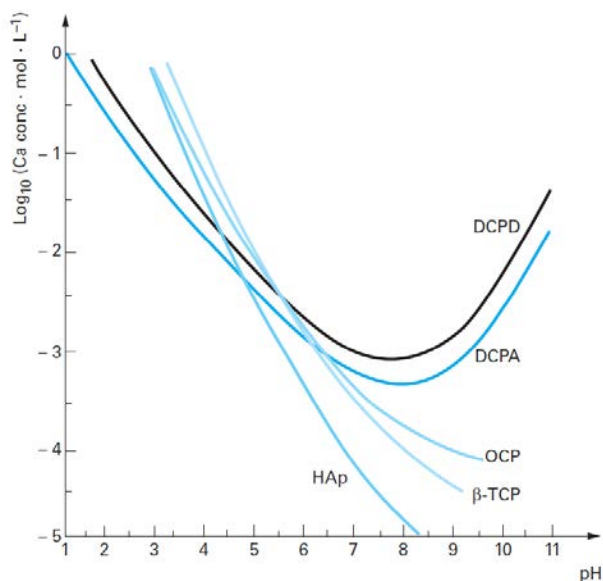


Figure 5. Isothermes de solubilité des phosphates de calcium à 37°C en fonction du pH (COM13)

*In vivo*, le dépôt minéral est issu de l'activité cellulaire ce qui permet d'avoir une MEC minéralisée rigide et dense. L'apatite phosphocalcique se présente sous forme de plaquettes irrégulières nanométriques (1 à 1,5 nm d'épaisseur ; 16 nm de largeur sur 27 nm de longueur) fortement lacunaire, contenant de nombreux groupes de substitution. Elles sont associées aux fibres de collagène pour donner un matériau léger (densité relative moyenne de l'os adulte : 2,2) avec de bonnes propriétés en compression et en traction (Tableau 5).

Propriétés	Os cortical	Os spongieux
Résistance à la compression (MPa)	100 - 230	2 - 12
Résistance à la traction (MPa)	50 - 150	10 - 20
Déformation à rupture (%)	1 - 3	5 - 7
Ténacité (MPa.m <sup>1/2</sup> )	2 - 12	-
Module d'Young (MPa)	7 - 30	0,05 - 0,5

Tableau 5. Récapitulatif des propriétés mécaniques de l'os (HEN93)

### 1.3. L'ostéogénèse

L'ostéogénèse est le processus biologique à l'origine de la constitution et du développement du tissu osseux. Ce processus est caractérisé par l'engagement des cellules souches dans la lignée ostéoblastique. Au fur et à mesure du processus de différenciation, ces cellules vont perdre leur aptitude à se multiplier mais vont acquérir les fonctions physiologiques de l'ostéoblaste mature c'est-à-dire un rôle de régulation et la capacité de synthétiser et minéraliser la MEC.

Le développement du squelette se fait de façon séquentielle dans le temps et l'espace. Il se caractérise par une succession de phases de morphogénèse<sup>7</sup> et de phases de croissance (LAU10). Au cours du développement fœtal, vont se mettre en place les ébauches squelettiques. Ces dernières, essentiellement composées de membranes fibreuses et cartilagineuses, seront progressivement remplacées par de l'os via 2 mécanismes différents (MAR01) (BAR12):

- l'ossification membranaire ;
- l'ossification endochondrale.

### ***1.3.1. Ossification membranaire ou endomembraneuse***

Ce phénomène a majoritairement lieu au niveau des os plats tels que ceux du crâne ou de la clavicule (LAU10). Sous l'action de différents facteurs de croissance, les cellules mésenchymateuses se condensent, forment les contours du futur tissu et se différencient en ostéoblastes (HAL92). Ces dernières assurent la production de la MEC et sa minéralisation (BER15). L'ossification progresse par apposition, à partir du centre du tissu mésenchymateux. Dans un premier temps c'est un réseau de travées osseuses qui apparaît. Il est par la suite résorbé et remplacé par de l'os lamellaire.

### ***1.3.2. Ossification endochondrale***

Ce phénomène est responsable de la formation des os longs tel que le tibia mais aussi d'une grande majorité du squelette (MAC08) (LAU10). L'ossification endochondrale repose sur :

- la destruction de l'ébauche cartilagineuse embryonnaire ;
- son remplacement par de l'os.

Les chondrocytes, au centre de l'ébauche cartilagineuse, arrêtent de proliférer afin d'exercer un rôle important de régulation. Dans le temps, les chondrocytes meurent par apoptose laissant leur place aux capillaires, vaisseaux sanguin et aux progéniteurs ostéoblastiques : c'est la formation des centres d'ossifications primaires (Figure 6.B et C). La néovascularisation de l'ébauche cartilagineuse va permettre l'arrivée de cellules souches mésenchymateuses et leur différenciation en cellules de la lignée ostéoblastique. Ce phénomène s'étend aux extrémités de l'os provoquant la formation des centres d'ossification secondaires (Figure 6.D). Ils finissent par remplacer le tissu cartilagineux sauf au niveau du cartilage articulaire. Une large majorité des chondrocytes meurent alors que d'autres s'organisent afin d'allonger le futur os dans une direction. Ces régions de croissance osseuse, appelées cartilages de conjugaison, persistent jusque la fin de l'adolescence et

---

<sup>7</sup> Morphogénèse : phénomène qui regroupe les changements structurels et biologiques que subit un organe



séparent les zones d'ossification primaires et secondaires. Le résultat final est un cylindre creux avec des parois constituées d'os compact renfermant une cavité avec la moelle osseuse.

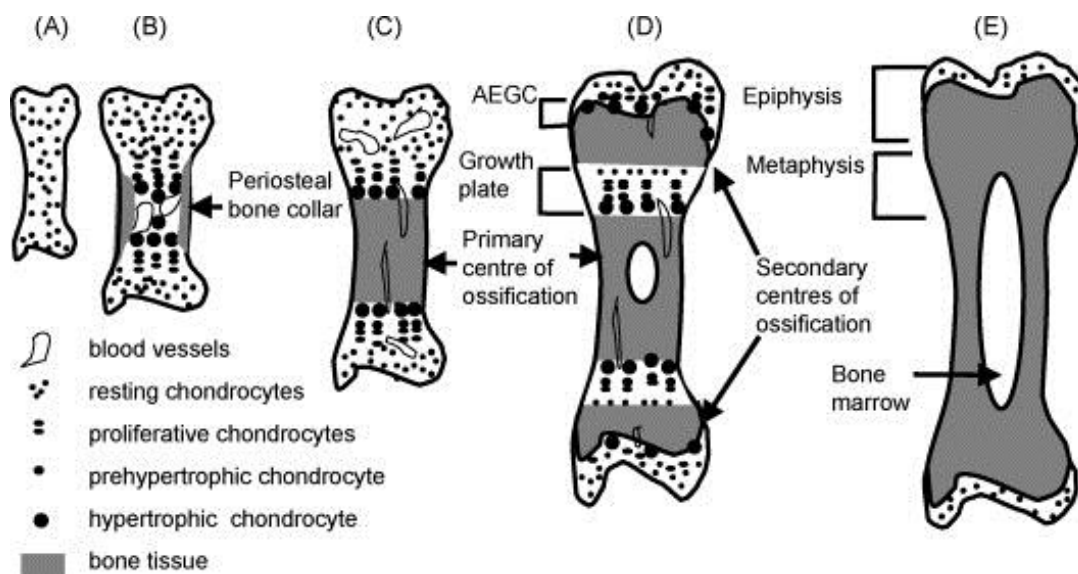


Figure 6. Schéma récapitulatif de l'ossification endochondrale (MAC08) : (A) ébauche cartilagineuse, (B) formation du centre d'ossification primaire, (C) centre d'ossification primaire, (D) formation des centres d'ossification secondaires et mise en place des cartilages de conjugaison, (E) os long adulte

### 1.3.3. Le remodelage osseux

L'os n'est pas un tissu figé, il fera au contraire, tout au long de notre vie, l'objet d'un remodelage qui va se caractériser par un équilibre entre dégradation et néosynthèse permettant le maintien de la masse osseuse. Sur une année, environ 10 % de la masse osseuse adulte est remodelée.

Le remodelage varie en fonction des périodes de notre vie. Ainsi, durant l'enfance et la puberté, la croissance osseuse est accélérée. À l'âge adulte, on assiste à un ralentissement de ce phénomène. Et au-delà d'un certain âge, le remodelage osseux perd de son efficacité et des déséquilibres peuvent survenir. Ce déséquilibre peut être accentué par un changement hormonal. La ménopause, par exemple, se caractérise par la chute de la production d'œstrogènes (HUR04) (BAY12) ce qui engendre un ralentissement de l'activité ostéoblastique aboutissant à une perte de masse osseuse, à une dégradation de la microstructure et à l'augmentation du risque de fracture : c'est l'ostéoporose post-ménopausique (EAS17).

Un squelette en bonne santé requiert des liens étroits et une communication permanente entre les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes. Les cellules osseuses étant mécanosensibles, l'un des principaux moteurs de ce remodelage est la stimulation mécanique du squelette. Le processus de remodelage osseux (compact et trabéculaire) met

en jeu plusieurs acteurs, les principaux étant les ostéoblastes et les ostéoclastes. Ces cellules sont mobiles, interdépendantes et leurs activités, asynchrones. Elles sont sous le contrôle des ostéocytes. Ces derniers, fortement connectés entre eux, forment un syncytium ou réseau cellulaire dans l'ensemble du tissu osseux qui joue le rôle de « mécanostat ». C'est-à-dire que les ostéocytes vont réguler l'activité des CSMH (BIR12), des ostéoblastes et ostéoclastes en fonction des contraintes appliquées au squelette (PRI16).

### **1.3.3.1. Phase de résorption**

Le remodelage osseux commence par l'activation, par les ostéoblastes, des cellules responsables de la résorption osseuse : les ostéoclastes. Sous l'action de facteurs ostéorésorbants, les ostéoblastes vont interagir via un système de ligand - récepteur avec des précurseurs ostéoclastiques pour amorcer leur différenciation (BAY12).

En dehors du remodelage, l'accès à l'os est bloqué par les cellules bordantes (Figure 7.1). Sous l'action de facteurs d'ostéorésorption, ces dernières vont céder leurs places aux précurseurs ostéoclastiques activés (Figure 7.2 et 3) qui donneront des ostéoclastes matures. Le processus de résorption (Figure 7.4) ou de création de lacunes se divise en 2 étapes: (1) l'acidification du compartiment de résorption et (2) la dégradation de la phase minérale et la libération de protéases chargées de la digestion des constituants organiques de la MEC. Cette phase dure environ 12 jours chez un adulte.

L'action ostéoclastique est inhibée par plusieurs facteurs notamment le calcium environnant. Cela mène à la mort par apoptose des ostéoclastes (Figure 7.4). Ces derniers seront progressivement remplacés par les précurseurs ostéoblastiques (Figure 7.5) qui initieront la néosynthèse osseuse.

### **1.3.3.2. Phase de formation**

Les ostéoblastes sont chargés de l'ostéogénèse, c'est-à-dire, la sécrétion et la minéralisation de la matrice ostéoïde (Figure 7.6). Cette étape nécessite un apport suffisant en minéraux (calcium et phosphate). Le transfert de calcium vers les sites de nucléation sur les fibres de collagène se fait via 2 mécanismes : l'un est actif et se fait grâce à des pompes à calcium ostéoblastiques et l'autre est passif (MAR01). La synthèse osseuse est plus longue que l'étape de résorption. Un cycle complet peut durer jusqu'à 4 mois chez l'adulte. L'action des ostéoblastes peut se résumer en 2 étapes principales: (1) la production de MEC ou tissu ostéoïde et (2) la minéralisation de ce tissu. Lors de ce processus, de nombreux ostéoblastes vont se retrouver piégés par leurs propres sécrétions. Ils subsisteront sous la forme d'ostéocytes au sein de petites cavités communicantes, les ostéoplastes. Les autres

deviendront des cellules bordantes ou mourront. Les principales étapes du cycle de remodelage sont représentées dans la Figure 7.

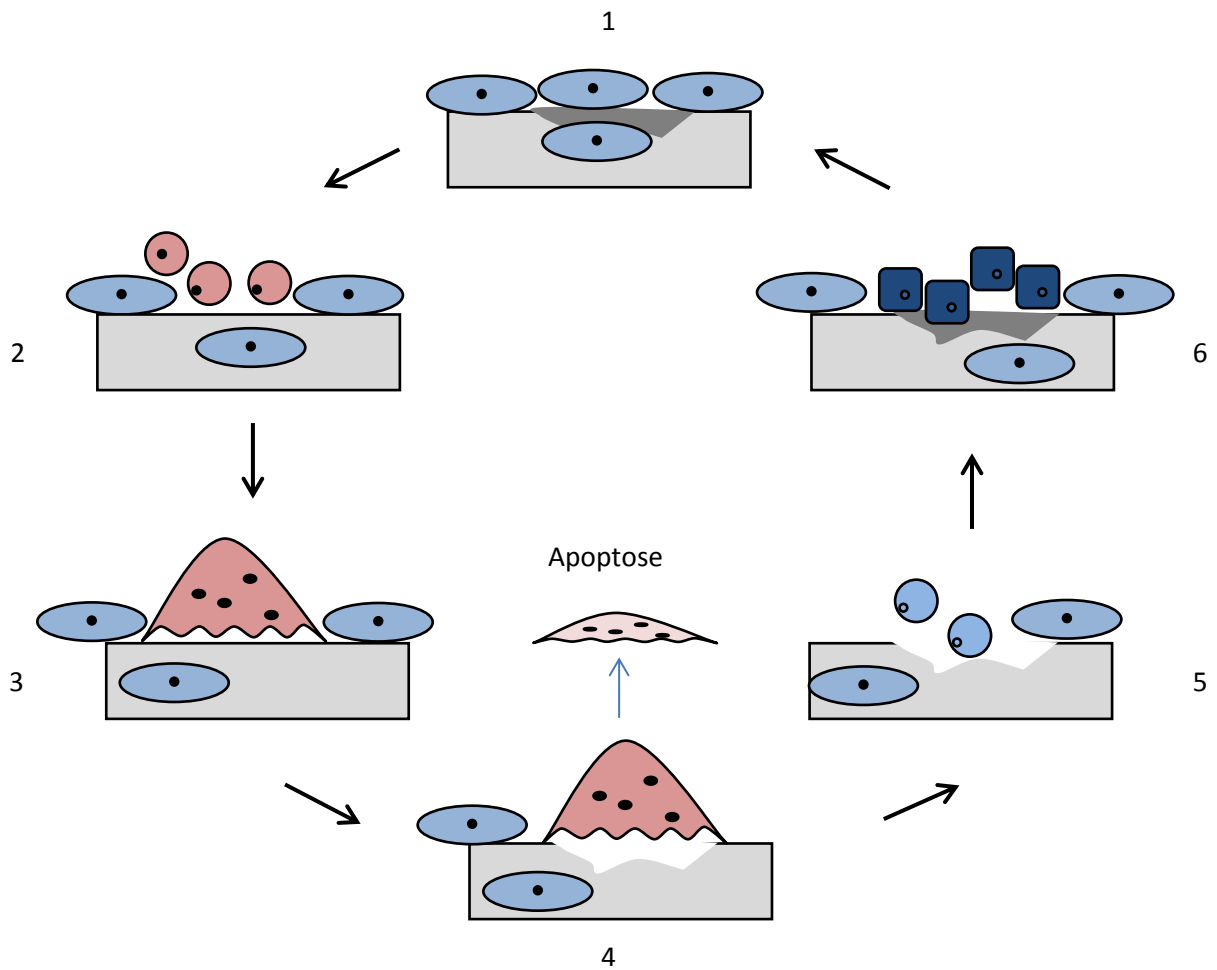


Figure 7. Cycle de remodelage osseux : (1) os protégé par les cellules bordantes, (2) recrutement des pré-ostéoclastes, (3) ostéoclaste mature, (4) résorption osseuse au niveau d'une lacune de Howship et apoptose de l'ostéoclaste, (5) recrutement de pré-ostéoblastes, (6) synthèse d'une nouvelle matrice osseuse par les ostéoblastes matures et (7) les ostéoblastes meurent, deviennent des cellules bordantes ou sont inclus dans la matrice (adapté de (MAR01))

### 1.4. Différenciation ostéoblastique et ses marqueurs

L'ostéoblaste mature est une cellule hautement spécialisée qui provient de la différenciation d'une cellule souche mésenchymateuse. Pluripotente, cette dernière peut donner de nombreux types cellulaires au travers des stimuli environnementaux et notamment de l'activation de facteurs de transcription<sup>8</sup> bien précis. Elle peut ainsi être à l'origine de cellules cartilagineuses, adipeuses, et musculaires (Figure 8).

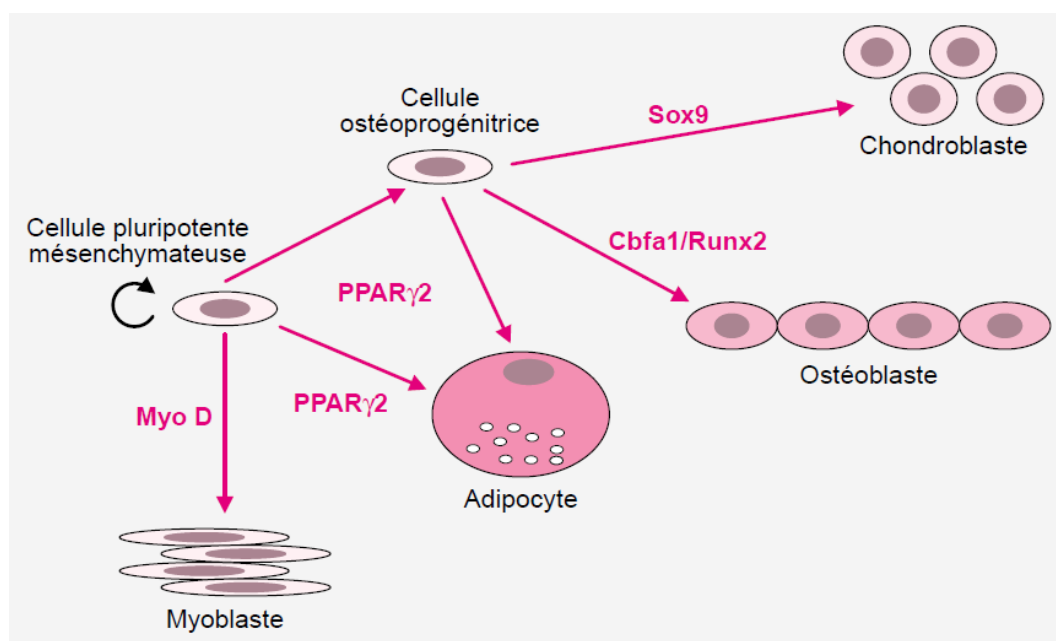


Figure 8. Schéma récapitulatif du devenir d'une cellule souche mésenchymateuse en fonction de l'expression du facteur de transcription spécifique (MAR01)

L'ostéoblaste intervient de façon précoce dans le remodelage osseux puisque c'est lui qui permet le recrutement des précurseurs ostéoclastiques (Figure 7.2). Une fois la phase de résorption achevée, il intervient dans la néosynthèse osseuse (Figure 7.5).

L'acquisition du phénotype<sup>9</sup> de l'ostéoblaste mature passe par l'engagement de la cellule dans une voie de différenciation : le progéniteur ostéochondrocytaire se différencie en ostéoprogéniteur, puis en préostéoblaste, puis en ostéoblaste jeune afin de devenir un ostéoblaste mature qui finira sa vie comme ostéocyte. L'acquisition de ces caractéristiques phénotypiques est progressive et séquentielle. Il est donc possible d'identifier et de quantifier des marqueurs propres à une ou plusieurs phases de la différenciation. Le Tableau 6 fait état d'une liste non exhaustive de certains des différents marqueurs qui sont induits au fur et à

<sup>8</sup> Facteur de transcription : protéine nécessaire à l'initiation et à la régulation de la transcription d'un gène en ARN messager.

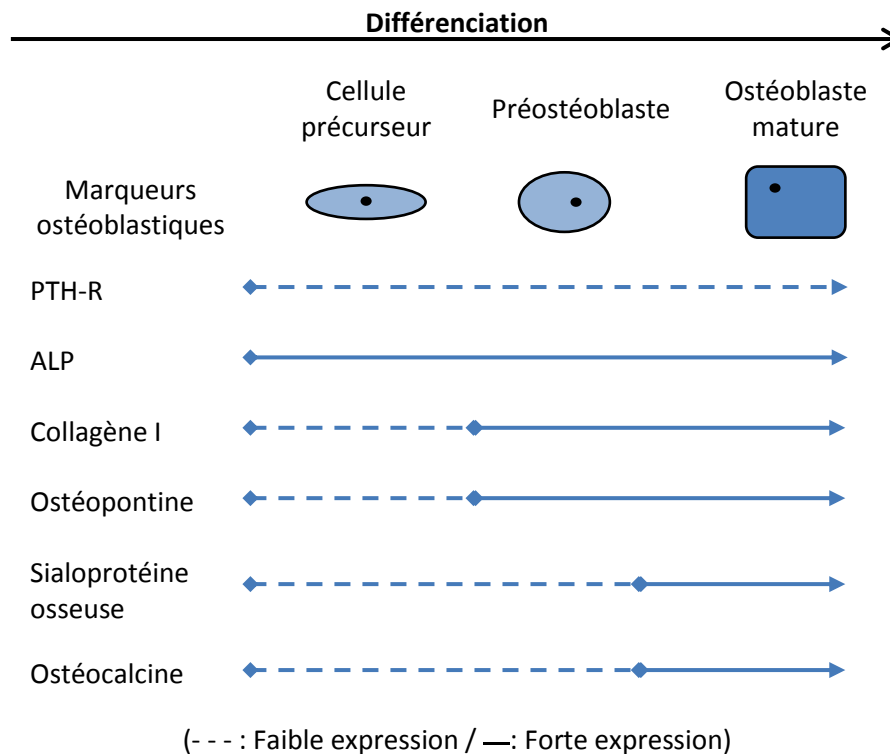
<sup>9</sup> Phénotype : représente l'ensemble des caractéristiques observables d'une cellule et découle de l'expression du génotype dans un environnement.

## Chapitre 1 : Étude bibliographique

mesure de l'avancement du cycle de différenciation ainsi que l'activité de la cellule à chaque étape jusqu'à ce qu'elle présente le phénotype d'un ostéoblaste mature.

	Progéniteur ostéoblastique immature	Progéniteur ostéoblastique mature	Préostéoblaste	Ostéoblaste mature	ostéocyte
<b>Facteurs de transcription</b>					
Runx2	++	++	++	+	-
Ostérix	-/+	+	-/+		
<b>Enzymes</b>					
ALP	-	+	++	+++	-
<b>Protéines collagéniques et non collagéniques de la MEC</b>					
Collagène de type I	+	++	++	++	-
Ostéocalcine	-	-	-	+++	-
Ostéopontine	-/+	-/+	+	+++	+++
Sialoprotéine osseuse (BSP)	++	-	+++	+++	+++
<b>Facteurs et récepteurs</b>					
Hormone parathyroïdienne (PTH)	-	-/+	+++	+++	++
Récepteur au PTH (PTHr)	-/+	+	++	++	-
<b>Molécules d'adhésion</b>					
CD 44	-/+	-/+	+	++	++
Galectine 3	-/+	-/+	+	+++	+++

**Tableau 6. Récapitulatif non exhaustif du taux d'expression de facteurs impliqués dans la différenciation ostéoblastique (AUB01)**



**Figure 9. Schéma récapitulatif des principaux marqueurs ostéoblastiques et de leur expression lors de la différenciation ostéoblastique (MAR01)**

Les facteurs déterminant les différentes étapes de la différenciation sont encore peu ou mal connus. Cela est notamment dû à la participation active et simultanée de l'ensemble des cellules du type ostéoblastique et ce, peu importe le stade de la différenciation. Il est donc difficile d'isoler, *in vivo*, des cellules correspondant à chaque stade de la différenciation. L'étude de la différenciation ostéoblastique s'est donc faite par le biais de cultures de modèles cellulaires d'origine humaine ou animale, *in vitro* (KAR04a). Parmi ces cellules, on retrouve des cultures primaires. Ces cellules proviennent directement de biopsies telles que les cellules souches mésenchymateuses humaines ou CSMH. Il est important de garder à l'esprit que les cultures primaires d'ostéoblastes ou de précurseurs ostéoblastiques sont moins homogènes que les lignées immortalisées, mais elles ont un comportement plus proche de celui d'une cellule *in vivo*. Elles sont largement utilisées dans le cadre d'étude de la progression de la différenciation et sont, selon Kumar *et al.* (KUM11), plus sensibles à l'architecture qu'à la composition chimique du substrat de culture.

D'autres sont issues de cultures de lignées cellulaires clonales immortelles telles que les MC3T3-E1 ou les UMR201, toutes deux d'origine murine. Une autre catégorie de cellules est d'origine tumorale. On y retrouve des cellules murines (ROS17/2.8 et UMR 106) et les cellules humaines (MG63 et SaOS-2) (KAR04). Il existe aussi des lignées cellulaires artificiellement immortalisées telles que les cellules d'origines murines RCT-1 et RCT-3. Ces

lignées cellulaires sont particulièrement utilisées dans le cadre de travaux étudiant les voies de signalisation en réponse à des stimuli ostéotropiques.

Ces modèles de cultures cellulaires ont permis de définir le phénotype ostéoblastique. Ci-dessous une liste non exhaustive des marqueurs ostéoblastiques les plus souvent rencontrés dans la littérature :

- runX2 ou cbfa1 est un facteur de transcription multifonctionnel essentiel impliqué dans la régulation de nombreux gènes qui contrôlent le développement squelettique. Il est essentiel à la différenciation du précurseur ostéochondrocytaire en précurseur ostéoblastique. Pendant le développement osseux, ce facteur de transcription favorise la croissance de la population d'ostéoblastes immatures et favorise leur différenciation, ce qui implique la formation d'os primaire. Ainsi ce facteur de transcription précoce va se lier aux promoteurs<sup>10</sup> de nombreux gènes tels que le collagène de type I, la sialoprotéine osseuse, l'ostéocalcine et l'ostéopontine afin de réguler leurs transcriptions ;
- la phosphatase alcaline ou ALP est une enzyme hydrolytique qui joue un rôle majeur dans la minéralisation (ORI10). On la retrouve sur la membrane des ostéoblastes et dans une moindre mesure sur les chondroblastes. Cette enzyme hydrolyse les esters de mono phosphates à pH élevé (pH 8 - 10) pour produire l'entité de base de l'apatite osseuse. Elle fournit localement du phosphate inorganique afin d'initier la minéralisation. Ces esters sont aussi des inhibiteurs de la minéralisation. La phosphatase alcaline est un marqueur phénotypique fonctionnel qui permet d'apprécier l'activité métabolique précoce des ostéoblastes. C'est aussi un marqueur de la différenciation ostéoblastique. Plus les cellules progressent vers le stade de la minéralisation plus la phosphatase alcaline est exprimée (KAR04) (BIR12). Cette activité finie par décroître lorsque l'ostéoblaste mature se transforme en ostéocyte. La production de cette enzyme dépend donc de la population cellulaire, du stade de différenciation et du processus de minéralisation. L'activité de cette enzyme est mesurée grâce à une réaction chimique qu'elle catalyse : la déphosphorylation du paranitrophénol phosphate en paranitrophénol un composé coloré. La mesure de la teneur du produit de réaction permet d'apprécier le degré de différenciation ostéoblastique;

---

<sup>10</sup> Promoteur: région de l'ADN à proximité d'un gène et essentielle à sa transcription.

- le collagène de type I est synthétisé par les cellules au fur et à mesure de leur différenciation. Il compose environ 10 % de la MEC. Son ARN messager ou ARNm<sup>11</sup> est transcrit mais peu ou pas traduit dans un premier temps, il est par la suite entièrement exprimé. Il fait partie des marqueurs précoces de la lignée ostéoblastique (KAR04). Des études récentes suggèrent l'importance du collagène de type I dans l'expression d'autres marqueurs tels que la phosphatase alcaline et l'ostéopontine (CEL98) ;
- l'ostéopontine est une protéine non collagénique retrouvée dans la MEC osseuse. Elle n'est cependant pas exclusive au tissu osseux puisqu'on la retrouve chez les cellules nerveuse et rénale. Elle est exprimée lors de la phase de prolifération. En post prolifération elle est moins exprimée avant d'être fortement induite lors de la minéralisation. Cette dernière lie les ions  $Ca^{2+}$  et joue, via une séquence protéique, un rôle dans l'adhésion cellulaire.
- les BMPs ou *bone morphogenetic proteins* : les protéines morphogénétiques osseuses (BMP 2, 4, 6 et 7) sont produites par les ostéoblastes et ont un rôle clé dans la différenciation ostéoblastique et la néosynthèse osseuse (URI65). Elles stimulent notamment runX2 et les gènes du collagène de type I ou de la phosphatase alcaline. Cette classe de protéine est exprimée de façon précoce par les cellules de la lignée ostéoblastique et plus tardivement lors de la minéralisation.

### 1.5. Conclusion

L'étude histologique de ce tissu montre un assemblage de structures hiérarchisées nanométriques, microscopiques et macroscopiques (Figure 10). L'os est ainsi constitué de molécules structurelles nanométriques et d'une phase inorganique dont la synthèse, la structuration et l'organisation sont régies par les cellules osseuses notamment l'ostéoblaste. Il est important de noter que l'ensemble des cellules impliquées dans la fonction osseuse est sous le contrôle de nombreuses molécules régulatrices : on retrouve ainsi parmi les principaux acteurs de la régulation des hormones telles que l'hormone parathyroïdienne (PTH), les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF), des facteurs de croissance fibroblastiques (FGF), des facteurs de croissance vasculaires (VEGF) et les BMPs (BIL02) (HUR04).

L'étude du phénotype ostéoblastique s'est faite via de nombreux modèles cellulaires. Ces dernières présentent des spécificités et des différences qui en feront de bons candidats pour

---

<sup>11</sup> ARNm: ou acide ribonucléique messager est le résultat de la transcription d'un gène (ADN) et est traduit en protéine. L'ARNm sert de support intermédiaire à l'information génétique entre le gène et la protéine codée par ce dernier.



## Chapitre 1 : Étude bibliographique

l'étude de nombreux paramètres tels que la différenciation cellulaire, la production de MEC (collagènes) ou la mesure d'activité de protéines spécifiques (ALP).

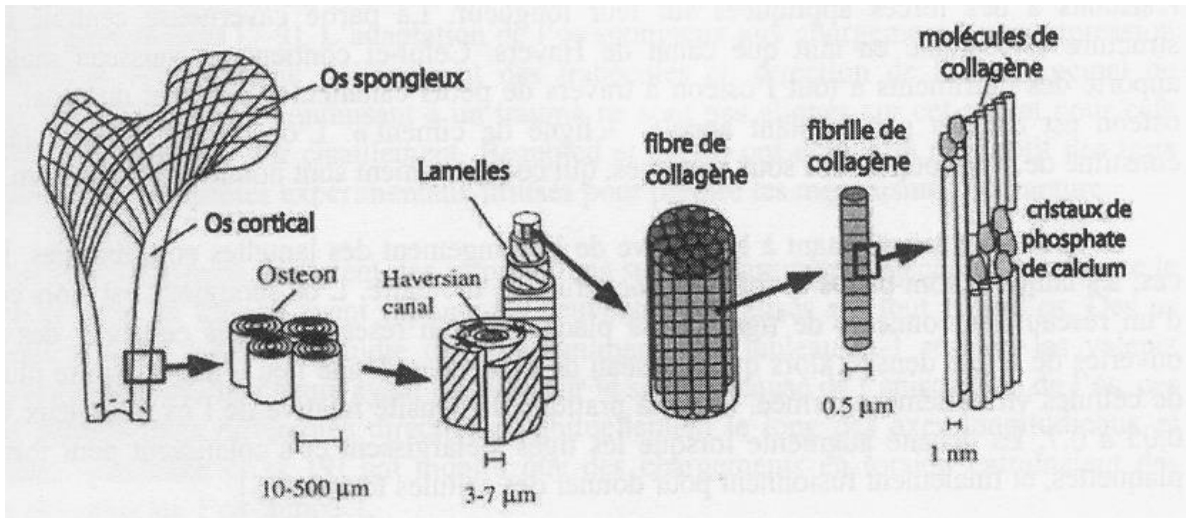


Figure 10. Structure hiérarchisée de l'os : de la molécule de collagène à l'os (adaptée de (RHO98))

## 2. Les substituts osseux en phosphates de calcium

Le substitut osseux synthétique idéal serait biocompatible, bioactif, ostéoinducteur, ostéoconducteur, résorbable, mécaniquement adapté, reproductible, abordable, abondant et facilement mis en œuvre par le praticien. Les substituts osseux peuvent être d'origine naturelle (autogreffe, allogreffe et xélogreffe) ou d'origine synthétique (polymérique ou céramique). Les céramiques phosphocalciques permettent de répondre à un grand nombre de problématiques liées par exemple à la transmission de maladie ou à la qualité et la quantité du greffon. De plus, de nombreuses études ont aussi montré, *in vivo* et *in vitro*, que leur comportement pouvait être très proche de celui du tissu osseux. Toutes ces caractéristiques font d'eux de très bons candidats pour l'élaboration de substituts osseux.

Les substituts osseux synthétiques sont, de nos jours, utilisés expérimentalement et cliniquement. Pour cela ils respectent au minimum, les critères suivants (COM13) :

- stérilité : la stérilisation par rayonnement  $\gamma$  doit être privilégiée si possible (le risque qu'un élément soit non stérile malgré une étape de stérilisation doit être inférieur à  $10^{-6}$ ) ;
- biocompatibilité : requis de la norme NF EN ISO 10993 ;
- agréments réglementaires : dépend de l'autorité compétente du pays (Haute Autorité de Santé en France) ;
- ostéoconduction et ostéointégration : sur une période de 3 mois suivant l'implantation, il doit y avoir néoformation osseuse et absence de coque fibreuse autour du greffon ;
  - résorbabilité (si applicable) : la résorption se fait en 2 ans ;
  - visibilité : la présence d'un agent opacifiant doit permettre l'identification de ce dernier sur une période excédant les 3 mois post implantation ;
  - résistance mécanique : la résistance à la compression doit être comprise entre 5 et 550 MPa.

Les compositions chimiques des phosphates de calcium en ont fait des matériaux de choix pour l'élaboration de substituts osseux.

### 2.1. Caractéristiques générales

Le  $\beta$ -TCP et l'HA sont des céramiques synthétiques obtenues grâce à des traitements thermiques à haute température contrairement à l'apatite osseuse qui est le fait d'une minéralisation d'origine cellulaire. Malgré cette différence, les phosphates de calcium synthétiques présentent des propriétés proches de l'os. En plus d'une composition similaire, les observations faites *in vivo* et *in vitro* montrent que ces céramiques sont biocompatibles (DEG80) et induisent une cascade de réactions biologiques similaires à l'os (HAN11).

Contrairement aux matériaux inertes, ils sont intégrés par l'environnement biologique ce qui permet la stabilisation mécanique du site d'implantation. En effet, dans une application sous contrainte, une zone critique mal stabilisée sera le siège de micromouvements pouvant déboucher sur un descellement ou au phénomène de *stress shielding*<sup>12</sup> (GOO85) (FRE82).

Ces matériaux peuvent, au même titre que le tissu osseux, capter et concentrer des cytokines (LEG02). Ils sont ostéoconducteurs, c'est-à-dire qu'ils servent de support à la formation osseuse. De plus, certaines études rapportent l'aptitude de ces matériaux à provoquer la formation osseuse en zone ectopique: l'ostéoinduction (URI65) (CHE13). Toutefois ces résultats dépendent du modèle animal utilisé (CHE16). L'ostéoinduction est une aptitude liée à la composition chimique mais aussi aux caractéristiques architecturales et topographiques de l'implant. Les bonnes propriétés et performances des phosphates de calcium sont aujourd'hui indéniables. Le nombre de contribution ainsi que l'intérêt que leur portent les cliniciens et chercheurs en ont fait le *gold standard* des substituts osseux synthétiques.

Afin de pouvoir bénéficier pleinement des avantages chimiques des phosphates de calcium, la maîtrise de leur synthèse est essentielle.

### 2.1.1. Le phosphate tricalcique

Le TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  existe sous plusieurs formes allotropiques. Leurs stabilités ainsi que leurs organisations cristallines varient en fonction de la température (COM13) (JAR81). En dessous de 700°C, le phosphate tricalcique apatitique,  $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$  est amorphe (A-TCP), au-delà il se transforme en  $\beta$ -TCP stable. La transformation de la phase  $\beta$  en phase  $\alpha$  (2,86 g/cm<sup>3</sup>) s'effectue vers 1125°C et s'accompagne d'une augmentation de la taille de la maille cristalline. Cette propriété peut nuire à l'intégrité structurelle et physique de la pièce. Elle limite aussi la température de frittage du  $\beta$ -TCP. Les caractéristiques chimiques et cristallographiques du  $\beta$ -TCP sont reprises dans le Tableau 7.

Caractéristiques chimiques et cristallographiques du $\beta$ -TCP	
Ca/P	1,5
Masse volumique	3,07 g/cm <sup>3</sup>
Groupe d'espace	R3 <sub>c</sub>
Maille cristalline	Rhomboédrique
Paramètre de maille	a = b = 10,429 Å et c = 37,380 Å $\alpha = \beta = 90^\circ$ et $\gamma = 120^\circ$

Tableau 7. Caractéristiques chimiques et cristallographiques du  $\beta$ -TCP

<sup>12</sup> *Stress shielding* : phénomène lors de laquelle, la contrainte mécanique normalement appliquée sur un os est diminuée ou redistribuée par la présence d'un implant. Le résultat est une diminution de la densité osseuse avec une augmentation des risques de fracture et de descellement de l'implant.

Les différentes étapes de la transformation thermique sont résumées dans le Tableau 8 :

<b>Ca/P = 1,5</b>	
1756°C	Phase liquide
	$\alpha'$ -TCP
1470°C	Transformation de phase
	$\alpha$ -TCP
1125°C	Transformation de phase
	$\beta$ -TCP
700°C	Transformation de phase
	A-TCP
630°C	Déshydratation
	Phosphate tricalcique amorphe (A-TCP)

**Tableau 8. Transformation par traitement thermique de  $\beta$ -TCP synthétisé en solution à basse température avec un Ca/P = 1,5**

Il est important de noter que le rapport Ca/P va influencer le comportement thermique d'une poudre de phosphate de calcium.

### **2.1.2. L'hydroxyapatite**

L'hydroxyapatite stoechiométrique fait partie de la famille des apatites dont la formule de base est:  $M_{10}(XO_4)_6Z_2$  avec M, un cation bivalent ;  $XO_4$ , un anion trivalent et Z, un anion monovalent. La formule de l'hydroxyapatite est :  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ . Cette céramique cristallise dans le système hexagonal et appartient au groupe d'espace  $P6_{3/m}$ . Sa masse volumique théorique est de 3,156 g/cm<sup>3</sup> et son rapport Ca/P est de 10/6.

### **2.2. Procédés de synthèse**

Les phosphates de calcium résultent de la neutralisation des trois acidités de l'acide phosphorique,  $H_3PO_4$  par remplacements successifs de protons par des ions calciums :

1.  $H_3PO_4 + H_2O \leftrightarrow H_2PO_4^- + H_3O^+$
2.  $H_2PO_4^- + H_2O \leftrightarrow HPO_4^{2-} + H_3O^+$
3.  $HPO_4^{2-} + H_2O \leftrightarrow PO_4^{3-} + H_3O^+$

On distingue deux grandes voies de synthèse :

- la voie humide à basse température ;
- la voie solide à haute température.

L'HA et le  $\beta$ -TCP peuvent être synthétisés à partir des mêmes composés de départ. Ce sont les paramètres de synthèse (pH, température...) et, plus particulièrement, le rapport atomique Ca/P qui va déterminer la composition finale du produit de réaction ainsi que la présence ou l'absence éventuelle d'impureté (Figure 11 et Figure 12).

# Chapitre 1 : Étude bibliographique

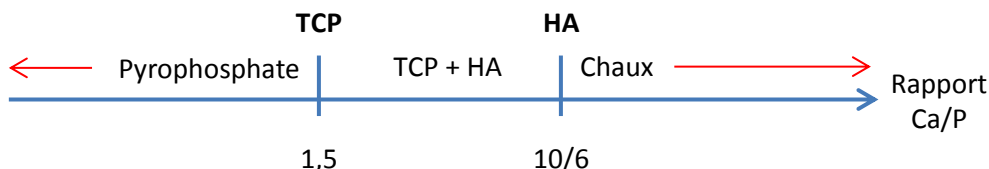


Figure 11. Produits issus de la synthèse de phosphate de calcium en fonction du rapport Ca/P. Le pyrophosphate et la chaux sont considérés comme des impuretés

Dans le cas de la synthèse de TCP, un excès de calcium ( $Ca/P > 1,5$ ) favorisera l'apparition d'HA alors qu'une déficience ( $Ca/P < 1,5$ ), sera à l'origine de la présence de pyrophosphate de calcium,  $Ca_2P_2O_7$  (Figure 12).

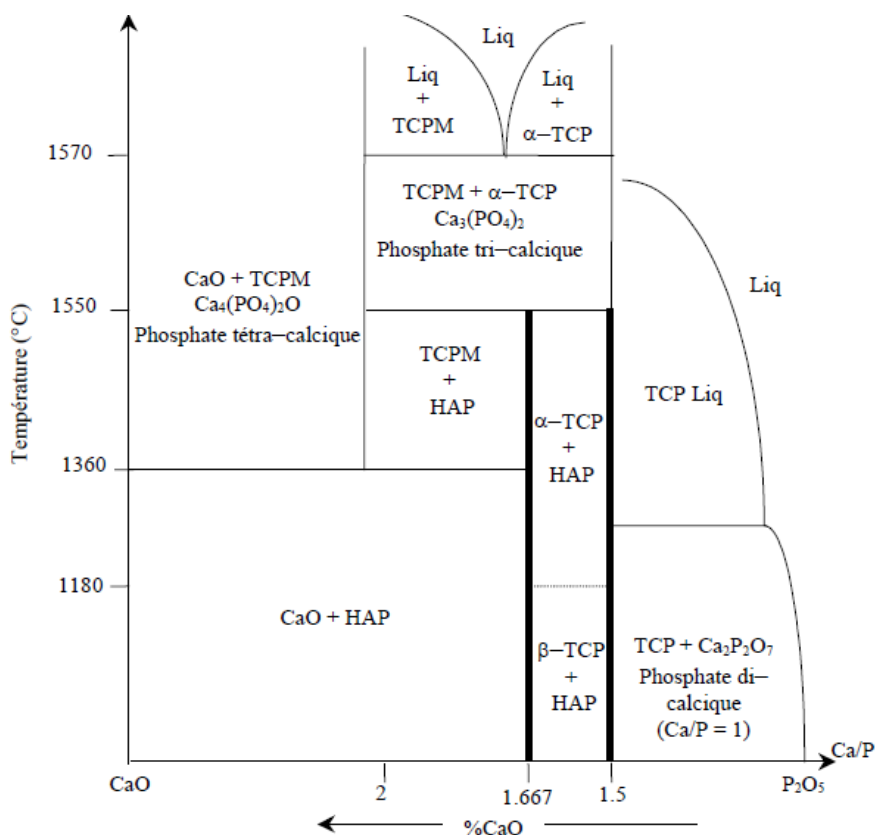


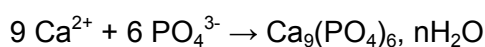
Figure 12. Diagramme de phase partiel du système  $CaO - P_2O_5$  (WEL61)

### **2.2.1. Voie humide**

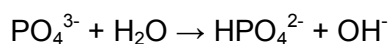
Cette méthode est la plus répandue et permet d'obtenir des poudres relativement fines et donc très réactives. La double décomposition à partir de sels de phosphate et de calcium permet d'obtenir un phosphate de calcium apatitique amorphe. Cette méthode de synthèse se caractérise par le grand nombre de paramètres de fabrication sur lequel l'opérateur peut avoir une influence :

- la composition des solutions de départ ;
- l'addition plus ou moins rapide des réactifs ;
- le rapport Ca/P ;
- la constante diélectrique du milieu ;
- le pH ;
- la température ;
- le temps de maturation ;
- la présence ou pas de germes ;
- l'ajout de composés organiques.

Une fois maîtrisée, cette méthode permet la synthèse de  $\beta$ -TCP répondant à des critères bien précis. Classiquement cette méthode de précipitation consiste à introduire au goutte à goutte, dans une solution de nitrate de calcium,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (Annexe 1) une solution d'hydrogénophosphate de diammonium,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Annexe 2). Ce mélange est sous agitation permanente et le pH légèrement acide est maintenu par l'ajout contrôlé d'ammoniaque. Après les premières heures de maturation, on obtient du phosphate tricalcique amorphe de formule chimique  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6, n\text{H}_2\text{O}$  (Équation 1). La formation du composé intermédiaire précédent est suivie d'une hydrolyse selon l'équation suivante (Équation 2) :

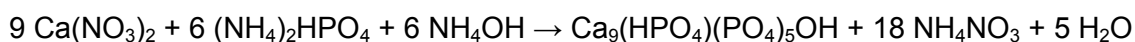


**Équation 1. Obtention du phosphate tricalcique amorphe**



**Équation 2. Hydrolyse**

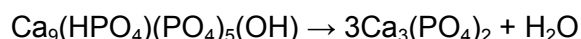
Cette hydrolyse conduit à la formation du phosphate tricalcique apatitique (DES03) (Équation 3) :



**Équation 3. Obtention du phosphate tricalcique apatitique**

## Chapitre 1 : Étude bibliographique

Après filtration et séchage, on obtient une poudre brute composée de phosphate tricalcique apatitique. Lorsque le rapport Ca/P est égal à 1,5 ; la calcination (température > 700°C) du phosphate tricalcique apatitique permet sa transformation en  $\beta$ -TCP grâce à l'élimination d'une molécule d'eau (KAN05) (Équation 4) :



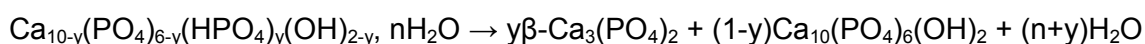
### Équation 4. Obtention du $\beta$ -TCP pur

Lorsque le rapport Ca/P est inférieur à 1,5, on retrouve dans la poudre brute une phase apatitique et du phosphate dibasique anhydre qui une fois calcinés donneront du  $\beta$ -TCP et du pyrophosphate de calcium,  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , un produit indésirable (Équation 5) :



### Équation 5. Obtention de $\beta$ -TCP avec du pyrophosphate de calcium

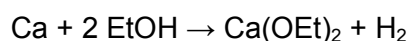
De la même manière, lorsque le rapport Ca/P est compris entre 1,5 et 1,67, on obtient un phosphate tricalcique apatitique qui sous l'action d'un traitement thermique va donner un mélange de  $\beta$ -TCP et d'HA (Équation 6) :



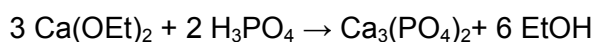
### Équation 6. Obtention de $\beta$ -TCP et d'HA

Dans le cadre de cette étude, le rapport Ca/P est légèrement supérieur à 1,5 ce qui nous permet de produire une poudre contenant jusqu'à 2 à 3 % en masse d'HA. Ces particules d'HA vont inhiber la croissance granulaire et améliorer la densification lors du frittage (DES07).

Une autre méthode repose sur un procédé sol-gel (FEL09). On prépare tout d'abord du diéthoxyde de calcium sous atmosphère inerte (Équation 7). Ce dernier réagit ensuite avec de l'acide phosphorique et de l'éthanol (Équation 8).



### Équation 7. Obtention de diéthoxyde de calcium



### Équation 8. Obtention de $\beta$ -TCP par méthode sol-gel

### 2.2.2. Voie sèche

Le Tableau 9 récapitule les techniques de synthèse par voie sèche que l'on retrouve dans la littérature.

Références	Réactifs	Conditions de synthèse
(LIN98)	Phosphate dicalcique + Carbonate de calcium	1000°C pendant 24h
	$\text{CaCO}_3 + 2 \text{CaHPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	
(RYU02)	Pyrophosphate de calcium + Carbonate de calcium	Broyage pendant 24 h suivi d'un traitement thermique à 1100°C pendant 12h
	$\text{CaCO}_3 + \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CO}_2$	
(CHO07)	Oxyde de calcium + pentoxyde de phosphore	Broyage mécanique énergétique pendant 16 h suivi d'un traitement thermique
	$3 \text{CaO} + \text{P}_2\text{O}_5 \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	
(BEN06)	Carbonate de calcium + hydrogénophosphate de diammonium	900°C
	$3 \text{CaCO}_3 + 2 (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 3 \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_3 + 3 \text{H}_2\text{O}$	
(COM13)	Hydroxyapatite + pyrophosphate de calcium	850°C – 1125°C
	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \rightarrow 4 \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O}$	

Tableau 9. Tableau récapitulatif des différentes méthodes de synthèse de phosphate tricalcique par voie sèche

Les méthodes décrites ci-dessus sont énergivores, chronophages et, contrairement à la voie humide, les rendements sont plus faibles.

### 2.3. Conclusion

Les phosphates de calcium sont des composés synthétiques dont la composition chimique est très proche de la composante minérale de l'os. Il existe différentes voies de synthèses : la voie humide et la voie sèche. La voie humide offre de nombreux avantages tels que la possibilité de contrôler les paramètres de synthèse et un coût énergétique relativement faible. On note aussi une certaine facilité de mise en œuvre avec un rendement plus élevé. Notre choix s'est donc naturellement porté vers ce mode de synthèse. L'obtention de ces composés passe par un traitement thermique à haute température ne permettant pas d'y incorporer des éléments sensibles à la chaleur tels que les composantes de la MEC osseuse. En effet les protéines structurelles et de régulations constituant la MEC se dénaturent et perdent leurs fonctions physiologiques à haute température. La maîtrise de la synthèse des phosphates de calcium est cruciale à l'obtention d'un produit final répondant aux requis des différentes normes encadrant les matériaux destinés à une utilisation chez l'homme et des méthodes de mise en forme. L'exploitation du potentiel ostéogénique lié à la composition du matériau va aussi dépendre de son architecture et donc des moyens de mise en forme employés.



### 3. La porosité

L'arrangement géométrique de l'environnement est un facteur déterminant sur le comportement cellulaire. Par exemple, un support de culture bidimensionnelle n'aura pas la même influence qu'un support de culture tridimensionnelle (CUK01). Maîtriser les différents paramètres microstructuraux d'un implant, va favoriser son intégration au milieu physiologique grâce à une colonisation cellulaire efficace. La porosité est un de ces paramètres clés et peut être décrite de plusieurs façons :

- le taux de porosité ou volume poreux ;
- la taille moyenne des pores ;
- la distribution en taille des pores ;
- la forme des pores ;
- les interconnexions entre pores.

Selon la classification IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), on distingue 3 catégories de pores. Le terme macropore désigne les pores de dimensions moyennes supérieures à 50 nm. Le terme micropore désigne, quant à lui, les pores de dimensions moyennes inférieures 2 nm. Les pores de dimensions intermédiaires constituent un milieu mésoporeux (CHA99). Toutefois cette étude ne partage pas cette nomenclature mais celle que l'on rencontre classiquement dans la littérature concernant les biomatériaux. On considère ainsi que les micropores désignent des pores de dimensions inférieures à une dizaine de micromètres et que les macropores désignent des pores de diamètres supérieurs à quelques dizaines de micromètres.

La porosité totale d'un matériau est la somme des porosités fermées et ouvertes. La porosité ouverte interconnectée est celle que l'on recherche, car accessible aux fluides biologiques et aux cellules. En plus d'avoir un impact sur le recrutement moléculaire et cellulaire, la porosité va influencer les propriétés mécaniques de l'implant (LEH95). En effet le volume poreux, la taille des pores et leurs distributions spatiales au sein d'un implant (PEC10) sont des paramètres clés et une concentration trop importante de pores à un endroit donné va fragiliser l'ensemble de la structure en augmentant le risque d'apparition de défauts critiques. Un compromis doit donc être trouvé entre porosité et résistance mécanique.

L'impact de la porosité sur la vascularisation et la néoformation osseuse, *in vivo* ou *in vitro*, est largement admis (MUR10). La signature génétique d'un type cellulaire varie en fonction de l'architecture du support sur lequel il est cultivé (KUM11). La vitesse et la qualité de l'invasion est tributaire du volume poreux, du diamètre des pores et de l'inter connectivité entre pores. Une surface élevée exposée au milieu physiologique va favoriser des échanges

ioniques, l'adsorption de protéines et la formation d'apatite osseuse par dissolution-précipitation. L'état de surface et la topographie sont aussi des facteurs dont dépend la surface spécifique et qui vont influencer les différents phénomènes cités plus haut. Idéalement, l'implant est colonisé par les cellules adhérentes à la couche de protéines adsorbées. L'implant, ainsi pris en charge, sera remodelé. La dégradation de l'implant dans l'organisme dépend de la stabilité de son site d'implantation ou de la zone critique, des propriétés physico-chimiques du matériau et de l'environnement biologique. La porosité impacte ainsi l'ostéoinduction, l'ostéoconduction et *in fine* l'ostéointégration.

Globalement la porosité aura un impact important sur :

- la façon dont le matériau va évoluer au sein de l'organisme ;
- les réactions biologiques induites par le matériau.

### **3.1. Impact de la porosité**

#### ***3.1.1. Le taux de porosité***

Un taux de porosité optimisé influencera positivement les cellules sans pour autant être délétère aux propriétés mécaniques de l'implant (LEH95). Gauthier *et al.* (GAU98) soutiennent cette hypothèse. La comparaison entre eux d'échantillons macroporeux biphasiques ou BCP implantés chez le lapin, montre que les taux de porosité optimaux sont de 40 et 50 %. L'étude préconise quand même de préférer une porosité basse, ici 40 %, afin de préserver les propriétés mécaniques de l'implant. L'équipe de Kruyt (KRU04) compare 2 types d'implants granulaires en HA avec des caractéristiques poreuses différentes: 60 % de porosité avec des pores de 400  $\mu\text{m}$  et 70 % de porosité avec des pores de 800  $\mu\text{m}$ . Les échantillons sont implantés en zone ectopique chez la chèvre. Les 2 types d'implants donnent de bons résultats, cependant, l'implant à 70 % de porosité semble contenir le plus d'os néoformé.

*In vitro*, Park *et al.* (PAR12) montrent, que les implants en  $\beta$ -TCP de 40 et 50 % de porosité sont de meilleurs candidats que ceux de 20 et 30 %. Les résultats d'Itoh *et al.* (ITO04) diffèrent : selon cette équipe, le taux de porosité a un rôle marginal. Différents échantillons macroporeux (50 à 300  $\mu\text{m}$ ) associant collagène et apatite ont été générés avec des taux de porosité différents : 49, 73 et 79 %. Les cultures de MC3T3 n'ont permis de déceler aucune différence au niveau de la prolifération.

Les gammes de porosité testées et donnant des résultats satisfaisants sont larges et vont de 40 à 70 %. Il convient toutefois de choisir un taux de porosité qui induit une réponse positive

de la part des cellules sans pour autant nuire aux propriétés mécaniques. Un taux de porosité de l'ordre de 40 à 50 % semble adapté.

### **3.1.2. Macroporosité**

Une macroporosité maîtrisée va permettre d'induire une réponse biologique appropriée et d'assurer la tenue mécanique de l'implant. Les dimensions doivent permettre la libre circulation des fluides biologiques ainsi que des cellules impliquées dans le processus de guérison. La macroporosité surfacique va aussi permettre, par imbrication, la stabilisation de l'interface implant/organisme. La taille des pores impactera aussi la surface spécifique. Or cette dernière joue un rôle dans l'adsorption protéique et donc dans l'adhésion cellulaire (KES03). Il convient donc d'optimiser la dimension et le volume des pores afin d'avoir une influence positive sur la réponse de l'organisme.

Les cellules osseuses les plus volumineuses sont les ostéoclastes, avec des tailles allant de 20 à 100  $\mu\text{m}$ . Il semblerait donc que la limite inférieure de la taille des macropores est de l'ordre de la centaine de micromètre. Les résultats et observations de nombreuses études semblent montrer que le diamètre minimum de pore doit être supérieur ou égale à 100  $\mu\text{m}$  (HUL70). Cependant, une autre étude montre qu'à partir de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre, une ostéoconduction active est observée dans des échantillons en HA (CHA00). Galois *et al.* (GAL04) montrent, de leur côté, qu'une taille de pore supérieure à 80  $\mu\text{m}$  est suffisante pour une colonisation osseuse *in vivo* dans des implants en  $\beta$ -TCP. Les auteurs décrivent aussi l'apparition de structures concentriques similaires aux ostéons de l'os naturel. Toutefois, les dimensions optimales pour une néoformation et un remodelage osseux se situent entre 300 et 400  $\mu\text{m}$ . Karageorgiou *et al.* (KAR05) ainsi que 2 autres études combinant HA et facteurs de croissance, les BMPs appuient les résultats précédents (KUB01) (TSU97). En dessous 300  $\mu\text{m}$  environ, le matériau est infiltré par du tissu ostéoïde fibreux non minéralisé. Et au-delà de cette valeur on retrouve dans les pores des échantillons, du tissu osseux vascularisé ainsi que des éléments de la moelle osseuse tels que des adipocytes et de jeunes cellules sanguines. Kuboki *et al.* (KUB01) mettent aussi en évidence le fait que les mécanismes d'ossification diffèrent en fonction de la taille de pores à cause du degré de vascularisation. Ainsi pour des diamètres supérieurs à 300  $\mu\text{m}$ , c'est une ossification sans intermédiaire cartilagineux qui a lieu alors qu'en dessous de cette valeur c'est plutôt une ossification ostéochondrale. Taniguchi et son équipe (TAN16) comparent, *in vivo*, des échantillons en titane qui présente une porosité d'environ 65 % et des pores de dimensions allant de 300 à 900  $\mu\text{m}$ . La repousse osseuse est faible mais présente dans l'implant avec des pores de 300  $\mu\text{m}$ . Les meilleurs résultats en terme de néosynthèse et de volume osseux sont obtenues pour l'échantillons présentant des pores de 600  $\mu\text{m}$ .

La vascularisation est une étape importante au bon déroulement de la guérison osseuse (CAR03). En effet une bonne irrigation permettra un apport régulier et suffisant en oxygène, en nutriments, en molécules régulatrices et un accès jusqu'au cœur du matériau. Klenke *et al.* (KLE08) concluent que les dimensions de pore supérieures ou égales à 140  $\mu\text{m}$  sont suffisantes pour la vascularisation de l'implant. De plus, le volume d'os néoformé augmente avec la taille des pores. Les taux de porosité sont de l'ordre de 75 % avec, 50 % de macropores et 25 % de micropores. Toutefois, cette étude se base sur des résultats obtenus avec des granules de BCP implantées dans une application sans contrainte (os du crâne). Il est aussi important de noter que la forme des pores n'est pas précisée. Kuboki et son (KUB01) équipe comparent entre eux des échantillons en HA, chargés en BMP et implantés chez le rat. On retrouve au sein de ces échantillons des pores tubulaires dont les diamètres respectifs sont de 90 à 120  $\mu\text{m}$  et de 350  $\mu\text{m}$ . Les petits diamètres ont favorisé la formation précoce de cartilage suivi d'une invasion vasculaire tardive qui a initié une ossification endochondrale. Les pores de plus grandes dimensions ont quant à eux permis une invasion vasculaire précoce qui a initié une ostéogénèse directe. Cette étude souligne aussi le fait que dans de nombreux cas, le passage par une étape de chondrogenèse est inévitable d'où l'importance d'une vascularisation suffisante de l'implant afin de permettre la néosynthèse osseuse.

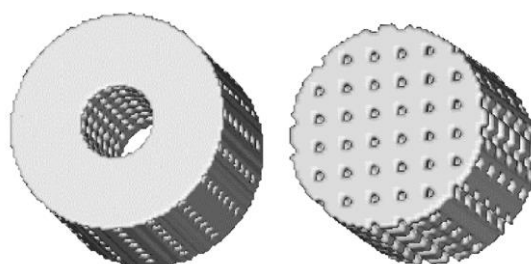
L'adhésion cellulaire est positivement influencée par une surface spécifique élevée. À la longue, cet effet est supplanté par la migration cellulaire au sein du matériau. Or ce sont des tailles de pores élevées qui contribuent à cet effet tardif qu'est la migration des cellules. Il semble donc important de trouver un bon compromis entre surface spécifique et taille de pores. Murphy et ses collègues (MUR10) montrent que pour une gamme de pores allant de 85 à 190  $\mu\text{m}$ , l'échantillon avec des pores de 120  $\mu\text{m}$  présente une meilleure adhésion cellulaire au bout de 48 h, une migration cellulaire plus prononcée et une population plus élevée au bout des 7 jours. Cependant, sur l'ensemble du lot testé, c'est l'échantillon avec des pores de 325  $\mu\text{m}$  qui offre les meilleurs résultats, c'est-à-dire une adhésion, migration et prolifération cellulaire significativement plus élevées que pour les autres échantillons. Cette étude ne fait pas mention de la forme des pores ainsi que de la taille des interconnexions. Murphy *et al.* (MUR10) s'appuient sur les travaux d'O'Brien *et al.* (OBR05) dont l'étude conclut qu'une corrélation linéaire existe entre nombre de cellules adhérentes (MC3T3-E1) et surface spécifique et cela dans les 48 h qui suivent l'ensemencement d'échantillons en glycosaminoglycane et collagène. Il semblerait donc que pour des gammes de taille de pore relativement faibles (< 150  $\mu\text{m}$ ), la surface spécifique joue un rôle prépondérant dans l'adhésion cellulaire dans les 48 h qui suivent l'ensemencement.

La macroporosité doit être suffisante pour favoriser la libre circulation des cellules et nutriments tout en permettant l'évacuation des déchets. Le taux de porosité doit cependant être suffisamment réduit pour ne pas compromettre les propriétés mécaniques de l'implant. La microporosité favoriserait quant à elle, l'attachement cellulaire de façon précoce. Cependant il est difficile de dissocier l'effet de la topographie micrométrique d'une surface spécifique élevée causée par la présence de microporosité. Les conclusions semblent montrer qu'en dessous des 300  $\mu\text{m}$  environ, la formation osseuse est aléatoire. Certaines études vont même plus loin en évoquant le fait qu'au-delà de 350  $\mu\text{m}$ , la taille n'intervient que très peu dans le comportement cellulaire (MAN09) et que la recherche devrait se concentrer sur d'autres paramètres architecturaux tels que la forme des pores, les interconnexions ou la topographie.

### **3.1.3. Les interconnexions**

L'inter connectivité des pores est un facteur clé du devenir, sur le long terme, du matériau. En effet, les cellules osseuses doivent pouvoir circuler librement dans l'ensemble du matériau. Un réseau poreux adapté permettra aussi la libre circulation des éléments nutritifs essentiels (oxygène, nutriments...) à la survie et à la prolifération cellulaire mais aussi des différents facteurs de régulation tels que les hormones et autres cytokines. Il permettra aussi l'élimination des déchets issus du métabolisme cellulaire. La taille des interconnexions ou diamètre de pores accessible est capitale puisque c'est ce paramètre qui va permettre l'accès au cœur de l'implant (JON09). Comme précédemment, la taille limite est imposée par la plus grosse cellule circulante, l'ostéoclaste.

Chu *et al.* (CHU02) comparent 2 structures en HA différentes: une architecture orthogonale avec des pores de 444  $\mu\text{m}$  pour une porosité de 44 % et une architecture radiale avec des pores de 366  $\mu\text{m}$  et une porosité de 38 % (Figure 13).



**Figure 13. Illustration d'un implant à architecture radiale (à gauche) et orthogonale (à droite) (CHU02)**

Les échantillons implantés pendant 9 semaines chez le cochon, montrent clairement le potentiel ostéogénique du matériau. Cependant, la néoformation osseuse diffère dans les 2 échantillons: elle est plus homogène dans l'architecture orthogonale favorisant ainsi la stabilisation mécanique de la zone critique. Il semblerait ici que la structure radiale ne soit

pas hydrodynamiquement favorable à cause de l'absence d'interconnexions entre les porosités, en effet, les fluides biologiques y circulent mal.

Lu *et al.* (LU99) montrent, *in vivo*, qu'à partir de 20  $\mu\text{m}$  les interconnexions sont suffisantes pour permettre l'invasion de l'échantillon (50 % de porosité avec des pores de 100 à 300  $\mu\text{m}$  et un diamètre d'interconnexion allant de 19 à 216  $\mu\text{m}$  environ) et la prolifération dans les macropores, cependant la valeur optimale se situe aux alentours de 40  $\mu\text{m}$ . *In vivo*, ces recherches montrent que les interconnexions de 20  $\mu\text{m}$  favorisent l'apparition d'un tissu chondroïde et que ce n'est qu'au-delà de 50  $\mu\text{m}$  que la néo-ostéogénèse est favorisée. Ces résultats mettent en avant la nécessité d'optimiser les interconnexions. Un autre aspect mis en avant par l'étude est la densité d'interconnexion. Il semblerait ainsi qu'une densité élevée favoriserait la libre circulation des fluides biologiques et donc l'interaction avec la céramique.

Flautre *et al.* (FLA01) comparent, *in vivo*, des implants en HA avec une taille de pore fixe (175 – 260  $\mu\text{m}$ ) mais avec des tailles d'interconnexions qui varient (30, 60, 100, 130  $\mu\text{m}$ ). Les résultats montrent clairement que l'infiltration des implants par du tissu ostéoïde est optimale pour des diamètres d'interconnexion de 130  $\mu\text{m}$ . Jones *et al.* (JON09) montrent que pour un diamètre de pores accessible supérieur à 100  $\mu\text{m}$  la croissance osseuse est favorisée.

Les études citées ci-dessus soulignent l'importance d'un réseau poreux interconnecté. Un diamètre de l'ordre de la centaine de micromètre semble être propice à une invasion cellulaire efficace et, *in fine*, une bonne néo formation osseuse.

### **3.1.4. Géométrie**

De nombreuses formes de pores ont été testées et ce avec des résultats différents et parfois même contradictoires.

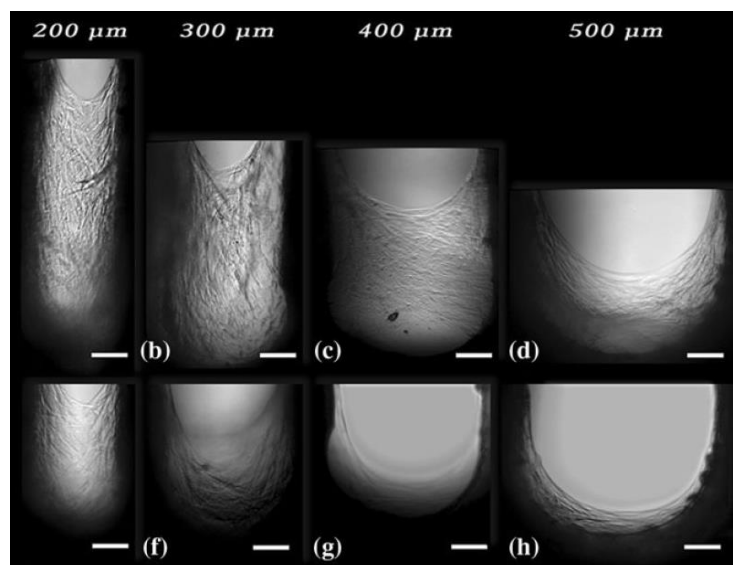
Kumar et son équipe (KUM11) génèrent 5 types d'architecture en polymères grâce à 5 techniques de mise en forme différentes. On retrouve des structures lisses, aléatoires ou fibreuses. Les conclusions de cette étude sont les suivantes :

- à chaque structure peut être associée une signature génétique unique ;
- la morphologie cellulaire varie en fonction du support de culture ;
- les CSMH sont plus sensibles à l'architecture qu'à la composition du support de culture. De plus les cellules les plus engagées dans la voie ostéogénique sont celles

que l'on retrouve sur l'échantillon avec des fibres nanométriques obtenues par electrospinning<sup>13</sup>.

Cette étude souligne le fait qu'il est possible grâce à une architecture adaptée de diriger la différenciation cellulaire.

Knychala et al, (KNY13) comparent entre eux des pores de différentes largeurs dans un ciment à base d' $\alpha$ -TCP (Figure 14).



**Figure 14. Images de microscopie optique montrant la croissance cellulaire en fonction de la largeur des pores (200 à 500 µm). Barres d'échelle : 100 µm (KNY13)**

Il en ressort de cette étude que plus la largeur du pore est faible plus la prolifération cellulaire est importante. En effet, le rayon de courbure de l'amas cellulaire qui forme le front de prolifération semble diriger la prolifération cellulaire : plus elle est faible plus la prolifération est élevée. L'adhésion cellulaire va permettre à la cellule de sonder son environnement grâce à ces protéines d'adhésion et de percevoir certaines caractéristiques du support telles que le rayon de courbure. En effet les protéines transmembranaires qui permettent l'attachement, sont reliées au cytosquelette de la cellule. Le cytosquelette est un système cytoplasmique composé de différents filaments protéiques conférant à la cellule sa forme, sa capacité à se mouvoir mais aussi à se diviser. Les principaux composants de ce système sont les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires (ALB11). En fonction de son positionnement, la cellule va exercer sur son cytosquelette une certaine tension qui a un impact sur la prolifération cellulaire. En effet plus celle-ci est forte plus la prolifération est stimulée.

<sup>13</sup> Electrospinning : procédé de mise en forme des polymères permettant la fabrication de membrane non tissée à partir de polymère à l'état fondu ou en solution.

Bidan *et al.* (BID12) (BID13) arrivent aux mêmes conclusions : une architecture poreuse concave qui permet de mettre en tension le réseau de filaments d'actine grâce aux points focaux d'adhésion, favorise la prolifération cellulaire. Cette géométrie poreuse influe aussi le volume de tissu formé. Lasgorceix *et al.* (LAS14) observent que la colonisation cellulaire des pores de petites tailles ( $0,37 \text{ mm}^2 > \text{surface} > 0,24 \text{ mm}^2$ ) semble peu impactée par la forme des pores contrairement aux pores de grandes dimensions ( $1,12 \text{ mm}^2 > \text{surface} > 0,423 \text{ mm}^2$ ). Sur le schéma (Figure 15) suivant on peut voir les différentes formes de pores testées ainsi que les valeurs du taux de recouvrement de chaque pore sur une période de 14 jours.

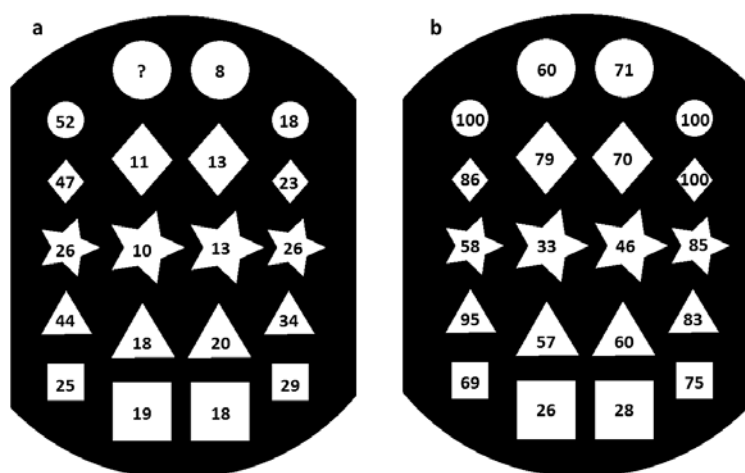
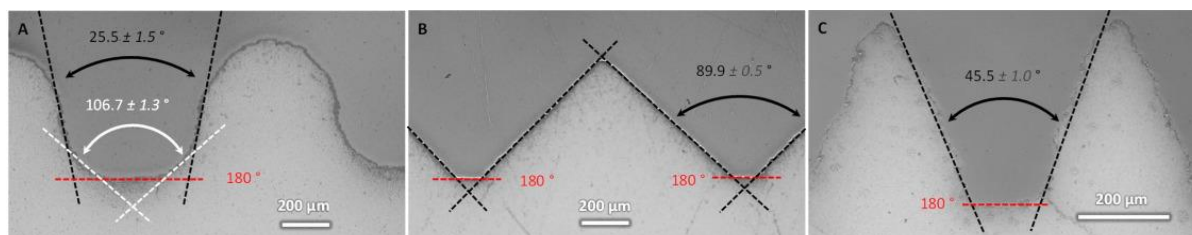


Figure 15. Schéma des échantillons sur lequel sont reportées les valeurs du taux de recouvrement du pore à 7 jours de culture (a) et 14 jours de culture (b)

En effet, c'est au niveau d'angles saillants ( $0$  à  $180^\circ$ ), que la prolifération cellulaire *in vitro* (MC3T3-E1) se fait préférentiellement. Cette dernière semble être inhibée par des angles rentrants ( $180$  à  $360^\circ$ ) mais également par la présence de bords plans. Cette différence est particulièrement visible pour les macropores en forme d'étoile. Les meilleures progressions du taux de recouvrement sont observées pour les macropores triangulaires, circulaires et en forme de losange. Les conclusions de ses travaux rejoignent ceux des études citées plus haut. Juignet et son équipe (JUI17) nous font part de l'importance de l'angle d'ouverture des pores. 3 échantillons différents en HA et présentant des sillons à leur surface sont fabriqués et utilisés comme supports de culture *in vitro*.



Les sillons diffèrent les uns des autres de par le motif et de par la période de répétition de ce dernier comme l'illustre la Figure 16.



**Figure 16. Micrographies ayant permis la mesure de l'angle d'ouverture des sillons sur les 3 échantillons : (A) sinusoïdale de période  $2\pi$ , (B) triangulaire de période  $2\pi$  et (C) triangulaire de période  $\pi$  (JUI17)**

Il semblerait ici que la différenciation des cellules (cellules osseuses issues de la calvaria de la souris) est influencée par l'angle d'ouverture des sillons. Ainsi, plus cet angle est faible plus la différenciation cellulaire est avancée. Urquia Edreira *et al.* (URQ16) comparent entre eux des supports de culture cellulaire présentant des concavités de dimensions différentes : 440  $\mu\text{m}$ , 800  $\mu\text{m}$  et 1800  $\mu\text{m}$ . Ils concluent que plus cette concavité a un diamètre faible (440  $\mu\text{m}$ ) plus celle-ci va favoriser la prolifération et la différenciation cellulaire. Cet effet est imputé à la multiplication des interactions inter-cellules dans un espace confiné. Les diamètres élevés (1800  $\mu\text{m}$ ) ne permettent pas aux cellules de détecter la courbure du pore dans lequel elles sont cultivées. Il semblerait donc que la croissance cellulaire dépend d'une composante mécanique. La mise en tension du cytosquelette par le rayon de courbure d'un pore (filament d'actine) semble stimuler la croissance cellulaire *in vitro* et l'invasion tissulaire *in vivo*. Rumpler *et al.* (RUM08) rapportent dans l'une de leurs études les liens de proportionnalité qui lient quantité de tissu formée au rayon de courbure des pores. Afin de stimuler la croissance cellulaire, la forme de pore doit être concave avec un rayon de courbure suffisamment faible pour mettre en tension le cytosquelette, encourager la prolifération et favoriser les interactions entre cellules.

Magnaudeix *et al.* (MAG16) nous montrent que la géométrie a aussi un impact sur la vascularisation d'un implant. Les tests sont effectués *in vitro* sur des échantillons présentant le même type de pore que la Figure 15. L'angiogenèse a été évaluée sur des échantillons macroporeux en contact avec la membrane chorioallantoïdienne<sup>14</sup> d'un embryon de poussin. Il en ressort que les angles aigus ou saillants favorisent l'angiogenèse et donc la vascularisation de l'échantillon. Comme expliqué précédemment, la vascularisation est une étape importante de l'assimilation du matériau par l'organisme. Il convient donc de générer

<sup>14</sup> Membrane chorioallantoïdienne : membrane extra embryonnaire, richement vascularisée que l'on retrouve chez les oiseaux et les reptiles. Cette membrane sert de modèle, en biologie, pour l'étude de l'angiogenèse.

une structure poreuse, concave, de taille et de forme adaptées et présentant des angles saillants.

### ***3.1.5. Microporosité et topographie de surface***

De nombreuses études soutiennent le rôle prépondérant de la surface spécifique sur l'adsorption protéique et donc sur l'adhésion cellulaire. Or la surface spécifique est indissociable de la taille de pores : plus celle-ci est faible, plus la surface spécifique est élevée.

Hornez *et al.* (HOR07) comparent l'effet de la micro (1 à 10  $\mu\text{m}$ ), meso (10 à 50  $\mu\text{m}$ ), macroporosité (500 à 600  $\mu\text{m}$ ) et l'absence de porosité sur la colonisation, par des MC3T3-E1, d'échantillons en hydroxyapatite. La conclusion de cette étude est la suivante: la microporosité a une influence positive sur le développement cellulaire. Au bout de 3 jours de culture, les meilleurs résultats (prolifération) sont observés sur l'échantillon microporeux. Cette conclusion peut être corrélée avec la surface spécifique accessible aux cellules. Habibovic *et al.* (HAB05) démontrent que la présence de microporosités dans les parois des macroporosités des implants est nécessaire, si ce n'est indispensable pour rendre le matériau ostéoinductif chez la chèvre. Les échantillons diffèrent les uns des autres de par leur composition (BCP VS HA) et de par leur température de frittage. Les meilleurs résultats sont issus des échantillons en BCP microporeux. Cela semble s'expliquer par le fait qu'une surface spécifique importante et une solubilité élevée va permettre de créer un environnement idéal pour les cellules ostéogéniques. Une étude (WOO07) *in vivo* compare 2 implants macroporeux (250-350  $\mu\text{m}$ ) chargés en rhBMP-2 (*recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2*). Les 2 implants diffèrent de par la présence, dans les macroporosités d'un des implants, d'une microporosité allant de 2 à 8  $\mu\text{m}$ . Cette dernière se révèle nécessaire à la néoformation osseuse. Cette étude souligne l'importance de la microporosité sur l'attachement cellulaire et *in fine*, sur la croissance et la colonisation de l'implant par les cellules. Il est important de noter, dans cette étude et bien d'autres encore, que la microporosité peut être associée à des « rugosités » micrométriques de la topographie.

Curtis *et al.* (CUR97) et plus récemment Carvalho *et al.* (CAR16) ont montré dans leurs travaux les effets évidents et bénéfiques de structures micrométriques. Carvalho *et al.* montrent que la présence de structures micrométriques était suffisante pour induire la différenciation ostéoblastique de CSMH. Deux types de structures sont comparés : des lignes et des piliers. Il ressort que ce sont les piliers qui permettent d'avoir de meilleurs résultats cellulaires, *i.e.* une différenciation cellulaire plus marquée. L'équipe de Faia-Torres (FAI15) rapporte des résultats similaires. Des substrats polymériques avec un gradient de

topographie leur permettent ensuite d'étudier l'impact de cette topographie sur la différenciation de CSMH en présence ou en l'absence de facteurs ostéogènes. Les structures micrométriques (3 à 5  $\mu\text{m}$ ) permettent d'orienter la différenciation cellulaire en l'absence de molécules ostéogènes.

Wang *et al.* (WAN04) remettent en question certains des résultats précédents concernant l'importance de la microporosité. Ils comparent entre eux, des échantillons en HA frittés à différentes températures, *in vitro*. L'échantillon fritté à 1200°C, présentant les plus gros grains et la plus faible microporosité, favorise la prolifération cellulaire ainsi que la synthèse de protéines osseuses telles que la sialoprotéine osseuse. Ces résultats concordent avec ceux de l'équipe de Frayssinet *et al.* (FRA97). Ce dernier élabore des échantillons en HA frittés à différentes températures afin de générer des tailles de grains et de microporosités différentes. Les résultats préliminaires montrent que la prolifération s'améliore pour des températures de frittage élevées. C'est le même constat lorsque les cellules sont cultivées dans le même milieu de culture que les échantillons en HA mais sans contact direct. Il semblerait donc que cette microporosité peut être délétère aux bonnes conditions de prolifération des cellules, puisqu'elle contribue à une surface spécifique élevée qui va modifier le milieu de culture à cause des échanges. Klenke et son équipe (KLE08) relèvent l'effet délétère que peut avoir une surface spécifique élevée : plus cette dernière est élevée plus la formation osseuse à l'intérieur et à l'extérieur de l'implant est faible.

Bignon et son équipe (BIG03) observent quant à eux, que la microporosité est facultative et qu'à long terme (28 jours), la prolifération cellulaire est aussi efficace sur un implant avec seulement 2 % de microporosité dans les parois des macropores (600 à 1250  $\mu\text{m}$  et 300 à 600  $\mu\text{m}$ ).

Il est important de noter que certaines des études précédentes ((WAN04)(BIG03)) ne présentent que des résultats à long terme et il se peut que l'effet bénéfique à court terme de la microporosité ait été occulté. Il semblerait en effet qu'une hydroxyapatite microporeuse (12,5 % de porosité) va favoriser, sur les premières 24 h, l'attachement cellulaire (SaOS-2). Cette tendance s'inverse au bout de 4 jours et c'est l'hydroxyapatite peu microporeuse (2,5 % de porosité) qui présente une meilleure adhésion cellulaire (ROU06).

L'adsorption protéique et donc l'adhésion cellulaire est aussi influencée par des structures nanométriques. La rugosité d'une céramique va dépendre de la taille des grains et des cristallites. Afin d'étudier l'impact de la rugosité sans que le matériau ait un quelconque impact, Dos Santos *et al.* (SAN08) recouvrent d'une feuille d'or 2 échantillons de phosphate de calcium nanométrique. L'adsorption protéique est meilleure sur les échantillons avec un Ra de 32 nm (HA) que sur ceux dont le Ra est de 142 nm (TCP). Selon cette équipe la

rugosité a une plus grande influence que la composition chimique du substrat. Webster *et al.* quant à eux, (WEB00) montrent que l'adsorption est meilleure sur des échantillons en HA avec des grains de 67 nm et un Ra de 17 nm par rapport à des échantillons avec des grains de 179 nm et un Ra de 10 nm. Cette étude met en avant le fait qu'une nano rugosité élevée favorise l'adhésion cellulaire. Li *et al.* (LI012) comparent des échantillons en BCP avec des tailles de grains différents : 86, 167 et 768 nm. Ils trouvent que l'adsorption protéique (BSA et lysozyme) est meilleure sur l'échantillon avec les grains les plus fins. Ces études semblent indiquer que des rugosités inférieures à 100 nm sont favorables à une bonne adsorption protéique.

La microporosité et la topographie influencent le comportement cellulaire. Elles favorisent l'adsorption protéique et donc l'adhésion cellulaire. Dans certains cas, la microporosité confère au matériau des propriétés ostéoinductives et elle permet dans d'autres cas de diriger la différenciation cellulaire. Encore une fois, il est difficile de dégager des valeurs précises pouvant faire l'objet d'un consensus. Cependant, il est clair que les structures micrométriques et nanométriques ont un impact non négligeable sur le comportement cellulaire vis à vis du matériau.

### **3.2. Conclusion**

L'importance d'une macroporosité interconnectée est évidente. Les interconnexions servent de voies de passages aux cellules et de circulation aux nutriments et aux déchets. Les macroporosités sont quant à elles le siège de la néoformation osseuse. Il semble donc évident d'optimiser ces paramètres architecturaux dans le but de provoquer une réponse positive de l'organisme. Les articles ci-dessus semblent mettre en avant le fait qu'une architecture multi échelle contrôlée et maîtrisée serait suffisante pour orienter le devenir cellulaire limitant ainsi l'utilisation de facteurs ostéogéniques tels que les BMPs.

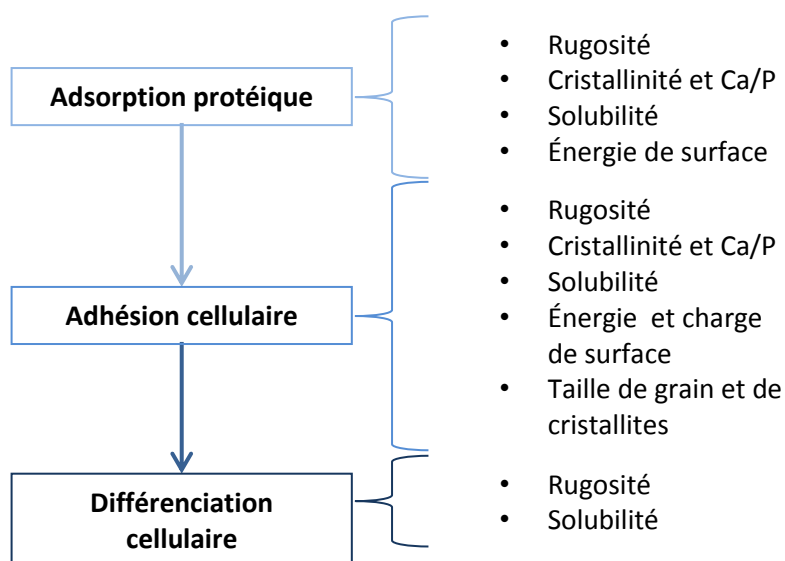
Il existe de nombreuses études dans ce domaine et on y trouve de nombreuses contradictions qui rendent difficile l'établissement d'un consensus. Cependant, une certaine tendance se profile : un diamètre de pore  $\geq 300 \mu\text{m}$ , un diamètre d'interconnexion de l'ordre d'une centaine de micromètres, un taux de porosité relativement faible (entre 40 et 50 %) pour ne pas compromettre les propriétés physiques de l'implant et une distribution spatiale des pores homogènes. Il convient donc de choisir et de maîtriser correctement les méthodes de mise en forme. Les conclusions pointent vers des tailles de pores suffisantes pour permettre la libre circulation des cellules mais suffisamment faibles pour contribuer à une surface spécifique élevée ce qui permettra une bonne adhésion protéique et *in fine* une bonne adhésion cellulaire.

## Chapitre 1 : Étude bibliographique

Pour conclure, les dimensions qui caractérisent l'architecture poreuse doivent être cohérentes avec celles des cellules. En effet si ces dimensions ne sont pas adaptées, les cellules ne percevront pas les caractéristiques architecturales susceptibles d'avoir, sur elles, une influence positive.

#### 4. Comportement du matériau en milieu physiologique

L'implantation d'élément étranger, initiée chez l'hôte, provoque une réaction immunitaire. Cette réaction peut être délétère à l'intégration du matériau ou, au contraire, la favoriser. Un matériau dit biocompatible provoque chez l'hôte une réponse positive dont le résultat est son acceptation et son intégration par les tissus environnants. La procédure chirurgicale qui permet la pose de la greffe est presque toujours suivie par une réaction inflammatoire locale qui vise à initier une réponse immunitaire. Les premiers événements notables lorsqu'une céramique est en contact avec les fluides biologiques sont les échanges ioniques et l'adsorption protéique (KES03) (FRA11) (DUC99). De nombreuses protéines, telles que des molécules d'adhésion de la MEC, le fibrinogène<sup>15</sup> et des molécules régulatrices se retrouvent ainsi à la surface du matériau. Cette couche va changer les propriétés surfaciques du matériau. Le résultat est une nouvelle interface entre l'organisme et l'implant. L'adhésion cellulaire se fait via des interactions entre les protéines adsorbées et les cellules. L'adsorption protéique dépend de nombreux facteurs tels que la rugosité, la porosité, la charge de surface, la solubilité du matériau et l'environnement biologique dans lequel il se trouve (Figure 17).



**Figure 17. Schéma récapitulatif des différentes propriétés du matériau qui ont un impact sur la cascade d'événements biologiques qui commence par l'adsorption protéique, suivi de l'adhésion cellulaire et enfin de la différenciation (SAM13)**

L'adhésion des cellules se fait essentiellement via des intégrines<sup>16</sup> qui se lient aux molécules de la MEC telles que le collagène, la fibronectine ou la vitronectine. Parmi ces cellules, on retrouve des cellules immunocompétentes qui agissent dans le cadre de la réaction inflammatoire et de la réponse immunitaire. Leur recrutement s'effectue grâce à des molécules chimiotactiques secrétées par les cellules se trouvant sur le site de l'implantation.

<sup>15</sup> Fibrinogène : glycoprotéine qui une fois activée participe activement à la coagulation du sang.

<sup>16</sup> Intégrines : protéines d'adhésion transmembranaires impliquées dans l'adhésion cellule/MEC et cellule/cellule.

Au même titre que l'adsorption protéique, l'adhésion cellulaire va dépendre des propriétés physico-chimiques du matériau (Figure 17).

#### **4.1. Le phosphate tricalcique beta**

Dans le cas du  $\beta$ -TCP, les changements des propriétés interfaciales par l'accumulation de protéines va permettre la précipitation d'une couche d'apatite biologique par phénomène de dissolution/précipitation (BOH09). Cette couche est, selon Kokubo et Takadama (KOK06), essentielle à la bioactivité du matériau et joue un rôle prépondérant dans sa biointégration. Parallèlement, on assiste au recrutement par chimiotactisme de cellules osseuses qui prennent en charge le remodelage du matériau. Le  $\beta$ -TCP est un matériau résorbable. C'est-à-dire qu'au fur et à mesure du temps, il sera dégradé et remplacé par du tissu néoformé. Il existe 3 mécanismes de dégradation/résorption :

- la dissolution du matériau ;
- le remodelage du matériau par les cellules qui est le mécanisme majoritaire et celui principalement visé par les chercheurs ;
- rupture de l'implant.

Les propriétés du matériau et celles des fluides biologiques avec lesquels il est en contact vont favoriser les échanges ioniques. Ces derniers sont inévitables et permettent de conditionner et de préparer le matériau à accueillir des cellules. Les ions libérés ne sont pas toxiques et sont pour certains comme le calcium ou le phosphore sous le contrôle de l'homéostasie ionique de l'hôte. Le deuxième mécanisme, suit le premier et est tributaire des propriétés physico-chimiques du matériau et des cellules ostéocompétentes. Ce mécanisme est contrôlé et régulé. Le dernier mécanisme de dégradation est très minoritaire, non contrôlé, et peut dans certains cas générer des débris inflammatoires aux conséquences potentiellement graves. Ce dernier mécanisme de dégradation est à éviter alors que les 2 premiers sont essentiels à la bonne intégration du matériau.

Le devenir des cellules adhérentes est très dépendant de l'environnement ionique et de la MEC. Les ostéoblastes, par exemple sont sensibles à la présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (MAE05). Un des rôles de l'hormone parathyroïdienne est de maintenir un taux de  $\text{Ca}^{2+}$  sérique suffisant pour préserver le volume de MEC sécrété lors de la synthèse osseuse (BLA02). Lors de la différenciation de CSMH, on observe la synthèse de protéines associées à l'ion calcium et à l'incorporation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la MEC (TIT07). L'ion phosphate quant à lui impacte directement les gènes impliqués dans la minéralisation de la MEC. Ainsi une augmentation dans la concentration en phosphate inorganique, va favoriser l'expression de protéines non collagéniques telles que la protéine GLA de la MEC et l'ostéopontine. De plus, l'hydrolyse du

pyrophosphate, par les phosphatases alcalines ostéoblastiques, en phosphate inorganique va favoriser la calcification de la MEC grâce à la suppression de l'effet inhibiteur du pyrophosphate et à l'augmentation du taux local de phosphate (KHO11) (MAR01). L'interaction entre MEC et cellules est indispensable à la différenciation ostéoblastique. C'est notamment grâce aux points d'adhésion focaux que la MEC et la topographie ont un impact sur la fonctionnement cellulaire (SAM13).

#### 4.2. Conclusion

La prise en charge du matériau par l'organisme va donc dépendre dans un premier temps des interactions avec le milieu physiologique. Les modifications ainsi initiées vont permettre l'adsorption protéique, le recrutement de cellules compétentes qui se différencieront et prendront en charge le devenir du matériau au sein de l'organisme (Figure 18). Les propriétés physico-chimiques doivent être maîtrisées au même titre que la mise en forme du matériau.

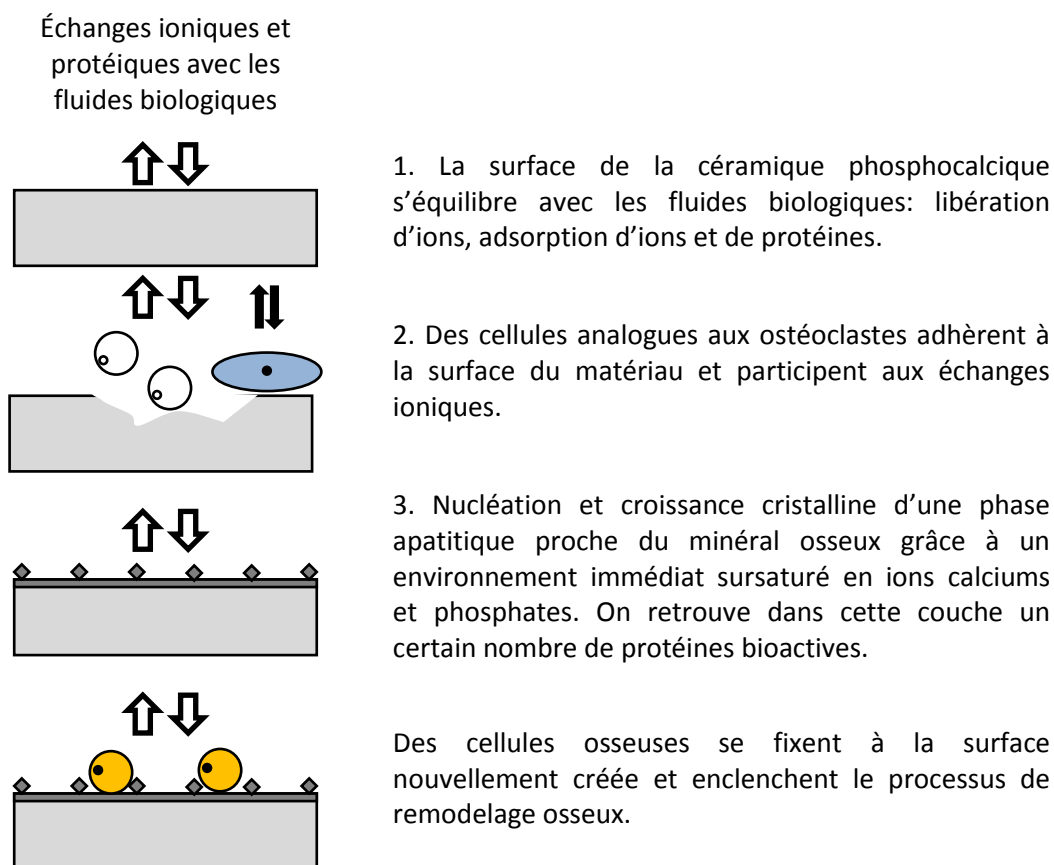


Figure 18. Récapitulatif des changements qui s'opèrent à la surface d'une céramique phosphocalcique dans le milieu physiologique (adapté de (COM13))



## 5. Procédés de mise en forme

L'obtention d'un matériau poreux répondant à des critères bien précis réside dans la maîtrise des procédés de mise en forme. Les techniques de mise en forme de la céramique sont nombreuses et présentent, chacune, des avantages et des inconvénients. Les procédés choisis doivent donc permettre une bonne maîtrise de l'architecture de l'implant et cela à plusieurs échelles. Cependant d'autres exigences sont à respecter (LEO03) :

- préservation des propriétés chimiques du matériau ainsi que de sa biocompatibilité,
- maîtrise du taux de porosité, de la taille, de la forme et de l'interconnexion des pores ;
- contrôle des propriétés mécaniques de la pièce ;
- procédé suffisamment polyvalent pour permettre l'adaptation de l'implant au site d'implantation ;
- procédé adaptable à des matériaux ou des configurations différentes ;
- reproductibilité, coût et durée.

L'émergence d'applications nécessitant l'utilisation de céramiques poreuses a permis le développement de nombreuses techniques de mise en forme (STU06) (OHI12) (Figure 19).

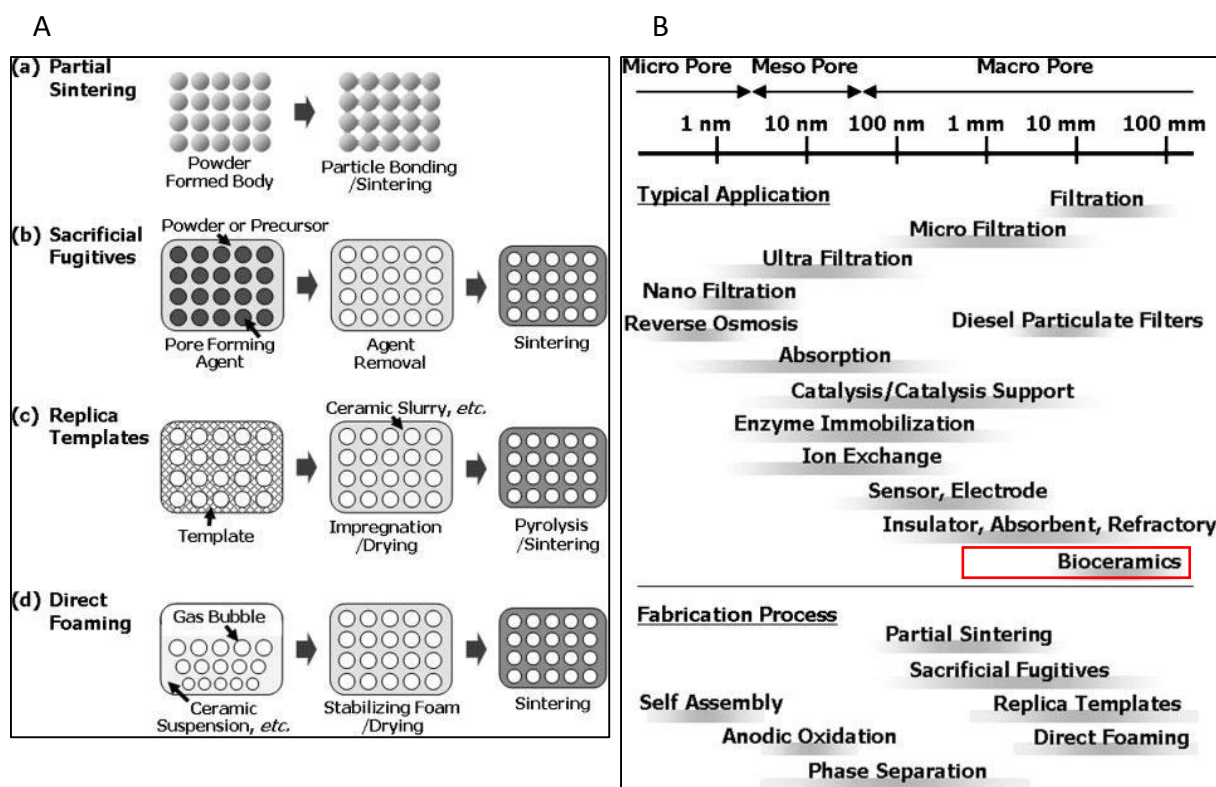


Figure 19. (A) récapitulatif de différents procédés de mise en forme ainsi que de leurs principes et (B) classification de matériaux céramiques en fonction du diamètre de pores, de l'application et des procédés fabrication. Le rectangle délimite la gamme de dimensions et les techniques de fabrication

## Chapitre 1 : Étude bibliographique

La méthode la plus directe consiste à fritter partiellement une pièce en céramique afin de générer de la porosité. Cette dernière est tributaire :

- de la taille des grains de départ : le diamètre des grains doit être 2 à 5 fois plus élevé que la taille de pore voulue ;
- des caractéristiques de la pièce crue : les additifs ainsi que la densité du matériau vont influencer la taille de pores ;
- du frittage : une température élevée et un traitement de longue durée va favoriser la densification de la pièce et donc la diminution du taux de porosité.

Néanmoins, les taux de porosité générés sont faibles, inférieurs à 50 % en général.

L'imprégnation de réplique est une méthode simple et flexible qui s'adapte à toutes les céramiques. Les répliques peuvent être d'origine naturelle (corail, bois...) ou d'origine synthétique (éponge en polyuréthane, assemblage de billes en polymères...). L'élimination de cette préforme laisse place à une réplique en céramique présentant, le plus souvent, un volume poreux relativement important avec des pores interconnectés. Cette méthode est limitée par la relative simplicité architecturale des préformes obtenues. Le mode d'élimination des préformes varie en fonction du matériau utilisé et peut, dans certains cas, être problématique. En général, un traitement thermique adapté est suffisant pour une élimination propre et efficace de l'élément sacrificiel.

Les céramiques poreuses peuvent être obtenues par l'utilisation d'agents sacrificiels, les porogènes (LIU99). Ces derniers existent sous plusieurs formes et dimensions. Les porogènes sont généralement classés en 4 grandes familles:

- les organiques naturels : fibre de cellulose, amidons, sucres, etc. ;
- les organiques synthétiques : PMMA, PVC, Nylon, etc. ;
- les métaux et autres matériaux inorganiques : nickel, carbone (fibre, nanotubes), sels, etc. ;
- les liquides : eau, émulsions (huiles), etc.

Les moyens mis en œuvre pour éliminer les porogènes sont variables et vont dépendre de la nature physico-chimique de ces derniers. De manière générale, la pyrolyse est le moyen d'élimination le plus souvent employé. Le traitement thermique doit être adapté au porogène et prendre en compte les dégagements gazeux résultants. Il est important de noter que l'élimination de certains des produits cités plus tôt entraîne la formation de produits toxiques pour l'opérateur et son environnement. De ce point de vue, l'utilisation de glucide, tels que l'amidon et la cellulose, ou d'eau présentent de nombreux avantages.

Le moussage consiste à incorporer dans une suspension de céramique de l'air ou un gaz. Cependant la présence de bulles et donc d'interfaces gaz/liquide est à l'origine d'instabilités thermodynamiques favorisant la coalescence des bulles. L'utilisation de tensioactifs peut résoudre ce problème.

Le Tableau 10 fait état de techniques de mise en forme basées sur l'utilisation de répliques, de phases sacrificielles ou encore des mousses.

	<b>Méthode</b>	<b>Porosité (%) / Diamètre de pore (µm)</b>	<b>Distribution de la taille de pores</b>	<b>Forme de pores</b>	<b>Distribution spatiale</b>
<b>Réplique</b>	Éponge en PU	40 à 95 / 150 à 1300	Large	Aléatoire	Anisotropique
	Corail	20 à 50 / 150 à 500	Large	Aléatoire	Anisotropique
	Bois	25 à 95 / 10 à 300	Trimodale	Allongée	Colonnaire
<b>Phase sacrificielle</b>	Bille de PMMA	25 à 90 / 250 à 1000	Monomodale ou multimodale	Sphérique	Isotropique
	Moussage congélation	50 à 95 / 2 à 90	Bimodale	Sphérique	Isotropique
	Congélation orientée	30 à 65 / 5 à 200 de largeur 10 à 500 de longueur	Monomodale	Ellipsoïdale	Colonnaire
<b>Moussage direct</b>	Avec surfactant	40 à 95 / 30 à 1000	Large	Sphérique	Isotropique
	Avec particules	40 à 90 / 20 à 300	Large	Sphérique	Isotropique
	Gel casting	40 à 90 / 100 à 1000	Large	Sphérique	Isotropique

Tableau 10. Récapitulatif des techniques de mise en forme de céramiques ainsi que leurs caractéristiques

Certaines méthodes additives peuvent être utilisées pour fabriquer des pièces poreuses. La fabrication additive s'appuie sur des données informatiques. Un modèle numérique de l'objet est réalisé par conception assistée par ordinateur (CAO). De ce modèle découle le fichier STL (pour STéréoLithographie) qui est ensuite décomposé en une succession de sections/plans parallèles d'épaisseur constante perpendiculaire à l'axe de la hauteur (axe z). Ce « tranchage » va permettre la fabrication couche par couche de la pièce.

Le Tableau 11 fait état de différentes techniques de mise en forme par fabrication additive utilisées pour les céramiques.

Fabrication additive	Tolérance (mm)	Avantages	Inconvénients
<b>Extrusion de matériau</b>	0,5 à 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bonnes propriétés mécaniques</li> <li>Pas de perte de matière</li> <li>Support facile à enlever</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Précision limitée pas le diamètre de la buse d'extrusion</li> </ul>
<b>Procédé SLS (Selective Laser Sintering)</b>	0,2 à 0,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cadence de production élevée</li> <li>Architecture complexe</li> <li>Cout faible</li> <li>Bon état de surface final</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rugosité de surface élevée</li> <li>Propriétés mécaniques médiocres</li> <li>Limitée aux matériaux absorbants les IR</li> </ul>
<b>Projection de liant</b>	0,05 à 0,1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Adaptable à de nombreux matériaux</li> <li>Technologie simple</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rugosité de surface élevée</li> <li>Technologie chère</li> <li>Propriétés mécaniques médiocres</li> <li>Nécessite l'utilisation de liants organiques</li> </ul>
<b>Stéréolithographie</b>	0,01 à 0,1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Architecture complexe</li> <li>Bon état de surface final</li> <li>Bonnes propriétés mécaniques</li> <li>Précision élevée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Résines photosensibles chères</li> <li>Étapes de nettoyage nécessaires</li> <li>Contrôle de la précision verticale</li> </ul>

Tableau 11. Récapitulatif de techniques de mise en forme par fabrication additive, leurs avantages et inconvénients (adapté de (CHA15))

Dans le cadre de cette étude, les méthodes de mises en forme ont été choisies de par leur aptitude à générer des architectures poreuses différentes et maîtrisées :

- imprégnation d'une préforme polymérique en moule de plâtre ;
- congélation orientée d'une barbotine ;
- stéréolithographie.

Il est important de noter que chaque technique possède des contraintes qui leur sont inhérentes. La barbotine doit donc être optimisée en fonction de chacune des méthodes. Dans les 3 cas, la suspension est réalisée en milieu aqueux. L'eau est un milieu de

suspension bon marché, non toxique et facile à mettre en œuvre. L'incorporation d'additifs est indispensable afin d'obtenir une suspension stable. Ces adjuvants vont permettre l'obtention d'une suspension présentant une faible viscosité avec un haut taux de matière sèche d'une part et d'autre part une manipulation aisée de la pièce lors du démoulage et des autres opérations de post-coulage. Au même titre que les porogènes ou les préformes, mais dans une moindre mesure, le traitement thermique de la pièce doit prendre en compte la présence d'adjuvants.

### 5.1. Imprégnation d'une préforme en PMMA par une suspension de $\beta$ -TCP

Cette technique de mise en forme repose sur 2 grandes étapes : (1) la fabrication contrôlée d'une préforme en bille de polymère et (2) son imprégnation par une suspension stable (Figure 20).

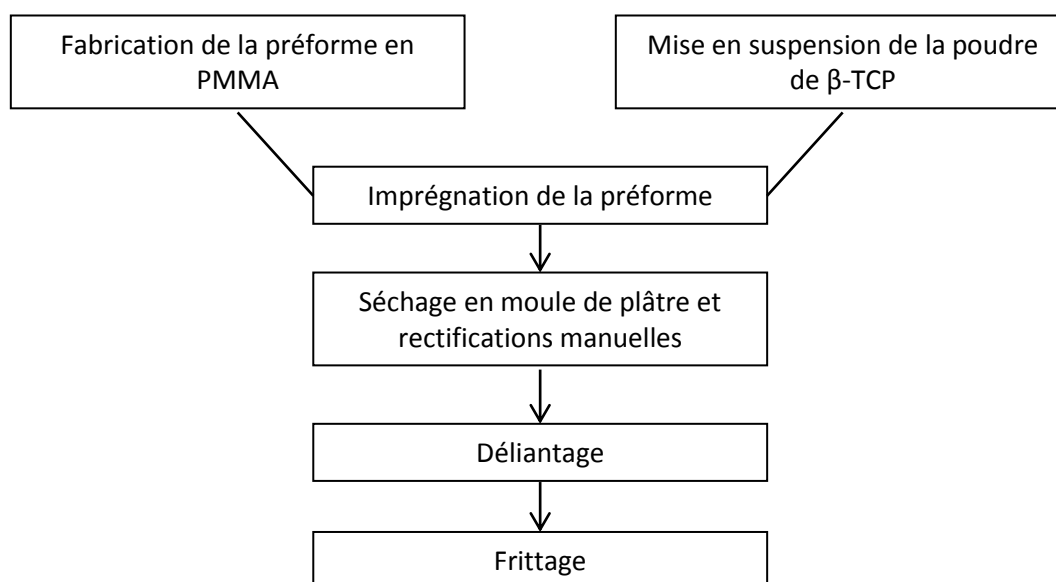


Figure 20. Récapitulatif des différentes étapes de l'imprégnation d'une préforme polymérique

#### 5.1.1. Fabrication de la préforme

Cette méthode consiste à imprégner par une barbotine optimisée, une structure poreuse constituée de billes en PMMA (Diakon TM Ineos Acrylics, Holland) interconnectées dans un moule en plâtre. Les billes sont regroupées par gammes granulométriques grâce à une colonne de tamisage.

Le PMMA a été choisi car il est soluble dans de nombreux solvants organiques (acétone, éthanol...) et parce qu'il a aussi l'avantage d'être facilement éliminable par un traitement thermique adapté. Afin de fabriquer la préforme, on utilise des billes de PMMA d'une distribution granulométrique connue. Les billes de PMMA sont soudées entre elles

chimiquement via l'utilisation d'un solvant organique, ici, un mélange eau/acétone (25 % / 75 % vol.). Ce dernier va permettre la dissolution lente et superficielle des billes (Figure 21.a). L'application d'une pression légère via un piston permet la fusion partielle des billes au niveau des points de contact. La coalescence partielle des billes entraîne une diminution de la hauteur totale de l'édifice (Figure 21.b). On peut, grâce aux travaux de Descamps *et al.* (DES08), corrélérer cette valeur de retrait au diamètre d'interconnexion des billes de PMMA.

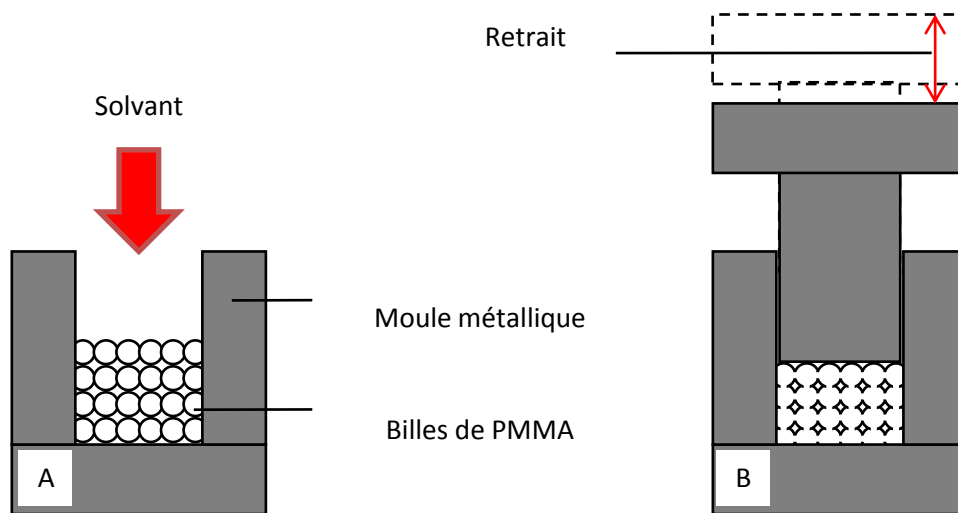


Figure 21. Élaboration d'une préforme en billes de PMMA : (A) mise en contact des billes avec le solvant et (B) coalescence des billes et retrait de l'édifice

Deux méthodes sont proposées : la première est empirique et la deuxième est un modèle géométrique qui s'appuie sur l'arrangement théorique de billes de dimensions connues.

#### 5.1.1.1. Modèle empirique

Le modèle empirique (Équation 9) est obtenu grâce à des mesures qui ont permis de tracer des courbes de diamètre d'interconnexion en fonction du retrait relatif et cela pour des gammes granulométriques bien précises.

$$\varphi = a \frac{\Delta}{H} + b$$

$\varphi$  : diamètre d'interconnexion

$\Delta$  : retrait mesuré

$H$  : hauteur initiale de l'édifice

$a$  et  $b$  : constantes dépendantes de la gamme granulométrique concernée

Équation 9. Équation du modèle empirique

Le retrait relatif étant le rapport entre le retrait réel et la hauteur, avant retrait, de l'édifice en PMMA. Ces courbes ont pu être associées à des droites (Figure 22) et leurs équations ont pu être déterminées.

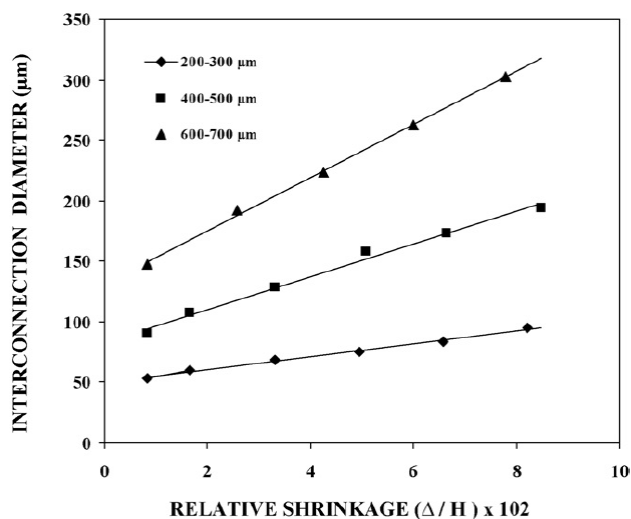


Figure 22. Taille des interconnexions en fonction du retrait relatif du squelette organique

### 5.1.1.2. Modèle Géométrique

La disposition des billes les unes par rapport aux autres va dépendre des différents modes d'empilement compact possible. Descamps *et al.* (DES08) s'appuient ici sur 5 modes d'empilement (Tableau 12). À chaque mode d'empilement est associée une densité relative théorique.

Mode d'empilement	Angles (°)			Densité relative (%)
	Base	Avant	Côté	
Cubique	90	90	90	52,36
Simple couche	90	60	90	60,46
Double couche	90	60	60	69,81
Pyramidale	90	45	45	74,04
Tétraédrique	60	60	60	74,04

Tableau 12. Récapitulatif des différents modes d'empilement possibles pour des sphères ainsi que les densités relatives associées (DES08)

Une série de tests permettant de mesurer la densité d'une quantité donnée de billes de granulométrie connue a permis de remonter à un mode d'empilement : simple couche.

Diamètre de billes (µm)	Densité relative (%)
200-300	58,9
300-400	59,5
400-500	59,4
500-600	59,8
600-700	60,1

Tableau 13. Densité relative mesurée par gamme granulométrique de billes (DES08)

En s'appuyant sur les éléments précédents et en considérant que les interconnexions sont isotropiques entre les billes en contact, une formule préliminaire a été déterminée. Cette dernière a ensuite été affinée en confrontant ces résultats à ceux du modèle empirique (Équation 10).

$$\varphi = 2\bar{r} \sqrt{1 - \left(1 - \frac{\Delta}{H} - \frac{2\bar{r}}{3H}\right)^2}$$

$\varphi$  : Diamètre d'interconnexion

$H$  : Hauteur initiale de l'édifice

$\Delta$  : Retrait mesuré

$\bar{r}$  : Diamètre moyen des billes

Équation 10. Équation du modèle géométrique

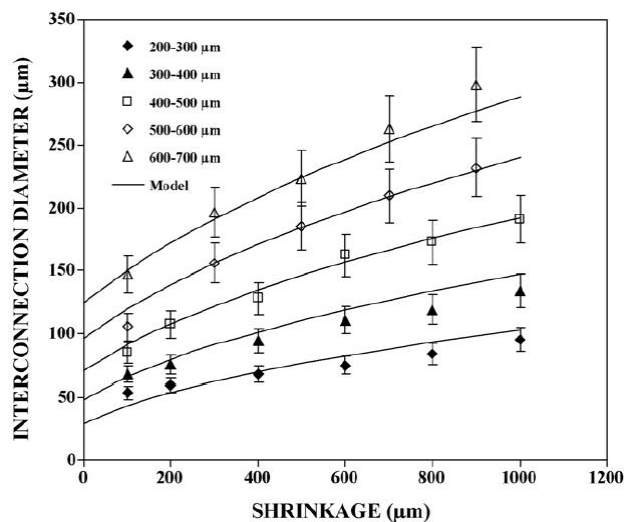


Figure 23. Comparaison des résultats empiriques aux résultats obtenus via le modèle théorique (« Model »)

Ces 2 formules mathématiques permettent donc de calculer le retrait nécessaire pour obtenir un diamètre d'interconnexion précis et cela pour une gamme granulométrique donnée. Il est cependant important de noter que ces résultats théoriques doivent être confrontés aux résultats expérimentaux afin d'être vérifiés. L'impact de l'opérateur et de son environnement (température ambiante) sur le diamètre réel des interconnexions n'est pas négligeable.

### 5.1.2. Imprégnation de la préforme

Une fois la préforme en billes de PMMA obtenue, son infiltration peut être envisagée. La suspension aqueuse est composée d'un taux de matière sèche élevé, d'eau et d'un certain nombre d'adjuvants : le dispersant empêche la sédimentation et l'agglomération des particules lors de leur mise en suspension dans l'eau, le liant permet une manipulation aisée de la pièce lors des opérations de post-coulage et déliantage et le mouillant permet un meilleur contact entre suspension et billes. L'infiltration se fait dans un moule en plâtre. Ce dernier va permettre de sécher la pièce car les porosités du plâtre sont à l'origine d'un



phénomène de dépression capillaire permettant le séchage, le compactage et donc la mise en forme du matériau à l'état cru. Après le démoulage, elle est retravaillée à la main afin d'enlever l'excédent de matière.

La pièce subit un premier traitement thermique dont le but est l'élimination de la phase sacrificielle. Afin de conserver l'intégrité de la phase en céramique, la destruction des billes de PMMA doit être progressive de façon à éviter une augmentation brutale du volume gazeux, à l'intérieur de la pièce. Un traitement thermique à basse température et de longue durée a donc été choisi. Le frittage de la pièce constitue la dernière étape du procédé de fabrication de la pièce. Le résultat est un réseau de pores sphériques interconnectés au sein de la céramique (Figure 24).

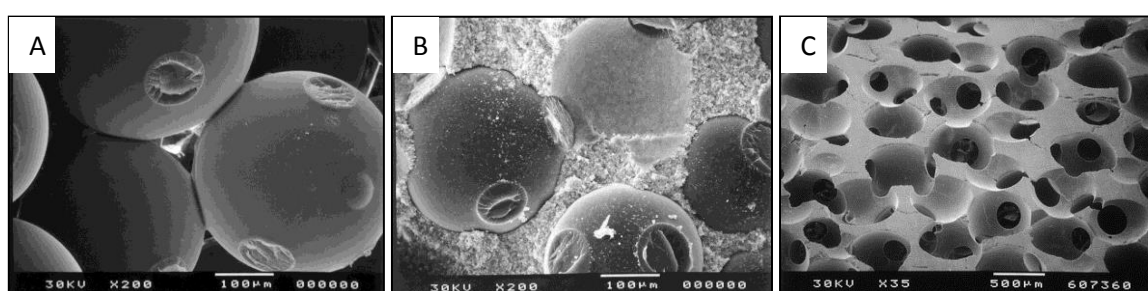


Figure 24. Micrographies MEB de billes en PMMA interconnectées (A), d'une préforme imprégnée (B) et d'une pièce en céramique après déliantage et frittage (C)

## 5.2. Congélation orientée

La congélation orientée ou *freeze casting* consiste à mettre en forme une suspension de céramique par congélation unidirectionnelle (DEV06) (ZHA11). La structure poreuse de la pièce finale est due à la formation de cristaux de glace et à leurs interactions avec les particules de céramique. La croissance des cristaux de glace, conditionne en grande partie la structure poreuse. Tout commence par la formation d'un nucléus, point de départ de la croissance cristalline. Si ce nucléus est formé par une accumulation de molécules liquides refroidies, la nucléation est dite homogène. Dans tous les autres cas, la nucléation est dite hétérogène. Lors de la congélation d'une suspension céramique, les particules forment les nucléi. La finesse des particules va favoriser la nucléation aux dépens de la croissance. Les particules sont repoussées vers l'extérieur par la croissance des cristaux de glace. Elles forment ainsi des parois denses (Figure 25.a et b). Le solvant, transformé en glace, constitue la phase sacrificielle et son élimination se fait par sublimation (Figure 25.c). La dernière étape est celle du frittage et est nécessaire à la consolidation de la pièce (Figure 25.d).

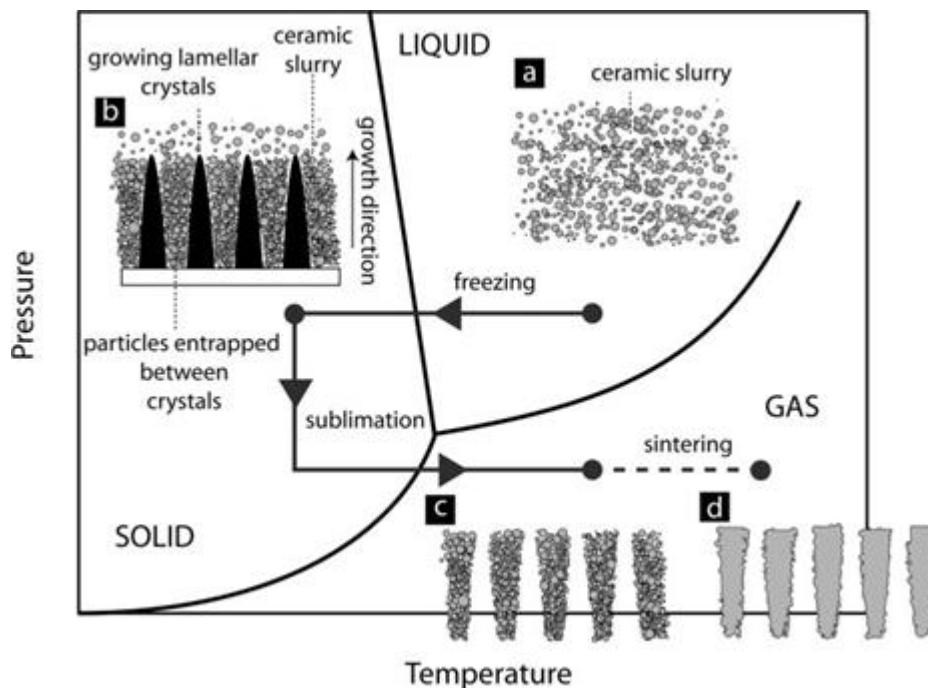


Figure 25. Description des différentes phases de l'élaboration d'un échantillon dense à partir d'une barbotine aqueuse (DEV08) lors d'une congélation orientée

La congélation orientée produit des échantillons anisotropiques : la porosité varie en fonction de la hauteur de l'échantillon. Ainsi, plus on se rapproche du haut de la pièce plus celle-ci sera poreuse. 3 zones peuvent être distinguées (Figure 28) (DEV06) : une zone dense à la base de l'échantillon, suivie d'une zone dite cellulaire dans laquelle on retrouve des pores sphériques de l'ordre du micron et enfin une troisième et dernière zone dite lamellaire

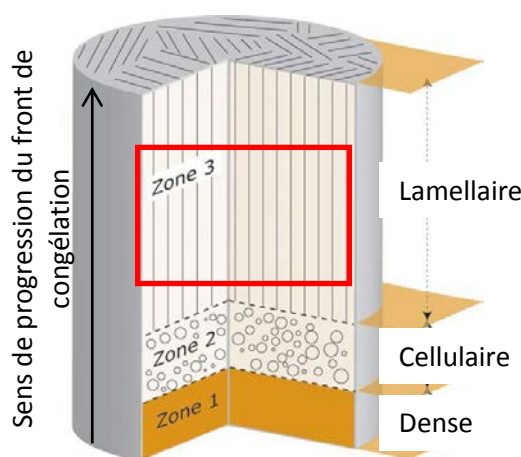


Figure 26. Schématisation de la structure globale d'un échantillon en céramique obtenue par congélation orientée (adapté de (DEV06)). La zone d'intérêt est délimitée par le rectangle rouge

La zone 3 est celle d'intérêt puisqu'elle présente un réseau de pores ellipsoïdaux tubulaires, parallèles et interconnectés. Afin de réduire l'anisotropie et d'augmenter l'homogénéité de la zone 3, on utilise un support texturé. Ce dernier se place au fond de chaque réservoir et va

favoriser la croissance cristalline au profit la formation de nucléi (HAU14). Le support texturé choisi est illustré par la Figure 27.

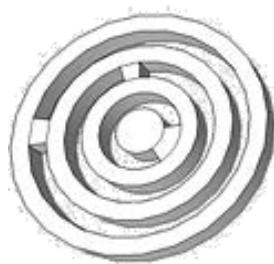


Figure 27. Schéma du support texturé

Cette structure lamellaire est due à la déstabilisation du front de congélation. Le front de congélation représente la limite entre les cristaux déjà créés et la suspension liquide. C'est à ce niveau que cristaux et particules vont interagir. Mullins (MUL64) explique que ce front de congélation, plan au début, se déstabilise avec le temps. C'est ce qui permet l'éjection latérale des particules de céramique et la formation d'une structure lamellaire perpendiculaire au front de congélation. En l'absence de déstabilisation, les particules de céramique sont éjectées en avant du front de congélation résultant dans la formation d'un compact de poudre. C'est ce qui explique la présence d'une zone dense. Toutefois des études récentes contredisent cette explication. La congélation a été observée par tomographie. Cela a permis de voir *in situ*, l'interaction des différents éléments entre eux et la genèse de cette structure anisotrope constituée de 3 zones distinctes. Ainsi Deville *et al.* (DEV09a) (DEV09b) expliquent que la structure est le résultat de la formation de 2 types de cristaux : la première population dite de type z est principalement orientée selon l'axe z (perpendiculaire au front de congélation) et la deuxième, dite de type r, est moins lamellaire et plutôt orientée selon le plan xy. Lors de la congélation, on a la formation de ces 2 populations en proportion égale. Au fur et à mesure de la congélation le nombre de cristaux de type r diminue alors que les cristaux de type z persistent pour générer la structure, constituée de tubes ellipsoïdaux parallèles, qui nous intéresse.

### **5.2.1. Influence des paramètres de fabrication**

La maîtrise totale de cette technique de mise en forme peut être difficile (DEV06). Il est en effet difficile d'évaluer le degré d'impact de chaque paramètre de fabrication sur le produit final.

Les graphes présentés sur les figure 29 à 30, montrent l'évolution de la taille des pores (a : petit diamètre et b : grand diamètre) en fonction de 3 paramètres : la vitesse de refroidissement; le taux de  $\beta$ -TCP et le taux de liant.

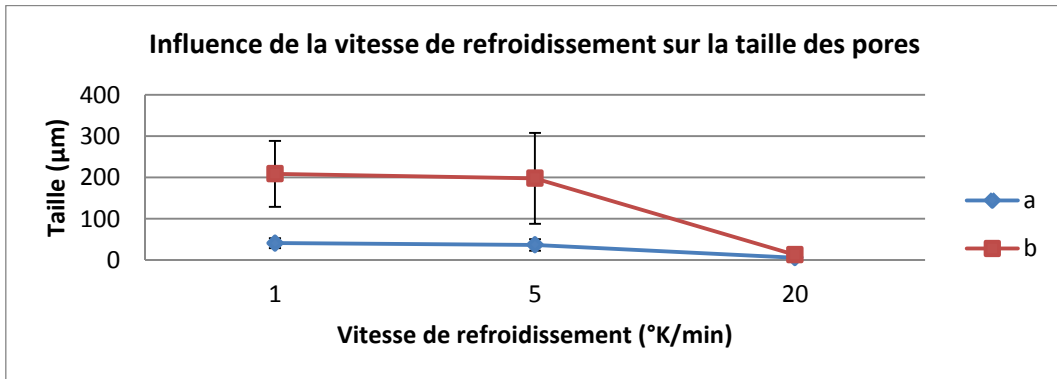


Figure 28. Variation des tailles de pore en fonction de la vitesse de refroidissement (30% de matière sèche pour 3% m. de liant par rapport au taux de matière sèche) (adapté de (MEU16))

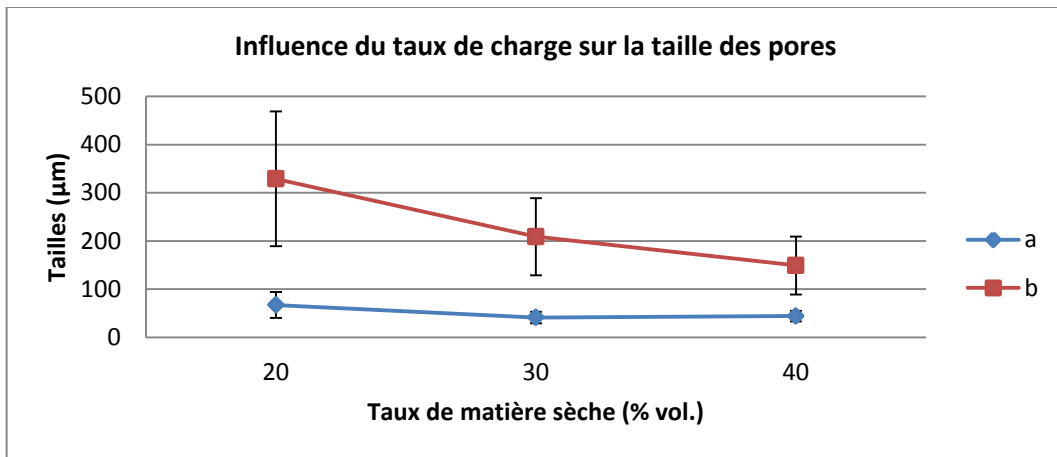


Figure 29. Variation des tailles de pores en fonction du taux de matière sèche (3% m. de liant par rapport au taux de matière sèche et une vitesse de refroidissement de 1°K/min) (adapté de (MEU16))

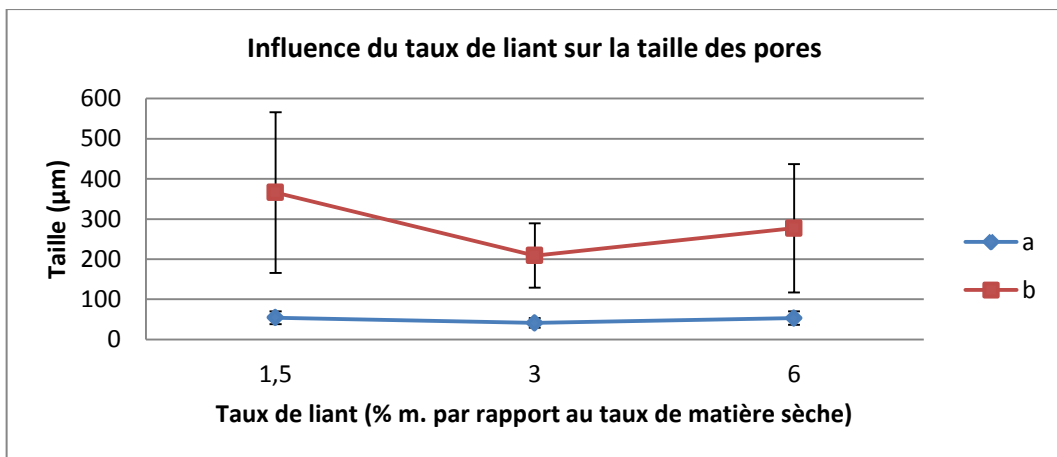


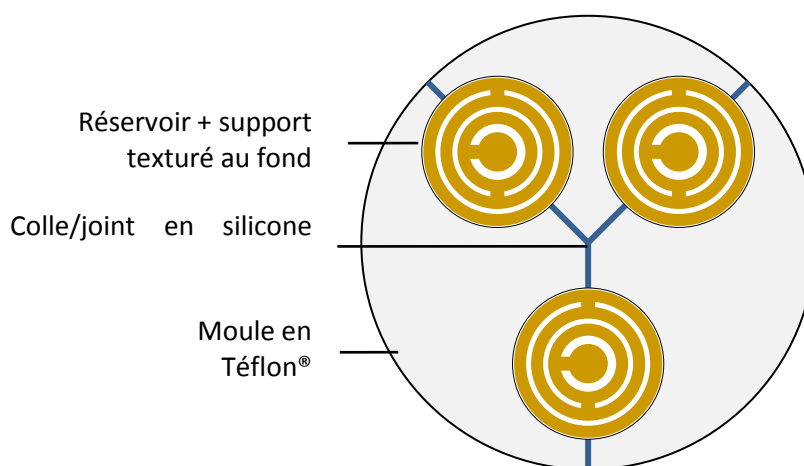
Figure 30. Variation des tailles de pores en fonction du taux de liant (30 % vol. de matière sèche et une vitesse de refroidissement de 1°K/min) (adapté de (MEU16))

La vitesse de refroidissement va conditionner la finesse des cristaux de glace. Ainsi plus cette vitesse de congélation est élevée plus les cristaux cristalliseront finement. On observe que pour la vitesse très élevée de 20°K/min, les pores sont plutôt sphériques avec des dimensions de l'ordre de la dizaine de micromètres. D'autre part, un taux croissant de matière sèche a tendance à faire diminuer la taille des pores, surtout le grand diamètre. Enfin, contrairement aux 2 paramètres précédents, l'influence du liant sur la taille des pores est plus difficile à établir.

### **5.2.2. Congélation d'une barbotine**

Le protocole suivant provient des travaux de thèse de D. Hautcoeur (HAU14). On prépare tout d'abord une suspension de  $\beta$ -TCP stable. Après 24 h de mélange, dans un mélangeur tridimensionnel Turbula, en présence de billes en zircone de 2 mm de diamètre on ajoute à la suspension la quantité voulue de liant.

La congélation de la suspension se fait dans un moule (Figure 31) refroidi par la base via le dispositif de congélation (Figure 32).



**Figure 31. Moule de congélation en Teflon® (vue d'en haut)**

Le moule est composé de 4 parties : une base tronconique en laiton sur laquelle sont disposées les 3 parties en Teflon® qui forment le cylindre creusé de 3 réservoirs qui accueillent la suspension (Figure 31). Afin que la résine en silicone (Loctite SI5926 silicone bleu) qui sert de joint et de colle sèche, le montage du moule se fait la veille pendant la préparation de la barbotine.

Le moule est placé au niveau de l'enceinte cryogénique (Figure 32). Le bon contact entre le support refroidissant du dispositif et de la base du moule est assuré par de la pâte thermique. Avant de couler la suspension dans le moule, ce dernier est refroidi à -20°C au rythme de 1°C/min. Une fois cette température atteinte, 7 ml de suspension sont introduits

dans chacun des 3 réservoirs. Le cycle de refroidissement se poursuit au même rythme jusqu'à  $-40^{\circ}\text{C}$ . Cette température est maintenue jusqu'à solidification totale de la suspension.

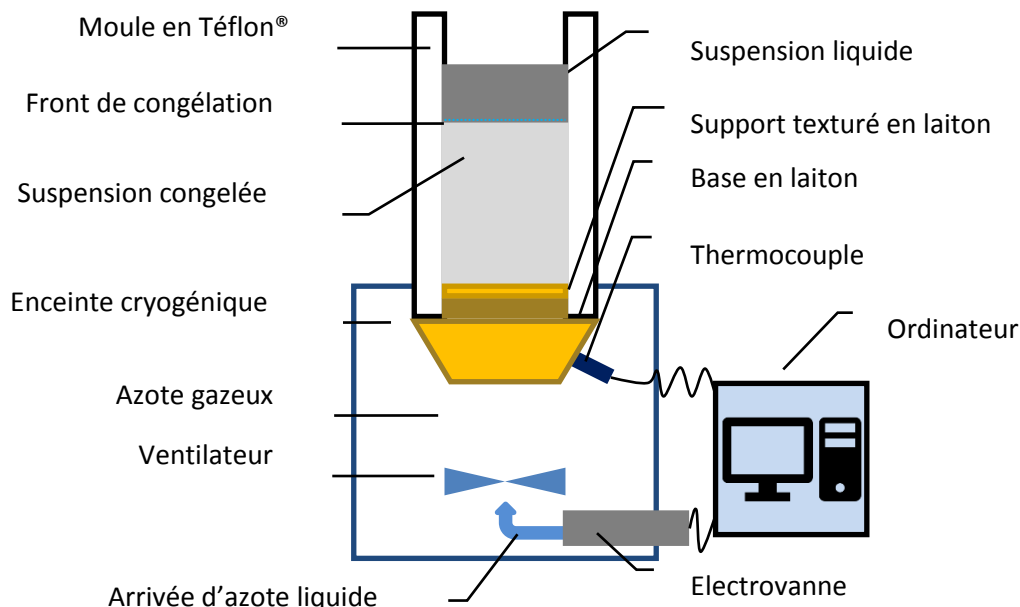


Figure 32. Schéma du dispositif de congélation orientée

Les échantillons sont ensuite démoulés et placés dans un lyophilisateur pour une période de 24 h afin que toute l'eau soit sublimée. Le démoulage est une étape critique car elle se fait à température ambiante risquant ainsi la fonte des cristaux de glace. La présence d'eau liquide dans le lyophilisateur ne permettra pas l'élimination de la glace par sublimation et l'échantillon finira par fondre. Un passage par le congélateur permet d'éviter ce problème.

L'étape suivante est le frittage. Une fois densifiés, le diamètre des échantillons est rectifié au tour avant la découpe.

### 5.3. Stéréolithographie

La stéréolithographie est une méthode de fabrication additive. C'est-à-dire que la construction de la pièce se fait couche par couche. Cette méthode de mise en forme s'appuie sur un modèle numérique de la pièce, obtenu par conception assistée par ordinateur ou CAO. Ce dernier est ensuite transformé en fichier STL. Ce dernier décrit la surface de l'objet à imprimer grâce à une série de facettes triangulaires. Enfin, le fichier STL est « tranché », de sorte à ce que la pièce soit segmentée en une succession de plans, parallèles et d'épaisseur constante: c'est le fichier d'impression. Il est transmis à la machine de fabrication additive qui projette à son tour le masque UV correspondant, sur la suspension, afin de la polymériser de façon sélective.

## Chapitre 1 : Étude bibliographique

Cette technique est particulièrement efficace pour la mise en forme d'implants à base de polymère (CHO09). Elle permet aussi la mise en forme de suspension polymère/céramique (LEE09).

Cette technique repose sur la photopolymérisation d'une suspension céramique photosensible. Ce phénomène permet, sous l'action d'une excitation lumineuse, la polymérisation et donc la solidification d'une phase liquide composée, en partie, de monomères. Cette réaction chimique peut être décomposée en 3 phases : l'initiation suivie de la polymérisation et enfin la terminaison. La barbotine polymérisable est composée de céramique, de monomères et d'un certain nombre d'adjuvants. On retrouve en plus des adjuvants classiquement utilisés dans une barbotine, le photoinitiateur ou photoamorceur. L'oligomère est activé par un rayonnement de longueur d'onde appropriée. Chaque photon absorbé est à l'origine de l'activation par photolyse d'un centre radicalaire ou ionique qui va réagir avec des monomères et/ou d'autres oligomères. S'ensuit, une réaction de polymérisation à l'origine de la formation d'une chaîne de polymères et/ou une réaction de réticulation. Cette technique permet donc de créer un réseau polymérique dans lequel sont piégées des particules de céramiques.

En plus de réagir avec la résine polymérisable, le rayonnement va interagir avec les particules de céramique. On peut relier entre elles, grâce à l'équation de Beer-Lambert-Bouguer, l'énergie du rayon incident à la densité d'énergie reçue par un milieu d'épaisseur  $z$  et de coefficient d'extinction  $\alpha$ . Le milieu étant ici, la résine non chargée.

$$E = Ei \cdot \exp(-\alpha z)$$

***E*** : densité d'énergie

***\alpha*** : coefficient d'extinction

***Ei*** : densité d'énergie du faisceau incident

***z*** : épaisseur de la couche

### Équation 11. Relation de Beer – Lambert – Bouguer

En modifiant légèrement l'équation ci-dessus, on peut calculer l'épaisseur  $z$  de la couche polymérisée en fonction de la densité d'énergie critique,  $E_c$  permettant la photopolymérisation :

$$z = \frac{1}{\alpha} \cdot \ln\left(\frac{Ei}{E_c}\right)$$

### Équation 12. Détermination de l'épaisseur $z$ de la couche polymérisée en fonction de l'énergie critique $E_c$

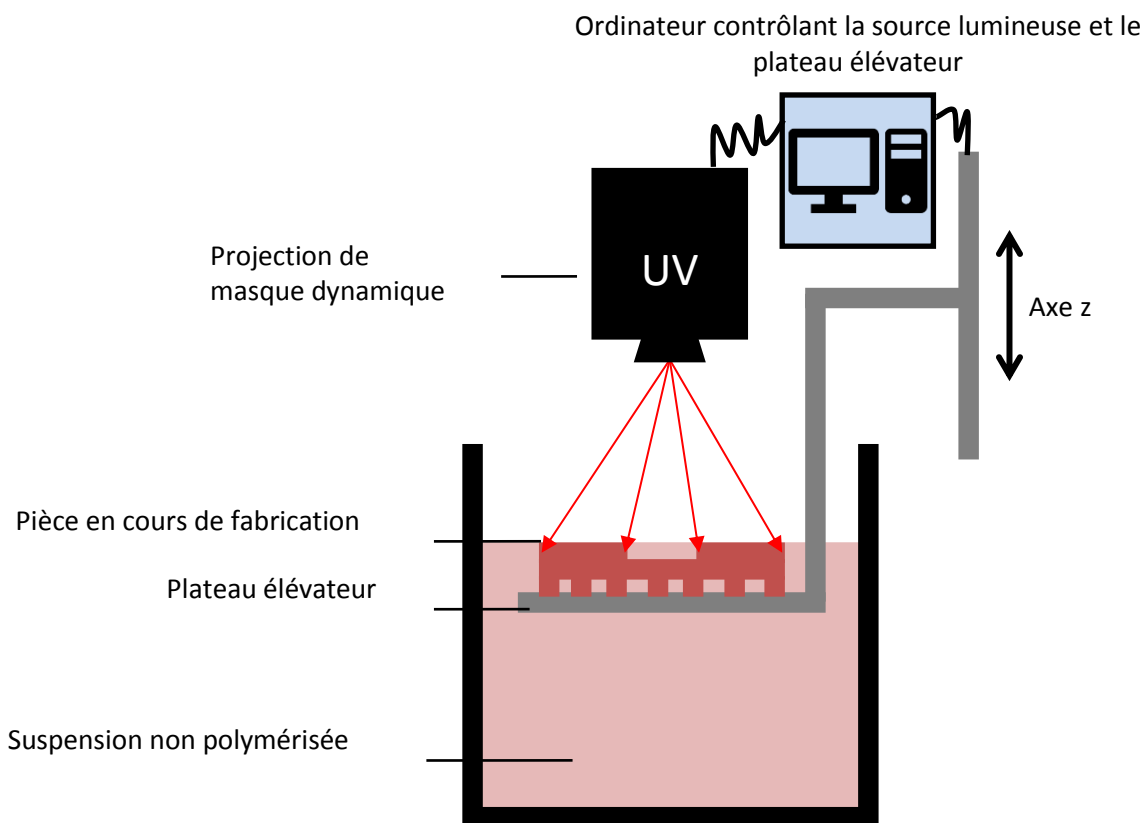
Cette équation nous permet donc de calculer l'énergie nécessaire pour polymériser une couche de résine d'épaisseur  $z$ .

Les interactions entre rayonnement et particules sont à l'origine d'un phénomène de diffusion du faisceau (CHA07). Le terme  $Dp$  prend en compte l'ensemble de ces interactions et est fonction de la taille des particules, la fraction volumique de matière sèche, de la longueur d'onde du faisceau, de l'indice de réfraction de la résine et de la différence entre l'indice de réfraction entre les particules et les monomères (WU16). L'équation de Jacobs utilise ce terme et découle directement de la relation de Beer – Lambert – Bouguer (JAC92) :

$$z = Dp \cdot \ln\left(\frac{E_i}{E_c}\right)$$

**Équation 13. Relation de Jacobs**

La faible diffusivité du rayonnement exciteur va permettre la formation de brin de polymère inférieur au micromètre. Cette propriété de la barbotine est très importante puisqu'elle va permettre une polymérisation localisée sur une hauteur faible.



**Figure 33. Schéma de principe de la stéréolithographie**

Le dispositif projette sur la surface de la suspension un flash de lumière qui va permettre sa polymérisation (Figure 33). Contrairement à d'autres, ce dispositif ne comporte pas de racleur/égaliseur mais s'appuie sur l'aptitude de la suspension à s'étaler. Nous travaillons donc avec des suspensions de faible viscosité qui nécessitent des temps de relaxation courts, de l'ordre d'une dizaine de secondes. La qualité de la suspension va conditionner la qualité

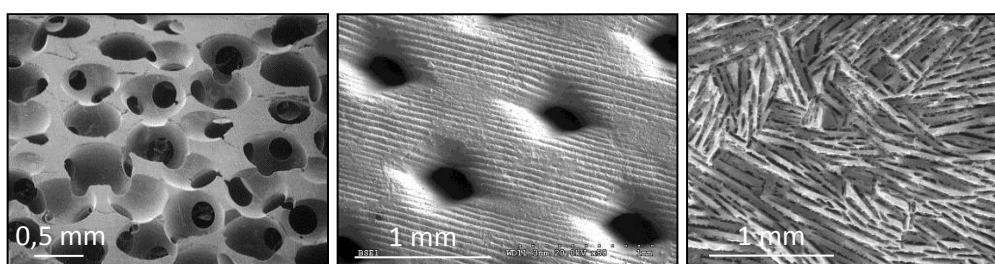


du produit final. Ce procédé nécessite une suspension réactive, stable dans le temps, rhéofluidifiante, de faible viscosité et comportant une charge de matière sèche élevée. La réactivité est appréciée en fonction du niveau d'énergie à fournir pour amorcer la polymérisation. La suspension doit rester stable au cours de l'impression de la pièce afin de conserver la régularité et la constance des microstructures pour ainsi limiter les contraintes mécaniques internes. Un comportement rhéofluidifiant et une faible viscosité garantissent l'étalement optimal de la suspension. Enfin, le taux de charge élevé en céramique limite le retrait lors du frittage et permet d'obtenir une pièce de densité élevée.

Une fois imprimée, la pièce subit une série de rinçages qui vise à éliminer la matière non polymérisée et une étape de consolidation : le frittage.

### 5.4. Conclusion

L'HA et  $\beta$ -TCP sont aujourd'hui largement reconnus comme étant de bons matériaux pour la fabrication de substituts osseux et dentaires. Leurs compositions chimiques, très proches de celle de l'os, en font de très bons candidats. Ces matériaux sont cependant différents : leurs stabilités dans les fluides biologiques ne sont pas les mêmes. Un échantillon dense en  $\beta$ -TCP sera progressivement remplacé par de l'os néoformé alors qu'un échantillon dense en HA n'évoluera que très peu au cours du temps. Nous avons donc choisi de travailler avec du  $\beta$ -TCP. Sa synthèse se fait par précipitation aqueuse. Les paramètres de fabrication tels que le pH, la température, le temps de maturation et le rapport Ca/P sont fixés et permettent d'obtenir un produit final qui répond aux requis des normes encadrant l'utilisation de céramiques comme substituts osseux. Nous avons choisi de travailler avec un  $\beta$ -TCP contenant quelques pourcent d'HA afin d'améliorer la densification de notre matériau lors du frittage. La poudre obtenue a été mise en forme par 3 procédés qui permettent de générer des architectures poreuses originales (Figure 34) qui serviront de support de culture.



**Figure 34. Micrographie MEB des 3 types de structures générées (de gauche à droite) : imprégnation d'une préforme polymérique PS, stéréolithographie 3D et congélation orientée CO**

Nous avons choisi d'utiliser des MG63 pour démontrer l'innocuité de notre matériau. Étant donné que ce dernier est issu d'un ostéosarcome, nous avons décidé de choisir des cellules

## Chapitre 1 : Étude bibliographique

souches mésenchymateuses humaines afin d'étudier l'impact architectural sur le comportement cellulaire.

## Chapitre 2 : Méthodes expérimentales, caractérisation et mise en forme du matériau

### 1. Synthèse, contrôles et caractérisation de la poudre

#### 1.1. Synthèse par voie humide

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi de synthétiser la poudre par voie humide avec un rapport Ca/P de 1,51 afin d'obtenir une phase de  $\beta$ -TCP avec quelques pourcent d'HA (Équation 6).

La synthèse se déroule en plusieurs étapes. Dans un réacteur double enveloppe de 50 l, est introduite une solution de nitrate de calcium tetrahydraté,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (110,1 moles dans 16 l d'eau distillée) (Honeywell, pureté > 98 %) (Annexe 1). Cette solution est maintenue sous agitation mécanique (Heidolph RZR 2102 Control) à 75 tr/min et à une température constante de 30°C grâce à un thermocryostat (Julabo). Une solution d'hydrogénophosphate de diammonium,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Carlo Erba, pureté = 98 %) (72,7 moles dans 16 l d'eau distillée) (Annexe 2) est rajoutée grâce à une pompe péristaltique (Cole-Palmer Instrument Company, Masterflex L/S) avec un débit de 2 x 100 ml/min. Le pH du milieu réactionnel est maintenu à 6,7 grâce à l'ajout ponctuel d'une solution d'ammoniaque à 30 % (Carlo Erba) par le biais d'un système de rétrocontrôle constitué d'une pompe doseuse (Black Stone BL 7916) couplée à une sonde de mesure de pH (Schott H8381 HD). Le réacteur est vidé à l'issue des 20 h de maturation. Le précipité est ensuite filtré sur Büchner. Les gâteaux sont rincés à l'eau distillée afin d'éliminer la majeure partie du nitrate d'ammonium,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et séchés à 90°C pendant 24 h avant d'être grossièrement broyés à la main pour une calcination en 3 étapes:

1. montée à 1°C/min jusque 230°C (1°C/min) suivi d'un palier de 4 h ;
2. montée à 1°C/min jusque 300°C suivi d'un palier de 1 h ;
3. montée à 5°C/min jusque 850°C suivi d'un palier de 3 h.

Ce traitement thermique permet :

- d'éliminer le nitrate d'ammonium résiduel ;
- d'induire la diminution de la surface spécifique de la poudre brute ;
- de transformer les différents composés apatitiques bruts en composés stables et cristallisés, c'est à dire en une phase de  $\beta$ -TCP contenant quelques pourcents d'HA.

Lors de la calcination, les cristallites s'agglomèrent. Afin d'éliminer ces agglomérats de grandes tailles et la porosité intergranulaire, la poudre est broyée pendant 3 h dans des jarres en polyéthylène haute densité (PEHD), d'une contenance de 6,6 l et contenant des billes en zircone yttrée (3 % mol. d'oxyde d'yttrium). Chaque jarre contient 9,1 kg de billes au total. Elles sont de dimensions suivantes : 10, 15, 20 mm de diamètre et sont respectivement utilisées dans les proportions massiques suivantes 25, 50 et 25 %. Cette étape va permettre de casser les agglomérats. La surface spécifique de la poudre passe ainsi de 70 m<sup>2</sup>/g environ pour la poudre brute (non calcinée et non broyée) à 5,5 m<sup>2</sup>/g pour la poudre finale (Micromeritics Flowsorb III). Afin d'effectuer ces mesures, les poudres subissent un dégazage à 250°C pendant 24 h. Les caractéristiques granulaires d'une poudre influencent sa mise en suspension ainsi que son frittage. Il est donc important d'avoir une poudre réactive adaptée aux méthodes de mise en forme choisies permettant de donner une pièce parfaitement homogène après frittage.

Cette technique de synthèse permet de produire des lots de poudre de 10 kg environ. Chaque lot est qualifié, grâce à une série de tests et d'essais préconisés par les normes NF ISO 13779 et 13175, avant de pouvoir être utilisé comme biomatériau.

### **1.2. Contrôles et caractérisations**

#### ***1.2.1. Identification et quantification des différentes phases constitutives***

Afin de mener à bien les essais suivants, la poudre brute est calcinée à 1000°C pendant 15 h afin d'augmenter la proportion de phases cristallines.

##### **1.2.1.1. Identification des constituants par DRX**

La diffraction des rayons X (Panalytical DW/3040/60) permet d'identifier et de quantifier avec précision les différentes phases cristallines qui composent la poudre.

Descamps *et al.* (DES07) démontrent qu'il est plus intéressant de travailler avec des poudres non stœchiométriques. Étant donné le rapport Ca/P choisi, on s'attend à avoir parmi les phases constitutives, de l'HA et une absence de pyrophosphate. Afin de mesurer avec précision de faibles quantités d'HA dans la poudre de  $\beta$ -TCP, les normes préconisent la réalisation d'abaques à partir de mélanges standards d'HA et de  $\beta$ -TCP stœchiométriques. Les raies utiles sont la (210) ( $2\theta = 28,971^\circ$ ) ou la (211) ( $2\theta = 31,772^\circ$ ) pour l'HA (fiche JCPDS 9 – 432) et la (0210) ( $2\theta = 31,027^\circ$ ) du  $\beta$ -TCP (fiche JCPDS 09 – 0169). Pour des teneurs d'HA inférieures à 30 %, la raie (210) est inexploitable car difficilement observable.

L'alternative proposée est donc l'utilisation de la raie (211) (RAY01) qui est quant à elle exploitable pour des taux d'HA supérieurs ou égaux à 0,5 %.

Le Tableau 14 provient de la thèse de E. Rguiti (RGU11) et vérifie les travaux de Raynaud (RAY01).

Domaines de composition	Mélange $\beta$ -TCP / HA		
	$\% \beta$ -TCP > 80 %	$20\% < \% \beta$ -TCP < 80%	$\% \beta$ -TCP < 20%
Rapport d'intensités intégrées	$R_1 = \frac{I_{HA(211)}}{I_{TCP(0210)}}$	$R_2 = \frac{I_{HA(211)}}{I_{TCP(0210)}}$	
% m. en $\beta$ -TCP	$\% TCP = 100 - \left(\frac{R_1}{0,0111}\right)$	$\% TCP = \frac{92,7 \cdot R_2}{5,45 + R_2}$	$\% TCP = \frac{R_2}{0,085}$

Tableau 14. Détermination du pourcentage massique de  $\beta$ -TCP dans des mélanges biphasés TCP/HA (RAY01).

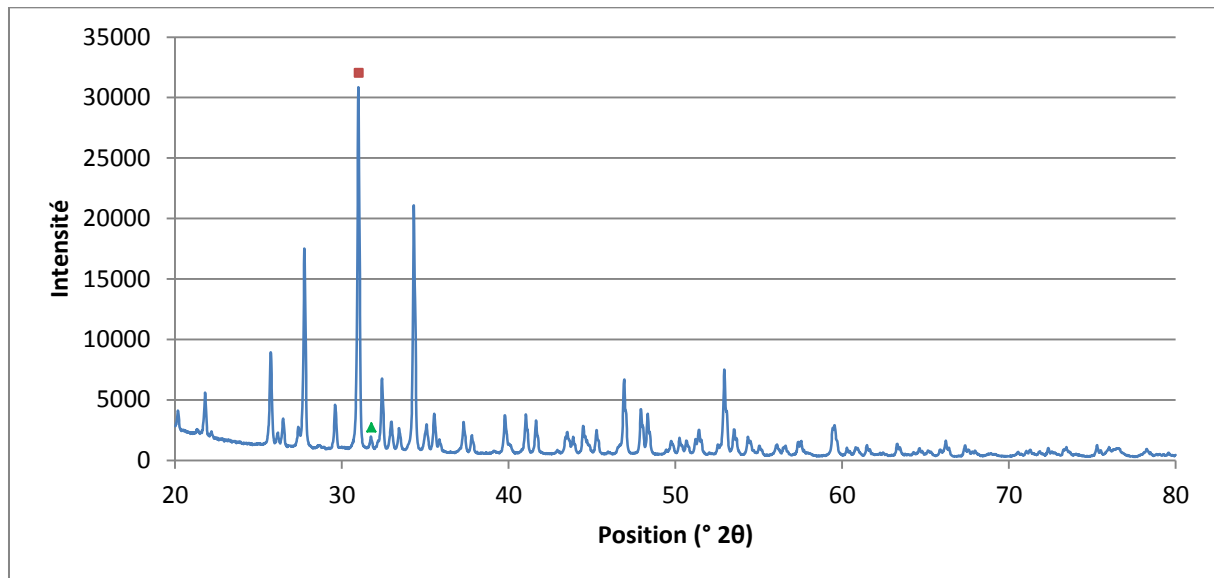


Figure 35. Diffractogramme RX de la poudre (Carré rouge : raie (201) du  $\beta$ -TCP et triangle vert : raie (211) de HA)

On retrouve dans la poudre de  $\beta$ -TCP  $3 \pm 1$  % d'HA.

Cependant cette méthode est peu ou pas efficace lorsque les phases que l'on cherche à identifier sont présentes en quantités trop faibles ou lorsque la discrimination entre pics est difficile ou impossible. C'est le cas pour le pyrophosphate de calcium. En effet, Destainville *et al.* (DES03) proposent d'utiliser la raie (202) du pyrophosphate de calcium. Cette dernière est la plus intense et discriminable. Elle correspond à une intensité relative de 45 % ( $2\theta = 28,869^\circ$ ). Cependant cette raie n'est observable que pour des quantités supérieures à 4 %. Les DRX effectuées sur les poudres montrent que cette raie est très faible donc inexploitable.

### 1.2.1.2. Détermination de la pureté par spectrométrie FT-IR

Afin de contourner la limitation de la DRX, la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (Jasco FT-IR 4600) est utilisée. Les spectres IR sont enregistrés en transmission par un spectromètre à transformée de Fourier entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  sur des pastilles contenant 298 mg de KBr et 2 mg de poudre de  $\beta$ -TCP. Les bandes à 720  $\text{cm}^{-1}$  et à 1200  $\text{cm}^{-1}$  sont caractéristiques du pyrophosphate de calcium. Leurs absences confirment la pureté de la poudre (DES03) (RAY02) (Tableau 15).

Bandes IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensité	Désignation
460	Faible	Déformation symétrique P-O ( $\nu_2$ ) (groupes $\text{PO}_4$ )
550-600	Forte	Déformation antisymétrique P-O ( $\nu_4$ ) (groupes $\text{PO}_4$ )
630	Épaulement	O-H (groupes OH)
720	Large et faible	P-O-P (groupes $\text{P}_2\text{O}_7$ )
820	Faible	N-O (groupes $\text{NO}_3$ )
865-880	Faible	Élongation P-OH (groupes $\text{HPO}_4$ )
920	Faible	P-O-P (groupes $\text{P}_2\text{O}_7$ )
960-965	Moyenne	Élongation symétrique P-O ( $\nu_1$ ) (groupes $\text{PO}_4$ )
1020-1120	Forte	Élongation antisymétrique P-O ( $\nu_3$ ) (groupes $\text{PO}_4$ )
1200	Faible	P-O-P (groupes $\text{P}_2\text{O}_7$ )
1180-1200	Épaulement	P-OH (groupes $\text{HPO}_4$ )
1414-1454	Faible	C-O (groupes $\text{CO}_3$ )
1380-1400	Forte	N-O (groupes $\text{NO}_3$ )
1630	Moyenne	$\text{H}_2\text{O}$ et $\text{CO}_2$ adsorbés
3580	Épaulement	O-H (groupes OH)
3650	Faible	O-H (groupes $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )
3000-3700	Moyenne	H-O-H (groupes $\text{H}_2\text{O}$ adsorbés)

Tableau 15. Attribution des principales bandes IR caractéristiques des phosphates de calcium (HEU77)

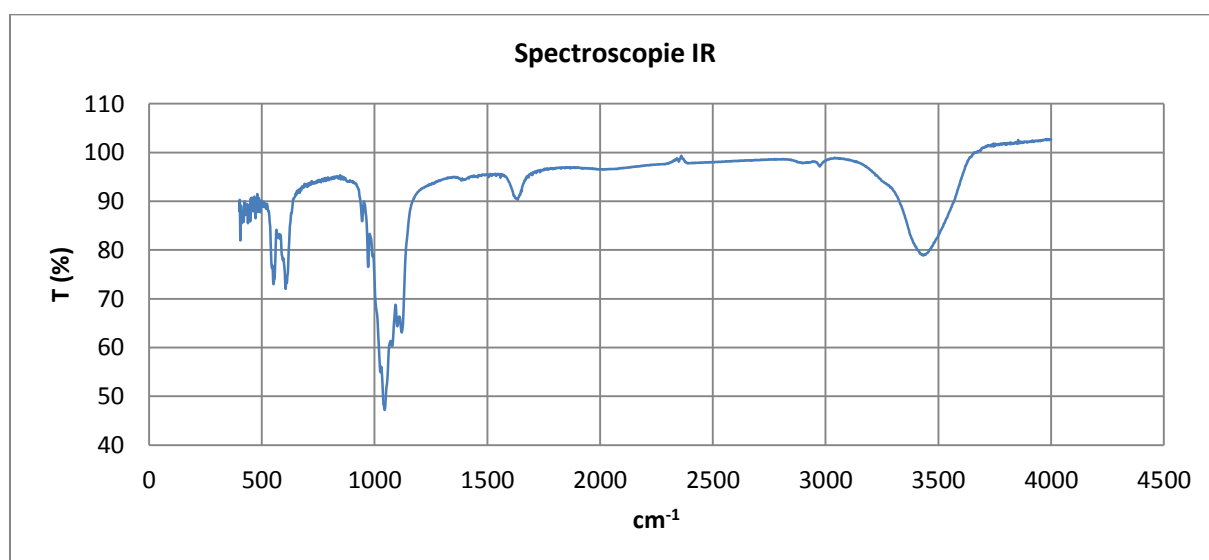


Figure 36. Spectre infrarouge de la poudre synthétisée

L'absence de raies à 720  $\text{cm}^{-1}$  et 1200  $\text{cm}^{-1}$  sur le spectre de la poudre confirme la non-présence de pyrophosphate. Afin d'affiner ce résultat, la norme ISO 13779 préconise

l'utilisation de raies en plus de celles citées plus haut : l'absence de bande à  $757\text{ cm}^{-1}$  et à  $434\text{ cm}^{-1}$  indique l'absence de la forme  $\alpha$  du pyrophosphate de calcium et l'absence des bandes à  $1210\text{ cm}^{-1}$  et  $1185\text{ cm}^{-1}$  à  $723\text{ cm}^{-1}$  et à  $454\text{ cm}^{-1}$  indique l'absence de la forme  $\beta$  du pyrophosphate de calcium.

### **1.2.1.3. Quantification des éléments traces**

La quantification d'éléments traces, plus particulièrement la quantification de métaux lourds (plomb, mercure, arsenic et cadmium), dans la poudre de  $\beta$ -TCP finale se fait par spectrométrie à plasma à couplage inductif ou ICP. Ce test consiste, grâce à une torche plasma, ioniser l'échantillon et d'analyser le nuage d'ions ainsi généré. Les résultats ainsi que les valeurs limites imposées par la norme sont récapitulées dans le Tableau 16 :

<b>Métaux lourds</b>	<b>Limite imposée par la norme (mg/kg)</b>	<b>Poudre de synthèse (mg/kg)</b>
Plomb	30	0,000
Mercure	5	0,007
Bismuth	-	0,000
Arsenic	3	0,001
Antimoine	-	0,000
Étain	-	0,003
Cadmium	5	0,000
Argent	-	0,002
Cuivre	-	0,000
Molybdène	-	0,000
Somme des métaux lourds	50	0,013

Tableau 16. Récapitulatif de la quantification d'éléments traces par ICP dans la poudre de  $\beta$ -TCP

La quantification des éléments traces dans la poudre de  $\beta$ -TCP finale nous permet de conclure que les teneurs en métaux lourds, de la poudre produite, sont très inférieures aux valeurs limites imposées par la norme.

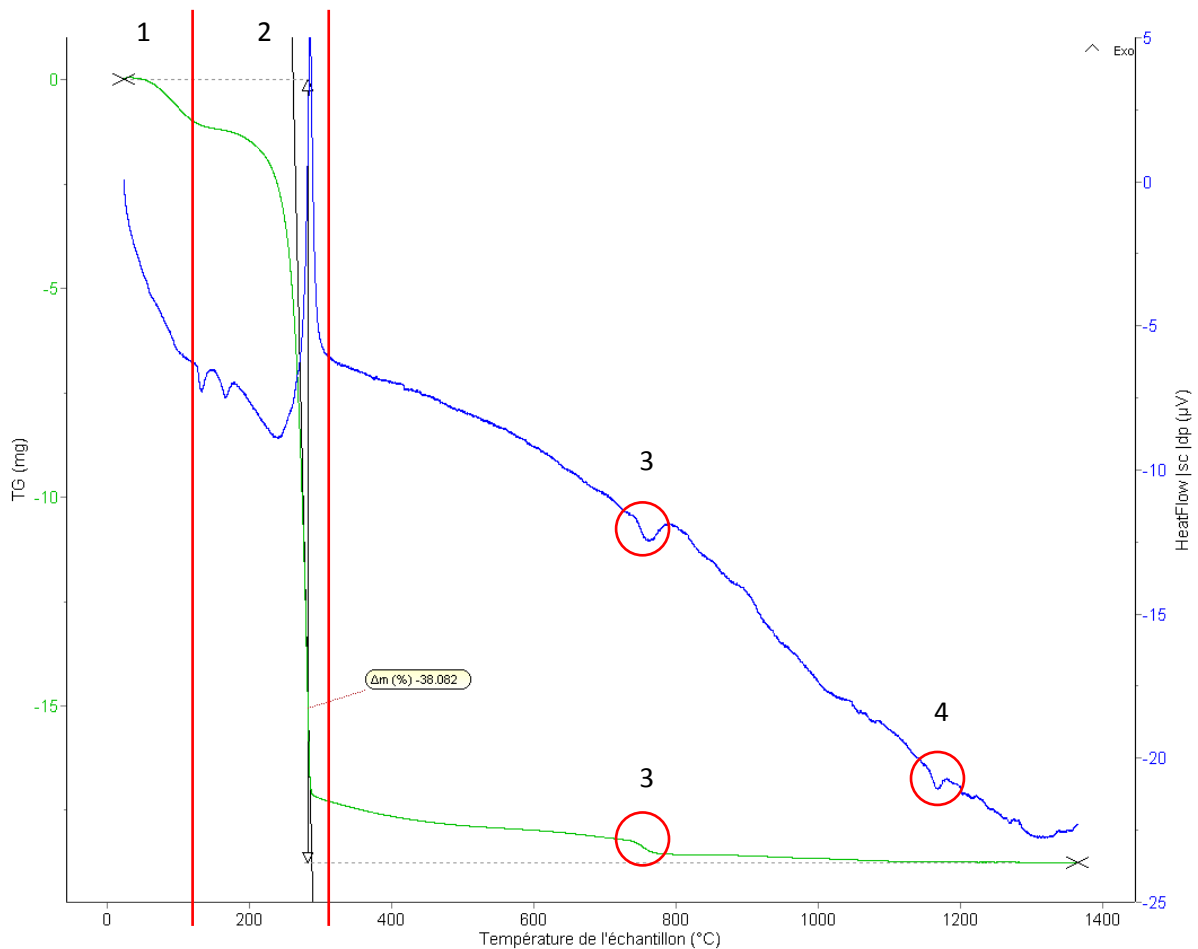
Ce test s'est effectué dans le cadre d'une collaboration avec la *Belgian Ceramic Research Center* de Mons, Belgique.

## ***1.2.2. Caractérisation de comportement thermique***

### **1.2.2.1. ATG/ATD**

Cet essai nous a permis d'étudier le comportement de la poudre brute lorsqu'elle subit un traitement thermique. L'échantillon est porté à  $1300^\circ\text{C}$  à  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Le dispositif (Setaram Lab Sys Evo) suit ainsi les variations de masse de l'échantillon (analyse thermogravimétrique) aussi bien que le flux thermique / enthalpie (analyse calorifique différentielle) en fonction de la température. Lorsque les variations d'enthalpie sont associées / corrélées aux variations de masse, il est possible d'identifier certains des phénomènes que subit la poudre (Figure 37).

Le premier évènement (Figure 37.1) notable se produit entre 90°C et 150°C. Il correspond à l'évaporation de l'eau et est caractérisé par une légère diminution de la masse de l'échantillon (moins de 3 %) et d'une chute de l'enthalpie. On assiste ensuite à une chute drastique de la masse d'environ 30 % (Figure 37.2). Cette dernière s'accompagne d'un pic exothermique et correspond à l'élimination du nitrate d'ammonium résiduel un peu avant les 300°C. Vers 775°C apparaît un pic endothermique qui correspond à la transformation des espèces apatitiques en  $\beta$ -TCP et en HA stœchiométriques (Figure 37.3). La transition de phase (passage de  $\beta$ -TCP en  $\alpha$ -TCP) se fait à 1150°C environ (Figure 37.4). La perte de masse totale est estimée à 40 % environ.



**Figure 37. Analyse thermique de la poudre de  $\beta$ -TCP brute et les évènements qui lui sont associés (ATG en vert et DSC en bleu)**

Le comportement thermique de la poudre est cohérent avec les informations trouvées dans la littérature et les légères différences peuvent être attribuées à un rapport Ca/P qui diffère légèrement.



### **1.2.2.2. Dilatométrie**

Les propriétés biologiques, chimiques et physiques des biocéramiques dépendent en partie du cycle de frittage : un frittage de longue durée à haute température va favoriser le grossissement des grains ou la coalescence de porosité résiduelle et la dédensification de la pièce alors qu'un cycle trop court à faible température ne permettra pas ou que partiellement la densification. Ainsi un cycle mal maîtrisé peut entraîner une chute des propriétés mécaniques.

La dilatométrie est une analyse thermique au cours de laquelle les variations dimensionnelles d'un échantillon sont mesurées par le dispositif (Netzsch DIL 402 C) en fonction d'un cycle thermique. On élabore, par pressage isostatique (HP systems CIP 3700 bars) des cylindres de 6 mm de diamètre sur une hauteur de 2 cm. L'ensemble du dispositif de mesure est en alumine, ce qui implique de prendre en compte les variations dimensionnelles de l'appareil.

On distingue sur le graphique plusieurs phases (ROU13) :

1. l'échantillon se dilate sous l'effet de la chaleur et les tensions internes se relâchent ;
2. stade initial du frittage : formation des ponts inter granulaires ;
3. stade intermédiaire du frittage : Les premiers signes du retrait se font voir. Les pores sont interconnectés et forment la porosité ouverte de l'échantillon ;
4. étape de densification : élimination de la porosité ouverte et densification rapide du matériau ;
5. stade final du frittage : élimination complète ou partielle de la porosité fermée. La densité maximale est atteinte ;
6. retrait lié au refroidissement de la pièce.

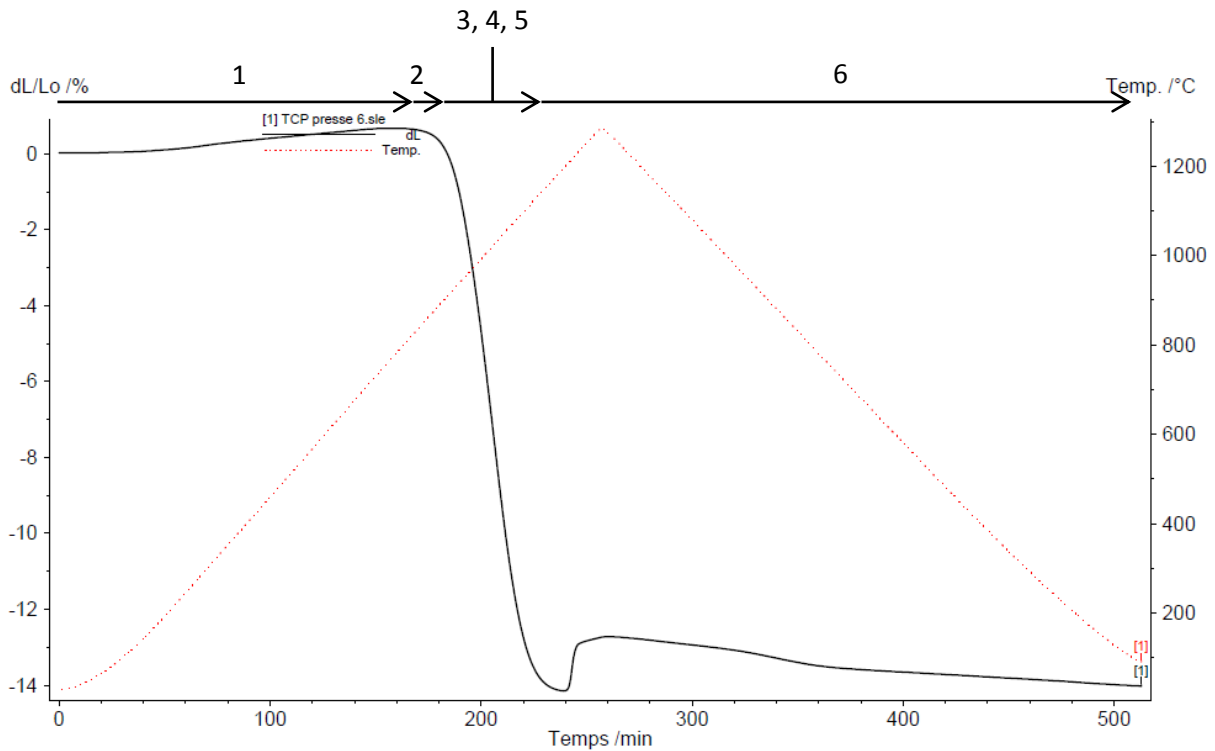


Figure 38. Courbe de retrait de la poudre avec les évènements qui lui sont associés (5°C/min)

Le retrait dimensionnel d'une pièce en  $\beta$ -TCP atteint en fin de frittage est de  $14 \pm 0,8$  %. L'épaule constatée aux alentours de 1150°C est le résultat de la transition de la phase  $\beta$  à la phase  $\alpha$ .

### 1.2.2.3. Détermination du cycle de frittage

La pesée hydrostatique ou pesée d'Archimède permet d'évaluer l'aptitude de la poudre à densifier lors du frittage. À partir d'une suspension à 65 % de matière sèche et 1,5 % de dispersant, des cylindres sont mis en forme par coulage en moule de plâtre. Ils subissent par la suite des traitements thermiques qui diffèrent de par leurs durées et leurs températures de plateau. 3 pesées sont effectuées sur 3 échantillons différents. La vitesse de montée et de descente est de 5°C/min.

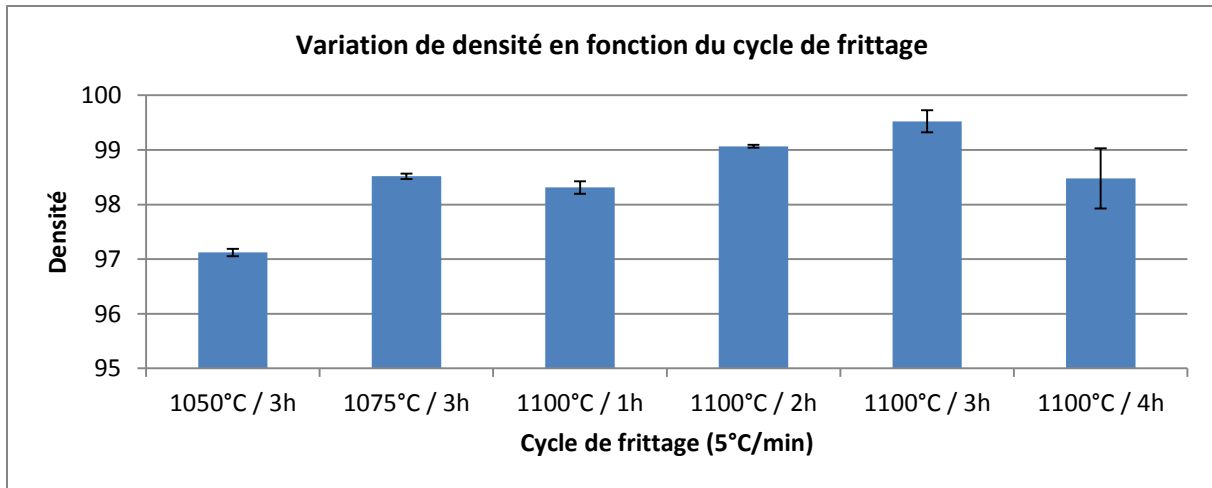


Figure 39. Variation de la densité en fonction du cycle de frittage

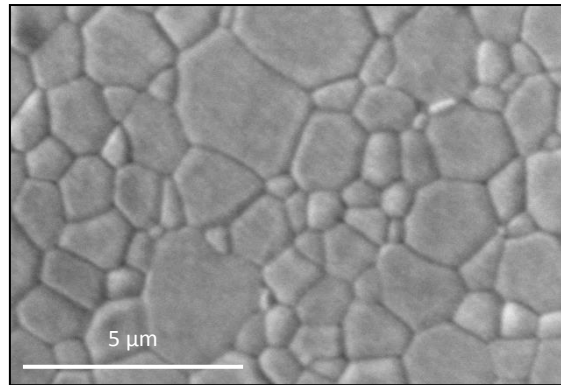
C'est le cycle permettant d'avoir l'échantillon le plus dense qui est choisi. L'échantillon le plus dense (> 99 % de densité) est obtenu au bout de 3 h de frittage à 1100°C. Au-delà de 3 h on observe un phénomène de dédensification.

#### **1.2.2.4. Évaluation de l'aptitude du matériau au frittage**

Le frittage est une des étapes clés de la mise en forme des céramiques et peut être décrit comme un processus physico-chimique qui permet le passage d'un compact pulvérulent à un compact dense, sous l'action de la chaleur et cela avec ou sans fusion des constituants. D'un point de vue physico-chimique, on discerne plusieurs types de frittage (ROU13) (BER05) :

- le frittage en phase solide : les constituants restent solides et la densification est principalement due à la déformation et à la soudure des grains entre eux ;
- le frittage en phase liquide : la montée de la température permet l'apparition d'une phase liquide à l'origine du réarrangement, de la mise en contact des particules de céramique entre elles et de la formation des joints de grains ;
- la grésification : une phase liquide vitreuse importante apparaît ce qui permet de combler les porosités de la pièce.

La densification du  $\beta$ -TCP se fait par frittage en phase solide (Figure 40).



**Figure 40. Micrographie MEB de la structure d'un échantillon densifié à 1100°C pendant 3 h et ayant subi une attaque thermique à 1000°C pendant 15 min afin de révéler les joints de grain**

Afin d'évaluer l'aptitude au frittage ou à la densification, on prépare des barreaux de  $\beta$ -TCP par la méthode de coulage en moule de plâtre.

	% m.	Masses (g) pour 100 g de barbotine
<b>Matière sèche</b>	65	65,00
<b>Dispersant (Darvan C)</b>	1,5 % massique de matière sèche	0,975
<b>Eau distillée</b>	Complément à 100 %	34,025

**Tableau 17. Composition pour 100 g de suspension**

Après 1 h de mélange (Jarre de broyage avec billes en zircone yttrée), la suspension est coulée en moule de plâtre. Une fois secs, les barreaux sont légèrement retravaillés à la main par l'opérateur afin d'enlever l'excédent de matière. Les barreaux sont frittés à 1100 °C pendant 3 h et grossièrement polis.

Le protocole de pesée sous eau appliqué est ensuite décrit dans la norme ISO 623 – 2 (Annexe 3). Les échantillons sont denses à plus de 99 %.

### ***1.2.3. Mesure de la densité de la poudre par pycnométrie***

La densité de la poudre est mesurée par pycnomètre à hélium (Micromeritics AccuPyc II 1340). Cette technique repose sur la mesure du volume de gaz déplacé. Ce dispositif est constitué de 2 chambres successives : la première contient l'échantillon de poudre et la deuxième est la chambre d'expansion. On suppose ici que les 2 cellules sont à pression atmosphérique (Pa). La chambre contenant l'échantillon est remplie de gaz et ce de façon contrôlée (P1). L'ouverture la chambre d'expansion permet de mesurer un différentiel de pression (P2) qui va nous permettre de calculer le volume de l'échantillon grâce à la loi de Mariotte (Équation 14):

$$V_{ech} = \frac{V_{cel} - V_{exp}}{\frac{P_1 - P_a}{P_2 - P_a} - 1}$$

Équation 14. Loi de Mariotte

La poudre présente une densité de 3,07 g/cm<sup>3</sup>.

### 1.2.4. Granulométrie

Il est important de connaître les caractéristiques granulométriques de la poudre puisque ces dernières vont, dans une certaine mesure, influencer la mise en suspension. Pour l'essai granulométrique, une barbotine à 65 % m. de matière sèche et 1,5 % de dispersant est préparée. La population est clairement bimodale avec un D50 de 0,82 ± 0,01 µm de diamètre (Malvern Mastersizer 3000). Ce résultat suggère la présence d'une population d'agrégat et une population d'agglomérat.

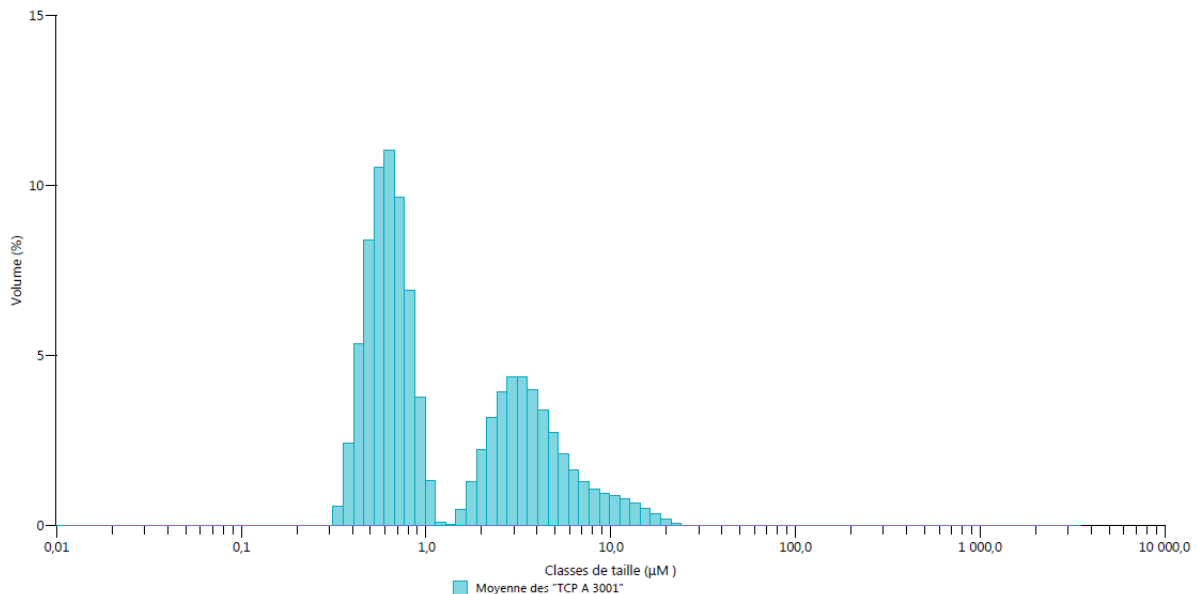
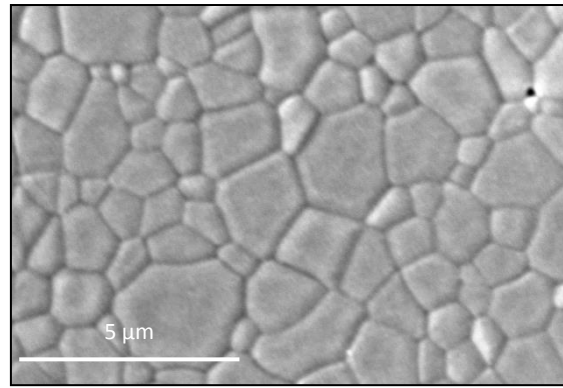


Figure 41. Analyse granulométrique volumique de la poudre

### 1.2.5. Microstructure

Afin de mesurer la taille des grains, des pastilles denses sont nécessaires. Ces pastilles sont élaborées avec la même suspension que les barreaux de densité (65 % mat. sèche et 1,5 % de dispersant). Le frittage s'effectue à 1100°C pendant 3 h. Ces pastilles subissent un polissage jusqu'à 1 µm (pâte diamantée). On fait ensuite subir aux échantillons une attaque thermique à 1000°C pendant 15 min. Une étape de métallisation est ensuite nécessaire pour permettre l'observation au MEB. Les grains sont visibles ainsi que quelques pores. Ces derniers correspondent aux porosités fermées « coincés » entre les grains et témoignent d'une croissance des grains normale et d'un échantillon dense. La micrographie suivante est celle d'un échantillon fritté et ayant fait l'objet d'une attaque thermique.



**Figure 42. Micrographie de la structure d'un échantillon densifié à 1100°C pendant 3 h et ayant subi une attaque thermique à 1000°C pendant 15 min**

La méthode utilisée est dite des interceptes. La taille moyenne des grains est inférieure au micromètre ( $0,85 \pm 0,11 \mu\text{m}$ ). Cette dernière est la moyenne des mesures effectuées sur 200 grains environ (NF EN ISO 643) auquel on a appliqué la correction d'Abercrombie (Annexe 4). La micrographie nous permet cependant d'identifier une certaine hétérogénéité dans les grains : certains sont beaucoup plus gros que d'autres. Cette observation concorde avec les résultats de la granulométrie qui nous indique que la population de grains est bimodale.

### **1.2.6. Dissolution et variation de pH**

Afin d'évaluer le comportement d'un échantillon de  $\beta$ -TCP immergé dans du milieu de culture cellulaire, une cinétique de dissolution corrélée au pH est effectuée. La cinétique de dissolution nous donne des informations sur l'aptitude du matériau à la résorption malgré l'intervention de mécanismes autres que la dissolution. Le suivi du pH nous permet d'évaluer comment le matériau le fera évoluer *in vivo*, en effet des écarts importants de pH sont délétères à l'ostéoconduction et donc à la guérison.

Le protocole suivi est issu de la norme ISO 13175-3. Des échantillons massifs de  $\beta$ -TCP sont immergés dans du Tris (Trishydroxyméthylaminométhane –  $(\text{OHCH}_2)_3\text{CNH}_2$ ) de telle sorte que le rapport entre la masse du matériau et le volume de Tris soit compris entre 0,1 et 4,0 ml/mg. Ce rapport est maintenu constant. Les fioles sont maintenues à 37°C et sous agitation (200 tpm) sur la durée du test. Le pH du milieu est de  $7,3 \pm 0,1$ . Des prélèvements et des mesures de pH sont effectués toutes les 24 h. Les quantités de calcium lixiviées sont déterminées par ICP. Les résultats sont compilés dans le Tableau 18:

<b>Temps (h)</b>	<b>pH</b>	<b>% m. de calcium dissous par rapport à la masse d'échantillon</b>
24	7,3	0,2
48	7,3	0,9
72	7,2	2,1

**Tableau 18. Variation de pH et pourcentage massique de calcium dissous sur une période de 48h**

Les résultats montrent clairement une dissolution du matériau dans le Tris avec une augmentation progressive de la concentration de Ca. Le pH varie très peu sur 72 h. Étant donné que cette variation ne dépasse pas 0,3 ; on considère que la poudre répond au requis de la norme.

### 1.2.7. Angle de goutte et énergie de surface

La mesure de l'angle de contact (FTA 188 Video Tensiometer) permet d'apprécier l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface. Cette méthode consiste à déposer, sur un substrat, une goutte d'un liquide suffisamment petite pour que les phénomènes liés à la gravité soient négligeables. Lorsque la goutte est stabilisée, on mesure l'angle  $\theta$  de la tangente au profil de la goutte (Figure 43). La mesure de cet angle permet d'apprécier le caractère hydrophile ( $\theta < 90^\circ$ ) ou hydrophobe ( $\theta > 90^\circ$ ) du substrat lorsque de l'eau est utilisée. On peut aussi déterminer l'énergie de surface du substrat grâce à l'utilisation de plusieurs liquides de référence. Cette mesure peut aussi nous donner des informations quant à l'homogénéité physique (rugosités) et / ou chimique de la surface.

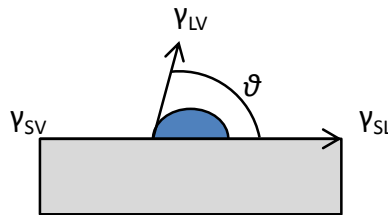


Figure 43. Schéma représentant l'angle de contact  $\theta$  et les composantes  $\gamma_{SV}$  (tension interfaciale solide - liquide),  $\gamma_{LV}$  (tension interfaciale liquide - vapeur) et  $\gamma_{SL}$  (tension interfaciale solide - vapeur).

4 liquides différents ont été choisis : l'eau, le glycérol, l'éthylène glycol et le diiodométhane. Les mesures ont été faites sur des échantillons polis jusqu'à  $1 \mu\text{m}$  (pâte diamantée). Le tableau Tableau 19 donne les valeurs des différentes composantes de liquide avec :

- $\gamma_L$  la tension interfaciale liquide-vapeur ;
- $\gamma_{Ld}$  la composante dispersive ;
- $\gamma_{Lp}$  la composante non dispersive.

(mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_L$	$\gamma_{Ld}$	$\gamma_{Lp}$
<b>Eau</b>	72,8	21,8	51
<b>Éthylène Glycol</b>	48	29	19
<b>Diiodométhane</b>	50,8	50,8	0
<b>Glycérol</b>	64	34	30

Tableau 19. Récapitulatif des composantes nécessaires au calcul de l'énergie de surface.

Ils vont nous permettre, grâce à la méthode d'Owen-Wendt (OWE69), d'accéder à l'énergie libre de la surface. L'énergie de surface du matériau s'élève à  $47 \text{ mJ/m}^2$ . Lorsque ces mêmes échantillons sont en contact avec du milieu de culture complétement sur une période

de 7 jours à 37°C en incubateur humide avec 5 % de CO<sub>2</sub>, l'énergie de surface s'élève à 57 mJ/m<sup>2</sup>. Les mesures d'angle de contact qui ont permis ce calcul reflètent l'augmentation du caractère hydrophile du matériau (Tableau 20). Cela est très probablement dû à l'adsorption protéique à la surface de la céramique.

Liquide	Angle de goutte (°)	
	Jour 0	Jour 10
Eau	51,8 ± 1	20,3 ± 1
Éthylène glycol	49,4 ± 1	29,9 ± 1
Diodométhane	34,2 ± 1	33,3 ± 1
Glycérol	50,6 ± 0	50,9 ± 1

Tableau 20 : Récapitulatif des mesures d'angle de contact au jour 0 et après 10 jour d'immersion dans du milieu de culture complétement

### 1.2.8. Mesure du point isoélectrique

La mise en forme de la poudre nécessite sa mise en suspension. La connaissance du point isoélectrique est un bon point de départ car cette caractéristique inhérente à la poudre est une indication de la gamme de pH favorable à sa mise en suspension. Cette valeur est déterminée grâce à la mesure du potentiel zêta en fonction du pH (Figure 44).

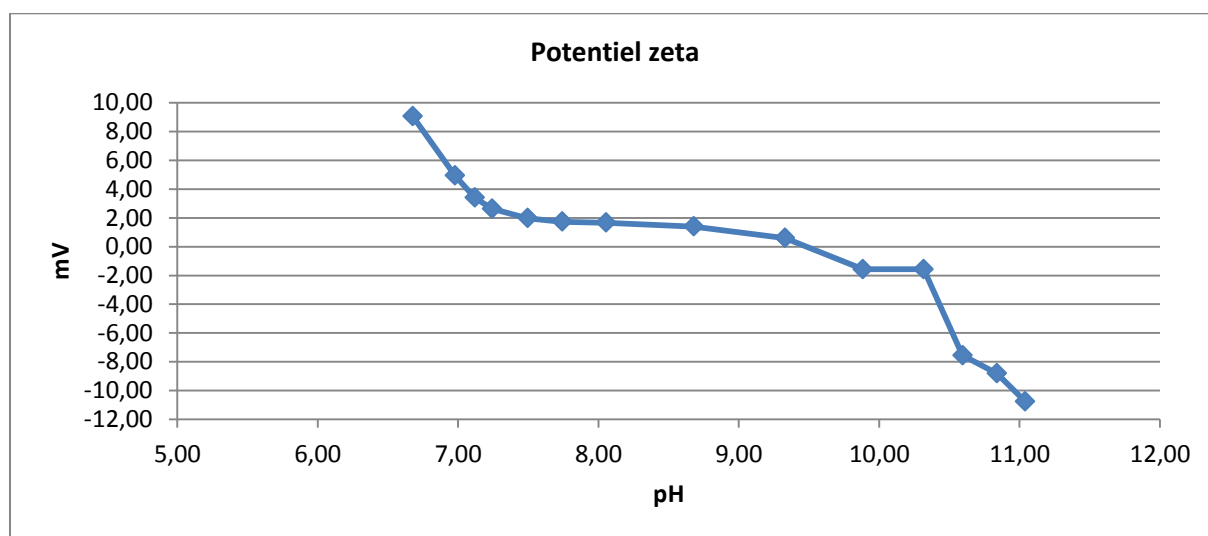


Figure 44. Mesure du potentiel zêta en fonction du pH de la poudre synthétisée

Une dispersion de  $\beta$ -TCP à 1 g/l est préparée dans de l'eau MiliQ. Le pH initial, environ 6,7, est ajusté grâce à une solution d'acide chlorhydrique, HCl à  $1 \cdot 10^{-1}$  mol/l. La force ionique initiale est de  $1 \cdot 10^{-2}$  mol/l. La dispersion est passée au bain à ultrasons pendant 30 min avant les mesures. Le titrage de la solution se fait grâce à une solution de soude, NaOH à  $1 \cdot 10^{-1}$  mol/l. Les mesures (Zetasizer Nano ZS, Malvern UK) sont faites après stabilisation de la dispersion pendant 5 min. Au fur et à mesure de l'addition de soude, il y a formation de NaCl ce qui augmente, en fin de mesure, la force ionique à  $1,2 \cdot 10^{-2}$  mol/l.



## Chapitre 2 : Méthodes expérimentales, caractérisation et mise en forme du matériau

Le potentiel isoélectrique du  $\beta$ -TCP se trouve vers pH 9,5. On considère que pour qu'une suspension soit stable, le pH doit être éloigné du point isoélectrique de la poudre, *i.e.* que la valeur absolue du potentiel zêta soit élevée. Dans le cas présent, seuls les pH très basiques (> pH 11) permettront la mise en suspension du matériau. Afin d'éviter cela, il convient d'utiliser un dispersant. Ce dernier permettra d'augmenter la valeur absolue du potentiel zêta, quel que soit le pH de la solution. Cette mesure a été faite dans le cadre d'une collaboration avec le *Ruder Boskovich Institute* de Zagreb, Croatie.

### 1.3. Récapitulatif

Tests	Conditions et paramètres	Résultats
Surface spécifique	PB et PF subissent un dégazage à 250°C / 24 h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PF : <math>5,5 \pm 0,3 \text{ m}^2/\text{g}</math></li> <li>• PB : <math>69 \pm 0,6 \text{ m}^2/\text{g}</math></li> </ul>
Détermination des différentes phases	Traitement thermique PB : 1000°C / 15 h	$3 \pm 1 \%$ d'HA
Pureté de la poudre	Traitement thermique PB : 1000°C / 15 h	Absence de pyrophosphate de calcium
Quantification de métaux lourds	PB	0,013 mg/kg
Comportement thermique	PB	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Élimination de l'eau et du nitrate d'ammonium entre 90 et 300 °C.</li> <li>2. Transformation des espèces apatitiques vers 775°C.</li> <li>3. Transition de phase vers 1150°C</li> </ol>
Densité	Traitement thermique PF : 250°C/24 h et conservation dans un dessiccateur	$3,070 \pm 0,01 \text{ g}/\text{m}^3$
Point isoélectrique	-	pH 9,5
Dilatométrie	Pressage isostatique 5°C/min	$14 \pm 0,8 \%$
Aptitude au frittage et densité en cru	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Densité en cru (coulé)</li> <li>2. Densité en cru (pressé)</li> <li>3. Barbotine à 65 % m. matière sèche et 1,5 % m. de dispersant - Frittage - 1100°C / 3 h</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. &gt; 63 %</li> <li>2. &gt; 60 %</li> <li>3. &gt; 99 %</li> </ol>
Cycle de frittage	Barbotine à 65 % m. matière sèche (PF) et 1,5 % de dispersant subissant différent cycle de frittage	5°C/min jusqu'à plateau à 1100°C pendant 3 h
Granulométrie	Barbotine à 65 % m. matière sèche (PF) et 1,5 % de dispersant (2910 rpm - US/20s)	Distribution bimodale D50 : $0,82 \pm 0,01 \mu\text{m}$
Microstructure	Barbotine à 65 % m. matière sèche (PF) et 1,5 % m. de dispersant Frittage – 1100°C / 3h	Distribution bimodale $0,85 \pm 0,11 \mu\text{m}$ (200 grains)
Cinétique de dissolution (Ca) et variation de pH sur 72 h dans du Tris (( $M_{\text{ech}}/V_{\text{sol}} = 0,1$ à $0,4 \text{ mg}/\text{ml}$ )	Exprimé en % de Ca dissous par rapport à la masse totale de l'échantillon	<p>Jour 1 : 0,2 %</p> <p>Jour 2 : 0,9 %</p> <p>Jour 3 : 2,1 %</p> <p>Variation pH &lt; 0,3 → OK</p>
Énergie de surface	Barbotine à 65 % m. matière sèche (PF) et 1,5 % m. de dispersant Frittage – 1100°C / 3 h et poli	$47 \text{ mJ}/\text{m}^2$

Tableau 21. Récapitulatif des différents tests de contrôle de la poudre de  $\beta$ -TCP (PB : poudre brute et PF : la poudre finale)

## 2. Mise en forme de la poudre

Les méthodes de mise en forme choisies, l'imprégnation d'une préforme polymérique, la stéréolithographie et la congélation orientée, nécessitent la mise en suspension de la poudre de  $\beta$ -TCP. Dans un premier temps, on mélange la poudre à de l'eau distillée. L'eau présente de nombreux avantages puisqu'elle est non polluante, peu chère et facilement manipulable. Toutefois, l'eau, à elle seule, ne permettra pas de produire des échantillons de bonne qualité. Des adjuvants doivent être incorporés au mélange afin d'obtenir, une faible viscosité pour un haut taux de charge et une pièce dont la manipulation est aisée avant la densification. Il existe pour chaque méthode de mise en forme des requis différents. Les barbotines ont donc été optimisées pour chaque technique.

Les échantillons fabriqués serviront ensuite de supports pour la culture cellulaire. Ils doivent donc s'adapter aux plaques de cultures et être facilement manipulable. Les dimensions des échantillons sont donc fixées à 11 mm de diamètre pour une hauteur de 3 mm.

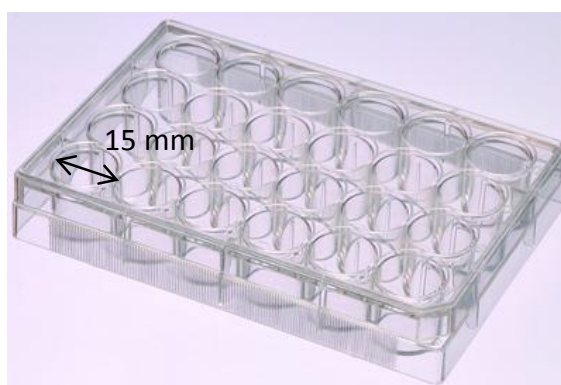


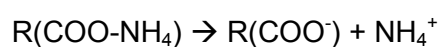
Figure 45. Photographie d'une plaque de culture de 24 puits (Source: Catalogue VWR)

### 2.1. Imprégnation d'une préforme en PMMA par une suspension

#### 2.1.1. Mise en suspension de la poudre

Le dispersant est un adjuvant permettant de stabiliser des particules de poudre en suspension dans de l'eau.

Le Darvan C est un électrolyte de type carboxylate: le polyacrylate d'ammonium. Ce dernier se présente sous forme de sels d'acide polyacrylique basiques. L'accroissement du pH de la solution va entraîner la dissociation du dispersant selon l'Équation 15:



Équation 15. Décomposition du dispersant

Lorsque le pH augmente, l'ensemble des groupements carboxyliques sont dissociés. Le mécanisme de répulsion est de type électro-stérique. C'est-à-dire que les molécules de dispersant anionique s'adsorbent à la surface des particules avec des expansions de chaînes polymériques vers le solvant.

La mesure du potentiel zêta par accoustophorèse (Accoustosizer IIS, Colloidal dynamics) permet d'effectuer une étude potentiométrique d'une barbotine en conditions réelles. Les 2 titrages effectués visent, dans un premier temps à déterminer la quantité optimale de dispersant et dans un deuxième temps à apprécier l'influence du pH lorsque les conditions de dispersion idéales sont réunies. On prépare une solution aqueuse de dispersant qui est introduite de façon contrôlée dans une barbotine contenant 10 % m. de matière sèche. Les variations du potentiel zêta en fonction de la quantité de dispersant introduite sont retranscrites dans la Figure 46. Le logiciel de calcul prend en compte les phénomènes de dilution, on peut donc déterminer la quantité optimale de dispersant par lecture graphique. Ce test s'est effectué dans le cadre d'une collaboration avec le *Belgian Ceramic Research Center* de Mons, Belgique.

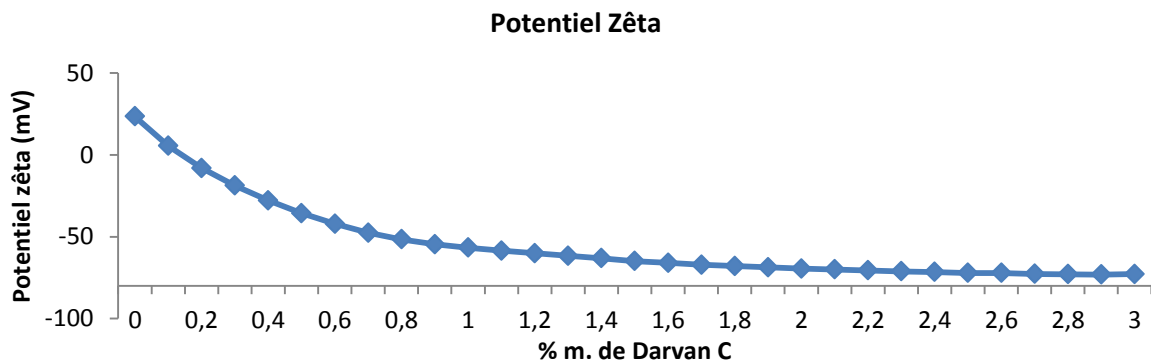


Figure 46. Détermination de la quantité optimale de dispersant pour une suspension de  $\beta$ -TCP

Les particules de  $\beta$ -TCP sont chargées positivement et présentent un potentiel zêta de 23,5 mV et un pH naturel de 9,2. L'ajout de dispersant va provoquer la diminution du potentiel zêta jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint. Le début de la stabilisation du potentiel zêta marque le début de la gamme de concentration de dispersant optimale. On estime que le début de cette stabilisation se fait vers -60 mV pour une valeur de dispersant de 1,2 % massique par rapport à la poudre. En appliquant une marge de sécurité, la quantité optimale de dispersant est fixée à 1,5 % par rapport à la masse de matière sèche. Le pH de la solution avec la quantité optimale de dispersant est de 8,8. On a donc dans 100 g de barbotine, 65 g de matière sèche et 0,975 g de Darvan C.

Le liant va conférer à la pièce une bonne tenue mécanique avant la densification. Il agit comme une colle inter-granulaire et est éliminé lors du traitement thermique. Ce dernier est un latex de type acrylique présenté sous forme d'émulsion aqueuse à 55 % (Duramax B1001, Rohm & Haas). Le principal avantage de cet adjuvant est qu'il ne provoque pas d'augmentation importante de la viscosité. Afin de déterminer la quantité optimale de liant, une série de massifs a été élaboré avec des concentrations de liant différentes allant de 1 à 5 % par rapport à la quantité de matière sèche. Ces massifs subissent un traitement thermique de déliantage identique à celui subi par les échantillons obtenus par imprégnation d'une préforme polymérique. La tenue mécanique des massifs ainsi que leur aptitude à être manipulés sont évaluées. À partir de 2,5 % de liant dans la suspension, on observe une nette diminution des casses liées aux manipulations de l'opérateur. L'application d'une marge de sécurité est cependant nécessaire pour faire diminuer de façon significative la fréquence des casses. La quantité de liant dans la suspension est fixée à 4 % par rapport à la quantité de matière sèche.

Pour 100 g de barbotine, on mélange pendant 1 h dans une jarre de broyage contenant des billes de zircone yttrée, 65 g de poudre à 34,025 g d'eau distillée et à 0,975 g de dispersant. Cette étape assure la désagglomération des particules ainsi que l'obtention d'une suspension stable. Elle est ensuite transférée dans un bécher afin que l'on puisse y ajouter 2,6 g (4 % m. matière sèche) de liant et 0,065 g (0,01 % m. matière sèche) d'agent mouillant (Dynol, Air Products Chemicals). Le mélange s'effectue sous agitation magnétique pendant 30 min. L'agent mouillant va permettre de diminuer la tension superficielle de la suspension favorisant un contact plus intime avec les billes.

### ***2.1.2. Imprégnation de la préforme polymérique***

Une colonne de tamisage permet de discriminer les différentes gammes granulométriques des billes de PMMA. La gamme granulométrique d'intérêt est celle qui va de 500 à 600  $\mu\text{m}$ . Le diamètre d'interconnexion des billes visé est de 150  $\mu\text{m}$ . Ces dimensions concernent la pièce avant frittage.

0,49 g de billes sont introduites dans un moule en acier inoxydable de 14 mm de diamètre. Les billes sont tassées à l'aide d'un piston de façon à rendre horizontale la surface. Une solution aqueuse d'acétone à 75 % vol. est ajoutée. Sous son action, la surface des billes se dissout partiellement entraînant leur fusion, la création de ponts. Cette réaction s'accompagne d'une diminution de la hauteur globale de l'édifice polymérique. Lorsque la valeur de retrait de -140  $\mu\text{m}$  est atteinte, l'édifice est immergé dans de l'eau distillée afin de stopper la réaction. Après séchage, les édifices sont infiltrés par une suspension stable de céramique dans des moules de plâtre. Après démoulage, la pièce est légèrement retravaillée

à la main avant d'être placée dans une étuve ventilée à 40°C pendant 24 h pour parfaire le séchage. La pièce subit un premier traitement thermique, le déliantage, dont le but est d'éliminer le porogène (Figure 47). Le macroporeux est par la suite fritté à 1100°C pendant 3 h à 5°C/min.

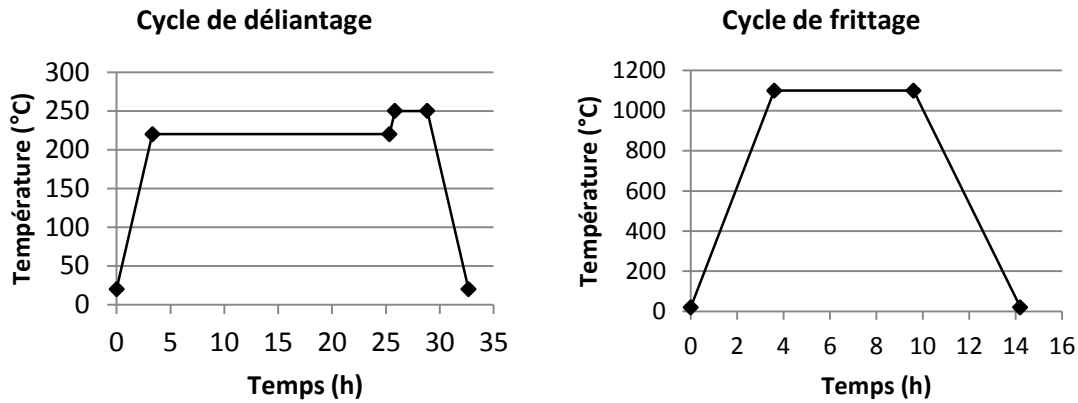


Figure 47. Cycle thermique que subit une préforme polymérique imprégnée d'une suspension de  $\beta$ -TCP : un traitement de déliantage suivi d'un frittage

Le résultat, après frittage, est un disque poreux de 11 mm de diamètre sur 3 mm de hauteur environ, (Figure 48.C)

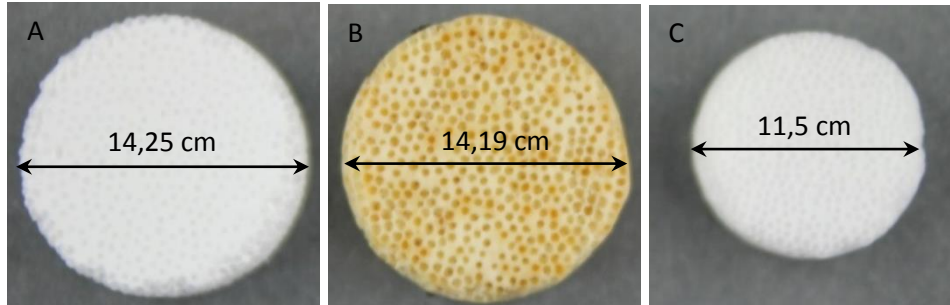


Figure 48 : (A) Échantillon non délianté, (B) échantillon délianté et (C) échantillons délianté et fritté.

## 2.2. Congélation orientée

### 2.2.1. Optimisation de la barbotine

Les adjuvants utilisés et leurs concentrations proviennent des travaux de D. Hautcoeur (HAU14). Le Dolapix CE64 (Zschimmer & Schwarz) est un dispersant de type polyacrylate d'ammonium similaire au Darvan C. Sa concentration optimale a été déterminée à l'aide d'un accoustosizer et est fixée à 2,25 % m. par rapport à la masse de matière sèche.

Le liant est un poly (éthylène glycol) de masse moléculaire égale à 1000 mol/g.

### 2.2.2. Congélation

Trois échantillons différents ont été élaborés grâce à la congélation orientée. Ces échantillons diffèrent de par leurs compositions en quantité de matière sèche et en liant. Meurice *et al.* (MEU16) ont fabriqué 7 types d'échantillons (Tableau 22) différents et les ont soumis à un certain nombre de tests biologiques.

Échantillons	Paramètres	Taille de pores		Porosité (%)
		Petit diamètre	Grand diamètre	
CO1	57 % / 3 % / 1°C/min	41 ± 12	209 ± 80	51 ± 1
CO2	57 % / 3 % / 5°C/min	37 ± 14	198 ± 110	52 ± 1
CO3	57 % / 3 % / 20°C/min	6 ± 2	13 ± 5	53 ± 1
CO4	57 % / 1,5 % / 1°C/min	54 ± 16	366 ± 200	51 ± 1
CO5	57 % / 6 % / 1°C/min	53 ± 17	277 ± 160	50 ± 1
CO6	47 % / 3 % / 20°C/min	67 ± 27	329 ± 140	67 ± 1
CO7	67 % / 3 % / 1°C/min	44 ± 11	149 ± 60	36 ± 1

Tableau 22. Récapitulatifs des paramètres de fabrication (% m. de matière sèche / % m. de liant par rapport au taux de matière sèche / vitesse de congélation), des dimensions des pores et du taux de porosité ( (MEU16)

Les observations ont permis la sélection de 3 échantillons; CO1, 4 et 7; selon un certain nombre de paramètres :

- le taux de porosité : CO1 et 4 présentent des taux de porosité équivalents et comparable aux valeurs des échantillons générés par les autres méthodes de mise en forme ;
- les dimensions de pores : CO7 présente les plus petites tailles de pores ayant permis une bonne colonisation cellulaire. CO4 quant à lui présente les plus grands pores ;
- le taux de charge : un taux de matière sèche proche de celui des échantillons générés par les 2 autres méthodes de mise en forme ;
- la concentration de liant : une concentration trop élevée favorise des débris lors de la découpe ;

Les structures tubulaires générées par cette technique pourraient être bénéfiques à l'invasion cellulaire et à la vascularisation de l'implant. Les suspensions ont été préparées la veille de la congélation. On mélange tout d'abord, eau distillée, matière sèche et dispersant. Cette étape a lieu en présence de billes de zircone yttrée de 2 mm de diamètre, dans un mélangeur tridimensionnel Turbula®, pendant 24 h. La quantité de billes correspond à la masse de la matière sèche dans la suspension. Après 24 h de mélange, les billes sont éliminées par filtration et on ajoute à la suspension le liant avant une dernière étape de mélange doux au Turbula® pendant 30 min.

Le moule est constitué de 4 parties : une base en laiton et 3 pièces en Teflon® qui une fois assemblées, forment un cylindre creusé de 3 réservoirs verticaux ouverts par le haut. Les supports texturés sont placés au fond des réservoirs. L'assemblage du moule se fait la veille et nécessite l'utilisation d'une colle de silicone résistante aux fortes variations de température. Afin d'assurer un bon contact entre la base en laiton du moule et le socle de l'enceinte cryogénique (Air Liquide - Freezal - NH104003), on utilise une pâte thermique (Assmann WSW component).

Comme expliqué précédemment, le moule est d'abord refroidi à -20°C au rythme de 1°C/min avant l'introduction de 7 ml de suspension dans chacun des 3 réservoirs. Le cycle de refroidissement se poursuit au même rythme jusqu'à -40°C. Cette température est maintenue jusqu'à solidification complète des échantillons. Les cylindres en  $\beta$ -TCP congelés sont démoulés et rapidement introduits dans un lyophilisateur (Amsco / Finn-Aqua) pour une période de 24 h. Les échantillons crus sont par la suite frittés à 1100°C pendant 3 h. Le diamètre des échantillons denses est rectifié au tour pour atteindre 11 mm. Les échantillons sont ensuite découpés en disques d'épaisseur 3 mm dans la zone lamellaire. Seulement 30 % de l'échantillon sont conservés. Cette mesure de précaution s'explique de par la structure anisotrope de l'échantillon et vise à avoir des disques avec des propriétés homogènes.



## **2.3. Stéréolithographie**

### ***2.3.1. Préparation de la barbotine***

Pour la préparation de la barbotine, la poudre de  $\beta$ -TCP est mélangée avec une résine acrylique à déliantage rapide. La résine est composée de dispersants, stabilisants, liants et photoinitiateurs permettant d'obtenir des suspensions chargées très fluides (de l'ordre de 100 mPa.s). La suspension est composée de 65 % m. de poudre de  $\beta$ -TCP et de 35 % m. de résine. Le mélange de résine acrylique a été fourni par le fabricant, CryoBeryl Software. La suspension est ensuite homogénéisée avec un tourne-jarre pendant 30 min en présence de billes de zircone yttrée.

### ***2.3.2. Impression***

Lors de la conception, le modèle tridimensionnel de l'implant est soutenu par des piliers automatiquement placés par le logiciel (Creation Workshop, Datatree3D). L'objet a ensuite été sectionné en une série de couches de 50  $\mu$ m d'épaisseur puis transmis au logiciel de stéréolithographie (CryoCeram, CryoBeryl Software). L'impression couche par couche se fait via l'imprimante CryoCeram Printer. La projection d'un masque UV dynamique sur la surface de la suspension permet sa polymérisation sélective et donc la construction de l'objet couche par couche.

La profondeur de polymérisation est un paramètre clé qui va permettre le chevauchement et donc la cohésion des couches entre elles. Ainsi en évaluant la profondeur d'irradiation en fonction du temps, on peut déterminer le temps de polymérisation optimal qui assurera une bonne adhésion inter couches. Pour la suspension de  $\beta$ -TCP, un temps de polymérisation de 6 secondes (avec une irradianance de 5 mW/cm<sup>2</sup>) permet d'obtenir une bonne cohésion entre les couches. Après la polymérisation, l'échantillon est immergé dans la barbotine puis remonte en s'arrêtant à 50  $\mu$ m sous la surface du liquide. Ce mouvement provoque l'apparition d'une surépaisseur de barbotine au niveau de l'échantillon ; cette surépaisseur de barbotine doit se relaxer pour retrouver le niveau général de la suspension et permettre l'étalement optimal de la barbotine à la surface de la couche polymérisée. Si ce temps est trop court, la couche polymérisée aura les bords bombés et ne permettra pas une cohésion optimale entre couches. Dans notre cas, un temps minimum de 10 secondes est nécessaire pour la bonne construction des structures.

Les échantillons sont frittés suivant le cycle thermique décrit précédemment.

## 2.4. Caractérisations des macroporeux

### 2.4.1. Micrographies et porosité

La macrostructure de chaque échantillon a été observée au microscope électronique à balayage (Figure 49).

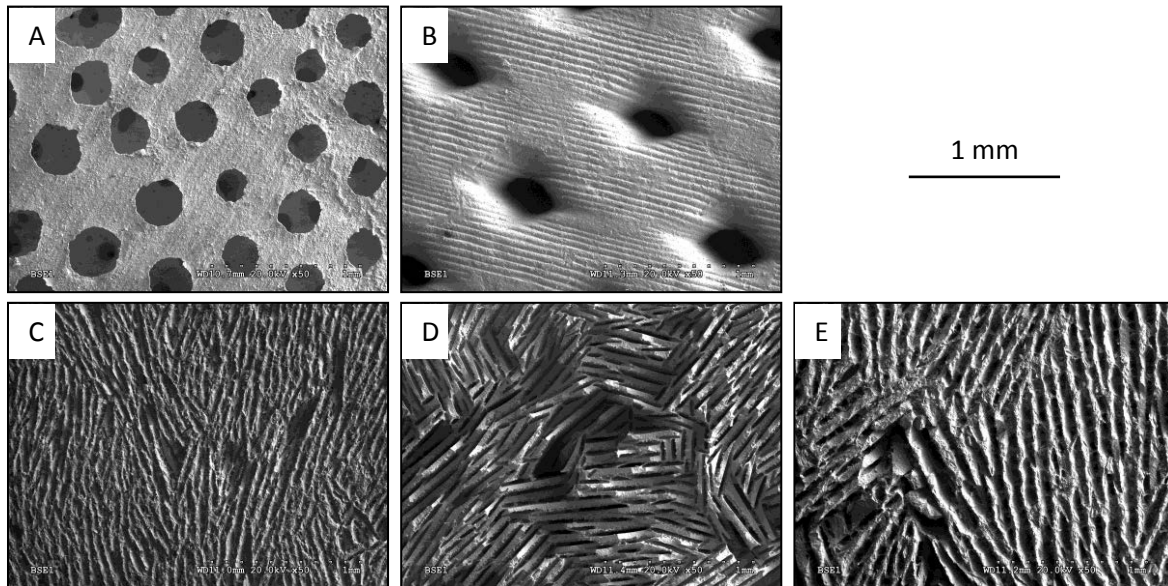


Figure 49. Micrographies MEB de la surface des échantillons : (A) PS, (B) 3D, (C) CO1, (D) CO4 et (E) CO7

L'échantillon PS présente des pores sphériques interconnectés. L'impression 3D a généré des échantillons avec des pores en forme de losange et en entonnoir. On observe aussi des sillons à la surface due à la méthode de mise en forme. La congélation génère quant à elle des pores tubulaires de section ellipsoïdale. On retrouve sur les échantillons CO1 et 7 des débris obstruant les pores. Toutefois c'est sur CO7 que l'on trouve le plus de débris. Cela est probablement dû aux concentrations en matière sèche et en liant : plus ces dernières sont élevées plus la céramique est dure ce qui favorisera la génération de poussières lors de la découpe. Ces micrographies ont aussi servi pour la mesure de la taille moyenne des pores. Les mesures se sont faites via un logiciel de traitement d'images (Image J) et les moyennes proviennent d'un minimum de 200 valeurs (Tableau 23). Le taux de porosité est mesuré par pesée sous eau (Tableau 23).

Échantillons	Taille de pores et d'interconnexions ( $\mu\text{m}$ )		Porosité (%)
PS	435 $\pm$ 58 – 121 $\pm$ 22		65 $\pm$ 1
-	Petit diamètre	Grand diamètre	-
3D	202 $\pm$ 23	350 $\pm$ 23	50 $\pm$ 1
CO1	41 $\pm$ 12	209 $\pm$ 80	51 $\pm$ 1
CO4	54 $\pm$ 16	366 $\pm$ 200	51 $\pm$ 1
CO7	44 $\pm$ 11	149 $\pm$ 60	36 $\pm$ 1

Tableau 23. Taille de pore et porosité des macroporeux

Contrairement aux autres échantillons, 3D présente des pores en surface qui sont en forme d'entonnoir. Les dimensions données dans le tableau ne correspondent pas à la partie évasée du pore situé en surface de l'échantillon mais à l'étranglement situé en deçà de la surface. En surface on est plus proche de 700  $\mu\text{m}$  pour le grand diamètre et 500  $\mu\text{m}$  pour le petit.

Contrairement aux 2 autres méthodes de mise en forme, la congélation orientée permet de générer une topographie intéressante à l'intérieur des pores. Cette topographie varie en fonction de la formulation. On voit clairement sur les micrographies suivantes que CO4 possède de très nombreuses structures micrométriques ressemblant à des replis (Figure 50.C et D et Figure 51). La « densité » de replis diminue pour CO1 (Figure 50.A et B) et devient très faible pour CO7 (Figure 50.E et F). Ces structures peuvent jouer un rôle dans la colonisation cellulaire.

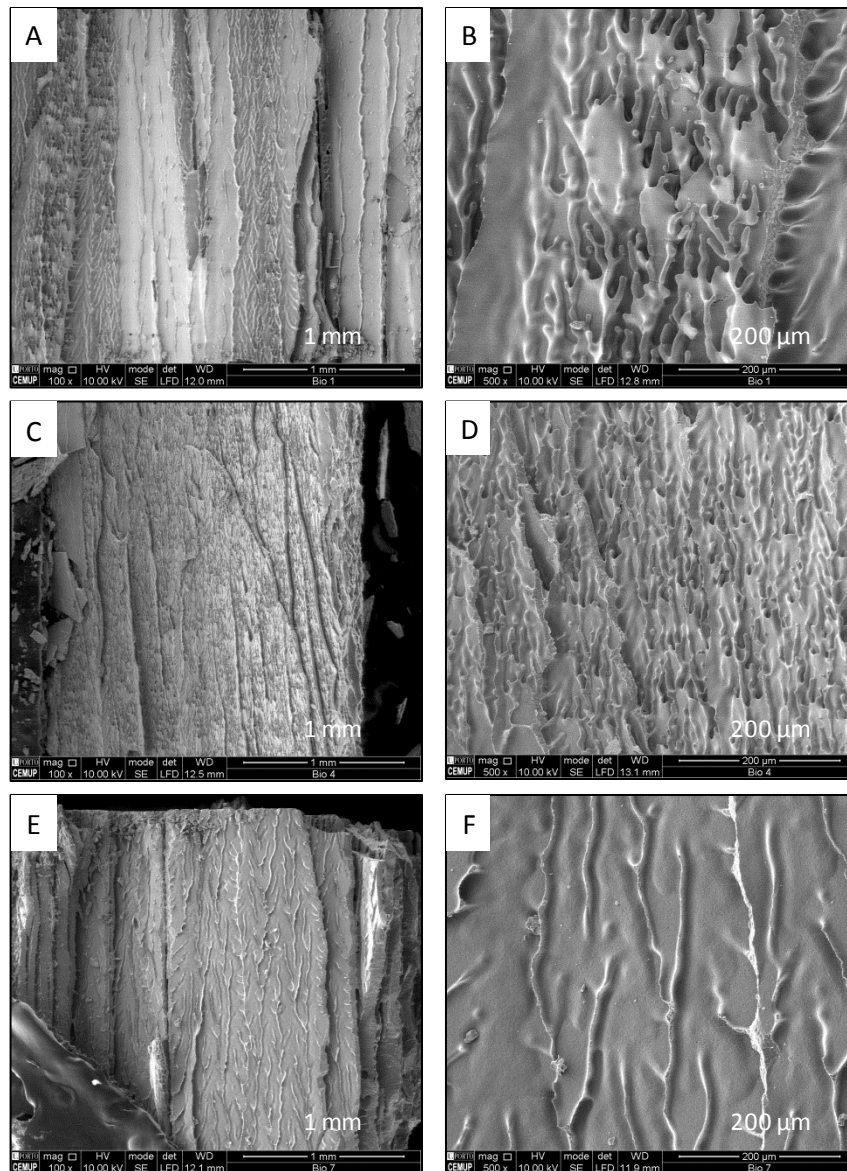


Figure 50. Micrographie MEB de section transversale des échantillons obtenus par congélation orientée : CO1 (A et B), CO4 (C et D) et CO7 (E et F)

La Figure 51 montre le profil d'une paroi.

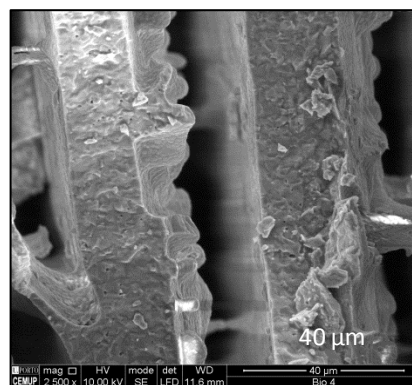


Figure 51. Micrographie MEB de parois de pores de l'échantillon CO4

### 2.4.2. Surface spécifique

La mesure de la surface spécifique moyenne des échantillons s'est faite sur une dizaine d'échantillons. Limite de détection du Flowsorb III 2310 : 0,01 m<sup>2</sup>/g avec une reproductibilité de plus de 0,5%.

	PS	CO4	CO1	3D
<b>Surface spécifique (m<sup>2</sup>/g)</b>	0,6 ± 0,1	0,63 ± 0,06	0,65 ± 0,1	0,44 ± 0,04

Tableau 24. Surface spécifique des macroporeux

Les surfaces spécifiques des échantillons PS et CO4 ne présentent pas de différences significatives. L'échantillon 3D quant à lui présente une surface spécifique inférieure aux autres. Les mesures faites sur l'échantillon CO7 ne sont en rien représentatives de la réalité. En effet l'abondance de débris issus de la découpe a parasité les mesures.

### 2.4.3. Rugosimétrie

Les mesures n'ont été effectuées que sur les échantillons avec les meilleurs résultats biologiques.

	PS	CO4	3D
<b>Ra</b>	20 nm	34 nm	51 nm

Tableau 25. Tableau récapitulatif des différentes valeurs de Ra obtenues par microscopie confocale

Ra correspond à la moyenne arithmétique des écarts à la ligne moyenne du profil. Les mesures ont été faites grâce au microscope confocal (Leica DCM 3D, Leica Microsystems). Les échantillons subissent dans un premier temps une étape de métallisation. Ces clichés nous permettent d'apprécier la topographie de chaque échantillon. On voit clairement à la surface de l'échantillon 3D la présence de sillons réguliers.

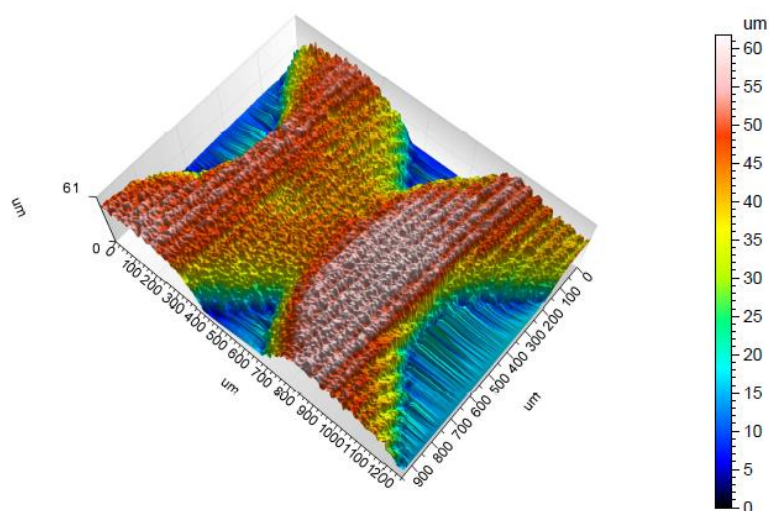


Figure 52. Reconstruction tridimensionnelle d'une portion d'un échantillon 3D au microscope confocal

L'échantillon PS présente une surface relativement lisse avec des pores de diamètre différents.

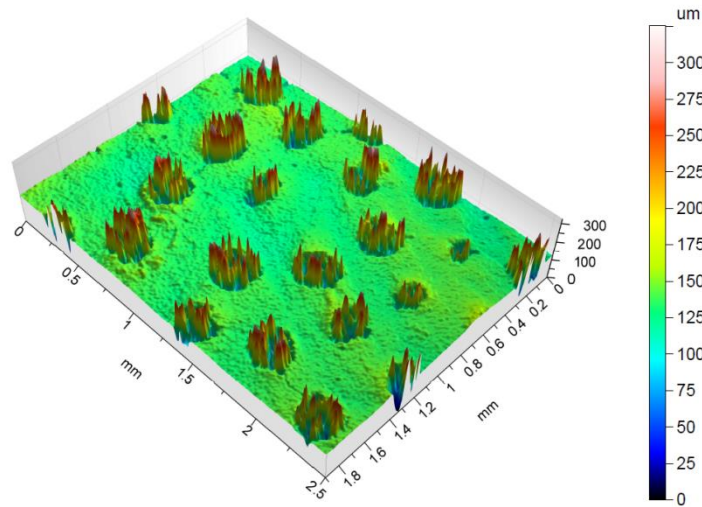


Figure 53. Reconstruction tridimensionnelle d'une portion d'un échantillon PS au microscope confocal

L'échantillon CO4 a été cassé dans le sens de la congélation de sorte à révéler sa structure interne. On observe une succession de parois parallèles avec à leur surface des structures micrométriques.

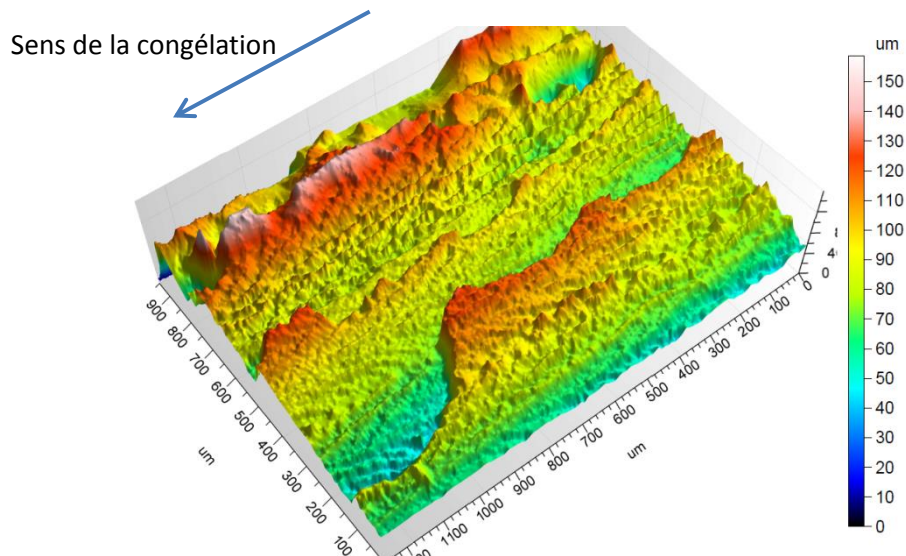


Figure 54. Reconstruction tridimensionnelle d'une portion d'un échantillon CO4 brisé dans le sens de la congélation

Les rugosités ont été mesurées sur les échantillons avec les meilleurs résultats d'un point de vue biologique. PS, 3D et CO présentent des rugosités de tailles inférieures à la centaine de nanomètres. La littérature nous indique qu'une telle rugosité contribue positivement à l'adsorption protéique et donc, *in fine*, à l'adhésion cellulaire.

## Chapitre 3 : Culture cellulaire et évaluation biologique

Les essais biologiques ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration entre le LMCPA, Université de Valenciennes et l'INEB, Université de Porto, Portugal.

### 1. Matériels et méthodes expérimentales

#### 1.1. Culture cellulaire

Deux types de cellules humaines ont été utilisées : des cellules d'origine tumorales, les MG63 et des cellules issues de culture primaire, les cellules souches mésenchymateuses. Les phosphates de calcium permettent l'adhésion et la prolifération de ces dernières (KAS08).

Les MG63 nous ont permis d'évaluer l'aptitude de nos échantillons à accueillir des cellules. Ces dernières étant des cellules d'origines tumorales, elles sont de bonnes candidates pour l'évaluation de la prolifération cellulaire sur un support. Les cellules souches mésenchymateuses nous ont permis d'étudier l'impact des caractéristiques structurales de chaque échantillon. En effet leur comportement *in vitro* est plus proche de ceux que l'on peut observer *in vivo*.

Le donneur de cellules souches mésenchymateuses est un individu de sexe masculin âgé de 5 ans. L'échantillon osseux prélevé est divisé en plusieurs morceaux et rincé avec de l' $\alpha$ -MEM ( *$\alpha$ -Minimum Essential Medium*) supplémenté en sérum (10 % de sérum de veau fœtal), en antibiotiques (pénicilline (10 unité/ml) + streptomycine (2,5  $\mu$ g/ml) en solution saline, Sciencell) et en antifongique (fungizone (2,5  $\mu$ g/ml), Sigma). La suspension cellulaire qui en résulte sert à ensemercer une boîte de Pétri. La culture dure 10 jours dans un incubateur humide avec 5 % de CO<sub>2</sub> à 37°C. Cette monocouche cellulaire est rincée au PBS (2 fois) et le milieu est renouvelé tous les 3 jours. Lorsque la culture primaire atteint 80 % de la confluence, les cellules adhérentes sont rincées avec du PBS, détachées sous action enzymatique (0,04 % de trypsine à 37°C) et cultivées.

Une analyse de cytométrie en flux a confirmé la présence de marqueurs spécifiques aux cellules mésenchymateuses (CD105, CD146 et CD90 positif et CD45 négatif). Ces derniers, les clusters de différenciation, sont des antigènes spécifiques exprimés à la surface des cellules. Ils permettent d'identifier avec précision le type cellulaire. Étant donné la pluripotence des cellules souches mésenchymateuses, une expérience préliminaire nous a permis d'évaluer la voie de différenciation préférentielle de ces cellules.

Les cellules ont étéensemencées sur des plaques de culture en polystyrène 24 puits ( $2 \cdot 10^4$  cellules/puits) dans le milieu de culture décrit plus haut. Grâce à l'immunohistochimie, *i.e.* le marquage de molécules spécifiques grâce à des colorants fluorescents, on a pu déterminer que les cellules étaient bien des ostéoblastes (ALP) et qu'elles ne présentaient pas de marqueurs chondrocytaires (safranin O) ou adipocytaires (oil red O).

Avant de servir de support de culture, les échantillons sont stérilisés dans un autoclave à 125°C pendant 20 min en présence de vapeurs d'eau. Les échantillons sont par la suite transférés dans des plaques de culture 24 puits stériles en présence de milieu de culture non supplémenté et incubés (37°C / 5 % CO<sub>2</sub> / atmosphère humide) pendant 1 semaine avant ensemencement. Une libération trop importante d'ions est délétère à la suivie cellulaire. Cette étape de rinçage va permettre de ralentir cette cinétique et ainsi favoriser la survie et le développement cellulaire. La culture cellulaire se fait par la suite dans du milieu supplémenté que l'on renouvèle tous les 3 jours.

### 1.2. Étude de la morphologie des CSMH

#### 1.2.1. Microscopie électronique à balayage

L'étude de la morphologie cellulaire s'est essentiellement fait par MEB (FEI Quanta 400 FEG/ESEM). Les cellules ont tout d'abord été déshydratées par des passages successifs dans des bains d'éthanol et d'hexaméthylsilazane de plus en plus concentrés (50 à 100 %). Une étape finale de métallisation (Au et Pd) est ensuite nécessaire avant observation au MEB.

#### 1.2.2. Immunomarquage

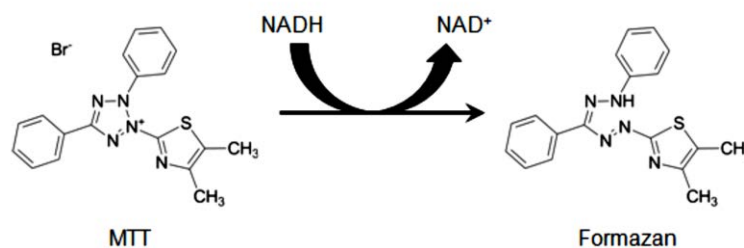
L'immunomarquage est une technique de biologie cellulaire qui consiste à marquer, grâce à un anticorps, un élément de la cellule. La première étape consiste à fixer les cellules dans une solution de formaldéhyde à 3,7 % pendant 15 min. Elles subissent ensuite une étape de perméabilisation grâce à une incubation pendant 30 min dans une solution de Triton à 0,1 %. Afin de limiter les interactions non spécifiques entre antigènes et cibles potentiels, les échantillons sont incubés pendant 30 min dans du BSA (*Bovine Serum Albumin*). Les échantillons sont ensuite immergés successivement dans une solution avec de la phalloïdine (marquage des filaments d'actine) et ensuite dans une solution avec du DAPI (marquage des noyaux). Entre chaque bain, les échantillons sont rincés avec du PBS (*Phosphate Buffer Solution*). L'observation des échantillons se fait ensuite grâce à un microscope confocal (Leica TCS SP5 AOBS instrument).



### 1.3. Prolifération cellulaire et activité métabolique

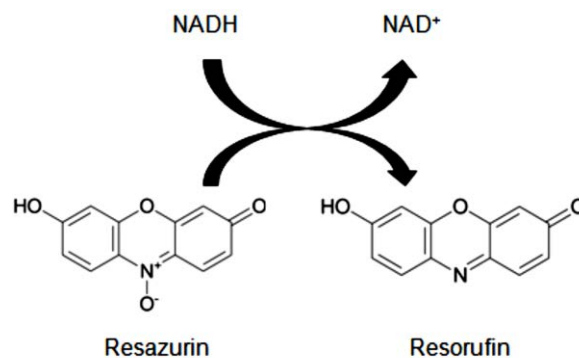
La prolifération cellulaire peut être suivie de nombreuses façons. Les tests peuvent être quantitatifs, comme lorsqu'on suit l'apparition d'un produit de réaction catalysé par une enzyme cellulaire au cours du temps ou qualitatifs, comme quand on marque les cellules vivantes avec un colorant vital.

Afin d'avoir une indication visuelle et qualitative de l'état de la prolifération des MG63 sous une loupe binoculaire, le MTT a été utilisé comme agent colorant. Le MTT ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium fait partie de la famille des composés tétrazolium utilisée en biochimie comme indicateur d'oxydo-réduction (RIS04). Seules les cellules vivantes sont en mesure de transformer le MTT en formazan (Équation 16), composé cristallin de couleur violette. Les échantillons sont incubés avec 1,2 ml de solution de MTT à 1% pendant 3 h dans une étuve (37°C / 5 % CO<sub>2</sub> / atmosphère humide). Les échantillons sont par la suite transférés dans une nouvelle plaque de culture pour observation à la loupe binoculaire. Les cellules vivantes sont colorées en violet.



Équation 16. Réaction de réduction qui permet de transformer le MTT en formazan

Pour les CSMH, on utilise un indicateur d'oxydo-réduction : la résazurine. Elle est réduite, via une enzyme mitochondriale, en résorufine (Équation 17), un composé fluorescent (excitation à 560 nm et filtre émission à 590 nm) quantifiable (RIS04). La fluorescence dépend ainsi du nombre de cellules et de leur activité métabolique mitochondriale.

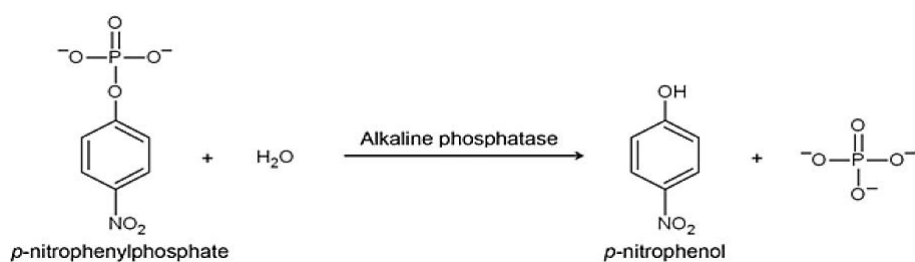


Équation 17. Réaction de réduction qui permet de transformer la résazurine et résorufine

Les échantillons ont tout d'abord été transférés dans une nouvelle plaque de culture avec du milieu de culture neuf avec 10 % de résazurine et le tout a été incubé pendant 3 h à 37°C. Des prélèvements de 100 µl ont été transférés dans une plaque 96 puits pour permettre la mesure de la fluorescence par un lecteur de plaque (Synergy HT, Biotek). Le milieu de culture cellulaire est renouvelé après les prélèvements. Les résultats sont exprimés en unité de fluorescence relative (RFU). Le contrôle correspond aux résultats issus de cellules cultivées sur le fond en polystyrène. L'essai compte 2 unités par types d'échantillons et 3 mesures par unités. Cette expérience se déroule sur 35 jours.

#### 1.4. Activité protéique : la phosphatase alcaline

L'activité de cette protéine se mesure grâce au produit d'une réaction chimique s'effectuant en milieu basique (pH 10,5) : l'hydrolyse du paranitrophenyl phosphate (Sigma), (PNPP) en paranitrophénol (PNP) (Équation 18). Ce dernier est jaune (absorbance maximale : 405 nm) et sa concentration peut être mesurée au cours du temps grâce à un spectromètre.



Équation 18. Réaction de déphosphorylation du paranitrophényl phosphate en paranitrophénol et phosphate inorganique

Les plaques de culture sont incubées avec le substrat pendant 1 h en incubateur (37°C / 5 % CO<sub>2</sub> / Atmosphère humide). Ensuite la réaction est stoppée grâce à l'ajout de soude à 5 M. Des prélèvements de 100 µl ont été transférés dans une plaque 96 puits pour permettre la mesure de la fluorescence par un lecteur de plaque (Synergy HT, Biotek). L'activité mesurée est normalisée par rapport à la quantité totale de protéine et est exprimée en nanomole de PNP par microgramme de protéine. L'essai compte 3 unités par type d'échantillons et 1 mesure par unité.

## **2. Résultats**

Les tests préliminaires effectués avec des MG63 nous ont permis de confirmer le potentiel biologique de nos échantillons (Figure 55, les flèches blanches indique la présence de cellules). Les cellules ont été marquées au MTT pour être observées à la loupe binoculaire. D'autres échantillons ont quant à eux été fixés et préparés pour des observations au MEB. Grâce au marquage MTT, on observe une multiplication cellulaire sur 4 jours. Les populations se densifient sur l'ensemble des échantillons. Les micrographies nous montrent des cellules aplaties, adhérentes avec des extensions cytoplasmiques. Ces dernières semblent s'être bien adaptées à leur environnement et à leur substrat. Dans la gamme d'échantillons testés, CO7 fait l'objet d'un départ lent : on observe au jour 1, que de nombreuses cellules sont encore sphériques et non adhérentes. Il semblerait qu'un temps d'adaptation soit nécessaire sur cet échantillon puisqu'au bout de 4 jours les cellules sphériques ne sont plus visibles et sont remplacées par des cellules adhérentes. Ces bons résultats nous ont permis de passer à l'étape suivante, c'est-à-dire la culture de CSMH.

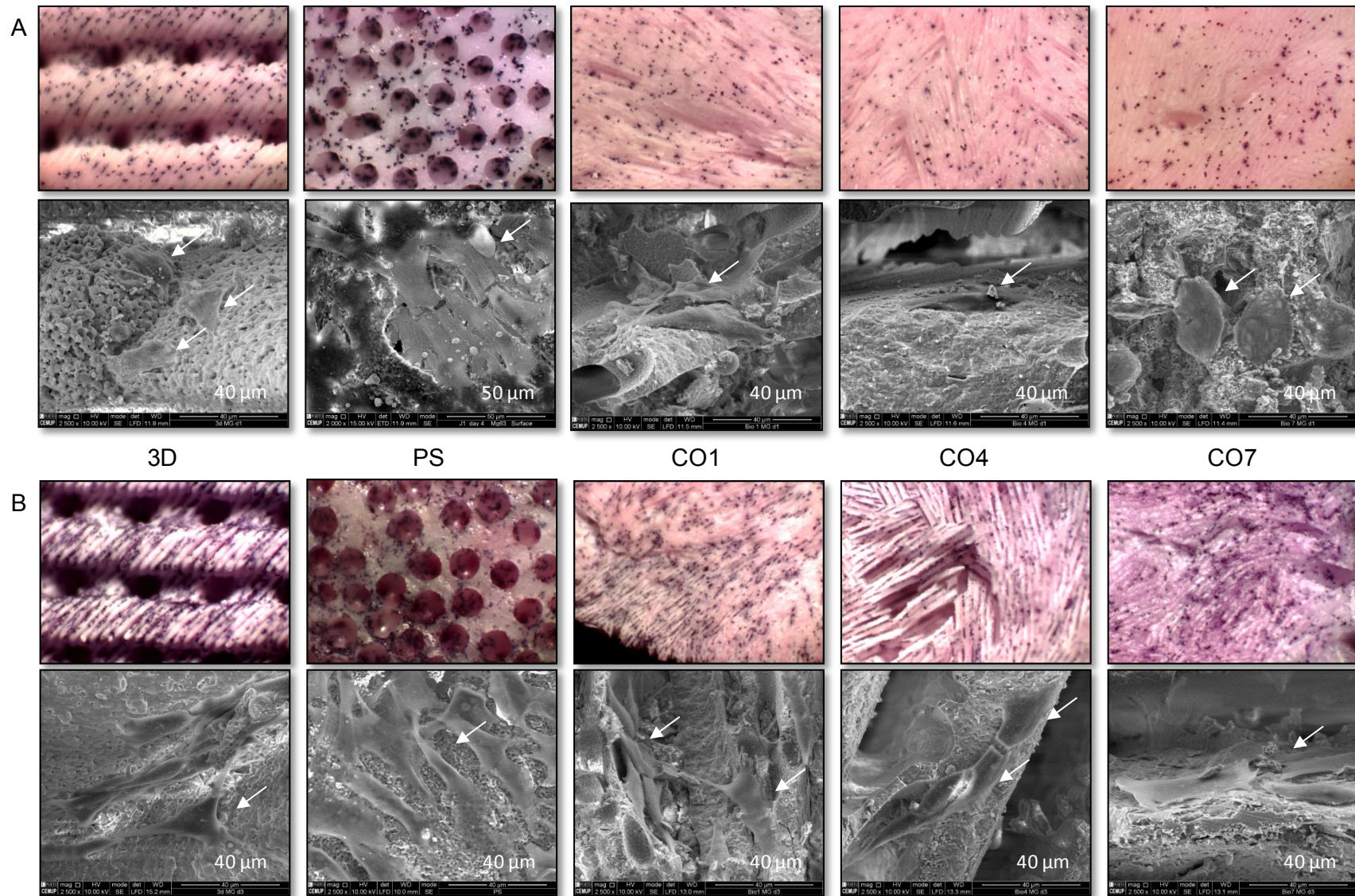
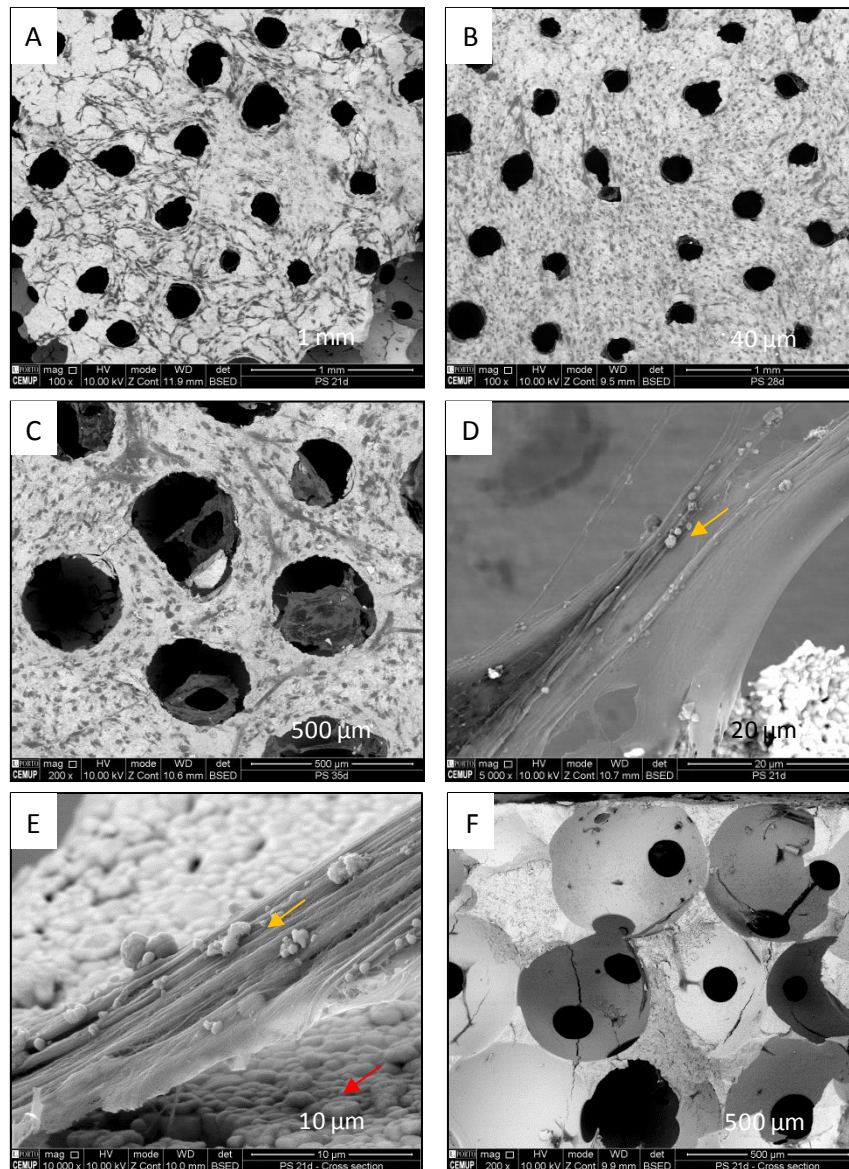


Figure 55. Photographies issues d'une loupe binoculaire (1ere ligne) et du MEB (2eme ligne). (A) correspond au jour 1 et (B) correspond au jour 3

## 2.1. Étude de la morphologie cellulaire

Les images MEB ont été faites aux jours 21, 28 et 35 (Annexe 5).

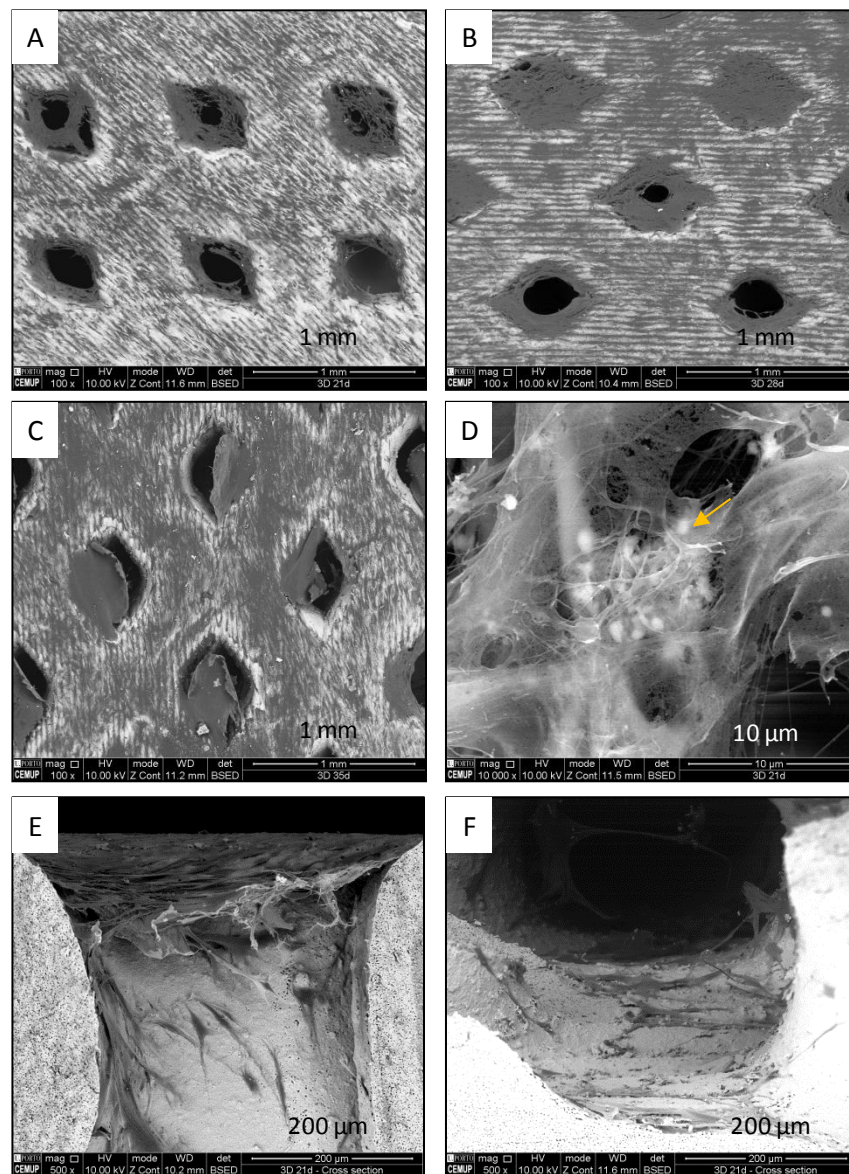
L'échantillon PS présente de nombreuses cellules à sa surface (Figure 56). Ces dernières sont adhérentes, aplaties avec des extensions cytoplasmiques et croissent entre le 21<sup>e</sup> et 35<sup>e</sup> jour. On note quand même un ralentissement après le 28<sup>e</sup> jour. Le tapis cellulaire est relativement dense avec de la MEC. Cet échantillon présente cependant une pénétration cellulaire faible avec une évolution quasi nulle entre les jours 21 et 35. En effet on retrouve les cellules au niveau des premières couches de pores. Seules des cellules isolées sont présentes au cœur de la structure. La matrice en surface et, dans une moindre mesure, celle à l'intérieur du réseau poreux sont en cours de minéralisation (présence de nodules de minéralisation dès le jour 21) (Figure 56.E et D, flèche orange). En plus des nodules, on note la présence de structures qui apparaissent progressivement au cours du temps : ces derniers semblent être issus d'un phénomène de dissolution/précipitation (Figure 56.E, flèche rouge).



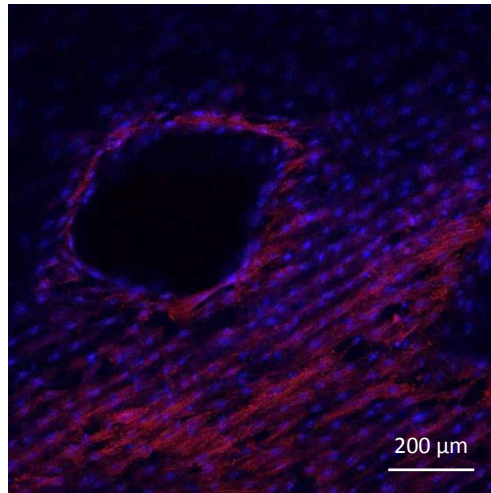
**Figure 56. Micrographies MEB de l'échantillon PS : (A) 21<sup>e</sup> jour surface ; (B) 28<sup>e</sup> jour surface ; (C) 35<sup>e</sup> jour surface, (D) 21<sup>e</sup> jour nodules de minéralisation, (E) 21<sup>e</sup> jour coupe transversale avec cellules, nodules de minéralisation (flèche orange) et précipitât (flèche rouge) et (F) 21<sup>e</sup> jour, pénétration cellulaire très limitée**

Les échantillons 3D semblent avoir une population cellulaire beaucoup plus dense que les autres échantillons (Figure 57). Les cellules observées sont adhérentes et présentent des extensions cytoplasmiques. Une majorité de ces dernières s'orientent en fonction des sillons parallèles que l'on trouve en surface. On note sur le cliché pris au microscope confocal des cellules immunomarquées préférentiellement dans les sillons de l'échantillon (Figure 58). Les noyaux sont marqués au DAPI ou 4',6-diamidino-2-phenylindole et apparaissent en bleu alors que les filaments d'actine, en rouge, sont marqués par la phalloïdine. On voit aussi sur ces clichés l'orientation des filaments d'actine selon les rainures. Il semblerait que le cytosquelette s'est adapté à la topographie de l'échantillon. Cette population se densifie au jour 28 et ce jusqu'au 35<sup>e</sup> jour. Il est important de noter que certaines porosités sont occultées par un tapis cellulaire continu. Ce dernier semble se développer de façon

préférentielle mais pas exclusive au niveau des angles aigus des porosités. La pénétration cellulaire est plus importante que l'échantillon PS, mais les cellules que l'on retrouve dans la structure sont relativement éloignées les unes des autres et ne forment pas de tapis cellulaire continu. On retrouve, en surface et au sein des porosités, une matrice extracellulaire en cours de minéralisation à partir du jour 21. Contrairement aux autres échantillons, on note l'absence de structure faisant penser à un précipitât.



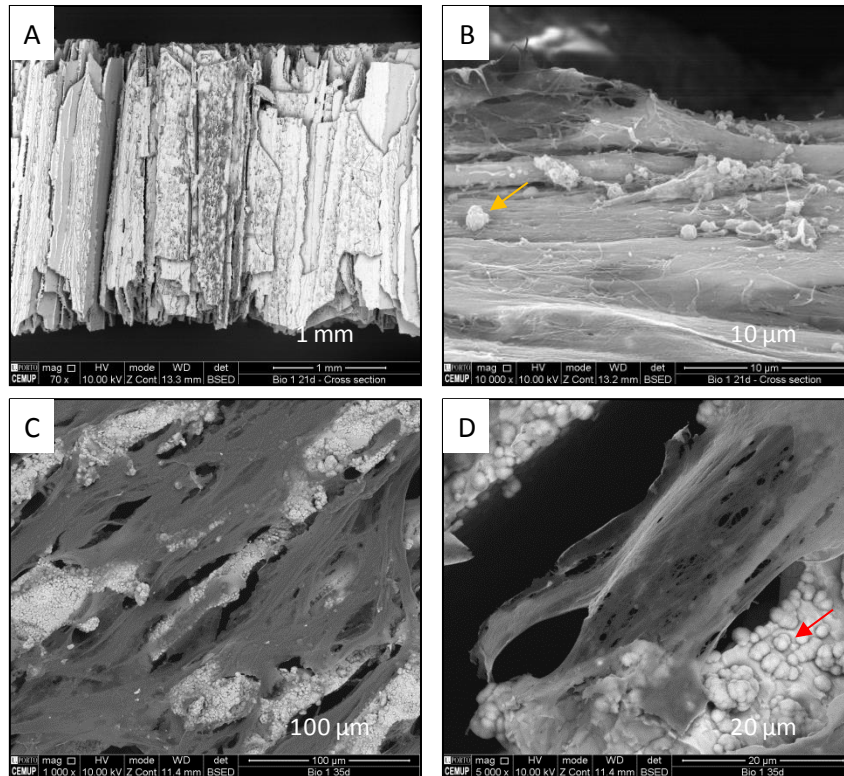
**Figure 57. Micrographies MEB de l'échantillon 3D : (A) 21<sup>e</sup> jour, surface avec de nombreuses cellules orientées ; (B) 28<sup>e</sup> jour, surface avec croissance du tapis cellulaire; (C) 35<sup>e</sup> jour, tapis cellulaire dense en surface (D) 21<sup>e</sup> jour nodules de minéralisation (flèche), (E) 21<sup>e</sup> jour, coupe transversale montrant un pore en forme d'entonnoir dont le haut est obstrué par une couche de cellule et de MEC et (F) 21<sup>e</sup> jour, présence de cellules dans le réseau poreux**



**Figure 58. Image prise au microscope confocal de CSMH immunomarquées sur un échantillon 3D au 14<sup>e</sup> jour**

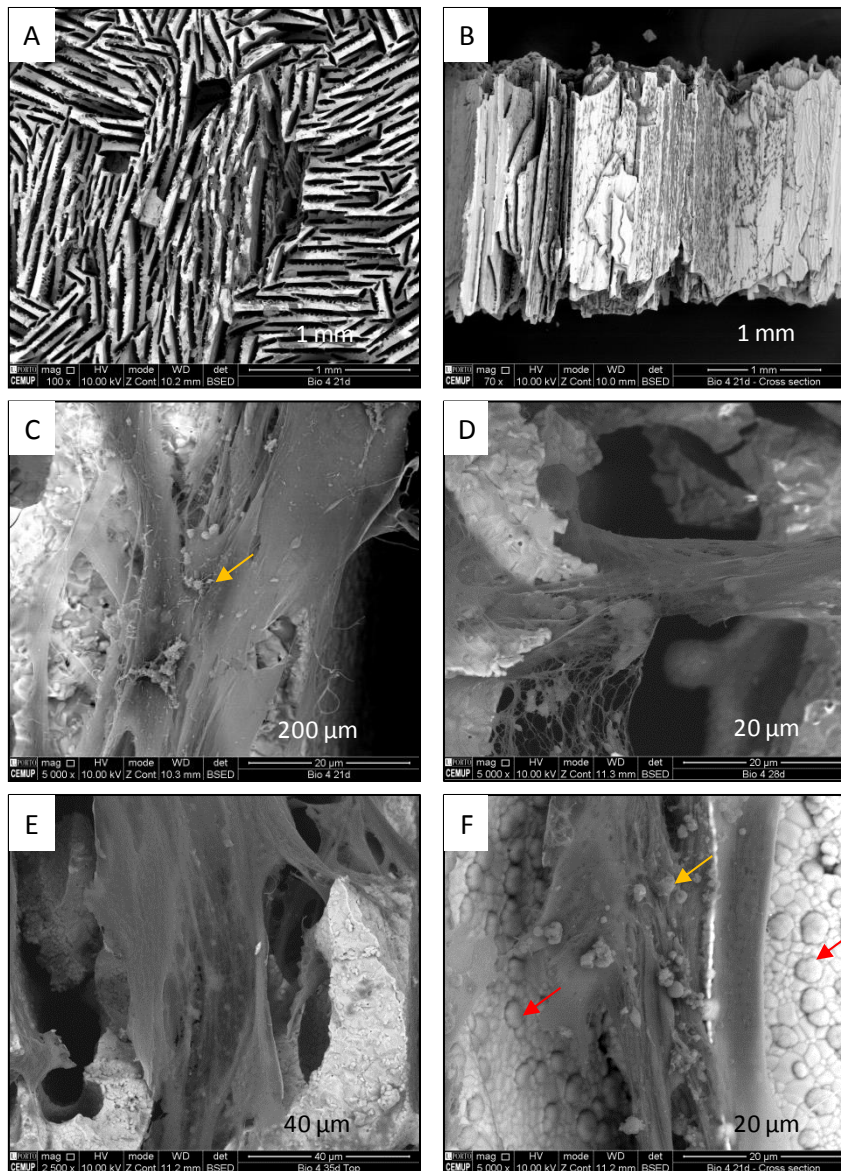
L'échantillon CO1 présente des cellules adhérentes et quelques débris. La population cellulaire se densifie entre les jours 21 et 28. Cette dernière n'évolue que très peu au jour 35, toutefois il semble que la couche cellulaire en surface soit plus dense. Ceci est probablement dû à une légère croissance cellulaire et une production de MEC au-delà du 28<sup>e</sup> jour. Les cellules observées sont adhérentes et présentent de nombreuses extensions cytoplasmiques. La pénétration cellulaire est très bonne et bien supérieure à celle des échantillons 3D et PS. On retrouve des cellules à l'intérieur des pores et sur toute la hauteur de l'échantillon. On y retrouve des populations cellulaires denses avec de la MEC en cours de minéralisation dès le 21<sup>e</sup> jour (Figure 59.B, flèche orange). À la surface du matériau, on note l'apparition de structures résultant du phénomène de dissolution/précipitation (Figure 59.D, flèche rouge).





**Figure 59. Micrographies MEB de l'échantillon CO1 : (A) 21<sup>e</sup> jour coupe transversale ; (B) 21<sup>e</sup> jour nodules de minéralisation (flèche orange) ; (C) 35<sup>e</sup> jour surface pores obstrués par un enchevêtrement de cellules et de MEC et (D) 35<sup>e</sup> jour présence de précipitât (flèche rouge)**

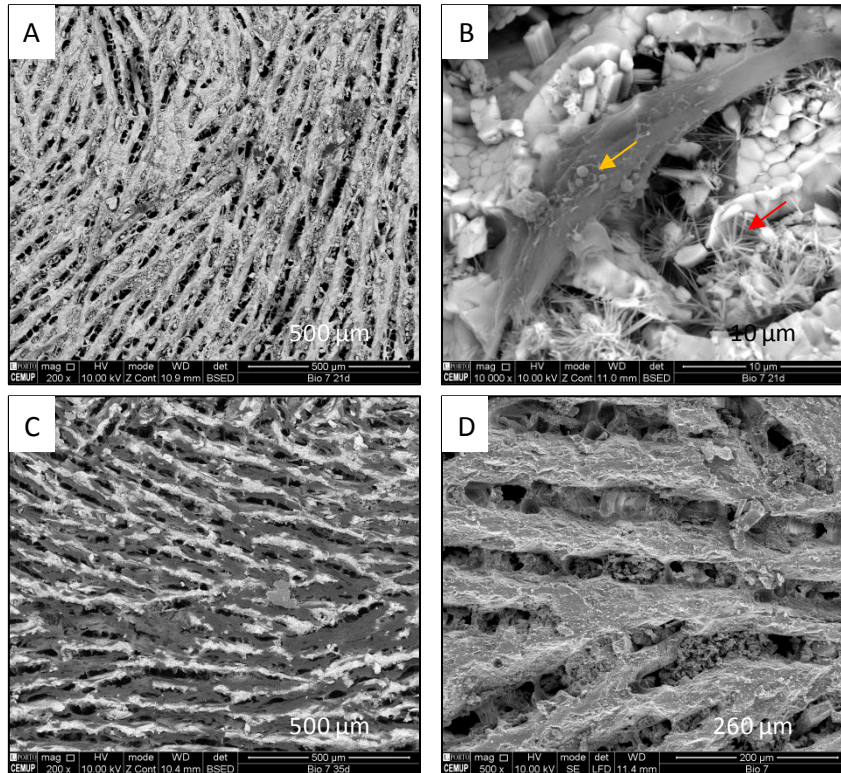
L'échantillon CO4 présente une bonne couverture cellulaire en surface. Ces dernières sont adhérentes et possèdent de nombreuses extensions cytoplasmiques. Contrairement à CO1, les débris sont moins nombreux. Entre les jours 21 et 28, la population cellulaire croît. Comme l'échantillon CO1, CO4 présente une couche cellulaire qui semble s'être densifiée légèrement au 35<sup>e</sup> jour. La pénétration cellulaire est excellente puisque l'on retrouve un tapis cellulaire (Figure 60) sur toute la hauteur des échantillons. On y retrouve aussi une matrice extracellulaire en cours de minéralisation par les cellules. Des nodules sont observés dès le 21<sup>e</sup> jour (Figure 60.C, flèche orange). On remarque aussi de nombreuses cellules pontant les parois de pore (Figure 60.D) et la présence croissante de structures résultant du phénomène de dissolution/précipitation (Figure 60.F, flèches rouges).



**Figure 60. Micrographies MEB de l'échantillon CO4 : (A) : 21<sup>e</sup> jour surface, (B) 21<sup>e</sup> jour coupe transversale montrant l'invasion cellulaire (C) 21<sup>e</sup> jour nodules de minéralisation (flèche orange), (D) 28<sup>e</sup> jour coupe transversale cellule pontant les parois du pore, (E) 28<sup>e</sup> jour surface avec cellules et MEC et (F) 21<sup>e</sup> jour, coupe transversale avec cellules, nodules de minéralisation (flèche orange) et précipitât (flèche rouge)**

Les performances de CO7 sont très réduites vis-à-vis des autres échantillons. Des cellules sont présentes à la surface mais en nombre plus faible que pour les autres échantillons. Ces dernières semblent être adhérentes et présentent des extensions cytoplasmiques. Il est important de noter que le nombre de cellules est très faible et cela est probablement dû au nombre élevé de débris observé (Figure 61.D). Malgré une étape de lavage après la découpe, les débris n'ont pu être éliminés de façon efficace. Les premières images MEB (21<sup>e</sup> jour) ne nous permettent pas d'affirmer s'il y a eu pénétration cellulaire ou pas. Et cette dernière ne semble pas évoluer au cours du temps. Par contre des nodules de minéralisation sont présents en surface. L'échantillon CO7 est le seul échantillon à présenter des structures en épine. Elles n'ont pas encore été identifiées mais sont certainement le résultat d'un

phénomène de dissolution/précipitation différents des autres types d'échantillon. L'une des causes probables serait l'abondance de débris sur et dans l'échantillon. Cet échantillon connaît une croissance cellulaire tardive. Au 35<sup>e</sup> jour, un tapis cellulaire recouvre une bonne partie de la surface de l'échantillon et même certains pores.



**Figure 61. Micrographies MEB de l'échantillon CO7 au: (A) 21<sup>e</sup> jour surface de l'échantillon avec débris et très peu de cellule visible, (B) 21<sup>e</sup> jour nodule de minéralisation (flèche orange), structures en épines (flèche rouge) et nombreux débris (C) 35<sup>e</sup> jour surface de l'échantillon et (D) échantillon (sans cellules) après découpage et rinçage, de nombreux débris sont présents et bloquent les pores**

Tous les échantillons ont à leur surface et à l'intérieur de leurs réseaux de pores, des cellules avec ce qui semble être de la matrice extracellulaire. On observe aussi sa minéralisation progressive: des nodules de minéralisation sont présents dès le 21<sup>e</sup> jour. Les populations cellulaires des échantillons 3D, PS, CO1 et 4 croissent régulièrement jusqu'au 28<sup>e</sup> jour environ et leurs activités semble ralentir par la suite. Les échantillons congelés, à l'exception de CO7, sont extrêmement favorables à la pénétration cellulaire, et ce dès le 21<sup>e</sup> jour. L'impact de l'architecture sur la façon dont les échantillons ont été colonisés est visible puisqu'on note des cellules qui s'alignent sur la surface texturée de 3D alors que certaines dans CO1 et 4 sont tendues entre les parois de pore et solidement accrochées aux rugosités. Le phénomène de dissolution/précipitation peut être observé sur tous les échantillons sauf 3D. Le précipitât prend plutôt une forme globulaire sur les échantillons PS et CO1 et 4. Il semblerait que dans le cas de CO7, l'abondance de débris et, conséquemment, la haute surface spécifique sont à l'origine d'un phénomène de

dissolution/précipitation différent de celui rencontré chez les autres échantillons ce qui explique ces structures épineuses.

Les observations faites au MEB montrent clairement un comportement cellulaire qui diffère en fonction des échantillons. On note aussi des modifications du matériau qui semblent aussi être liées à l'architecture macroporeuse.

## 2.2. Prolifération cellulaire

Les mesures d'activité métabolique ont été faites sur l'ensemble des échantillons sur une période de 35 jours (Figure 62). Contrairement au contrôle, les résultats issus des échantillons en  $\beta$ -TCP nous indiquent la présence d'une période de latence. Celle-ci varie de 7 (3D) à 14 jours environ (PS et CO1, 4 et 7). Passé cette période, on observe une croissance de l'activité mitochondriale qui culmine, pour l'ensemble des échantillons, le 28<sup>e</sup> jour. On estime à ce moment-là que la confluence est atteinte puisqu'au-delà, l'activité de l'ensemble des échantillons baisse. Ce schéma est valable pour le contrôle puisqu'au-delà de 21 jours, donc de la confluence, l'activité métabolique décroît.

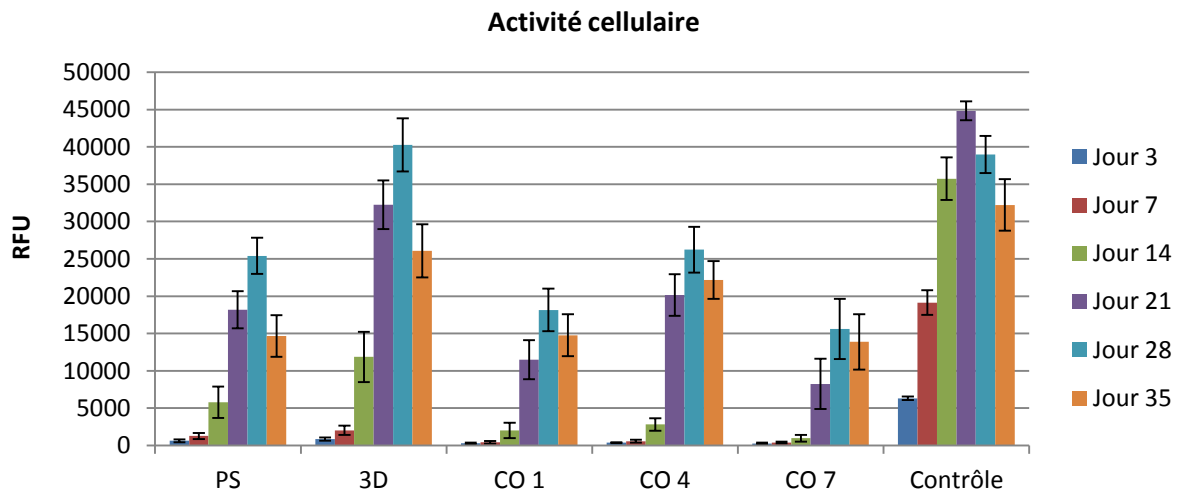


Figure 62. Activité cellulaire qui découle du test à la resazurine

3D est le siège de la population cellulaire présentant la plus forte activité métabolique au 28<sup>e</sup> jour. On peut donc dire qu'il est le support avec la plus grande population cellulaire. Il est suivi par PS et CO4 qui ont des activités équivalentes.

Globalement, les résultats montrent que les cellules se sont adaptées aux échantillons avec une croissance soutenue sur 28 jours. Au-delà, on note une diminution qui peut être attribuée aux conditions de cultures *in vitro* qui résultent dans l'obtention de population cellulaire de forte densité dans un environnement statique et dans un milieu de culture renouvelé que tous les 3 jours. Il est important de noter ici, que cette diminution de l'activité

métabolique n'est en aucun cas liée au matériau mais aux conditions de culture *in vitro*. Les résultats concordent avec les conclusions préliminaires issues des tests préliminaires avec les MG63 et de l'observation des micrographies avec les CSMH.

### 2.3. Activité protéique

Le contenu protéique total (Figure 63) a été déterminé par la méthode de Lowry (LOW51). Les mesures d'activité protéique ont été faites au 14<sup>e</sup>, 21<sup>e</sup>, et 28<sup>e</sup> jour de culture. On observe ici une évolution positive de la concentration protéique pour l'ensemble des échantillons et pour le puits contrôle. Le contenu protéique de l'échantillon 3D est le plus élevé au 28<sup>e</sup> jour et est suivi de près par les échantillons PS et CO4. Le contenu protéique total va dépendre de la taille de la population cellulaire et surtout de leur phénotype.

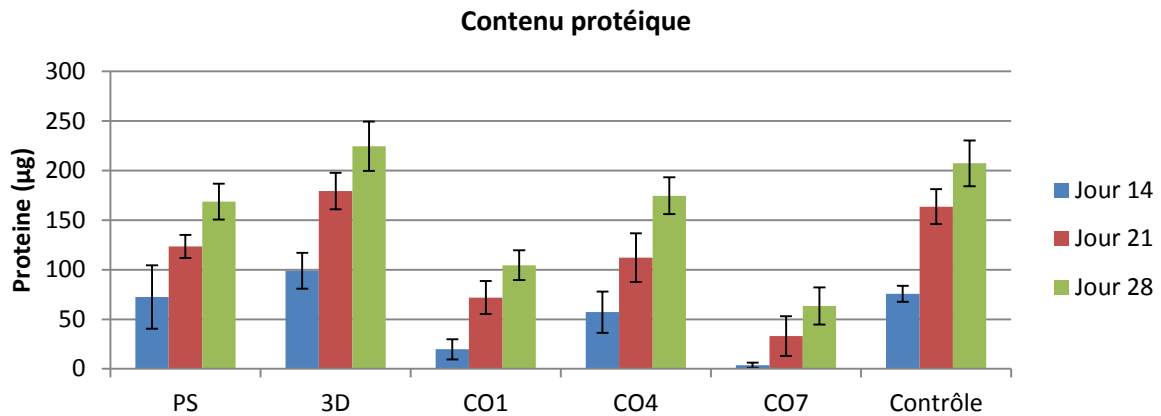


Figure 63. Contenu protéique mesuré par la méthode de Lowry

On remarque que l'augmentation du contenu protéique se fait parallèlement à l'augmentation de l'activité cellulaire (Figure 62) sur la même période. Afin de vérifier cette hypothèse un test de corrélation entre activité cellulaire et contenu protéique est effectué. La Figure 64 nous montre les droites de régression linéaire nous permettent d'évaluer la corrélation entre le contenu protéique et l'activité cellulaire. Ces 2 paramètres sont fortement corrélés sauf dans le cas du contrôle et de CO4 qui semblent avoir atteint la confluence avant les autres dans le cadre de ce test. Les coefficients de corrélation correspondant aux échantillons en céramique sont supérieurs à 0,999 à l'exception de CO4 qui est de 0,952 et du contrôle qui est quant à lui de 0,523. Il existe donc un lien entre le contenu protéique et l'activité cellulaire mitochondriale lorsque les cellules sont en phase de croissance.

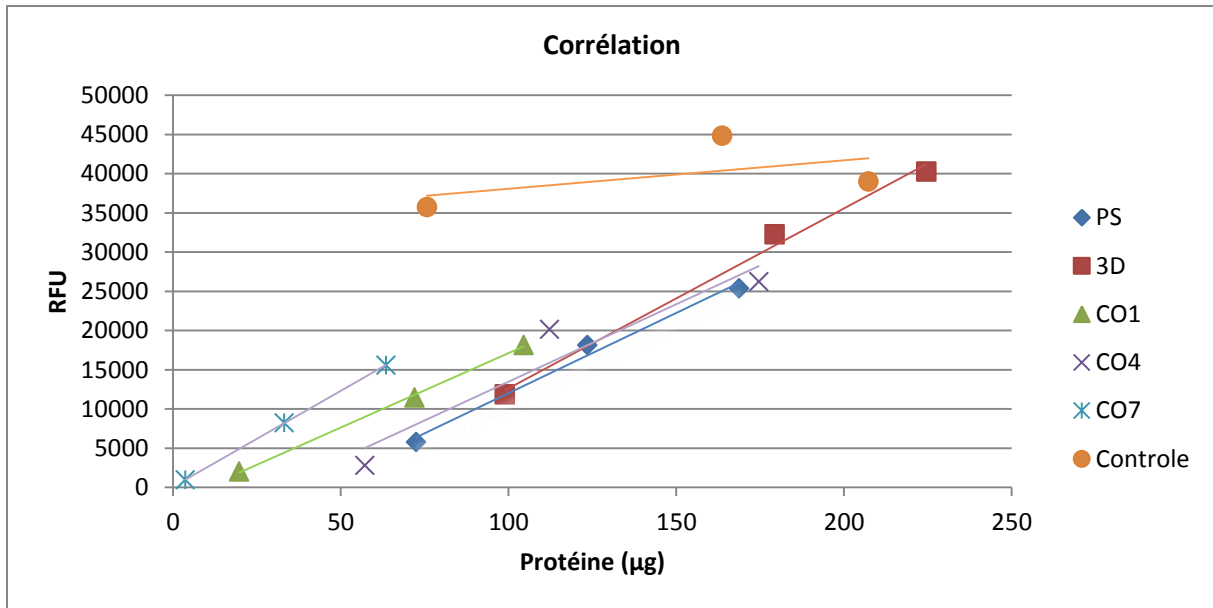


Figure 64. Étude de la corrélation entre l'activité cellulaire et la quantité totale de protéine grâce aux droites de régression linéaire (14<sup>e</sup>, 21<sup>e</sup> et 28<sup>e</sup> jour)

Le contenu protéique va nous permettre de calculer l'activité phosphatase alcaline. Pour les échantillons PS et 3D et le puits contrôle, l'activité ne varie que très peu sur les 14 jours de culture (Figure 65). Cependant, il semble que les valeurs des échantillons testés soient légèrement supérieures à celles du contrôle. Pour les échantillons congelés, l'activité au jour 14 est faible mais connaît une croissance forte au jour 21 qui semble se stabiliser au jour 28. L'activité protéique des échantillons CO1, 4 et 7, au jour 28 sont significativement plus élevée que le contrôle et les 2 autres échantillons.

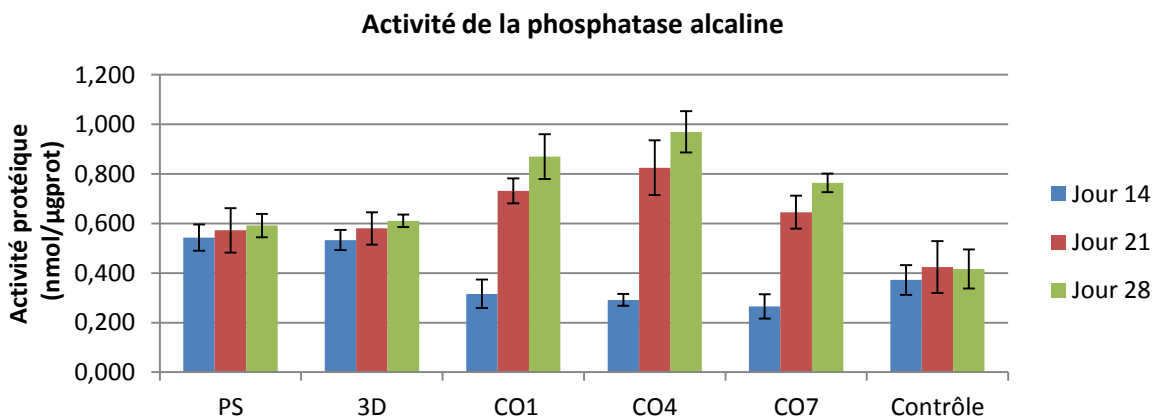


Figure 65. Activité de la phosphatase alcaline

Les plus grandes populations cellulaires sont présentes sur les échantillons 3D et PS. Or ces dernières expriment une activité phosphatase alcaline plus faible que les échantillons issus de la congélation orientée. Le même constat peut être fait avec le contrôle. Il semblerait donc que l'activité phosphatase alcaline ne soit pas liée à la taille de la population. Par contre on

### Chapitre 3: Culture cellulaire et évaluations biologiques

pourrait attribuer cet écart d'activité à une différence dans l'état d'avancement de la différenciation cellulaire.

## Discussion et perspectives

Les résultats obtenus semblent montrer une influence du matériau et de la structure sur les cellules. En effet, les réactions cellulaires diffèrent en fonction de l'architecture. Elle est caractérisée par la géométrie, les dimensions et la topographie du réseau poreux. Les principales caractéristiques poreuses et topographiques des échantillons sont rappelées dans le Tableau 26.

Échantillons	Taille de pores et d'interconnexions ( $\mu\text{m}$ )		Porosité (%)	Surface spécifique ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Ra (nm)
	Petit diamètre	Grand diamètre			
PS	435 $\pm$ 58 – 121 $\pm$ 22		65 $\pm$ 1	0,58 $\pm$ 0,08	20
3D	202 $\pm$ 23	350 $\pm$ 23	50 $\pm$ 1	0,44 $\pm$ 0,04	51
CO1	41 $\pm$ 12	209 $\pm$ 80	51 $\pm$ 1	0,64 $\pm$ 0,09	-
CO4	54 $\pm$ 16	366 $\pm$ 200	51 $\pm$ 1	0,63 $\pm$ 0,06	34
CO7	44 $\pm$ 11	149 $\pm$ 60	36 $\pm$ 1	-	-

Tableau 26. Récapitulatifs de certaines caractéristiques poreuses et topographiques des échantillons

Avant l'adhésion cellulaire, le matériau subit des changements physico chimiques au contact du milieu de culture. On note l'augmentation du caractère hydrophile du matériau lorsque celui-ci est en contact avec du milieu de culture supplémentée. En effet, l'énergie de surface augmente avec le temps, ce qui témoigne d'un changement de l'interface matériau / milieu. Cette dernière est très probablement due à l'adsorption protéique. Deuxièmement on note l'apparition, avec le temps, de structures globulaires d'origine minérale sur les échantillons 3D, PS, CO1 et 4 et des structures en épine sur CO7. C'est le résultat des interactions entre matériau et milieu de culture. Cette phase minérale apparaît grâce à un phénomène de dissolution/précipitation et est visible au 21<sup>e</sup> jour. Il serait intéressant, dans le futur, d'identifier ces phases, par spectroscopie Raman par exemple, afin d'apprécier l'impact de l'architecture sur le phénomène de dissolution/précipitation

Concernant la réponse cellulaire vis-à-vis du matériau, une période de latence est observée pour l'ensemble des échantillons. Selon Carvalho *et al.* (CAR16) ce comportement est tout à fait typique des CSMH. Après cette période de latence, les cellules s'adaptent à leur nouvel environnement. Les cellules observées sont adhérentes avec de nombreuses extensions cytoplasmiques et sont actives puisqu'on note la production de MEC et sa minéralisation. Les travaux de McBeath et son équipe (MCB04) montrent que la forme de la cellule est importante et qu'elle permet de prévoir, dans une certaine mesure l'évolution de la cellule. Ainsi, les probabilités qu'une cellule adhérente et étalée sur une surface s'engage dans l'ostéogénèse sont plus élevées que des cellules non adhérentes qui ont plus de chance de devenir des adipocytes.



Malgré des caractéristiques morphologiques communes des différences sont notables. Dans le cas de 3D, la prolifération surfacique a été influencée par la présence de sillons. L'orientation des cellules et leur présence massive dans les sillons montrent clairement leur affinité pour ce type de topographie. Cet échantillon est à l'origine de la meilleure activité cellulaire et du contenu protéique le plus élevé parmi les échantillons au jour 28. Il semble que la topographie surfacique ait été l'un des principaux moteurs de cette prolifération cellulaire. En effet, 3D présente la plus faible surface spécifique et une prolifération essentiellement surfacique. Les cellules sont alignées avec réorganisation du cytosquelette. Il est donc fort possible que les mécanismes de régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire soient différents des autres. Le même constat peut être effectué chez d'autres échantillons tels que CO1 et CO4 où l'on retrouve de nombreuses cellules dans la structure poreuse, pontant des parois entre elles. Dans le cas de CO4 les dimensions poreuses (Tableau 26) ont sans doute facilité la migration cellulaire ainsi que la prolifération dans les pores. Dans le cas de CO7, la formulation n'a pas permis de découpe propre. En effet des débris fins ont été générés et sont probablement dus au haut taux de matière sèche. Ces derniers n'ont pu être éliminés efficacement par les rinçages prévus à cet effet, conséquemment ils persistent et obturent des pores qui sont déjà de faible diamètre (Tableau 26). Il est aussi important de noter que l'étude préliminaire a mis en évidence un retard d'adhésion chez cet échantillon. Les débris semblent être à l'origine des résultats médiocres engendrés par cet échantillon.

La pénétration cellulaire est tributaire des dimensions de pores, de leur forme et de la topographie que l'on trouve à l'intérieur de ces derniers. Les observations au MEB montrent clairement que la pénétration cellulaire est optimale dans les échantillons congelés avec les meilleurs résultats pour l'échantillon CO4. La forme ellipsoïdale des pores semble jouer un rôle positif. Les dimensions de pore et la rugosité des parois semblent avoir influencé la réponse cellulaire. Cet échantillon offre une large gamme de dimensions poreuses. De plus, la topographie que l'on trouve à l'intérieur de ces pores est intéressante : les parois comportent de nombreuses protubérances ou replis. Ces derniers influencent la surface spécifique et donc l'adsorption protéique. Ces 2 échantillons sont ceux avec les surfaces spécifiques les plus élevées. On peut donc supposer que dans le cas de CO1 et 4, ces structures ont joué un rôle positif dans le comportement cellulaire puisque de nombreuses cellules sont présentes dans les pores et semblent être accrochées aux rugosités des parois. Cette rugosité intermédiaire ( $R_a = 34 \text{ nm}$ ) et la forme des pores semblent avoir favorisé la pénétration cellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse il faudrait, générer un échantillon présentant la même forme de pore tubulaire avec des parois à la topographie plane et lisse.

Concernant les résultats quantitatifs, l'activité cellulaire est fortement corrélée à la quantité de protéine mesurée pour les échantillons 3D, PS, CO1 et CO7. Une augmentation du contenu protéique est due à une croissance de la population et/ou à un changement physiologique lié au stade de la différenciation. Cette dernière peut, en effet, se traduire par une augmentation de l'activité de synthèse protéique. On peut supposer que ce sont ces 2 facteurs qui ont contribué à l'augmentation du contenu protéique. Il est aussi important de noter que dans le cas du contrôle et de CO4, la confluence serait atteinte entre le 21<sup>e</sup> et le 28<sup>e</sup> jour alors que pour les autres échantillons elle serait plutôt atteinte après le 28<sup>e</sup> jour. Les cellules dans le puits de référence et le puits de CO4 ne sont donc pas en phase de croissance exponentielle contrairement aux autres. L'inhibition de contact et les conditions de culture de plus en plus délétères expliquent l'absence de corrélation entre contenu protéique et activité cellulaire dans les puits contrôles et CO4. Toutefois une baisse de l'activité cellulaire peut aussi être due à une diminution de la capacité de prolifération liée à l'avancement de la différenciation.

L'activité de la phosphatase alcaline observée sur nos échantillons varie en intensité. Elle est stable chez les échantillons PS, 3D et contrôle alors qu'elle croît sur les échantillons issus de la congélation orientée. Une des hypothèses qui expliquerait cette différence est l'état d'avancement de la différenciation cellulaire. Il est aujourd'hui admis que l'activité de la phosphatase alcaline varie en fonction de l'état de la différenciation cellulaire : elle croît progressivement au fur à mesure de la différenciation, culmine lorsque la cellule a atteint le stade d'ostéoblaste mature et décroît lorsque le stade d'ostéocyte est atteint. Il est donc possible que les cellules présentes dans les échantillons CO aient atteint un stade de différenciation plus avancé que les cellules présentes sur les autres échantillons et dans le puits contrôle ou, au contraire, qu'elles soient en retard par rapport aux autres cellules qui commencent déjà à se transformer en ostéocytes. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence : l'environnement cellulaire, les interactions matériau/cellule, topographie/cellule et cellule/cellule. Le comportement d'un matériau dans un milieu quelconque va dépendre de ces propriétés physico chimiques mais surtout de sa morphologie. En effet cette dernière va favoriser ou limiter les interactions avec le milieu. Une morphologie adaptée favorisera la circulation de fluide au sein de l'échantillon augmentant ainsi les chances d'une colonisation réussie. La structure macroporeuse permettra de sublimer ou pas les bonnes propriétés du matériau de départ. Il est donc important de connaître les caractéristiques structurelles qui ont le potentiel d'influencer positivement le comportement cellulaire.

Afin de confirmer notre hypothèse, il faudrait approfondir l'étude. Ainsi il est prévu d'étudier l'expression de certains gènes clés (collagène de type I, runX2, ALP et ostéopontine) afin de déterminer si oui ou non, les cellules cultivées sur les échantillons issus de la congélation

orientée sont à un stade de différenciation plus avancé que les autres. Ainsi une RT-PCR semi quantitative pourrait nous permettre d'étudier l'expression génique. Une quantification globale de la quantité d'ADN serait un bon indicateur de la taille des populations cellulaires. Une étude immunohistochimique plus poussée pourrait nous donner des informations sur l'impact des différentes structures sur l'organisation cytosquelettique.

Il serait aussi intéressant de fabriquer des structures analogues à celle obtenue par congélation orientée, par stéréolithographie. Cette méthode nous permettra de nous affranchir de certains des inconvénients de la congélation orientée mais aussi d'avoir un meilleur contrôle sur la structure générée. Nous pouvons ainsi fabriquer une structure soutenant un réseau de tubes ellipsoïdaux interconnectés avec des parois lisses. Cela nous permettra, en comparant avec des échantillons issus de la congélation orientée, d'étudier le rôle et l'impact réel de la topographie des parois sur les CSMH.

## Conclusions

L'objectif de cette étude a été d'étudier les éventuels liens entre une architecture macroporeuse en  $\beta$ -TCP et le comportement cellulaire. Pour cela, de la poudre de  $\beta$ -TCP a été fabriquée par précipitation aqueuse. Les paramètres de synthèse ont été suivis de près ce qui a permis l'obtention d'un produit de haute qualité répondant aux requis de normes encadrant l'utilisation de céramique comme biomatériaux. En plus des essais préconisés par les normes, d'autres tests tels que ceux qui encadrent le comportement thermique du matériau, ont été effectués afin de mieux le caractériser. Les tests effectués sont récapitulés ci-dessous:

- la détermination de la composition de la poudre par DRX, FT-IR et ICP ;
- l'étude de son comportement thermique par ATG/ATD, dilatométrie, son aptitude à la densification et la détermination du cycle de frittage optimal ;
- la mesure de la densité par pycnométrie à hélium ;
- l'étude de la granulométrie par granulomètre laser ;
- la caractérisation de la microstructure via le MEB ;
- son comportement dans du Tris et son énergie de surface.

Ces informations nous ont permis de caractériser notre matériau et d'aborder l'étape suivante: sa mise en forme. Le choix de la méthode de mise en forme est important. Les techniques ont été choisies en fonction de leur aptitude à générer des architectures macroporeuses intéressantes sans pour autant altérer les propriétés biologiques du  $\beta$ -TCP. Les méthodes choisies sont les suivantes: l'imprégnation d'une préforme polymérique par une suspension aqueuse (PS), la stéréolithographie (3D) et la congélation orientée (CO). Les suspensions ont été optimisées en fonction de chaque technique. Les traitements thermiques qui suivent la mise en forme ont permis la pyrolyse des divers adjuvants et la densification des échantillons. Ces derniers ont par la suite été stérilisés afin de servir de support de culture cellulaire.

Deux types de cellules ont été choisis. Les MG63 sont des cellules humaines issues d'une lignée tumorale. Elles nous ont permis de voir si les échantillons étaient aptes à accueillir des cellules. Les résultats préliminaires nous ont montré que les méthodes de mise en forme n'ont en aucun cas altéré la biocompatibilité et le potentiel biologique de notre matériau. Lors de la deuxième phase de cette étude, les cellules utilisées étaient des CSMH. Ces dernières, issues d'une biopsie, sont pluripotentes mais une étape de sélection a permis de s'assurer que celles utilisées ont été bien engagées dans la voie de différenciation ostéoblastique. Afin

d'apprécier l'influence de l'architecture poreuse sur les cellules, leur morphologie, leur activité métabolique (résazurine) et l'activité de la phosphatase alcaline sont étudiées.

Globalement les cellules s'adaptent au matériau mais appréhendent différemment l'architecture. On peut donc faire l'hypothèse suivante: à chaque architecture est associée une signature génétique différente. Dans le cas de 3D, les cellules prolifèrent abondamment sur la surface texturée mais la pénétration cellulaire est médiocre. Le même constat peut être fait pour l'échantillon PS. Dans le cas des échantillons congelés, on retrouve des cellules en surface mais aussi à l'intérieur de l'architecture. Les cellules pénètrent à l'intérieur des structures et forment de véritables tapis cellulaires sur toute la hauteur des pores. L'étude de l'activité cellulaire nous a permis de voir que 3D était le siège de la plus grande population cellulaire. Ce résultat concorde avec les observations faites au MEB et au microscope confocal. Il est suivi de PS et de CO4. L'activité phosphatase alcaline mesurée montre que le  $\beta$ -TCP permet de l'accentuer et les meilleures activités enzymatiques proviennent des échantillons CO. La phosphatase alcaline est une enzyme qui permet d'hydrolyser des esters de mono phosphate en milieu basique permettant la minéralisation de la MEC secrétée. Cette activité varie en fonction de l'état d'avancement de la différenciation cellulaire. En effet, elle croît jusqu'au stade d'ostéoblaste mature et chute au-delà de ce stade. Nous pouvons donc supposer que cette forte activité est due à un degré de différenciation cellulaire plus avancé dans les échantillons issus de la congélation orientée notamment CO4. 3D est donc un très bon support de culture cellulaire mais ne favorise pas la pénétration cellulaire et l'activité phosphates alcaline alors que CO1 et CO4 favorisent la colonisation des pores et l'activité de la phosphatase alcaline.

Ces disparités peuvent s'expliquer par des différences au niveau des interactions cellule/matériau, cellule/cellule et matériau/environnement. La congélation orientée permettrait de générer un réseau poreux capable d'influencer la différenciation des CSMH. Afin de vérifier cette hypothèse des études portant sur l'expression génique de certains marqueurs tels que le collagène de type I ou l'ostéopontine et la structure cytosquelettique sont en cours.

## **Bibliographie**

**ALB01.** T. Albrektsson, C. Johansson, "Ostoinduction, osteoconduction and osseointegration", *Eur Spine J*, 10, (2001): 96-101.

**ALB11.** *Biologie moléculaire de la cellule*, Cinquième édition, ISBN: 978-2-257-00096-5, 2011.

**ALF15.** A. I. Alford, K. M. Kozloff, K. D. Hankenson, "Extracellular Matrix Networks in Bone Remodeling" *Int J Biochem Cell Biol* 65, (2015) : 20–31.

**AUB01.** J.E. Aubin. "Regulation of osteoblast formation and function" *Rev Endocr Metab Dis* 2(1), (2001): 81-94.

**BAR12.** R. Barré, "Etude du rôle des récepteurs couplés aux protéines G lors de la différenciation cellulaire des ostéoblastes: intérêt de la voie Gi", Thèse de l'Université de Toulouse, 2012.

**BAY12.** L. Bayliss, D. J. Mahoney, P. Monk, "Normal Bone Physiology, Remodelling and Its Hormonal Regulation" *Surgery (Oxford)* 30, (2012): 47–53.

**BEN06.** F. Ben Ayed, K. Chaari, J.I Bouaziz, K. Bouzouita, "Frittage Du Phosphate Tricalcique" *C R Phys* 7(7), (2006): 825–35.

**BER05.** *Technique de l'ingénieur - AF6620 - Frittage: aspects physico chimiques. Partie 1: frittage en phase solide.* (2005).

**BER15.** A. D. Berendsen, B. R. Olsen, "Bone development" *Bone* 80, Supplement C , (2015): 14-18.

**BER15a.** *Techniques de l'ingénieur - AF6610: Les apatites: des phosphates naturels.* (2015).

**BID12.** C. M. Bidan, K. P. Kommareddy, M. Rumpler, P. Kollmannsberger, Y. J. M. Bréchet, P. Fratzl, J. W. C. Dunlop, "How linear tension converts to curvature: geometric control of bone tissue growth" *PloS One*, 7, (2012): e36336.

**BID13.** C. M. Bidan, K. P. Kommareddy, M. Rumpler, P. Kollmannsberger, P. Fratzl, J. W. C. Dunlop, "Geometry as a factor for tissue growth: towards shape optimization of tissue engineering scaffolds" *Adv Healthc Mater* 2, (2013):186–94.

- BIG03.** A. Bignon, J. Chouteau, J. Chevalier, G. Fantozzi, J.P. Carret, P. Chavassieux, G. Boivin, M. Melin, D. Hartmann, "Effect of micro- macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response" *J Mater Sci Mater Med.* 14, (2003):1089-97.
- BIL02.** J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, G. A. Rodan, "Principles of bone biology", Second Edition, San Diego: Academic press; (2002).
- BIR12.** E. Birmingham, G. L. Niebur, P. E. McHugh, G. Shaw, F. P. Barry, L. M. McNamara, "Osteogenic differentiation of MSC is regulated by osteocyte and osteoclast cells in simplified bone niche" *Eur Cell mater* 23, (2012):13-27.
- BLA02.** H. C. Blair, M. Zaidi, P. H. Schlesinger, "Mechanisms Balancing Skeletal Matrix Synthesis and Degradation" *Biochem J* 364(2), (2002): 329–41.
- BOH09.** M. Böhner, J. Lemaître, "Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?" *Biomaterials* 30(12), (2009): 2175-79.
- BOY98.** B. D. Boyan, R. Batzer, K. Kieswetter, Y. Liu, D. L. Cochran, S. Szmuckler-Moncler, D. D. Dean, Z. Schwartz, "Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ " *J Biomed Mater Res* 39(1), (1998) : 77–85.
- CAR03.** R. A. D. Carano, E. H. Filvaroff, "Angiogenesis and bone repair", *DDT Vol.* 8, 21, (2003): 980-989.
- CAR16.** A. Carvalho, A. Pelaez-Vargas, D. J. Hansford, M. H. Fernandes, F. J. Monteiro, "Effects of line and pillar array microengineered SiO<sub>2</sub> thin films on the osteogenic differentiation of human bone marrow derived MSC", *Langmuir* 32 (4), (2016): 1091-1100.
- CEL98.** S. Celic, Y. Katayama, P. J. Chilco, T. J. Martin, D. M. Findlay, "Type I Collagen Influence on Gene Expression in UMR106-06 Osteoblast-like Cells Is Inhibited by Genistein", *J Endocrinol* 158, (1998): 377-388.
- CHA00.** B.S. Chang, K.S. Hong, H.J. Youn, H.S. Ryu, S.S. Chung, K.W. Park, "Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations" *Biomaterials* 21(12), (2000): 1291–98.
- CHA07.** T. Chartier, C. Duterte, P. Abelard, Y. Abouliatim, C. Delage, C. Chaput, "Net-shape forming of complex ceramic parts with a high dimensional resolution stereo- and microstereolithography" *Proceedings of 10th ECeRS Int. Conference, Berlin, 2007.*

- CHA15.** T. Chartier, C. Dupas, M. Lasgorceix, J. Bris, E. Champion, N. Delhote, C. Chaput, "Additive manufacturing to produce complex 3D ceramic parts", *J Ceram Sci Tech* 06, (2015): 95-104.
- CHA99.** Technique de l'ingénieur - P1050 - Caractérisation de la texture poreuse du matériaux. (1999).
- CHE13.** L. Cheng, S. Yujuni, Y. Feng, B. Hong. "Osteoinduction of Calcium Phosphate Biomaterials in Small Animals" *Mater Sci Eng C* 33(3), (2013): 1254–60.
- CHE16.** L. Cheng, T. Wang, J. Zhu, P. Cai, "Osteoinduction of Calcium Phosphate Ceramics in Four Kinds of Animals for 1 Year: Dog, Rabbit, Rat, and Mouse" *Transplant Proc* 48(4), (2016): 1309–14.
- CHO07.** D. Choi, P. N. Kumta, "Mechano-Chemical Synthesis and Characterization of Nanostructured  $\beta$ -TCP Powder" *Mater Sci Eng C* 27(3), (2007): 377–81.
- CHO09.** J. W. Choi, R. Wicker, S. H. Lee, K. H. Choi, C. S. Ha, I. Chung, "Fabrication of 3D Biocompatible/biodegradable Micro-Scaffolds Using Dynamic Mask Projection Microstereolithography" *J Mater Proc Tech* 209(15-16), (2009): 5494–5503.
- CHU02.** T. M. G. Chu, D. G. Orton, S. J. Hollister, S. E. Feinberg, J. W. Halloran, "Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures" *Biomaterials*, 23(5), (2002):1283–1293.
- COM13.** C. Combes, C. Rey, Technique de l'ingénieur - N4950 - Biomatériaux à base de phosphate de calcium. (2013).
- CUK01.** E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens, K. M. Yamada, "Taking cell-matrix adhesions to the third dimension" *Science* 294, (2001): 1708-1712.
- CUR97.** A. Curtis, C. Wilkinson, "Topographical control of cells", *Biomaterials* 18, (1997): 1573-83.
- DEG80.** K. De Groot, "Bioceramics consisting of calcium phosphates salts", *Biomaterials Vol* 1, 47, (1980): 47-50.
- DES03.** A. Destainville, E. Champion, D. Bernache-Assollant, E. Laborde. "Synthesis, Characterization and Thermal Behavior of Apatitic Tricalcium Phosphate." *Materials Chemistry and Physics* 80(1), (2003): 269–77.



- DES07.** M. Descamps, J. C. Hornez, and A. Leriche. "Effects of powder stoichiometry on the sintering of  $\beta$  tricalcium phosphate." *Journal of the European Ceramic Society* 27, no. 6 (2007): 2401–06.
- DES08.** M. Descamps, T. Duhoo, F. Monchau, J. Lu, P. Hardouin, J. C. Hornez, A. Leriche, "Manufacture of Macroporous  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Bioceramics." *J Eur Ceram Soc* 28, no. 1 (2008): 149–57.
- DES15.** M. Deschepper, J. Paquet, A. Moya, M. Manassero, M. Bensidhoun, H. Petite, *Techniques de l'ingénieur - MED7200: Des biomatériaux à l'ingénierie tissulaire: perspectives en réparation osseuse.* (2015).
- DEV06.** S. Deville, E. Saiz, A.P. Tomsia, "Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering." *Biomaterials* 27(32), (2006): 5480–89.
- DEV08.** S. Deville, "Freeze casting of porous ceramics: a review of current achievement and issues", *Adv Eng Mater* 10(3), (2008): 155-169.
- DEV09a.** S. Deville, E. Maire, A. Lasalle, A. Bogner, C. Gauthier, J. Leloup, C. Guizard, "In Situ X-Ray radiography and tomography observations of the solidification of aqueous alumina particle suspensions (I): initial Instants *Cer Soc* 92(11), (2009): 2489–96.
- DEV09b.** S. Deville, E. Maire, A. Lasalle, A. Bogner, C. Gauthier, J. Leloup, C. Guizard, "In situ X-Ray radiography & tomography observations of the solidification of aqueous alumina particle suspensions (II): steady state" *J Am Cer Soc* 92 (11), (2009): 2497-03.
- DUC99.** P. Ducheyne, Q. Qiu, "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function" *Biomaterials* 23 (20), (1999):2287-303.
- EAS17.** R. Eastell, "Prevention and management of osteoporosis" *Medicine* 45 (9), (2017): 565-569.
- FAI15.** A. B. Faia-Torres, M. Charnley, T. Goren, S. Guimond-Lischer, M. Rottmar, K. Maniura-Weber, N.D. Spencer, R.L. Reis, M. Textor, N.M. Neves, "Osteogenic differentiation of HMSC in the absence of osteogenic supplements" *Acta Biomater* 28 (C), (2015): 64-75.
- FEL09.** H. B. Fella, P. Layrolle, "Sol–gel synthesis & characterization of macroporous calcium phosphate bioceramics containing microporosity" *Acta Biomater* 5(2), (2009): 735–42.

- FLA01.** B. Flautre, M. Descamps, C. Delcourt, M. C. Blary, P. Hardouin, "Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections - Experimental study in rabbit", *J Mater Sci Mater Med* 12, (2001): 679-682.
- FRA11.** S. Franz, S. Rammelt, D. Scharnweber, J. C. Simon, "Immune responses to implants - A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials" *Biomaterials* 32 (28), (2011): 6692-6709.
- FRA97.** P. Frayssinet, N. Rouquet, J. Fages, M. Durand, P. O. Vidalain, G. Bonel, "The influence of sintering temperature on the proliferation of fibroblastic cells in contact with HA bioceramics" *J Biomed Mater Res* 35, (1997): 337-347.
- FRE82.** M. A. Freeman, G. W. Bradley, P. A. Revell, "Observations upon the interface between bone and PMMA cement", *J Bone Joint Surg Br*, 64 (4), (1982): 489-493.
- GAL04.** L. Galois, D. Mainard, "Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: an experimental study", *Acta Orthop Belg* 70, (2004): 598-603.
- GAU98.** O. Gauthier, J. M. Bouler, E. Aguado, P. Pilet, G. Daculsi, "Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth", *Biomaterials*, 19(1-3), (1998):133-139.
- GDU04.** J. Gdula-Argasinska, J. Appleton, K. Sawicka-Kapusta, B. Spence, "Further investigation of the heavy metal content of the teeth of the bank vole as an exposure indicator of environmental pollution in Poland" *Environ Pollut* 131 (1), (2004): 71-79.
- GIA05.** P.V. Giannoudis, D. Haralambos, T. Eleftherios, "Bone Substitutes: An Update." *Injury* 36(3), (2005):20-27.
- GOO85.** S. B. Goodman, J. Schatzker, G. Summer Smith, V. L. Fornasier, N. Gofen, C. Hunt, "The effect of PMMA on bone: an experimental study", *Arch Orthop Trauma Surg* 104, (1985): 150-154.
- HAB05.** P. Habibovic, H. Yuan, C. M. Van Der Valk, G. Meijer, C. A. Van Blitterswijk, K. de Groot, "3D Microenvironment as Essential Element for Osteoinduction by Biomaterials" *Biomaterials* 26(17), (2005): 3565-75.
- HAK14.** D. J. Hak, D. Fitzpatrick, J. A. Bishop, J. L. Marsh, S. Tilp, R. Schnettler, V. Alt, "Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects", *Injury* 45, Supplement 2, S3-S7 (2014).

**HAL92.** B. K. Hall, T. Miyake, "The membranous skeleton: the role of cell condensation in vertebrate skeletogenesis" *Anat Embryol* 186, (1992): 107-124.

**HAN11.** G. Hannink, J. J. Chris Arts, "Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration?" *Injury, Bone Substitutes: A Comprehensive Overview*, 42 (2) (2011).

**HAS13.** Haute Autorité de Santé, "Révision des catégories homogènes de dispositifs médicaux: Substituts osseux – Rapport d'évaluation", mai 2013.

**HAU14.** D. Hautcoeur, "Céramiques poreuses anisotropes par congélation orientée: contrôle des microstructures et applications fonctionnelles", Thèse de l'université de Mons et de la Faculté Polytechnique de Mons, 2014.

**HEN71.** L. L. Hench, R. J. Splinter, W.C. Allen, T. K. Greenlee, "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials" *J. Biomed. Mater. Res. Symposium* 2 (1), (1971): 117 - 141.

**HEN93.** An introduction to bioceramics, Deuxième édition, ISBN: 978-1-908977-15-1, 1993.

**HEU77.** J. C. Heughebaert, "Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques." Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 1977.

**HOR07.** J. C. Hornez, F. Chai, F. Monchau, N. Blanchemain, M. Descamps, H. F. Hildebrand, "Biological and Physico-Chemical Assessment of Hydroxyapatite (HA) with Different Porosity" *Biomol Eng* 24(5), (2007): 505–9.

**HUL70.** S. F. Hulbert, F. A. Young, R. S. Mathews, J. J. Klawitter, C. D. Talbert, F. H. Stelling, "Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses" *J Biomed Mater Res Vol.4*(3), (1970): 433-456.

**HUR04.** M. M. Hurley, J. A. Lorenzo " Chapter 3 : Systemic and local regulators of bone remodeling" *Bone formation*, ISBN : 978-1-84996-900-0, 2004.

**ITO04.** M. Itoh, A. Shimazu, I. Hirata, Y. Yoshida, H. Shintani, M. Okazaki, "Characterization of CO3Ap-collagen sponges using X-Ray high-resolution microtomography." *Biomaterials* 25(13), (2004): 2577–83.

**JAC92.** P. Jacobs, "Rapid prototyping and manufacturing : fundamentals of stereolithography" *Society of manufacturing engineers in cooperation with the computer and automated systems association of SME*, 1992.

- JAR81.** M. Jarcho, "Calcium phosphates as hard tissue prosthetics", *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 157, (1981): 259-278.
- JON09.** A. C. Jones, C. A. Arns, D. W. Hutmatcher, B. K. Milthorpe, A. P. Sheppard, M. A. Knackstedt, "The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth", *Biomaterials* 30, (2009):1440-51.
- JUI17.** L. Juignet, B. Charbonnier, V. Dumas, W. Boulefour, M. Thomas, C. Laurent, L. Vico, N. Douard, D. Marchat, L. Laval, "Macrotopographic closure promotes tissue growth and osteogenesis in vitro" *Acta Biomater* 53, (2017): 536-48.
- KAN05.** S. Kannan, J. H. G. Rocha, A. F. Lemos, J. M. F. Ferreira, "Effect of Ca/P ratio of precursors on the formation of different calcium apatitic ceramics: an X-Ray Diffraction Study" *Scr Mater* 53(11), (2005): 1259–62.
- KAR04.** V. Kartsogiannis, K. W. Ng, "Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology" *Mol Cell Endocrinol*, 228(1-2), (2004): 79–102.
- KAR04a.** N. J. Karin, M. C. Farach-Carson, " Chapter 2 : In vitro régulation of osteoblasts activity", *Bone formation*, ISBN : 978-1-84996-900-0, 2004.
- KAR05.** V. Karageorgiou, D. Kaplan, "Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis." *Biomaterials* 26(27), (2005): 5474–91. .
- KAS08.** P. Kasten et al. "Porosity and pore size of  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: An in vitro and in vivo study". *Acta Biomaterialia*, 4(6),(2008):1904–15. .
- KES03.** B. G. Keselowsky, D. M. Collard, A. J. Garcia, "Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion" *J Biomed Mater Res*, 66A, (2003): 247-259.
- KHO11.** S. Khoshniat, A. Bourguine, M. Julien, M. Petit, P. Pilet, T. Rouillon, L. Beck, "Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium", *Bone*, 48(4), (2011):894–902.
- KLE08.** F. M. Klenke, Y. Liu, H. Yuan, E. B. Hunziker, A. K. Siebenrock, W. Hofstetter, "Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo" *J Biomed Mater Res A* 85(3), (2008): 777–86.

- KLE12.** J. Klein-Nulend, R. G. Bacabac, A. D. Bakker, "Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton" *Eur Cell Mater* 24, (2012):278-291.
- KLE15.** J. Klein-Nulend, R. F. M. van Oers, A. D. Bakker, R. G. Bacabac, "Bone cell mechanosensitivity, estrogen and osteoporosis" *J Biomech* 48 (5), (2015):855-65.
- KNY13.** J. Knychala, N. Bouropoulos, C. J. Catt, O. L. Katsamenis, C. P. Please, B. G. Sengers, "Pore geometry regulates early stage human bone marrow cell tissue formation and organisation" *Ann Biomed Eng*, 41, (2013): 917-930.
- KOK06.** T. Kokubo, H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?" *Biomaterials* 27(15), (2006): 2907-15.
- KRU04.** M. C. Kruyt, W. J. A. Dhert, C. Oner, C. A. van Blitterswijk, A. J. Verbout, J. D. de Bruin, "Optimization of bone-tissue engineering in goats", *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater*, 69B, (2004):113–20.
- KUB01.** Y. Kuboki, Q. Jin, H. Takita, "Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP induced osteogenesis and chondrogenesis" *J Bone Surg Am* 83 (1 suppl 2), (2001):105-115.
- KUM11.** G. Kumar, C. K. Tison, K. Chatterjee, P. S. Pine, J. H. McDaniel, M. L. Salit, M. F. Young, C. G. Simon Jr. "The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape" *Biomaterials* 32, (2011):9188-196.
- LAS14.** M. Lasgorceix, "Mise en forme par microstéréolithographie et frittage de céramiques macro-micro-poreuse en HA silicatée et évaluation biologique" Thèse de l'université de Limoges, 2014.
- LAU10.** S. Laurencin Dalicieux, " Role de l'acide lysophosphatidique et de son récepteur LPA1 dans le développement osseux et dentaire: effet paracrine dans le contrôle de l'ostéogénèse et la cémentogénèse." Thèse de l'université de Toulouse, 2010.
- LEE09.** J. W. Lee, G. S. Ahn, D. S. Kim, D. W. Cho, "Development of Nano- and Microscale Composite 3D Scaffolds Using PPF/DEF-HA and Micro-Stereolithography" *Microelectron Eng* 86(4-6), (2009): 1465–67.
- LEG02.** R. Z. LeGeros, "Properties of osteoinductive biomaterials: Calcium phosphates", *Clin. Orth.* 395, (2002): 81-98. .

- LEH95.** J. C. Le Huec, T. Schaeverbeke, D. Clément, J. Faber, A. Le Rebeller, "Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress", *Biomaterials* 16, (1995): 113-118.
- LEO03.** K. F. Leong, C. M. Cheah, C. K. Chua, "Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs" *Biomaterials, Focus on Biomaterials Science in Asia* 24(13), (2003): 2363–78.
- LER09.** T. Lerner, V. Bullmann, T. Schulte, M. Scheider, U. Liljenqvist, "A level-1 pilot study to evaluate of ultraporous  $\beta$ -TCP as a graft extender in the posterior correction of adolescent idiopathic scoliosis", *Eur Spine J.*, 18(2), (2009): 170–179.
- LI012.** B. Li, X. Liao, L. Zheng, X. Zhu, Z. Wang, H. Fan, X. Zhang, "Effect of nanostructure on osteoinduction of porous biphasic calcium phosphate ceramics" *Acta Biomater* 8, (2012):3789-804.
- LIM17.** J. Lim, I. Grafe, S. Alexander, B. Lee, "Genetic causes and mechanisms of osteogenesis imperfecta" *Bone*, 102, (2017): 40-49.
- LIN98.** F. H. Lin, C. J. Liao, K. S. Chen, J. S. Sun, "Preparation of High-Temperature Stabilized  $\beta$ -Tricalcium Phosphate by Heating Deficient Hydroxyapatite with  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  Addition" *Biomaterials* 19(11–12), (1998): 1101–7.
- LIU99.** D. M. Liu, "Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity.", *J Mater Sci: Materials in medicine* 8 (1997): 227-232.
- LOW51.** O. H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A. Lewis Farr, R.J Randall. "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.*, 193, (1951):265-275.
- LU99.** J. X. Lu, B. Flautre, K. Anselme, P. Hardouin, A. Gallur, M. Descamps, B. Thierry, "Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo", *J Mater Sci: Material in Medicine* 10 (1999): 111-120.
- MAC08.** E. J. Mackie, Y. A. Ahmed, L. Tatarczuch, K. S. Chen, M. Mirams, "Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton" *Int J Biochem Cell Biol*, 40 (1), (2008):46-62.
- MAE05.** S. Maeno, Y. Niki, H. Matsumoto., H. Morioka, T. Yatabe, A. Funayama, J. Tanaka, "The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials*, 26(23), (2005):4847–55.

- MAG16.** A. Magnaudeix et al., "Quantitative analysis of vascular colonisation and angioconduction in porous silicon substituted HA with various pore shapes in a CAM model" *Acta Biomaterialia* 38, (2016): 179-189.
- MAN09.** S. M. Mantila Roosa, J.M. Kemppainen, E.N. Moffitt, P.H. Krebsbach, S.J. Hollister, "The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model", *J Biomed Mater Res A* (2009).
- MAR01.** P. Marie, "Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste", *Medecine/Sciences*, (2001): 1252-9.
- MCB04.** R. McBeath, D. M. Pirone, C. N. Nelson, K. Badhriraju, C. S. Chen, "Cell shape, cytoskeleton tension and RhoA regulate stem cell lineage commitment" *Dev Cell* 6 (4), (2004):483-495.
- MEU16.** E. Meurice, F. Bouchart, J.C. Hornez, A. Leriche, D. Hautcoeur, V. Lardot, F. Monteiro, "Osteoblastic cells colonization inside beta-TCP macroporous structures obtained by ice-templating." *J Eur Ceram Soc* 36(12), (2016): 2895-2901.
- MON80.** G. Montel, G. Bonel, J. C. Trombe, J. C. Heughebaert, C. Rey. "Progrès dans le domaine de la chimie des composés phosphores solides à structure d'apatite". *Pure and App. Chem* 52, (1980): 973-987.
- MUL64.** W. W. Mullins, "Stability of a planar interface during solidification of a dilute binary alloy" *J. Appl. Phys* 35 (2), (1964): 444-451.
- MUR10.** C. M. Murphy, M. G. Haugh, F. J. O'Brien, "The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering" *Biomaterials* 31(3), (2010): 461-66.
- OBR05.** F. J. O'Brien, B. A. Harley, I. V. Yannas, L. J. Gibson, "The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds." *Biomaterials* 26(4), (2005): 433-41.
- OHI12.** T. Ohiji, M. Fukushima, "Macroporous ceramics: processing and properties" *Int Mater Rev* 57(2), (2012): 115-131.
- ORI10.** H. Orimo. "The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease" *J Nippon Med Sch* 77(1), (2010): 4-12.
- OWE69.** D. K. Owens, R. C. Wendt « Estimation of the surface free energy of polymers" *J Appl Polym Sci* 13, (1969): 1741-47.

- PAR12.** J. H. Park, J. Y. Bae, J. Shim, I. Jeon, "Evaluation of suitable porosity for sintered porous  $\beta$ -tricalcium phosphate as a bone substitute" *Mater Charact* 71, (2012): 103–11.
- PEC10.** F. Pecqueux, F. Tancret, N. Payraudeau, J. M. Bouler, "Influence of Microporosity and Macroporosity on the Mechanical Properties of Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics: Modelling and Experiment." *JECS* 30(4), (2010): 819-29.
- PRI16.** M. Prideaux, D. M. Findlay, G. J. Atkins, "Osteocytes: the master cells in bone remodelling" *Cur Opin Pharmacol* 28, (2016): 24-30.
- PUZ04.** J. E. Puzas, " Chapter 4: Site-specific mineralized matrix formation by osteoblasts", *Bone formation*, ISBN : 978-1-84996-900-0, 2004.
- RAY01.** S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, J. P. Laval, "Determination of calcium/phosphorus atomic ratio of calcium phosphate apatites using X-Ray diffractometry" *J Am Cer Soc* 84(2), (2001): 359–66.
- RAY02.** S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, P. Thomas, "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders" *Biomaterials* 23(4), (2002): 1065–72.
- RGU11.** E. Rguiti, "Frittage, propriétés mécaniques et fonctionnalisation de biocéramiques mono et biphasées", Thèse de l'Université de valenciennes et du Haunais Cambrésis, 2011.
- RHO98.** J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone", *Mech Eng & Ph* 20, (1998): 92-102.
- RIS04.** T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor, "Cell viability assays." *Assay guidance manual*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, (2004).
- ROU06.** M. Rouahi, O. Gallet, E. Champion, J. Dentzer, P. Hardouin, K. Anselme, "Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response" *J Biomed Mater Res A*, (78)2, (2006): 222-35.
- ROU13.** N. Roussel, "Optimisation du dopage d'alumines nanométriques et frittage par SPS. Application aux céramiques transparentes", Thèse de l'Université de Toulouse, 2013.
- RUM08.** M. Rumpler, A. Woesz, J. W. C. Dunlop, J. T. van Dongen, P. Fratzl, "The effect of geometry on three dimensional tissue growth" *J R Interface* 5, (2008): 1173-1180.



- RYU02.** H. S. Ryu, H. J. Youn, K. Sun Hong, B. S. Chang, C. K. Lee, S. S. Chung, "An improvement in sintering property of  $\beta$ -TCP by Addition of calcium pyrophosphate" *Biomaterials* 23(3), (2002): 909–14.
- SAM13.** S. Samavedi, A. R. Whittington, A. S. Goldstein, "Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior" *Acta Biomater* 9, (2013): 8037-45.
- SAN08.** E. A. dos Santos, M. Farina, G. A. Soares, K. Anselme, "Surface energy of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion" *J Mater Sci Mater Med* 19, (2008): 2307-16.
- SHE15.** V. R. Sherman, W. Yang, M. A. Meyers, "The material science of collagen" *J Mech Behav Biomed Mater*, 52, 2015: 22-50.
- SKO17.** S. A. Skoog, G. Kumar, R. J. Narayan, P. L. Goering, "Biological responses to immobilized microscale and nanoscale surface topographies" *Pharmacol Ther* (2017).
- STU06.** A. R. Studart, U. T. Gonzenbach, E. Tervoort, L. J. Gauckler "Processing routes to macroporous ceramics: a review" *J Am Cer Soc* 89(6) (2006):1771–89.
- TAN16.** N. Taniguchi et al., "Effect of pore size on bone ingrowth into porous Ti implants fabricated by additive manufacturing: an in vivo experiment." *Mater Sci Eng C* 59, (2016): 690-701.
- TIT07.** I. Titorencu, V. Jinga, E. Constantinescu, A.V. Gafencu, C. Ciohodaru, I. Manolescu, M. Simionescu, "Proliferation, differentiation and characterization of osteoblasts from human BM mesenchymal cells", *Cytotherapy*, 9(7), (2007):682–96. .
- TSU97.** E. Tsuruga, H. Takita, H. Itoh, Y. Wakisaka, Y. Kuboki, "Pore size of porous HA as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis" *J Biochem*, 121, (1997): 317-324.
- URI65.** M. R. Urist, "Bone : formation by autoinduction", *Science*, Vol. 150, No. 3698, (1965): 893-899.
- URQ16.** E.R. Urquia Edreira, A. Hayrapetyan, J.G.C. Wolke, H.J.E. Croes, A. Klymov, J.A. Jansen, J.J.J.P. vanden Beucken, "Effect of calcium phosphate ceramic substrate geometry on MSC organization and osteogenic differentiation" *Biofabrication* 8, (2016): 025006.
- WAN04.** C. Wang, Y. Dua, B. Markovic, J. Barbara, C. Rolfe Howlett, X. Zhang, H. Zreiqat, "Proliferation and bone-related gene expression of osteoblasts grown on HA ceramics sintered at different temperature. *Biomaterials*, 25(15), (2004):2949-56.

- WEB00.** T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, R. Bizios, "Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics" *J Biomed Mater Res* 51, (2000): 475-83.
- WEL61.** J. H. Welch, W. Gutt, "High-temperature studies of the system calcium oxide-phosphorus pentoxide", *J Chem Soc*, (1961): 4442-4444.
- WOO07.** J. R. Woodard, A. J. Hilldore, S. K. Lan, C. J. Park, W. A. Morgan, J. A. C. Eurell, A. J. Wagoner Johnson, "The Mechanical Properties and Osteoconductivity of Hydroxyapatite Bone Scaffolds with Multi-Scale Porosity" *Biomaterials* 28(1) (2007): 45–54.
- WU16.** H. Wu, Y. Cheng, W. Liu, M. Zhou, S. Wu, X. Song, Y. Chen, "Effect of the particle size and the debinding process on the density of alumina ceramics fabricated by 3D printing based on stereolithography" *Ceram Int* 42 (15), (2016): 17290-294.
- ZHA11.** K. Zhao, Y. F. Tang, Y. S. Qin, J. Q. Wei, "Porous Hydroxyapatite Ceramics by Ice Templating: Freezing Characteristics and Mechanical Properties." *Ceramics International* 37(2), (2011): 635–39.

## **Normes**

**NF EN ISO 10993** : Évaluation biologique des dispositifs médicaux

**NF ISO 13175 – 3** : Implants chirurgicaux - Phosphates de calcium - Partie 3 : substituts osseux à base d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique bêta

**NF ISO 13779 – 1** : Implants chirurgicaux - Hydroxyapatite - Partie 1 : céramique à base d'hydroxyapatite

**NF EN ISO 623 – 2**: Céramiques techniques avancées - Céramiques monolithiques. Propriétés générales et texturales - Partie 2 : détermination de la masse volumique et de la porosité.

**NF EN ISO 643** : Aciers - Détermination micrographique de la grosseur de grain apparente

## Liste des figures

Figure 1. Étapes de cicatrisation osseuse à la suite d'une fracture (DES15) .....	4
Figure 2. Schéma d'une coupe sagittale d'une extrémité d'os long et d'un fragment d'os compact.....	10
Figure 3. Composition du tissu osseux (% m.).....	12
Figure 4. Schéma de l'assemblage en triple hélice du procollagène (SHE15) .....	13
Figure 5. Isothermes de solubilité des phosphates de calcium à 37°C en fonction du pH (COM13).....	15
Figure 6. Schéma récapitulatif de l'ossification endochondrale (MAC08) : (A) ébauche cartilagineuse, (B) formation du centre d'ossification primaire, (C) centre d'ossification primaire, (D) formation des centres d'ossification secondaires et mise en place des cartilages de conjugaison, (E) os long adulte.....	17
Figure 7. Cycle de remodelage osseux : (1) os protégé par les cellules bordantes, (2) recrutement des pré-ostéoclastes, (3) ostéoclaste mature, (4) résorption osseuse au niveau d'une lacune de Howship et apoptose de l'ostéoclaste, (5) recrutement de pré-ostéoblastes, (6) synthèse d'une nouvelle matrice osseuse par les ostéoblastes matures et (7) les ostéoblastes meurent, deviennent des cellules bordantes ou sont inclus dans la matrice (adapté de (MAR01)).....	19
Figure 8. Schéma récapitulatif du devenir d'une cellule souche mésenchymateuse en fonction de l'expression du facteur de transcription spécifique (MAR01).....	20
Figure 9. Schéma récapitulatif des principaux marqueurs ostéoblastiques et de leur expression lors de la différenciation ostéoblastique (MAR01) .....	22
Figure 10. Structure hiérarchisée de l'os : de la molécule de collagène à l'os (adaptée de (RHO98)).....	25
Figure 11. Produits issus de la synthèse de phosphate de calcium en fonction du rapport Ca/P. Le pyrophosphate et la chaux sont considérés comme des impuretés.....	29
Figure 12. Diagramme de phase partiel du système CaO - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (WEL61).....	29
Figure 13. Illustration d'un implant à architecture radiale (à gauche) et orthogonale (à droite) (CHU02) .....	37
Figure 14. Images de microscopie optique montrant la croissance cellulaire en fonction de la largeur des pores (200 à 500 µm). Barres d'échelle : 100 µm (KNY13) .....	39
Figure 15. Schéma des échantillons sur lequel sont reportées les valeurs du taux de recouvrement du pore à 7 jours de culture (a) et 14 jours de culture (b) .....	40
Figure 16. Micrographies ayant permis la mesure de l'angle d'ouverture des sillons sur les 3 échantillons : (A) sinusoïdale de période 2π, (B) triangulaire de période 2π et (C) triangulaire de période π (JUI17) .....	41

Figure 17. Schéma récapitulatif des différentes propriétés du matériau qui ont un impact sur la cascade d'évènements biologiques qui commence par l'adsorption protéique, suivi de l'adhésion cellulaire et enfin de la différenciation (SAM13) .....	46
Figure 18. Récapitulatif des changements qui s'opèrent à la surface d'une céramique phosphocalcique dans le milieu physiologique (adapté de (COM13)) .....	48
Figure 19. (A) récapitulatif de différents procédés de mise en forme ainsi que de leurs principes et (B) classification de matériaux céramiques en fonction du diamètre de pores, de l'application et des procédés fabrication. Le rectangle délimite la gamme de dimensions et les techniques de fabrication.....	49
Figure 20. Récapitulatif des différentes étapes de l'imprégnation d'une préforme polymérique .....	53
Figure 21. Élaboration d'une préforme en billes de PMMA : (A) mise en contact des billes avec le solvant et (B) coalescence des billes et retrait de l'édifice .....	54
Figure 22. Taille des interconnexions en fonction du retrait relatif du squelette organique....	55
Figure 23. Comparaison des résultats empiriques aux résultats obtenus via le modèle théorique (« <i>Model</i> »).....	56
Figure 24. Micrographies MEB de billes en PMMA interconnectées (A), d'une préforme imprégnée (B) et d'une pièce en céramique après déliantage et frittage (C).....	57
Figure 25. Description des différentes phases de l'élaboration d'un échantillon dense à partir d'une barbotine aqueuse (DEV08) lors d'une congélation orientée.....	58
Figure 26. Schématisation de la structure globale d'un échantillon en céramique obtenue par congélation orientée (adapté de (DEV06)). La zone d'intérêt est délimitée par le rectangle rouge.....	58
Figure 27. Schéma du support texturé.....	59
Figure 28. Variation des tailles de pore en fonction de la vitesse de refroidissement (30% de matière sèche pour 3% m. de liant par rapport au taux de matière sèche) (adapté de (MEU16)).....	60
Figure 29. Variation des tailles de pores en fonction du taux de matière sèche (3% m. de liant par rapport au taux de matière sèche et une vitesse de refroidissement de 1°K/min) (adapté de (MEU16)) .....	60
Figure 30. Variation des tailles de pores en fonction du taux de liant (30 % vol. de matière sèche et une vitesse de refroidissement de 1°K/min) (adapté de (MEU16)) .....	60
Figure 31. Moule de congélation en Teflon® (vue d'en haut).....	61
Figure 32. Schéma du dispositif de congélation orientée.....	62
Figure 33. Schéma de principe de la stéréolithographie .....	64

Figure 34. Micrographie MEB des 3 types de structures générées (de gauche à droite) : imprégnation d'une préforme polymérique PS, stéréolithographie 3D et congélation orientée CO .....	65
Figure 35. Diffractogramme RX de la poudre .....	69
<b>Figure 36. Spectre infrarouge de la poudre synthétisée. Les lignes noires indiquent l'absence des pics caractéristiques du pyrophosphate</b> .....	70
Figure 37. Analyse thermique de la poudre de $\beta$ -TCP brute et les événements qui lui est associés .....	72
<b>Figure 38. Courbe de retrait de la poudre avec les événements qui lui sont associés (5°C/min)</b> .....	74
Figure 39. Variation de la densité en fonction du cycle de frittage .....	75
Figure 40. Micrographie MEB de la structure d'un échantillon densifié à 1100°C pendant 3 h et ayant subi une attaque thermique à 1000°C pendant 15 min afin de révéler les joints de grain .....	76
Figure 41. Analyse granulométrique volumique de la poudre .....	77
Figure 42. Micrographie de la structure d'un échantillon densifié à 1100°C pendant 3 h et ayant subi une attaque thermique à 1000°C pendant 15 min.....	78
Figure 43. Schéma représentant l'angle de contact $\theta$ et les composantes $\gamma_{SV}$ (tension interfaciale solide - liquide), $\gamma_{LV}$ (tension interfaciale liquide - vapeur) et $\gamma_{SL}$ (tension interfaciale solide - vapeur).....	79
Figure 44. Mesure du potentiel zêta en fonction du pH de la poudre synthétisée .....	80
Figure 45. Photographie d'une plaque de culture de 24 puits (Source: Catalogue VWR) .....	83
Figure 46. Détermination de la quantité optimale de dispersant pour une suspension de $\beta$ - TCP .....	84
Figure 47. Cycle thermique que subit une préforme polymérique imprégnée d'une suspension de $\beta$ -TCP : un traitement de déliantage suivi d'un frittage .....	86
Figure 48 : (A) Échantillon non délianté, (B) échantillon délianté et (C) échantillons délianté et fritté. ....	86
Figure 49. Micrographies MEB de la surface des échantillons : (A) PS, (B) 3D, (C) CO1, (D) CO4 et (E) CO7 .....	90
Figure 50. Micrographie MEB de section transversale des échantillons obtenus par congélation orientée : CO1 (A et B), CO4 (C et D) et CO7 (E et F).....	92
Figure 51. Micrographie MEB de parois de pores de l'échantillon CO4 .....	92
Figure 52. Reconstruction tridimensionnelle d'une portion d'un échantillon 3D au microscope confocal.....	93
Figure 53. Reconstruction tridimensionnelle d'une portion d'un échantillon PS au microscope confocal.....	94

Figure 54. Reconstruction tridimensionnelle d'une portion d'un échantillon CO4 brisé dans le sens de la congélation .....	94
Figure 55. Photographies issues d'une loupe binoculaire (1ere ligne) et du MEB (2eme ligne). (A) correspond au jour 1 et (B) correspond au jour 3.....	100
Figure 56. Micrographies MEB de l'échantillon PS : (A) 21 <sup>e</sup> jour surface ; (B) 28 <sup>e</sup> jour surface ; (C) 35 <sup>e</sup> jour surface, (D) 21 <sup>e</sup> jour nodules de minéralisation, (E) 21 <sup>e</sup> jour coupe transversale avec cellules, nodules de minéralisation (flèche orange) et précipitât (flèche rouge) et (F) 21 <sup>e</sup> jour, pénétration cellulaire très limitée .....	102
Figure 57. Micrographies MEB de l'échantillon 3D : (A) 21 <sup>e</sup> jour, surface avec de nombreuses cellules orientées ; (B) 28 <sup>e</sup> jour, surface avec croissance du tapis cellulaire; (C) 35 <sup>e</sup> jour, tapis cellulaire dense en surface (D) 21 <sup>e</sup> jour nodules de minéralisation (flèche), (E) 21 <sup>e</sup> jour, coupe transversale montrant un pore en forme d'entonnoir dont le haut est obstrué par une couche de cellule et de MEC et (F) 21 <sup>e</sup> jour, présence de cellules dans le réseau poreux.....	103
Figure 58. Image prise au microscope confocal de CSMH immunomarquées sur un échantillon 3D au 14 <sup>e</sup> jour.....	104
Figure 59. Micrographies MEB de l'échantillon CO1 : (A) 21 <sup>e</sup> jour coupe transversale ; (B) 21 <sup>e</sup> jour nodules de minéralisation (flèche orange) ; (C) 35 <sup>e</sup> jour surface pores obstrués par un enchevêtrement de cellules et de MEC et (D) 35 <sup>e</sup> jour présence de précipitât (flèche rouge).....	105
Figure 60. Micrographies MEB de l'échantillon CO4 : (A) : 21 <sup>e</sup> jour surface, (B) 21 <sup>e</sup> jour coupe transversale montrant l'invasion cellulaire (C) 21 <sup>e</sup> jour nodules de minéralisation (flèche orange), (D) 28 <sup>e</sup> jour coupe transversale cellule pontant les parois du pore, (E) 28 <sup>e</sup> jour surface avec cellules et MEC et (F) 21 <sup>e</sup> jour, coupe transversale avec cellules, nodules de minéralisation (flèche orange) et précipitât (flèche rouge).....	106
Figure 61. Micrographies MEB de l'échantillon CO7 au: (A) 21 <sup>e</sup> jour surface de l'échantillon avec débris et très peu de cellule visible, (B) 21 <sup>e</sup> jour nodule de minéralisation (flèche orange), structures en épines (flèche rouge) et nombreux débris (C) 35 <sup>e</sup> jour surface de l'échantillon et (D) échantillon (sans cellules) après découpage et rinçage, de nombreux débris sont présents et bloquent les pores.....	107
Figure 62. Activité cellulaire qui découle du test à la resazurine .....	108
Figure 63. Contenu protéique mesuré par la méthode de Lowry .....	109
Figure 64. Étude de la corrélation entre l'activité cellulaire et la quantité totale de protéine grâce aux droites de régression linéaire (14 <sup>e</sup> , 21 <sup>e</sup> et 28 <sup>e</sup> jour).....	110
Figure 65. Activité de la phosphatase alcaline .....	110

## Liste des tableaux

Tableau 1. Récapitulatif des facteurs de risques à l'origine d'une réparation osseuse compromise (HAK14) .....	5
Tableau 2. Tableau récapitulatif des principaux phosphates de calcium utilisés comme biomatériaux (COM13) (BER15a) .....	7
Tableau 3. Composition chimique (pourcentages massiques) des constituants minéraux de différents tissus calcifiés, de l'HA et du $\beta$ -TCP (MON80). Le rapport atomique Ca/P permet de caractériser les phosphates de calcium .....	14
Tableau 4. Produit de solubilité de quelques phosphates de calcium (du plus soluble au moins soluble) dans de l'eau à 25°C (adapté de (BER15a)) .....	14
Tableau 5. Récapitulatif des propriétés mécaniques de l'os (HEN93).....	15
Tableau 6. Récapitulatif non exhaustif du taux d'expression de facteurs impliqués dans la différenciation ostéoblastique (AUB01).....	21
Tableau 7. Caractéristiques chimiques et cristallographiques du $\beta$ -TCP .....	27
Tableau 8. Transformation par traitement thermique de $\beta$ -TCP synthétisé en solution à basse température avec un Ca/P = 1,5 .....	28
Tableau 9. Tableau récapitulatif des différentes méthodes de synthèse de phosphate tricalcique par voie sèche .....	32
Tableau 10. Récapitulatif des techniques de mise en forme de céramiques ainsi que leurs caractéristiques .....	51
Tableau 11. Récapitulatif de techniques de mise en forme par fabrication additive, leurs avantages et inconvénients (adapté de (CHA15)).....	52
Tableau 12. Récapitulatif des différents modes d'empilement possibles pour des sphères ainsi que les densités relatives associées (DES08) .....	55
Tableau 13. Densité relative mesurée par gamme granulométrique de billes (DES08).....	55
Tableau 14. Détermination du pourcentage massique de $\beta$ -TCP dans des mélanges biphasés TCP/HA (RAY01).....	69
Tableau 15. Attribution des principales bandes IR caractéristiques des phosphates de calcium (HEU77) .....	70
Tableau 16. Récapitulatif de la quantification d'éléments traces par ICP dans la poudre de $\beta$ -TCP .....	71
Tableau 17. Composition pour 100 g de suspension .....	76
Tableau 18. Variation de pH et pourcentage massique de calcium dissous sur une période de 48h .....	78
Tableau 19. Récapitulatif des composantes nécessaires au calcul de l'énergie de surface. .	79



Tableau 20 : Récapitulatif des mesures d'angle de contact au jour 0 et après 10 jour d'immersion dans du milieu de culture complémente	80
Tableau 21. Récapitulatif des différents tests de contrôle de la poudre de $\beta$ -TCP (PB : poudre brute et PF : la poudre finale)	82
Tableau 22. Récapitulatifs des paramètres de fabrication (% m. de matière sèche / % m. de liant par rapport au taux de matière sèche / vitesse de congélation), des dimensions des pores et du taux de porosité ( (MEU16)	87
Tableau 23. Taille de pore et porosité des macroporeux	90
Tableau 24. Surface spécifique des macroporeux	93
Tableau 25. Tableau récapitulatif des différentes valeurs de Ra obtenues par microscopie confocal	93
Tableau 26. Récapitulatifs de certaines caractéristiques poreuses et topographiques des échantillons	112

## Annexes

### 1. Fiche signalétique du nitrate de calcium tetrahydraté

Données fournisseur : HONEYWELL

Formule chimique:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

N° CAS : 13477-34-4

Masse moléculaire :  $236,15 \text{ g.mol}^{-1}$

Pureté :  $\geq 98 \%$

pH (5 %, 20°C) = 4,0 – 7,0

Impuretés :

Impuretés	Teneur max. (%. m)
Fer	0,001
$\text{Mg}^{2+}$	0,03
$\text{Na}^+$	0,01
Métaux lourd (Pb)	0,002
$\text{Cl}^-$	0,005
$\text{PO}_4^{3-}$	0,005
$\text{SO}_4^{2-}$	0,01

## 2. Fiche signalétique de l'hydrogénophosphate de diammonium

Données fournisseur: CARLO ERBA

Formule chimique:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

N° CAS : 7783-28-0

Masse moléculaire :  $132,06 \text{ g.mol}^{-1}$

Pureté : 98 %

pH (5 %, 25°C) = 7,7 - 8,1

Impuretés :

Impuretés	Teneur maximale (ppm)
Cl <sup>-</sup>	10
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	100
Insolubles dans l'eau	50
Métaux lourds (Pb)	10
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	30
Fer	10
K <sup>+</sup>	10
Na <sup>+</sup>	50
Ca <sup>2+</sup>	10
Mg <sup>2+</sup>	5

### 3. Pesée hydrostatique

Ce protocole provient de la norme : ISO 623 – 2. La mesure de la densité se fait par pesée hydrostatique. Cette méthode permet grâce à la mesure de la masse de l'échantillon sous différentes conditions de calculer la masse volumique apparente et la porosité ouverte:

- La masse sèche ou M1: la masse de l'éprouvette sèche.
- La masse humide ou M2: l'échantillon sec est mis sous vide. Cette étape va permettre l'expulsion de l'air des porosités ouvertes. L'échantillon est ensuite immergé dans de l'eau et le vide est cassé. Cette étape de la pesée hydrostatique a pour but d'optimiser le remplissage de l'ensemble de la porosité ouverte en éliminant l'air présent dans l'échantillon. L'excédent d'eau est éliminé grâce à du papier humide avant la mesure.
- La masse immergée ou M3: cette dernière correspond à la masse de l'échantillon immergé après l'imprégnation à vide.

Les équations permettant de calculer les résultats sont les suivantes

- La masse volumique apparente  $\rho_{app}$  (kg/m<sup>3</sup>) ( $\rho_L$  : densité de l'eau) (Équation 19) :

$$\rho_{app} = \frac{M1}{M3 - M2} \times \rho_L$$

**Équation 19**

- Pourcentage de la porosité ouverte  $\Pi_o$  (Équation 20) :

$$\Pi_o = \frac{M3 - M1}{M3 - M2} \times 100$$

**Équation 20**

Le pourcentage de porosité ouverte attendu est inférieur à 1%. Les mesures sont effectuées sur au moins 10 échantillons et répétées 3 fois. La densité à cru de nos barreaux est supérieure à 60 % lorsqu'ils sont pressés et supérieure à 63 % lorsqu'ils sont coulés. La densité de nos barreaux frittés est supérieure à 99 %. Cette technique est aussi utilisée pour déterminer le taux de porosité de nos échantillons.

#### 4. Correction d'Abercrombie

Elle permet le calcul de la taille réelle de particules sphériques identiques sectionnées de façon aléatoire. Le rayon d'une section horizontale d'une sphère va dépendre de la hauteur auquel elle a été sectionnée. La valeur de ce rayon  $r(z)$  peut être déterminée en appliquant le théorème de Pythagore et en utilisant la distance  $z$  qui détermine la hauteur du plan considéré et  $R$  le rayon de la sphère (Équation 21) :

$$r(z) = \sqrt{R^2 - z^2}$$

Équation 21

Lorsque la sphère est sectionnée en plans horizontaux d'épaisseur égale  $dz$ , l'équation suivante permet de déterminer le rayon de profil moyen  $\bar{r}$  (Équation 22) :

$$\bar{r} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r_i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sqrt{R^2 - z_i^2} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sqrt{R^2 - R^2 \left(\frac{i}{n}\right)^2}$$

Équation 22

Le rayon de la sphère  $R$  est constant, d'où (Équation 23) :

$$\bar{r} = R \left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sqrt{1 - \left(\frac{i}{n}\right)^2} \right) = kR$$

Équation 23

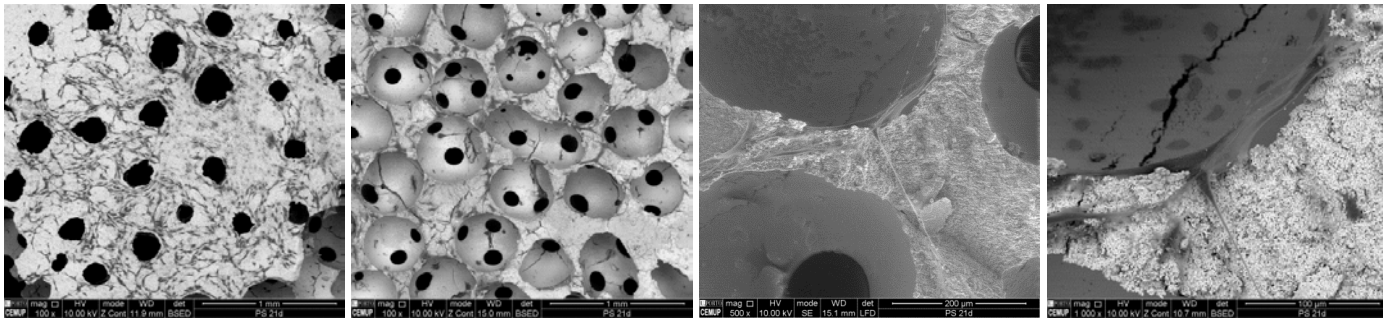
Cette équation permet ainsi d'exprimer le rayon du profil moyen en fonction du rayon de la sphère. La détermination de la constante  $k$  se fait graphiquement. L'aire du quart de disque est égale à la somme de l'aire des plans horizontaux de longueurs moyennes  $\bar{r}$ . Cette dernière est obtenue en divisant l'aire du quadrant par le rayon  $R$  de la sphère (Équation 24) :

$$\bar{r} = \frac{\pi R^2/4}{R} = \frac{\pi}{4} R \text{ d'où } R = \frac{4}{\pi} \bar{r}$$

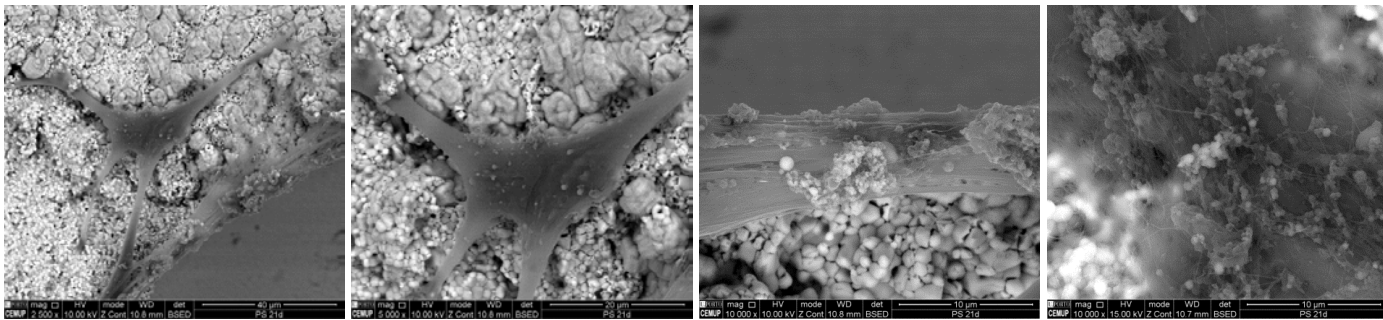
Équation 24

## 5. Micrographies MEB

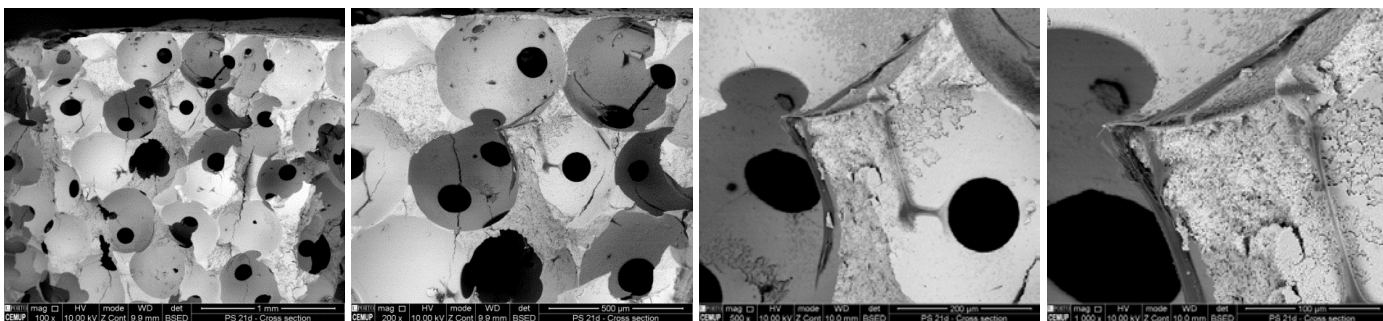
PS – Micrographies – 21<sup>e</sup> jour



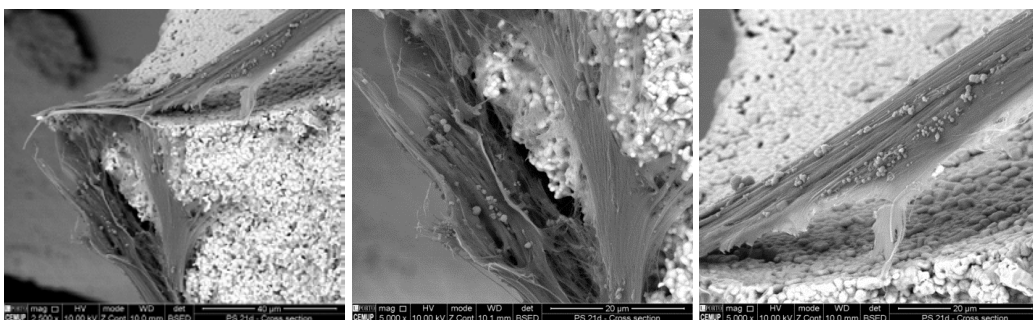
Prolifération en surface



Minéralisation en surface

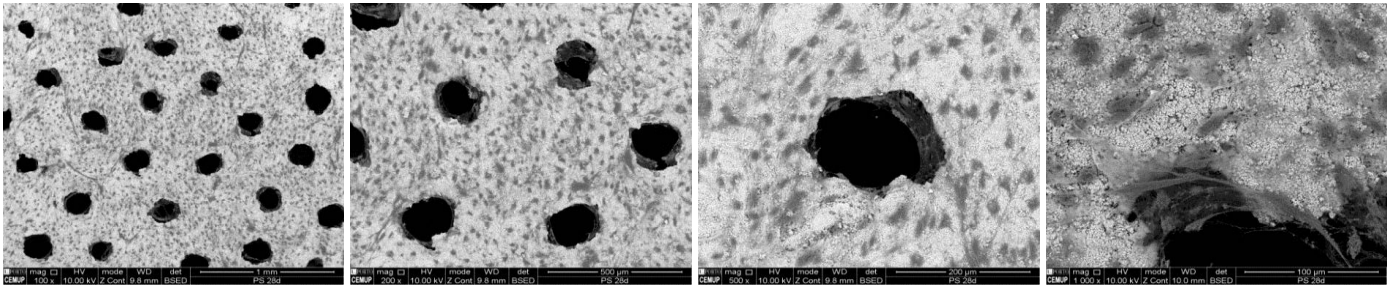


Prolifération à l'intérieur de la structure

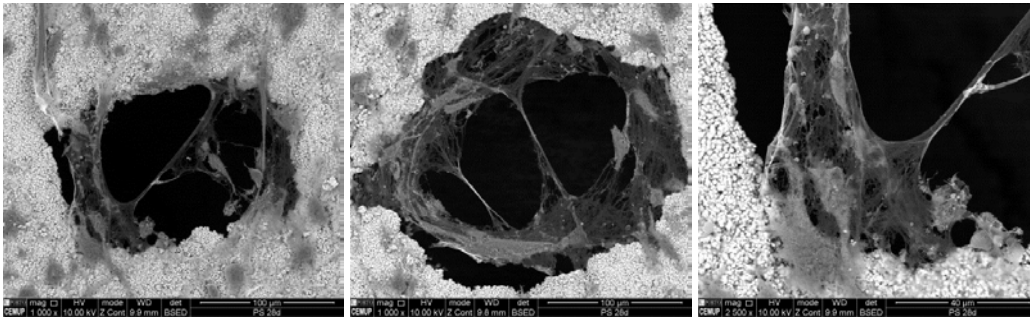


Minéralisation à l'intérieur de la structure

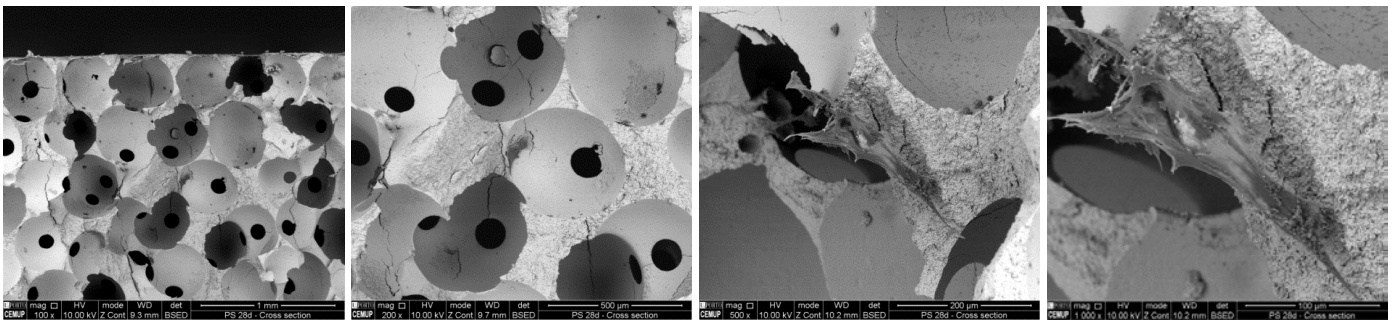
# PS - Micrographies - 28<sup>e</sup> jour



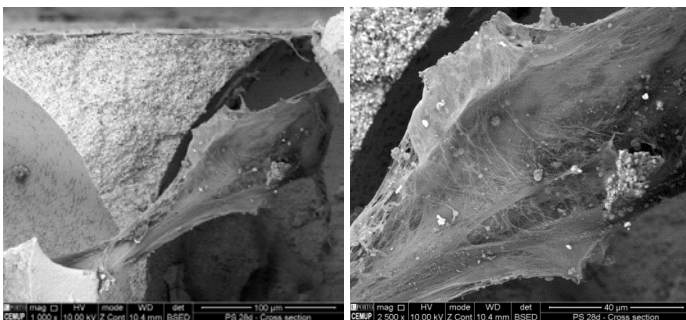
Prolifération en surface



Minéralisation en surface

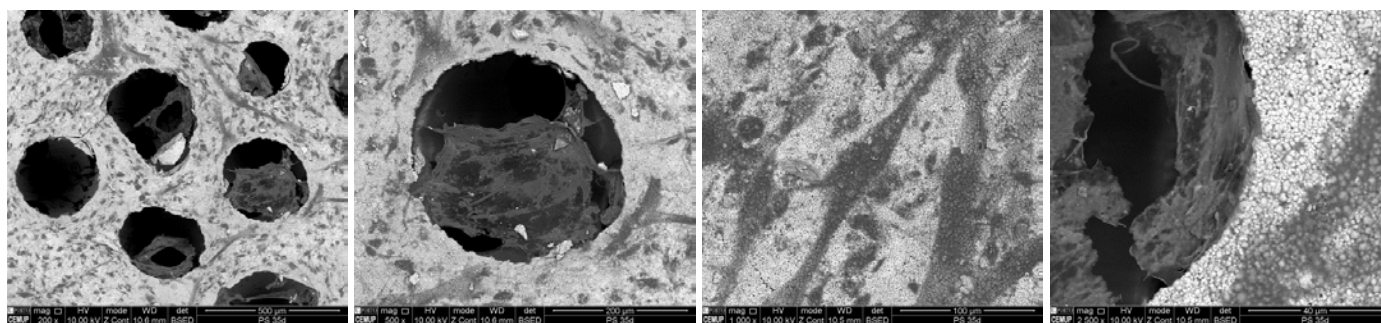


Prolifération à l'intérieur de la structure



Minéralisation à l'intérieur de la structure

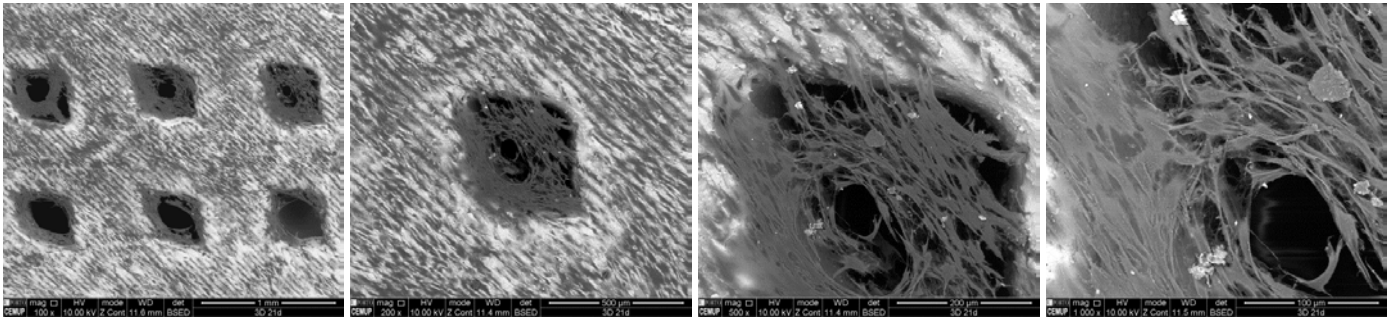
# PS – Micrographies – 35<sup>e</sup> jour



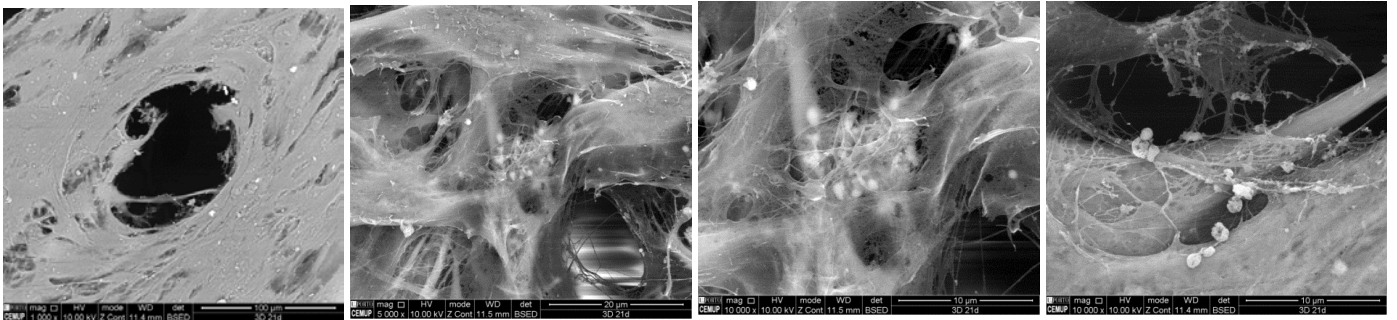
Prolifération en surface



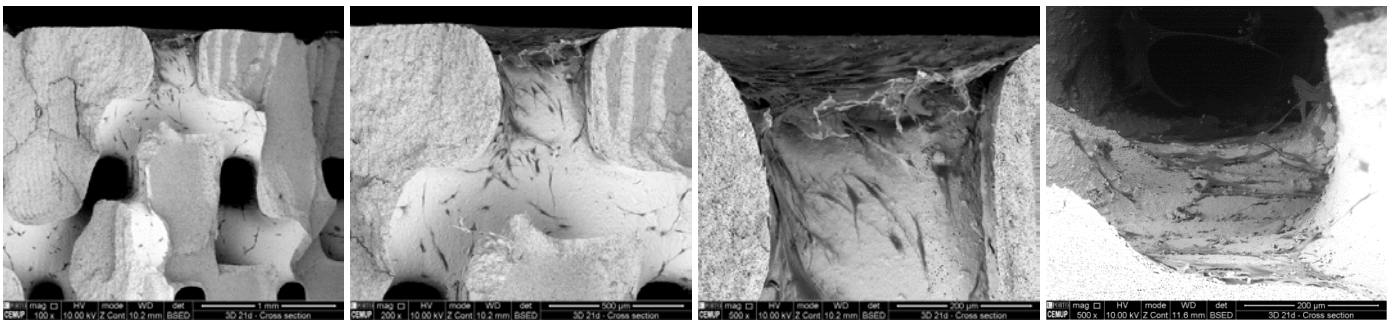
### 3D - Micrographies - 21<sup>e</sup> jour



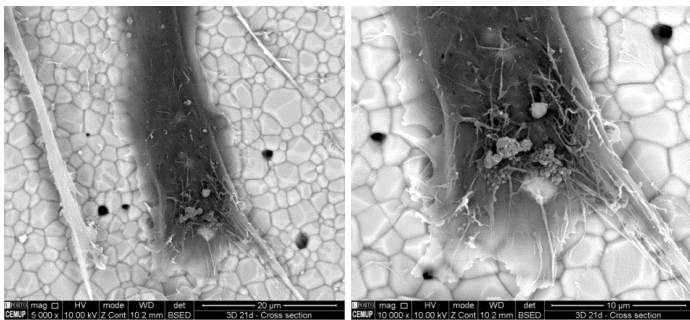
Prolifération en surface



Minéralisation en surface

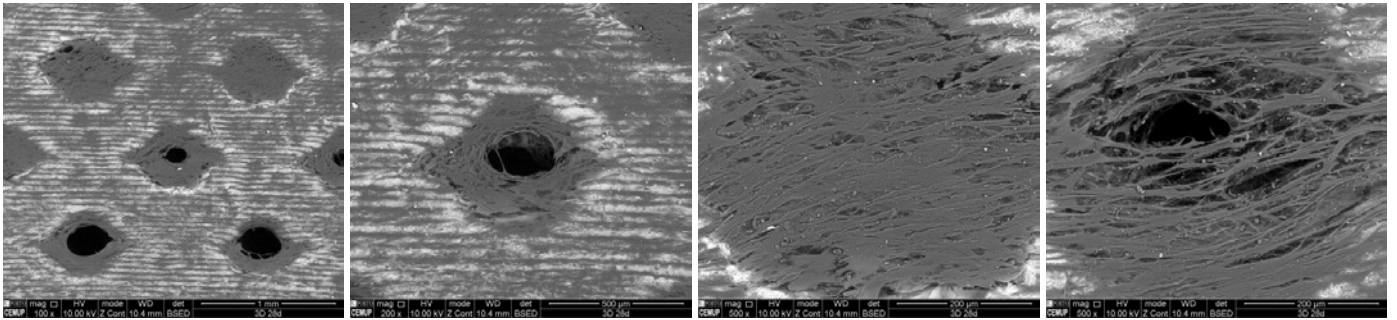


Prolifération à l'intérieur de la structure

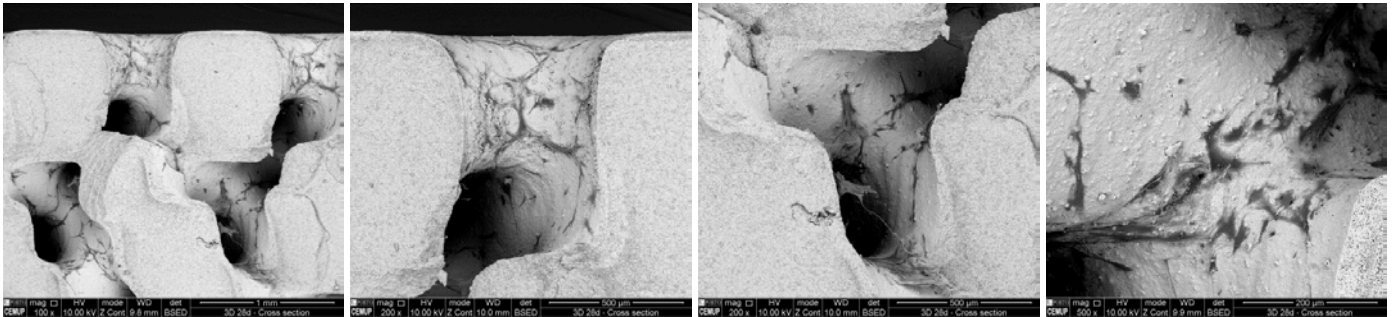


Minéralisation à l'intérieur de la structure

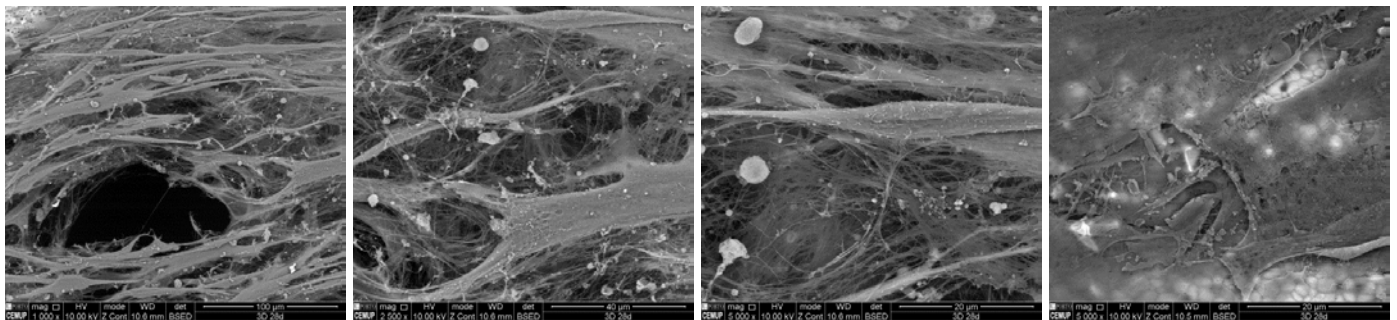
### 3D - Micrographies - 28<sup>e</sup> jour



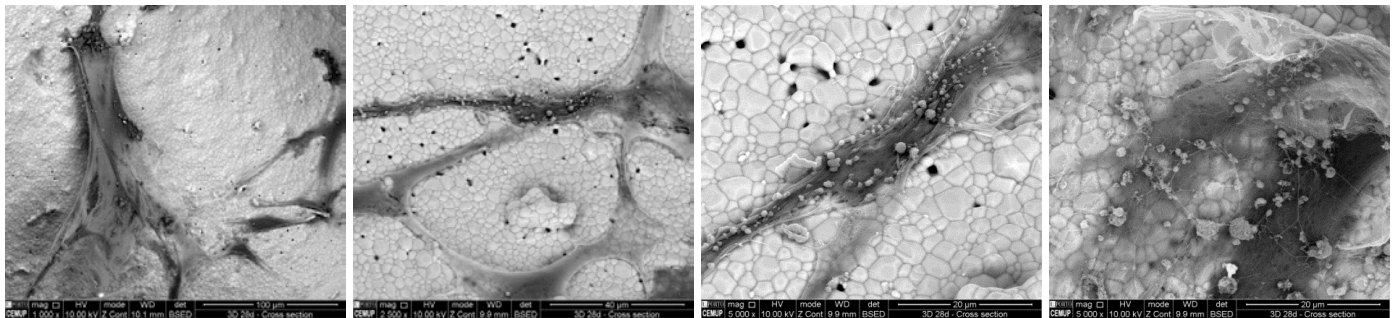
Prolifération en surface



Prolifération à l'intérieur de la structure

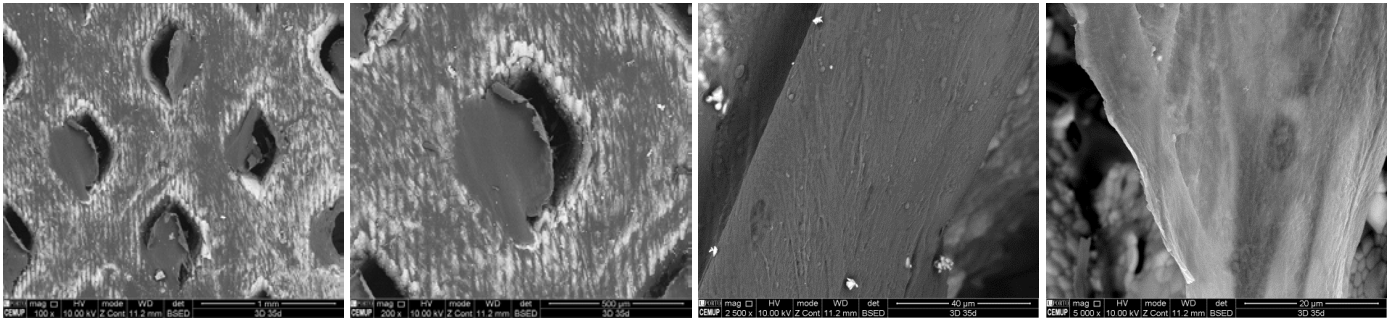


Minéralisation en surface (à l'intérieur des pores et sur le matériau)

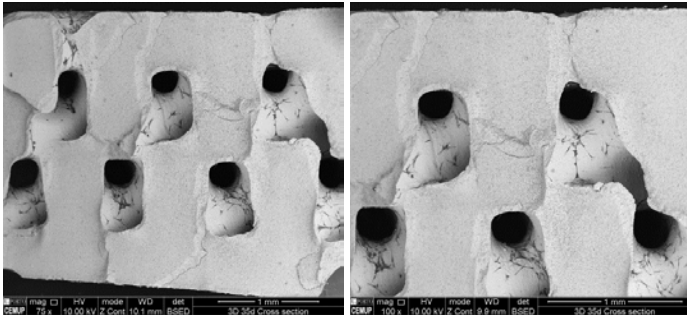


Minéralisation à l'intérieur de la structure

### 3D - Micrographies - 35<sup>e</sup> jour

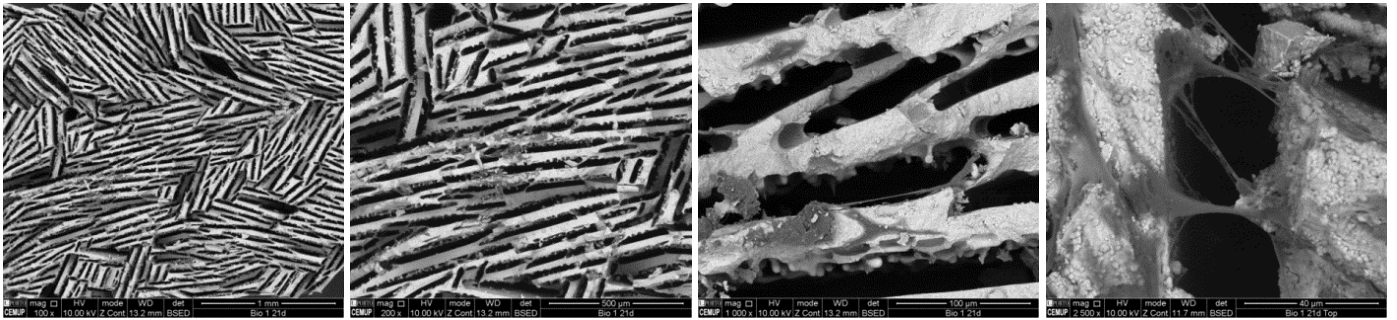


Prolifération en surface

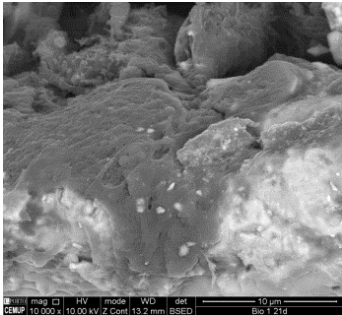


Prolifération à l'intérieur de la structure

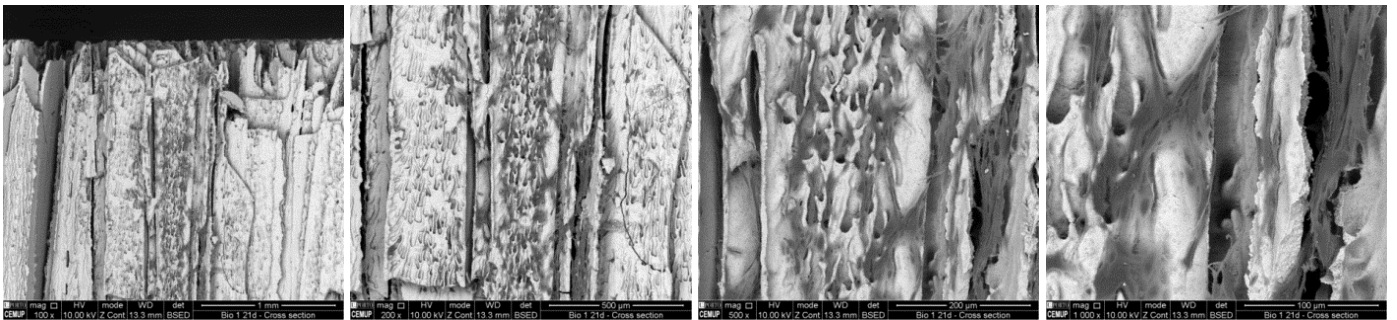
# CO1 - Micrographies - 21<sup>e</sup> jour



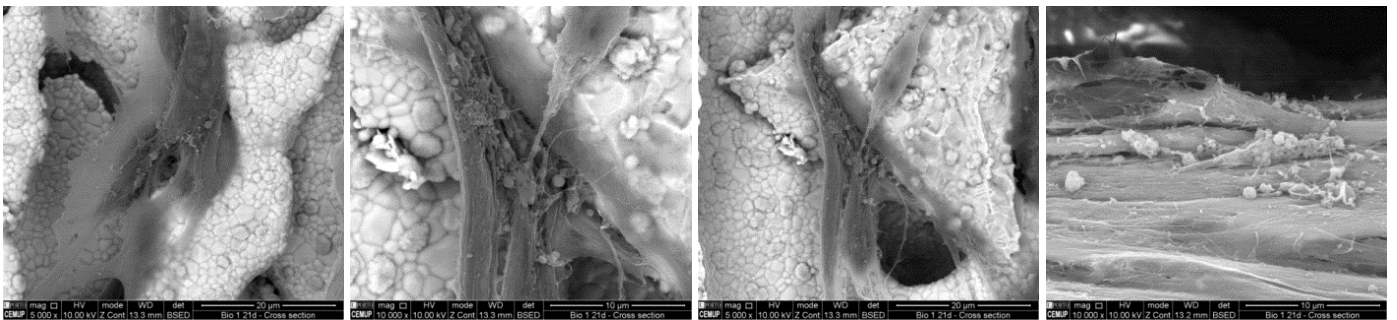
Prolifération en surface



Minéralisation en surface

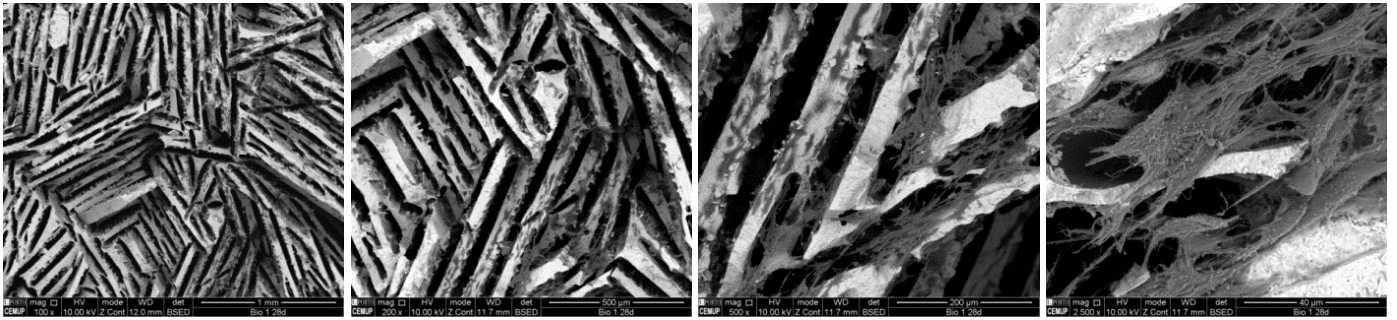


Prolifération à l'intérieur de la structure

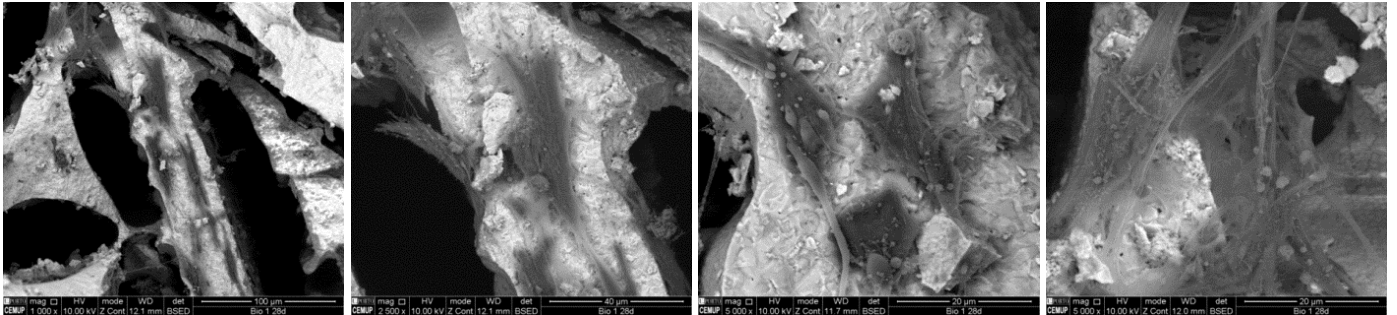


Minéralisation à l'intérieur de la structure

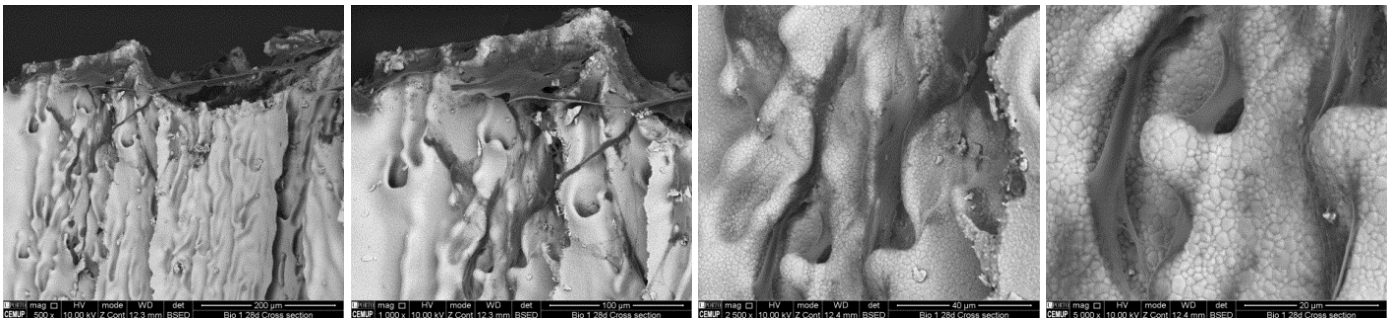
## CO1 - Micrographies - 28<sup>e</sup> jour



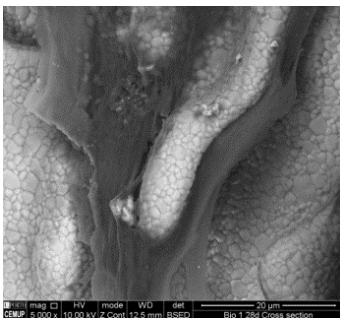
Prolifération en surface



Minéralisation en surface

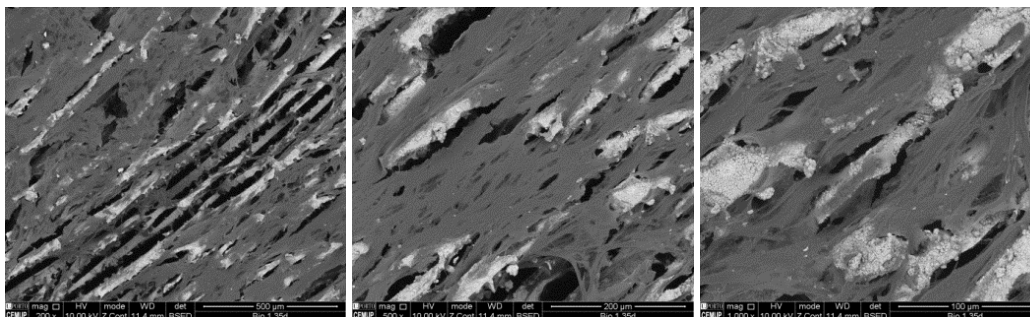


Prolifération à l'intérieur de la structure

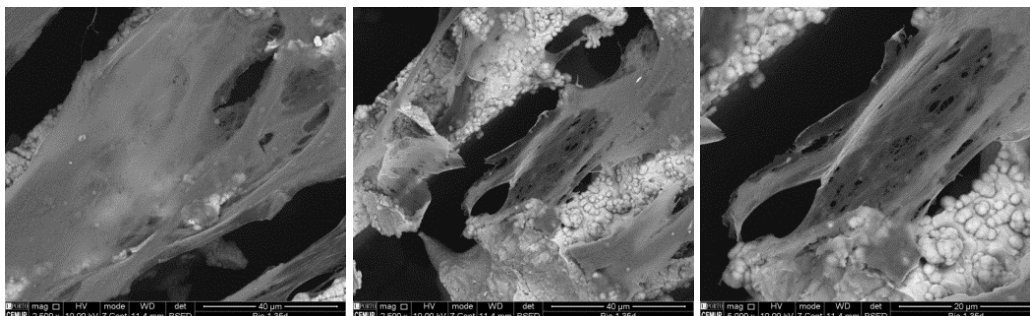


Minéralisation à l'intérieur de la structure

## CO1 - Micrographies - 35<sup>e</sup> jour

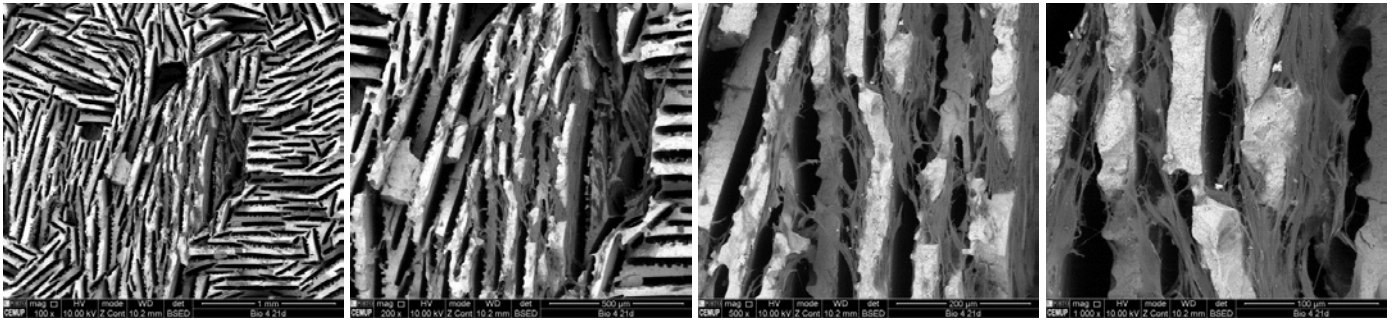


Prolifération en surface

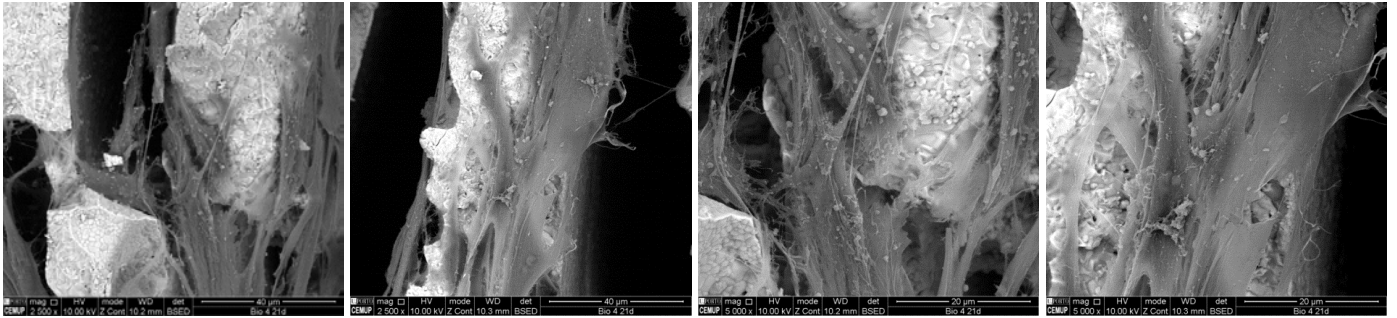


Minéralisation en surface

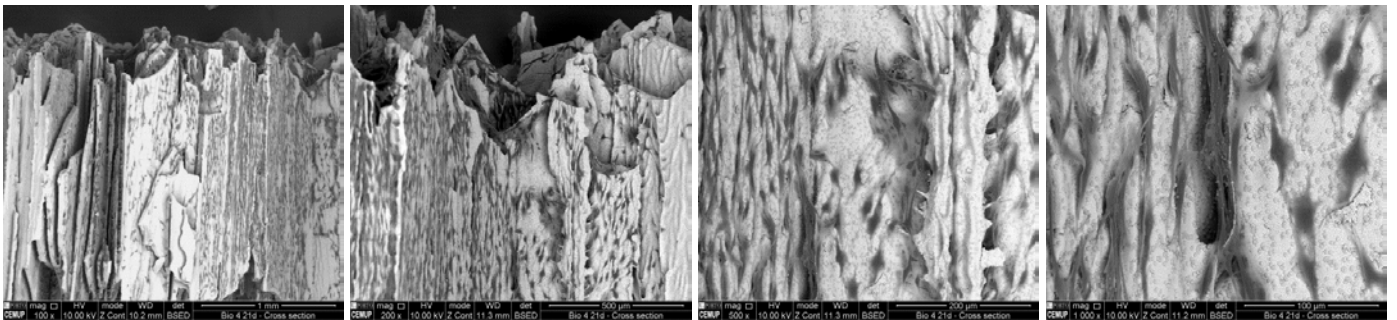
# CO4 - Micrographies - 21<sup>e</sup> jour



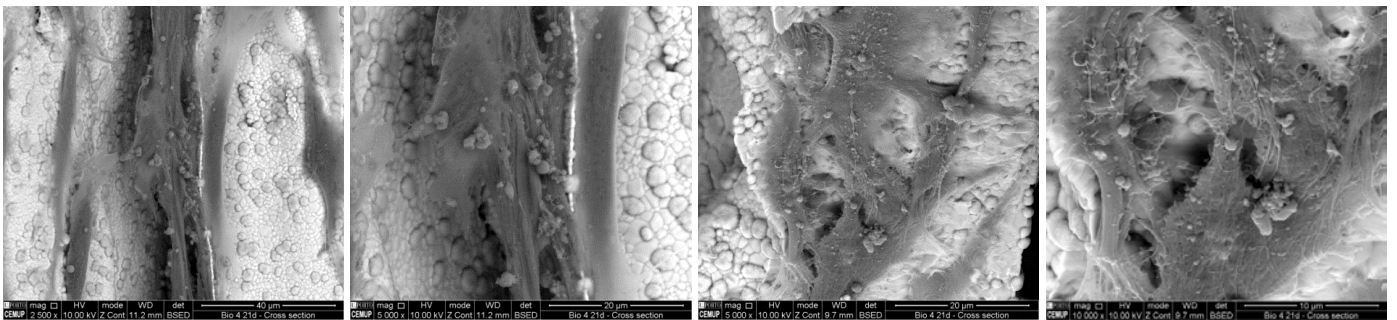
Prolifération en surface



Minéralisation en surface

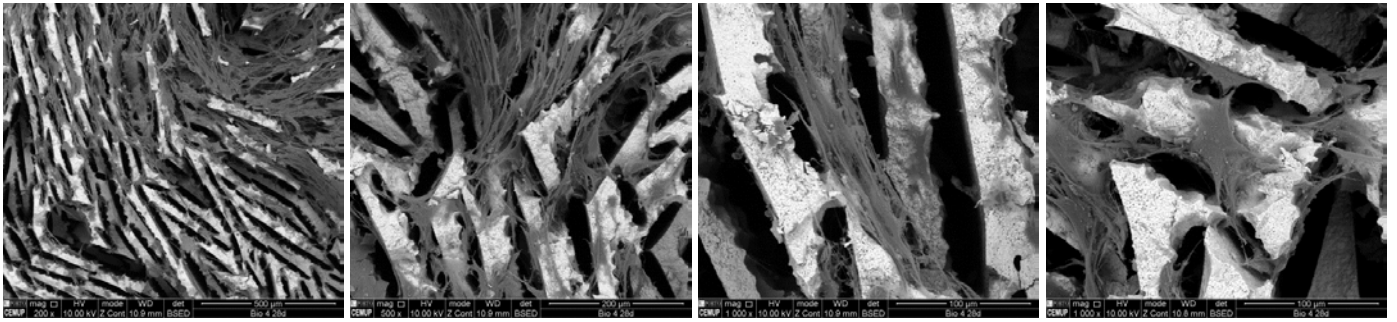


Prolifération à l'intérieur de la structure

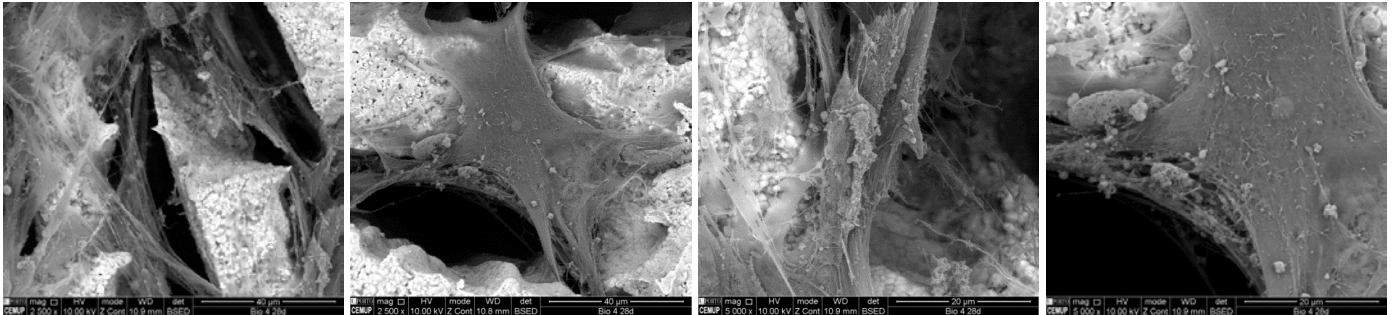


Minéralisation à l'intérieur de la structure

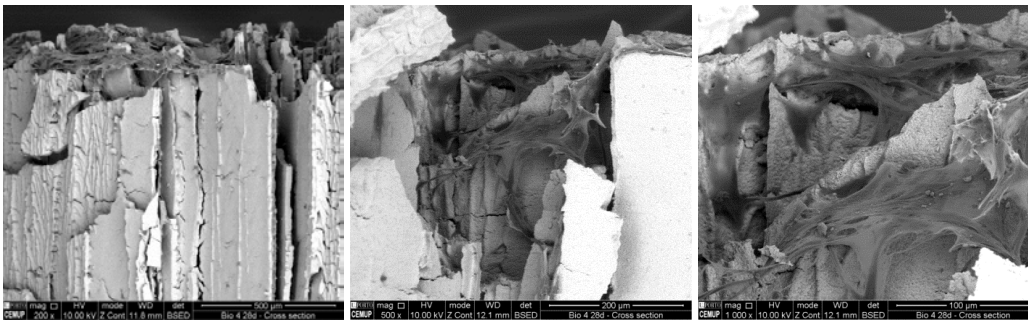
## CO4 - Micrographies - 28<sup>e</sup> jour



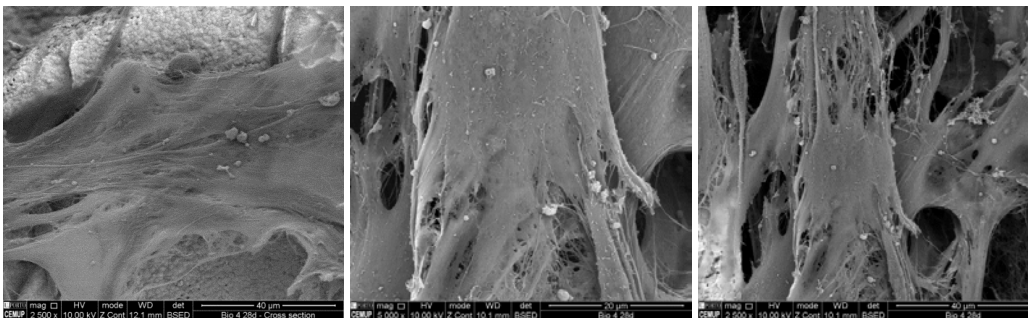
Prolifération en surface



Minéralisation en surface



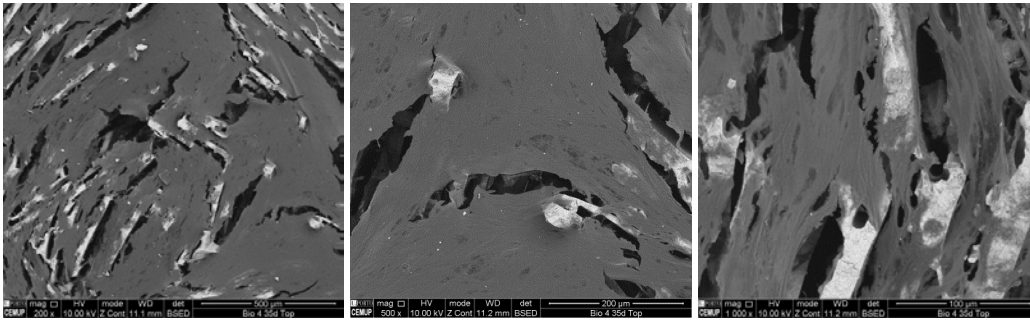
Prolifération à l'intérieur de la structure



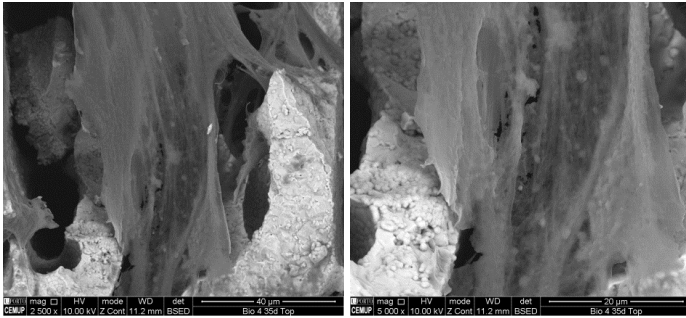
Minéralisation à l'intérieur de la structure



## CO4 - Micrographies - 35<sup>e</sup> jour

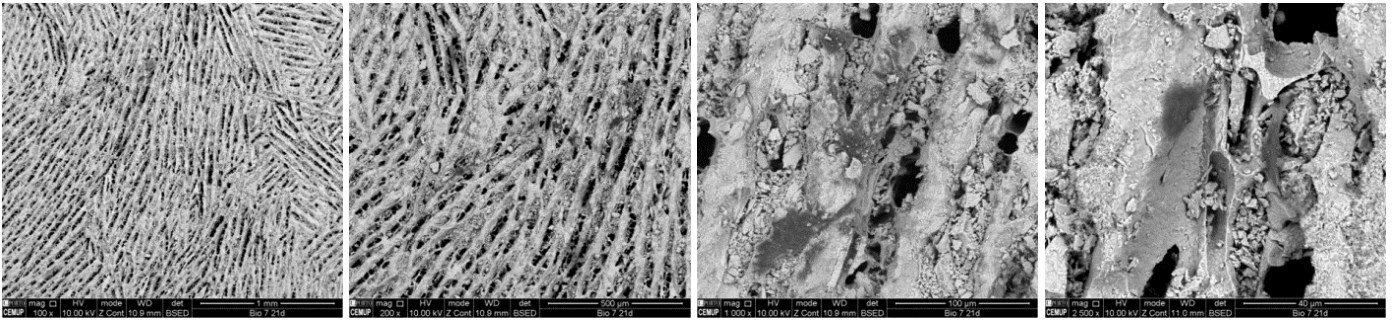


Prolifération en surface

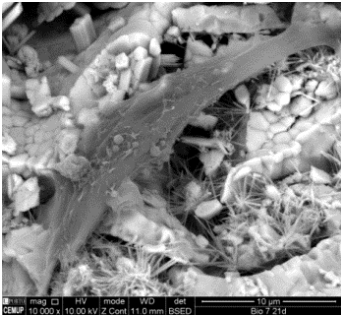


Minéralisation en surface

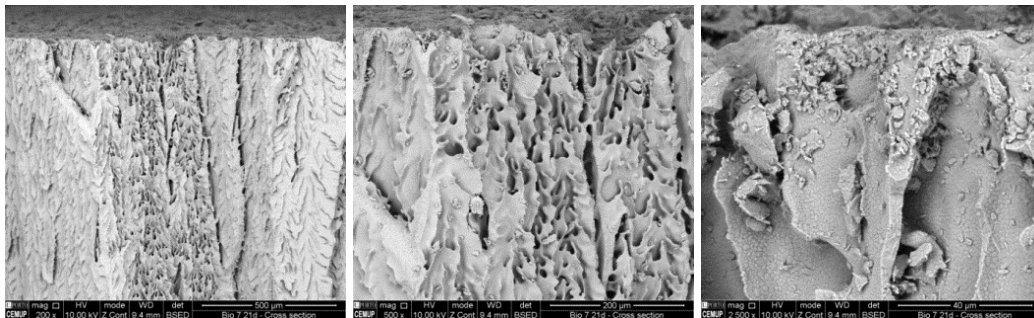
## CO7 – Micrographies – 21<sup>e</sup> jour



Abondance de débris avec peu de cellules

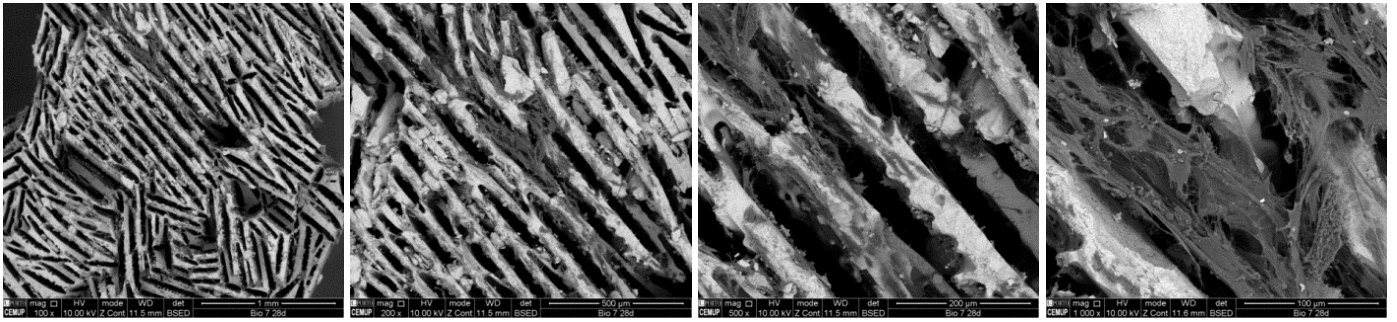


Minéralisation en surface et présence de structure en épine

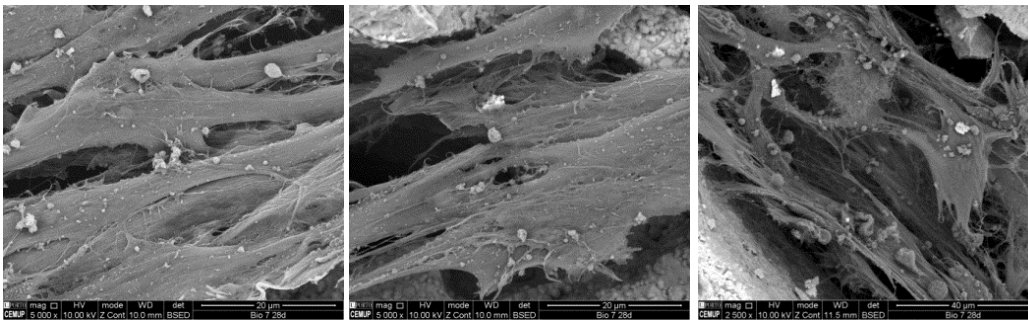


Pas de prolifération cellulaire visible à l'intérieur de la structure

## CO7 - Micrographies - 28<sup>e</sup> jour

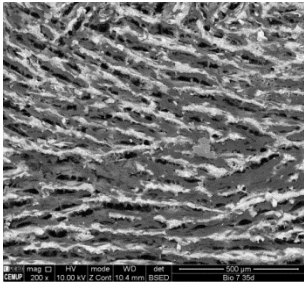


Prolifération en surface

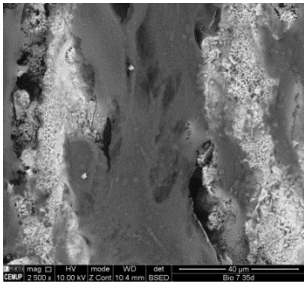
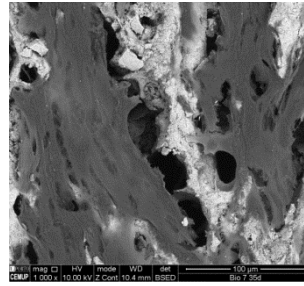
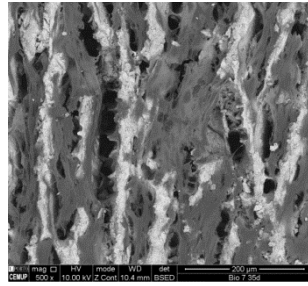


Minéralisation en surface

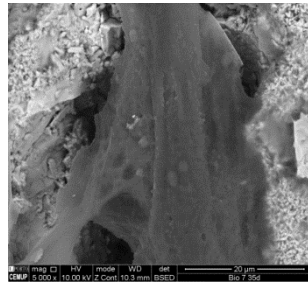
## C07 - Micrographies - 35<sup>e</sup> jour



Prolifération en surface



Minéralisation en surface



## 6. Liste des communications et publication

1. COST Action – 13 au 14 octobre 2015 – Sofia, Bulgarie:

S. Chamary, E. Meurice, D. Hautcoeur, J-C. Hornez, F. Bouchart, A. Leriche, M-H. Fernandes, F. Monteiro. *Impact of macroporous phosphate calcium architecture on cell invasion: an in vitro study of cell invasion of freeze casted samples*

2. BCerS, journée annuelle – 2015 – Mons, Belgique:

S. Chamary, E. Meurice, D. Hautcoeur, J-C. Hornez, F. Bouchart, A. Leriche, M-H. Fernandes, F. Monteiro. *Impact of macroporous structure on cell invasion and proliferation: an in vitro study of cell invasion of a freeze casted  $\beta$ -TCP sample*

3. Shaping 6 (2016) – Montpellier, France:

S. Chamary, D. Hautcoeur, J-C. Hornez, A. Leriche, F. Cambier. *Processing methods to control porosity for bioinspired ceramics*

4. PMF 2017 – Toulouse, France:

S. Chamary, E. Meurice, D. Hautcoeur, J-C. Hornez, A. Leriche, F. Bouchart, M-H. Fernandes, F. Monteiro. *Influence d'une architecture poreuse en biocéramique sur la colonisation, prolifération et activité cellulaire*

5. Biomat 2017 – Ambleteuse, France:

S. Chamary, E. Meurice, D. Hautcoeur, J-C. Hornez, A. Leriche, F. Bouchart, M-H. Fernandes, F. Monteiro. *Impact of macroporous calcium phosphate architecture on cells: an in vitro study of cell colonization and metabolic activity*

6. Bioceramics 29 (2017) – Toulouse, France:

S. Chamary, E. Meurice, D. Hautcoeur, J-C. Hornez, A. Leriche, F. Bouchart, M-H. Fernandes, F. Monteiro. *Impact of macroporous calcium phosphate architecture on cells: an in vitro study of cell colonization and metabolic activity*

7. BCerS, journée annuelle – 2017 – Mons, Belgique:

S. Chamary, E. Meurice, D. Hautcoeur, J-C. Hornez, F. Bouchart, A. Leriche, M-H. Fernandes, F. Monteiro. *Influence of a porous calcium phosphate architecture on bone cells: an in vitro study of cell proliferation and differentiation*

### **Publication:**

S. Chamary, D. Hautcoeur, J-C. Hornez, A. Leriche, F. Cambier.

### ***Bio-inspired hydroxyapatite dual core-shell structure for bone substitutes***

Reference de l'article: JECS11290

Titre du journal: Journal of the European Ceramic Society

**Institutions:**

- UVHC – LMCPA, Maubeuge, France: S. Chamary, J-C. Hornez, A. Leriche, F. Bouchart, E. Meurice
- BCRC, Mons, Belgique : D. Hautcoeur, F. Cambier
- INEB, Porto, Portugal : F. Monteiro
- Bone Lab, Faculdade de Medicina Dentara da Universidade do Porto, Porto, Portugal: M-H. Fernandes