



**HAL**  
open science

# Etude du potentiel ostéogénique de surfaces en titane mécano-bactéricides : de nouveaux implants pour la régénération osseuse

Theo Ziegelmeyer

## ► To cite this version:

Theo Ziegelmeyer. Etude du potentiel ostéogénique de surfaces en titane mécano-bactéricides : de nouveaux implants pour la régénération osseuse. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV052 . tel-04406020

**HAL Id: tel-04406020**

**<https://theses.hal.science/tel-04406020v1>**

Submitted on 19 Jan 2024

**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

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie Biologie

Unité de recherche : IAB : Epigenetics, Environment, Cell Plasticity, Cancer (UGA / Inserm U1209 / CNRS UMR 5309)

**Etude du potentiel ostéogénique de surfaces en titane mécano-bactéricides : de nouveaux implants pour la régénération osseuse**

**Investigating the osteogenic potential of mechanobactericidal titanium surfaces: new implants for bone regeneration**

Présentée par :

**Theo ZIEGELMEYER**

Direction de thèse :

**Jean-luc COLL**

INSERM

Directeur de thèse

**Véronique FRACHET**

École Pratique des Hautes Études

Co-directeur de thèse

Rapporteurs :

**Halima KERDJOUDJ**

PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université de Reims - Champagne Ardenne

**Sylvain CATROS**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, Université de Bordeaux

Thèse soutenue publiquement le **5 octobre 2023**, devant le jury composé de :

**Emmanuelle PLANUS**

PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Présidente

**Halima KERDJOUDJ**

PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université de Reims - Champagne Ardenne

Rapporteuse

**Sylvain CATROS**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, Université de Bordeaux

Rapporteur

**Jean-Daniel MALCOR**

CHARGE DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône Auvergne

Examineur

**Jean-Luc COLL**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM délégation Auvergne-Rhône-Alpes

Directeur de thèse

**Véronique FRACHET**

MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, EPHE

Co-directrice de thèse







## Remerciements

Je tiens à exprimer tous mes remerciements à l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ces travaux de recherche. Mme la présidente Emmanuelle Planus, les rapporteurs Halima Kerdjoudj et Sylvain Catros ainsi que Jean-Daniel Malcor, je suis fier de vous présenter ma thèse et je vous remercie de votre participation à l'évaluation de ce travail.

Ces trois années de thèse ont été très enrichissantes, et j'ai pu y découvrir un domaine multidisciplinaire passionnant, grâce à la thématique de recherche, mais également grâce à la diversité des profils que j'ai côtoyés. Ce travail ne peut ainsi s'achever sans remercier les différentes personnes ayant contribué de près ou de loin à son accomplissement. Je tiens tout particulièrement à remercier mon équipe de recherche. Je n'aurais pas pu espérer évoluer dans un meilleur cadre de travail que celui trouvé parmi vous.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon directeur de thèse Jean-Luc Coll pour m'avoir fait confiance et permis d'entreprendre ce projet de thèse. Je tiens également à remercier sincèrement ma codirectrice de thèse, Véronique Frachet. Je te remercie du soutien que tu m'as accordé tout au long de ma thèse, d'avoir eu la patience de me former, de m'encourager et de me conseiller jusqu'à la fin de la rédaction de ce manuscrit que tu as lu (et corrigé) méticuleusement.

Un grand merci à nos collaborateurs Elena Ivanova et Denver Linklater pour leur enthousiasme et leur confiance sur ce projet, qui n'aurait pas pu avoir lieu sans eux. Votre réactivité et vos idées ont été une aide précieuse. Merci également à Georges, Rodolphe, Véronique et Julien pour m'avoir permis d'effectuer l'expérience qui à mes yeux est la plus importante de ma thèse. L'expérience *in vivo* s'est parfaitement bien déroulée, grâce à votre aide et votre soutien. Je remercie également Max, Julien, Olivier, Alexandra et Arlette pour leurs bonnes humeurs qui ont rendu les contourings de scans presque agréables.

J'avais beaucoup à apprendre expérimentalement, merci à Laetitia, Sule, Pierre et Fabien pour vos conseils et votre patience. Merci Camila et Pierre pour m'avoir partagé votre amour du Western Blot que je ne suis pas sûr de partager. Merci également Quentin de m'avoir accompagné quelques semaines sur mon projet et à Tristan pour ton enthousiasme et plus généralement pour l'intérêt que tu as montré pour mon projet pendant ces trois ans.

Merci pour l'entraide et le soutien. Pierre, Sean, Camila, Mohammed, Mohammed, Veronica, Ghadir, j'ai pris énormément de plaisir à partager ces trois années avec vous. Mon expérience n'aurait pas été la même sans vous. Je vous remercie du fond du cœur pour votre aide, mais aussi pour la bonne ambiance au quotidien !

Je tiens également à remercier les personnes ayant participé à l'évaluation de ce projet, et notamment les membres de mon CSI d'avoir consacré du temps et de l'intérêt à ce projet et du soutien et l'aide dont ils m'ont fait part.

Pour conclure, merci à toutes les personnes qui m'accompagnent depuis tant d'années et qui font la personne que je suis. Merci à mes parents et Julie pour leur soutien et leur amour. Merci Mimi, je n'aurais pas réussi cette thèse sans ton soutien, merci d'être à mes côtés depuis tout ce temps. Je vais sûrement oublier du monde, mais

---

merci Titou, Rwanou, Simon, Jules, Emma, Etienne, Cyril, toute la team du 8<sup>ème</sup>, CMB et Montaud. Être en votre compagnie est une source intarissable de soleil et de bonne humeur !

Je tenais encore une fois à remercier tous les acteurs de ce projet qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse. Ces trois années ont été très enrichissantes professionnellement et personnellement. Cela a été un réel bonheur de les vivre à vos côtés.



---

# Table des matières

<b>Liste des figures</b>	<b>1</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>5</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>6</b>
<b>Contexte du travail</b>	<b>8</b>
<b>Chapitre I : Etat de l'art</b>	<b>10</b>
<b>I. Le tissu osseux, un tissu dynamique (physiologie osseuse)</b>	<b>12</b>
<b>1. STRUCTURE ET COMPOSITION</b>	<b>12</b>
1.1. LES STRUCTURES DE L'OS	12
1.2 LA COMPOSITION DU TISSU OSSEUX	14
<b>2. CREATION ET MAINTIEN DE LA FONCTION OSSEUSE</b>	<b>17</b>
2.1 REMODELAGE	17
2.2 MODELAGE	18
2.3 OSSIFICATION	18
<b>II. Réparer l'os : mécanismes physiologiques</b>	<b>21</b>
<b>1. CICATRISATION OSSEUSE : REPOSE DU TISSU EN CAS DE LESION</b>	<b>21</b>
1.1 LES PHASES DE LA CICATRISATION	21
1.2 COMMUNICATION CELLULAIRE	23
1.3 FACTEURS MECANIQUES ET MECANOTRANSDUCTION	26
<b>III. Réparer l'os : stratégies thérapeutiques</b>	<b>30</b>
<b>1. UN BESOIN THERAPEUTIQUE</b>	<b>30</b>
<b>2. LA GREFFE OSSEUSE</b>	<b>32</b>
<b>3. BIOMATERIAUX POUR L'OS : LES PROPRIETES SOUHAITEES</b>	<b>32</b>
3.1. BIOCOMPATIBILITE	33
3.2. OSTEOCONDUCTION	34
3.3. PROPRIETES MECANIQUES	36
3.4. OSTEOINDUCTION	38
<b>4. LES BIOMATERIAUX EN DEVELOPPEMENT POUR REGENERER L'OS</b>	<b>39</b>
4.1. LES SUBSTITUTS OSSEUX	39
4.2. PERSPECTIVES : L'INGENIERIE TISSULAIRE	42
<b>IV. De bio inerte à bioactif : améliorer les propriétés ostéogéniques du titane</b>	<b>44</b>
<b>1. L'UTILISATION DU TITANE EN CHIRURGIE DE L'OS</b>	<b>44</b>
1.1 LE TITANE	44
1.2 APPLICATIONS : QUELQUES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	45
1.3. PERSPECTIVES D'AMELIORATIONS DES BIOMATERIAUX	46
<b>2. METHODES DE CREATION DE TOPOGRAPHIES DE SURFACE</b>	<b>47</b>
<b>3. LES TOPOGRAPHIES DE SURFACE REGULENT LE COMPORTEMENT DES CSM</b>	<b>49</b>
3.1 REPONSES MOLECULAIRE AUX TOPOGRAPHIES DE SURFACE	49
3.2 REPONSES CELLULAIRES AUX MODIFICATIONS TOPOGRAPHIQUES	51
4. MODIFICATIONS DE SURFACE D'IMPLANTS EN TITANE	58
<b>4. DES PERSPECTIVES DE SYNERGIES POUR AMELIORER L'OSTEOINTEGRATION</b>	<b>59</b>
4.1 COAGULAT	59
4.2 OSTEOIMMUNOMODULATION	60
4.3 ANGIOGENESE	63
<b>V. De bioinerte à bioactif : prévenir l'apparition d'infections</b>	<b>64</b>
<b>1. LES INFECTIONS D'IMPLANTS</b>	<b>64</b>
<b>2. METHODE CHIMIQUE : REVETEMENT</b>	<b>66</b>

---

<b>3. METHODES PHYSIQUES : TOPOGRAPHIES DE SURFACE</b>	<b>67</b>
3.1 BIOMIMETISME	67
3.2 ADHERENCE BACTERIENNE	69
3.3 EFFET BACTERICIDE	70
<b>Combiner les effets, objectifs de thèse</b>	<b>74</b>
<b>1. SURFACES MECANOBACTERICIDES POUR DES APPLICATIONS DE RECONSTRUCTION OSSEUSE</b>	<b>74</b>
<b>2. OBJECTIFS</b>	<b>77</b>
<b>Chapitre II : Matériels et Méthodes</b>	<b>78</b>
<b>I. Surfaces en titane nanostructurées</b>	<b>80</b>
<b>1. PRODUCTION DES SURFACES NANOSTRUCTUREES</b>	<b>80</b>
1.1. SURFACES POLIES	80
1.2. GRAVURE PLASMA	80
1.3. GRAVURE HYDROTHERMALE	81
<b>2. CONDITIONS EXPERIMENTALES</b>	<b>82</b>
<b>II. Modélisation de l'interaction initiale</b>	<b>83</b>
<b>1. MESURE DE L'ADSORPTION PROTEIQUE DES SURFACES EN TITANE</b>	<b>83</b>
1.1. ALBUMINE DE SERUM BOVIN (BSA)	83
1.2. FIBRONECTINE	83
<b>2. INTERACTION AVEC LE SANG</b>	<b>83</b>
2.1. PRELEVEMENT SANGUIN	83
2.2. HEMOLYSE	84
2.3. COAGULATION	84
<b>III. Modélisation <i>in vitro</i> du potentiel ostéogénique</b>	<b>85</b>
<b>1. CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES (CSM)</b>	<b>85</b>
1.1. CULTURE CELLULAIRE	85
1.2. DIFFERENCIATION OSTEOGENIQUE	85
1.3. ANALYSE DE LA SIGNALISATION DEPENDANTE DE ROCK	85
1.4. ANALYSE DE LA SIGNALISATION DEPENDANTE DE FAK	85
1.5. CONTROLES DES MARQUEURS DE SURFACES PAR CYTOMETRIE EN FLUX	86
<b>2. MECANOTRANSDUCTION ET MARQUEURS PRECOCS DE L'OSTEOGENESE</b>	<b>86</b>
2.1. IMMUNOFLUORESCENCE	86
2.2. WESTERN BLOT	87
2.3. <i>IN CELL</i> ELISA	87
<b>3. SUIVI DE LA DIFFERENCIATION EN OSTEOBLASTES</b>	<b>88</b>
3.1. ACTIVITE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE	88
3.2. QUANTIFICATION DES ARN PAR RT-QPCR	88
3.3. ANALYSE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	88
3.4. ANALYSE DE LA MINERALISATION	89
<b>IV. Propriétés angiogéniques</b>	<b>90</b>
<b>1. CELLULES ENDOTHELIALES</b>	<b>90</b>
<b>2. MILIEUX CONDITIONNES DE CSM (mCCSM)</b>	<b>90</b>
2.1. COLLECTE DES MCCSM	90
2.2. SECRETION DE VEGF	90
2.3. VIABILITE CELLULAIRE	91
<b>3. REPONSE CELLULAIRE DES HUVEC AUX MCCSM</b>	<b>91</b>
3.1. MIGRATION EN TRANSWELL	91
3.2. TEST DE MIGRATION (WOUND HEALING ASSAY)	92
3.3. TEST D'ANGIOGENESE <i>IN VITRO</i> (FORMATION DE CAPILLAIRES EN MATRIGEL)	92
<b>V. Modèle <i>in vivo</i> : Déficit crânien de taille critique chez le rat</b>	<b>94</b>

---

<b>1. PROCEDURE CHIRURGICALE</b>	<b>94</b>
1.1. PREPARATION PREOPERATOIRE	94
1.2. CHIRURGIE	95
1.3. SOINS ET SUIVIS POST-OPERATOIRES	96
<b>2. SCAN PAR MICRO TOMOGRAPHIE</b>	<b>96</b>
2.1. PROTOCOLE D'ÉVALUATION DE L'OSSIFICATION PERI-IMPLANT	96
<b>3. ANALYSE VISUELLE</b>	<b>97</b>
<b>4. HISTOLOGIE</b>	<b>97</b>
<b>ANALYSE STATISTIQUE</b>	<b>98</b>
<b>Chapitre III : Résultats</b>	<b>99</b>
<b>I. Modélisation des interactions initiales</b>	<b>101</b>
1. CARACTERISATION DE LA DEPENDANCE DE L'ADSORPTION PROTEIQUE A LA TOPOGRAPHIE DE SURFACE	101
2. EVALUATION DU CONTACT DES IMPLANT NANOSTRUCTURES AVEC LE SANG	103
<b>I. Modélisation <i>in vitro</i> du potentiel ostéogénique</b>	<b>106</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>106</b>
1.1. LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES (CSM)	106
1.2. LES MARQUEURS DE SUIVI	107
1.3. ETABLISSEMENT DU MODELE D'ÉTUDE DE L'OSTEOGENESE DE CSM ISOLEES DE TISSU ADIPEUX.	107
<b>2. INITIATION DE LA MECANOTRANSDUCTION ET MARQUEURS PRECOCS DE LA DIFFERENCIATION</b>	<b>111</b>
2.1. MODULATIONS MORPHOLOGIQUES ASSOCIEES A LA PRESENCE DE NANOSTRUCTURES	111
2.2. TRANSDUCTION DU MESSAGE MECANIQUE ET REPONSE CELLULAIRE DES CSM AUX TOPOGRAPHIES DE SURFACE	114
<b>3. SUIVI DE LA DIFFERENCIATION OSTEOBLASTIQUE DE CSM SUITE A UNE OSTEOINDUCTION MECANIQUE</b>	<b>119</b>
3.1. MODULATION DE LA CINETIQUE D'ACTIVITE DE L'ALCALINE PHOSPHATASE PAR LES SURFACES EN TITANE NANOSTRUCTUREES	119
3.2. SECRETION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE : LE COLLAGENE 1	121
3.3. SECRETION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE : L'OSTEOPONTINE	122
3.4. MINERALISATION DE LA MATRICE : QUANTIFICATION DES DEPOTS CALCIQUES	123
<b>II. Angiogenèse</b>	<b>125</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>125</b>
1.1. IMPACT DE LA PRESENCE DE NANOSTRUCTURES SUR LA CAPACITE DE SECRETION DE VEGF PAR LES CSM	125
<b>2. EVALUATION DES REPONSES CELLULAIRES D'HUVEC AUX MILIEUX CONDITIONNES ISSUS DE CSM</b>	<b>126</b>
2.1. PROLIFERATION DES HUVEC SUITE A LEUR CULTURE EN MCCSM	126
2.2. CARACTERISATION DE LA MIGRATION D'HUVEC EN PRESENCE DE CSM : CO-CULTURES EN TRANSWELL	127
2.3. CARACTERISATION DE LA MIGRATION D'HUVEC EN MCCSM : TEST DE CICATRISATION	128
2.4. EVALUATION DE LA MORPHOGENESE DES HUVEC EN MATRIGEL	130
<b>III. Modélisation <i>in vivo</i> de l'ostéogénèse induite par des implants nanostructurés</b>	<b>132</b>
<b>1. DEFAT CRANIEN DE TAILLE CRITIQUE CHEZ LE RAT</b>	<b>133</b>
1.1. PRESENTATION DU MODELE	133
1.2. MODALITE DE SUIVI EXPERIMENTAL	134
<b>2. CINETIQUE D'OSSIFICATION EN FONCTION DE LA TOPOGRAPHIE A LA SURFACE DE L'IMPLANT EN TITANE</b>	<b>135</b>
<b>3. EVALUATION VISUELLE</b>	<b>137</b>
3.1. DESCRIPTION DU SCORE	137
3.2. SCORE DE QUANTITE OSSEUSE	138
3.3. CONTACT OS-IMPLANT	139
<b>4. ANALYSE HISTOLOGIQUE</b>	<b>140</b>
<b>Chapitre IV : Discussion</b>	<b>143</b>
<b>1. EFFET DE LA NANOTOPOGRAPHIE DE SURFACE SUR LES PHASES PRECOCS DE LA REGENERATION OSSEUSE</b>	<b>145</b>
1.1. CAPACITE DE LA TOPOGRAPHIE DE SURFACE A MODULER L'ADSORPTION PROTEIQUE	146
1.2. LA TOPOGRAPHIE COMME FACTEUR THROMBOGENIQUE	147

---

1.3. L'ADHERENCE DES CSM SUR LES TOPOGRAPHIES 2T ET HTE	148
<b>2. MECANOTRANSDUCTION ET OSTEOINDUCTION</b>	<b>149</b>
2.1. LA TRANSDUCTION DU MESSAGE INDUIT PAR LES TOPOGRAPHIES 2T ET HTE	149
2.2. INITIATION DE L'OSTEOINDUCTION	151
2.3. LA PHASE DE MINERALISATION	152
<b>3. AMELIORATION DES MODELES <i>IN VITRO</i> : VERS UNE MEILLEURE PRISE EN COMPTE DES COMMUNICATIONS INTERCELLULAIRES</b>	<b>154</b>
4. EVALUATION DE L'OSTEOINTEGRATION D'IMPLANTS EN TITANE NANOSTRUCTURES	156
5. PERSPECTIVES	160
<b>Conclusion</b>	<b>163</b>
<b>Annexes</b>	<b>165</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>182</b>

---

## Liste des figures

Figure 1 : Illustration de l'organisation anatomique de l'os cortical.....	13
Figure 2 : Illustration hiérarchique des différentes structures osseuses.....	14
Figure 3 : Illustration de l'action de résorption d'un ostéoclaste.....	16
Figure 4 : Ostéocytes et leurs canalicules observés par microscopie électronique à balayage (MEB).....	16
Figure 5 : Illustration du processus de remodelage osseux.....	17
Figure 6 : Schématisation du processus d'ossification intramembranaire (source <sup>31</sup> ).....	19
Figure 7 : Schématisation du processus d'ossification endochondrale (source <sup>31</sup> ).....	20
Figure 8 : Illustration de différents types de fractures.....	21
Figure 9 : Processus typique de réponse face à une lésion du tissu osseux.....	22
Figure 10 : Exemple de signalisation par différents facteurs de croissance sur les CSM, ostéoblastes et cellules endothéliales lors de la réparation osseuse.....	25
Figure 11 : Illustration de l'intégration de signaux mécaniques par les cellules.....	27
Figure 12 : Représentation schématique des voies de signalisation mises en jeu dans les CSM et les cellules endothéliales en réponse à une contrainte de tension.....	29
Figure 13 : Exemple de radiographies présentant trois défauts osseux.....	31
Figure 14 : Microscopie électronique à balayage montrant la morphologie de particules de $\beta$ -TCP ainsi que des exemples d'échafaudages de $\beta$ -TCP.....	34
Figure 15 : Images histologiques de l'interface os-implant poreux.....	35
Figure 16 : Exemple d'implants avec des compositions et porosités variées.....	36
Figure 17 : Représentation schématique de la différenciation ostéoblastique.....	38
Figure 18 : Images histologiques du contact os-implant.....	39
Figure 19 : Les différentes formes de substituts osseux commercialisés actuellement.....	39
Figure 20 : Propriétés de la greffe osseuse dans la réparation de défauts osseux.....	40
Figure 21 : Résumé des propriétés souhaités pour un substitut osseux (source <sup>164</sup> ).....	42
Figure 22 : Illustration d'une approche d'ingénierie tissulaire basé sur la description d'un composite ostéogénique pour la reconstruction d'un défaut crâniofacial (source <sup>186</sup> ).....	43
Figure 23 : Illustration d'une prothèse totale de hanche.....	45
Figure 24: Illustration de la conception d'un implant en prévision d'une cranioplastie.....	46
Figure 25 : Exemple de méthodes induisant des structure micro ou nanométriques à la surface de titane et ayant montré une amélioration du potentiel ostéogénique sur des lignées de CSM ou d'ostéoblastes (sauf A).....	49
Figure 26 : Illustration du paramètre d'hydrophilie avec la méthode d'angle de contact de l'eau.....	50
Figure 27: Exemples de nanostructures et leur possible effet ostéoinducteur.....	53

Figure 28 : Lien entre paramètres topographiques, rigidité et potentiel ostéoinducteur.....	54
Figure 29 : Phénomènes impliqués dans la mécanotransduction en réponse à différentes tailles de topographies de surface.....	55
Figure 30 : Impact des propriétés physicochimiques des biomatériaux dans leur capacités ostéoimmunomodulatrices.....	60
Figure 31 : Illustration de l'effet synergique pro-ostéointégration d'une nanotopographie du titane sur les CSM et macrophages.....	62
Figure 32 : Etapes de la formation de biofilms par les Staphylocoques.....	65
Figure 33 : Schématisation des deux approches majeures dans la conception de surfaces innovantes pour lutter contre les infections bactériennes péri-implants.....	66
Figure 34 : Images par MEB de surfaces naturelles et équivalents biomimétiques.....	68
Figure 35 : Illustration de l'adhérence d'une cellule bactérienne à une surface lisse ou nanostructurée.....	69
Figure 36 : Illustration des propriétés bactéricides de nanopics.....	71
Figure 37 : Comparaison de la structure et composition des bactéries gram positives et gram négatives.....	72
Figure 38 : Caractérisation de surfaces de titane polies et nanostructurées développées par E. Ivanova.....	75
Figure 39 : Démonstration par microscopie de l'efficacité bactéricide de nanostructures à la surface de titane.....	76
Figure 40 : Les nanostructures de titane soutiennent la différenciation ostéogénique de CSM <sup>301</sup> .....	76
Figure 41 : Illustration d'une chambre de gravure plasma.....	80
Figure 42 : Illustration de la procédure de gravure hydrothermale.....	81
Figure 43 : Photographie des trois surfaces en titane étudiées.....	82
Figure 44: Schéma du protocole d'analyse de l'hémolyse induite par les surfaces en titane.....	84
Figure 45: Récapitulatif du protocole d'étude du potentiel coagulant.....	84
Figure 46 : Analyse du potentiel migrateur de cellules Huvec stimulées par des CSM cultivées sur surfaces en titane.....	91
Figure 47 : Etude du potentiel de cellules Huvec à migrer au sein d'une blessure induite.....	92
Figure 48 : Analyse de l'angiogenèse <i>in vitro</i> .....	93
Figure 49 : Planification de l'expérience <i>in vivo</i> .....	94
Figure 50: Images illustrant la procédure de création du défaut crânien de taille critique chez le rat.....	95
Figure 51: Protocole de quantification de données de régénération osseuse acquises par Ct scan.....	97
Figure 52 : Illustration de trois phénomènes précoces suite à l'implantation de biomatériaux.....	101
Figure 53 : Capacité d'adsorption d'albumine de sérum bovin par les différentes surfaces en titane.....	102
Figure 54 : Capacité d'adsorption de fibronectine humaine par les différentes surfaces en titane.....	103
Figure 55 : Quantification de l'hémolyse induite par nos surfaces en titane.....	104
Figure 56 : Quantification du potentiel thrombogénique des surfaces en titane.....	105
Figure 57 : Schéma des différentes voies de différenciation de CSM ayant pu être identifiées.....	106
Figure 58 : Représentation de certains des marqueurs clés de la différenciation ostéogénique.....	107

Figure 59 : Vérification des marqueurs de surfaces des CSM de trois donneurs différents.....	108
Figure 60 : Etablissement du potentiel ostéogénique de CSM isolées de trois donneurs distincts.....	109
Figure 61 : Morphologie de CSM sur surfaces Poli, 2T et HTE. ....	111
Figure 62 : Analyse morphologique de CSM cultivées sur différentes surfaces : aire des cellules. ....	112
Figure 63 : Analyse morphologique de CSM cultivées sur différentes surfaces : aspect ratio des cellules. ....	113
Figure 64 : Analyse morphologique de CSM cultivées sur différentes surfaces : Aire des noyaux relative à l'aire des cellules..	113
Figure 65 : Localisation de la protéine YAP dans des CSM cultivées 72 h sur différentes surfaces. ....	115
Figure 66 : Expression de la protéine Smad4 par les CSM après 5 jours de culture à la surface de titane. ....	116
Figure 67 : Modulation de la quantité de protéine Runx2 dans des CSM à 5 jours de culture. ....	117
Figure 68 : Modulation de l'expression de la protéine Runx2 par des CSM suite à leur culture pendant 7 jours sur différentes surfaces en titane. ....	118
Figure 69 : Modulation de l'expression de la protéine Runx2 à 7 jours avec ou sans traitement par 10µM Y27632.....	119
Figure 70 : Expression du gène codant pour l'ALP à 7 jours de culture.....	120
Figure 71 : Activité de l'alkaline phosphatase à différents temps de culture de CSM sur surfaces en titane.....	120
Figure 72 : Impact des nanotopographies de titane sur l'expression de collagène 1 de CSM après 7 jours de culture.....	121
Figure 73 : Evaluation des niveaux de sécrétion de collagène 1 par les CSM. ....	122
Figure 74 : Evaluation des niveaux de sécrétion d'ostéopontine par les CSM. ....	123
Figure 75 : Photos d'un tapis cellulaire de CSM marqué à l'Alizarin red. ....	123
Figure 76 : Evaluation de la différenciation ostéogénique par analyse des dépôts calciques.....	124
Figure 77 : Etude de la modulation de la capacité sécrétoire des CSM après culture sur nanostructures.....	126
Figure 78 : Analyse de l'effet de différents milieux conditionnés sur la prolifération des Huvec. ....	127
Figure 79 : Etude de la modulation du potentiel chimiotactique de CSM par les nanostructures de titane.....	128
Figure 80 : Analyse de la migration d'Huvec incubées avec différents mcCSM (Wound healing assay). ....	129
Figure 81 : Observation en microscopie à contraste de phase de la morphogenèse d'Huvec cultivées sur matrigel. ....	130
Figure 82 : Evaluation du potentiel angiogénique de différents mcCSM obtenus après culture des CSM sur nos supports en titane nanostructurés. ....	131
Figure 83 : Représentation schématique de modèles de défaut osseux courants ....	132
Figure 84 : Evolution du poids des rats sur les 30 premiers jours suite à la chirurgie.....	134
Figure 85 : illustration de la délimitation de la zone de scan et zone d'analyse de l'ossification. ....	135
Figure 86 : Cinétique d'ossification : volume osseux/volume total.....	136
Figure 87 : Cinétique d'ossification : Densitométrie osseuse.....	137
Figure 88 : description des scores d'évaluation de régénération osseuse.....	138

Figure 89 : <b>Evaluation visuelle de la quantité d'os nouvellement formé selon la topographie à la surface d'implant en titane.</b>	139
Figure 90 : <b>Evaluation visuelle de la quantité d'os nouvellement formé selon la topographie de surface de l'implant en titane.</b>	140
Figure 91 : <b>Coloration au tétrachrome de McNeal des coupes d'implants Poli, 2T et HTE après 12 semaines <i>in vivo</i>.</b>	141
Figure 92 : <b>Récapitulatif des principaux résultats de l'étude <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de surfaces mécanobactéricides pour la régénération osseuse.</b>	142
Figure 93 : <b>Modèle de l'internalisation nucléaire de YAP en réponse à un stimuli mécanique.</b>	150
Figure 94 : <b>Illustration des deux types d'ostéogenèse mises en jeu lors de l'ostéointégration d'un implant.</b>	157
Annexe 1 : <b>Tableau récapitulatif de l'expression de marqueurs de la différenciation des ostéoblastes.</b>	166
Annexe 2 : <b>Analyse de la rugosité des surfaces Poli, 2T et HTE<sup>301</sup>.</b>	167
Annexe 3 : <b>Caractérisation physicochimique des surfaces en titane<sup>8</sup>.</b>	168
Annexe 4 : <b>Viabilité cellulaire de CSM à 72h de culture en présence de concentration croissante de Y27632 .</b>	169
Annexe 5 : <b>Composition des tampons pour la procédure de Western blot.</b>	169
Annexe 6 : <b>Liste des amorces de RT-qPCR utilisées pour l'analyse de l'expression de gènes ostéogéniques.</b>	170
Annexe 7 : <b>Liste des anticorps utilisés.</b>	171
Annexe 8 : <b>Distribution de la protéine YAP après trois jours de culture de CSM sur différentes surfaces : Poli, 2T et HTE.</b>	172
Annexe 9 : <b>Modèles de défauts de l'os calvarial pour l'évaluation des biomatériaux.</b>	173
Annexe 10 : <b>Méthodes d'évaluation des performances de biomatériaux dans un modèle de défaut calvarial du rat.</b>	174
Annexe 11 : <b>Reconstruction 3D de scan <math>\mu</math>Ct des défauts vides à 2 semaines et 12 semaines.</b>	175
Annexe 12 : <b>Contact des plaquettes avec les surfaces en titane nanostructurées.</b>	176
Annexe 13 : <b>Aspect ratio du noyau de CSM à la surface de nanostructures de titane.</b>	176
Annexe 14 : <b>Analyse de la localisation périnucléaire de YAP.</b>	177
Annexe 15 : <b>Illustration de l'usure des nanostructures 2T.</b>	178
Annexe 16 : <b>Résumé des méthodes les plus communément utilisées pour l'étude du potentiel ostéogénique de biomatériaux pour l'os.</b>	179
Annexe 17 : <b>Exemple d'implants en titane poreux pour des applications orthopédiques.</b>	180
Annexe 18 : <b>Exemple d'implants dentaires traités pour augmenter l'ostéointégration.</b>	180

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste non exhaustive de facteurs de croissance et leurs rôles dans la régénération osseuse .....	24
Tableau 2 : Comparaison de propriétés mécaniques de biomatériaux utilisés comme implants osseux. ....	37
Tableau 3 : Résumé des propriétés biologiques et limites des greffes osseuses et de certains substituts osseux .....	41
Tableau 4 : Caractéristiques de techniques de modification de surface pour la création de micro/nanotopographies.....	48
Tableau 5 : Impact des propriétés de surface sur la différenciation des CSM. ....	51
Tableau 6 : Les nanotopographies affectent les comportements d'adhérence, de morphologie et de différenciation des cellules. ....	57
Tableau 7 : Exemple de modifications de surfaces d'implants osseux en titane. ....	58
Tableau 8 : Comparaison de la mouillabilité et de l'effet bactéricide de différentes surfaces nanostructurées. ....	72
Tableau 9 : Résumé des conditions expérimentales. ....	82
Tableau 10 : Valeurs de l'activité de l'ALP à différents temps de culture.....	121
Tableau 11 : Valeurs d'absorbance suite à l'extraction de la coloration Alizarin red à différents temps de culture.....	124
Tableau 12 : Nombre de rats pour lesquels un score de 0 a été attribué. ....	139

## Liste des abréviations

### A

**ADNe** : ADN extracellulaire

**ALP** : phosphatase alcaline

**ANG1** : angiopoïétine 1

**ARG1** : arginase 1

### B

**BCP** : Phosphate de calcium biphasique

**BIC** : Contact os-implant

**BM-CSM** : CSM de la moelle osseuse

**BMD** : densitométrie osseuse

**BMP** : protéines morphogénétiques de l'os

**BMSC** : CSM de moelle osseuse

**β-TCP** : β-tricalcium phosphate

**BSA** : albumine de sérum bovin

**BSP2** : sialoprotéine osseuse 2

**BV/TV** : volume d'os/volume total

### C

**CoCrMo** : cobalt-cromium-molybdenum

**Col1** : collagène 1

**COX2** : cyclooxygénase 2

**CP** : commercialement pur

**CSM** : cellule souche mésenchymateuse

**Ct** : cycle seuil

### D

### E

**EGF** : facteur de croissance épidermique

**ELISA** : enzyme-linked immunosorbent assay

**EP4** : récepteur de la prostaglandine E2

**EGM2** : milieu de culture des cellules endothéliales

### F

**FAK** : kinase d'adhésion focale (focal adhesion kinase)

**FDA** : Food and Drug Administration

**FGF** : facteur de croissance des fibroblastes

**Fn** : fibronéctine

**FnBP** : protéine de liaison à la fibronéctine

**FOV** : champ de vision

### G

**GIR** : gravure ionique réactive

**GP-CSM** : CSM de la ligne épiphysaire

### H

**H&E** : hématoxyline/éosine

**HAS** : Haute Autorité de Santé

**HCl** : acide chlorhydrique

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : l'acide sulfurique

**HIF** : facteur inductible par l'hypoxie

**Huvec** : cellule endothéliales de cordon ombilical

### I

**IFN-γ** : interferon γ

**IGF** : (insuline-like growth factor) facteur de croissance ressemblant à l'insuline

**IL** : interleukine

### J

### K

**kDa** : kilodalton

### L

**LINC** : linker of nucleoskeleton and cytoskeleton

**LPS** : lipopolysaccharides

### M

**MAPK** : mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)

**MEB** : microscopie électronique à balayage

**mcCSM** : milieu conditionné de CSM

**MEC** : matrice extracellulaire

**MMP** : métalloprotéinase de la matrice

**MRSA** : Staphylocoque aureus résistant à la méticilline

**MSC2** : milieu de culture des CSM

## N

**NaCl** : sodium chloride

**NaOH** : sodium hydroxide

**NGS** : Sérum de chèvre normal

**NK** : cellules tueuses naturelles

**NO** : oxyde d'azote

## O

**OCN** : ostéocalcine

**OPG** : ostéoprotégérine

**OPN** : ostéopontine

## P

**P48** : plaque de culture 48 puits

**P96** : plaque de culture 96 puits

**PBST** : PBS 0,05% Tween-20

**P-CSM** : CSM du périoste

**PDGF** : facteur de croissance dérivés des plaquettes

**PEEK** : polyetheretherketone

**PECAM** : platelet endothelial cell adhesion molecule

**PFA** : paraformaldéhyde

**PGA** : acide poly-glycolique

**PGE2** : prostaglandine E2

**PIA** : adhésine intercellulaire polysaccharidique

**PLA** : acide poly-L-lactique

**PMMA** : (poly(méthacrylate de méthyle))

**pNPP** : phosphate de p-nitrophénol

**pNP** : p-nitrophénol

## Q

## R

**RANKL** : ligand activateur du NF- $\kappa$ B

**ROCK** : Rho-associated protein kinase

**Rpm** : rotations par minute

**RT-PCR** : PCR en temps réel

**Runx2** : facteur de transcription relié à runt 2

## S

**SDS** : dodécylsulfate de sodium

**SEM** : erreur type de la moyenne

**SLA** : sablage avec gravure à l'acide

**Smad4** : membre 4 de la famille des SMAD

**SOFROT** : société française de recherche orthopédique et traumatologique

**SD** : déviation standard

**SVF** : sérum de veau foetal

## T

**TBS** : solution saline tamponnée au Tris

**TBST** : TBS 0,05% Tween-20

**TGF- $\beta$**  : facteur de croissance transformant  $\beta$

**TIMP** : inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases

**TNA** : nanotube de titanate

**TNF- $\alpha$**  : facteur de nécrose tumorale  $\alpha$

**TRAP** : phosphatase alcaline résistante au tartrate

## U

## V

**VEGF** : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

**vWF** : facteur de Von Willebrand

## W

**WB** : western blot

## X

## Y

**Y27632** : inhibiteur de ROCK

**YAP** : Yes associated protein

## Z

## Autres

**$\mu$ Ct** : microtomographies par rayons X

## Contexte du travail

La réparation tissulaire est un processus physiologique captivant, puisqu'elle permet à certaines espèces de régénérer spontanément leurs membres. Même si l'Homme peut se trouver défavorisé par la nature, en réalité nous ne sommes pas totalement dépourvus de mécanismes comparables. Un des exemples les plus remarquables est la capacité de l'os à se réparer lui-même. En effet, ce serait se méprendre que d'imaginer le tissu osseux comme une simple armature minérale inerte<sup>1</sup>. En l'occurrence, l'os peut être considéré comme un organe. Il est composé de différents tissus, de cellules spécialisées et remplit plusieurs fonctions indispensables. Il est responsable de fonctions locomotrices et protectrices bien connues, mais également homéostatiques<sup>2-4</sup>. Nos os possèdent donc cette capacité à répondre spontanément à des situations traumatiques pouvant affecter leur intégrité.

Toutefois, cette capacité naturelle est perturbée face à des lésions de tissus importantes. Une approche thérapeutique est alors indispensable pour permettre un regain de fonction de l'os. Soit en remplaçant l'os par un objet capable de répondre à cette fonction (prothèses) ou en aidant l'os à retrouver sa fonction physiologique (greffes, implants). En effet, en fournissant à l'os un cadre moléculaire et physique adéquat (une substance de comblement ou de support), il est possible de rassembler les conditions nécessaires pour stimuler la capacité régénérative naturelle de l'os. Dans ce contexte, des biomatériaux capables de répondre à ces besoins ont été développés. Si l'on se réfère à la définition faite par Joon Park et R.S. Lakes<sup>5</sup>, « *un biomatériau peut être défini comme tout matériau utilisé pour fabriquer des dispositifs destinés à remplacer une partie ou une fonction d'une manière sûre, fiable, économique et physiologiquement acceptable* ». Différents types de biomatériaux ont pu être développés pour des applications thérapeutiques associées à l'os. Entre matériaux organiques ou non, synthétiques ou non, des stratégies variées sont aujourd'hui accessibles aux chirurgiens pour s'adapter aux différentes situations cliniques. Notre projet s'intéresse tout particulièrement à l'utilisation du **titane**. Que ce soit sous forme d'alliages pour des prothèses orthopédiques ou sous forme de grilles en reconstruction osseuse, le titane est apparu ces dernières décennies comme incontournable. En effet, ces propriétés mécaniques et de biocompatibilité en ont fait un matériau de choix pour combler le déficit fonctionnel associé à un défaut osseux. Cependant, malgré l'amélioration des procédures chirurgicales et des stratégies thérapeutiques disponibles, le taux d'échec des implants reste important.

Or, les pathologies osseuses liées au vieillissement de la population conduisent à un recours croissant aux implants. Un implant en titane, même si démontrant des propriétés très intéressantes, n'est pas dépourvu de risques pour le patient : manque de stabilité, sur-inflammation locale, risque d'infections nosocomiales, sont autant de raisons qui démontrent la nécessité d'études pour comprendre et prévenir ces échecs chirurgicaux.

Pendant longtemps, la majorité des implants étaient des supports passifs à la régénération osseuse. Aujourd'hui, la recherche étudie des matériaux bioactifs c'est-à-dire des matériaux capables d'engendrer une réponse biologique spécifique à l'interface tissu-matériau. Les recherches ont abouti à la création de nombreuses alternatives très innovantes et prometteuses. Différentes méthodes technologiques ont été développées pour conférer à ces biomatériaux des propriétés complémentaires leur permettant d'interagir avec les tissus vivants. Ainsi, notre projet s'inscrit dans une volonté d'amélioration du titane.

**L'objectif de notre travail est de démontrer l'efficacité thérapeutique d'une approche de modification de surface du titane lui conférant différentes propriétés bioactives.**

Dans la nature, certaines espèces animales ont développé des mécanismes de défense face aux bactéries. C'est le cas des cigales et des libellules qui arborent des nano-protubérances à la surface de leurs ailes, empêchant l'adhérence et la prolifération bactérienne<sup>6</sup>. Le laboratoire du Pr Elena Ivanova (RMIT University, Melbourne, Australie) s'est inspiré de ces mécanismes naturels afin de développer des biomatériaux nanostructurés possédant des propriétés mécano-bactéricides<sup>7</sup>. En collaboration avec ce laboratoire, notre équipe (Cancer Target and Experimental Therapeutics, Institut pour l'Avancée des Biosciences, INSERM U1209, UMR CNRS 5309) a montré que ces biomatériaux, naturellement antibactériens, permettent non seulement l'adhérence et la prolifération de cellules eucaryotes humaines, mais seraient en plus capables d'améliorer l'ostéointégration du biomatériau<sup>8</sup>.

Ce manuscrit débutera par une introduction sur la physiologie osseuse avec des notions clés permettant de comprendre les différents phénomènes biologiques impliqués dans l'ostéointégration d'un implant. Puis, une présentation du contexte bibliographique des différentes stratégies thérapeutiques et alternatives innovantes en cours de développement permettra de mettre en exergue l'ensemble des enjeux et avancées en ingénierie régénérative osseuse. Ce premier chapitre permettra de donner les clés nécessaires à la compréhension du travail effectué au cours de ce projet et de mettre en évidence le potentiel innovant de modifications de surfaces en titane.

Ce travail de recherche a été financé par le ministère de la recherche via l'Ecole Doctorale Chimie et Science du Vivant de l'Université Grenoble Alpes (EDCSV), ainsi que par la mise à disposition d'un financement de recherche de l'association des Gueules cassées. Pour mener à bien ce projet pluridisciplinaire, nous nous sommes entourés d'acteurs experts dans leur domaine respectif :

- Cette étude a été possible grâce à l'aide et au travail de **Elena Ivanova** et son équipe pour la production des surfaces en titane et son expertise en matériau.
- L'hébergement des animaux, ainsi que l'imagerie micro tomographique a été effectué avec l'aide et l'expertise de la plateforme d'imagerie du petit animal **OPTIMAL**.
- La chirurgie du modèle animal et l'analyse radiologique a été effectué avec l'aide du Professeur **Georges Bettega**, chirurgien maxillo-facial au CHU d'Annecy, ainsi que de Rodolphe Lartzien (assistant en chirurgie maxillo-faciale) et d'Alexandra Delay (interne en chirurgie maxillo-faciale)

# Chapitre I :

**Etat de l'art**



# I. Le tissu osseux, un tissu dynamique (physiologie osseuse)

Les os sont les unités de base du squelette. Ils assurent de nombreuses fonctions dans l'organisme. Leurs fonctions mécaniques représentent un échafaudage pour soutenir les différents tissus biologiques et permettre la locomotion. La rigidité du tissu en fait également un très bon élément de protection des organes, mais aussi de la moelle osseuse qu'il renferme. La composition minérale et organique des os assure également une homéostasie minérale<sup>9</sup> et hormonale<sup>2-4</sup> essentielle dans divers processus systémiques<sup>1</sup>. Pour remplir toutes ces fonctions, l'os est un matériau complexe avec une composition et une structure sur plusieurs niveaux très organisés. Il est trop souvent considéré comme une charpente inerte, faisant abstraction de son impressionnante dynamique. Pour pouvoir maintenir sa fonction dans le temps, l'os fait preuve d'une grande plasticité pour s'adapter aux différentes contraintes qu'il subit. Ce phénomène est appelé remodelage osseux. Il consiste en un perpétuel cycle de dégradation et reconstruction de la matrice osseuse pour correspondre au mieux aux contraintes mécaniques. Ces propriétés plastiques dépendent de l'action de différentes cellules spécialisées qui confèrent également une aptitude à la réparation. Face à des traumatismes de la vie altérant son intégrité, le tissu osseux est capable de mettre en action un processus de cicatrisation qui permettra de recréer du tissu.

## 1. Structure et composition

### 1.1. Les structures de l'os

#### 1.1.1 Les types d'os

Le squelette est composé de 206 os. Tous ces os ne sont pas exactement similaires et plusieurs méthodes de classification sont possibles. Classiquement, ils sont définis selon leur forme. Ils peuvent être répartis en 5 classes principales<sup>10</sup> :

- les os longs soutiennent le poids du corps et sont nécessaires aux mouvements (fémur, tibia, cubitus et radius),
- les os courts sont présents au sein des articulations, assurant stabilité et amplitude dans les mouvements (os carpiens de la main, tarsiens de la cheville),
- les os plats sont principalement impliqués dans la protection des organes internes (crâne, sternum, côtes et omoplate),
- les os de forme irrégulière (vertèbres et ethmoïde)
- les os sésamoïdes sont intégrés aux tendons et les protègent (patella).

#### 1.1.2 Organisation anatomique de l'os

Individuellement, les os ont une architecture différente qui caractérise leur type et leurs fonctions. On distingue pour tout os adulte deux parties distinctes : l'os cortical et l'os trabéculaire.

**L'os cortical**, également appelé compact ou haversien, fait référence à l'os dense et très organisé qui forme l'enveloppe dure de l'os. Sa densité est due à une agrégation concentrique de lamelles formées de matrice osseuse autour du canal de Havers. Ces structures cylindriques s'orientent selon l'axe principal de l'os et sont appelées système de Havers ou ostéons (Figure 1). Cette organisation de la matrice osseuse est essentielle

mécaniquement, puisqu'elle supporte une part importante de la charge appliquée aux os<sup>11</sup>. Cet os très compact possède une faible porosité, de l'ordre de 5-10%<sup>12</sup>.

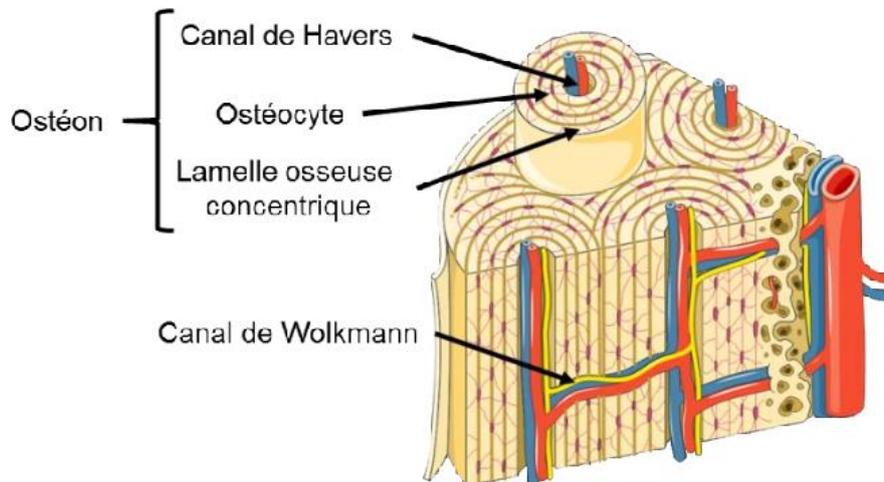


Figure 1 : **Illustration de l'organisation anatomique de l'os cortical.** La porosité de l'os cortical est liée à la présence des canaux de Havers au centre des ostéons mais également des canaux de Volkmann, reliant perpendiculairement les canaux de Havers. Ces canaux contiennent des nerfs et des vaisseaux sanguins (source <sup>13</sup>).

**L'os trabéculaire** ou os spongieux est caractérisé par sa structure spongieuse. Les cavités délimitées par les trabécules contiennent des tissus adipeux et la moelle hématopoïétique hautement vascularisée. Le réseau tri-dimensionnel formé par les trabécules s'ajuste aux forces mécaniques<sup>14</sup> et influence la résistance mécanique de l'os. L'importante surface<sup>15</sup> des trabécules, ainsi que leur plasticité, en font des zones métaboliquement très actives, avec un remodelage très présent, qui jouent un rôle important dans l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme.

Ces deux éléments s'organisent différemment selon les types d'os. Les os longs ont une structure bien particulière qui leur permet de fortement résister aux forces appliquées parallèlement à l'axe de l'os. Ils sont composés d'une longueur d'os cortical (diaphyse) avec aux extrémités des structures d'os trabéculaire et cortical (épiphyses). L'os plat quant à lui se compose d'os trabéculaire pris en sandwich entre deux couches d'os cortical. Outre le tissu osseux, l'os se compose également d'autres tissus, la moelle osseuse, le périoste et l'endoste.

**La moelle osseuse hématopoïétique** est un tissu précieux protégé au centre de l'os. Ce tissu est à l'origine de deux grands types de cellules progénitrices. Ces cellules ont des rôles essentiels à l'échelle de l'organisme mais également essentiels en local, puisqu'elles sont à l'origine des différentes cellules de l'os :

- Les cellules souches hématopoïétiques produisent les différentes cellules du sang (globules rouges, globules blanc et plaquettes) dans un processus appelé hématopoïèse. A noter que ces cellules sont également responsables de la génération de cellules de la lignée ostéoclastique.
- Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules souches multipotentes importantes pour produire et réparer les tissus squelettiques (os, cartilage et tissu adipeux).

**Le périoste et l'endoste** sont deux tissus conjonctifs entourant l'os. Le périoste est la membrane couvrant l'extérieur de l'os, là où l'endoste recouvre la partie intérieure de l'os. Ces tissus sont fortement vascularisés et possèdent des cellules ostéoprogénitrices. Ils participent ainsi activement à l'innervation, à la croissance et à la cicatrisation de l'os.

Que ce soit la moelle ou le périoste, ces deux tissus sont fortement ostéogéniques, c'est-à-dire qu'ils sont capables de promouvoir la formation d'os. En effet, de par leur composition cellulaire, ils représentent pour l'os un réservoir cellulaire à proximité, qui lui donne un accès aux différentes cellules capables de le remodeler et de le réparer<sup>16,17</sup>.

## 1.2 La composition du tissu osseux

Le tissu osseux est composé de cellules et d'une matrice extracellulaire (MEC). La MEC possède une composante minérale et organique. En proportion, l'os se compose de 50 à 70% de minéraux, 20 à 40% de matrice organique, 5 à 10% d'eau et moins de 3% de lipides. La composition de la matrice extracellulaire osseuse peut varier en fonction de l'âge, de la santé et des conditions pathologiques. Par exemple, dans des conditions telle que l'ostéoporose, la composition de la matrice peut être altérée, ce qui peut affaiblir la structure osseuse et augmenter le risque de fractures<sup>18</sup>.

### 1.2.1 La composante organique

La composante organique de la matrice extracellulaire de l'os représente entre 20 à 40% de sa masse totale. Elle est principalement composée de fibres de collagène de type I, qui sont entrelacées pour former un réseau tridimensionnel.

Outre les fibres de collagène de type I, la matrice organique contient également une variété de protéines sécrétées par les cellules osseuses, tels que d'autres type de collagène, des protéoglycanes, des glycoprotéines, des facteurs de croissance (TGF- $\beta$ ) ainsi que des protéines morphogénétiques de l'os (BMP). Certaines de ces protéines sont essentielles dans différents processus que l'on découvre encore à l'heure actuelle. On peut citer notamment l'ostéopontine (OPN), la sialoprotéine osseuse 2 (BSP2), l'ostéonectine et l'ostéocalcine (OCN).

### 1.2.2 La composante minérale

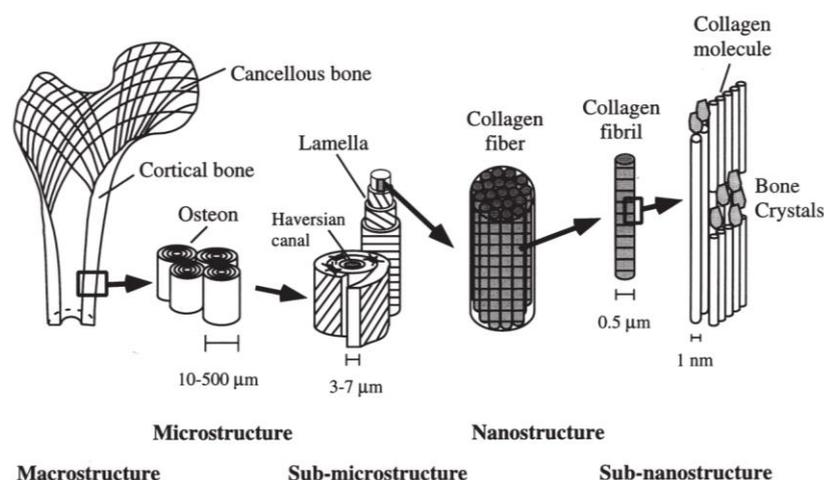


Figure 2 : **Illustration hiérarchique des différentes structures osseuses**, de l'échelle macroscopique de l'os, à l'échelle nanométrique du collagène et de l'hydroxyapatite (source <sup>19</sup>)

La composante inorganique de la matrice extracellulaire osseuse représente entre 50 à 70% du poids sec de l'os. Elle est principalement composée de cristaux d'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , qui sont formés par la combinaison de sels minéraux tels que le phosphate de calcium et l'hydroxyde de calcium. Ces cristaux peuvent

être de tailles différentes et sont déposés dans l'espace entre les fibres de collagène, formant ainsi une structure solide et résistante. Les cristaux d'hydroxyapatite de calcium sont disposés parallèlement aux fibres de collagène (Figure 2). Cette orientation maximise la résistance du collagène aux forces de traction (étirement) et la résistance des hydroxyapatites de calcium aux forces de compression<sup>20</sup>. L'organisation hiérarchique des composantes minérales et organiques de l'os, en fait un tissu hautement spécialisé pour résister au maximum aux forces mécaniques qui lui sont appliquées.

### 1.2.3 Composition cellulaire

Les cellules sont généralement différenciées selon leurs fonctions. Dans le tissu osseux, on retrouve plusieurs types de cellules spécialisées qui travaillent en synergie. Elles maintiennent la structure osseuse, régulent le métabolisme osseux et participent à la réparation des blessures. Ces cellules peuvent être réparties en 4 types cellulaires différents : les ostéoblastes, les ostéoclastes, les ostéocytes et les cellules bordantes.

**Ostéoblastes** : ce sont des cellules spécialisées de type fibroblastique, provenant des cellules souches mésenchymateuses (CSM) de tissus comme la moelle osseuse ou le périoste. Les CSM sont des cellules multipotentes, capables de se différencier en cellules adipeuses, cartilagineuses ou osseuses. En présence d'un stimulus approprié, elles peuvent devenir des cellules ostéoprogénitrices, puis des ostéoblastes. Les ostéoprogéniteurs sont déjà engagés dans la différenciation mais sont encore à un stade immature. A ce stade, on les retrouve principalement dans la couche interne du périoste et dans l'endoste où elles prolifèrent. Pour l'os, ce stade intermédiaire de l'ostéoblaste est un bon moyen de créer une source de cellules qui peuvent rapidement être recrutées et induites en ostéoblastes. Une fois matures, les ostéoblastes vont intervenir dans la sécrétion des différents composants de la matrice osseuse que l'on a pu évoquer précédemment. Ils sécrètent ainsi le collagène de type I, mais sont aussi responsables de la minéralisation de la matrice. Les protéines non collagéniques que l'on a pu évoquer précédemment sont aussi sécrétées par les ostéoblastes. Elles peuvent être utilisées comme marqueurs du phénotype de l'ostéoblaste et chacune d'entre elles présente un profil temporel d'expression unique au cours de la différenciation de l'ostéoblaste (Annexe 1).

**Ostéoclastes** : ils ont également comme origine la moelle osseuse, mais proviennent des cellules hématopoïétiques. Ce sont de grandes cellules phagocytaires multinucléées dérivées de la lignée cellulaire des macrophages<sup>21</sup>. Les ostéoclastes sont des cellules spécialisées dans la résorption osseuse, contribuant au remodelage osseux en réponse à la croissance ou aux changements de contraintes mécaniques sur le squelette. Leur fonction est permise via l'action simultanée d'acides organiques capables de dissoudre la composante minérale de la matrice, puis la présence d'enzymes protéolytiques (métalloprotéinases de la matrice (MMPs)) capables de dégrader le collagène. (Figure 3).

Cette activité de résorption libère des déchets, tels que le calcium et le phosphate, qui participent activement à l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme. Mais c'est également le cas de différentes protéines que les ostéoclastes récupèrent dans la matrice osseuse et sont capables de libérer dans leur microenvironnement.

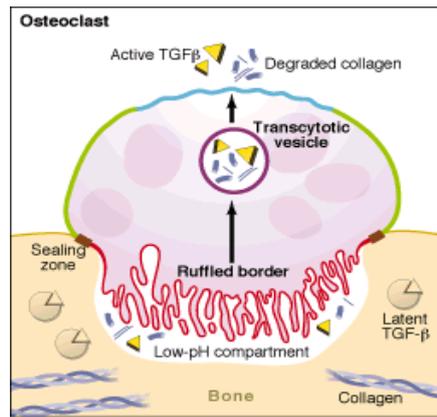


Figure 3 : **Illustration de l'action de résorption d'un ostéoclast.** Les ostéoclastes adhèrent à la matrice osseuse et créent des zones étanches à leurs extrémités (« sealing zone »). La membrane inférieure (en rouge) permet la dégradation de la matrice osseuse via l'acidification du milieu et l'action d'enzymes. Certains des composants protéiques de la matrice, tels que le TGF- $\beta$  (facteur de croissance transformant  $\beta$ ) peuvent être internalisés par la cellule et relargués via sa membrane apicale (en bleu) dans l'environnement extérieur (source <sup>22</sup>).

**Ostéocytes** : Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes dans l'os mature. Ils sont responsables du maintien de la santé osseuse. Ce sont des ostéoblastes qui se sont intégrés à la matrice osseuse. Ils représentent l'état de différenciation le plus mature de la lignée ostéoblastique. Ces cellules sont des mécanorécepteurs sensibles aux variations de pression qui s'exercent sur la matrice osseuse. Grâce à leurs fines extensions cytoplasmiques appelées canalicules (Figure 4), les ostéocytes peuvent communiquer des informations avec les cellules voisines. En effet, il a été démontré que le stress mécanique peut être détecté par les ostéocytes et que ces cellules déclenchent des réactions biochimiques pour le transmettre.

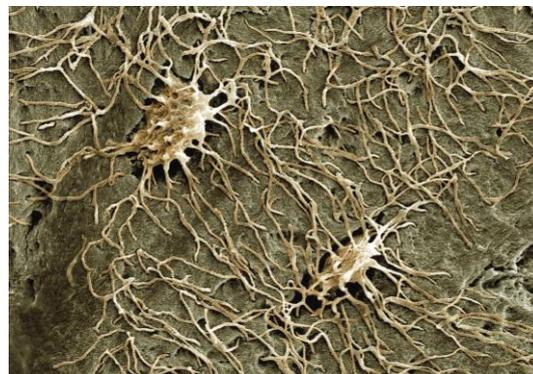


Figure 4 : **Ostéocytes et leurs canalicules observés par microscopie électronique à balayage (MEB)** (source : Kevin Mackenzie, Université d'Aberdeen)

**Les cellules bordantes** : Ces cellules recouvrent la surface de l'os. Elles représentent un stade de maturation des ostéoblastes. Elles n'ont pas de fonctions sécrétrices particulières, mais protègent la surface de l'os de toute activité de résorption des ostéoclastes. Elles peuvent toutefois être réactivées à tout moment pour former des ostéoblastes.

## 2. Création et maintien de la fonction osseuse

### 2.1 Remodelage

Le remodelage osseux prend place tout au long de la vie d'un individu. Il désigne les mécanismes par lesquels le tissu osseux est renouvelé. Le remodelage implique l'élimination continue de fragments discrets d'os ancien, leur remplacement par une matrice protéique nouvellement formée et la minéralisation de cette matrice pour former de l'os nouveau. Il permet ainsi de maintenir l'intégrité de l'os et l'homéostasie minérale. Le remodelage osseux est régulé par plusieurs types de cellules, mais son action est principalement liée à l'activité séquentielle d'ostéoclastes et d'ostéoblastes (Figure 5). Le processus est initié par une phase d'activation médiée par différents facteurs chimiques qui entraînent le recrutement et l'activation de pré-ostéoclastes ainsi que le soulèvement de la couche de cellules bordantes. Parmi la multitude de facteurs décrits dans la littérature, le ratio de RANKL et d'ostéoprotégérine (OPG) ressort comme primordial. Le ligand activateur du NF- $\kappa$ B (RANKL) est déterminant pour l'activation des ostéoclastes. Mais la liaison à son récepteur peut être inhibé par l'OPG, faisant de ce duo de protéines des régulateurs clés du remodelage osseux<sup>15</sup>. Il est important de noter que le remodelage osseux est un processus dynamique et équilibré. Normalement, la quantité de tissu osseux formé est égale à la quantité de tissu résorbé, ce qui maintient l'intégrité structurelle des os.

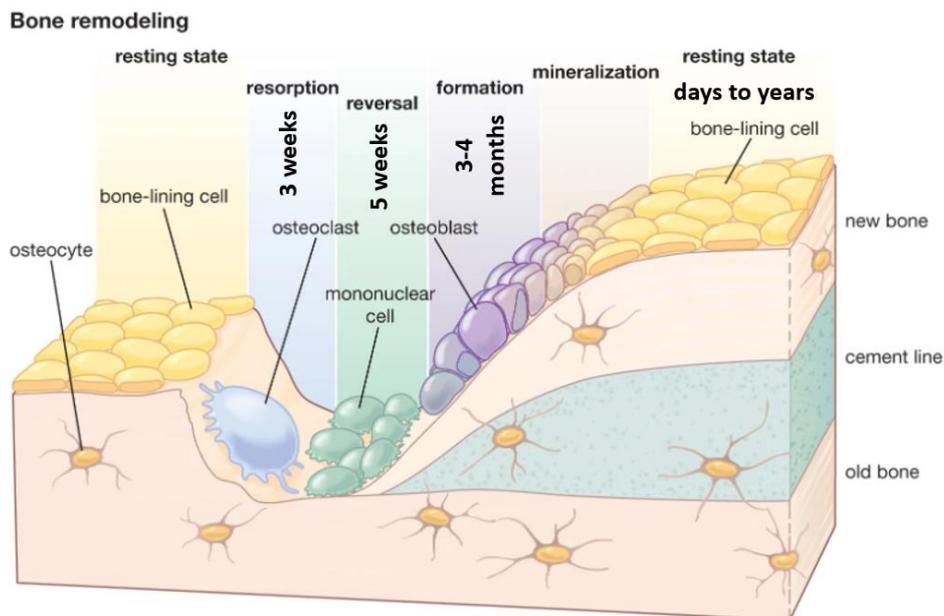


Figure 5 : **Illustration du processus de remodelage osseux** (source : Encyclopaedia Britannica Inc.). Les ostéoclastes adhèrent à la surface osseuse rendue accessible par le décollement des cellules bordantes (bone-lining cell). Ils entament leur action de résorption, qui est complétée par des cellules mono-nucléaires suite à l'apoptose des ostéoclastes multinucléés. Le relargage de différents facteurs dans l'environnement permet le recrutement de cellules ostéoprogénitrices. Après leur différenciation en ostéoblastes, elles sécrètent une matrice organique (ostéoïde) qui sera par la suite minéralisée en matrice osseuse. Suite à cela, la majorité des ostéoblastes rentrent en apoptose (50 à 70%). Le reste est soit emprisonné dans la matrice et se transforme en ostéocytes ou soit se transforme en cellules bordantes.

De nombreux sites de remodelage osseux peuvent être présents simultanément dans le squelette. On estime que 10 % du squelette est remodelé chaque année<sup>23</sup>. Certains déséquilibres entre la résorption et la formation osseuse peuvent se produire dans certaines conditions pathologiques. C'est le cas de l'ostéoporose, où la résorption prédomine sur la formation, entraînant une diminution de la densité osseuse et une augmentation du risque de fractures.

## 2.2 Modelage

Le remodelage est à ne pas confondre avec le modelage. Même si le modelage peut s'observer chez l'adulte<sup>24</sup>, il reste bien moins fréquent que le remodelage. Le modelage permet d'adapter la structure du squelette aux contraintes mécaniques<sup>25</sup>. La formation osseuse ainsi que la résorption sont indépendantes. C'est-à-dire que l'une peut avoir lieu sans que l'autre n'intervienne (sans résorption préalable à la formation osseuse ou sans formation à la suite de la résorption). De cette façon, l'os se forme là où il est le plus sollicité mécaniquement et se résorbe là où il n'est pas nécessaire. Les contraintes mécaniques induites par les contractions musculaires, le mouvement et la gravité stimulent la croissance osseuse pour adapter la structure de son tissu et son organisation tridimensionnelle. Mais cela implique aussi qu'une faible stimulation osseuse entraîne sa résorption. Par exemple, Inoue et al. ont montré une cascade de perturbation des marqueurs osseux à la suite d'un alitement de 120 jours. Cela s'est traduit en une forte résorption osseuse et une activité ostéoblastique réduite<sup>26</sup>. Une chose certaine est que la réponse tissulaire à ces facteurs mécaniques prend origine à l'échelle cellulaire. Les ostéocytes sont capables de détecter les forces mécaniques exercées sur l'os et de les traduire en signaux cellulaires, ce qui leur permet de réguler l'adaptation osseuse de manière appropriée. Grâce à leur système de canalicules (réseau lacuno-canaliculaire), les ostéocytes régulent la formation et la fonction des ostéoblastes et des ostéoclastes afin de maintenir l'homéostasie osseuse. Les ostéocytes produisent pour cela diverses protéines comme RANKL et OPG que l'on a déjà évoqué précédemment (Partie I.2.1.)<sup>27,28</sup>.

## 2.3 Ossification

L'ossification fait référence au processus de formation des os. Elle peut se faire selon deux modes, l'ossification intramembranaire et l'ossification endochondrale, qui impliquent tous deux la transformation du tissu mésenchymateux en tissu osseux. Ces deux modes se différencient dans le recours ou non à un intermédiaire cartilagineux.

**L'ossification intramembranaire** est responsable, au cours du développement fœtal, de la formation des os plats de la face ainsi que d'une partie des clavicules. L'initiation de ce mode d'ossification se fait par des cellules souches mésenchymateuses du mésenchyme ou de la cavité médullaire (de la crête neurale chez le fœtus). Sous l'influence de messagers chimiques, les cellules prolifèrent et se condensent en nodules compacts ou centre d'ossification. Ces amas de CSM indifférenciées vont stopper leur prolifération et évoluer vers un phénotype ostéoprogéniteur, puis éventuellement en ostéoblastes (Partie I.1.2.3.).

L'activation des facteurs de transcription Runx2 et Ostérix est essentielle à la différenciation et la maturation en ostéoblastes. Ils ont une multitude de gènes cibles, notamment l'ostéocalcine, la sialoprotéine osseuse (BSP), l'OPN ou encore le collagène de type I<sup>10</sup>. Leur activation est relativement complexe et dépend d'informations biochimiques et mécaniques dans l'environnement cellulaire. On peut notamment citer les protéines de la famille des TGF- $\beta$  et certaines protéines morphogénétique de l'os (BMP)<sup>29,30</sup>. La multitude de facteurs d'activation et d'inhibition est essentielle, puisqu'elle permet une fine régulation spatiale, mais également temporelle, de l'action des ostéoblastes. C'est notamment le cas de Runx2 qui est essentiel pour initier la différenciation des CSM en ostéoblaste et la production de collagène, mais qui devient contre-productif sur des stades plus avancés, lorsqu'il est nécessaire d'organiser la matrice. Suite à leur différenciation en ostéoblastes, une matrice préliminaire riche en fibrille de collagène de type I va s'accumuler au sein de l'amas (Figure 6). Cette matrice non minéralisée est

appelée ostéoïde. L'ostéoïde se dépose autour des ostéoblastes et forme une trame tridimensionnelle de fibres de collagène. Les sels minéraux, principalement le calcium et le phosphate, se déposent dans l'ostéoïde, ce qui entraîne sa calcification et sa transformation en matrice osseuse minéralisée. Les ostéoblastes piégés dans la matrice minéralisée deviennent des ostéocytes, qui maintiennent la structure osseuse et participent à sa minéralisation. A mesure que la matrice extracellulaire se forme, les centres d'ossification fusionnent et forment des trabécules. Des vaisseaux sanguins se forment dans les espaces de la matrice et le tissu conjonctif des vaisseaux participera à la formation de la moelle osseuse hématopoïétique. En parallèle, les cellules du mésenchyme autour de la matrice osseuse deviennent compactes et s'organisent pour former le périoste. Au niveau de la face interne du périoste, au contact de la matrice osseuse, des ostéoblastes apposeront une couche de tissu compact.

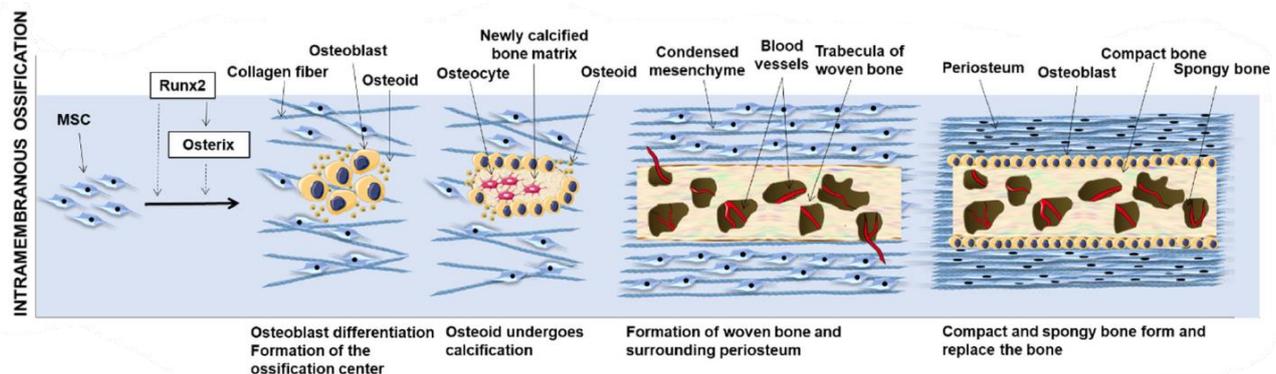


Figure 6 : Schématisation du processus d'ossification intramembranaire (source<sup>31</sup>)

**L'ossification endochondrale**, comme son nom l'indique, correspond à une ossification ayant lieu au sein d'un tissu cartilagineux. Ce processus concerne les os longs, les vertèbres, mais également une partie des os du crâne. Une ébauche cartilagineuse de l'os se forme suite à la concentration de cellules mésenchymateuses en un site bien précis. Ces cellules adhèrent entre elles grâce à l'expression de N-cadhérine<sup>32</sup>. A ce stade, à la différence de l'ossification intramembranaire, les cellules se différencient en cellules primaires du cartilage ou chondrocytes. Cette différenciation est majoritairement dépendante de la présence de facteurs tels que les protéines morphogénétiques de l'os (BMP), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) ou le trio SOX (SOX5, SOX6 et SOX9)<sup>33</sup>. La présence de ces molécules va induire la sécrétion par les chondrocytes d'une MEC riche en collagène de type II et protéoglycane agrécan. Parallèlement, une membrane appelée périchondre croît et recouvre le cartilage en formation. Au fur et à mesure que le cartilage s'agrandit, les chondrocytes présents dans la partie centrale de l'os sont exposés à un environnement différent et s'hypertrophient. Les chondrocytes, une fois hypertrophiés, sécrètent du collagène de type X et minéralisent la matrice. Ils vont également sécréter une variété de facteurs chimio-attractants et de différenciation. Leur rôle sera notamment de recruter des cellules endothéliales, des chondroclastes (équivalent à des ostéoclastes pour le cartilage) et d'induire la différenciation en ostéoblastes (Runx2) de cellules contenues dans le périchondre. Ces ostéoblastes débutent la transformation de la matrice collagénique en os trabéculaire.

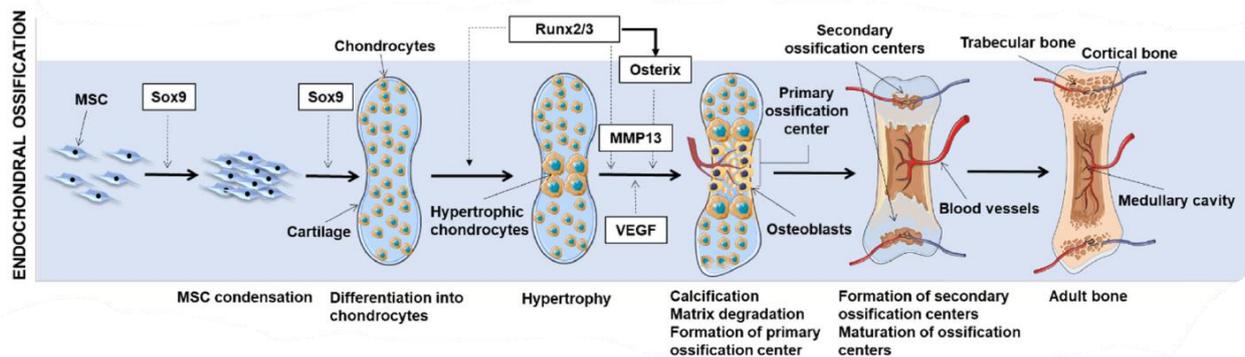


Figure 7 : Schématisation du processus d'ossification endochondrale (source<sup>31</sup>)

Ce processus d'hypertrophie se termine par l'apoptose des chondrocytes<sup>34</sup>, qui laissent de la place pour l'invasion de vaisseaux sanguins et la transformation de la matrice. Cette phase de maturation du cartilage, hypertrophie, mort des chondrocytes et remplacement par de l'os trabéculaire, se poursuit vers les extrémités de l'os (épiphyses). A un certain stade, l'os trabéculaire au centre de l'os va se résorber, laissant une cavité (la cavité médullaire) qui sera progressivement remplie de moelle osseuse. Des centres d'ossification secondaires se créent dans les épiphyses et transforment le cartilage en os jusqu'à ce que les plaques de croissance fusionnent de chaque côté (Figure 7). Ce site de fusion est appelé ligne épiphysaire. A ce stade, le modèle cartilagineux a entièrement été remplacé par de l'os. Il y a deux exceptions à cela : la ligne épiphysaire qui maintiendra une composition cartilagineuse jusqu'à l'âge adulte et le cartilage qui recouvre les épiphyses et qui devient le cartilage articulaire.

A noter que la croissance longitudinale de l'os long se fait suivant le même principe. Du cartilage, puis de l'os est formé à partir de la ligne épiphysaire, allongeant ainsi la diaphyse. Ce processus a lieu pendant l'enfance et l'adolescence et se termine généralement entre 18 et 25 ans, lorsque la ligne épiphysaire se transforme définitivement en os cortical. La croissance transversale de l'os est quant à elle dépendante d'une activité simultanée d'ostéogénèse, provenant du périoste, et de résorption de l'os médiée par les ostéoclastes dans la cavité médullaire.

Cette première partie descriptive a permis de mettre en évidence la structure hiérarchique de l'os, et d'introduire des phénomènes physiologiques clés au maintien et développement d'un os sain. L'os est un matériau complexe qui reçoit de nombreuses sollicitations mécaniques. Pour maintenir son intégrité fonctionnelle dans le temps, la physiologie de ce tissu est faite de manière à ce qu'il puisse s'adapter et se renouveler en permanence. On estime que l'intégralité de notre squelette est renouvelée tous les 10 ans en moyenne. Le modelage de l'os permet de réduire l'usure du tissu en permettant une réponse adéquate aux contraintes mécaniques. Quant au remodelage, il permet un renouvellement continu du tissu usé par la formation de tissu neuf.

Toutefois, comme vous avez peut-être pu l'expérimenter vous-mêmes, l'os est un tissu qui peut être mis en défaut au cours de la vie. Les traumatismes, c'est-à-dire les événements qui peuvent porter atteinte à l'intégrité de ce tissu sont fréquents et dépassent le cadre de microfissures prises en charges par le remodelage.

La suite de ce chapitre portera sur la description des réponses physiologiques ou thérapeutiques permettant un regain de fonction face à un tissu osseux endommagé.

## II. Réparer l'os : mécanismes physiologiques

Le processus de guérison de l'os est un mécanisme complexe qui implique le recrutement et la différenciation de cellules, sous la régulation de divers facteurs de croissance et cytokines. Au cours des dernières décennies, des avancées notables ont été accomplies dans la compréhension de ce processus de guérison. Ce savoir a permis de développer des approches biologiques et biophysiques pour faciliter la consolidation des fractures complexes et plus largement la réparation de défauts osseux. Ce chapitre a pour but de présenter les différentes phases de la réparation de l'os et l'ensemble des facteurs nécessaires à son déroulement.

### 1. Cicatrisation osseuse : réponse du tissu en cas de lésion

#### 1.1 Les phases de la cicatrisation

L'équilibre dynamique de l'os empêche efficacement l'apparition de fractures. Toutefois, en cas de charge supérieure à la résistance de l'os ou face à des dommages accumulés suite à des contraintes cycliques, il n'est pas rare que des fractures apparaissent. La réparation physiologique de ces fractures permet généralement un rétablissement de l'os endommagé avec une structure, composition et réponse biomécanique identiques à celles d'avant la blessure. Cependant, lorsque l'on considère la prise en charge des fractures osseuses, on estime qu'aujourd'hui environ 10 % d'entre elles ne guérissent pas normalement<sup>35-37</sup>. Cela peut être associé à un problème de stabilité de la réparation, sa taille, la présence d'une infection, un manque d'apport vasculaire ou des facteurs systémiques comme la présence de comorbidités chez le patient<sup>37</sup>.

Différents facteurs affectent la réparation. L'analyse des caractéristiques de la fracture va aider à la prise de décision clinique, en pronostiquant l'évolution de la fracture et les complications qui peuvent être associées à sa prise en charge<sup>38,39</sup> (Figure 8). La première chose est de distinguer entre fracture fermée ou ouverte. Une fracture ouverte implique la rupture de la peau et l'exposition de l'os à l'extérieur. Elle va être très propice aux risques d'infection et les dommages induits aux tissus environnant l'os, comme le périoste, compliquent la prise en charge.

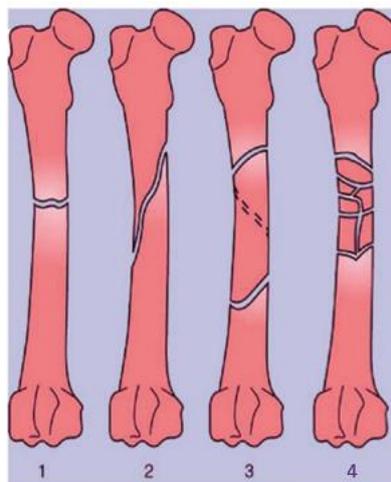


Figure 8 : Illustration de différents types de fractures. 1-transverse, 2-oblique, 3-en spirale, 4-comminutive (en plusieurs morceaux) (source<sup>39</sup>)

Lorsque l'on considère la réparation osseuse, on peut définir deux catégories : la cicatrisation osseuse primaire et la cicatrisation osseuse secondaire, dont la distinction est encore discutée<sup>39-41</sup>. La distinction entre les deux processus pourrait s'expliquer par une différence de potentiel ostéogénique et chondrogénique des CSM en fonction de leur environnement cellulaire<sup>41</sup>. La cicatrisation primaire concernerait essentiellement les fractures suffisamment stables et de taille réduite<sup>40</sup>, et est considérée par certains comme intégrée au processus de remodelage osseux (Partie I.2.1.). La cicatrisation osseuse secondaire est la méthode d'ossification la plus commune. Elle est généralement décrite en 4 phases qui se succèdent (Figure 9).

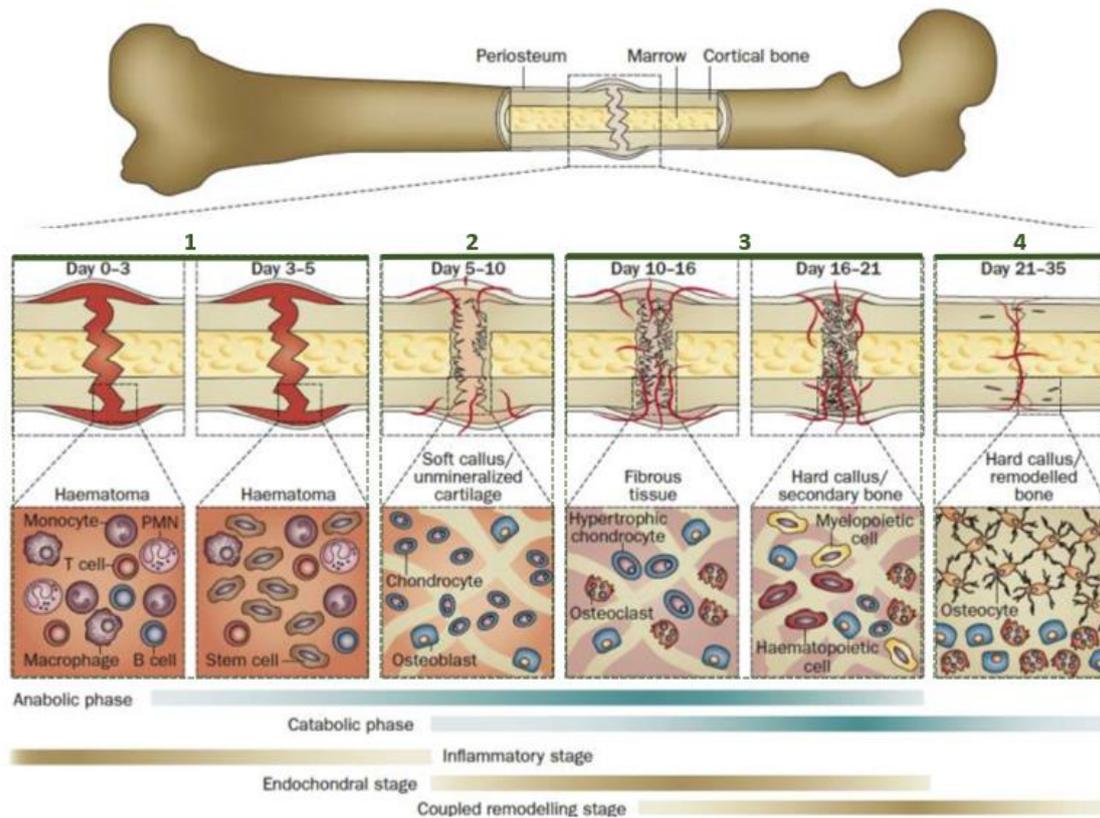


Figure 9 : **Processus typique de réponse face à une lésion du tissu osseux.** Dans leur revue, Einhorn et Gerstenfeld décrivent le processus de cicatrisation selon deux phases métaboliques (bleu) qui se chevauchent avec trois événements biologiques majeurs (marron). On retrouve sur cette figure les types de cellules primaires intervenant aux différents stades. L'échelle de temps de la guérison est évoquée sur la base d'une fracture fermée du fémur d'une souris, fixée par une tige intramédullaire. (source <sup>35</sup>)

**Hématome** : Lorsqu'une fracture osseuse se produit, la première étape de la réparation est la réponse inflammatoire. Des vaisseaux sanguins sont endommagés, ce qui entraîne une libération de molécules et de cellules inflammatoires dans la zone blessée. Cela provoque une augmentation du flux sanguin, l'accumulation de cellules immunitaires et la formation d'un caillot sanguin pour stabiliser la fracture. Cette réponse inflammatoire permet le recrutement de CSM et de cellules ostéoprogénitrices.

**Cal fibrocartilagineux** : A ce stade, une ossification endochondrale (Partie I.2.3.) se déclenche. Normalement, la réponse inflammatoire a permis de créer un environnement local propice à la différenciation des CSM en chondroblastes, fibroblastes ou ostéoblastes. En conséquence, la chondrogenèse se produit, en formant un réseau fibrocartilagineux aux extrémités de la fracture. Parallèlement, le tissu de granulation sous le périoste se transforme en substance ostéoïde, déposée par les cellules ostéoprogénitrices du périoste.

**Cal osseux** : L'hypertrophie des chondrocytes et la présence d'ostéoclastes permet de résorber le cal et d'enclencher sa minéralisation<sup>34</sup>. Les vaisseaux sanguins prolifèrent, ce qui permet la migration des CSM. Sous le périoste, l'os non organisé continue de se former. À la fin de cette phase, un cal dur d'os immature se forme.

**Remodelage** : Ce processus de remodelage osseux permet de restaurer progressivement la forme et la fonction normale de l'os fracturé. L'apport continu d'ostéoblastes et d'ostéoclastes permet, à terme, la transformation du cal en os organisé. Ces changements s'accompagnent d'un remodelage du réseau vasculaire. La consolidation complète de la fracture peut prendre plusieurs semaines, voire plusieurs mois, selon la gravité de la fracture et les facteurs individuels.

### 1.2 Communication cellulaire

En s'appuyant uniquement sur les cellules présentes au sein de l'os, le processus de réparation prendrait des dizaines d'années pour se réaliser. Cela paraît irréalisable, surtout que les ostéoblastes ont une durée de vie de quelques jours (maximum 100 jours)<sup>42</sup>. Il est donc primordial de pouvoir recruter une grande quantité de cellules sur le site lésé. L'inflammation déclenchée au site de la fracture va induire la sécrétion de nombreux facteurs de croissance et cytokines, qui vont permettre le recrutement des cellules souches mésenchymateuses, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires vers la région de l'os fracturé.

La phase inflammatoire débute immédiatement après l'endommagement de l'os et des tissus mous environnants. La perturbation des vaisseaux entraîne inévitablement un apport en sang sur le site du défaut. Dans la fente de fracture, le fibrinogène se transforme en fibrine et l'hématome prend forme<sup>43</sup>. Plusieurs études ont montré un rôle primordial de ce coagulat, puisque son retrait est lié à une perturbation de la formation osseuse.

De plus en plus de preuves soutiennent l'idée que l'hématome favorise la phase de réparation en libérant des facteurs de croissance qui stimulent l'angiogenèse et la formation osseuse en induisant la migration des cellules souches mésenchymateuses, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires vers la région de l'os fracturé<sup>39</sup>. Une liste de certains facteurs de croissance communément impliqués dans la réparation osseuse a été publiée dans une revue de Bayer, et al. et est reportée dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Liste non exhaustive de facteurs de croissance et leurs rôles dans la régénération osseuse (adapté et traduit de <sup>44</sup>)

Facteurs de croissance	Rôles dans la régénération osseuse	Types cellulaires impliqués
<b>BMP-2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promeut la différenciation ostéogénique et chondrogénique<sup>45-47</sup></li> <li>• Augmente la prolifération des ostéoblastes<sup>46</sup></li> <li>• Promeut l'angiogenèse <sup>48</sup></li> <li>• Module la polarisation des macrophages<sup>49</sup></li> </ul>	<p>Sécrété par les cellules endothéliales, les macrophages<sup>50,51</sup> et les ostéoblastes <sup>52,53</sup></p> <p>→Agis sur les CSM, les cellules ostéoprogénitrices, les macrophages<sup>49,50</sup> et les ostéoblastes <sup>46</sup></p>
<b>TGF-β</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recrute des précurseurs ostéoblastes <sup>54,55</sup></li> </ul>	<p>Sécrété par les plaquettes<sup>65</sup>, présent sous forme inactive dans la matrice osseuse (Partie I.1.2.3.)</p> <p>→Agis sur les précurseurs d'ostéoblastes suite à son activation<sup>54</sup></p>
<b>PDGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induit la prolifération de CSM<sup>56</sup></li> <li>• Augmente l'angiogenèse et la production de VEGF<sup>57,58</sup></li> <li>• Aide au recrutement de CSM pour aider la vascularisation et pour aider la formation osseuse<sup>59</sup></li> </ul>	<p>Sécrété par les plaquettes, les neutrophiles et les macrophages<sup>60</sup></p> <p>→Agis sur les CSM<sup>56-59,61</sup></p>
<b>VEGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmente la prolifération de cellules endothéliales<sup>62,63</sup></li> <li>• Chimio-attraction de CSM et de cellules NK<sup>63,64</sup></li> <li>• Promeut la différenciation de CSM<sup>65</sup></li> </ul>	<p>Sécrété par les plaquettes et les cellules ostéogéniques<sup>66</sup></p> <p>→Agis sur les CSM<sup>63</sup>, les cellules endothéliales<sup>67</sup> et les cellules immunitaires<sup>68</sup></p>
<b>IGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induit la néoangiogenèse chez l'adulte<sup>69</sup></li> <li>• Augmente la synthèse de matrice osseuse<sup>55</sup></li> </ul>	<p>Déposé par les ostéocytes<sup>55</sup> dans la matrice osseuse</p> <p>→ Agis sur les préostéoblastes et les cellules endothéliales<sup>70</sup></p>
<b>FGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induit la formation de nouveaux capillaires <sup>71-73</sup></li> <li>• Favorise la prolifération et la différenciation des ostéoblastes<sup>74,75</sup></li> </ul>	<p>Sécrété par les ostéoblastes, macrophages et cellules endothéliales<sup>55</sup></p> <p>→Agis sur les CSM, ostéoblastes<sup>75</sup> et cellules endothéliales<sup>71,72</sup></p>

L'inflammation aiguë des tissus environnants se manifeste par une dilatation des vaisseaux sanguins et l'arrivée rapide de cellules sanguines. Il est probable que les plaquettes soient la principale source de facteurs de croissance à l'arrivée sur le site d'une lésion. En plus des facteurs de coagulation, elles libèrent le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance transformant-β1 (TGF-β1), qui favorisent la production osseuse. Le PDGF a un effet direct sur la sécrétion de collagène, mais également sur la synthèse de protéines non collagéniques<sup>78</sup>. En plus de son potentiel ostéogénique, l'hématome de la fracture possède également un potentiel angiogénique. En effet, suite à la lésion et la création d'un hématome, l'environnement qui en résulte est fortement hypoxique <sup>35</sup>. Le facteur de transcription HIF-1α (facteur inductible par l'hypoxie) va alors favoriser l'invasion vasculaire et la différenciation des cellules ostéoprogénitrices en stimulant l'expression de VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) et de chimiokines (comme par exemple CXCL12)<sup>79-81</sup>. Ainsi, l'ensemble des cellules recrutées pénètrent dans l'hématome. Elles s'y incrustent et pourront, à terme, générer la matrice extracellulaire qui évoluera en ostéoïde ou matrice cartilagineuse La Figure 10 vous présente un exemple de réseau de signalisation induit par la présence de ces facteurs de croissance dans l'environnement.

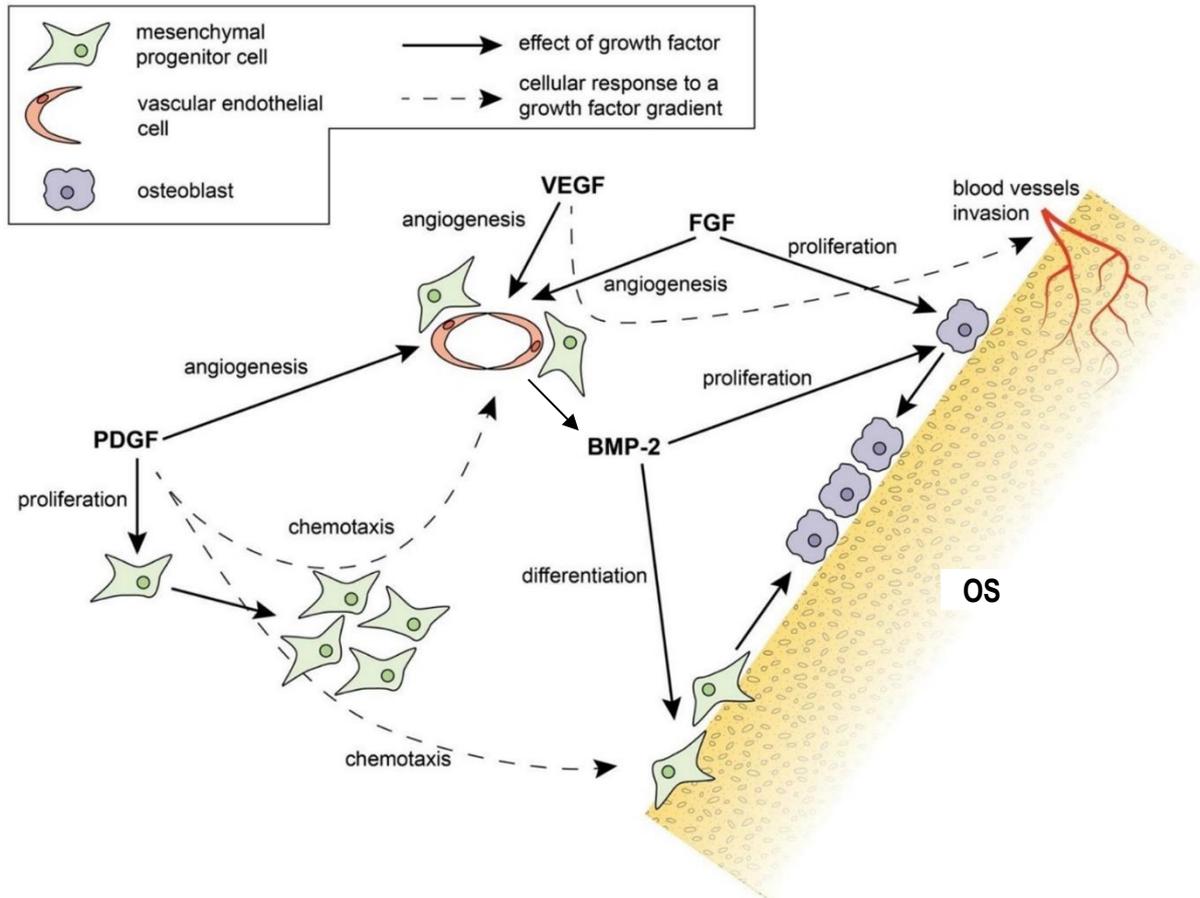


Figure 10 : Exemple de signalisation par différents facteurs de croissance sur les CSM, ostéoblastes et cellules endothéliales lors de la réparation osseuse. (source<sup>44</sup>)

Parmi les cellules sanguines arrivant sur le site de la lésion, on peut également s'intéresser aux cellules immunitaires innées. Les systèmes immunitaire et squelettique sont étroitement interconnectés. Les cellules immunes représentent jusqu'à 20% des cellules de l'os et de la moelle osseuse <sup>82</sup>.

Les premières cellules à intervenir sont les neutrophiles, qui sont recrutés dans l'hématome et aident à éliminer les débris osseux. Les cellules tueuses naturelles (NK), interviennent dans le recrutement de cellules progénitrices. Une étude *in vitro* faite par Almeida et al. a révélé que les cellules NK peuvent multiplier par trois le recrutement des CSM de la moelle osseuse<sup>83</sup>.

Des propriétés similaires peuvent être médiées par les macrophages. En effet, outre leur fonction phagocytaire, les macrophages sont capables de communiquer avec les différents acteurs cellulaires via la sécrétion de facteurs de croissance. Traditionnellement, les macrophages sont divisés entre un phénotype pro-inflammatoire (M1) et un phénotype anti-inflammatoire (M2). Il a été observé que les différentes phases inflammatoires nécessaires à la cicatrisation osseuse sont étroitement liées à une transition d'un phénotype M1 vers M2. Même si les termes M1/M2 sont sûrement un peu réducteurs quant à la complexité phénotypique des macrophages, il est maintenant clair qu'une transition entre pro et anti-inflammatoire s'effectue<sup>84</sup>. Les M1 ont un rôle important sur des phases très précoces par la multitude de cytokines sécrétées pour recruter différents types cellulaires sur le site de la lésion<sup>85</sup>. Au contraire, le phénotype M2 est associé à des événements de réparation tissulaire. Cela se fait notamment via la sécrétion de nombreux facteurs de croissance qui ont été évoqués précédemment

comme le TGF- $\beta$ 1, la BMP2 ou encore le VEGFA<sup>86</sup>. De nombreuses recherches récentes ont mis en avant une communication complexe entre les CSM et les macrophages. Les résultats suggèrent que les CSM possèdent des capacités immunomodulatrices capables de réguler la transition vers le phénotype M2. Les CSM sont capables de répondre à l'IL-6 en sécrétant la prostaglandine E2 (PGE2) dans leur environnement<sup>87</sup>. Cette molécule est capable d'induire chez les macrophages une transition vers le phénotype M2<sup>88</sup>. Cette signalisation s'intensifierait avec une sécrétion de facteurs ostéoinducteurs qui promeuvent la différenciation des CSM et représentent des signaux supplémentaires de transition vers une réponse anti-inflammatoire. Ainsi, une étude récente a montré qu'une partie de l'action de BMP2 serait en réalité via sa capacité à induire une transition en faveur du phénotype M2<sup>49</sup>.

L'inflammation est donc primordiale dans le processus de réparation. D'ailleurs, l'utilisation de médicament anti-inflammatoire (par exemple la cyclo-oxygénase 2<sup>43</sup>) a un effet délétère sur le processus de guérison des fractures. Toutefois, un environnement pro-inflammatoire est néfaste à la formation osseuse. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires typiques comme le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-11, et l'IL-17 favorisent la résorption osseuse par la différenciation et l'activation des ostéoclastes et inhibent la différenciation et la fonction des ostéoblastes. Par exemple, l'interféron  $\gamma$  induit une baisse du facteur ostéogénique Runx2. A l'inverse, des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou l'IL-13 ont démontré un effet ostéogénique<sup>85</sup>. Le maintien de l'inflammation est donc nocif pour la réparation. C'est le cas des lésions infectées qui ne guérissent pas <sup>89</sup>. Si l'inflammation n'est pas résolue, comme dans le cas d'une infection bactérienne sur le site de la blessure, la cicatrisation peut échouer.

Il existe donc une nécessité d'un équilibre subtil dans la fonction des macrophages M1/M2, qui semble indispensable à la guérison des fractures et à une régénération réussie <sup>90</sup>.

### 1.3 Facteurs mécaniques et mécanotransduction

En allant plus loin dans la compréhension du processus de réparation, il a été possible d'identifier d'autres facteurs déterminants, tels que le facteur mécanique.

Les signaux mécaniques et physiques qui se produisent lors de la marche et d'autres types de mouvements jouent un rôle crucial dans le maintien d'un os sain. Lors de l'application dynamique de charges sur un os intact, des contraintes de cisaillement stimulent les ostéocytes à produire des molécules de signalisation. Cette transduction de messages mécaniques par les ostéocytes est indispensable au maintien d'un équilibre entre ostéorésorption et formation osseuse. Cette communication joue aussi un rôle en situation de fracture et est liée notamment à la stabilité de la lésion. Différentes études ont comparé *in vivo* la quantité d'ossification en présence de systèmes de stabilisation variés. Il a été observé que lorsqu'une fracture n'est pas fixée de manière stable, l'ossification est augmentée. Une stimulation mécanique semblerait notamment promouvoir l'apparition de cal cartilagineux<sup>91</sup>, là où une forte stabilité peut permettre une ossification intramembranaire. Ces événements mécaniques ne concernent pas que l'ossification. Elles s'appliquent tout au long du processus de réparation. C'est par exemple le cas dans les phases précoces où une stimulation mécanique améliore la capacité pro-angiogénique de l'hématome <sup>92</sup>. Toutefois, une trop grande instabilité entre les fragments osseux est néfaste. Elle entrave le remplacement du cartilage, diminue l'angiogenèse et empêche l'os de combler le défaut <sup>35</sup>.

Les contraintes induites sur le membre fracturé induisent, à l'échelle cellulaire, différentes informations mécaniques. La moindre contrainte à l'échelle macroscopique peut entraîner des stimulations mécaniques variées à l'échelle microscopique. Elles se traduisent de différentes manières. On considère qu'une cellule sur le site de la fracture peut recevoir des informations de type : contraintes de cisaillement, d'étirements ou de compression. De plus, il ne faut pas non plus omettre les propriétés mécaniques inhérentes au site de lésion, qui dépendent de la matrice extracellulaire. Enfin, dans le cadre de la reconstruction osseuse un aspect mécanique est important, il s'agit des propriétés du substrat sur lequel les cellules adhèrent. On entend par là, la rigidité ou l'élasticité du support ainsi que de la topographie, avec le paramètre de rugosité. La rugosité a pour objectif de quantifier l'ampleur des irrégularités sur une surface. Elle intègre notamment l'écart entre le relief le plus haut et le relief le plus bas.

Le processus par lequel une cellule détecte les changements de son environnement externe et génère un signal biochimique implique de nombreuses voies. Ces voies comprennent la détection des forces mécaniques par des récepteurs ("mécanosenseurs")<sup>93</sup> localisés à la membrane plasmique (Figure 11). Ces récepteurs vont transmettre l'ensemble des signaux via l'activation de signalisations intracellulaires (mécanotransduction), qui vont varier selon le récepteur activé. L'ensemble est capable d'exercer un effet ostéogénique.

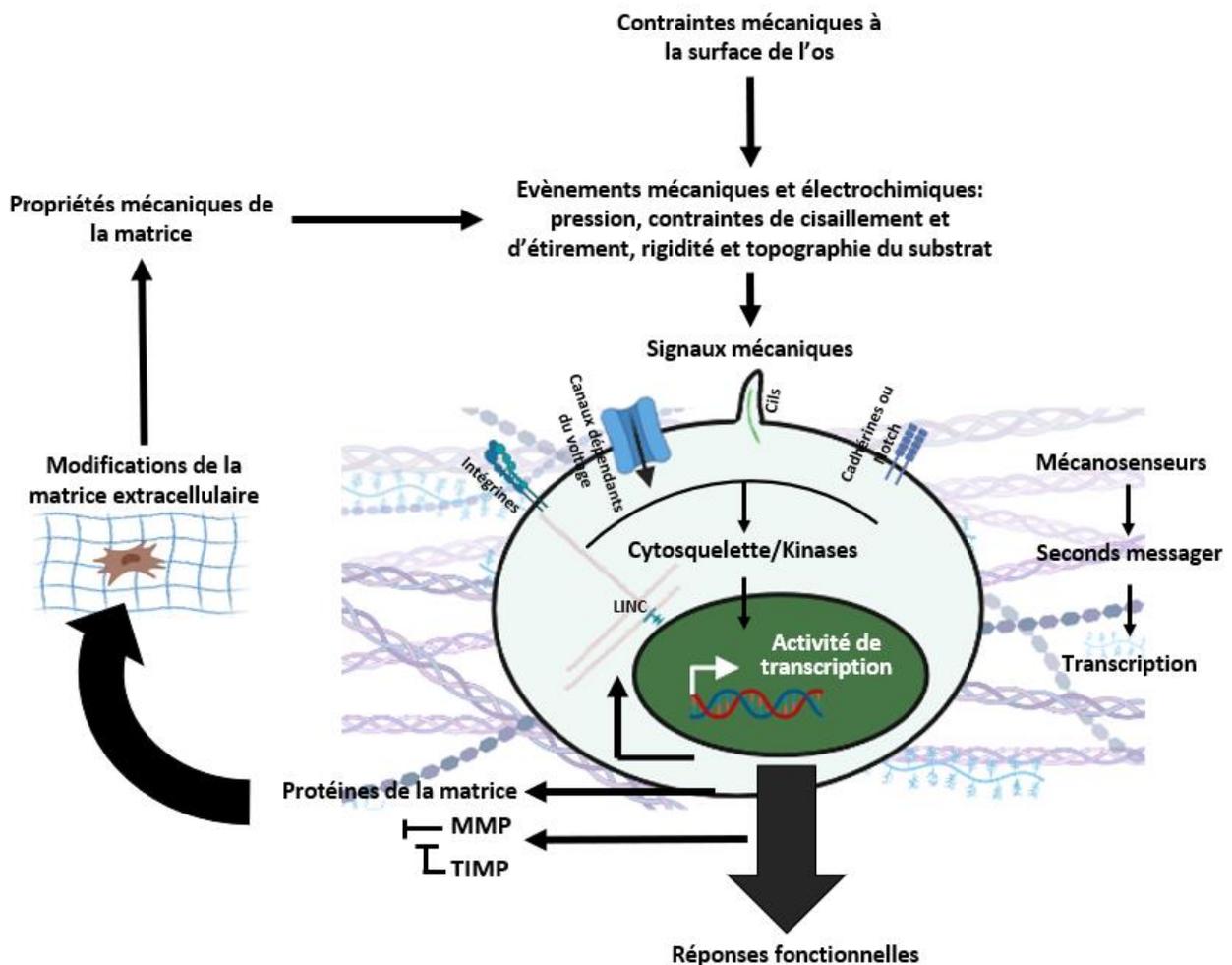


Figure 11 : **Illustration de l'intégration de signaux mécaniques par les cellules.** LINC : de l'anglais « Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton », MMP : métalloprotéases matricielles, TIMP : inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases. (adapté de <sup>94</sup>)

Les adhérences focales sont des acteurs clés dans le traitement de ces stimuli mécaniques. Ce sont des complexes protéiques qui permettent l'ancrage de la cellule. Au sein de ce complexe, les protéines s'organisent avec différents rôles. On identifie des protéines transmembranaires (intégrines), le cytosquelette d'actine et tout un ensemble de protéines intermédiaires entre les deux (FAK, vinculine, paxilline, Sarc...).

Les intégrines sont considérées comme les mécanosenseurs des propriétés de la MEC. Elles sont constituées d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ , dont l'association va leur conférer des spécificités de substrats différentes. Par exemple, les intégrines  $\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  se lient au motif RGD présent au sein de la fibronectine, là où les sous-unités  $\alpha_1\beta_1$  ou  $\alpha_2\beta_1$  se lient préférentiellement au collagène<sup>95</sup>. Ces récepteurs vont transmettre l'ensemble des signaux mécaniques perçus via l'activation de signalisations intracellulaires, qui varient selon le récepteur activé.

Les kinases associées aux intégrines vont ensuite jouer un rôle primordial dans la mise en place d'une réponse aux stimuli mécaniques externes. C'est le cas de FAK (Focal Adhesion Kinase). La phosphorylation de FAK augmente de façon linéaire avec la force de tension appliquée aux adhérences focales<sup>96</sup>. Cette phosphorylation a pour conséquence l'activation de protéines de la voie de signalisation des Rho-GTPases<sup>97</sup>. La protéine RhoA, ainsi que la kinase qui lui est associée (ROCK), sont déterminantes dans la régulation de la contractilité de l'actine via l'activité de la myosine. Les CSM s'engageraient dans la voie ostéogénique suite à l'activation de RhoA/ROCK, là où l'adipogenèse domine lorsque l'étalement cellulaire est limité et que la voie RhoA/ROCK est inhibée. L'activation de FAK a également été reliée à une activation de la voie des MAP kinases (MAPK)<sup>98</sup>, connue pour son rôle de transmetteur d'informations de l'environnement extracellulaire au noyau. Cette voie serait capable d'activer à son tour différents gènes ostéogéniques, notamment via une influence sur le facteur de transcription Runx2.

Le cytosquelette apparaît comme central dans les mécanismes de mécanotransduction. La modification du cytosquelette engendre une mise sous tension des filaments d'actine. Celle-ci va être transmise au noyau par la stimulation de mécanosenseurs nucléaires comme le complexe LINC (en anglais linker of nucleoskeleton and cytoskeleton)<sup>99</sup>. Il représente donc un transducteur direct de l'information. De plus, les modifications qui lui sont apportées vont elles-mêmes contribuer à créer ou amplifier un signal. L'ensemble de ces signaux, une fois transmis au noyau, déclenchent des réponses cellulaires. Dans le cas des CSM, les réponses sont notamment déterminantes dans l'induction des voies de différenciation<sup>100</sup>. Ces réponses fonctionnelles s'accompagnent d'adaptations morphologiques de la cellule<sup>101</sup>, du noyau<sup>102</sup>, de modifications des capacités de migration et de prolifération, de changements dans la matrice extracellulaire<sup>103</sup> et dans la sécrétion de facteurs de croissance.

Ainsi, les informations mécaniques font partie intégrante de la communication intercellulaire permettant la formation d'os. De nouvelles méthodes expérimentales *in vitro* ont permis d'étudier plus précisément l'impact de stimulations mécaniques. La Figure 12 introduit les conclusions faites par Jiang et al. sur l'impact des contraintes de traction sur la communication entre CSM et cellules endothéliales. Les auteurs n'ont pas réussi à mettre en évidence une réponse suffisante des cellules endothéliales à la traction. Toutefois, leur modèle de coculture a permis d'identifier un effet médié par les CSM. En effet, celles-ci répondent à cette contrainte mécanique par la sécrétion de VEGF, qui permet d'induire la sécrétion de facteurs ostéogéniques par les cellules endothéliales. Ainsi, cette contrainte de traction promeut une activité angiogénique et ostéogénique.

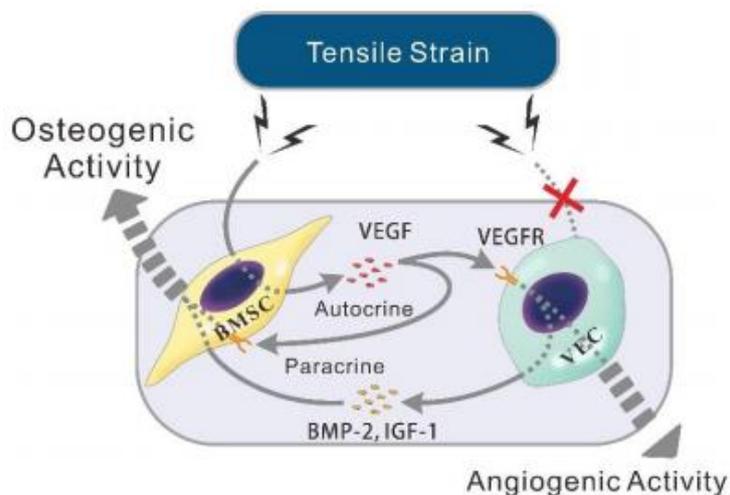


Figure 12 : **Représentation schématique des voies de signalisation mises en jeu dans les CSM et les cellules endothéliales en réponse à une contrainte de tension.** Les CSM (BMSC) augmentent la sécrétion de VEGF en réponse à une contrainte de tension. L'augmentation en VEGF augmente l'activité ostéogénique des CSM via une action autocrine. En réponse au VEGF sécrété par les CSM à la suite de la contrainte de tension, des cellules endothéliales (VEC) en coculture avec les CSM, augmentent leur activité angiogénique et sécrètent du BMP2 et de l'IGF-1 à destination des CSM. Le BMP2 et l'IGF-1 constituent des facteurs favorisant l'activité ostéogénique des CSM. Les expériences menées dans cet article n'ont pas observé d'effet de la contrainte de tension sur les cellules endothéliales (croix rouge) (source <sup>66</sup>).

## III. Réparer l'os : stratégies thérapeutiques

### 1. Un besoin thérapeutique

L'apparition de techniques thérapeutiques pour réparer les lésions de l'os remonte à des temps anciens. En 350 avant Jésus-Christ, Hippocrate établit la première description d'une immobilisation d'un membre endommagé. En effet, dans la plupart des lésions de l'os, il suffit de stabiliser le membre et de limiter son utilisation pour permettre au tissu de se reformer. Aujourd'hui, on effectue aussi des réductions de fractures, c'est-à-dire que l'on réaligne les fragments osseux dans la position la plus anatomique possible, puis on immobilise le tout. Plusieurs techniques d'immobilisation sont possibles. On parle de réduction fermée lorsqu'il n'y a pas nécessité d'intervenir chirurgicalement. C'est le cas avec les plâtres et des fixateurs externes. A l'inverse, on parle de réduction ouverte lorsqu'une approche chirurgicale est requise. C'est le cas en présence de fractures déplacées. La fixation interne implique l'utilisation d'implants chirurgicaux pour maintenir les deux extrémités opposées de la fracture. Les méthodes de fixation interne les plus couramment utilisées sont les plaques, les vis, les cerclages et tiges intramédullaires. Toutefois, il faut bien comprendre que ces méthodes reposent sur le processus naturel de réparation et ne sont pas infaillibles. Elles ne conviennent pas à toutes les situations. Le nombre d'acteurs cellulaires et la temporalité de la réparation sont autant de problèmes possibles pouvant se conclure par une mauvaise réparation. Ainsi, le processus de réparation osseux peut être influencé par les facteurs inhérents au défaut osseux, mais aussi par divers facteurs individuels tels que l'âge, le régime alimentaire et la présence de troubles osseux sous-jacents. Ils peuvent être classés en deux catégories : les facteurs locaux et les facteurs systémiques. Une liste non exhaustive de ces facteurs vous est présentée ci-dessous<sup>36</sup>.

#### Facteurs locaux

- Caractéristiques de la fracture : Taille, stabilité, alignement et dommages aux tissus mous environnants.
- Infections bactériennes
- Approvisionnement en sang et présence d'un hématome

#### Facteurs systémiques (ces facteurs prédisposent à une mauvaise cicatrisation)

- Vieillesse
- Malnutrition/Obésité
- Cigarette
- Modulation hormonale (ménopause, diabète, maladie parathyroïdienne)
- Pathologies osseuses (ostéoporose, ostéomalacie)

Malgré l'efficacité d'adaptabilité de l'os même face à des situations traumatiques inattendues, l'os peut se retrouver dans l'incapacité de répondre efficacement. Environ 10 % des fractures ne guérissent pas normalement<sup>35</sup>.

La **non-union** d'une fracture correspond à une réparation incomplète. Elle concerne les fractures théoriquement capables d'être réparées suite à une réduction et une stabilisation. La définition communément admise d'une non-union est une fracture qui persiste pendant au moins neuf mois, en l'absence de signes radiographiques de progression de la guérison pendant trois mois consécutifs<sup>104,105</sup>. Globalement, les non-unions présentent une persistance de tissu fibreux, d'os tissé et de cartilage au niveau du site de la lésion, sans évolution vers une formation osseuse mature et fonctionnelle.

Les **défauts de taille critique** sont des défauts qui ne peuvent être réparés par l'organisme. La perte osseuse peut résulter de l'extrusion de fragments au moment de la blessure ou lors du débridement d'une fracture ouverte, lorsque des segments d'os dévitalisés sont enlevés, créant ainsi un défaut. De plus, des pertes osseuses peuvent être induites suite à des interventions nécessitant un débridement de l'os, à des craniectomies, des atrophies mandibulaires ou la résection de tumeurs ou kystes osseux. Dans le cas de défauts de taille critique, la cicatrisation naturelle est impossible. Malheureusement, aucun consensus n'existe quant à un seuil pour lequel on considère un défaut critique<sup>106,107</sup>. La taille critique dépend de la localisation anatomique du défaut et de l'état de l'enveloppe de tissus mous qui l'entoure. Différentes définitions de tailles ont été proposées: 2,5 cm<sup>106</sup> ou plus de 2 fois la largeur de l'os<sup>40,108</sup>. Il est également intéressant de noter qu'une non-union n'est pas la même chose qu'un défaut de taille critique. Un défaut de taille critique possède souvent une réponse physiologique adéquate mais fait face à une incapacité à remplacer une trop grande perte osseuse. Ainsi, les défauts critiques peuvent évoluer vers des non-unions, mais une non-union peut se produire sans perte osseuse initiale.

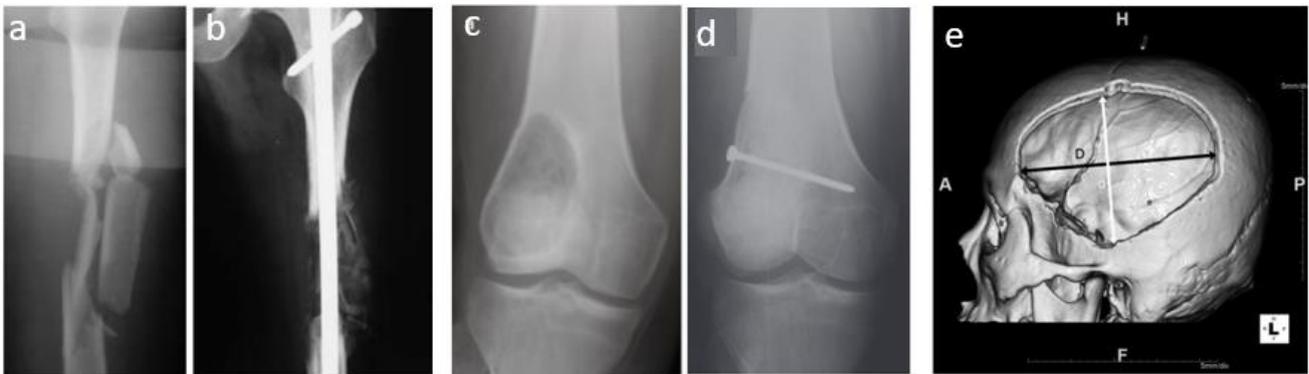


Figure 13 : **Exemple de radiographies présentant trois défauts osseux.** a) Fracture ouverte comminutive du fémur. L'os était trop endommagé pour envisager l'alignement et la fixation des débris. b) Il a donc été nécessaire d'éliminer tous les débris qui obstruaient la lésion et poser ce qu'on appelle une tige médullaire pour stabiliser l'os. Ici, la stratégie thérapeutique a nécessité le recours à une greffe osseuse, pas visible sur cette radiographie (source<sup>109</sup>). c) La partie ovale légèrement plus sombre correspond à une tumeur du fémur distal d) Le retrait de la tumeur a laissé un défaut d'une taille relativement importante et compromettant la fonction du fémur. Son traitement a été fait par comblement du défaut avec une greffe d'os puis fixation à l'aide d'une vis (source<sup>110</sup>). e) Reconstruction en 3D par scan micro Ct d'une craniectomie décompressive en vue latérale. Ce scan présente l'ampleur du défaut osseux qui a été généré pour permettre la dépressurisation du cerveau et l'élimination de débris osseux. Il a été fait en prévision du design d'un implant synthétique par imprimerie 3D pour correspondre à la forme du crâne (source<sup>111</sup>).

Une multitude de traumatismes subis par l'os ou de troubles osseux nécessitent une intervention thérapeutique par chirurgie pour combler la perte de fonction (Figure 13). Plusieurs méthodes sont envisageables pour aider le patient à retrouver la fonction du tissu squelettique endommagé. Selon les situations, on peut identifier deux stratégies. Il est possible de recourir à l'utilisation d'une prothèse qui a pour but de remplacer le tissu afin de prendre en charge la fonction manquante. C'est en particulier le cas au niveau des articulations avec les prothèses de hanches ou de genoux. L'autre solution thérapeutique consiste à aider l'os à retrouver son intégrité via l'utilisation de substitut osseux tels que **l'autogreffe osseuse** ou des **biomatériaux**.

## 2. La greffe osseuse

Historiquement, les chirurgiens comblaient une perte osseuse avec des matériaux comme des céramiques, du métal ou de l'os. Nous avons des traces historiques de procédures chirurgicales remontant à l'Égypte ancienne. Mais les premières interventions documentées ont notamment débuté avec le travail de Meekeren<sup>112</sup> en 1668 qui, pour soigner un soldat blessé, utilisa un fragment d'os de chien<sup>113,114</sup>. Les connaissances se sont développées à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle, avec le travail de plusieurs chirurgiens comme Léopold Ollier qui a introduit le terme de greffe osseuse avec son traité expérimental et clinique de la régénération des os. Puis, au début du 20<sup>ème</sup> siècle, Fred Albee a décrit les premières procédures de greffes osseuses autologues<sup>115</sup>. Effectivement, le meilleur substitut au tissu osseux reste encore l'os lui-même. Particulièrement l'os du patient. Ainsi, la greffe osseuse autologue s'est peu à peu imposée comme la référence pour le comblement d'une perte de substance osseuse<sup>40</sup>. Cette procédure consiste à combler le défaut osseux avec de l'os du patient prélevé sur une autre zone du corps. En effet, l'os possède l'ensemble des caractéristiques nécessaires pour promouvoir l'ostéogénèse. De plus, le greffon est compatible du point de vue immunitaire (pas de problème de rejet).

En réalité, la greffe d'os autologue est bien plus subtile. Son efficacité dépend grandement du tissu utilisé comme substitut et de la vascularisation du greffon. Un greffon vascularisé maintient la viabilité cellulaire et possède un meilleur potentiel ostéogénique. Toutefois, les sites de prélèvements sont rares (fibula principalement) et l'implantation requiert une grande technicité chirurgicale<sup>116</sup>.

Malgré l'évolution des procédures chirurgicales, la greffe autologue présente plusieurs limites<sup>40,117</sup> :

- Morbidité du site de prélèvement
- Quantité limitée de matériel disponible
- Qualité variable du greffon (notamment chez les personnes âgées)
- Allongement de la durée d'opération et augmentation de la perte de sang
- Risque d'infection du site donneur
- Recours à l'utilisation de plaques, vis ou échafaudages pour combler le manque de stabilité mécanique des greffons

Ces limites ont conduit à imaginer d'autres biomatériaux qui puissent remplacer la greffe autologue dans la reconstruction osseuse.

## 3. Biomateriaux pour l'os : les propriétés souhaitées

La définition établie en 1986 lors de la conférence de Chester précise que les biomatériaux sont « des matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques ».

Les progrès combinés en biologie et en matériaux ont permis le développement d'une multitude de biomatériaux, ouvrant des perspectives nouvelles dans la prise en charge des défauts osseux. Des biomatériaux naturels ou synthétiques sont disponibles pour la réparation des tissus. Leur rôle est de fournir un soutien mécanique et structural, de restaurer la fonction de l'organe lésé, de s'intégrer au tissu endommagé et de favoriser la cicatrisation. En reconstruction osseuse, plusieurs termes décrivent les qualités que l'on souhaite d'un implant pour promouvoir ses capacités d'intégration et son potentiel régénérateur. Elles sont décrites ci-après.

### 3.1. Biocompatibilité

Le facteur le plus important qui permet de distinguer un biomatériau de n'importe quel autre matériau est sa capacité à entrer en contact avec des tissus humains sans engendrer de réaction nocive à l'organisme.

Le terme de biocompatibilité a ainsi été créé pour faire référence à ces matériaux qui seraient exempt de toxicité pour l'organisme. En termes de toxicité on considère par exemple : la cytotoxicité, la mutagénicité, l'immunogénicité ou la génotoxicité. Toutefois, il existe encore beaucoup d'incertitudes concernant les mécanismes assurant cette biocompatibilité<sup>118</sup>. Les facteurs qui vont intervenir sont multiples et ne dépendent pas uniquement des propriétés inhérentes au matériau mais dépendent aussi de l'environnement. Effectivement, un matériau qui déclenche une coagulation suite au contact avec le sang n'a pas la même biocompatibilité pour une application cardiovasculaire ou en implant osseux. Le biomatériau n'est pas pour autant lui-même toxique. Mais la réponse qu'il peut provoquer le sera. La liste ci-dessous présente différents facteurs intervenant dans la réponse de l'hôte à un implant osseux. Chacun de ces paramètres est impliqué dans l'intégration de l'implant avec l'os et son potentiel de réparation.

#### **Exemple de variables liées au matériau capables d'influencer la réponse de l'hôte**<sup>118</sup> :

- Porosité<sup>119</sup>
- Hydrophilie/Hydrophobie<sup>120,121</sup>
- Energie de surface
- Topographie de surface<sup>122,123</sup>
- Profil de dégradation et toxicité des produits de dégradation<sup>124,125</sup>
- Relargage d'ions et toxicité des ions<sup>40,126</sup>
- Propriétés mécaniques (élasticité, rigidité)<sup>127,128</sup>

#### **Exemple d'évènements de la réponse locale de l'hôte à un biomatériau** :

- Adsorption des protéines<sup>129,130</sup>
- Adhésion et activation des plaquettes<sup>131,132</sup>
- Activation de la cascade de coagulation<sup>133,134</sup>
- Génotoxicité<sup>135</sup>, cytotoxicité<sup>136</sup>
- Réponses des cellules endothéliales<sup>137</sup>
- Activation des neutrophiles, des macrophages, du complément<sup>138,133,139-141</sup>
- Réponses des cellules de l'os<sup>142-144</sup>
- Réponses des cellules souches mésenchymateuses<sup>145-147</sup>
- Production d'anticorps (réponse immunitaire/ anaphylaxie)<sup>148,149</sup>

L'usage des biomatériaux a beaucoup évolué. Pendant longtemps, un bon matériau était choisi pour être biocompatible et avoir des propriétés mécaniques adaptées au site d'implantation. Aujourd'hui, les attentes sont plus grandes. On recherche de plus en plus des matériaux qui puissent être biologiquement fonctionnels. Outre l'absence d'effets indésirables, il est maintenant question d'avoir des implants qui possèdent certaines propriétés capables d'engendrer spécifiquement une réponse chez l'hôte. Cela permet d'optimiser le pouvoir thérapeutique de l'implant dans une situation donnée. Différentes propriétés ont été décrites pour résumer les effets souhaités par un biomatériau destiné à l'os.

## 3.2. Ostéoconduction

La Haute Autorité de Santé (HAS) définit l'ostéoconduction comme la propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire, à partir du tissu receveur au contact de ce matériau. On voit ici l'implant comme un échafaudage pour recevoir le tissu de l'hôte. La croissance osseuse à la surface d'un implant dépend des cellules osseuses déjà présentes ou recrutées suite au traumatisme. Une multitude de paramètres sont capables de favoriser l'adhérence, la prolifération et la sécrétion de matrice par ces cellules. Les propriétés de l'implant dépendent principalement de la nature du biomatériau et du processus de fabrication. On distingue ainsi des caractéristiques chimiques (composition du matériau) et physiques (architecture au niveau de la macro et microstructure).

### 3.2.1. Caractéristiques chimiques

Selon la composition de l'implant, il est possible d'observer des différences dans la capacité d'adhérence ou de prolifération des cellules à la surface. Par exemple, après 3 jours de culture de fibroblastes à la surface d'implants synthétiques, on retrouve trois fois plus de cellules avec le titane, comparé à un composite carbone-carbone et presque deux fois plus que sur le polyéthylène<sup>150</sup>. Certaines compositions chimiques sont donc plus favorables à la prolifération cellulaire que d'autres. Ainsi, il est largement reconnu que les implants en phosphate de calcium démontrent des propriétés ostéoconductrices. Ces biomatériaux peuvent être de compositions différentes : hydroxyapatite<sup>151</sup>,  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP)<sup>152</sup>, Phosphate de calcium biphasique (BCP)<sup>153,154</sup>. Les particules qui les constituent peuvent aussi être de morphologies différentes (Figure 14). Ces biomatériaux miment la composante minérale du tissu osseux. Ils sont très propices à l'adhérence des cellules osseuses.

On assiste donc au développement de nouveaux implants démontrant de meilleures propriétés ostéoconductrices. C'est notamment le cas des implants métalliques dont la surface est recouverte par de l'hydroxyapatite<sup>155</sup>, du  $\beta$ -TCP<sup>156</sup> ou des peptides RGD<sup>157-159</sup>. La séquence RGD est l'un des site essentiel d'attache à la MEC. Elle représente un site de liaison pour une grande partie des intégrines connues.

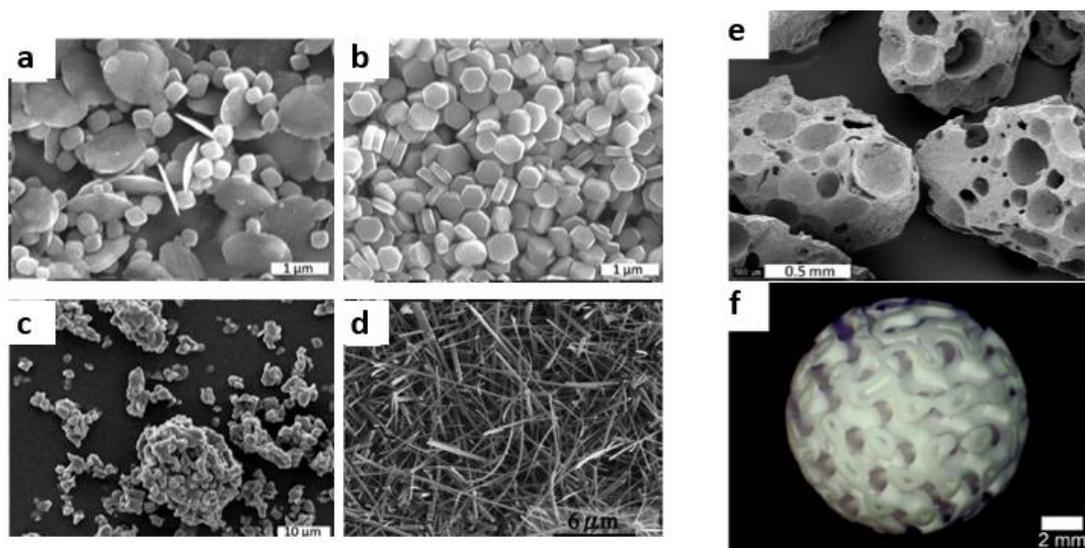


Figure 14 : Microscopie électronique à balayage montrant la morphologie de particules de  $\beta$ -TCP ainsi que des exemples d'échafaudages de  $\beta$ -TCP. a,b) particules de  $\beta$ -TCP précipitées. c) Morphologie d'une poudre commerciale de  $\beta$ -TCP. d) Fibres de  $\beta$ -TCP. e) Granules de  $\beta$ -TCP obtenues par broyage de bloc de  $\beta$ -TCP. f) Exemple d'échafaudage de  $\beta$ -TCP obtenu par une méthode d'imprimerie 3D. (source<sup>152</sup>)

### 3.2.2. Caractéristiques structurelles, porosité de l'implant

Le biomatériau doit rassembler un ensemble de propriétés appropriées pour que le tissu du patient puisse s'y intégrer et s'y développer. Une des propriétés clés dépend de sa structure micro et macroscopique. Les avancées en conception de biomatériaux ont permis de promouvoir une grande variété de conformations (Figure 14).

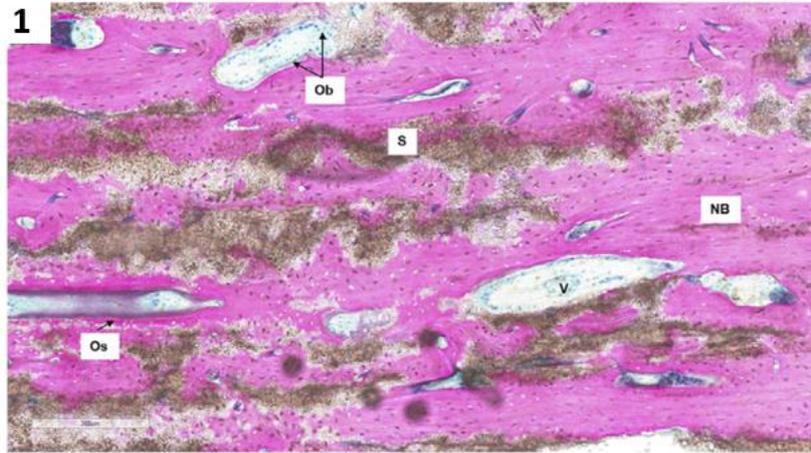


Figure 15 : **Images histologiques de l'interface os-implant poreux.** Coloration histologique au bleu de toluidine, 6 mois après la reconstruction d'un défaut cortical critique chez le mouton à l'aide d'un échafaudage 3D en hydroxyapatite. Ob : ostéoblastes ; Os : ostéoïde ; S : implant ; NB : nouvel os ; V : vaisseaux. (source <sup>160</sup>)

Afin d'espérer obtenir une intégration optimale de l'implant, il faut en effet lui donner la possibilité d'être envahi par des cellules pour y former un tissu osseux et des vaisseaux sanguins (Figure 15). Dans une optique de biomimétisme, on tend donc à créer des biomatériaux ayant une porosité comparable à celle de l'os. La porosité est définie comme le pourcentage d'espace vide au sein d'un solide. Cette propriété structurale est indépendante du matériau en lui-même et dépend plus de la méthode de conception de l'échafaudage à partir de ce matériau (Figure 16). Les pores qui sont créés peuvent être de différentes formes. On différencie ainsi les pores fermés, qui ne sont pas accessibles, les pores dit « aveugles », qui sont des culs de sacs à l'intérieur du matériau, là où les pores traversants permettent le passage d'un fluide d'une extrémité à l'autre du matériau. La composition poreuse en trois dimensions accélère le processus de régénération osseuse. En effet, les pores fournissent un espace pour la prolifération des cellules et des vaisseaux sanguins. Les cellules pourront à terme se servir de cet échafaudage pour y déposer une matrice osseuse en 3D. La vascularisation permet, quant à elle la bonne diffusion de l'oxygène et des nutriments au sein de l'implant.

Une multitude d'études ont cherché à trouver la taille de pore optimale pour favoriser une ossification<sup>161,162</sup>. La taille minimale requise pour permettre la formation de tissu minéralisé semble être de l'ordre de 50  $\mu\text{m}$ <sup>163</sup>. Des pores de taille plus grande augmentent l'efficacité de pénétration des tissus et de la vascularisation. Toutefois, la porosité altère les propriétés mécaniques de l'implant. Elle altère également les propriétés de dégradation<sup>164</sup>. En effet, des biomatériaux dégradables, capables de se dégrader au fur et à mesure que l'os se forme et le remplace, sont aussi développés. Cependant, l'équilibre de dégradation est très compliqué à trouver. Une dégradation trop rapide compromet le soutien mécanique censé être apporté par l'implant.



Figure 16 : **Exemple d'implants avec des compositions et porosités variées.** **1a)** Images d'échafaudages de  $\beta$ -TCP et **1b)** d'une biocéramique (bredigite) obtenue par méthode d'impression 3D (source <sup>165</sup>). **2)** Photographie de 3 implants de titane fabriqués avec différentes porosités grâce à une technique d'empilement de sphères de titane. Les implants sont présentés avec une taille croissante des sphères de titane, de 600 $\mu$ m à 1250 $\mu$ m (source <sup>166</sup>). **3)** Reconstruction 3D par  $\mu$ Ct de trois échafaudages. De haut en bas on retrouve : un implant fait par impression 3D de poly (L-lactide)/hydroxyapatite ;  $\beta$ -TCP ; matrice osseuse déminéralisée. A droite, les valeurs de porosité et taille de pores calculées pour chacun de ces échafaudages. (source <sup>167</sup>)

### 3.3. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques du biomatériau sont particulièrement importantes pour des applications en lien avec l'os. Elles doivent être au plus proche de celles du tissu à régénérer. La raison est que l'implant doit avoir une rigidité adéquate qui permet d'encaisser les efforts à la place de l'os en réparation. Il doit être suffisamment rigide dans le temps pour permettre la déposition de tissu osseux nouvellement formé. Dans le cas de réparation maxillo-faciale, l'implant doit délivrer une rigidité suffisante pour assurer l'esthétique de la reconstruction. Il peut également être gage de protection immédiate de certaines structures vitales (plancher orbital ou cranioplasties). Toutefois, l'os doit pouvoir retrouver une sollicitation suite à la réparation. Cela fait écho au processus de modelage décrit partie I.2.2. Un os qui ne subit aucun stress mécanique est susceptible à la résorption. Là où la rigidité d'un implant est bénéfique pendant la réparation, elle peut devenir un frein au développement d'un os fonctionnel et peut devenir néfaste aux os environnants. En effet, un implant rigide absorbe les contraintes mécaniques, empêchant l'os d'être stimulé. Ce phénomène est appelé en anglais « stress shielding ». L'élimination des contraintes typiques de l'os par un implant a pour conséquence la réduction de la densité osseuse.

Le tableau 2 présente des exemples de biomatériaux utilisés en réparation osseuse et certaines de leurs propriétés mécaniques.

Tableau 2 : **Comparaison de propriétés mécaniques de biomatériaux utilisés comme implants osseux**. La force de compression (compressive strength) est la capacité d'un matériau à résister à des charges tendant à réduire sa taille. Elle représente la quantité de compression que le matériau peut subir avant de rompre. A l'inverse, la résistance à la traction (tensile strength) est la capacité de résister à des charges tendant à l'allonger. Le module de Young, ou module d'élasticité, est un paramètre qui englobe différentes caractéristiques mécaniques. Il est défini comme la contrainte mécanique qui engendre un allongement de 100 % de la longueur initiale d'un matériau. Un module de Young élevé désigne un matériau rigide (adapté de <sup>168</sup>).

	Compressive Strength [MPa]	Tensile Strength [MPa]	Young's Modulus [GPa]
Cancellous bone	2-20		01-2
Cortical bone	100-200	50-151	5-20
Alloy TiAl <sub>6</sub> Nb <sub>7</sub>	1074-1086	≥900	≥105
Alloy Ti <sub>6</sub> Al <sub>4</sub> V	450-1850	≥860	≥100
Polyethylene		38-49	≥3
Mg Alloys	65-100	170-270	41-45
Aluminum oxide ceramic Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	150	≥500	≥380
Alloy Mg-Zn		67-169.5	42.3-45.3
Hydroxyapatite HaP	500-1000	40-300	80-120
Porous hydroxyapatite 82-86%	120-900	3	0.83-1.6 × 10 <sup>-3</sup>
Hydroxycellulose hydrogel	32	3.5	2.23
Bioglass	800-1200	42	40-140
PEEK	80	≥100	3-4
PLA		50-70	2.4
PLGA	2.90-4.19	41.4-55.2	1.4-2.08
PCL		20.7-34.5	0.21-0.35
Chitosan fibers		9.0-16.0	250-380
PLA/chitosan	47.1	44.5	
Silk		500-740	5-17

Ainsi, trouver un matériau biocompatible avec des propriétés mécaniques équilibrées n'est pas évident. Comme il vient d'être mentionné, la résistance mécanique est dépendante de la composition, de la méthode de fabrication et de la morphologie de l'implant. Par exemple, le paramètre de porosité est un excellent moyen d'augmenter le potentiel ostéoconducteur de l'implant. Il se fait toutefois au détriment des propriétés mécaniques et augmente la vitesse de dégradation. La taille optimale des pores dépend donc de l'application et du matériau utilisé. Lorsqu'il est utilisé dans des conditions de charge, on priorisera le choix d'un implant avec de bonnes propriétés mécaniques, parfois au détriment de ses propriétés ostéoconductrices.

### 3.4. Ostéoinduction

L'ostéoinduction correspond au processus de stimulation de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en cellules productrices d'os. Le recrutement de cellules immatures et la stimulation de ces cellules dans la voie de différenciation préostéoblastique est un phénomène biologique courant. La réparation naturelle de l'os peut être vue comme un ensemble d'évènements ostéoinducteurs. Comme décrit dans la partie II.1.2, elle découle principalement de l'action de protéines (facteurs de croissance, cytokines), qui contrôlent les différentes phases de la différenciation en ostéoblastes (Figure 17). Ces protéines permettent l'activation de facteurs de transcription spécialisés dans la transcription de gènes ostéogéniques, qui codent pour des protéines impliquées dans la formation osseuse. Selon leur rôle, elles sont spécifiques de certaines phases de la différenciation et leur expression suit une cinétique finement régulée. Elles représentent ainsi des marqueurs de la différenciation en ostéoblastes.

Le contrôle de la différenciation provient aussi des propriétés physico-chimiques de l'implant. C'est notamment le cas via l'action des contraintes mécaniques qui peuvent induire une mécanotransduction favorable à la différenciation<sup>121,147</sup> (Figure 11).

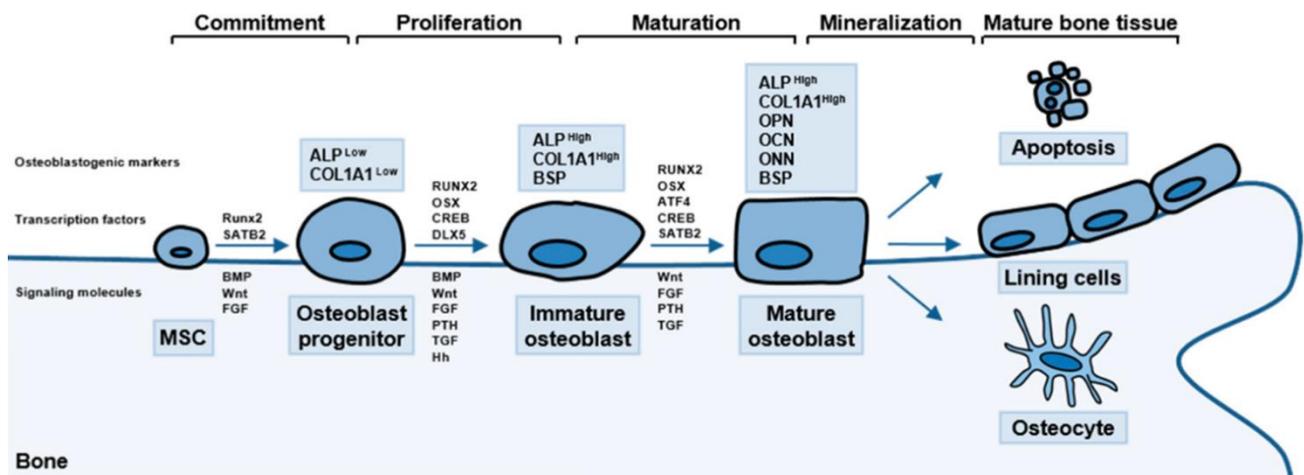


Figure 17 : **Représentation schématique de la différenciation ostéoblastique.** Un ensemble de molécules intervient à différents stades de la différenciation. Ces molécules activent des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de protéines clés pour la formation osseuse. (source<sup>169</sup>)

L'objectif final est d'avoir un biomatériau présentant la meilleure **ostéointégration** (ou osséointégration<sup>170</sup>). Ce terme, comme son nom l'indique, fait référence aux capacités d'un matériau à s'intégrer parfaitement au sein ou au contact du tissu osseux receveur (Figure 18). Pour cela, l'absence de formation de tissu fibreux anormal à l'interface est primordiale. Une bonne ostéointégration est gage de stabilité des fonctions et de la sécurité de l'implant dans le temps.

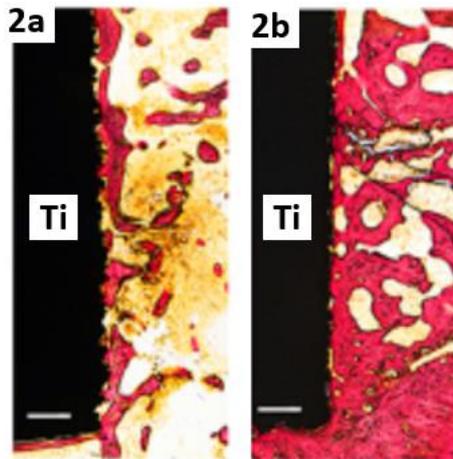


Figure 18 : **Images histologiques du contact os-implant.** Coloration de Van Gieson (fuchsine acide / d'acide picrique, coloration du collagène) après 6 semaines d'implantation d'un implant en alliage de titane (Ti). 2a et 2b présentent deux méthodes induisant une rugosité différente à la surface de l'implant (source <sup>171</sup>). L'os nouvellement formé est en rose et l'échelle est de 200µm. On observe un lien plus étroit entre la surface de l'implant en 2b et l'os qui se régénère. On est ici dans une situation de meilleure ostéointégration en 2b comparé à 2a.

## 4. Les biomatériaux en développement pour régénérer l'os

### 4.1. Les substituts osseux

On peut considérer plusieurs stratégies implantaires pour aider la réparation d'une lésion de l'os. Quand on considère l'utilisation de biomatériaux pour combler le défaut osseux, on parle dans ce cadre de substituts osseux. Ce sont des biomatériaux qui ont pour objectif de combler un défaut osseux et permettre une reconstruction de l'os. La société française de recherche orthopédique et traumatologique (SOFROT) définit les substituts osseux comme (rapport d'évaluation de mai 2013 de la HAS) :

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

- 1) destiné à l'implantation chez l'homme ;
- 2) dans la perspective d'une reconstitution du stock osseux ;
- 3) par le renforcement d'une structure osseuse ou le comblement d'une perte de substance osseuse d'origine traumatique ou orthopédique ».

Ils sont de formes diverses, mais nécessitent toutefois de pouvoir s'adapter au défaut osseux qu'ils doivent combler (Figure 19). Ils peuvent être utilisés seuls lorsque leurs propriétés mécaniques le permettent, ou en association avec des implants qui peuvent servir d'armatures ou de moyens de fixation.



Figure 19 : **Les différentes formes de substituts osseux commercialisés actuellement** (source <sup>172</sup>).

En réalité, le besoin de substitut osseux se justifie par le besoin d'une méthode fiable pour remplacer la greffe osseuse autologue. Il est donc nécessaire de reproduire au mieux les différents atouts de la greffe autologue, qui est à la fois ostéoconductive, ostéogénique et ostéoinductive (Figure 20). Elle manque néanmoins de stabilité mécanique. La raison est que la majorité des greffes osseuses correspondent à des petits morceaux d'os sain. Ces morceaux sont agglomérés en une sorte de pâte qui est appliquée pour combler la lésion de l'os.

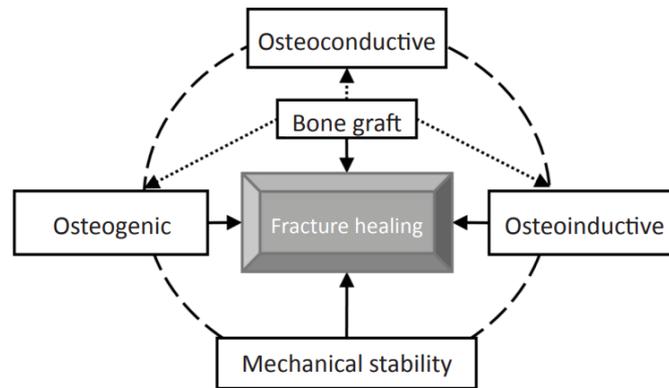


Figure 20 : **Propriétés de la greffe osseuse dans la réparation de défauts osseux.** La greffe osseuse est ostéoconductive, ostéoinductive et ostéogénique. Elle est cependant considérée comme inapte pour conférer une stabilité mécanique (source <sup>173</sup>).

Parmi la multitude de substituts osseux développés ou à l'étude, on distingue deux grandes familles : ceux d'origine naturelle (humaine, animale, végétale) et ceux d'origine synthétique.

#### **Allogreffes**

Les allogreffes sont collectées de donneurs humains. Pour permettre la compatibilité immunitaire, elles sont décellularisées. Deux approches sont prédominantes. Les allogreffes minéralisées, qui sont intéressantes pour leurs performances mécaniques et les allogreffes déminéralisées, qui subissent un traitement acide permettant leur déminéralisation. Les greffons gardent une MEC et certains facteurs de croissance associés à la MEC.

#### **Xénogreffes**

Les xénogreffes sont produites à partir de tissus d'origine animale. Ils sont principalement d'origine bovine, porcine ou dérivés de coraux. Les tissus sont décellularisés. Ils peuvent être sous forme de granules et utilisés comme comblement de défauts, notamment en application maxillaire. Ces xénogreffes sont parfois modifiées par traitement thermique pour les céramiser (cristallisation de la structure pour la rendre plus dure) Ces substituts osseux sont utilisés en tant que hydroxyapatites biologiques. Ils ont pour principal intérêt d'être ostéoconducteurs.

Les allogreffes et les xénogreffes sont toutefois moins efficaces que la greffe autologue. Elles comportent un risque de transmission de maladies et les traitements que les greffons subissent pour limiter le risque de rejet diminuent leurs propriétés ostéogéniques<sup>174</sup>. De plus, ces greffes nécessitent des prérequis réglementaires et peuvent poser des problèmes éthiques. C'est notamment le cas vis-à-vis de certaines croyances religieuses.

#### **Synthétiques**

Les biomatériaux synthétiques sont de composition, structure et propriétés variées (Tableau 3). Pour plus de détails, les substituts osseux ont fait l'objet d'énormément de revues de littératures<sup>40,175-178</sup>. Pour résumer on peut identifier plusieurs catégories de substituts osseux:

### III. Réparer l'os : stratégies thérapeutiques

- Céramiques (sulfate de calcium, calcium phosphate, hydroxyapatite, zirconium, alumine)
- Polymères organiques (collagène, acides hyaluronique, fibrine, chitosane, alginate)
- Polymères synthétiques : (poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA), acide poly-L-lactique (PLA), acide polyglycolique (PGA), polycaprolactone)
- Verres bioactifs (principalement fait de silice, d'oxyde de sodium, d'oxyde de calcium et de phosphates (ex : 45S5))
- Métalliques (titane et ses alliages, acier inoxydable, alliages de cobalt)

Tableau 3 : Résumé des propriétés biologiques et limites des greffes osseuses et de certains substituts osseux (adapté de 40,176,179 à partir de 180-182)

Type de substitut		Ostéo-conduction	Ostéo-induction	Ostéo-genèse	Ostéo-intégration	Résistance mécanique	Avantages	Inconvénients
Grefe d'os autologue	Os spongieux	+++	+++	+++	+++	-	"Gold standard"	Faible résistance mécanique Disponibilité limitée Morbidité et infection potentielle au niveau du site donneur
	Os cortical	+	+	+	+	+++	Soutien structural et mécaniquement stable	Plus long à remodeler, difficile à récolter et à implanter Disponibilité limitée Morbidité et infection potentielle au niveau du site donneur
Grefe d'os allogénique	Os spongieux	+	+	-	++	-	Pas de second site chirurgical, durée de conservation longue si lyophilisé	Risque de réaction immunitaire, de rejet, ou de transmission de pathologies
	Os cortical	+	-	-	+	+++		
	Matrice osseuse déminéralisée	+	+	-	++	-	Contient des facteurs de croissance qui le rendent ostéoinductif	Propriétés variables selon la source et le procédé de fabrication
Substituts synthétiques	Sulfates de calcium	+	-	-	++	+	Bon marché, facile à préparer	Résorption (trop) rapide, résistance mécanique faible, seulement ostéoconducuteur
	Hydroxyapatites	+	-	-	+	++	Très biocompatible, meilleure résistance à la compression et à la traction comparé au phosphate tricalcique	Résorption (trop) lente, seulement ostéoconducuteur
	Phosphates de calcium (céramiques)	+	-	-	+	++	Même composition que l'os	Seulement ostéoconducuteurs, difficile à modeler
	Phosphates de calcium (ciments)	+	-	-	+	+	Faciles à mouler	Faible résistance mécanique
	Bioverres	+	+	-	+	+	Forme des liens forts avec les tissus mous et durs, relargue des ions potentiellement ostéoinducteur, propriétés antibactériennes	Dégradation rapide nocive pour les cellules (pH), que pour des défauts sans charges car fragile
	poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA)	-	-	-	-	+++	Maintien les implants orthopédiques en place	Inerte, exothermique et potentiellement toxique
	Titanium et ses alliages	-	-	-	+	+++	Biocompatible, résistance à la corrosion, légèreté	Inerte, haut module de young Faible résistance à l'usure
	Acier inoxydable	-	-	-	-	+++	Faible coût, facilement disponible, biocompatibilité acceptable, résiste à l'usure	Inerte, haut module de Young Faible résistance à la corrosion, Réaction allergique
	Alliages de Cobalt-chromium	-	-	-	-	+++	Résistance à l'usure et à la corrosion	Inerte, haut module de Young Coûteux et difficile à usiner Réactions allergiques
	Composite de phosphate de calcium + BMP2	+	++	-	++	++	La supplémentation en BMP2 augmente la bioactivité du phosphate de calcium et lui confère des propriétés ostéoinductrices	Besoin d'un relargage contrôlé dans le temps Un surdosage peut promouvoir la formation d'os ectopique, l'apparition de cancer, ostéolyse Coûteux

Pour être en adéquation avec son rôle dans la reconstruction osseuse, un substitut osseux idéal devrait être ostéoconducuteur, ostéoinducteur, ostéogénique et ostéointégrable. Il faudrait en plus qu'il possède de bonnes propriétés mécaniques et qu'il soit non toxique, et biodégradable (Figure 21). Comme vous pouvez le voir dans le Tableau 3, à ce jour, aucun biomatériau ne rassemble l'ensemble de ces propriétés.

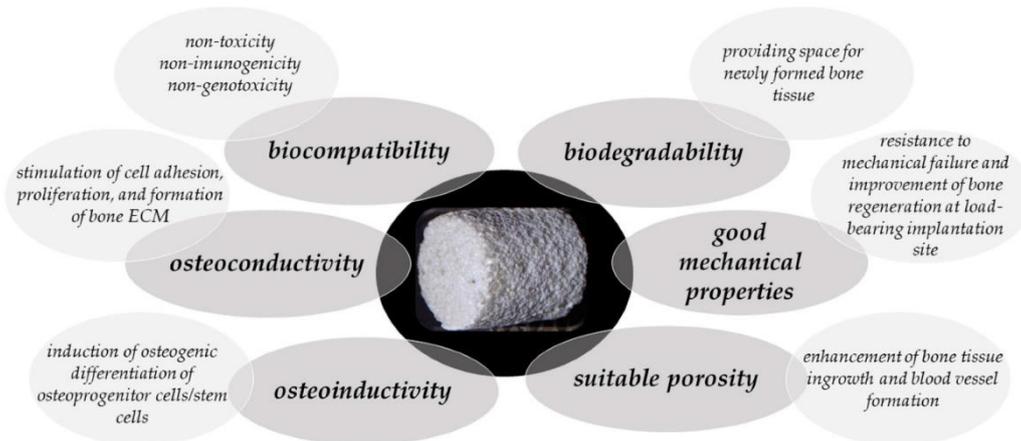


Figure 21 : Résumé des propriétés souhaitées pour un substitut osseux (source <sup>164</sup>)

En effet, certains défis majeurs demeurent :

- Polymères : la biocompatibilité n'est pas toujours adéquate et la résistance biomécanique est limitée.
- Métaux : des questions demeurent sur l'impact de la libération d'ions métalliques<sup>126</sup>. Les métaux ont une bioactivité limitée et une biodégradation difficile à envisager pour la majorité d'entre eux.
- Céramiques : matériaux relativement friables, nécessitant des techniques de fabrication complexes et encore peu reproductibles.

Enfin, pour l'ensemble de ces matériaux, il faut que la vitesse de dégradation soit en phase avec le taux de régénération des tissus osseux de remplacement. Il est donc nécessaire de poursuivre les avancées dans ce domaine.

## 4.2. Perspectives : l'ingénierie tissulaire

Les connaissances accumulées sur l'interaction des tissus humains avec un implant et plus globalement sur les mécanismes de la physiologie osseuse<sup>31</sup> ont ouvert des perspectives de développement de biomatériaux ayant différents rôles thérapeutiques.

Pour simplifier, on peut considérer que le choix du biomatériau et sa composition détermine la biocompatibilité de l'implant. La composition, mais surtout la méthode de conception, permet quant à elle de moduler les paramètres ostéoconducteurs <sup>183</sup>. Reste à conférer au matériau des propriétés ostéoinductrices. La majorité des études ont opté pour une approche médiée par l'ajout de protéines connues pour avoir un effet ostéoinducteur. Les BMP2 et BMP7 <sup>184</sup> ont été autorisées par la « Food and Drug Administration » (FDA) en complémentarité médicamenteuse pour leur capacité à augmenter la réparation osseuse. Pour en augmenter l'efficacité et la sûreté, des études tentent de développer une administration locale. Cela se traduit via la complémentarité de greffe avec de la BMP2 ou le recouvrement de biomatériaux, permettant ainsi d'augmenter le pouvoir ostéoinducteur d'implants (voir Tableau 3). Par exemple, l'utilisation d'une éponge de collagène imbibé de BMP2 dans la prise en charge de fracture ouverte du tibia a démontré une réduction significative des interventions secondaires et une consolidation beaucoup plus rapide des fractures ouvertes (221 jours contre 266 jours avec la pratique standard)<sup>185</sup>. Cependant, des travaux récents alertent sur les risques associés à l'utilisation de BMP. On a pu relever de nombreux effets indésirables tels que des complications inflammatoires, la formation d'os ectopiques et la formation de tumeurs.

Le succès relatif de ces stratégies ostéoinductrices a poussé à imaginer des biomatériaux encore plus innovants. On peut dans ce cadre citer les stratégies d'ingénierie tissulaire (Figure 22). Elles consistent à apporter des cellules ostéoprogénitrices et à provoquer leur différenciation en ostéoblastes à l'aide d'un facteur ostéoinducteur. Cela favorise ainsi la formation osseuse à l'intérieur d'une structure poreuse en trois dimensions, à la fois ostéoconductrice et biodégradable. L'objectif est à la fois d'augmenter le pouvoir ostéoinducteur d'un biomatériau via l'utilisation de facteurs de croissance, mais également de lui conférer des propriétés ostéogéniques via notamment la supplémentation en CSM. Cette stratégie est également observable dans la conception des hydrogels. Ce sont des mélanges de polymères dans une phase liquide, qui ont la particularité de gélifier sous certaines conditions. Il serait ainsi possible d'imaginer pouvoir les injecter en non-invasif et de les faire gélifier au sein du défaut osseux. Une grande perspective dans l'utilisation de ces hydrogels est leur possible combinaison avec des facteurs de croissance et des CSM. Ces méthodes sont très prometteuses mais encore à un stade précoce de recherche. Le cadre pratique et réglementaire associé notamment à l'isolement et l'amplification des CSM, complexifie encore la mise en place de l'ingénierie cellulaire en clinique.

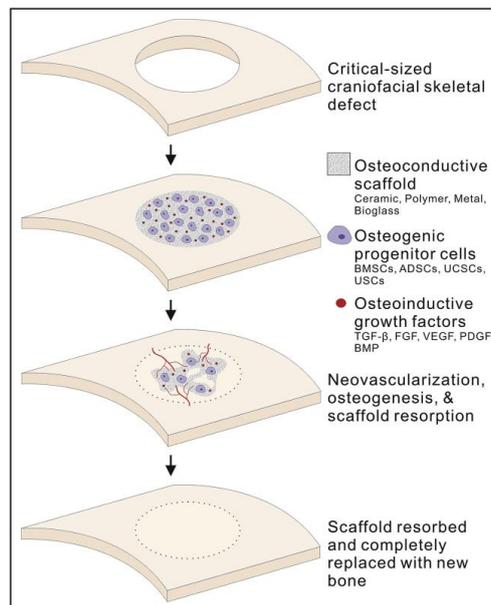


Figure 22 : Illustration d'une approche d'ingénierie tissulaire basé sur la description d'un composite ostéogénique pour la reconstruction d'un défaut crâniofacial (source<sup>186</sup>)

En conclusion, les substituts osseux, et plus généralement les implants développés à partir de biomatériaux synthétiques, représentent une alternative viable par leur disponibilité illimitée, la possibilité de les modeler, l'absence de risque de transmission de maladies et la variété de biomatériaux disponibles, qui permet d'adapter le choix pour répondre au mieux à une situation donnée. Selon leur composition moléculaire, ils peuvent être résorbables ou non, avec des temps de résorption variables. Certains peuvent également être bioactifs.

Cependant, le choix et l'application de ces implants peuvent être limités par la forme, la taille et la position de la lésion osseuse. Par exemple, certains matériaux fragiles ne conviennent pas aux zones soumises à de fortes contraintes. Il est alors nécessaire d'utiliser des biomatériaux avec une forte résistance aux sollicitations mécaniques. C'est le cas des métaux et notamment du **titane**.

## IV. De bio inerte à bioactif : améliorer les propriétés ostéogéniques du titane

### 1. L'utilisation du titane en chirurgie de l'os

#### 1.1 Le titane

Le titane est un matériau commun à une grande variété d'implants. Son utilisation se justifie par différentes propriétés qu'il possède. En voici une liste non-exhaustive :

- Bonne biocompatibilité
- Se lie étroitement à l'os
- En alliage, le titane possède un module d'élasticité relativement proche de l'os (tableau 2)
- Résistance élevée à la corrosion
- Peu allergène comparé au nickel, cobalt ou chromium<sup>149</sup>
- Léger
- Relativement malléable et peut être travaillé à froid ou à chaud dans une grande variété de formes.

Les alliages de titane sont en réalité le format le plus répandu. Ils sont souvent utilisés pour concevoir des implants, en particulier le Ti6Al4V composé de 90 % de titane (Ti), 6 % d'aluminium (Al) et 4 % de vanadium (V). Ils gardent les mêmes propriétés de biocompatibilité, mais confèrent une meilleure résistance à la fatigue. La fatigue peut être définie comme l'apparition et la propagation de fissures dans un matériau lorsqu'il est soumis à des charges cycliques.

Le titane et ses alliages ont pour caractéristique première une très bonne résistance à la corrosion, due à la création d'une couche protectrice d'oxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) à la surface de l'implant. Cette couche, de quelques nanomètres, est une conséquence de la forte affinité du titane avec l'oxygène. La couche est stable et se répare tant qu'il y a de l'oxygène ou de l'eau dans son environnement. En conséquence, le relargage d'ions ou de résidu dans le tissu péri-prothétique est relativement faible. C'est une propriété très intéressante puisque les fluides physiologiques sont relativement corrosifs. En particulier dans le cas de l'os, où l'environnement peut être acide dans les premières semaines suivant une lésion<sup>126</sup>. En outre, ce revêtement oxydé confère également la capacité d'adsorber des protéines sans les dénaturer, ce qui n'est pas le cas de l'or par exemple<sup>187</sup>. Même si la quantité d'adsorption en elle-même n'est pas très élevée, cette propriété a des conséquences positives sur la formation d'un tissu à son contact<sup>188</sup>.

Pour toutes ces raisons le titane est très présent en clinique :

- La majorité des prothèses de hanches, de genou et d'épaules incluent au moins un composant en titane.
- Presque toutes les tiges intra-médullaires (figure 13b) sont faites d'alliage de titane.
- Les systèmes de plaques et vis pour la fixation des fractures sont au choix en acier inoxydable ou en titane.
- Le titane est aussi employé dans une variété de chirurgie de la colonne vertébrale.
- Le titane représente la majorité des implants dentaires.
- Il peut être utilisé sous forme de plaques dans une méthode d'augmentation mandibulaire appelée « régénération osseuse guidée ».
- Il est utilisé sous forme de grilles pour les cranioplasties.

## 1.2 Applications : quelques données épidémiologiques

Il faut bien se rendre compte de la taille du marché dans lequel on se positionne. Les indicateurs d'études de marché évaluent le marché américain des matériaux biocompatibles à environ 11 milliards de dollars et ce marché augmente d'environ 9 % par an<sup>124</sup>. En effet, avec l'allongement de la durée de vie et la prévalence en augmentation de l'ostéoporose et de l'arthrose, le recours à des prothèses et implants osseux se fait de plus en plus courant.

### 1.2.1. Prothèses orthopédiques

Prenons l'exemple de la hanche. L'articulation de la hanche subit des contraintes considérables au quotidien en raison de son rôle essentiel dans le soutien du poids du corps. Ces contraintes peuvent entraîner des problèmes fonctionnels, en particulier avec l'avancée en âge. Lorsque l'articulation n'est plus fonctionnelle, elle est remplacée chirurgicalement par une prothèse (figure 23). En général, les tiges sont fabriquées à partir de métaux (alliage de titane, acier inoxydable ou alliages de cobalt-chromium-molybdenum (CoCrMo)), tandis que les têtes fémorales peuvent être constituées de métaux et de céramique, et la cupule peut être composée de métaux, de céramiques ou de polymères<sup>189</sup>. Différentes combinaisons de ces matériaux peuvent être utilisées pour minimiser les problèmes potentiels et maximiser les chances de réussite à long terme. En France, environ 140000 patients<sup>190</sup> (données de 2013), environ 30000 en Belgique en 2020 (selon les données du rapport ORTHOpriDe 8), subissent un remplacement total de la hanche.



Figure 23 : **Illustration d'une prothèse totale de hanche** (source<sup>191</sup>). Parmi les composants, on peut identifier de haut en bas : la cupule qui se fixe dans l'os iliaque, avec ici un insert en bleu clair qui vient recouvrir l'intérieur de la cupule ; la tête fémorale qui coiffe l'extrémité de la tige fémorale. La tige fémorale est solidement stabilisée dans le fémur. La fonction articulaire se fait à l'interface de la tête fémorale et de la cupule, ou comme ici de l'insert.

### 1.2.2. Prothèses crâniennes

La cranioplastie correspond à l'intervention chirurgicale visant à réparer une déficience ou une difformité du crâne. Elle est généralement utilisée suite à des craniectomies, c'est-à-dire le retrait d'une partie de l'os crânial (figure 24). Les indications pour la craniectomie sont multiples. Dans la majeure partie des cas, les craniectomies sont faites en réponse à des traumatismes crâniens. Elles peuvent également être liées à des résections de tumeurs ou des infections<sup>192</sup>. La cranioplastie permet de rétablir l'intégrité du crâne pour assurer une protection mécanique du cerveau, ainsi que la prévention de tout désavantage psychologique communément observé à la suite d'handicaps esthétiques. Bien que de nombreux matériaux aient été décrits, il n'existe pas de consensus quant au matériau le plus adapté. On peut citer les implants de PMMA ou de polyetheretherketone (PEEK) ainsi que de titane. Le titane est relativement peu cher, biocompatible et sa forte résistance face au stress mécanique en

a fait un matériel de choix pour répondre au besoin de rigidité nécessaire aux cranioplasties<sup>193</sup>. De plus, son utilisation sous la forme de grilles le rend plus malléable. Un des facteurs les plus contraignant dans la prise en charge des cranioplasties est l'apparition de complications suite à la chirurgie (15 à 30% des interventions). Des études ont cherché à comparer le taux de complications suivant le biomatériau utilisé. Très peu d'études ont rassemblé un effectif de patients suffisant pour émettre des conclusions significatives<sup>194</sup>. Toutefois, les tendances semblent être favorables à l'utilisation de PEEK. Une étude observe une prévalence des échecs d'implant de l'ordre de 10,7 %, 3,6 % et 14,3 % dans les groupes de grille en titane, PEEK et PMMA, respectivement<sup>195</sup>. Cependant, le PEEK est relativement coûteux et son utilisation nécessite des méthodes de moulage 3D assez innovantes et pour l'instant, encore trop complexes pour démocratiser son utilisation en clinique.

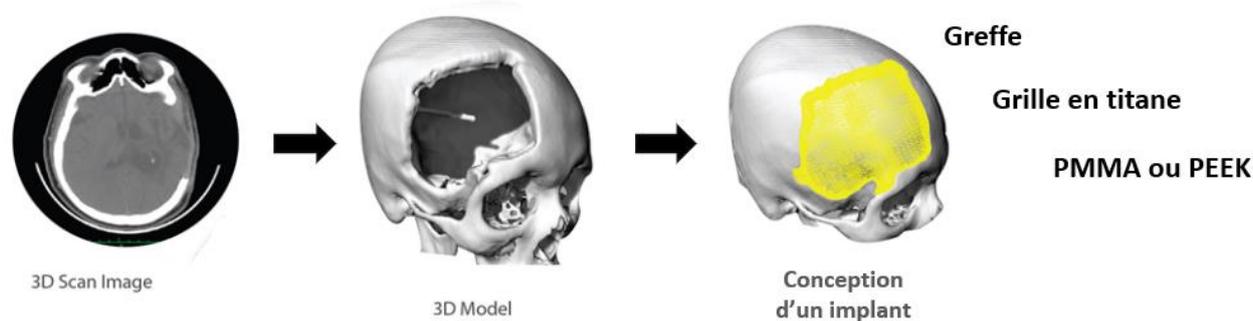


Figure 24: **Illustration de la conception d'un implant en prévision d'une cranioplastie.** Radiographie du crâne d'un patient ayant subi une craniectomie. On peut observer le défaut osseux sur le scan ainsi que sur le model en 3 dimensions. A droite, modélisation d'un implant correspondant au défaut osseux (en jaune). Sur la base de ces scans il est alors possible de confectionner un implant grâce à un matériau malléable ou par imprimerie 3D (adapté de<sup>192</sup>).

### 1.3. Perspectives d'amélioration des biomatériaux

De plus en plus de personnes sont amenées à vivre avec un biomatériau, ce qui justifie le besoin d'augmenter au maximum la sûreté de ces stratégies. Lorsqu'on se penche sur les raisons des échecs chirurgicaux, on identifie deux causes majoritaires: l'apparition d'infections au site de l'implant et le descellement mécanique (perte de fixation entre l'os et l'implant). Dans une étude menée sur 337597 procédures d'arthroplastie totale du genou (remplacement total de l'articulation par une prothèse), l'infection est l'étiologie la plus fréquente des reprises de prothèses de genou (20,4 % des cas)<sup>196</sup>. De la même façon, environ un tiers de l'échec des cranioplasties est dû à des infections qui nécessitent le retrait de l'implant<sup>197-201</sup>. Ces complications associées à l'implantation de biomatériaux ont un impact direct sur la qualité de vie des patients, mais ont aussi un coût financier important relatif à la complexité du traitement de ces fractures. Toutefois, des perspectives d'amélioration sont envisageables, et sont capables d'apporter d'énormes gains thérapeutiques et économiques.

Ainsi, le titane fait l'objet de nombreuses études, avec des approches variées et innovantes. Comme cela a pu être évoqué précédemment, les biomatériaux peuvent être fonctionnalisés avec des protéines, afin d'améliorer le contact avec l'os et favoriser sa régénération. La section sur la régénération osseuse a permis d'introduire une multitude de facteurs ostéoinducteurs qui représentent autant de stratégies possibles. Ainsi, des polymères organiques<sup>202</sup>, des ions métalliques<sup>203,204</sup>, des BMP<sup>205,206</sup>, des facteurs de croissances<sup>207</sup> ou des cytokines<sup>208</sup> ont été immobilisés à la surface d'implants en titane. Toutefois, pour populariser l'immobilisation de molécules biologiquement actives, il est nécessaire de garantir la sécurité, le stockage et la qualité dans le temps de ces protéines. La commercialisation de ce type de matériaux pose de nombreux problèmes, même s'il est facile

d'obtenir de bons résultats *in vitro* <sup>187</sup>. La raison principale est comme vous l'aurez compris dans la délivrance des molécules. Dans un premier temps, il est nécessaire de prendre en compte la concentration. Elle nécessite une connaissance accrue des phénomènes physiologiques en jeux pour éviter les effets secondaires liés à l'utilisation d'un dosage non physiologique. Dans un second temps, il est nécessaire d'imaginer des méthodes de délivrance contrôlée dans le temps. Lorsqu'on s'intéresse au titane, il est particulièrement compliqué d'établir une délivrance prolongée, qui la plupart du temps nécessite l'utilisation de biomatériaux dégradables. Pour toute ces raisons, une partie de la recherche s'intéresse à des approches tournées sur l'amélioration de propriétés inhérentes au titane.

Ainsi, parmi les nombreuses modifications qui ont été testées expérimentalement, on peut identifier deux objectifs :

- **Conférer aux implants en titane de meilleures propriétés ostéogéniques**
- **Conférer aux implants en titane un moyen de lutter ou de prévenir l'apparition d'infections.**

## **2. Méthodes de création de topographies de surface**

L'interface entre l'implant et l'os conditionne la stabilité. Les phénomènes propices à l'ostéointégration entraînent la formation d'os en contact direct de l'implant. Initialement, elle est dépendante de la formation d'une couche de tissu d'une dizaine de micromètre au contact de l'implant. Cette couche tissulaire développée pendant la cicatrisation permet l'ancrage de l'implant. En conséquence, les premières interactions de l'implant avec les tissus biologiques déterminent le succès de la chirurgie. Le postulat présenté dans cette section considère qu'en améliorant les propriétés ostéogéniques du titane, on améliore son ostéointégration et donc sa stabilité dans le temps.

D'un point de vue biomimétique, on peut considérer que l'environnement osseux comporte différentes structures de surface. C'est notamment le cas de l'hydroxyapatite qui présente des micro et nanostructures, mais aussi les fibres de collagène qui représentent une topographie à l'échelle nanométrique. Ces topographies semblent être favorables à la différenciation ostéogénique. Ainsi, de nombreuses études cherchent à décrypter les mécanismes et paramètres impliqués pour mieux contrôler l'ostéoinduction dépendante des topographies. Grace aux avancées technologiques en conception de matériaux, les chercheurs ont maintenant accès à une multitude de méthodes capables de moduler la surface d'implants en titane à une si petite échelle (voir Tableau 4).

#### IV. De bio inerte à bioactif : améliorer les propriétés ostéogéniques du titane

Tableau 4 : **Caractéristiques de techniques de modification de surface pour la création de micro/nanotopographies.** (Source 123)

Types	Techniques	Procédures	Avantages	Limites
<b>Topographies incontrôlées</b>	<b>Projection plasma</b>	Il s'agit d'une technologie de pulvérisation thermique utilisant l'arc plasma comme source de chaleur. produire des rugosités qui dépassent de la surface de l'implant.	Facile à opérer Forte liaison Economique	Fuite d'ions Difficile d'atteindre des surfaces internes ou des trous
	<b>Sablage</b>	Sablage des implants en forçant des particules abrasives contre la surface	Simple et peu coûteux Rend la surface rugueuse	Faible efficacité de traitement résidu de composés abrasifs
	<b>Gravure chimique</b>	Traitements acide, alcalin ou hydrothermique Cette méthode consiste en un processus de corrosion sélectif et contrôlé	Faible coût ; possibilité d'obtenir des nanostructures en forme de feuilles, d'aiguilles ou de pyramides	En fonction de la concentration de l'acide, de la température et de la durée
	<b>Oxydation anodique</b>	Processus électrochimique accéléré Un film d'oxyde est appliqué à la surface des implants. Cette méthode est généralement utilisé pour augmenter l'épaisseur de la couche de TiO <sub>2</sub> et fabriquer des nanostructures contrôlables. Plusieurs morphologies peuvent être produites (micro-arc oxydation (MOA), nanotubes de TiO <sub>2</sub> )	Processus simple ; dureté élevée ; caractéristiques nanométriques ; stabilité élevée ; amélioration de la résistance à la corrosion.	Consommation d'énergie élevée faible adhérence avec la matrice
<b>Microtopographie contrôlée</b>	<b>Traitement laser</b>	Micro-usinage par laser femto seconde Les impulsions laser traversent l'air jusqu'au dispositif de focalisation, qui peut focaliser le faisceau et positionner l'échantillon.	Capacité à réaliser des topographies complexes et à haute résolution rapidité et propreté bonne répétabilité	L'optimisation de tous les paramètres est un défi de taille.
	<b>Photolithographie</b>	Dissolution sélective d'un polymère photosensible et dépôt latent sur le substrat	Idéal pour les microstructures	Il faut généralement une surface plane et nécessite un post-traitement chimique
	<b>Embossage à chaud</b>	Consiste à presser une matrice micro-usinée directement dans le polymère à une température élevée pour former un motif en relief.	Coût avantageux ; précision ; rapidité et production de masse	Limité aux matériaux thermoplastiques et difficile de fabriquer des micro-structures 3D complexes
	<b>Microfraisage</b>	Processus d'enlèvement de matière à l'aide d'outils de fraisage à micro-échelle	Simple, n'affecte pas les caractéristiques clés de la surface de l'implant	Lent et inefficace ; limité par le plus petit diamètre des fraises disponibles

La recherche s'est penchée sur le développement d'une variété de topographies de surface pour tenter d'en contrôler les effets. Les structures créées peuvent être de formes, densités, organisations et tailles variables. La Figure 25 vous illustre des structures induites à la surface de titane à l'aide de certaines des méthodes présentées Tableau 4.

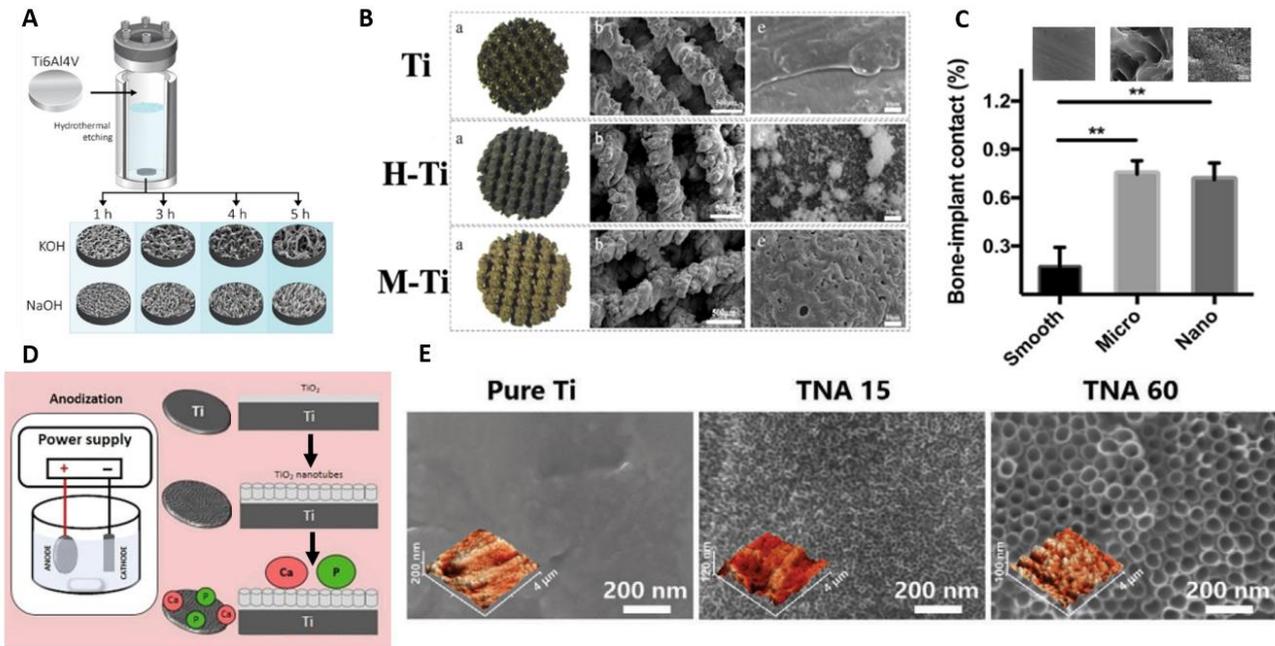


Figure 25 : Exemple de méthodes induisant des structure micro ou nanométriques à la surface de titane et ayant montré une amélioration du potentiel ostéogénique sur des lignées de CSM ou d'ostéoblastes (sauf A). **A** : Illustration du procédé de gravure chimique. Les implants en titane sont placés dans une solution aqueuse à une température, une pression et une durée précise. Ici, on peut voir une illustration des différentes structures induites en fonction du temps et de la solution utilisée (source <sup>209</sup>). **B** : Trois implants de titane ont été créés par imprimerie 3D et traités pour en moduler leurs caractéristiques de surface. La condition Ti correspond à l'implant sans post-traitement, la condition H-Ti correspond à un traitement hydrothermal de l'implant titane et la condition M-Ti correspond à un traitement par oxydation par micro-arc. Pour chaque condition, on peut retrouver une photo de l'implant en **a** et les images **b** et **c** ont été obtenues par MEB (barres d'échelles : **b** :500µm ; **c** :10µm) (source <sup>210</sup>) **C** : Les surfaces de titane ont été fabriquées par sablage (Micro) et gravure à l'acide (Nano). Analyse quantitative du contact os-implant 4 semaines post-implantation dans un modèle de rat. Les images en haut sont obtenues par MEB (barres d'échelle sont de 300 nm) (source <sup>211</sup>). **D** : Illustration de l'oxydation anodique. Ici, l'implant est placé comme anode et va subir une anodisation dans une solution d'électrolytes. Cette procédure crée des nanotubes de TiO<sub>2</sub> à la surface de l'implant (source <sup>212</sup>). **E** : Images MEB de la surface d'implant Ti pur et recouvert de nanotubes (TNA). Les nombres à la suite de TNA correspondent à la taille moyenne d'un nanotube unique en nm (source <sup>133</sup>).

### 3. Les topographies de surface régulent le comportement des CSM

Nous nous intéresserons ici aux effets que peuvent conférer des modifications à l'échelle micro/nanométrique. Il faut bien avoir conscience qu'à cette échelle, la topographie de la surface peut avoir des répercussions multiples sur différents acteurs, qu'ils soient protéiques ou cellulaires. Il est possible de moduler les propriétés d'adsorption protéique, la mouillabilité et d'induire des signaux mécaniques capables d'engendrer une réponse cellulaire.

#### 3.1 Réponses moléculaire aux topographies de surface

##### 3.1.1. Adsorption protéique

Les topographies de surfaces sont capables d'apporter différentes caractéristiques, en particulier la quantité de protéines adsorbée à la surface. L'adsorption protéique est essentielle pour initier les phases de cicatrisation. Deux points sont à prendre en compte. Dans un premier temps, les topographies de surface augmentent la surface de contact avec les fluides biologiques et donc la surface disponible pour adsorber les protéines. De plus, il a été observé qu'une nanostructure rugueuse contient une densité électrique plus élevée qu'une surface plane. La zone nanorugueuse génère ainsi une attraction électrique plus forte pour la fibronectine<sup>95</sup>.

Ainsi, les topographies de surface sont capables de moduler la capacité d'adsorption d'une surface, et ce, aussi via l'action qu'elles ont sur la mouillabilité.

### 3.1.2. Mouillabilité

La **mouillabilité** correspond à l'affinité pour l'eau. Elle influe directement sur la quantité et la conformation des protéines adsorbées, mais également sur le comportement de cellules à sa surface. Il est possible de moduler la mouillabilité par l'ajout de topographies. Cependant, qu'il soit question de structures micrométriques ou nanométriques, aucune corrélation n'a encore été clairement définie. Les deux peuvent induire une hydrophilie comme une hydrophobie. Les paramètres en jeu dépendent de la chimie du matériau et des liens électrostatiques qui vont se mettre en place en fonction de la taille, densité et forme des structures à la surface. L'étude du lien entre hydrophilie et réponse cellulaire est compliqué à déterminer. Il est difficile de dissocier le potentiel hydrophile d'autres paramètres de surface.

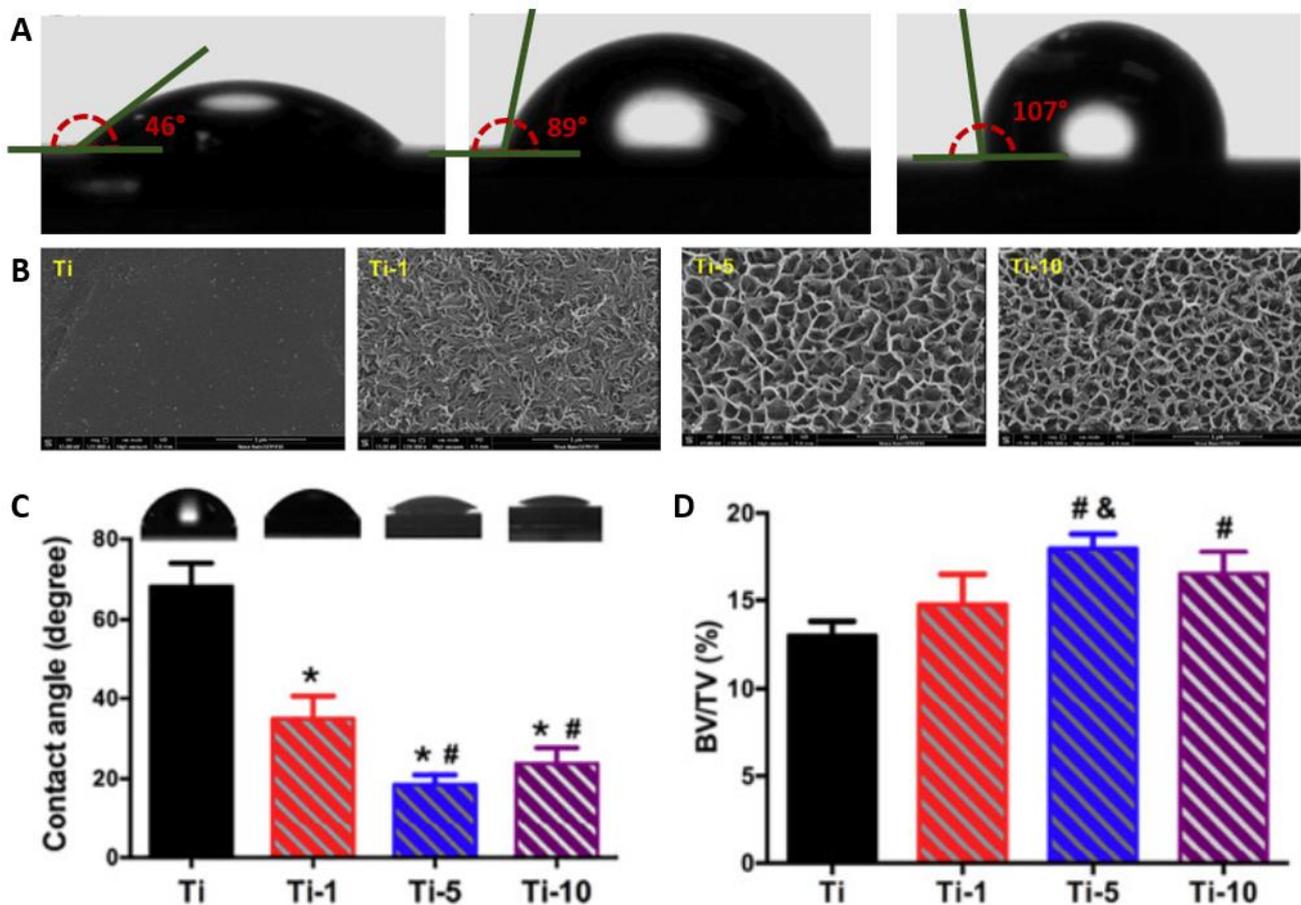


Figure 26 : **Illustration du paramètre d'hydrophilie avec la méthode d'angle de contact de l'eau.** A) Ici, trois surfaces d'hydrophobie croissante (de gauche à droite) (source <sup>213</sup>). B) Images MEB de différentes nanostructures créées à la surface du titane. C) Analyse de l'angle de contact de l'eau pour chacune de ces surfaces. D) Analyse quantitative de la quantité d'os nouvellement formé à la surface des implants en titane dans un modèle *in vivo* (source <sup>214</sup>).

L'hydrophilie intervient ainsi dans la capacité d'adhérence des cellules à une surface et a pu être associée à différents phénomènes biologiques, parmi lesquels on retrouve la différenciation ostéogénique. Dans leur étude, Hao et al. ont produit différentes hydrophilies de surface par l'ajout de couche d'hydroxyl-méthyle à mouillabilité variable (Figure 26 A). Tout d'abord, on peut observer que l'hydrophilie et la bioactivité d'une surface ne sont pas

corrélées. On observe aussi des degrés d'hydrophilie plus propices que d'autres à la prolifération de CSM et à leur différenciation en ostéoblastes. Un angle de contact de l'eau de 40° à 70° augmenterait l'expression de gènes ostéogéniques.

Dans l'étude présentée Figure 26 B, C et D, la quantité d'os nouvellement formé semble être inversement proportionnelle à l'angle de contact, c'est-à-dire proportionnelle à l'hydrophilie de la surface. De là à savoir si ces différences d'hydrophilies sont responsables des différences dans l'ossification demande des recherches additionnelles. L'hypothèse la plus probable est qu'une hydrophilie de surface est capable d'augmenter l'effet des nanotopographies. Notamment, en permettant une meilleure adhérence et un plus grand étalement de la cellule. Les cellules sont en effet plus propices à augmenter la quantité d'adhérences focales (sites d'interaction cellules/surface) sur une surface hydrophile. Elles se retrouvent ainsi plus sensibles à l'induction de voies de mécano-transduction médiées par les topographies de surface.

### 3.2 Réponses cellulaires aux modifications topographiques

Les cellules sont les acteurs majeurs de la réponse aux topographies de surface. Cela découle de leur sensibilité aux propriétés physico-chimiques du substrat sur lequel elles adhèrent. Dans le cadre de la réparation tissulaire, les CSM représentent un outil idéal pour étudier le rôle des différentes propriétés de surface. De nombreuses études se sont questionnées sur l'impact des propriétés physico-chimiques de surface sur les capacités de différenciation des CSM.

La recherche a ainsi accumulé une quantité de données impressionnante quant aux voies de différenciation des CSM<sup>215</sup>. Différents paramètres de surface ont pu être isolés et il a été possible de résumer leur rôle dans l'induction de ces voies (Tableau 5).

Tableau 5 : **Impact des propriétés de surface sur la différenciation des CSM.** "+" indique les facteurs favorables à l'engagement dans une lignée distincte, "-" indique les facteurs répressifs. Ici, ce tableau vous résume certaines des observations clés concernant l'induction des quatre voies de différenciation majoritaires chez les CSM. Ce tableau est un résumé non exhaustif de tous les paramètres de surface pouvant intervenir, mais permet toutefois de mettre en exergue certains points relativement bien établis dans ce domaine de recherche. On retrouve ainsi le paramètre de rigidité ou non d'un substrat, mais également la présence de micro/nanotopographies. Les microtopographies sont introduites en fonction de leurs rôles selon leur disposition dans l'espace (exemple Figure 27C). Plusieurs études ont pu montrer que des structures disposées aléatoirement n'avaient pas le même potentiel inducteur de différenciation que les mêmes structures lorsque leur disposition est contrôlée et ordonnée (d'après <sup>216</sup>).

Différenciation	Ostéogénique	Chondrogénique	Adipogénique	Myogénique
<b>Substrat rigide</b>	+	+	-	+/-
<b>substrat élastique</b>	-	-	+	+
<b>Substrat mou</b>	-	-	+	-
<b>Microtopographies</b>	Ordonnées - Désordonnées +	Ordonnées +	Ordonnées -	Ordonnées +
<b>Nanotopographies</b>	Irregulières	Régulières	Régulières	Régulières

On observe que ces paramètres impactent différemment les capacités ostéogéniques des CSM. De ce fait, certains critères sont reconnus comme favorables à la différenciation ostéogénique. Ils ont tous une action distincte, bien que le plus souvent une contribution synergique de ces différents paramètres soit identifiée. En effet, les voies de mécano-transductions sont partagées par les différents paramètres mécaniques de surfaces.

L'étude des propriétés mécaniques résultant des changements topographiques du titane est étroitement liée au paramètre sous-jacent de rigidité.

### Rigidité

Le titane est par nature légèrement ostéoinducteur. Cette faible ostéoinduction est médiée par la rigidité du titane. En effet, la régulation de la multipotence des CSM est hautement dépendante de leur environnement et notamment de leur environnement mécanique. Par exemple, des CSM recrutées au sein d'un environnement rigide, comme l'est le tissu osseux, ne seront pas soumises aux mêmes contraintes qu'au sein d'un tissu relativement élastique comme le tissu adipeux. Il a ainsi pu être démontré qu'un substrat rigide promouvra la différenciation ostéogénique, là où un substrat élastique est plus propice à la différenciation adipogénique<sup>128,146,216</sup>. Les CSM s'étendent davantage et développent des adhérences focales et des fibres de stress d'actine plus importantes sur les matrices rigides. Par contre, sur les matrices souples, elles adoptent une morphologie ronde. Ce phénomène est dû à la sensibilité des cellules à la rigidité.

Un des processus généralement décrit consiste en la création de forces de traction par les adhérences focales, qui cherchent à sentir la réaction du substrat face à une force de traction. Les matrices rigides résistent aux forces de traction générées par la cellule, stimulant l'étalement cellulaire. Les cellules exercent ainsi des tractions plus importantes sur les surfaces rigides<sup>217</sup>, alors qu'elles réduisent leur contractilité dépendante de la myosine sur les surfaces plus souples. La morphologie cellulaire qui en découle a une importance capitale sur l'engagement dans une voie de différenciation.

La mécanotransduction, qui va traduire le message de rigidité d'un substrat en réponse cellulaire implique la mise en place d'une multitude de voies de signalisation. La partie II.1.3 avait introduit l'importance des adhérences focales dans leur capacité à réguler la tension du cytosquelette d'actine via la signalisation de RhoA et ROCK (voir Figure 28). Dans le cas de la réponse à la rigidité, cette signalisation s'active et modifie la voie YAP et TAZ. Dans le cytoplasme, ce complexe est phosphorylé et est maintenu inactif. L'activation d'intégrines (notamment de la sous-unité  $\beta_1$ <sup>218</sup>) en réponse à un substrat rigide, permet la relocalisation nucléaire de YAP/TAZ et l'activation des facteurs TEAD. La voie RhoA/ROCK fait l'intermédiaire entre les protéines des adhérences focales et le complexe YAP/TAZ. Cette action pourrait être directe ou via la contraction du cytosquelette d'actine, qui permettrait l'internalisation nucléaire de YAP/TAZ. Les réponses cellulaires suite à la relocalisation de YAP/TAZ concernent principalement la prolifération et la différenciation ostéogénique. Parmi ses cibles, on peut par exemple mentionner le facteur de transcription Runx2 qui est activé par la fixation de TAZ et de SMAD4.

Toutefois, tous les paramètres contrôlant cet effet ne sont pas encore totalement compris. Comme illustré Tableau 5, parmi les paramètres actuellement à l'étude et qui montrent beaucoup de potentiel, on retrouve les caractéristiques topographiques du substrat, qui pourrait permettre d'améliorer les propriétés ostéoinductrices du titane.

### 3.3 Des topographies pour induire la différenciation ostéogénique

En plus de l'effet induit par la rigidité et les propriétés biochimiques inhérentes au titane, la présence de structures micro et ou nanométriques constitue un facteur de contrôle de l'ostéogénèse. Selon la forme, la taille, l'organisation (exemple Figure 27 C) ou la densité de ces structures de surface, la réponse cellulaire va varier. A la vue du nombre de paramètres impliqués dans la génération du message mécanique, il en découle également un nombre important de voies de signalisation mises en jeu. Même si la recherche a permis d'identifier les acteurs majeurs impliqués, il reste toutefois de nombreuses zones de doute quant aux liens existants entre ces paramètres et les réponses cellulaires associées.

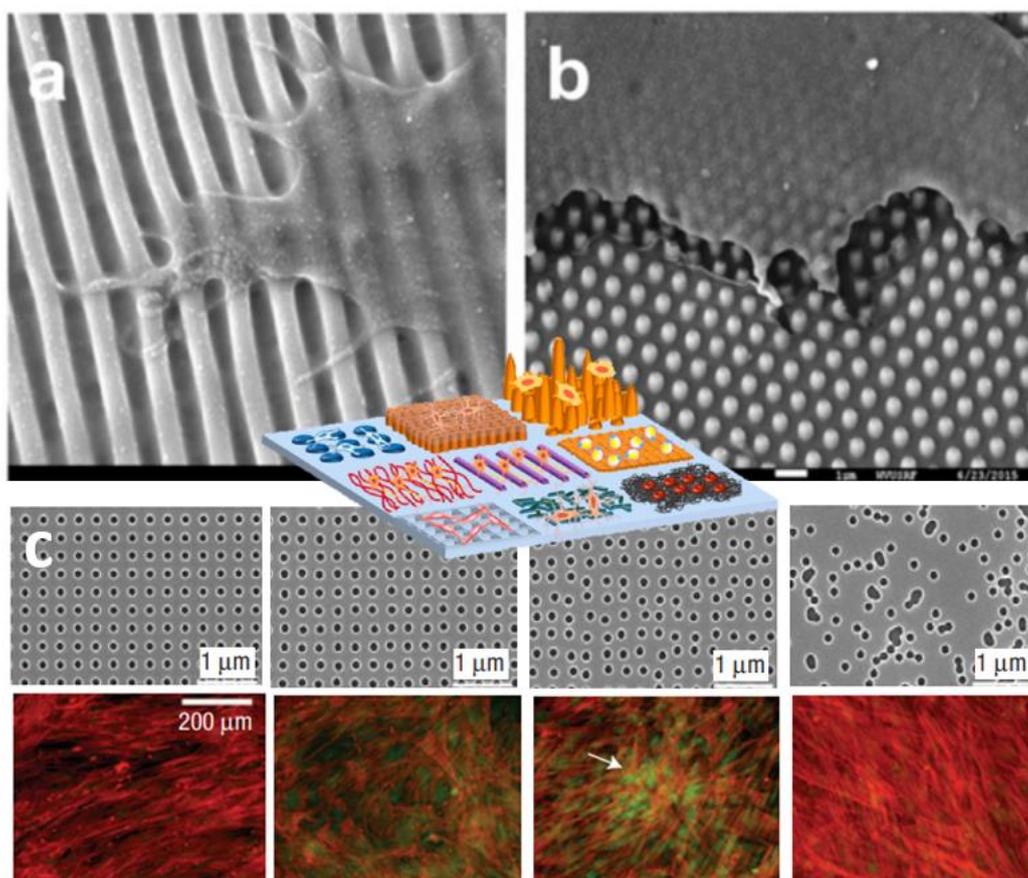


Figure 27: **Exemples de nanostructures et leur possible effet ostéoinducteur. a et b)** Fibroblastes en culture sur deux types de nanostructures (échelle de 1 μm). **a)** Exemple de sillons nanométriques et **b)** fossés nanométriques (source <sup>219</sup>). **c)** Etude de différentes organisations de nanotopographies et de CSM cultivées à leur surface pendant 21 jours. En haut, images par MEB présentant les nanotopographies et l'introduction de nano-désordres. En bas, immunofluorescence de CSM cultivées pendant 21 jours. Les cellules ont été marquées en rouge contre l'actine et en vert contre un marqueur de la différenciation ostéogénique, l'OPN. L'augmentation du signal associé à l'OPN dans la troisième figure en comparaison à la seconde, est indicatrice d'une augmentation du potentiel ostéogénique via l'organisation en désordre des nanotopographies (source <sup>220,221</sup>).

Les méthodes présentées dans le Tableau 4 comme permettant une « topographie contrôlée », ont été d'une immense aide pour la recherche. Ces méthodes sont capables de créer des topographies avec un contrôle sur les différents paramètres (Figure 27). Elles ont permis d'accumuler un ensemble de connaissances sur l'impact de ces paramètres sur la différenciation de CSM. On peut ainsi résumer la mécanotransduction induite par les topographies de surfaces en plusieurs mécanismes clés détaillés ci-après :

**Adhérence cellulaire :**

La topographie de surface influence l'adhérence des cellules en fournissant les points d'ancrages pour la cellule. Les questions évoquées précédemment d'adsorption protéique et de mouillabilité vont grandement influencer ce mécanisme. Mais, cela peut aussi être directement dépendant de la micro/nanostructures. C'est notamment le cas de l'épaisseur ou de la densité de structure au  $\mu\text{m}^2$ , qui détermineront respectivement la surface disponible ou la quantité de sites disponibles pour l'ancrage de la cellule. Les protéines d'adhérence cellulaire, telles que les intégrines, peuvent interagir avec la surface topographique, facilitant ainsi la fixation des cellules à la surface. On considère que les adhérences mûrissent en réponse à la force appliquée soit en interne via l'actine soit par l'un des facteurs externes. La maturation passe par le recrutement d'intégrines additionnelles et un ensemble de protéines permettant de stabiliser l'adhérence focale et d'agir pour une mécanotransduction. La tension du cytosquelette est généralement associée à des adhérences focales de grande tailles et allongées qui témoignent d'une maturité de ces adhérences focales, qui est généralement un indicateur d'une différenciation ostéogénique.

**Réorganisation du cytosquelette et de la morphologie :**

La nanotopographie fournit les repères physiques dont les récepteurs membranaires ont besoin pour organiser le cytosquelette et propager les signaux mécaniques vers le noyau. Lorsque les cellules interagissent avec une surface topographique, elles peuvent réorganiser leur cytosquelette. Ainsi, comme pour la rigidité, la topographie a une action directe sur la signalisation RhoA et ROCK. Le réarrangement du cytosquelette qui va s'en suivre peut conduire à des changements dans la forme et l'orientation cellulaire.

Dans le cadre de la différenciation ostéogénique, la présence de fibres de stress bien développées est nécessaire dans l'engagement dans la voie ostéogénique. En étant suffisamment grandes, les topographies de surface peuvent contraindre les cellules à adopter une forme particulière. Or, indépendamment de la rigidité, une cellule forcée à adopter une morphologie ronde est plus propice à une différenciation adipogénique<sup>97</sup>. Ainsi comme illustré Figure 28, des rugosités de surfaces rigides trop hautes sont contre-productives lorsque l'on souhaite engager les cellules dans la lignée ostéoblastique.

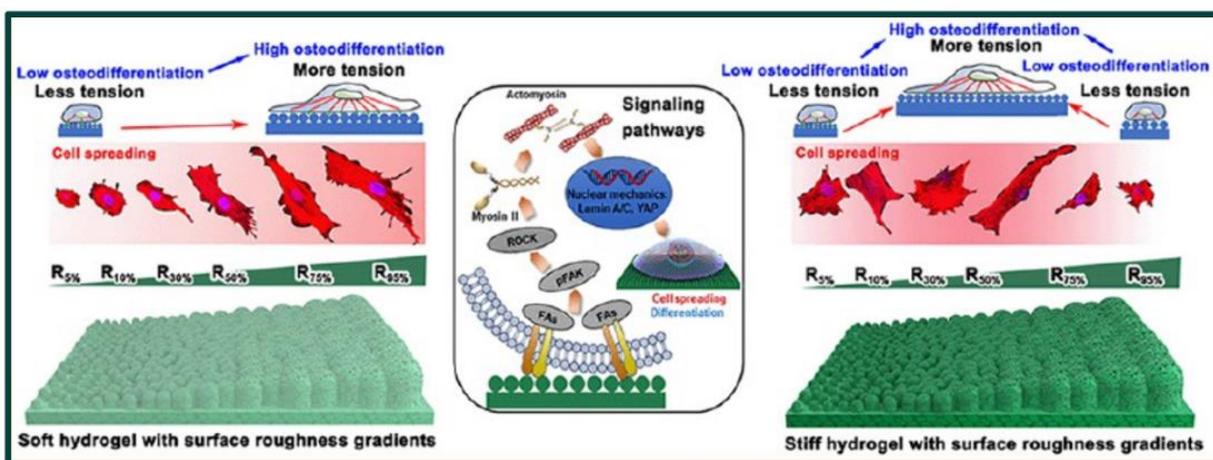


Figure 28 : **Lien entre paramètres topographiques, rigidité et potentiel ostéoinducteur.** Lien entre la rigidité d'une surface et une rugosité croissante. A gauche, illustration du paramètre de rugosité en présence d'un substrat souple. Plus la rugosité augmente, plus les cellules s'étalent, témoignant d'une tension plus importante et d'un plus grand potentiel ostéogénique. A droite, le même principe, mais en présence d'un substrat rigide. Sur un substrat rigide, une trop grande rigidité peut devenir contreproductive pour l'ostéodifférenciation de CSM. On peut voir qu'à partir d'une rigidité de 75%, les cellules se rétractent démontrant une plus faible tension et ainsi un potentiel ostéogénique plus faible. Au centre, on identifie l'action des adhérences focales en lien avec le cytosquelette, qui implémente des réponses fonctionnelles face à ce paramètre de rugosité (source <sup>128</sup>).

On peut ainsi observer deux réarrangements morphologiques en réaction à la topographie : La topographie peut contraindre les cellules dans une morphologie particulière<sup>222</sup>, ce qui conduira à un réarrangement du cytosquelette et une réponse cellulaire associée. En parallèle, la morphologie génère une réponse cellulaire. Ainsi, certaines voies de signalisation reposent sur une modification du cytosquelette ce qui entraîne des arrangements morphologiques. De plus, l'activation de mécanotransductions indépendantes du cytosquelette<sup>223</sup> peuvent tout de même se traduire en modification de la morphologie cellulaire suite à la réponse de la cellule.

### Activation des voies de signalisation intracellulaire :

La déformation mécanique induite par la topographie de surface peut activer différentes voies de signalisation à l'intérieur de la cellule. Pour passer de la sensation d'un substrat rugueux à une réponse cellulaire de tension, d'étalement et de différenciation en ostéoblaste, les cellules mettent en jeu plusieurs acteurs moléculaires. Les intégrines, protéines initiatrices de cette mécanotransduction, sont situées au sein des adhérences focales. Parmi elles, les intégrines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_V$ <sup>142</sup>,  $\beta_1$ <sup>213</sup> et  $\beta_3$ <sup>224</sup> sont déterminantes dans l'ostéoinduction médiées par les nanotopographies. Leur position transmembranaire leur permet d'initier la transduction du signal en transférant l'information du milieu extracellulaire au cytoplasme. Un ensemble de protéines du cytoplasme vont prendre le relai pour traduire cette information en réponse cellulaire. Parmi les voies de signalisations décrites on retrouve la voie YAP/TAZ.

La différenciation ostéogénique a beaucoup été étudiée en terme de régulation de YAP/TAZ. Les surfaces rugueuses favorisent l'ostéogénèse via l'activation nucléaire de YAP<sup>95</sup>. Les paramètres topographiques peuvent induire des effets diamétralement opposés. Des ondulations à l'échelle nanométrique sont ostéoinductrices de CSM. Alors que, des ondulations micrométriques diminuent la rigidité cellulaire et l'internalisation de YAP, inhibant le potentiel ostéoinducteur de ces surfaces (Figure 29).

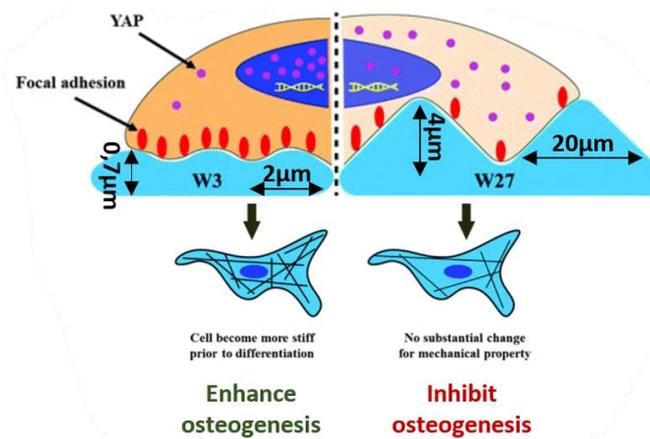


Figure 29 : **Phénomènes impliqués dans la mécanotransduction en réponse à différentes tailles de topographies de surface.** Selon la taille des structures de surface, les CSM n'auront pas la même organisation du cytosquelette et la localisation de YAP sera différente. En conséquence, le potentiel ostéoinducteur n'est pas le même (source <sup>225</sup>).

De plus en plus d'arguments pointent l'action du cytosquelette nucléaire dans la transduction de messages mécaniques<sup>99,226</sup>. Le cytosquelette d'actine est étroitement lié au cytosquelette nucléaire. C'est notamment le cas via l'ancrage aux protéines LINC de la membrane nucléaire. Il est admis qu'en réponse à une forte tension des fibres d'actine, la morphologie du noyau est changée<sup>102,227</sup>. Il peut s'en suivre une activation de canaux membranaires et notamment une augmentation de la perméabilité membranaire, permettant l'internalisation de YAP/TAZ mais aussi de la  $\beta$ -caténine<sup>228</sup>.

De la même manière, la voie de signalisation Wnt/  $\beta$ -caténine est aussi impliquée dans la réponse aux topographies. La voie Wnt implique la liaison du ligand Wnt au récepteur transmembranaire Frizzled. L'activité de liaison Wnt-Frizzled libère la  $\beta$ -caténine pour qu'elle se transloque dans le noyau et agisse comme coactivateur de la transcription. La  $\beta$ -caténine est nécessaire à la différenciation des CSM en ostéoblastes ou en chondrocytes dans les phases de la réparation. Les topographies à l'échelle nanométrique peuvent faciliter l'entrée de la  $\beta$ -caténine dans le noyau, améliorant les capacités ostéogéniques<sup>229</sup>. Cette signalisation prend également origine dans les adhérences focales. Il semblerait que l'activation des adhérences focales, ainsi que la présence de ligand Wnt, permet la relocalisation nucléaire de  $\beta$ -caténine et l'activation de facteurs de transcriptions pro-ostéogéniques. Lopes et al. ont montré que l'inhibition de l'intégrine  $\beta_3$  non seulement bloque le comportement ostéogénique des CSM cultivées sur des nanorugosités, mais diminue également l'expression de la  $\beta$ -caténine et de Frizzled<sup>224</sup>. Ce phénomène n'a pas été confirmé en présence de microrugosités, démontrant la dépendance de certaines intégrines à des topographies bien précises<sup>123,224</sup>.

Ces différentes voies de signalisation ne sont pas complètement indépendantes. De récentes études évoquent des liens entre les voies YAP et  $\beta$ -caténine<sup>211,230</sup>. Des cellules préostéoblastiques cultivées sur une nanotopographie produite par gravure à l'acide montrent une dégradation de YAP par l'autophagie, un mécanisme de recyclage intracellulaire. La dégradation de YAP a permis la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine, favorisant l'expression de gènes ostéogéniques. Il semblerait que des mécanismes de l'ostéogenèse en réponse à des nanostructures ne suivent pas le format conventionnelle d'activation de YAP/TAZ.

#### Réponses cellulaires :

Ainsi, ces voies de signalisation régulent la prolifération cellulaire, la différenciation ainsi que la sécrétion de facteurs de croissance (Figure 12). Le comportement des CSM peut théoriquement être contrôlé par la création de topographies adéquates à la surface d'un implant.

De nombreuses topographies ont été testées pour analyser leur capacité à favoriser la différenciation des cellules souches. Ainsi, la présence de trous de 120 nm disposés irrégulièrement est bénéfique à la différenciation ostéogénique<sup>220</sup> (Figure 27 c). Sur le même principe, des topographies décrites comme « nanowires » ont démontré une meilleure ostéoinduction de CSM *in vitro* ainsi qu'une meilleure ostéointégration de l'implant *in vivo*<sup>51</sup>. Enormément de topographies différentes ont démontré des effets sur l'adhérence cellulaire, la prolifération et la différenciation ostéogénique. Un relevé non exhaustif de ces recherches vous est présenté dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Les nanotopographies affectent les comportements d'adhérence, de morphologie et de différenciation des cellules (source <sup>95</sup>).

Nanofeatures	Material substrate	Cell type	Functional studies	Ref
<b>Nanopits</b> Diameter-100 nm Depth-100 nm	Polymethylmethacrylate (PMMA)	Human fibroblasts	Control cell spreading	Dalby M J et al. [19]
<b>Nanodots</b> Dimers, trimers and hexagons arrangement with interdot spacing of 60 nm	AuPd nanodots	3T3 mouse fibroblasts	Control cell adhesion receptors arrangement	Schwartzman, M et al. [104]
<b>Nanorods</b> Length-1.5 $\mu$ m Diameter-100 nm	TiO <sub>2</sub> substrate	Bone marrow-derived MSCs	Osteogenic differentiation	Qiu J et al. [99]
<b>Nanotubes</b> Outer diameter-100 nm Inner diameter-70 nm Height-250 nm	TiO <sub>2</sub> substrate	MC3T3-E1 osteoblast cells	Accelerate osteoblasts growth	Oh S et al. [108]
<b>Nanorough</b> $R_q=1$ nm $R_q=100$ nm $R_q=200$ nm	Glass	Human mesenchymal stem cell (hMSC)	Osteogenesis induction	Qian W et al. [115]
<b>Nanopatch</b> Ridge-800 nm Groove-800 nm Height-600 nm	Poly (lactic-co-glycolic acid) PLGA	Primary osteoblasts	Osteogenesis induction	Lee M S et al. [116]
<b>Nanopits</b> Diameter-120 nm Depth-100 nm Random displacement $\pm$ 50 nm	Polymethylmethacrylate (PMMA)	Mesenchymal stem cell (MSC)	Osteogenesis induction	Allan C et al. [21]
<b>Ordered/disordered Nanopits</b> Diameter-120 nm Spacing-300 nm Disordered- $\pm$ 50 nm offset Ordered-0 nm offset	polycaprolactone (PCL)	Mesenchymal stem cell (MSC)	Maintenance of MSC phenotype and multipotency	McMurray R J et al. [5]
<b>Nanopatterns</b> Distancing-30 nm Interdot spacing-106 nm	TiO <sub>2</sub> substrate	Mesenchymal stem cell (MSC)	Osteogenesis induction	Sjöström T et al. [119]
<b>Nanopillar</b> Height-15, 55, 100 nm	TiO <sub>2</sub> substrate	Human mesenchymal stem cell (hMSC)	Bone matrix nodule formation	Sjöström T et al. [120]

Ainsi, différents stimuli mécaniques peuvent être implémentés à la surface d'un implant via sa topographie de surface afin de contrôler les différents patterns du cytosquelette et induire des signalisations capables de promouvoir la différenciation souhaitée. Toutefois, les mécanismes sous-jacents par lesquels certains matériaux favorisent la différenciation des cellules souches restent obscurs. Etant donné la multitude de topographies possibles, il existe énormément d'acteurs différents impliqués dans la transduction de messages induits par la topographie. La majorité d'entre eux sont retrouvés dans les mécanismes responsables de la sensibilité à la rigidité, créant un lien fort entre les deux<sup>128</sup>. Mais, bien qu'un nombre croissant de preuves ait montré l'importance de la topographie dans la différenciation des cellules souches, aucun consensus n'a été trouvé quant aux paramètres les plus ostéoinducteurs<sup>122</sup>. De plus, la différenciation est un phénomène qui s'étale dans le temps et il a été identifié que les différentes voies de mécanotransduction ne sont pas toutes générées en même temps. Cela complexifie la compréhension que l'on a de l'impact des topographies de surface sur le destin cellulaire, mais motive la recherche à trouver les conditions les plus favorables permettant d'optimiser l'ostéointégration des implants titane. En outre, cela se fera également par le choix de méthodes de traitement de surface, qui soient reproductibles, peu coûteuses et capables d'être adaptées à l'ensemble des formes d'implants.

## 4. Modifications de surface d'implants en titane

Nous ne pouvons pas prédire quel type de matériau s'imposera à l'avenir. De nombreux traitements de surface ont été développés pour tirer parti de la sensibilité mécanique des cellules et augmenter l'ostéointégration des implants. Le Tableau 7 a pour vocation de vous présenter des études *in vitro* et *in vivo* basées sur des traitements de surface d'implants en titane. Comme vous pouvez le voir, les méthodes qui se sont imposées comme les plus compatibles pour le traitement d'implants sont celles que l'on a nommées précédemment comme non contrôlées.

Tableau 7 : **Exemple de modifications de surfaces d'implants osseux en titane.** « ↑ » représente une augmentation, là où « ↓ » signifie une diminution.

Résumé de l'étude	Méthode de traitement	Lignée cellulaire étudiée	Résultats majeurs
Surface de titane micro/nano rugueuse <sup>231</sup>	Gravure à l'acide	Ostéoblaste	Rugosité ↑ quand température ↑
			Aire des ostéoblastes ↑ en fonction de la rugosité
			↑ activité de la phosphatase alcaline (ALP) ↑ quantité de dépôt calcique ↑ expression d'ostéopontine et d'ostéocalcine
Surface de Ti-6Al-4V Micro/nanostructurée <sup>232</sup>	Gravure à l'acide	MC3T3 pré-ostéoblaste	Prolifération ↑
Échafaudage poreux de Ti-6Al-4V imprimé en 3D chargé d'un équivalent de MEC, de Mg et d'icariin <sup>233</sup>	Imprimerie 3D et biofonctionnalisation	Raw264.7 macrophages	↑ phénotype M2, ↑IL-10, Arg-1 ↓ différenciation ostéoclastique iNOS, TNF, TRAP
		CSM de moelle osseuse	↑ ALP, Runx2, OCN (milieu conditionné de macrophage ↑ la différenciation)
			↑ la production d'os <i>in vivo</i>
Nanocouches de magnésium/gallium sur des implants en titane <sup>234</sup>	traitement thermique alcalin + revêtement MG et gallium	CSM de rats	↑ ALP, BMP2, OPN, COL1 via ↑ autophagie
			↓ le potentiel ostéoclastique (TRAP, MMP9)
			↑ la production d'os <i>in vivo</i>
Surface de Ti-6Al-4V nanostructurée <sup>209</sup>	Gravure hydrothermale	HDF fibroblastes	↑ adhérence Pas cytotoxique
Nanofonctionnalisation d'échafaudage de titane avec TiO <sub>2</sub> et γFe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>235</sup>	Fonctionnalisation thermique et photochimique	CSM humaine	Prolifération, ↑activité de l'ALP et ↑ dépôts calciques
Surface de titane modifié par poly[2-(méthacryloyloxy)éthyl choline phosphate] zwitterionique <sup>236</sup>	polymérisation radicalaire par transfert d'atome	MC3T3 pré-ostéoblaste	↓l'angle de contact à l'eau et l'adsorption protéique ↑prolifération d'ostéoblastes, ↑ l'expression d'ALP;Col1;Runx2;OCN
		CSM	↑dépôts calciques
Des films multicouches d'alginate/chitosan fabriqués à la surface de nanotubes de titane contenant de l'IL-4 <sup>237</sup>	anodisation + IL-4 + recouvrement	CSM de rats	↑l'expression de gènes ostéogéniques
		Raw264.7 macrophages	M1 ↑ l'expression de ColA des CSM M2↑ l'expression d'ALP
			↑la formation osseuse et l'interface os-implant <i>in vivo</i>
Comparaison du traitement hydrothermal ou oxydation par micro-arc sur échafaudage de Ti-6Al-4V imprimés en 3D <sup>210</sup>	Traitement hydrothermal avec ajout de calcium	MC3T3 ostéoblastes	↑adsorption protéique, l'adhérence et la prolifération cellulaire
	Oxydation par micro-arc avec ajout de calcium et de phosphate		↑activité de l'ALP et ↑ dépôts calciques ↑l'expression protéique et génique de Runx2, OCN et Col1-1 ↑ la formation d'os <i>in vivo</i>
			L'effet ostéogénique est légèrement plus élevé pour l'oxydation micro-arc
Comparaison de l'effet de nanotubes de titane de différentes tailles (15nm, 60nm, 120nm) <sup>133</sup>	Traitement électrochimique	Plaquettes	↑Adsorption protéique (sauf 120nm) ↑l'activation des plaquettes et la sécrétion de PDGF et TGF-β
		Raw264.7 macrophages	↑facteurs ostéogéniques et phénotype M2 (sauf 60nm et 120nm)
			↑contacte os-implant en 15nm

Analyse de l'ostéoclastogénèse et ostéoblastogénèse de nanopilliers de 15nm en comparaison à une surface plane	Anodisation	CSM	↓ l'aire des cellules ↑ dépôts calciques et la sécrétion d'OPN
		Cellules hématopoïétiques	↓ du marqueur ostéoclastique TRAP (phosphatase alcaline résistante au tartrate) ↓ de l'expression de gènes ostéoclastogéniques et ↑ de l'expression d'ostéoprotégérine (OPG) un régulateur négatif de l'ostéoclastogénèse.
		<i>In vivo</i>	↑ du contacte implant-os d'environ 20%

En raison des disparités constatées entre les performances des biomatériaux candidats *in vitro* et *in vivo*, il s'avère compliqué de les convertir en implants cliniquement utilisables. À mesure que notre compréhension de la biologie osseuse et des mécanismes sous-jacents de l'ostéogénèse progresse, nous réalisons que le système musculosquelettique ne constitue pas le seul contributeur à ce processus. L'ostéointégration prend origine dans le contexte de cicatrisation osseuse. De plus en plus d'études cherchent donc à analyser les interactions pouvant avoir lieu entre les différents acteurs à la surface d'implants en titane micro ou nanotopographiés.

## 4. Des perspectives de synergies pour améliorer l'ostéointégration

L'ostéointégration est un processus complexe, il est essentiel d'introduire de la complexité dans les analyses *in vitro* pour mieux étudier les interactions entre l'os et les implants. De nombreuses recherches actuelles visent à déterminer si la topographie de surface des implants joue un rôle dans les interactions entre les différents acteurs impliqués dans la régénération osseuse. Notamment, de plus en plus d'intérêt se porte sur l'impact des topographies de surfaces sur d'autres types cellulaires impliqués dans la régénération osseuse. On peut citer :

- Les plaquettes<sup>133,238</sup>
- Les cellules immunitaires<sup>239-241</sup>
- Les cellules endothéliales<sup>139,242-244</sup>

### 4.1 Coagulât

La prise en compte du paramètre sanguin dans les études d'ostéointégration a été délaissée pendant longtemps en faveur d'études sur des phases plus avancées et plus concrètes de la cicatrisation osseuse. Pourtant, comme présenté partie II 1.2.1, la phase initiale de coagulation est essentielle de par sa capacité à initier la formation d'une MEC et à recruter des cellules.

On a vu précédemment que les topographies de surfaces sont capables de modifier la mouillabilité et la capacité d'adsorption protéique d'une surface. Ceci module au passage son potentiel coagulant. Dans leur étude, Park et al. montrent que la modification nanotopographique du titane accélère l'activation plaquettaire, promouvant la création d'une matrice dense de fibrine et la sécrétion de PDGF. Ces observations ont été confirmées et complétées par Bai et al. dans leur étude sur l'effet de nanotubes de titane (Figure 25 E). Ainsi, en plus de la formation d'une matrice riche en fibrine et la sécrétion de facteurs de croissance (PDGF et TGF- $\beta$ ), ils ont montré un lien direct de ces caractéristiques du coagulât sur la polarisation des macrophages. Les facteurs solubles sécrétés par les plaquettes à la surface de nanotopographies sont capables d'induire la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 et l'expression de gènes ostéogéniques. L'ensemble a montré être favorable à l'ostéointégration, puisqu'à la suite d'une implantation dans le fémur de lapin, le contact os-implant était amélioré pour l'une des conditions nanotopographiée très prometteuse *in vitro* : nanotubes de titane (TNA) de

15nm (TNA15). A noter que deux autres topographies ont été étudiées (TNA 60 nm, TNA 120 nm). Bien qu'elles montraient des propriétés *in vitro* moins encourageantes que TNA15, elles étaient tout de même intéressantes de par leur capacité à induire une coagulation et une activation plaquettaire. Toutefois, *in vivo*, il n'y a pas eu traduction de ces propriétés par une meilleure ostéointégration. Leur contact os-implant était de moins bonne qualité que le titane lisse. La raison la plus probable pour justifier ces discordances est dans la modulation de l'immunité. Ces deux nanotopographies ne semblaient pas promouvoir le phénotype M2 et certains gènes pro-inflammatoires se sont vus sur-exprimés. La modulation de l'immunité, qui est naturellement clé dans la cicatrisation osseuse semblerait donc également déterminante dans l'ostéointégration osseuse.

## 4.2 Ostéoimmunomodulation

Ce terme prend son origine dans l'ensemble des découvertes qui ont été faites quant au lien étroit entre voies de signalisation immunitaires et formation osseuse (Partie II.1.2). Dans le cadre de l'implantation de biomatériaux, ce lien est primordial. En effet, une réponse immunitaire inappropriée peut provoquer une inflammation excessive et conduire à la formation de tissu fibreux autour de l'implant. C'est la cause d'une partie des échecs chirurgicaux. L'immunité a la capacité d'affaiblir la capacité d'ostéogénèse des implants. Le propos central de l'ostéoimmunomodulation est qu'il est possible de conférer aux biomatériaux des propriétés afin de moduler un environnement immunitaire local<sup>82</sup> favorable à l'ostéogénèse.

L'avantage est que les propriétés physicochimiques sont modulatrices de la réponse immunitaires (Figure 30). Les différentes modifications de surfaces sont alors une porte d'entrée vers une possible ostéoimmunomodulation.

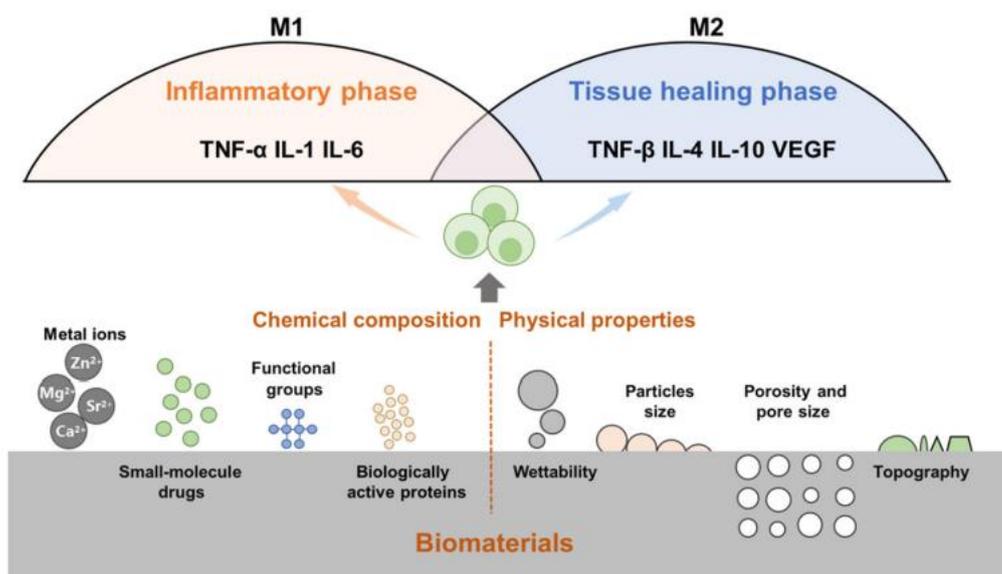


Figure 30 : Impact des propriétés physicochimiques des biomatériaux dans leur capacités ostéoimmunomodulatrices. Les propriétés de surface d'un implant sont capables de moduler les macrophages et leur réponse immunitaire (M1/M2). Parmi les acteurs de cette ostéoimmunomodulation, on peut dissocier les propriétés chimiques (comme la libération de certains ions), des propriétés physiques apportées notamment par la topographie de la surface (source <sup>241</sup>).

L'intérêt s'est beaucoup porté vers le comportement des macrophages. Dans un premier temps, ce sont des cellules adhérentes qui sont capables de rentrer en contact direct avec la surface de l'implant. Dans un second

temps, elles ont été beaucoup étudiées dans leur régulation de la cicatrisation osseuse est dans leur régulation de la fonction des ostéoclastes.

Les changements morphologiques des macrophages sous la stimulation de micro ou nanotopographies, induit une capacité à moduler l'environnement immunitaire via mécanotransduction<sup>245,246</sup>. Les effets sont divers. Chen et al. observent une diminution de gènes pro-inflammatoires et une augmentation de l'expression d'un marqueur du phénotype M2 (arginate) en réponse à des nanoparticules d'or. Selon eux, l'effet de ces nanostructures est notamment relié à une régulation de l'autophagie<sup>246</sup>. L'étude de Hotchkiss et al., quant à elle, mais en avant l'effet de l'hydrophilie et de la rugosité microscopique. Ils observent notamment le lien entre les deux. Pour une même rugosité, avoir une surface hydrophile augmente l'efficacité de l'ostéoimmunomodulation. Elle se traduit avec l'augmentation de cytokines pro M2 (IL-4 et IL-10) et la diminution de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ )<sup>247</sup>.

Outre, l'effet direct des topographies sur l'action des macrophages, des études *in vitro* en coculture ont pu montrer les interactions entre macrophages et CSM. C'est le constat que font Li et al. dans leurs études de différentes topographies sur l'environnement immunitaire et ostéogénique (Figure 31). Au cours de leur étude *in vitro*, ils ont pu sélectionner la topographie NW-Ti comme étant la plus prometteuse. Si l'on peut résumer brièvement leurs constats, les nanotopographies sont favorables à l'adsorption de fibronectine et de fibrinogène. Les protéines adhèrent avec une conformation favorable à l'exposition des peptides RGD, favorisant ainsi l'adhérence cellulaire et l'activation d'intégrines. Cette activation des adhérences focales a eu pour conséquence, chez les CSM, l'activation de gènes ostéogéniques. Les macrophages ont pour leur part fait une transition vers un phénotype M2. En terme de communication, ces changements ont un impact synergique important. En effet, en réponse à cette stimulation mécanique, les CSM ont augmenté leur sécrétion de prostaglandine E2 (PGE2). Cette sécrétion est dépendante d'une signalisation via ROCK et permet de promouvoir le phénotype M2 des macrophages. La transition M2, quant à elle, augmente la sécrétion de BMP2 par les macrophages, permettant de réguler positivement la différenciation ostéogénique.

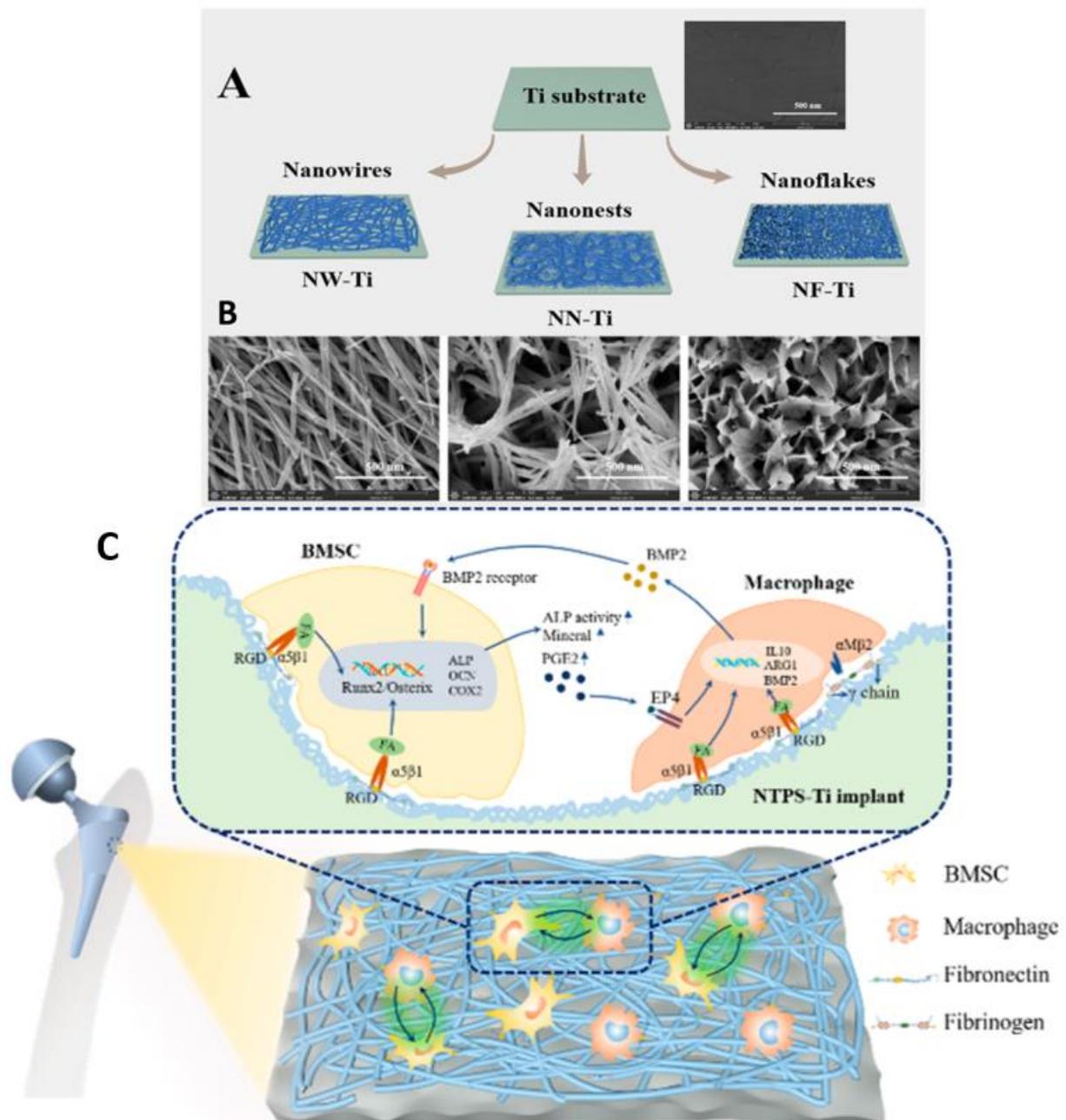


Figure 31 : **Illustration de l'effet synergique pro-ostéointégration d'une nanotopographie du titane sur les CSM et macrophages.**  
**A** : Illustration des trois types de topographies étudiées, avec en **B**, des images de chacune d'elles par MEB (barre d'échelle : 500nm).  
**C** : Résumé des principales observations faites quant aux interactions induites entre CSM et macrophages. RGD : peptide RGD ;  $\alpha_5\beta_1$  : intégrine ; COX2 : cyclooxygénase 2 (ou prostaglandine-endoperoxyde synthase 2) ; BMSC : CSM de moelle osseuse ; EP4 : récepteur de la prostaglandine E2 ; ARG1 : arginase 1 (marqueur du phénotype M2) (source <sup>51</sup>).

### 4.3 Angiogenèse

L'angiogenèse est reconnue comme un prérequis pour une ostéointégration complète. De la même manière, il est possible d'observer un effet des topographies sur la capacité angiogénique des cellules endothéliales<sup>248,249</sup>. Les nano/microtopographies sont capables de soutenir la viabilité et la prolifération des cellules endothéliales. Bai et al. ont montré un impact sur l'expression de différents gènes suite à la culture sur surfaces titane traitées par gravure hydrothermale. L'expression de ces gènes est impliquée dans l'augmentation de la production d'oxyde nitrique, une molécule anti-inflammatoire essentielle pour le fonctionnement endothélial<sup>139</sup>. De plus, la suractivation du facteur de Von Willebrand (vWF), d'angiopoïétine 1 (Ang1) et PECAM (pour « Platelet endothelial cell adhesion molecule ») met en évidence une possible amélioration de la création de nouveaux vaisseaux sanguins.

A ce jour, il existe peu d'études démontrant un effet plus profond des topographies sur les cellules endothéliales. La majorité des effets observés sont dépendants de la mise en place d'une communication entre les différents acteurs cellulaires. Ainsi, les CSM et les macrophages induisent un effet angiogénique en réponse à certaines topographies de surface, en partie via la sécrétion de VEGF<sup>250</sup>, mais également de facteurs de croissance fibroblastiques (FGF) et épidermique (EGF) dans le cas d'ostéoblastes<sup>251</sup>. De même, les cellules endothéliales sécrètent de la BMP2 suite à une stimulation par le VEGF. De nombreuses preuves peuvent témoigner de l'effet synergique de cocultures entre CSM et HUVEC (cellule endothéliales de cordon ombilical)<sup>65</sup>. Cet effet est amélioré par la présence de topographies de surfaces<sup>244</sup>.

L'environnement de la cicatrisation osseuse est de plus en plus pris en compte pour améliorer l'ostéointégration des implants. La négligence des paramètres d'interaction entre le caillot, l'ostéoimmunomodulation et l'angiogenèse dans la phase précoce suite à l'implantation, peut expliquer les discordances entre les études *in vitro* et *in vivo*. Il est ainsi nécessaire de considérer l'interaction de l'implant dans sa globalité et de ne plus se cantonner aux propriétés ostéo (ostéoconduction et ostéoinduction) très centrées sur les cellules osseuses. Ces nouvelles perspectives ont permis le développement de biomatériaux dont les propriétés *in vitro* concordent avec une ostéointégration *in vivo* et sont plus prometteurs d'un potentiel bénéfique clinique.

## V. De bioinerte à bioactif : prévenir l'apparition d'infections

### 1. Les infections d'implants

Les descellements septiques, c'est-à-dire d'origine infectieuse, sont l'une des contraintes les plus tenaces auxquelles sont actuellement confrontés les implants osseux (Partie IV.1.3). Ils entraînent des douleurs chroniques, une invalidité, une longue période de convalescence et dans certains cas la nécessité de reprise chirurgicale si l'ostéointégration est trop compromise. Chaque intervention chirurgicale comporte un risque de contamination bactérienne. Celle-ci peut provenir du site opératoire lui-même, de la peau du patient, de la salle d'opération ou de l'environnement extérieur. Elles peuvent apparaître dans un court laps de temps suite à l'opération (3 mois), mais aussi être retardées selon la virulence de la souche et apparaître plusieurs mois ou années après la chirurgie. Les microorganismes les plus couramment impliqués dans les infections orthopédiques sont des bactéries Gram positives. On retrouve en priorité des staphylocoques, *S.aureus* ou *S. à coagulase négative*. Les bactéries Gram négatives comme *Escherichia Coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* sont quant à elles des causes moins fréquentes d'infections<sup>252,253</sup>.

Il y a plusieurs raisons qui rendent les infections d'implants particulièrement problématiques. Tout d'abord, le système immunitaire n'est pas le plus propice à lutter contre ce type d'infection. Les cellules, notamment les neutrophiles, sont déjà occupés à réagir à la présence de l'implant et leurs actions anti-infectieuses en sont diminuées. De plus, au contact de l'os, les bactéries possèdent des caractéristiques leur permettant de se protéger. Ainsi, les staphylocoques sont capables de s'internaliser dans les ostéoblastes pour échapper au système immunitaire<sup>254</sup>. Toutefois, le plus gros problème auquel on fait face est la présence de biofilm. Lorsque les bactéries adhèrent sur une surface d'implant, elles vont s'organiser et sécréter des polymères dans leur environnement local (Figure 32). Ces sécrétions sont appelées biofilms et représentent un véritable bouclier face aux antibiotiques et au système immunitaire<sup>255</sup>.

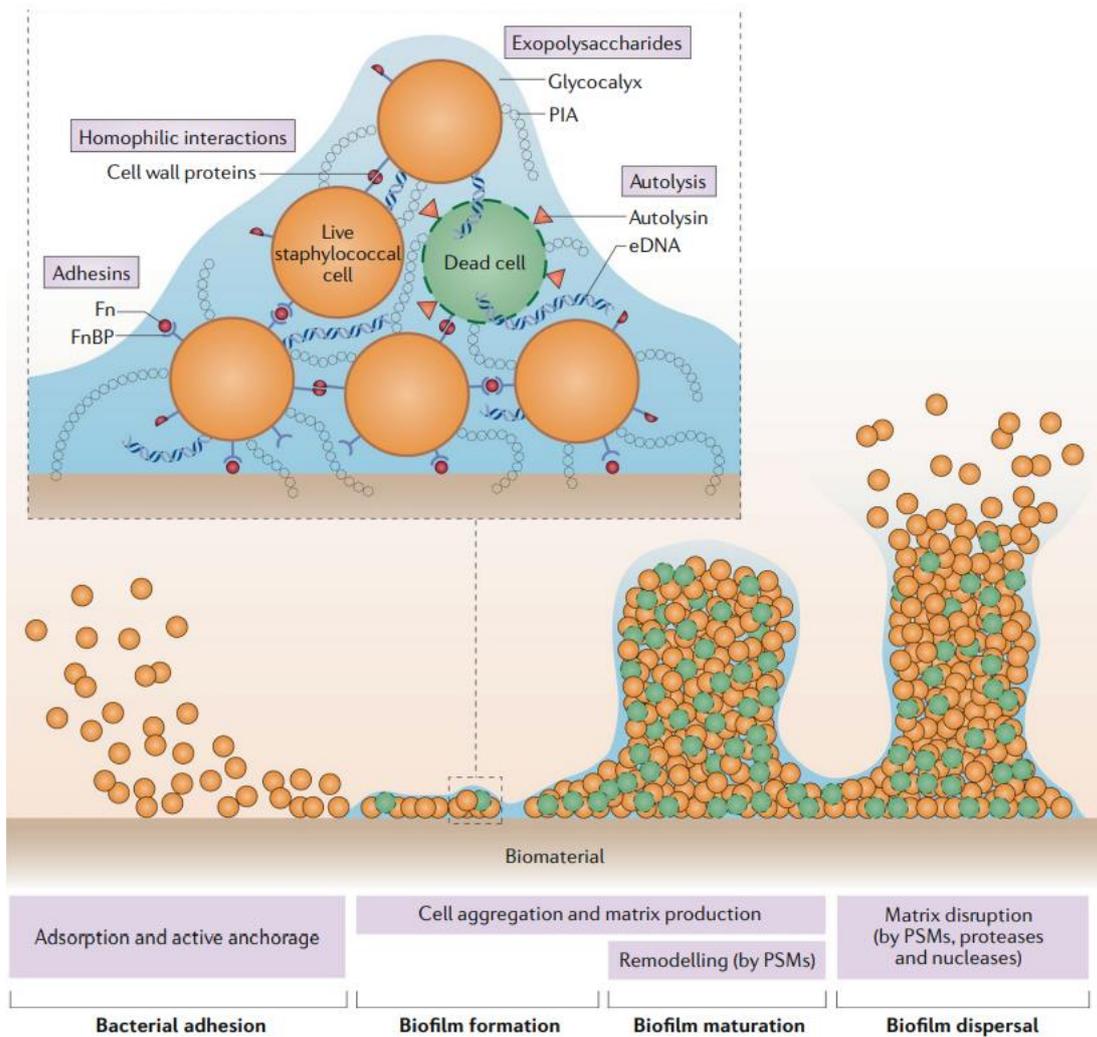


Figure 32 : **Etapes de la formation de biofilms par les Staphylocoques.** L'ancrage des bactéries à un biomatériau est souvent suivi de la formation d'un biofilm. Les adhesines sont des protéines capables de se lier à différents ligands de la matrice extracellulaire. On retrouve notamment la protéine de liaison à la fibronectine (FnBP) et l'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA). L'association de la FnBP avec la fibronectine (Fn) ainsi que les interactions des protéines de la paroi permettent la création de liaisons inter-cellulaires et l'agrégation des bactéries. Les bactéries vont alors sécréter différentes substances dans l'environnement extracellulaire. On retrouve des polymères (glycocalix) ainsi que de l'ADN extracellulaire (ADNe) relargué suite à l'autolyse de bactérie ou de cellules hôtes. L'ensemble constitue un environnement protecteur pour les bactéries. A terme, la matrice peut être détruite via l'action de protéases et de nucléases, permettant le relargage des bactéries et l'apparition potentielle d'infections systémiques (source <sup>252</sup>).

L'administration d'antibiotiques reste une stratégie viable<sup>256</sup>, même s'il ne faut pas ignorer leurs effets secondaires. Deux raisons majeures justifient des réticences à l'utilisation d'antibiotiques. Dans un premier temps, les propriétés bactéricides du médicament peuvent être réduites ou totalement éliminées par le biofilm. De plus, l'administration médicamenteuse ne permet pas toujours d'atteindre des doses suffisamment élevées de la molécule bactéricide localement. La seconde raison est liée à l'apparition de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Vous n'êtes pas sans savoir que nos modes de vie et notre consommation d'antibiotiques a conduit à l'accumulation d'antibiotiques dans notre environnement. Les bactéries sont fréquemment exposées à des doses non létales d'antibiotiques et cela joue un rôle important dans l'évolution de résistances<sup>257</sup>. Afin de contribuer activement à une baisse de la consommation d'antibiotiques, mais également pour lutter contre des infections par des souches résistantes (*S. aureus* résistant à la méticilline (MRSA)), il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies<sup>258</sup>.

La recherche s'est donc concentrée sur des stratégies pouvant prévenir l'apparition d'infections localement, au niveau du site de l'implant. L'objectif est de concevoir des surfaces capables d'atténuer la formation de biofilms. Les deux principales approches sont les modifications chimiques<sup>259,260</sup> ou physiques<sup>7,261</sup> des biomatériaux utilisés pour la fabrication d'implants osseux.

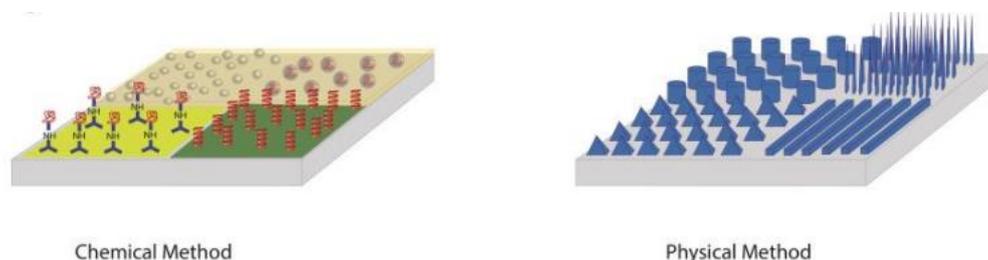


Figure 33 : **Schématisme des deux approches majeures dans la conception de surfaces innovantes pour lutter contre les infections bactériennes péri-implants.** La méthode chimique est associée à l'utilisation de molécules bactéricides. Cela concerne des antibiotiques, ions métalliques, peptides ou polymères. Ils peuvent être ajoutés par revêtement de surface ou greffage chimique de groupe fonctionnel. Les méthodes physiques reposent sur la création de structures micro ou nanométriques qui confèrent des propriétés anti-adhésives ou mécano-bactéricides (source <sup>262</sup>).

## 2. Méthode chimique : Revêtement

Les premières recherches ont porté sur l'ajout de molécules antimicrobiennes à la surface des implants. Comme présenté Figure 33, cela concerne une multitude d'agents qui peuvent être intégrés par revêtement ou directement greffés à la surface. Parmi les stratégies qui ont été développées, on peut mentionner l'utilisation :

- d'antibiotiques (Gentamicine<sup>263</sup>, Vancomycine<sup>264</sup> et d'autres<sup>265,266</sup>)
- d'ions métalliques antibactériens (Argent<sup>267</sup> et nanoAg<sup>268</sup>, Cuivre<sup>269</sup>, Zinc<sup>270,271</sup>, Manganèse<sup>272</sup>)
- de peptides antimicrobiens <sup>273</sup>
- de polymères (Chitosan<sup>269</sup>, « smart surface »<sup>274</sup>)

L'utilisation de telles molécules présente plusieurs inconvénients. Concernant les antibiotiques, le problème de la résistance a été évoqué auparavant et rend cette approche peu attrayante. Concernant les ions métalliques, ils possèdent un fort potentiel, avec des niveaux de bactéricidie élevé. Une étude menée sur une surface de titane traitée par oxydation micro-arc avec incorporation d'Ag<sub>2</sub>O a évalué l'effet bactéricide sur *S.aureus*. Selon la concentration en Ag incorporée, ils ont pu montrer un taux antibactérien atteignant environ 99%<sup>275</sup>. Cependant, ce type d'agents soulève le problème de toxicité potentielle sur les tissus de l'hôte. Sans oublier qu'il faut éviter tout effet néfaste sur l'ostéointégration de l'implant. Malgré tout, une partie des ions métalliques à l'étude est naturellement présente dans l'organisme et ne montre pas ou peu de toxicité avec les tissus humains.

Une autre grande question reste la maîtrise du relargage de ces agents. Pour pouvoir assurer une protection prolongée, il est en effet nécessaire que les agents antimicrobiens se diffusent au cours du temps. En pratique, c'est encore assez complexe à réaliser, même si d'énormes innovations voient le jour. Ainsi, de nouvelles méthodes de revêtement de surface permettent d'imaginer l'incorporation d'ions métalliques qui peuvent être diffusés selon le taux de dégradation du revêtement utilisé. Par exemple, une étude de Zhang et al. a étudié le comportement d'un revêtement composite d'hydroxyapatite avec incorporation de Nano Ag/ZnO sur un implant en Ti6Al4V<sup>268</sup>. Une faible cytotoxicité *in vitro* a été observée sur les premiers jours de culture d'une lignée d'ostéoblastes murins. De plus, leur traitement de surface a assuré une libération progressive et sur le long terme

(21 jours) d'une faible concentration d'ions Ag et Zn. Cette diffusion d'ions démontrait une bonne activité antibactérienne et suite à l'implantation *in vivo*, n'a pas montré de signe de lésions induites aux tissus autour de l'implant.

Cependant, une étude a montré une accumulation d'ions titane, chromium et cobalt dans le tissu osseux péri-implant et la moelle osseuse inter trabéculaire. Il est donc nécessaire d'actualiser notre vision des conséquences à long terme de l'utilisation de biomatériaux et des molécules bioactives qui leur sont associées. Ces stratégies semblent très prometteuses mais nécessitent un examen minutieux quant à leur potentielle toxicité à long terme.

Face aux nombreuses considérations que nécessite l'utilisation d'agents antimicrobiens, des alternatives sont nécessaires. Cette prise de conscience a amené la recherche à considérer le développement de surfaces qui puissent avoir un effet bactéricide inhérent. De récentes avancées en méthodes de fabrication à l'échelle nanométrique rendent les approches physiques plus intéressantes. En particulier, nous avons vu précédemment comment les micro et /ou nanostructurations de surface peuvent modifier les propriétés des biomatériaux. De nombreuses recherches actuelles s'intéressent donc à la fabrication de surfaces rendues bactéricides via leur topographie de surface.

### **3. Méthodes physiques : topographies de surface**

#### **3.1 Biomimétisme**

De nombreuses espèces végétales et animales ont développé des stratégies de défense contre les bactéries<sup>6,276,277</sup>. Ces surfaces naturelles exploitent des topographies variables pour s'approprier des propriétés biologiques diverses (Figure 34). Par exemple, les réseaux de nanostructures trouvés à la surface des ailes d'insectes peuvent tuer efficacement les bactéries par inactivation mécanique des cellules procaryotes<sup>6</sup>. En réalité, on peut identifier deux propriétés prédominantes lorsque l'on considère une protection face aux infections bactériennes : l'inhibition de l'adhérence bactérienne appelée en anglais « antifouling » et l'action de bactéricidie.

Ces activités sont dues aux interactions entre les bactéries et la surface, l'action spécifique (antibactérienne ou « antifouling ») étant déterminée par la géométrie de la surface et le comportement de l'espèce microbienne.

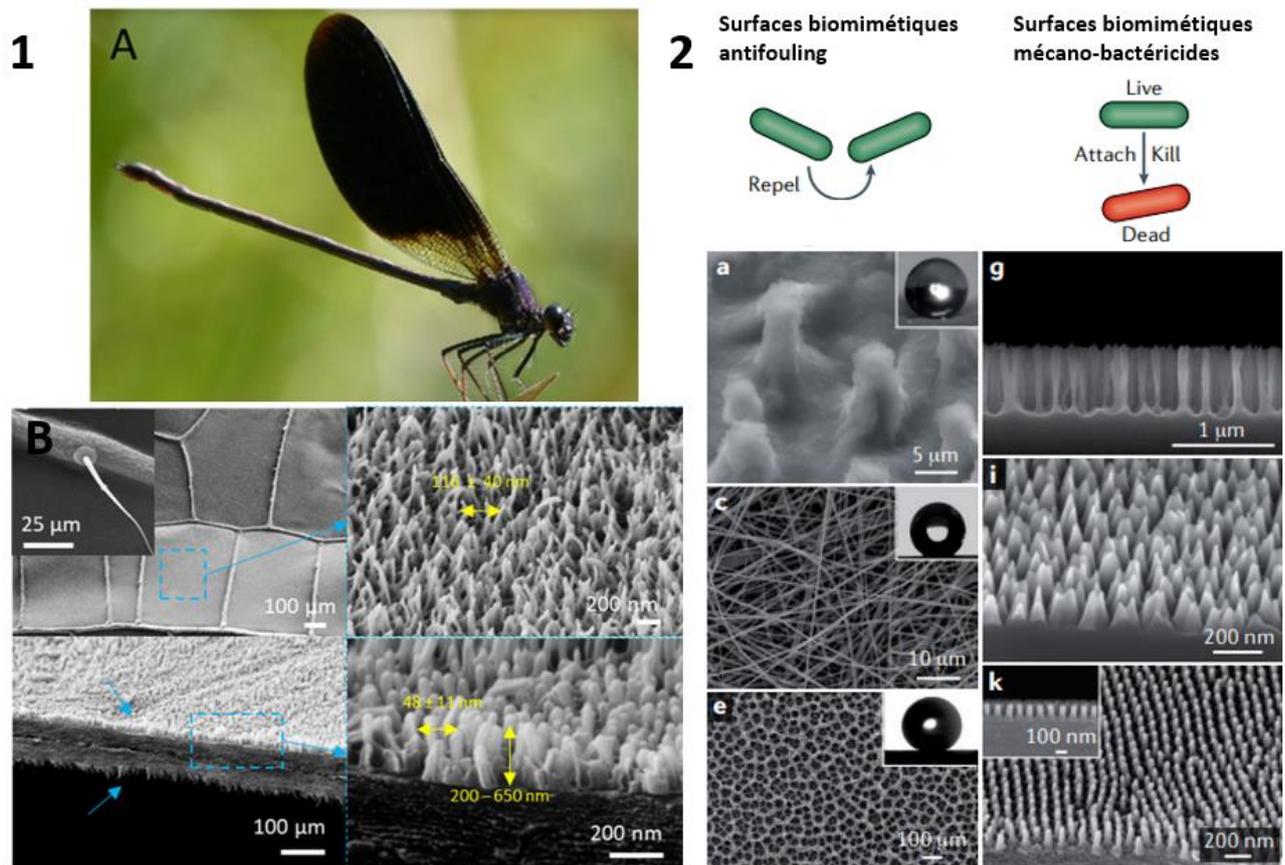


Figure 34 : Images par MEB de surfaces naturelles et équivalents biomimétiques. **1A** : Photo d'une libellule *C. haemorrhoidalis*. **1B** : Images MEB de la surface des ailes de la libellule. Vue de haut et à 45° des nanopiliers organisés à la surface. Les réseaux de nanopiliers sont présents sur les deux faces de l'aile (flèches bleues) (source <sup>278</sup>). **2** : On identifie sur le panel de gauche (**a**, **c**, **e**), des surfaces avec des propriétés antifouling. Pour chacune de ces images, l'angle de contact à l'eau des surfaces vous est présenté dans le coin supérieur droit. Toutes ces surfaces sont super-hydrophobes ce qui leur permet d'empêcher l'adhérence des bactéries et de les repousser. Le panel de droite (**g**, **i**, **k**) correspond à un ensemble de surfaces démontrant un effet bactéricide. Toutes les surfaces présentées sont issues d'études ayant pour objectif la reproduction synthétique de surfaces naturelles. **a** : Réplica de la feuille de lotus par impression sur polydiméthylsiloxane. **c** : Membrane fibreuse de polystyrène similaire à la surface de la pastèque chinoise. **e** : Structure en maille de cuivre poreux inspiré des feuilles de lotus. **g** et **i** : Structures de silicone noir, inspirée des ailes de libellules. A la différence de **g**, les structures en **i** sont pyramidales. **k** : Réseau de nanopiliers imprimés sur polydiméthylsiloxane et inspirés des ailes de cigales. L'ensemble des références sont accessibles dans la revue source <sup>279</sup>.

En s'inspirant de ce qui a été développé dans la nature, on peut donc imaginer arriver à produire des surfaces qui seraient intrinsèquement bactéricides, sans besoin d'ajouter de molécules à leur surface. Les progrès récents dans le domaine des matériaux et de la nano-ingénierie permettent de développer des surfaces à topographie contrôlée. Dans ce contexte, on a vu apparaître ces dernières années des surfaces bio-inspirée par la nature, en particulier des ailes d'insectes<sup>280</sup>. Les différents matériaux ainsi fabriqués acquièrent alors des propriétés mécano-bactéricides contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives.

### 3.2 Adhérence bactérienne

Dans le cadre du développement de biomatériaux pour la reconstruction osseuse, on peut envisager empêcher l'adhérence des bactéries à la surface de l'implant. Il s'agit en effet d'une étape clé dans la formation ultérieure d'un biofilm qui conduira à une infection. Prévenir l'apparition de ces infections plutôt que d'essayer d'en traiter les conséquences semble la solution la plus viable. L'adhérence bactérienne est influencée par les propriétés de surface du matériau, telles que la charge de surface, l'hydrophilie ou la rugosité de la surface<sup>281</sup>.

Quand on considère certaines topographies de surface, on identifie deux principes :

- Le premier est totalement inhérent aux topographies. Il considère qu'une topographie d'elle-même va favoriser, ou non, différents phénomènes d'adhérence bactérienne. Dans un premier temps on peut considérer qu'une topographie à l'échelle d'une dizaine de micromètres ou plus est plus propice à l'adhérence bactérienne. C'est lié au fait que ces topographies vont être de tailles supérieures aux bactéries et vont induire peu d'effet sur les bactéries en elles-mêmes. Elles représentent en réalité une surface d'adhérence plus importante pour une bactérie. Cela suit un principe simple où, sur une zone délimitée, la surface au sol est plus importante s'il y a des reliefs. Les structures multiplient donc les sites d'adhérence possibles.

Lorsqu'on considère des structures topographiques de plus petite taille, qui sont sur une échelle inférieure à celle des bactéries (du nanomètre jusqu'à quelques micromètres), elles vont directement avoir un impact sur les bactéries et notamment sur leur capacités d'adhérence. En particulier, ces nanostructures vont moduler la possibilité d'interactions électrostatiques. Il a été montré que sur une surface lisse, une plus grande quantité de liaisons peuvent être établies entre les protéines de la paroi ou de la membrane bactériennes et la surface (Figure 35). Les bactéries retrouvent moins de possibilités de liaison en présence de nanostructures. Cela explique un effet antifouling inhérent à certaines topographies.

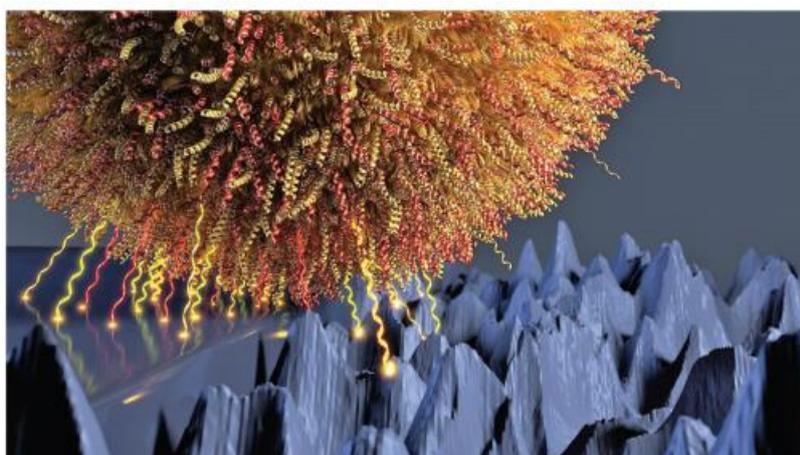


Figure 35 : **Illustration de l'adhérence d'une cellule bactérienne à une surface lisse ou nanostructurée.** Une surface lisse permet la mise en place de plus de liens électrostatiques avec la paroi bactérienne comparée à une surface nanostructurée (source <sup>282</sup>).

- Le second principe est dû à la capacité de la topographie à modifier la mouillabilité. La mouillabilité est un facteur prédominant dans la détermination de la capacité antifouling d'une surface. A ce jour, les liens de causalité entre adhérence bactérienne et mouillabilité ne sont pas encore clairs. Il semblerait que l'hydrophobie soit plus propice à l'adhérence de certaines bactéries, qui par nature ont une préférence pour les surfaces

hydrophobes de par leur composition de leur paroi ou de leur membrane. On peut voir une exception à cela: les surfaces avec des topographies hydrophobes ou superhydrophobes (Figure 34 2a, 2c et 2e). On considère une surface superhydrophobe lorsque l'angle de contact à l'eau est supérieur à 150°. Ce type de surfaces, généralement composé de pics, permettrait l'emprisonnement de bulles d'air à leur base. Ces bulles d'air seraient responsables d'un effet répulsif sur les bactéries qui s'approchent de la surface<sup>283</sup>. Outre ce phénomène particulier aux surfaces très hydrophobes, on observe généralement un effet antifouling lorsqu'on augmente l'hydrophilie<sup>281</sup>.

La modulation de l'adhérence bactérienne est une première étape pour permettre une protection de l'implant face aux infections bactériennes. Toutefois, pour aller plus loin, une surface idéale devrait être capable de tuer les bactéries qui essaient d'y adhérer. Cela est réalisable par l'ajout de topographies adéquates à la surface de l'implant. Toutefois, ce phénomène de bactéricidie est mécanique et implique un contact direct de la paroi bactérienne avec la surface du biomatériau. Il est donc nécessaire de trouver le compromis optimal entre caractères antifouling et caractère bactéricide.

### 3.3 Effet bactéricide

L'analyse des surfaces trouvées dans la nature nous encourage à imaginer le développement de structures mécano-bactéricides. Le terme mécano-bactéricide se rapporte à un effet dépendant d'une action mécanique sur la paroi bactérienne. Effectivement, en se penchant sur les structures naturellement bactéricides, différentes hypothèses ont pu être apportées quant au mécanisme d'action. Même si la recherche n'a pas trouvé de consensus sur la raison de cette bactéricidie, il en sort néanmoins un accord sur une action mécanique. Elle provient de différents effets combinés et se traduit par la rupture de la paroi bactérienne entraînant une lyse de la bactérie. Par exemple, sur des surfaces biomimétiques des ailes de cigales, on retrouve des structures pyramidales avec un fort "aspect ratio", c'est-à-dire une structure très allongée (longueur/diamètre). Ces structures à l'échelle entre le nano et le micromètre sembleraient induire la rupture de la paroi bactérienne par un effet de tension sur la paroi. La question se pose sur les forces responsables de la création de cette tension. Il semblerait que cela puisse être dû à l'association de la gravité et de la force d'adsorption, ce qui pousserait la cellule à se rapprocher de la surface malgré les pics qui étirent la paroi. A noter que les dernières études avancent que la rupture se produirait au niveau de la paroi sous tension, suite aux stress créés par les pics au contact de la paroi (Figure 36b). Ainsi, la mécano-bactéricidie est dépendante des propriétés mécaniques de la paroi, ou membrane, une raison pour laquelle on observe des différences d'efficacité entre bactéries Gram positives et Gram négatives (Tableau 8 et Figure 39). Une autre hypothèse récemment avancée est qu'il y aurait une combinaison d'une forte adhérence bactérienne aux nanostructures via les polymères sécrétés par les bactéries, et d'une action répulsive, qui créerait deux forces opposées, entraînant la déchirure de la paroi. Les tentatives des bactéries pour s'éloigner de cette surface défavorable entraîneraient une détérioration de la membrane cellulaire.

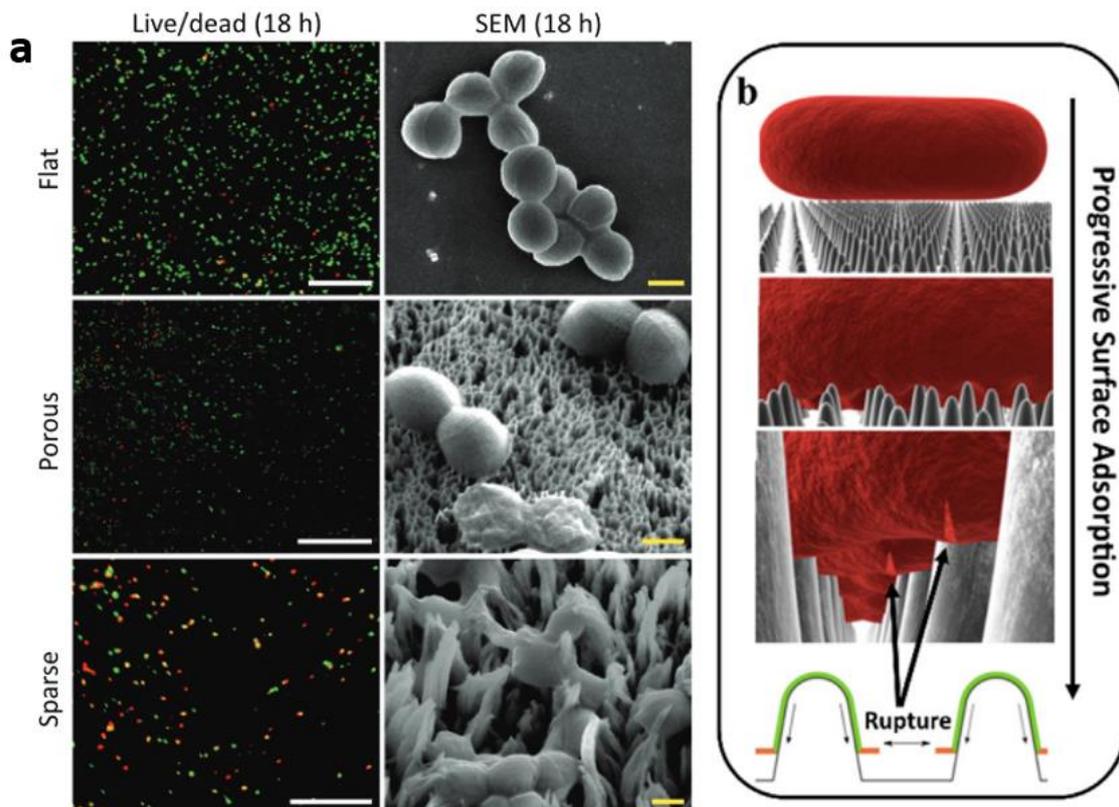


Figure 36 : **Illustration des propriétés bactéricides de nanopics.** **a** : Evaluation de la bactéricidie de surfaces en titane lisses (Flat) et nanostructurées (Porous, Sparse) sur des bactéries *S.aureus*. A gauche : images de microscopie à fluorescence représentatives de cellules *S. aureus*, viables en vert et mortes en rouge. On peut observer un effet antifouling sur les surfaces dites Sparse, avec une plus faible quantité totale de bactéries (source <sup>284</sup>). A droite : image par MEB de bactéries cultivées sur les surfaces pendant 18 heures. Alors que les bactéries ont une forme ronde (normale) sur titane lisse, des morphologies aplaties et étalées inhabituelles ont été observées sur les surfaces nanostructurées. La barre d'échelle est de 20 $\mu$ m pour les images de fluorescence et de 500nm en MEB (source <sup>143</sup>). **b** : Représentation schématique de l'effet mécano-bactéricide de nano-pics à fort aspect ratio, selon Elbourne et al.. On peut y voir l'approche de la bactérie, l'adhérence initiale avec déformation de la membrane cellulaire et enfin la rupture de la paroi dans la région suspendue entre les nanopics.

Lors des interactions cellulaires avec des surfaces micro et nanostructurées, la rigidité des membranes bactériennes est un facteur déterminant dans la réponse biologique et la capacité de survie des bactéries. Par exemple, l'efficacité des surfaces antibactériennes à fort aspect ratio est liée à la rigidité de la cellule adsorbée. Les cellules à Gram positif possèdent des couches plus épaisses de peptidoglycane, ce qui signifie qu'elles sont généralement plus rigides que les cellules Gram négatives, dont les membranes sont beaucoup plus fines (voir Figure 37). C'est pourquoi, il a été proposé que lors de l'adsorption à la surface des biomatériaux, les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles à la déformation, à l'étirement, et à la déchirure de la membrane<sup>284</sup>

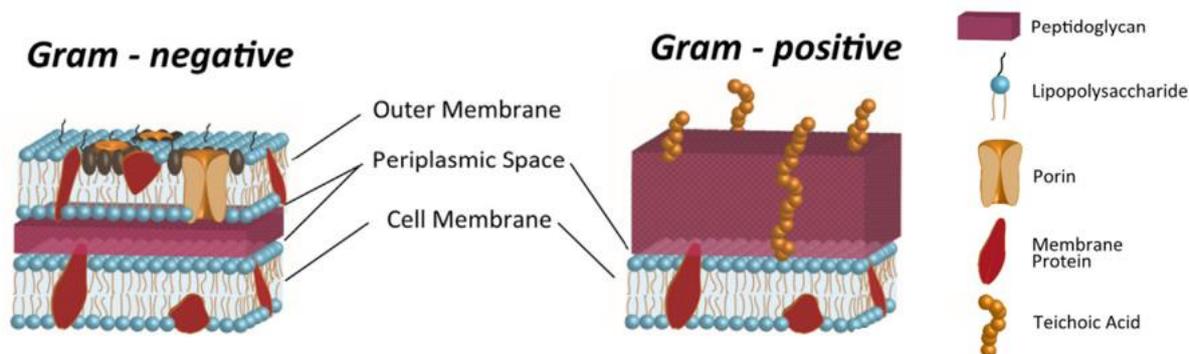


Figure 37 : **Comparaison de la structure et composition des bactéries gram positives et gram négatives** (source <sup>284</sup>). Les bactéries à Gram positif comportent une paroi épaisse de peptidoglycane. Leurs membranes sont plus rigides et sont donc plus résistantes à l'étirement et à la déchirure. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi cellulaire relativement plus fine, prise en sandwich entre les membranes cytoplasmiques externe et interne.

Afin d'obtenir une surface ayant une activité mécano-bactéricide, il est donc déterminant d'identifier les paramètres de gravures les plus adaptés. Une étude par Linklater et al. a ainsi testé la gravure de différents types de topographies et a pu observer des taux de bactéricidie très variables<sup>283</sup>. L'effet semble dépendant de la taille, l'aspect ratio et la densité des pics. Ainsi, les structures dites nanopiliers (inspirées des ailes de libellule) ont une action qui intègrerait le paramètre de flexibilité des piliers<sup>7,276</sup>. Les surfaces composées de fines bordures nanométriques auraient quant à elles la capacité de déstabiliser l'organisation lipidique de la membrane bactérienne, provoquant la création de pores.

Parmi les biomatériaux qui ont été développés sur ce principe mécano-bactéricide, différentes méthodes sont à l'étude et optimisées pour obtenir les nanostructures les plus intéressantes<sup>285</sup>. Comme vous pouvez l'observer dans le Tableau 8, les méthodes sont assez comparables à celles utilisées pour améliorer l'ostéointégration des biomatériaux. Par exemple, certaines gravures chimiques, plasma et électrochimiques ont déjà démontré qu'il était possible d'atteindre un taux de bactéricidie non négligeable.

Tableau 8 : **Comparaison de la mouillabilité et de l'effet bactéricide de différentes surfaces nanostructurées**. Les études sont présentées selon les caractéristiques principales de la méthode de gravure qui a permis leur obtention, la taille de leurs topographies, l'angle de contact à l'eau et le taux de mortalité bactérienne observé sur *S.aureus* ou *P.aeruginosa*. **A**<sup>286</sup>, **B**<sup>209</sup>, **C**<sup>287</sup>, **D**<sup>288</sup>, **E**<sup>277</sup>, **F**<sup>283</sup>

		Taille des topographies	Mouillabilité	Gram négative ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	Gram positive ( <i>Staphylococcus aureus</i> )
<b>A</b>	Gravure HCl	Micro	17°	84,7%	42,9%
	Gravure HCl + KOH	Micro/Nano	13°	99,4%	94,6%
	Gravure H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Micro	119°	93,3%	90,8%
	Gravure H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + KOH	Micro/Nano	5,2°	90,3%	94,8%
<b>B</b>	Gravure NaOH 5h	Nano	8°	94%	56%
	Gravure KOH 5h	Nano	10°	95,0%	64,0%
<b>C</b>	Gravure NaOH	Nano	/	/	74,0%
<b>D</b>	Gravure HNO <sub>3</sub> /HF + NaOH	Nano	17°	/	43,0%
<b>E</b>	Gravure KOH	Nano	73°	47,1%	19,8%
<b>F</b>	Gravure plasma	Micro/Nano	98°	72,5%	67,0%

Ce domaine de recherche est très dynamique et permet d'accumuler des connaissances sur le fonctionnement de telles stratégies antimicrobiennes. Sans trop de surprise, beaucoup de mécanismes d'action nous échappent encore. C'est ce que nous illustre Zhao et al. dans une récente étude introduisant la possibilité d'une mort programmée induite par les dommages mécaniques<sup>289</sup>. Selon eux, les dommages induits par les nanostructures ne seraient pas suffisants pour induire à eux-seuls la mort des bactéries. Leurs membranes internes pourraient subsister suite au contact avec les nanostructures. Toutefois, ils ont observé un état post stress comparable à une mort apoptotique suite aux dommages induits à la paroi. Cet état aurait pour effet une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène dans l'environnement. Selon eux, cela impliquerait des effets physiologiques durables sur la bactérie. On peut donc imaginer une possible propagation de signaux stressants dans l'environnement. Ces informations sont assez encourageantes quant au développement de surfaces mécano-bactéricides. Même si l'action bactéricide n'est pas totalement mécano-dépendante<sup>262</sup>, il semblerait que l'action des nanostructures pourrait induire la mort bactérienne, et ce, sans forcément avoir un fort contact avec les structures.

# Combiner les effets, objectifs de thèse

## 1. Surfaces mécanobactéricides pour des applications de reconstruction osseuse

Le succès des implants en applications orthopédiques, dentaires ou maxillo-faciales est généralement limité par un manque d'intégration à l'interface os-implant (Partie IV) et par le risque d'infections liées à l'implant (Partie V). L'interface biologique entre l'implant et le tissu de l'hôte est essentielle dans la détermination des performances du biomatériau. L'ingénierie de surface qui se développe depuis maintenant quelques années a permis d'introduire un éventuel contrôle de l'interface des biomatériaux en vue d'en améliorer le comportement. La possibilité de combiner un effet bactéricide à une meilleure ostéointégration permettrait d'augmenter grandement la sûreté des interventions requérant l'utilisation d'implants destinés à l'os.

La recherche s'attèle depuis quelques années à développer de tels biomatériaux. A ce jour encore aucun consensus n'a été trouvé quant à l'approche la plus adéquate pour atteindre cet objectif. Le recours à des revêtements supplémentés d'ions métalliques semble pourtant prendre le dessus. Certains ions métalliques sembleraient démontrer cette dualité d'effets tant recherché<sup>260</sup>. C'est par exemple le cas des ions  $Ag^{290-292}$ ,  $Cu^{293}$ ,  $Zn^{271,294}$  et  $Se^{295}$ , déjà évoqués et très présents dans la littérature actuelle. Une approche consiste à utiliser les différentes modifications de la couche de  $TiO_2$  comme solution pour l'incorporation d'éléments métalliques. On retrouve notamment le recours au remplissage de nanotubes de titane<sup>296</sup>. Il est ainsi possible de doter les implants en titane de meilleures capacités ostéogéniques et bactéricides grâce à la fonctionnalisation du  $TiO_2$ . Les ions métalliques représenteraient ainsi une alternative aux protéines dont les méthodes de revêtement intègrent encore beaucoup de complexité. Toutefois, on a vu que l'utilisation d'ions métalliques, comporte des risques quant aux quantités diffusées dans le temps par le matériau<sup>297</sup>. Cependant, certaines équipes sont convaincues qu'il est possible d'atteindre cet objectif sans recourir à l'utilisation de molécules bioactives.

On peut maintenant affirmer que la rugosité d'une surface est l'un des paramètres les plus importants et des plus prometteurs pour l'ostéointégration d'un implant (Partie IV 2.2). Outre l'espoir de trouver des topographies plus propices à l'ostéointégration, il est également nécessaire de développer des surfaces qui ne favorisent pas l'apparition d'infections péri-implant (Partie V). Il est donc primordial de trouver le bon compromis entre prévention des infections et amélioration de l'interface avec les tissus de l'hôte.

Le biomatériau idéal serait donc multifonctionnel : intrinsèquement antibactérien sans nécessiter de composants ou de traitements supplémentaires, tout en favorisant la croissance et la régénération des tissus à son contact<sup>298</sup>.

Deux domaines ont pendant longtemps évolué en parallèle: la recherche dédiée à la création et l'optimisation de surfaces bactéricides et celle tournée vers l'implémentation de surfaces ostéointégrable. Les avancées dans ces deux domaines les ont poussés à collaborer pour créer des topographies adaptées aux deux. On peut identifier deux approches :

- Partir de topographies ayant montré un intérêt dans l'induction d'une meilleure ostéointégration et en tester le potentiel bactéricide<sup>299</sup>.

- Cibler des topographies possédant un fort effet bactéricide et étudier leur potentiel vis-à-vis de la régénération osseuse<sup>300</sup>.

Notre projet s'intègre dans cette deuxième catégorie. Le laboratoire du Pr Elena Ivanova (RMIT University, Melbourne, Australie) a été parmi les premiers à développer des surfaces bioniques bactéricides. Leur expertise développée ces dernières années leur a permis d'accumuler des connaissances sur l'efficacité bactéricide de différentes nanostructures. Ils ont pu optimiser les différents paramètres expérimentaux pour pouvoir cibler les topographies les plus propices pour induire une mécano-bactéricidie. Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Ivanova, l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse a étudié deux types de topographies de surfaces bactéricides. L'une est obtenue par gravure plasma (2T) et l'autre par gravure hydrothermale (HTE), à partir de titane lisse (Poli) (Figure 38).

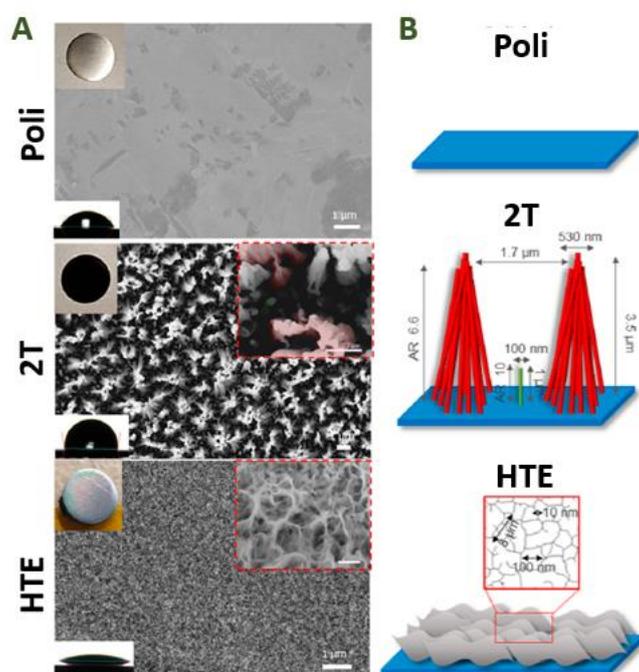


Figure 38 : **Caractérisation de surfaces de titane polies et nanostructurées développées par E. Ivanova.** **A** : Images MEB (vue du dessus) des différentes surfaces de titane : Surface polie (Poli), gravure plasma (2T) et gravure hydrothermale (HTE) respectivement. Les encarts en pointillés rouges sont représentatives des mêmes surfaces à plus fort grossissement. En haut à gauche, on peut retrouver des photographies prises suite au traitement du titane. En bas à gauche, des images illustrant l'angle de contact avec l'eau. **B** : Représentation schématisée des structures formées à la surface du titane (détail en Annexe 2 et 3). La gravure plasma de 40 min induit la formation de pics d'un diamètre à l'échelle nanométrique et d'une hauteur de l'ordre du micromètre. Intercalés entre ces pics se trouvent de plus petits pics de l'ordre d'une centaine de nanomètres. La gravure hydrothermale quant à elle, forme un réseau de " nanoarêtes " (de l'anglais nanoedges). Ces structures ont une épaisseur de 10nm à leur extrémité et sont espacées de 100nm.

Ces surfaces ont démontré des niveaux de bactéricidie presque comparables à ceux obtenus à l'aide de molécules bioactives (Figure 39). En général, les molécules bactéricides d'intérêt dans une optique thérapeutique atteignent des efficacités de 90 à 100% de bactéricidie. Ici, les topographies 2T et HTE démontrent respectivement un effet bactéricide de  $87 \pm 2 \%$  et  $98.8 \pm 0.7 \%$  contre la souche *P.aeruginosa*. Vous pouvez également observer sur cette image des propriétés variables d'antifouling selon la surface en titane. Le titane lisse a en l'occurrence un effet antifouling plus important que ses alternatives nanostructurées, avec environ 4 fois plus de bactéries présentes au  $\text{mm}^2$  sur les surfaces nanostructurées par rapport à Poli. Cette tendance s'inverse en présence de *Staphylococcus aureus*.

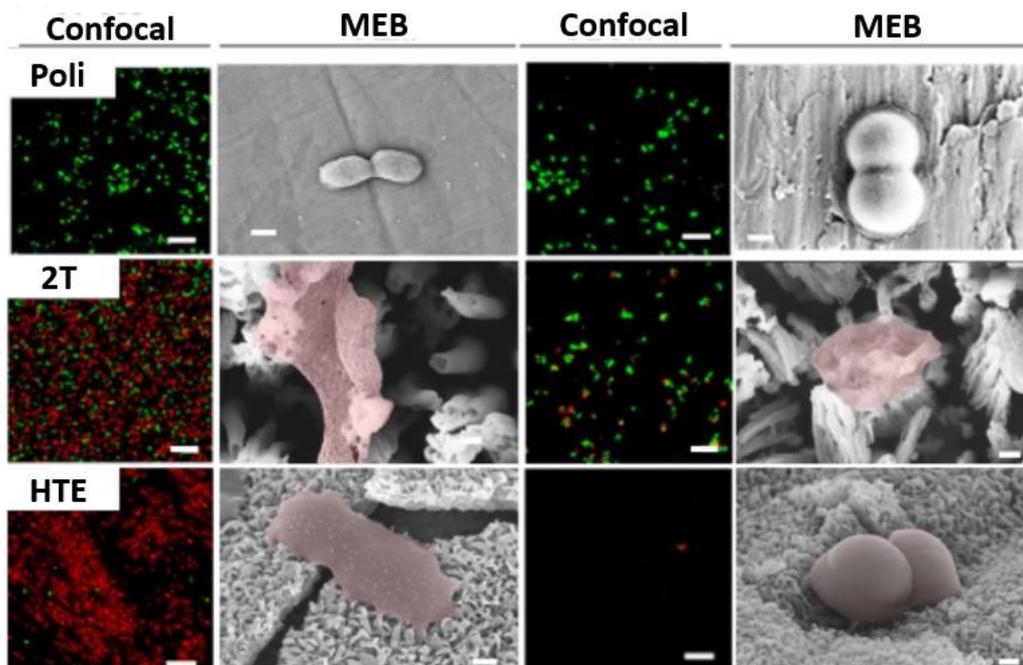


Figure 39 : **Démonstration par microscopie de l'efficacité bactéricide de nanostructures à la surface de titane.** Activité antibactérienne des surfaces de titane lisses (Poli), titane obtenu par gravure plasma (2T) et titane traité par gravure hydrothermale (HTE). L'activité antibactérienne a été testée contre les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* (panel de gauche) et *Staphylococcus aureus* (panel de droite), représentée par des images en microscopie confocale et MEB respectivement. Le signal vert correspond à des bactéries viables là où le signal rouge marque les bactéries non viables. Les bactéries rosées sur les images de MEB illustrent la bactéricidie dépendante de la topographie 2T et HTE. Les barres d'échelle sont de 10  $\mu$ m en confocal et de 200nm pour les images en MEB.

En collaboration avec ce laboratoire, notre équipe a montré que ces biomatériaux naturellement antibactériens permettent non seulement l'adhérence et la prolifération de cellules-souches mésenchymateuses (CSM), mais présentent en plus des propriétés ostéoinductives *in vitro*<sup>8</sup>.

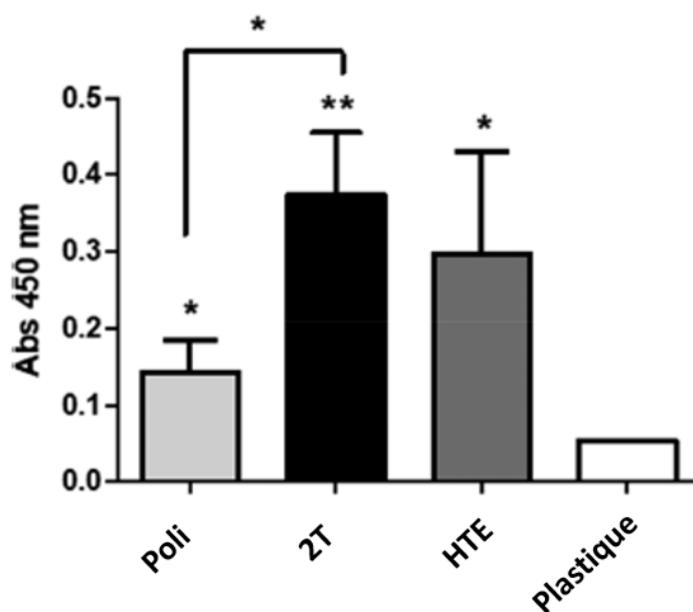


Figure 40 : **Les nanostructures de titane soutiennent la différenciation ostéogénique de CSM<sup>301</sup>.** Minéralisation des cellules détectée via l'absorbance du rouge d'Alizarine après 21 jours de culture sur les différentes surfaces. La surface plastique correspond à un contrôle négatif de CSM cultivées sur un plastique de culture. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p = 0.0016$ ).

Il a été montré que ces surfaces en titane induisent des modifications des CSM cultivées à leur surface. En particulier, des modifications morphologiques ont été observées, qui pourraient être à l'origine de la différenciation des CSM en ostéoblastes. Effectivement, les nanostructures 2T et HTE induisent une calcification plus importante après 21 jours de culture (Figure 40).

## 2. Objectifs

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité de ces résultats et avait pour but de démontrer le potentiel thérapeutique de ces supports innovants comme outils thérapeutiques en reconstruction osseuse. Nous souhaitons analyser plus en détail les voies de signalisation induites par les nanostructures de nos supports et déterminer le comportement de ces implants en titane nanostructurés *in vivo*, au contact des tissus

Le chapitre "Résultats" comportera quatre parties :

- La première sera consacrée à une évaluation des premières interactions auxquels un implant fait face suite à son implantation. Elle abordera notamment les premiers contact d'un implant avec le sang.
- Une deuxième partie se concentrera sur l'utilisation de modèle expérimentaux *in vitro* afin d'étudier l'ostéogénèse induite par la topographie de surface. L'impact des nanostructures de titane sur différents acteurs biologiques de la régénération osseuse sera décrit. L'accent sera notamment mis sur l'étude de la différenciation ostéogénique de cellules souches mésenchymateuses. Cela permet de modéliser *in vitro* certains aspects indispensables à l'ostéointégration des implants.
- La troisième partie élargira les observations faites sur les cellules souches mésenchymateuses aux comportements de cellules endothéliales. Cette partie aura pour objectif de déterminer un possible effet pro-angiogénique des topographies du titane.
- La quatrième partie reprendra les résultats obtenus lors d'une étude de nos implants *in vivo*, sur un modèle de défaut critique crânial du rat. Ce chapitre permettra d'émettre des conclusions quant au potentiel des nanotopographies de surface pour la régénération osseuse.

Enfin, le chapitre "Discussion" permettra de confronter les résultats obtenus à l'état des connaissances actuelles. Cette partie comprendra également des perspectives sur l'avenir de telles stratégies d'ingénierie tissulaire.

# Chapitre II :

## Matériels & Méthodes



# I. Surfaces en titane nanostructurées

## 1. Production des surfaces nanostructurées

### 1.1. Surfaces polies

Des tiges de titane commercialement pures (CP) ASTM (1 ou 0,5 cm de diamètre) ont été obtenues auprès de Goodfellow (Huntingdon, Angleterre). Un instrument Secotom-50 (Struers, Cleveland, États-Unis) a été utilisé pour couper les tiges de titane en disques de 1 à 2 mm d'épaisseur. Suite à cela, les disques de titane ont été polis à l'aide de papiers abrasifs en carbure de silicium de granulométrie P1200. Les disques de titane polis ont été nettoyés par ultrasons pendant 5 minutes dans des solutions séquentielles d'acétone à 100 %, d'éthanol à 100 % et d'eau Milli-Q.

Ces surfaces sont appelées **Poli** dans le reste du manuscrit. Les différentes gravures effectuées pour induire une topographie particulière à la surface du titane ont été faites à partir de ces surfaces Poli.

### 1.2. Gravure plasma

La gravure plasma existe sous différents formats. Dans notre cas, les surfaces **2T** ont été obtenues par gravure ionique réactive (GIR). La modification des surfaces Poli pour leur conférer la topographie 2T a été réalisée par gravure sans masque à base de chlore. Les disques en titane ont été disposés sur un support en quartz au sein d'un instrument de gravure GIR (Plasma Lab System 100, Oxford Instruments) (Figure 41). La gravure a été faite en utilisant du gaz  $\text{Cl}_2$  maintenu à un débit de 50 sccm (débit du gaz en  $\text{cm}^3/\text{min}$ ), une puissance ICP de 1000W, RF de 100W et une pression de 3 mTorr pendant 40 min.

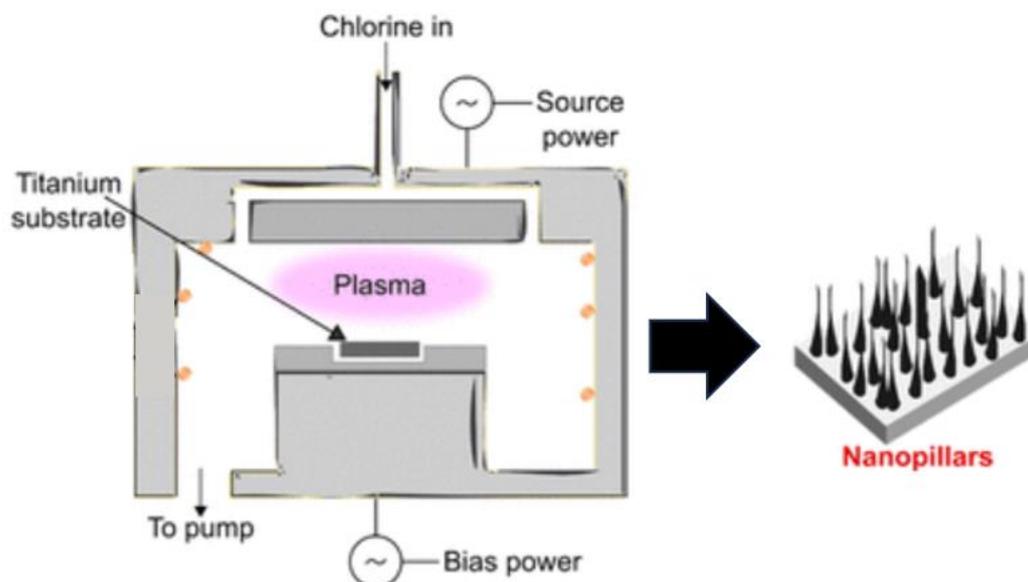


Figure 41 : **Illustration d'une chambre de gravure plasma.** Au sein de la chambre, un plasma va être généré suite à l'injection de gaz chlorure et la présence d'un champ électrique. Des ions vont être propulsés à la surface de l'échantillon en titane et arracher des atomes de sa surface. Après une période donnée de gravure, il est possible d'obtenir des nanopiliers à la surface de l'échantillon de titane (source <sup>302</sup>)

Le nom 2T est une contraction du terme « two-tier » signifiant "deux étages" et faisant référence à la topographie obtenue à la surface du titane suite à ce protocole de gravure plasma. En effet, la topographie présente deux nanostructures en pics de tailles distinctes, avec des pics d'une centaine de nanomètres et d'autres d'environ 3  $\mu\text{m}$ . Dans la littérature, il est possible de retrouver le terme « black titanium » pour parler de ce type de surface<sup>303,304</sup>. L'utilisation de ce terme se justifie par la couleur noire des surfaces.

### 1.3. Gravure hydrothermale

La gravure hydrothermale est une méthode bien établie reposant sur l'incubation de la surface dans une solution acide ou alcaline pendant un temps et une température donnés. Les paramètres utilisés pour la conception des surfaces **HTE** sont 1M KOH pendant 6 h à 150°C (Figure 42). En détail, les disques en titane préalablement polis ont été entièrement immergés dans 100 mL de KOH 1 M dans un autoclave revêtu de téflon et chauffé à 150 °C. Après la gravure hydrothermale, les disques de titane ont été collectés et conservés dans de l'eau Milli-Q pendant 24 heures.

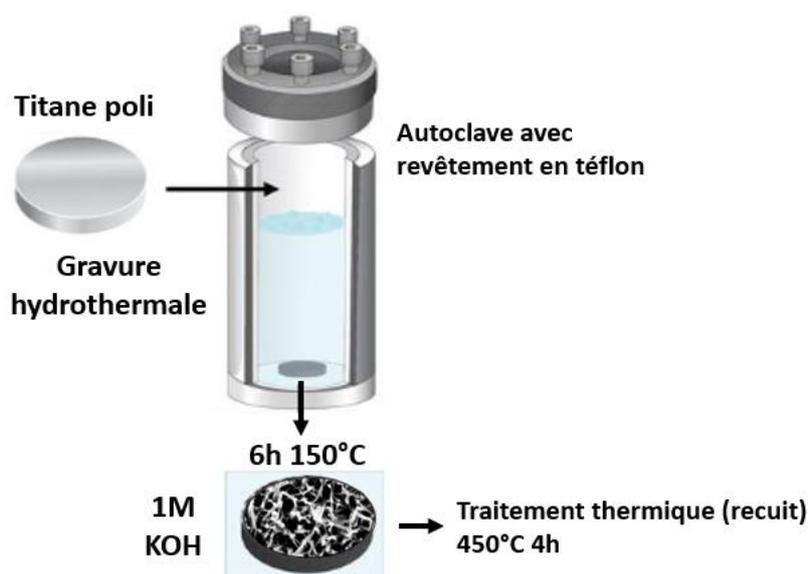


Figure 42 : **Illustration de la procédure de gravure hydrothermale.** Des disques de titane poli sont placés dans une solution de 1M KOH dans un autoclave. Après 6h d'incubation à 150°C, les surfaces sont placées dans de l'eau milli-Q puis séchées à 37°C. La préparation des surfaces s'est terminée par un recuit à 450°C pendant 4 h afin de stabiliser les structures.

Une étape de séchage pendant 24h à 37°C a été effectuée avant de poursuivre le traitement avec une étape de recuit à une température de 450°C pendant 4 h. L'augmentation de la température était graduelle à raison de 20°C/min. Cette étape est nécessaire dans la formation des nanostructures HTE et dans l'obtention d'une stabilité mécanique et chimique des structures de surfaces. La chambre a été laissée à refroidir jusqu'à atteindre la température ambiante, puis les surfaces en titanes ont été collectées. Enfin, une étape de sonication pendant 20 min dans l'éthanol 50% a permis l'élimination des impuretés et débris.

## 2. Conditions expérimentales

Pour cette thèse, les différentes surfaces étaient directement fournies prêtes à l'emploi par l'équipe d'Elena Ivanova. L'ensemble des conditions expérimentales utilisées pour ce projet vous sont résumées Tableau 9.

Tableau 9 : **Résumé des conditions expérimentales.** Deux conditions correspondent à des surfaces de culture en plastique avec différents milieux de culture. Trois autres conditions correspondent aux trois surfaces en titane.

Nom	Surface	Milieu de culture
<b>Plastique</b>	Plastique de culture traité	Milieu de maintien des CSM (MSC2)
<b>Osteo</b>	Plastique de culture traité	Milieu de différenciation ostéogénique (Stemcult)
<b>Poli</b>	Surface en titane polies	Milieu de maintien des CSM (MSC2)
<b>2T</b>	Surface en titane par gravure plasma	Milieu de maintien des CSM (MSC2)
<b>HTE</b>	Surface en titane par gravure hydrothermale	Milieu de maintien des CSM (MSC2)

Les disques en titane ont été gravés sur une seule face (visible Figure 43).

Préalablement à la mise en culture, il était nécessaire de suivre une procédure de stérilisation par autoclave.

Lors de la réutilisation de supports, ceux-ci étaient lavés par incubation, sous agitation, dans un mélange de PBS 0,5% tween, 0,5% Triton X-100, 1% SDS. Ils étaient ensuite soumis à deux sonications (15 sec ON à 90% de puissance; 15 sec OFF): la première dans de l'eau distillée et la seconde dans de l'éthanol 70%. Les supports étaient ensuite autoclavés.

Les supports ont été utilisés dans des plaques de 48 puits (surface de 1,1cm<sup>2</sup>) ou 96 puits (surface de 0,32cm<sup>2</sup>) selon la taille des supports : 0,8cm<sup>2</sup> ou 0,2 cm<sup>2</sup> (Figure 43).

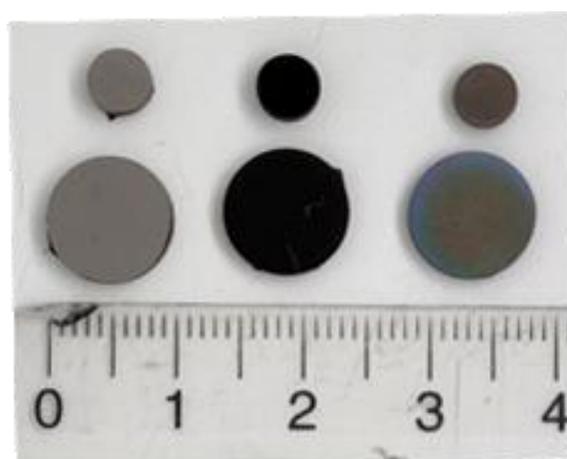


Figure 43 : **Photographie des trois surfaces en titane étudiées.** Deux formats ont été utilisés : des surfaces de 5 mm de diamètre et des surfaces de 1 cm. De gauche à droite on retrouve les surfaces Poli, 2T et HTE. On peut observer les différences de couleurs qu'induisent les topographies de surface.

## II. Modélisation de l'interaction initiale

### 1. Mesure de l'adsorption protéique des surfaces en titane

La capacité d'adsorption en protéines des différentes surfaces a été évaluée par l'analyse d'adsorption de l'albumine bovine (BSA) ou de fibronectine, suivant un protocole inspiré de <sup>305,306</sup>.

#### 1.1. Albumine de sérum bovin (BSA)

Les surfaces ont été incubées pendant 2 h dans une plaque 48 puits sur un agitateur horizontal à 100 rpm, 37°C avec 300 µL d'une solution de 0,2 mg/mL de BSA dans du PBS. La solution protéique était ensuite aspirée et les surfaces en titane étaient abondamment lavées 3 fois au PBS. Pour pouvoir quantifier la BSA, les surfaces étaient ensuite incubées 1 h à 100 rotations par minute (rpm), 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> dans 200 µL de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 1 %. La solution de SDS était alors récupérée et la BSA qu'elle contenait quantifiée grâce à un kit de dosage protéique (DC protein assay, Biorad, référence 500-0115). Pour gagner en sensibilité, le dosage était effectué en mode micro, suivant les conseils du fournisseur. Cela repose sur l'utilisation de 20 µl non dilué de la solution à étudier, au lieu des 5 µl généralement recommandés. Enfin, la concentration en protéines a été calculée par comparaison des valeurs d'absorbance de nos échantillons avec une courbe standard de BSA.

#### 1.2. Fibronectine

Le même protocole a été mis en place pour étudier l'adsorption d'une protéine humaine : la fibronectine. Les surfaces ont été immergées dans une solution de 0,1 mg/mL de fibronectine humaine recombinante. L'ensemble a été incubé pendant 2 h sur un agitateur placé dans un incubateur à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Les surfaces ont été abondamment lavées à trois reprises avec du PBS puis incubées 1 h à 100 rpm, 37°C dans 200 µl d'une solution à 1% SDS. La solution a par la suite été collectée et a servi à quantifier la fibronectine récupérée des surfaces en titane par dosage protéique.

### 2. Interaction avec le sang

#### 2.1. Prélèvement sanguin

Le sang utilisé était d'origine animale (rat). Le sang de rat a été prélevé sur les rats inclus dans l'étude *in vivo* de défaut crânien (voir ci-dessous) au moment de leur euthanasie. Brièvement, le sang a été prélevé par voie intracardiaque à l'aide d'une seringue de 2 mL et d'une aiguille de 18G (Terumo), en évitant autant que possible d'induire un stress mécanique susceptible de provoquer une coagulation. Le sang ainsi récupéré a été directement appliqué sur les surfaces en titane pour l'étude du potentiel de coagulation. Pour les autres expériences nécessitant du sang, une seringue préalablement revêtue d'héparine (PanPharma ETI3M219-1) a été utilisée. Le sang ainsi prélevé a été gardé à température ambiante en tube hépariné de 1 mL et utilisé dans les deux heures qui ont suivi.

## 2.2. Hémolyse

L'activité hémolytique de nos différentes surfaces en titane a été analysée (Figure 44). Pour cela, du sang de rat hépariné a été centrifugé pendant 15 min à 500 g en faisant attention à retirer au préalable le frein de l'appareil. Il a ainsi été possible d'isoler une solution de globules rouges qui a ensuite été diluée à 10% dans du PBS. Les surfaces en titane ont été immergées dans cette solution de globules rouges pendant 2 h à 37°C sous agitation. A l'issue de cette incubation, la solution a été collectée puis centrifugée à 4000 g pendant 15 min, afin de culotter les globules rouges et 100 µl de surnageant ont été utilisés pour lire l'absorbance à 540 nm. L'absorbance est corrélée à la quantité d'hémoglobine relarguée par la lyse de globules rouges. Cette expérience a été réalisée en répliqués à partir du sang de quatre rats différents.

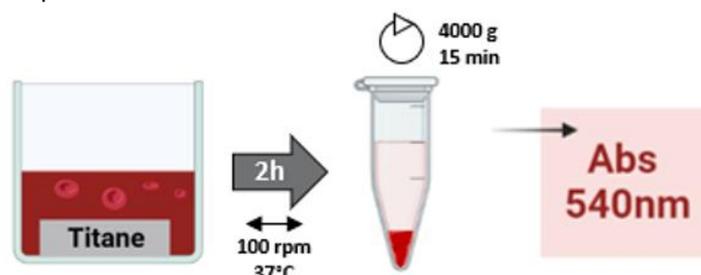


Figure 44: **Schéma du protocole d'analyse de l'hémolyse induite par les surfaces en titane.** Une solution de 10 % de globules rouges dilués dans du PBS est déposée en contact avec nos surfaces en titane pendant 2 h à 37°C sous agitation constante. La quantité d'hémoglobine relarguée pendant cette étape peut être estimée en étudiant l'absorbance à 540 nm du surnageant récupéré après une centrifugation de 15 min à 4000 g.

## 2.3. Coagulation

Le potentiel coagulant des différentes surfaces en titane a été évalué par une méthode simple de dépôt de sang<sup>307</sup> (Figure 45). Du sang sans anticoagulant était prélevé de 4 rats différents et, dans les secondes suivantes, 5 µl de ce sang était déposé sous forme de goutte à la surface des supports en titane. Après 15, 30 ou 45 min d'incubation à température ambiante, 500 µl d'eau milli-Q étaient ajoutés, suivis de 30 s d'agitation horizontale manuelle et de 5 min d'incubation. A la fin, 200 µl de surnageant étaient récupérés pour être analysés à 540 nm (Tecan, Sunrise). L'absorbance est proportionnelle à la quantité de globules rouges dans le surnageant. On peut ainsi la corréler à la quantité de globules rouges pris dans le coagulat.

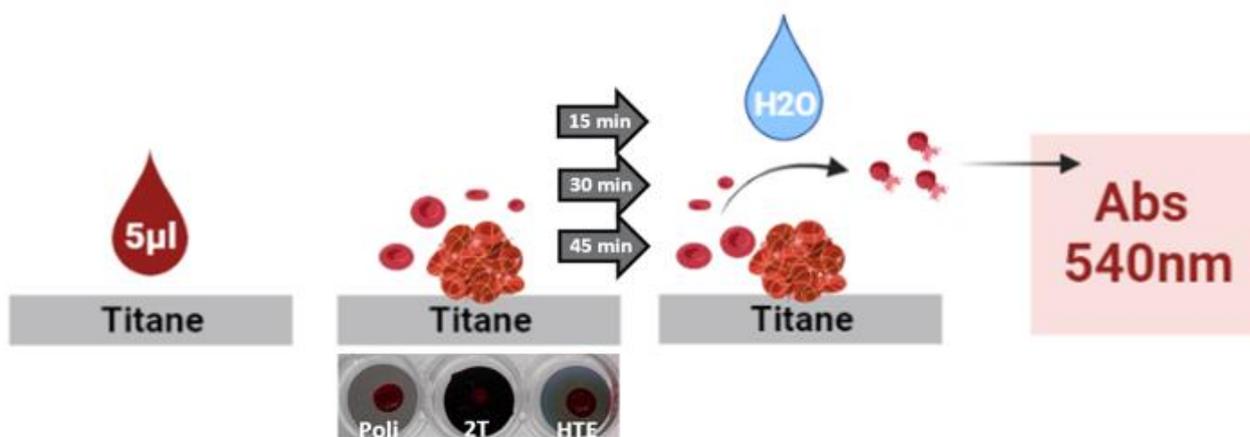


Figure 45: **Récapitulatif du protocole d'étude du potentiel coagulant.** Une goutte de sang était déposée sur une surface en titane et après différents temps d'incubation, 500µl d'eau sont ajoutés. L'eau permet de lyser les globules rouges non pris dans le coagulat. L'absorbance de l'hémoglobine ainsi relarguée est inversement proportionnelle à la taille du coagulat et au potentiel coagulant de la surface en titane.

## **III. Modélisation *in vitro* du potentiel ostéogénique**

### **1. Cellules souches mésenchymateuses (CSM)**

#### **1.1. Culture cellulaire**

Les cellules souches humaines dérivées de tissu adipeux ont été fournies par l'Etablissement Français du Sang de Saint Ismier (France). Nous avons à notre disposition des CSM isolées de 3 donneurs différents. Les expériences effectuées dans le cadre de ce projet ont été faites sur des CSM isolées d'un seul et même donneur.

Les CSM ont été cultivées dans un milieu « mesenchymal stem cell growth medium 2 » (Promocell) suivant le protocole du fournisseur. Brièvement, le milieu de culture était changé tous les 3 à 4 jours et les cellules étaient maintenues dans un environnement à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. La quantité de milieu variait entre 160 µl/cm<sup>2</sup> pour les cultures en flasque et 500 µl/cm<sup>2</sup> en plaques multipuits. Le nombre de passages des cellules a été étroitement contrôlé pour ne pas dépasser 6 passages. Selon l'expérience, l'ensemencement se faisait sur une base de 5000 cellules/cm<sup>2</sup> à 20000 cellules/cm<sup>2</sup>.

Les cellules étaient décollées grâce à l'action de l'enzyme TrypLE (Gibco) à 37°C. Brièvement, le milieu de culture était retiré et les cellules étaient lavées une fois au PBS afin d'éliminer le reste de milieu à la surface des cellules. Un volume de TrypLE était par la suite ajouté à la surface des cellules et laissé en contact environ 5 min à 37°C. Les cellules étaient collectées et centrifugées à 250 g pendant 5 min. Le surnageant était jeté et les cellules étaient resuspendues dans quelques mL de milieu de culture pour permettre le comptage avec du bleu de trypan. Les comptages étaient effectués à l'aide d'un automate Countess (Invitrogen).

#### **1.2. Différenciation ostéogénique**

Après 24 heures de culture, le milieu était renouvelé ou remplacé par du milieu Mesencult (Stemcell, référence 05465) dans le cas des contrôles de la différenciation ostéogénique. Le milieu de différenciation était renouvelé tous les 3 à 4 jours jusqu'à l'arrêt de la culture.

#### **1.3. Analyse de la signalisation dépendante de ROCK**

Dans le cadre du traitement avec molécules inhibitrices, 10 µM de Y27632 (référence 688002, Millipore) étaient ajoutés par puits 24h après l'ensemencement. Dans le cas d'expériences nécessitant des temps de culture long, l'inhibiteur était renouvelé dans le milieu de culture tous les 3 jours.

#### **1.4. Analyse de la signalisation dépendante de FAK**

Dans le cadre du traitement avec molécules inhibitrices, 1 µM d'inhibiteur 14 de FAK (référence SML0837, Sigma) étaient ajoutés par puits 24h après l'ensemencement. Dans le cas d'expériences nécessitant des temps de culture long, l'inhibiteur était renouvelé dans le milieu de culture tous les 3 jours.

Les concentrations en inhibiteurs ont été fixées en s'inspirant de la littérature<sup>308-310</sup> et en s'appuyant sur des analyses de viabilité cellulaire disponibles en Annexe 4.

## 1.5. Contrôles des marqueurs de surfaces par cytométrie en flux

La qualité de nos CSM a été contrôlée régulièrement. Brièvement, il est établi que les CSM peuvent être caractérisées par un ensemble de marqueurs de surfaces qu'elles expriment ou non. Les CSM doivent être :

- Positives** aux marqueurs CD90, CD105, CD44 et CD73
- Négatives** aux marqueurs CD45, CD34, CD11b, CD19 et HLA-DR

Brièvement, les CSM étaient récupérées par traitement à la TrypLE, puis lavées au PBS. Les cellules étaient ensuite remises en suspension dans du PBS additionné de 1% NGS (Normal Goat Serum), à raison de deux millions de cellules par mL. Différents tubes étaient préparés avec 5 µl des anticorps adéquates : 4 tubes correspondant aux 4 marquages positifs, 1 tube pour le cocktail de marquage négatif, ainsi qu'un tube pour le contrôle isotypique de marquage négatif et enfin un tube sans anticorps (Stemflow MSC analysis kit 562245, BD Biosciences). Après une incubation de 30 min dans le noir, les cellules étaient lavées deux fois avec du PBS 1% NGS et resuspendues dans un volume de 300-500 µl de ce même tampon. Les acquisitions ont été réalisées sur un cytomètre (Accuri C6 flow, BD Biosciences). L'analyse des données s'est faite avec le logiciel Cflow plus.

## 2. Mécanotransduction et marqueurs précoces de l'ostéogénèse

### 2.1. Immunofluorescence

Les CSM étaientensemencées à 5000 cellules/cm<sup>2</sup> à la surface des supports en titane (0,8 cm<sup>2</sup>) ou des lamelles de verre, pour une durée de 72 h. Les CSM étaient ensuite fixées avec de la paraformaldéhyde à 4 % et perméabilisées avec une solution de Triton-X100 à 0,2 % dans du PBS pendant 15 min. Après 3 lavages au PBS, les sites non spécifiques étaient bloqués par incubation pendant 1 h dans une solution de PBS contenant 10% de NGS. Les anticorps primaires étaient dilués dans une solution de PBS 0,05% Tween-20 (PBST), 10% NGS et incubés pendant 1h30 à la surface des supports. Après trois lavages au PBST, une solution de PBS 10 % NGS, 0,05 % Tween-20 contenant un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488 et de la phalloïdine-TRITC étaient ajoutés pendant 1h dans le noir. Après une phase de lavage, les noyaux étaient marqués grâce à l'utilisation d'une solution de PBS contenant 1 µM de Hoechst pendant 15 min. Après trois lavages à l'eau distillée, les différents supports étaient montés sur une lame de verre (milieu de montage Fluorsave, Millipore, référence 345789) et séchés sur la nuit à 4°C. Les lames étaient visualisées en épi-fluorescence sur un Axioimager M2 avec un objectif 40 X sans immersion. Pour l'analyse de localisation de YAP, les images de fluorescence du canal correspondant à l'Alexa-488 des différents groupes expérimentaux ont été acquises avec un temps d'exposition de 1000 ms. La comparaison des ratios de localisation de YAP a été obtenue grâce à un pipeline Cellprofiler<sup>311</sup>. La proportion de YAP dans le noyau a été quantifiée selon l'équation<sup>312</sup> :

$$\log \left( \frac{\text{Intensité nucléaire moyenne de YAP}}{\text{Intensité perinucléaire moyenne de YAP}} \right)$$

## 2.2. Western blot

Pour chaque condition expérimentale, plusieurs supports ont été ensemencés en parallèle. Les cellules étaient récupérées et culotées pour être lysées dans 20-50  $\mu$ l de RIPA complétement en inhibiteurs de protéases et phosphatases. Le RIPA est un tampon de lyse de composition: 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1,0 % (v/v) NP-40, 0,5 % (p/v) désoxycholate de sodium, 1,0 mM EDTA, 0,1 % (p/v) SDS et 0,01 % (p/v) azide de sodium à un pH de 7,4. Pour s'assurer d'une lyse complète, les échantillons étaient soniqués 4 min (15 sec ON/15 sec OFF, Diagenode bioruptor pico) à 4°C. Après centrifugation 10 min à 12000 g, le contenu total en protéines était quantifié suivant le protocole du kit (DC protein assay). Les échantillons étaient ensuite déposés sur un gel SDS-PAGE 10% à raison de 30  $\mu$ g de protéines par puits. Après 1h-1h30 de migration à 90-120 V, les protéines étaient transférées sur membrane de nitrocellulose (Ibnot, Invitrogen) par l'action d'un champ électrique de 100 V pendant 1h30. Les membranes de nitrocellulose étaient ensuite saturées avec 5% de lait en poudre écrémé dans un tampon Tris (TBS) pendant 2 h à température ambiante et sous faible agitation (20 rpm). Les membranes étaient incubées la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire d'intérêt dilué dans du TBS 0,1% Tween 20 (TBST), 5% BSA, sauf pour le marquage de la GAPDH qui était effectué par incubation de 1h30 à température ambiante et dans du TBS 0,1% Tween 20, 5% lait. Après trois lavages en TBST avec agitation à 60 rpm, les membranes étaient incubées 1h avec les anticorps secondaires couplés à la HRP. Les bandes de protéines étaient révélées à l'aide d'un réactif de chimioluminescence (Pierce ECL western, Thermo, référence 32106) en prévision d'une acquisition de signal sur système Fusion fx (Vilber). Les intensités relatives de signal ont été quantifiées à l'aide du logiciel Image J<sup>313</sup> et en utilisant la GAPDH comme protéine de ménage. La composition des différents tampons utilisés au cours de la procédure de western blot est disponible en Annexe 5.

## 2.3. In cell ELISA

Les CSM étaient ensemencées à 20000 cellules/cm<sup>2</sup> à la surface des supports en titane (0,2 cm<sup>2</sup>) en plaque 96 puits. Après la période voulue de culture, la viabilité cellulaire était évaluée (Prestoblue, Invitrogen, référence A13262), dans un objectif de normalisation des résultats d'expression protéique. Suite à cela, les échantillons étaient fixés avec 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 15 min et perméabilisés avec une solution de Triton-X100 à 0,2 % dans du PBS pendant 15 min. Les sites non spécifiques étaient bloqués par incubation pendant 1h30 sous légère agitation (20 rpm) dans une solution de blocage (PBS, 0,05% Tween (PBST) contenant 10% de NGS, 1% BSA). Les anticorps primaires (p-YAP/p-Src/Runx2/Smad4) étaient dilués dans la solution de blocage et mis à la surface des supports pendant 1h30 à 20 rpm. Après trois lavages au PBST, les anticorps secondaires étaient ajoutés dilués dans la solution de blocage pendant 1h. Après trois derniers lavages au PBST, le signal était révélé en recouvrant les puits d'une solution de TMB (Abcam, référence ab171522). Après 15-30 min, l'absorbance était lue à 450 nm. Une analyse semi-quantitative a été réalisée à partir des absorbances générées et en normalisant à la quantité de cellules déterminée préalablement.

### 3. Suivi de la différenciation en ostéoblastes

#### 3.1. Activité de la phosphatase alcaline

L'activité de la phosphatase alcaline (ALP) est communément évaluée à l'aide d'un test colorimétrique. Ce test suit la conversion du phosphate de p-nitrophénol (pNPP) en un produit jaune, le p-nitrophénol (pNP), grâce à l'action de l'enzyme ALP. Ce test peut être directement mené sur les cellules, sur du milieu de culture ou sur un extrait de protéines. Dans l'objectif de simplifier la normalisation de l'activité de l'ALP à la quantité totale de protéines, nous avons décidé d'utiliser des extraits protéiques. Après culture sur nos surfaces de titane, les cellules ont été récupérées par ajout de TrypLE.

Après centrifugation 5 min à 250 g, le culot cellulaire était lysé par ajout de 0,2% Triton-X100 pendant 1h à 4°C. Les échantillons étaient ensuite centrifugés 10 min à 10000 g afin de récupérer le lysat protéique. Après un dosage protéique (DC protein assay), ce lysat était directement utilisé à raison de 5 µl par puits d'une plaque 96 puits. Le volume était complété à 80 µl avec du DEA 1X (Phosphatase substrate kit, Thermo, référence 37620). Puis 50 µl de pNPP (5 mM final) dissout dans du DEA 1X contenant 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> étaient ajoutés pour permettre la réaction. La lecture de l'absorbance a été réalisée sur un lecteur microplaque (Sunrise, Tecan) à 415 nm après 15 min, 30 min, 1 h puis 2 h. Pour l'analyse des résultats, le temps 1 h a été retenu. En parallèle, des étalons de pNPP à des concentrations allant de 0 à 20 nmol/puits ont été fraîchement préparés et incubés avec 0,2 U d'ALP par puits. L'absorbance a ainsi pu être rapportée à une quantité de pNP par µg de protéines utilisés.

#### 3.2 Quantification des ARN par RT-qPCR

L'ARN total des échantillons a été extrait suivant les instructions du fournisseur (isolation kit, Tiangen, référence 4992729). Une quantification par Nanodrop permettait d'estimer la quantité d'ARN et la qualité de l'extraction. L'ARN était rétrotranscrit en ADNc grâce à un kit (Gotaq 2 step RTqPCR, Promega, référence A6010). Ce même kit permettait aussi l'analyse quantitative (qRT-PCR) en plaque 96 puits. L'analyse a été menée dans un volume total de 20 µl contenant 10 µl de mix Gotaq, 1 µM de chaque amorce, l'équivalent de 40 ng d'ADNc et complété jusqu'à 20 µl avec de l'eau exempte d'ARNase. Les puits étaient scellés à l'aide d'un film plastique transparent. La réaction était réalisée en thermocycleur (Cfx96 real time system, Biorad) suivant les étapes recommandées par le fournisseur: 95°C 120s – 95°C 15s/ 60°C 60s pour un total de 40 cycles. Un mix non rétrotranscrit était fait pour chaque échantillon et utilisé comme contrôle négatif dans la réaction de PCR. Les données de Ct (cycle seuil) ont été récupérées pour être analysées avec la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ <sup>314</sup>, en utilisant la GAPDH comme gène de ménage. Le détail des amorces utilisées est présenté en Annexe 6.

#### 3.3 Analyse de la matrice extracellulaire

Afin d'évaluer la quantité de protéines sécrétées dans la matrice extracellulaire par les CSM cultivées sur les surfaces en titane, un test ELISA a été réalisé en suivant un protocole préalablement décrit<sup>315</sup>. Après avoir retiré les cellules par traitement avec de la TrypLE et abondamment lavé les supports au PBS, ceux-ci étaient incubés dans une solution préalablement filtrée de PBS, 20 mM Tris-HCl, 4 M GuHCl, 10 mM EDTA, 0.066% (p/v) de dodécylsulfate de sodium (SDS), pH 8.0. Après 5 h à 37°C, la concentration totale de protéines dans la solution d'échantillon collectée était quantifiée grâce au kit (DC protein assay). Le test ELISA a été réalisé en plaque 96

puits (Nunc-maxisorp, Thermo, référence 442404 f96). Les différents échantillons de matrices extracellulaires étaient déposés dans les puits et incubés sur la nuit à 4°C, à raison de 10 µg de protéines par puits, dans une solution de 0,05 M carbonate/bicarbonate pH 9,6. Après trois lavages PBS 0,05% tween20 (PBST), les puits étaient saturés pendant 2 h à 25°C avec une solution de PBS, 1% BSA. Les anticorps primaires (anti-collagène 1/anti-osteoontine), dilués dans du PBST, 1% BSA, étaient ensuite ajoutés à raison de 100 µl par puits. Après 2 h à 25°C, les puits étaient lavés trois fois au PBS 0,1% Tween20. Les anticorps secondaires couplés à la HRP étaient ensuite ajoutés dilués dans du PBST, 1% BSA pendant 1 h (détail des anticorps en Annexe 7). Après les trois derniers lavages au PBST, le signal était révélé en ajoutant une solution de TMB (Abcam, référence ab171522). Après 10-15 min, la plaque était lue à 450 nm (Fluostar omega, Bmg labtech). Pour établir une quantification en protéines, une courbe d'étalonnage était préparée pour chaque protéine cible étudiée. Brièvement, les puits concernés étaient recouverts d'une concentration croissante (20 ; 10 ; 5 ; 2,5 ; 1, 25 ng/mL) de protéines purifiées (collagène type I, Millipore ou rhOsteopontin R&D system).

### **3.4. Analyse de la minéralisation**

Pour évaluer la différenciation ostéogénique, des CSM étaientensemencées à 20000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules étaient gardées en culture de 7 à 21 jours avec un remplacement du milieu tous les 3-4 jours. A l'issue de la culture, les CSM étaient lavées 3 fois au PBS puis fixées avec 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 15 minutes à température ambiante. Après retrait de la PFA et lavages des cellules, un volume suffisant pour recouvrir les échantillons d'alizarin red 2% pH 4,2 était ajouté pendant 20 min à température ambiante. Trois lavages avec de l'eau distillée étaient ensuite nécessaires pour éliminer la coloration non spécifique. La quantification des dépôts calciques était faite par dissolution de l'alizarin red. Pour cela, 500 µl d'une solution de 20% méthanol et 10% acide acétique était déposée dans les puits. Finalement, l'absorbance à 450nm était lue par spectrophotométrie.

## IV. Propriétés angiogéniques

### 1. Cellules endothéliales

Les cellules Huvec (cellules endothéliales humaines de cordon ombilical) sont des cellules primaires qu'il est nécessaire de cultiver dans un milieu de culture adapté. Dans notre cas, nous avons utilisé le milieu EGM2 de chez Lonza (référence CC-3162). Les cellules (ATCC) étaient utilisées entre 3 et 5 passages et le milieu de culture était renouvelé tous les 2-3 jours, à raison de 200  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  en flasque et de 600  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  en plaque multipuits. Selon les expériences, les Huvec étaientensemencées entre 5000 et 50000 cellules/ $\text{cm}^2$ . Les cellules sont détachées grâce à la trypsine.

### 2. Milieux conditionnés de CSM (mcCSM)

#### 2.1. Collecte des mcCSM

Six jours après l'ensemencement des CSM, les surfaces en titane étaient transférées dans de nouveaux puits d'une plaque 48 puits. Pour certaines expériences, notamment pour les ELISA, nous souhaitons avoir une idée de la quantité de cellules impliquées dans la sécrétion du mcCSM. Pour cela, 300  $\mu\text{l}$  de milieu contenant 10% de Prestoblue ont été ajoutés dans chaque puits pendant 1h. A l'issue de cette incubation, le milieu était entièrement récupéré et analysé à 570 nm (référence à 600nm). Ensuite, 400 $\mu\text{l}$  de milieu de culture frais, étaient ajoutés dans les puits et incubés avec les CSM pendant 24h. Les milieux conditionnés étaient récupérés, centrifugés à 9300 g pendant 10 min et stockés à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'à utilisation.

#### 2.2. Sécrétion de VEGF

Afin d'évaluer la quantité de VEGF sécrétée dans les mcCSM, un test ELISA a été réalisé. Les mcCSM étaient obtenus comme précisés ci-dessus. A l'exception d'un paramètre, l'absence de VEGF: après 6 jours de culture sur les différentes surfaces, du milieu MSC2 sans SVF était utilisé et laissé au contact des cellules pendant 24h.

Le test ELISA a été réalisé en plaque 96 puits (Nunc-maxisorp Thermo 442404 f96). Les différents échantillons de mcCSM dilués au 1/2 étaient déposés dans les puits. Ils étaient dilués dans une solution de 0,05 M carbonate/bicarbonate  $\text{pH}=9,6$  pour atteindre un volume final de 100  $\mu\text{l}$  et incubés sur la nuit à  $4^\circ\text{C}$ . Après trois lavages PBS 0,05% tween20 (PBST), les puits étaient saturés pendant 2 h à  $25^\circ\text{C}$  avec une solution de PBS 1% BSA. L'anticorps primaire anti-VEGF dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS 0,05% Tween20, 1% BSA, était ensuite ajouté à raison de 100  $\mu\text{l}$  par puits. Après 2 h à  $25^\circ\text{C}$ , les puits étaient lavés trois fois au PBS 0,1% Tween20. Les anticorps secondaires couplés à la HRP étaient ensuite ajoutés dilués dans du PBS 0,05% Tween20, 1% BSA pendant 1 h (détail des anticorps en Annexe 7). Après les trois derniers lavages au PBST, le signal était révélé en ajoutant une solution de TMB (Abcam, référence ab171522). Après 10-15 min, la plaque était lue à 450 nm (Fluostar Omega, BMG Labtech).

## 2.3. Viabilité cellulaire

Les essais de prolifération cellulaire ont été réalisés dans des plaques de culture à 96 puits. Des cellules Huvec étaient ensemencées à raison de 5000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules Huvec étaient cultivées pendant 24 h dans du milieu EGM2. Le milieu de culture était par la suite remplacé par 150 µl de cmCSM Poli, 2T ou HTE, ou un contrôle correspondant à 150 µl de milieu MSC2, pendant 48 h. La viabilité cellulaire a été quantifiée à l'aide de la méthode CELLTITER 96® Aqueous One Solution (Promega). Brièvement, ce test repose sur la réduction du tétrazolium (MTS) par les cellules métaboliquement viables en un produit coloré (formazan). Une solution de 20 µl de MTS était diluée avec 180 µl de milieu MSC2 et incubée au contact des cellules pendant 1 à 4 h (jusqu'à l'obtention d'un signal suffisant) à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. À l'issue de l'incubation, l'absorbance à 490 nm a été directement lue sur un lecteur microplaque (Sunrise, Tecan).

## 3. Réponse cellulaire des Huvec aux mcCSM

### 3.1. Migration en Transwell

Nous avons utilisé des inserts de culture avec des pores de 8 µm et une surface de 0,32 cm<sup>2</sup> (Transwell, Corning). Les CSM étaient ensemencées à raison de 20000 cellules/cm<sup>2</sup> sur des surfaces en titane de 0,8 cm<sup>2</sup>. En parallèle, après 6 jours de culture, des Transwell étaient ensemencés avec 50000 Huvec /cm<sup>2</sup> dans du milieu EGM2. A 7 jours de culture des CSM, les surfaces en titane étaient transférées dans une plaque 24 puits neuve et les Transwell contenant les Huvec étaient positionnés dans chacun des puits (Figure 46). Du milieu MSC2 était rajouté dans le fond du puits jusqu'à rentrer en contact avec la membrane du Transwell. Le Transwell était rempli de 200 µl de milieu MSC2. Après 24h de culture, les Transwell étaient transférés dans des bains de PBS successifs, afin d'éliminer les débris et cellules non adhérentes. La membrane du Transwell était ensuite mise en contact pendant 15 min avec de la paraformaldéhyde 4% afin de fixer les Huvec, puis colorée avec une solution de 0,5% de cristal violet. Suite à cela, les Transwell étaient lavés à l'eau milli-Q, puis les cellules présentes sur la membrane à l'intérieur du Transwell étaient retirées par frottement avec le bout d'un coton tige. Une fois secs, les Transwell étaient transférés dans un puits de plaque 48 puits préalablement rempli avec 200 µl de PBS 0,2% Triton X-100 et laissés pendant 2 h sous agitation horizontale de 100 rpm. La solution de lyse (200 µl) était récupérée pour être lue à une absorbance de 590nm (Tecan, Sunrise).

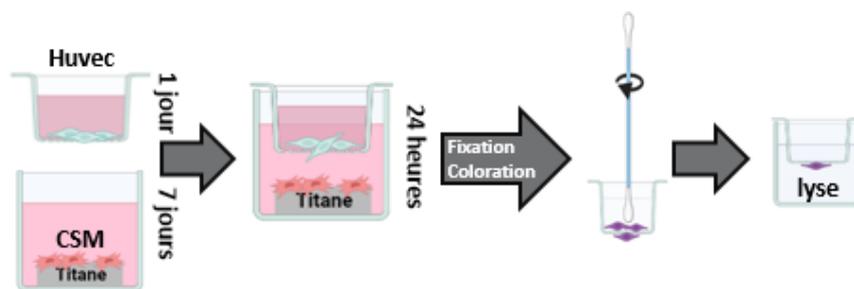


Figure 46 : **Analyse du potentiel migrateur de cellules Huvec stimulées par des CSM cultivées sur surfaces en titane.** Des CSM sont mises en culture pendant 7 jours sur les différentes surfaces en titane. En parallèle, des cellules Huvec sont ensemencées à la surface des Transwell pendant 24 h pour les laisser adhérer. Suite à cela, le Transwell contenant les Huvecs est déposé dans les différents puits contenant nos surfaces en titane. Après 24h de culture, les Transwell sont récupérés, lavés, fixés et colorés par du cristal violet. Par une action de frottement, il est alors possible d'éliminer les cellules contenues à l'intérieur du Transwell. A cette étape, on peut analyser la quantité de cellules ayant traversé les pores du Transwell en effectuant une lyse et une lecture de l'absorbance de ce lysat coloré au cristal violet.

### 3.2. Test de migration (wound healing assay)

Des cellules Huvec à passage 4 ou 5 étaient ensemencées à 150000 cellules/cm<sup>2</sup> dans une plaque de culture à 96 puits. Après obtention d'un tapis cellulaire dense (24 – 48 h), les cellules étaient lavées au PBS et une "blessure" était réalisée avec un cône de 200 µl (Figure 47). Après un lavage au PBS pour éliminer les cellules en suspension, 150 µl de milieu conditionné mcCSM étaient ajoutés par puits. La plaque était par la suite placée à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> sur une station de vidéomicroscopie (Zeiss AxioObserverZ1). Une acquisition était effectuée toutes les heures pendant 12 h. La quantification de la fermeture de la blessure a été réalisée par analyse d'image sur le logiciel Fiji<sup>313</sup>.

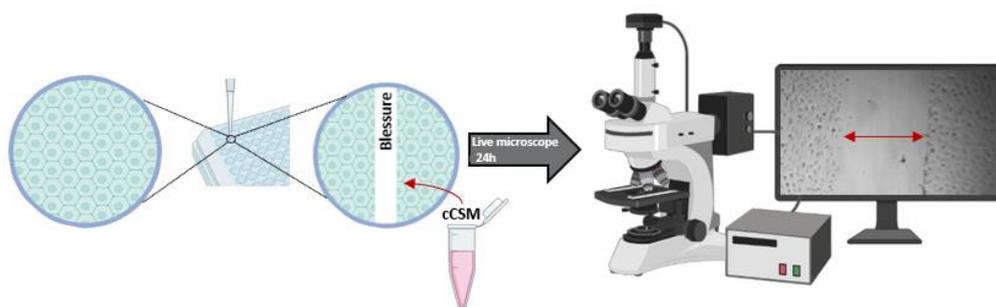


Figure 47 : **Etude du potentiel de cellules Huvec à migrer au sein d'une blessure induite.** Des cellules Huvec ont été mises en culture jusqu'à obtenir un tapis cellulaire. Grâce à un cône de 200 µl, une blessure a été créée au centre du tapis cellulaire sur toute la longueur du puit. Après ajout des différents milieux conditionnés d'intérêt, la plaque a directement été imagée sur un microscope avec une acquisition toute les heures pendant 12 h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.3. Test d'angiogenèse *in vitro* (formation de capillaires en matrigel)

Les puits d'une plaque 96 puits étaient recouverts de Matrigel (Corning, référence 354230, taux réduit de facteurs de croissance), déposé en 2 couches successives de 40 µl par puits, laissées à polymériser pendant 30 min chacune à 37°C. Les cellules Huvec étaient ensuite déposées à la surface du Matrigel à raison de 15000 cellules/puits dans 200 µl de mcCSM. La plaque était par la suite placée à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> sur une station de vidéomicroscopie (Zeiss AxioObserver Z1). Une acquisition était effectuée toutes les heures pendant 5 h. Pour chaque puits, 2 champs distincts étaient analysés. Les images en contraste de phase ont été analysées avec ImageJ (Figure 48).

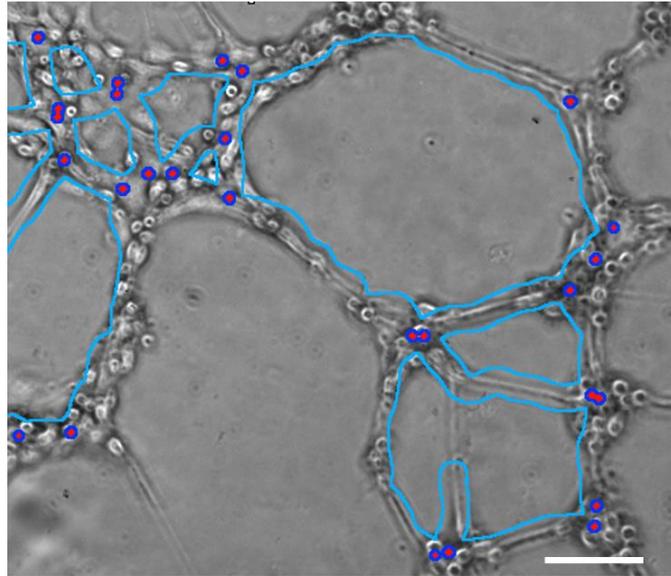


Figure 48 : **Analyse de l'angiogenèse *in vitro***. Le logiciel ImageJ identifie le nombre de mailles (traits bleus clairs) et calcule le nombre de jonctions (nœuds, ronds bleus foncés). L'échelle est de 500 $\mu$ m.

## V. Modèle *in vivo* : Défaut crânien de taille critique chez le rat

Notre projet et toutes les procédures expérimentales qui lui sont liées ont fait l'objet d'une autorisation éthique délivrée par le comité éthique COMETH, référencé sous le numéro APAFIS #35699-202205190819354 v2. Notre étude a été menée sur 36 rats mâles Wistar Han (Janvier Labs), âgés de 22 semaines (400-500 g à l'inclusion) pour exclure un effet potentiel de croissance<sup>316</sup>. Ces rats ont été divisés en quatre groupes expérimentaux:

- Implants titane Poli : 10 rats
- Implants titane 2T : 10 rats
- Implants titane HTE : 12 rats
- Contrôles : 4 rats
  - Craniectomie seule avec périoste : 2 rats
  - Craniectomie seule sans périoste : 2 rats

Notre protocole a consisté en un suivi de la régénération osseuse sur 12 semaines avec une acquisition *in vivo* par microtomographie par rayons X ( $\mu$ Ct) toutes les deux semaines (Figure 49). A l'issue des douze semaines, les rats ont été euthanasiés et un prélèvement terminal du défaut a été effectué. Les implants ainsi retirés ont été fixés et ont fait l'objet de coupes et de marquages histologiques.

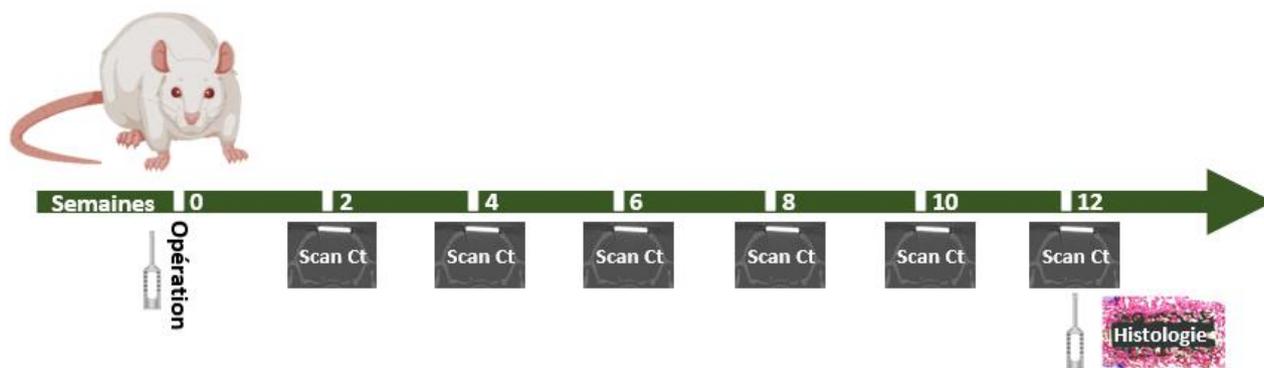


Figure 49 : **Planification de l'expérience *in vivo***. Suite à l'opération et la pose des différents implants en titane, les rats ont été scannés toutes les deux semaines. Au temps 12 semaines, les rats ont été euthanasiés, scannés puis les implants ont été récupérés par trépanation en vue d'un marquage histologique.

### 1. Procédure chirurgicale

#### 1.1. Préparation préopératoire

Les rats étaient au nombre de 2 dans des cages à 25°C et 30-50% d'hygrométrie, dans un environnement contrôlé, dépourvu de pathogènes et avec une alternance jour/nuit de 12h. Les litières étaient changées 1 fois par semaine et les rats avaient un accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Une période d'adaptation d'une semaine a été fixée avant le début des expérimentations. Au préalable de la procédure chirurgicale, les rats ont été anesthésiés avec un mélange d'hydrochloride de kétamine (60 mg/mL/kg) et de medetomidine (0,4 mg/100 $\mu$ l/kg) et placés en décubitus ventral sur une plaque chauffante en prévention de l'hypothermie. Le crâne a été rasé à l'aide d'une tondeuse. Enfin, de la buprénorphine (0,1mg/kg) a été administrée en sous-cutané.

## 1.2. Chirurgie

Le protocole chirurgical a été effectué suivant la description faite par Spicer en 2012<sup>317</sup>. Tous les actes chirurgicaux ont été réalisés par Georges Bettega, un chirurgien maxillo-facial rattaché à notre équipe (CH Annecy Genevois). La Figure 50 vous illustre les différentes étapes de la création du défaut crânien et de la pose des disques en titane Poli, 2T ou HTE.



Figure 50: Images illustrant la procédure de création du défaut crânien de taille critique chez le rat.

La procédure chirurgicale inclut une stabilisation des implants sans fixateurs. Les implants sont plaqués par-dessus le défaut par la suture du périoste. Deux types de contrôles sans implants ont été réalisés: soit avec, soit sans suture du périoste par-dessus le défaut. En effet, le périoste est le tissu le plus ostéogène, mais son effet n'est pas présent dans les conditions avec implants titane. Il nous semblait ainsi important d'avoir un contrôle comparable.

### **1.3. Soins et suivis post-opératoires**

Directement suite à la chirurgie, les rats étaient placés en cages individuelles sur un tapis chauffant jusqu'à leur éveil. Leur condition physique était contrôlée sur plusieurs heures suite à l'intervention et 2 fois de plus dans les 48 h qui suivaient. En particulier, nous avons recherché le moindre signe de souffrance. Les animaux ont été maintenus 7 jours en cages individuelles, le temps de la cicatrisation de la plaie opératoire. Durant les deux premières semaines post-opératoires, les rats ont été suivis et pesés tous les deux jours. Après cela, la pesée s'est faite de manière hebdomadaire.

## **2. Scan par micro tomographie**

### **2.1. Protocole d'évaluation de l'ossification péri-implant**

Les rats étaient scannés par  $\mu$ Ct (VivaCt, Scanco) toutes les deux semaines. Pour cela, les rats étaient anesthésiés par une induction en chambre avec 4% (vol/vol) d'isoflurane pendant 2-3min. Après induction, les rats étaient positionnés sur le lit du scanner et maintenus anesthésiés grâce à un masque injecté avec 2,5% (vol/vol) d'isoflurane. Le protocole de scan avait été établi au préalable de l'étude. Brièvement, les rayons X ont été fixés à une énergie de 70 keV, 114  $\mu$ A et 8 W. Le champ de vision (FOV) a été fixé à un diamètre de 49,8 mm et 16,1  $\mu$ m de taille de voxel. En moyenne, la zone scannée a été fixée à 9,2 mm (soit environ 576 coupes) avec l'implant titane (8 mm) positionné en son centre, pour une durée totale d'acquisition d'environ 30 min.

L'analyse a ensuite été réalisée grâce au logiciel du fournisseur Scanco. Le contourage a été établi manuellement pour représenter une zone couvrant la face inférieure de l'implant titane. La zone d'étude d'intérêt a été définie comme un rectangle de 1 mm d'épaisseur sur toute la longueur de l'implant à une distance de 150  $\mu$ m de ce dernier (Figure 51A). Cette zone était reportée sur l'ensemble des coupes incluant l'implant titane. Cette zone correspond au défaut osseux induit par chirurgie et ainsi représente la zone de régénération osseuse.

Pour pouvoir s'exempter d'une partie du bruit de fond généré par l'absorbance du titane, une zone hors de la zone d'intérêt a été analysée pour normaliser les acquisitions et faciliter leur comparaison. Cette zone a été placée sur la face supérieure de l'implant titane en suivant les mêmes paramètres que ceux utilisés pour le contouring du défaut (Figure 51B). Cette zone était à l'extérieur du crâne et ne risquait pas d'être envahie par de l'os nouvellement formé. L'analyse quantitative s'est faite en utilisant le paramètre de densitométrie osseuse (BMD) et le ratio du volume d'os/volume total (BV/TV). Ce protocole d'analyse d'images permet de quantifier la quantité et la densité osseuse en analysant les pixels associés aux scans. Il est possible de fixer différents paramètres pour définir le seuil auxquels les pixels seront considérés signaux positifs (Figure 51C). Pour l'ensemble de l'étude, les paramètres utilisés ont été fixés comme suit : Sigma=3 / Support=1,5 / Seuil inférieur de l'histogramme intensité du pixel=900.

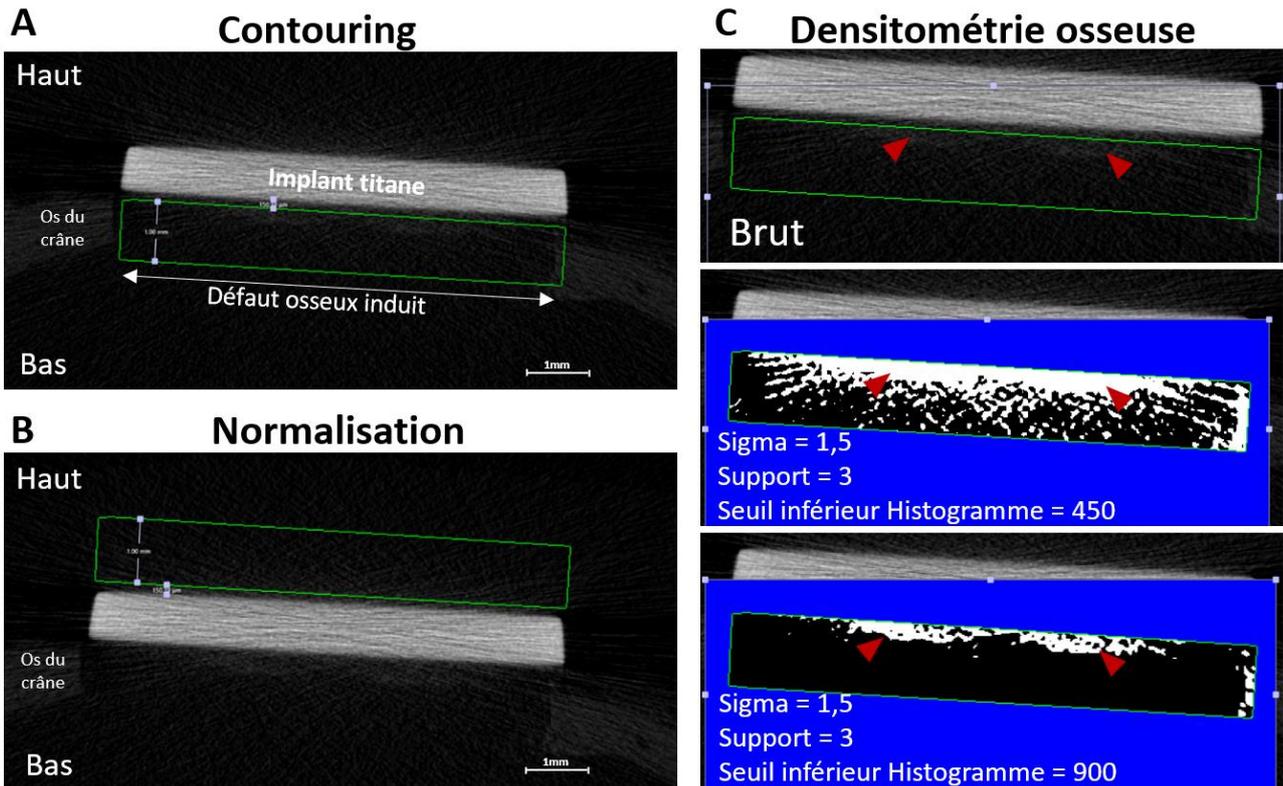


Figure 51: **Protocole de quantification de données de régénération osseuse acquises par Ct scan.** (A) Image du logiciel de Ct scan avec un exemple du contouring mis en place pour définir la zone d'intérêt. Cette zone avait une épaisseur de 1 mm et était positionnée afin de laisser un espace d'environ 150 µm entre l'implant et la zone d'intérêt pour s'exonérer d'une partie du bruit de fond généré par le titane. (B) Image pour illustrer la zone utilisée pour normaliser par rapport au bruit de fond. (C) Illustration des paramètres utilisés pour calculer la densitométrie osseuse. Le début de formation osseuse visible sur ce scan est pointé par les flèches rouges. Nous avons considéré que nos paramètres (image encadrée en rouge) sont les plus précis pour éliminer une grosse partie du bruit de fond sans perdre d'informations osseuse (à titre d'exemple, l'image du dessus obtenue en fixant le seuil à 450, laisse apparaître beaucoup de bruit de fond qui fausserait la quantification).

### 3. Analyse visuelle

L'analyse visuelle s'est faite sur des vidéos des scans au temps 2, 6 et 12 semaines pour chaque rat. L'ensemble des coupes de scans  $\mu$ Ct ont été exportées en format DICOM et converties en format vidéo avi sur logiciel ImageJ. Des numéros générés aléatoirement ont été attribués aux différentes vidéos. Ces vidéos ont été évaluées visuellement par cinq examinateurs. Deux scores ont été attribués par chacun des examinateurs pour chacune des vidéos. Ces scores font l'objet d'une présentation plus détaillée Figure 90.

### 4. Histologie

Après 12 semaines, les rats ont été euthanasiés par administration d'Exagon (400mg/kg) en intracardiaque. Les échantillons implantés ont été soigneusement retirés. Pour cela, les crânes ont été tondu et une incision a été faite le long de la voûte crânienne. Il a alors été possible de trépaniser autour de l'implant, à l'aide d'une tréphine de 12 mm. Les échantillons ont par la suite été fixés en PFA 4 % (Micrommicrotech) pendant 24 h. Après plusieurs lavages au PBS, les tissus fixés ont été conservés dans de l'éthanol 70 % jusqu'à utilisation. Les colorations histologiques ont été faites par LLS Rowiak sur des coupes non décalcifiées obtenues par laser microtomie (TissueSurgeon, LLS ROWIAK GmbH, Hannover, Germany). Brièvement, des coupes longitudinales sont effectuées à l'aide d'un microtome laser à une épaisseur d'environ 10 µm. Un microtome laser est un système

optique utilisant un laser femtoseconde en proche infrarouge pour permettre une découpe optique en vue d'applications histologiques. Pour plus d'informations, vous pouvez vous référer à l'une de leur publication<sup>318</sup>. La résine recouvrant les échantillons a été enlevée pour permettre la coloration des sections. Des colorations classiques à l'hématoxyline/éosine (H&E) ainsi que des colorations de McNeal ont été réalisées, à raison de 2 coupes colorées par colorant et par condition expérimentale. La coloration H&E permet de colorer les noyaux en bleu à violet et le cytoplasme en rose. La coloration McNeal permet une coloration de l'os en rose/rouge, des cellules et noyaux en bleu, du cartilage en violet et du tissu conjonctif en rose. En addition, un marquage immunohistochimique pour la cible CD31 a été effectué sur deux des coupes. Ce marquage a pour objectif l'identification de capillaires sur une coupe histologique.

## Analyse statistique

Toutes les expériences statistiquement analysées ont été réalisées au minimum trois fois (sauf spécifié). Les données sont représentées en moyenne plus ou moins la déviation standard. Les différences statistiques entre les groupes expérimentaux ont été testées par une analyse de variance sans assumer la normalité de la distribution. Deux groupes expérimentaux dont la p-value était inférieure à 0,05 ont été considérés comme significativement différents. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism version 7.

Les représentations graphiques dans le chapitre « Résultats » sont pour beaucoup sous la forme de ratios par rapport à la condition Poli, condition fixée comme contrôle de surface lisse en titane. Ce choix a été fait pour mettre en avant les différences entre surfaces lisses et topographiées. Comme vous le remarquerez au fur et à mesure de ce chapitre, l'utilisation de CSM n'est pas exempte d'hétérogénéité dans leur comportement. En outre l'utilisation de la déviation standard a été favorisée pour pouvoir pleinement illustrer les variabilités inter-réplicas. Le choix de cette représentation a été faite en ayant conscience de la perte d'une partie des informations contenues dans nos expériences. Toutefois, la représentation en facteurs de changement par rapport à Poli nous permet d'éliminer une partie de la variabilité inter-expériences et a été préférée étant donné notre objectif premier cherchant à mettre en avant les réponses cellulaires induites par nos nanostructures en comparaison d'une condition lisse.

# Chapitre III :

**Résultats**



## I. Modélisation des interactions initiales

Notre volonté était de développer différents modèles *in vitro* qui puissent être représentatifs des événements physiologiques qui se produisent lors de la greffe d'implants osseux.

Suivant une chronologie plus ou moins proche de celle rencontrée suite à l'implantation et la mise en place du phénomène de réparation osseuse, notre étude a débuté par l'évaluation du contact avec les fluides biologiques. Les premières interactions de l'implant sont avec le sang. Ce fluide est composé majoritairement de globules rouges et de plaquettes, mais également d'une multitude de protéines. Nous avons ainsi analysé la modulation de l'adsorption protéique apportée par nos topographies. De plus, nous avons testé la biocompatibilité des surfaces avec les globules rouges. Les globules rouges étant de petite taille (environ 7  $\mu\text{m}$ ), la possibilité d'une lyse induite par nos nanostructures n'est pas à exclure. Enfin, un paramètre clé de la réparation osseuse est la capacité d'initier la formation d'un environnement riche en facteurs de croissance et en chimiokines afin de recruter et d'activer les phénomènes de réparation tissulaire. Ce paramètre est dépendant de la formation d'un coagulat dense à la surface de l'implant. Chaque biomatériau possède une capacité de coagulation propre et donc une activation des plaquettes bien particulière. Nous avons été ainsi amenés à déterminer le potentiel coagulant de nos surfaces (Figure 50).

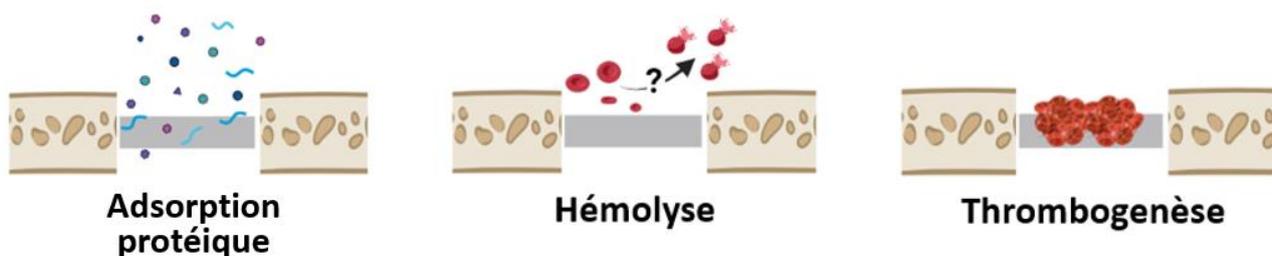


Figure 52 : **Illustration de trois phénomènes précoces suite à l'implantation de biomatériaux.** Sur chacun de ces schémas, un implant en titane (en gris) est inséré au sein d'un défaut osseux. De gauche à droite, on observe des protéines rentrant en contact avec l'implant, des globules rouges potentiellement lysés par l'implant et des globules rouges formant un coagulat à la surface de l'implant. Ces trois paramètres font l'objet de cette partie analysant les interactions initiales de l'implant avec des molécules et des cellules retrouvées en conditions physiologiques.

### 1. Caractérisation de la dépendance de l'adsorption protéique à la topographie de surface

L'adsorption protéique est le résultat d'interactions variées avec une surface solide. Dans le but d'observer la capacité d'adsorption induite par nos nanostructures, nous avons été amené à tester deux protéines par dosage protéique.

#### 1.1. Albumine de sérum bovin

L'albumine est une protéine de 68kDa très présente dans le sang. Dans notre cas concret, elle ne joue pas de rôle clé dans le processus de coagulation et dans la mise en place d'une ostéogénèse. Cependant, l'albumine purifiée de sérum bovin est un incontournable des pratiques de laboratoire et est ainsi très accessible et peu chère. Grâce à son homologie forte avec l'albumine humaine, on a estimé qu'elle était un modèle adéquate pour

mettre en place nos expériences d'adsorption protéique et estimer la capacité d'adsorption de nos nanostructures.

La Figure 53 vous présente la quantité de BSA adsorbée à la surface des supports en titane. Bien que les mêmes quantités de BSA aient été appliquées, nous observons une adsorption préférentielle pour les surfaces HTE. Les surfaces Poli et 2T ont une quantité de BSA adsorbée relativement similaire et significativement inférieure à celle observée en HTE. Il semblerait ainsi que les surfaces HTE soient plus propices à l'adsorption de BSA.

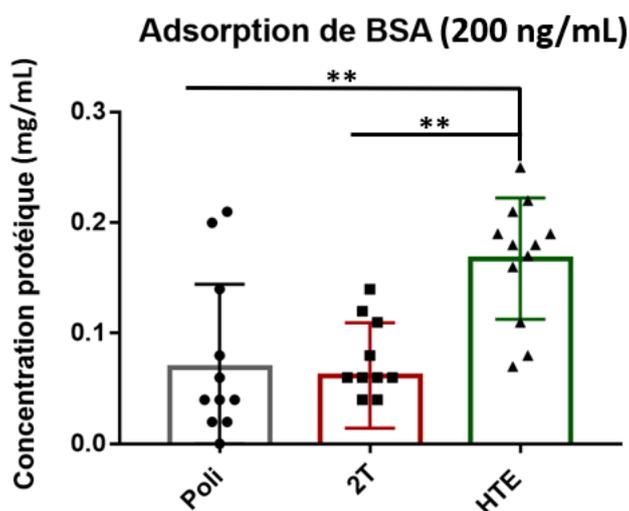


Figure 53 : **Capacité d'adsorption d'albumine de sérum bovin par les différentes surfaces en titane.** Représentation de la concentration en protéine extraite des surfaces en titane suite à leur incubation avec 200 ng/mL de BSA pendant 2h à 37°C. L'expérience comprend trois répliques indépendantes, les points représentent les différents répliques techniques. Significativité testée par test de one-way ANOVA, \*\*: p-value<0,01.

Il est décrit que l'adsorption protéique est très variable en fonction des protéines considérées. La BSA est une protéine globulaire soluble qui a potentiellement une capacité d'adsorption relativement différente d'autres protéines, et notamment des protéines fibrillaires.

## 1.2. Fibronectine humaine

La fibronectine humaine est une protéine représentative des protéines fibrillaires. Une modulation de l'adsorption est également visible (Figure 54). Toutefois, à la différence de la BSA, la fibronectine est adsorbée préférentiellement sur nos deux surfaces nanostructurées par rapport à la surface polie. Les valeurs d'absorbance atteignent en moyenne 0,015, 0,057 et 0,062 pour les surfaces Poli, 2T et HTE respectivement. La présence de structures à la surface du titane est donc propice à l'adsorption d'une protéine comme la fibronectine.

### Adsorption fibronectine humaine (0,1 mg/mL)

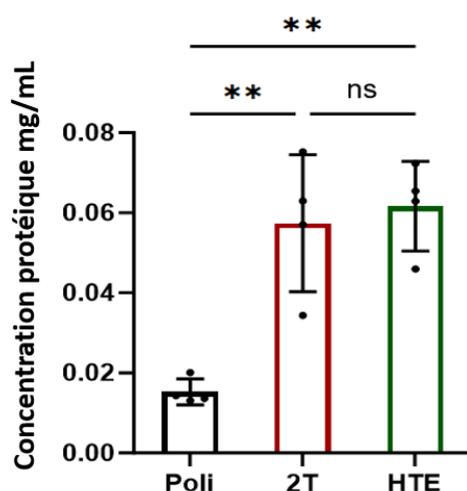


Figure 54 : **Capacité d'adsorption de fibronectine humaine par les différentes surfaces en titane.** Représentation de l'absorbance suite à un dosage protéique fait sur la solution extraite des surfaces en titane suite à leur incubation avec 100 ng/mL de fibronectine pendant 2 h à 37°C. L'expérience comprend quatre répliques indépendants.

## 2. Evaluation du contact des implant nanostructurés avec le sang

Outre la présence de protéines, le sang est source de différents acteurs cellulaires, parmi lesquels on retrouve les globules rouges et les plaquettes. Un des paramètres important dans la considération de la biocompatibilité d'un biomatériau est son pouvoir thrombogène. Par ce terme, on parle de la capacité d'induction d'une coagulation du sang suite au contact avec la surface du biomatériau. Généralement, on est à la recherche de biomatériaux qui soient inertes face au sang, c'est-à-dire, qui n'induisent pas de dommages aux cellules sanguines. Il faut également qu'ils aient un faible effet pro-coagulant. Dans le cadre d'une implantation en contact direct avec la circulation sanguine, comme un stent, le facteur thrombogène est primordial. L'induction d'une coagulation peut avoir des conséquences désastreuses. A l'inverse, dans notre cas, l'induction d'une coagulation est bénéfique pour la mise en place d'une ostéointégration de l'implant. Nous avons ainsi souhaité vérifier la biocompatibilité vis-à-vis des globules rouges et analyser la coagulation induite par nos topographies.

### 2.1. Validation de l'absence de cytotoxicité sur les globule rouges

Pour modéliser le contact de nos surfaces avec du sang, nous avons utilisé du sang de rat hépariné. Nos supports en titane ont été immergés dans une solution de globules rouges, avec une légère agitation. Cette agitation avait pour objectif de reproduire un mouvement de fluide. Les données issues de cette expérience sont représentatives de la quantité d'hémoglobine libre en solution, qui est proportionnelle à la quantité de globules rouges lysés. Le titane, qu'il soit lisse ou nanostructuré, ne semble pas induire la lyse de globules rouges. En effet, l'absorbance est significativement inférieure à celle générée par le contrôle positif H<sub>2</sub>O, qui en théorie induit 100% de lyse des globules rouges (Figure 55). En effet, par des phénomènes osmotiques, les globules rouges éclatent suite au contact avec l'eau. Brièvement, la concentration ionique de l'eau est beaucoup plus faible que celle présente au sein des globules rouges. Les lois de l'osmose qui s'appliquent aux membranes biologiques entraînent un équilibrage de ces concentrations. Ce qui se traduit concrètement par l'internalisation d'eau en quantité telle, que les globules rouges se gonflent et éclatent.

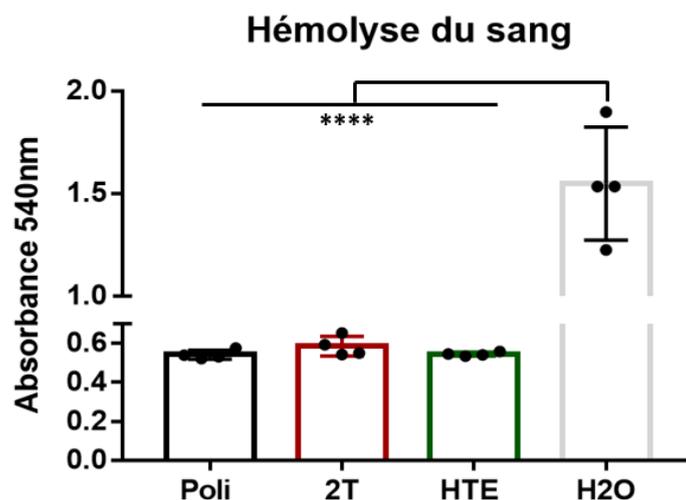


Figure 55 : **Quantification de l'hémolyse induite par nos surfaces en titane.** Analyse de l'absorbance créée par la lyse des globules rouges. La condition H<sub>2</sub>O correspond à l'absorbance générée suite à la lyse des globules rouges par osmose avec ajout d'eau. L'expérience comprend quatre répliques biologiques indépendants. Significativité testée par test de Kruskal-Wallis, \*\*\*\* : p-value<0,0001.

La sensibilité limitée de notre expérience ne permet malheureusement pas de conclure avec certitude sur une différence de lyse avec ou sans nanostructures. Toutefois, on n'observe presque aucune différence de signal parmi les répliques des différentes conditions. Il semblerait donc que la présence de nos nanostructures ne soit pas un facteur délétère sur l'intégrité des globules rouges.

## 2.2. Etude du potentiel coagulant de différentes topographies à la surface de disque en titane

Même si nos topographies ne semblent pas avoir d'impact sur les globules rouges, cela ne veut pas dire pour autant qu'elles n'en auront pas sur la coagulation. Effectivement, la coagulation est un phénomène initié par des protéines en lien avec les plaquettes. Nos analyses d'adsorption protéique laissent à penser qu'il pourrait y avoir une modulation du potentiel coagulant de nos surfaces en titane. De plus, les plaquettes sont les cellules centrales de la coagulation. Contrairement, aux globules rouges, les plaquettes adhèrent aux surfaces. Elles rentrent ainsi directement en contact avec les topographies en surface. Il nous semblait ainsi probable que la présence de nanostructures influe sur la coagulation.

L'analyse du potentiel coagulant d'une surface peut être réalisée de différentes façons. Une méthode simple consiste à déposer une goutte de sang non héparinée sur la surface étudiée. Après un temps d'incubation donné, il est possible d'estimer la quantité de globules rouges présents en suspension et la quantité emprisonnée dans le coagulat. Les données obtenues suite à cette expérience sont présentées Figure 56. Elles ont été traitées pour correspondre au pourcentage de coagulation établi par comparaison avec une condition sans coagulation. Chaque condition avec implant en titane montre de manière significative une coagulation. Des différences significatives sont présentes entre les différentes surfaces en titane (Figure 56).

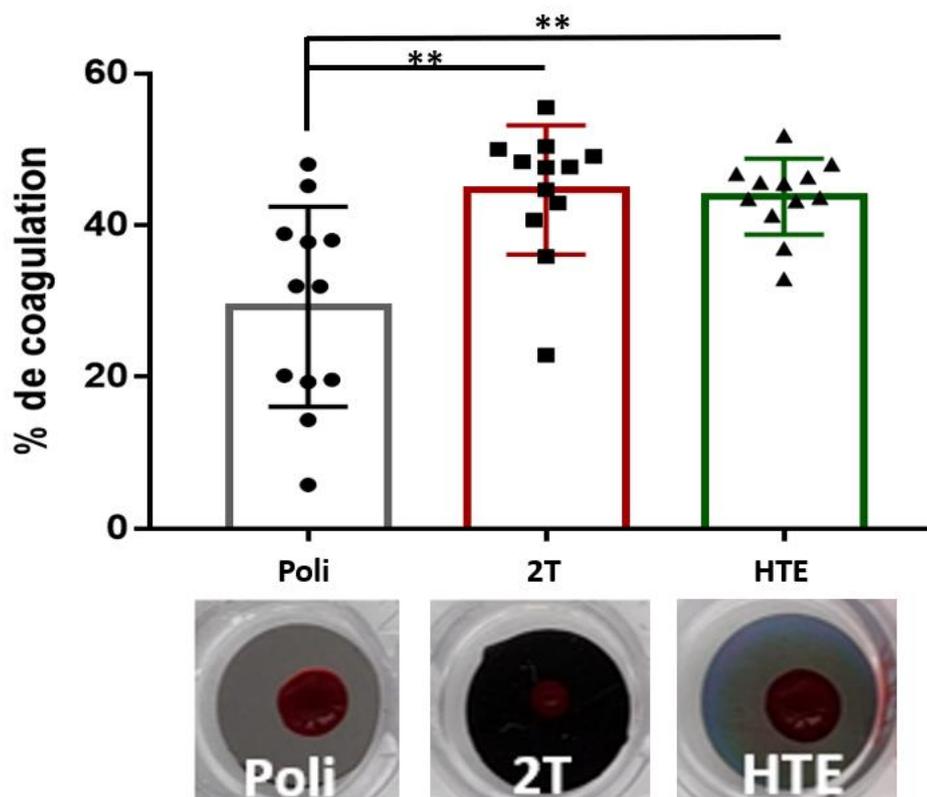


Figure 56 : **Quantification du potentiel thrombogénique des surfaces en titane.** Représentation en termes de pourcentage relatif à la condition sans coagulation (non présentée ici). Sous l'histogramme, des photos illustrent la formation du coagulat à la surface des différents supports en titane. L'expérience comprend quatre répliques biologiques indépendantes. Les points représentent les différents répliques techniques pour chacun des répliques biologiques. Significativité testée par test de one-way ANOVA, \*\* :  $p\text{-value} < 0,01$  ; \* :  $p\text{-value} < 0,05$ .

Une quantité plus importante de globules rouges se retrouve emprisonnée dans le coagulat lorsque le sang est en présence de nanostructures. Aucune différence significative n'est observée entre les deux types de nanostructures, avec une coagulation de 44,6% et 43,8% respectivement pour les surfaces 2T et HTE. Ce qui représente par contre une augmentation de 15,4% ( $p\text{-value} = 0,003$ ) sur la topographie 2T et une augmentation de 14,6% ( $p\text{-value} = 0,025$ ) pour la condition HTE par rapport à la surface Poli.

# I. Modélisation *in vitro* du potentiel ostéogénique

## 1. Introduction

Un des évènements primordiaux à l'ostéointégration est la capacité de la surface du biomatériau à induire l'ostéogénèse. Cela comprend la capacité de permettre l'adhérence, la prolifération et la différenciation de cellules ostéoblastiques et pré-ostéoblastiques. Tout cela a pour but de favoriser la production d'os par les ostéoblastes. Il est depuis longtemps établi que les propriétés de surface modulent les capacités d'ostéogénèse. En comparaison aux paramètres préalablement étudiés, l'analyse de l'ostéogénèse s'est donc imposé comme un incontournable dans l'étude de nouveaux implants pour des applications en lien avec l'os et est donc très présent dans la littérature.

Parmi les paramètres relativement homogènes dans les études, on retrouve le choix du modèle cellulaire. Deux solutions majoritaires sont envisageables: recourir à l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) ou de la lignée de précurseurs ostéoblastique murins MC3T3. Pour ce projet, nous avons choisi d'utiliser des CSM.

### 1.1. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Les CSM sont capables de se différencier en une multitude de types cellulaires (Figure 57) et présentent un fort potentiel pour des applications d'ingénierie tissulaire. Ce sont des cellules adhérentes capables d'être cultivées et amplifiées *in vitro*. Elles peuvent être isolées de différentes sources. Même si la moelle osseuse représente la source principale, les CSM sont connues pour pouvoir être retrouvées dans un grand nombre de tissus de notre organisme. Il est ainsi possible de les isoler du placenta, du cordon ombilical, de la pulpe dentaire ou du tissu adipeux.

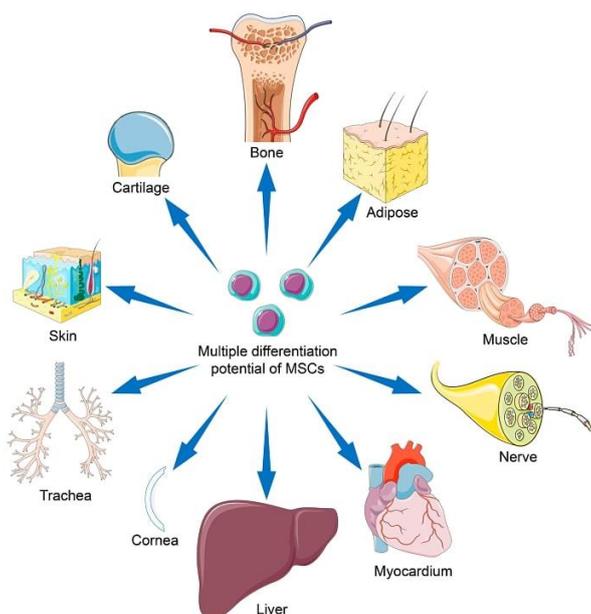


Figure 57 : Schéma des différentes voies de différenciation de CSM ayant pu être identifiées. (source <sup>319</sup>)

Dans notre cas, nous avons utilisé des CSM humaines isolées de tissu adipeux. Trois lots de CSM, isolées de trois donneurs différents, nous étaient accessibles. Ces trois lots vous seront introduits un peu plus en détail ultérieurement.

## 1.2. Les marqueurs de suivi

A partir de ce modèle cellulaire, il est possible d'étudier l'ostéogenèse d'une multitude de manières. Cela est dû à la variété de marqueurs permettant le suivi de la cinétique de différenciation en ostéoblastes. Cette cinétique se caractérise par trois phases principales :

- Phase de prolifération
- Phase de synthèse de la MEC
- Phase de minéralisation de la matrice

Effectivement, les CSM suivent une cinétique de différenciation très précise. Les marqueurs clés que l'on peut identifier sont tout d'abord le facteur de transcription Runx2 (Figure 58). Il a déjà été évoqué préalablement comme un initiateur du processus de différenciation. Son expression se traduit dans l'engagement dans la lignée ostéoblastique via notamment l'expression de gène codant pour ostéix, l'ALP ou encore le collagène 1. Ces facteurs, dont l'expression est induite par Runx2, sont considérés comme les protéines clés de la phase de synthèse de la MEC.

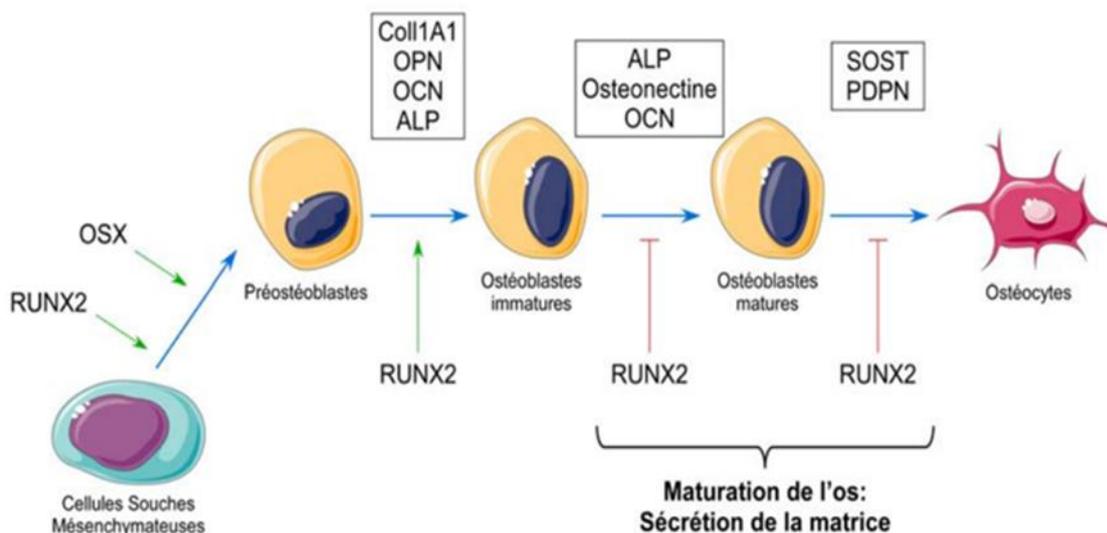


Figure 58 : **Représentation de certains des marqueurs clés de la différenciation ostéogénique.** Illustration des principales phases du processus de différenciation ostéogénique avec l'implication de certains marqueurs du statut de différenciation. On peut voir que le facteur de transcription Runx2 a un rôle clé dans le contrôle des différentes étapes de maturation (source <sup>320</sup>).

## 1.3. Etablissement du modèle d'étude de l'ostéogenèse de CSM isolées de tissu adipeux.

Étant donné la diversité de possibilités d'isolation envisageables pour les CSM, il est nécessaire de définir différents paramètres qui puissent les caractériser en tant que telles. Les CSM doivent être capables d'adhérer au plastique dans des conditions de culture *in vitro* et de se différencier en 3 types cellulaires caractéristiques

des CSM. On parle ici des voies de l'ostéogenèse, l'adipogenèse et la chondrogenèse. Cette validation est généralement faite *in vitro* par l'utilisation de milieux de culture décrits comme propices à l'induction de ces différentes voies de différenciation. La dernière caractéristique primordiale réside dans la présence de certains marqueurs de surface. Les CSM doivent être positives à la présence des protéines CD105, CD73 et CD90 en surface. En parallèle, elles doivent montrer une absence des marqueurs CD45, CD34, CD14, CD19 et HLA de classe II.

Il est établi dans la littérature que l'utilisation de CSM est associée avec une forte hétérogénéité selon l'individu. Ayant à disposition des CSM isolés de tissus adipeux de trois donneurs différents, nous avons été amenés à nous questionner sur leur validité et leurs capacités ostéogéniques. Nous avons ainsi fait le choix de les tester individuellement avant la mise en place de nos études du potentiel ostéogénique de nos nanostructures de surface.

La Figure 59 représente une analyse par cytométrie en flux de la présence ou de l'absence des marqueurs de surface décrits comme caractéristiques des CSM. Il a ainsi pu être validé que les CSM en notre possession, que ce soit le donneur 1, 2 ou 3 possèdent les bonnes caractéristiques en terme de marqueurs de surface.

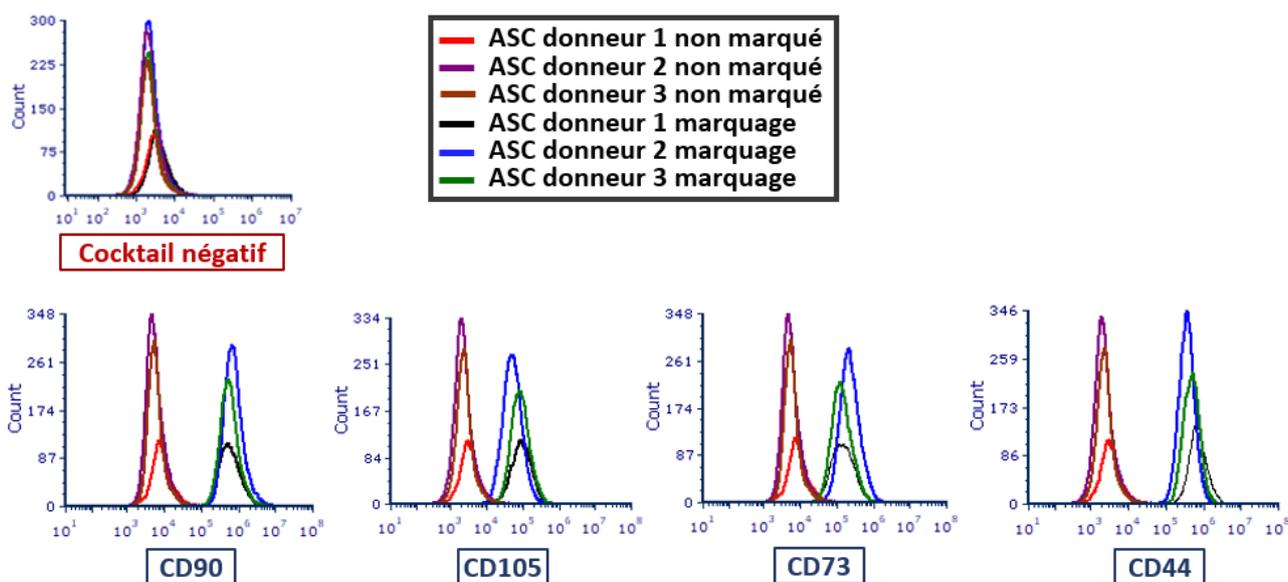


Figure 59 : **Vérification des marqueurs de surfaces des CSM de trois donneurs différents.** La présence des marqueurs de surface a été vérifiée par cytométrie en flux. Les CSM sont décrites comme devant être positives aux marqueurs CD90, CD105, CD44 et CD73 et négatives aux marqueurs CD45, CD34, CD11b, CD19 et HLA-DR (tous inclus au sein du cocktail d'anticorps "négatif" fourni dans le kit utilisé).

Une deuxième validation que nous avons établie est la capacité d'ostéogenèse. Nous avons testé les 3 donneurs pour différents marqueurs de l'ostéogenèse. Ces expériences comportaient plusieurs objectifs :

- Aider au choix du donneur le plus propice pour étudier le potentiel ostéogénique de nos surfaces en titane.
- Valider le recours et les méthodes d'analyse de marqueurs de l'ostéogenèse.
- Déterminer la chronologie d'apparition des protéines Runx2 et Smad4.

Parmi les marqueurs utilisés, le premier correspond à l'analyse de l'activité de l'ALP. Cette méthode repose sur la catalyse d'un substrat (pNpp) en un produit coloré dont la quantification peut être obtenue par lecture de l'absorbance. Cette protéine est décrite comme étant clé pour la minéralisation de la matrice extracellulaire, en partie par son implication dans la création des cristaux d'hydroxyapatite<sup>321</sup>. Elle est toutefois identifiable dès les phases précoces suite à l'engagement dans l'ostéogenèse<sup>322</sup>. Sa cinétique d'expression n'est pas clairement établie à cause de disparités selon les études<sup>323,324</sup>. Toutefois, on considère généralement que son expression *in vitro* est à son maximum entre 7 et 14 jours de culture.

Les CSM ont été cultivées sur plastique de culture dans deux milieux de culture différents, un milieu d'entretien (MSC2) et un milieu induisant la différenciation ostéogénique (Osteo). Les 3 donneurs à notre disposition sont tous capables d'initier une différenciation en ostéoblaste. On observe pour chacun d'eux une augmentation de l'activité de l'ALP suite à la culture en milieu ostéo (Figure 60 A1,2,3). On peut toutefois observer quelques différences dans l'activité de l'enzyme en fonction du donneur, mais également du temps de culture. Le donneur 1 et le donneur 2 présentent une activité plus importante à 5 jours, avec un niveau légèrement plus élevé pour le donneur 2 que ce soit à 3, 5 ou 7 jours (Figure 60 A2). En comparaison, le donneur 3 montre un niveau d'activation plus faible que les donneurs 1 et 2 (Figure 60 A3). En complément, on peut aussi observer la présence d'une activité de l'ALP sans induction de différenciation (MSC2). Le donneur 2 semble avoir une activité sous-jacente de l'ALP plus importante que les deux autres donneurs. Cela s'observe particulièrement au temps 7 jours, où la différence d'activité entre MSC2 et Osteo est relativement faible.

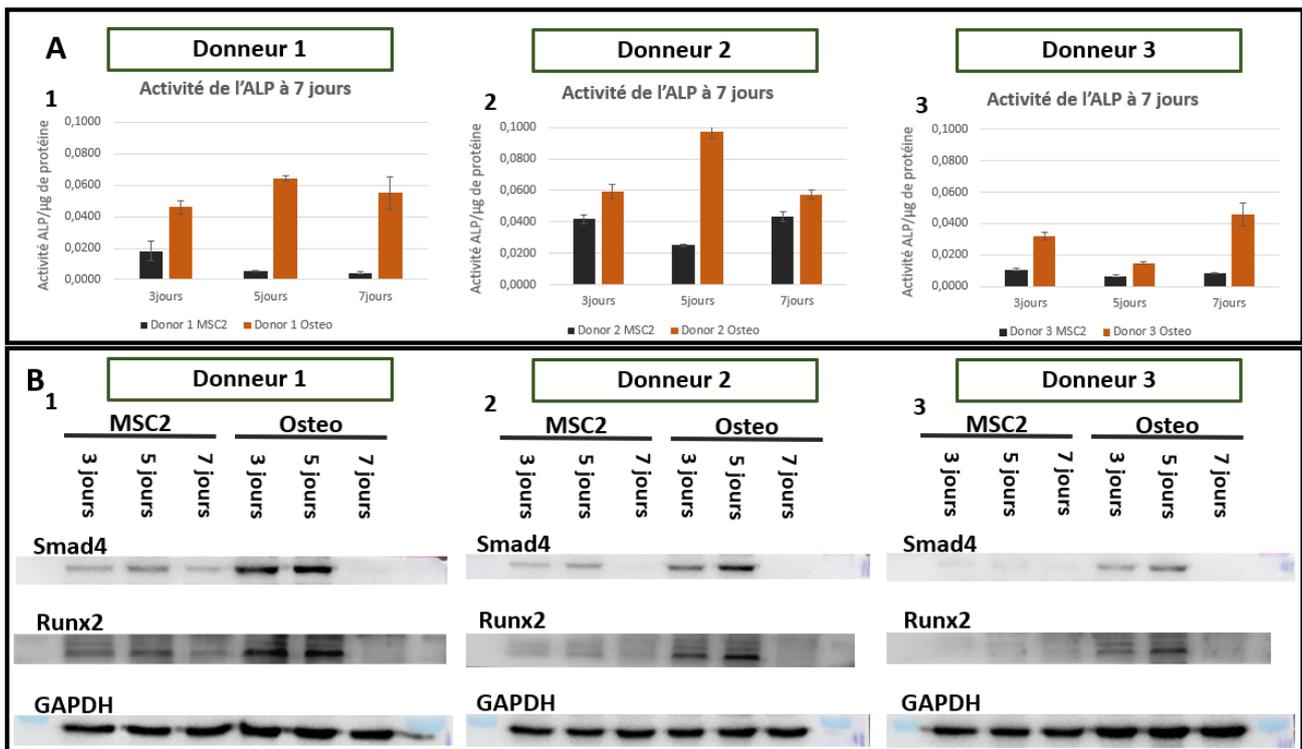


Figure 60 : Établissement du potentiel ostéogénique de CSM isolées de trois donneurs distincts. Le potentiel ostéogénique a été évalué suite à l'induction de la différenciation par la culture des cellules dans un milieu de différenciation ostéogénique. La présence de différents marqueurs de différenciation a pu être vérifié pour chacun des donneurs à 3, 5 et 7 jours. **A 1, 2, 3** : activité de l'alkaline phosphatase ; **B 1, 2, 3** : western blot contre la protéine Smad4 et Runx2 et contre la protéine de ménage GAPDH. La condition MSC2 correspond à un contrôle négatif de la différenciation qui consiste à la culture des cellules dans leur milieu de culture d'entretien.

L'observation de deux autres protéines a complété l'étude de l'ostéogenèse induite sur les trois donneurs. Les mêmes conditions ont été appliquées et les protéines ont fait l'objet d'une analyse de leur abondance au cours du temps par Western blot (Figure 60 B). Runx2 et Smad4 sont deux marqueurs précoces de la différenciation ostéogénique. Runx2 a déjà été introduit pour son rôle primordial en tant que facteur de transcription d'une multitude de gènes ostéogéniques. Smad4 pour sa part, n'est pas très représenté dans la littérature. Toutefois, sa présence est liée à l'action de Runx2. Effectivement, cette protéine est capable de réguler l'expression et l'activité de Runx2 et son rôle dans l'hypertrophie des chondrocytes<sup>325</sup> et dans l'ostéogenèse a été décrit<sup>326</sup>. Nous estimons que l'analyse de ces deux protéines pourrait nous guider pour suivre l'engagement des CSM dans la voie de différenciation ostéoblastique.

Les résultats de la Figure 60 B corroborent les tendances observées par le suivi de l'activité de l'ALP. En effet, pour les trois donneurs, il est possible de voir une augmentation de Runx2 et Smad4 en milieu Osteo en comparaison au milieu MSC2. On retrouve également une plus faible quantité de ces deux protéines pour le donneur 3 en comparaison aux donneurs 1 et 2. L'observation d'une forte activité sous-jacente de l'ALP chez le donneur 2, se retrouve quant à elle moins visible. L'abondance de Runx2 et Smad4 est relativement faible dans le milieu MSC2 (Figure 60 B2). Elle est en revanche un peu plus élevée chez le donneur 1 (Figure 60 B1). Pour tous les donneurs, l'augmentation en situation Osteo est visible aux temps 3 et 5 jours, avec une disparition presque totale de la présence de ces protéines à 7 jours de culture (Figure 60 B1,2,3).

Plusieurs conclusions ont pu être tirées de ces expériences. Tout d'abord, nous avons pu valider certaines des méthodes que nous prévoyons d'utiliser dans notre étude des surfaces en titane nanostructurées. Mais nous avons également récupéré des informations justifiant l'utilisation préférentielle du donneur 1 ou 2. Le donneur 3 semble montrer une capacité ostéogénique moins favorable. Quant au donneur 2, on observe une activité de l'ALP même en conditions de culture d'entretien. Pour la suite du projet, le donneur 1 a donc été sélectionné. Les donneurs 2 et 3 n'ont pas fait l'objet d'études plus poussées par la suite.

On a également pu observer que suite à l'induction de l'ostéogenèse, les protéines Runx2 et Smad4 se voient surexprimées. Il est ainsi possible d'interpréter la surexpression de ces marqueurs comme un facteur indiquant l'engagement des CSM dans la voie ostéogénique. Cependant, l'expression de ces marqueurs se fait particulièrement sur des temps très précoces (3 et 5 jours). Pour tous les donneurs, la disparition du signal au temps 7 jours peut nous laisser penser qu'une attention particulière sera nécessaire dans le choix du temps de culture sur nos supports en titane. Il semblerait que ce soit relativement en accord avec ce qui a pu être décrit dans la littérature (Figure 58). Runx2, et indirectement Smad4, sont responsables de la transition des CSM vers la phase de sécrétion de la MEC en permettant notamment l'expression de protéines de la matrice comme le collagène 1 ou ostéix. Toutefois, leur présence à long terme serait inhibitrice de la maturation des ostéoblastes, nécessitant ainsi la dégradation de ces protéines une fois les CSM engagées dans la différenciation. En l'occurrence, dans un milieu favorisant la différenciation ostéogénique, ces protéines sont visibles jusqu'au jour 5 environ. Nous avons ainsi pu accumuler un ensemble d'informations nous permettant d'initier notre étude de l'ostéogenèse dépendante de la topographie du titane.

## 2. Initiation de la mécanotransduction et marqueurs précoces de la différenciation

Notre objectif était de déterminer plus en détail le pouvoir ostéogénique de nos nanostructures présentes à la surface du titane. Nous souhaitons dans un premier temps étudier l'initiation de l'ostéogenèse. Il est maintenant reconnu que la topographie d'une surface est capable d'induire la différenciation de CSM par l'activation de différentes voies de mécanotransduction, caractérisées par plusieurs facteurs.

### 2.1. Modulations morphologiques associées à la présence de nanostructures

Comme présenté en Introduction (partie IV 3.3.1), la morphologie d'une cellule apporte beaucoup d'informations. C'est notamment le cas des CSM qui présentent des morphologies très variées en réponse à l'engagement dans les différentes voies de différenciation. La morphologie n'est pas uniquement symptomatique de la différenciation, elle témoigne aussi de la mise en place d'une mécanotransduction. Ce facteur peut ainsi être utilisé comme indicateur précoce de modification apportée à la cellule. L'ajout de structures à la surface du substrat est capable de moduler la morphologie. Certains paramètres morphologiques peuvent ainsi indiquer une modification du comportement cellulaire et notamment indiquer l'état de contractilité du cytosquelette.

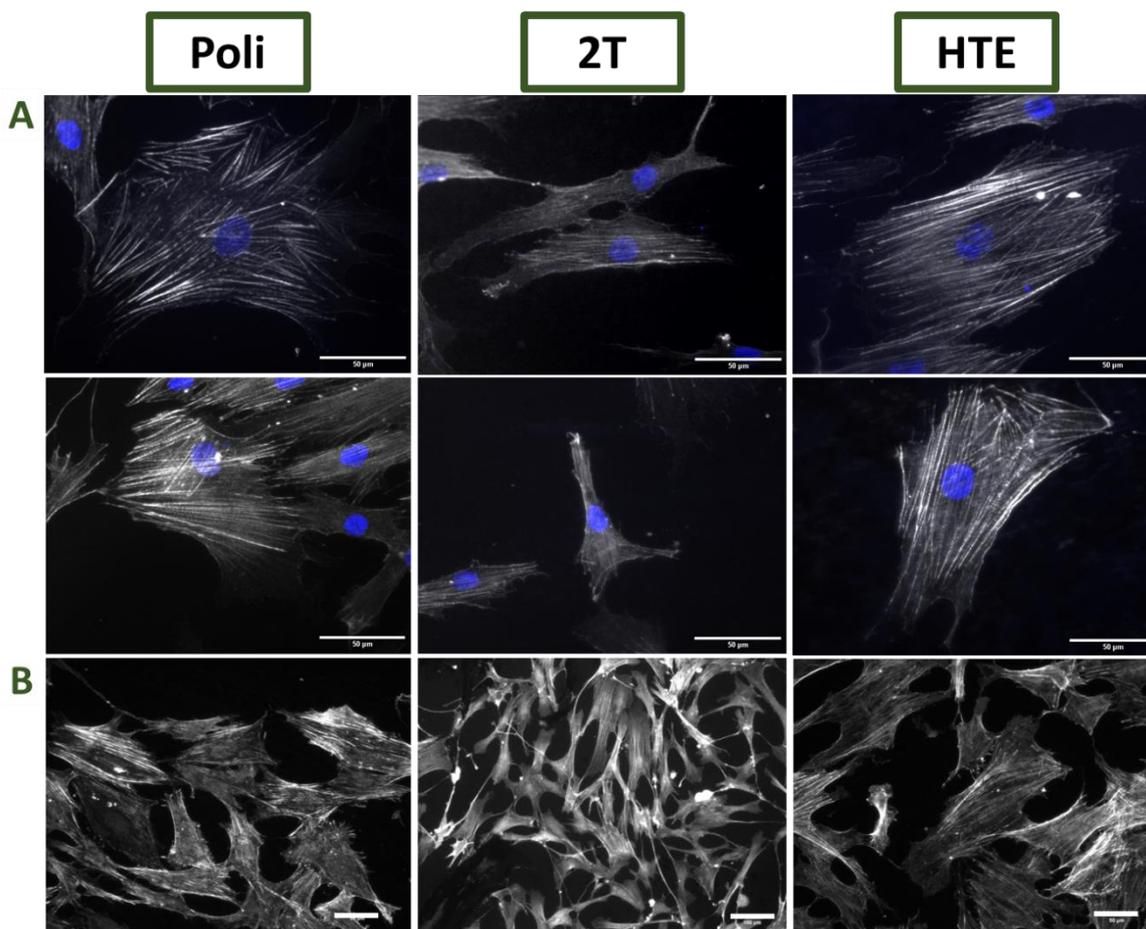


Figure 61 : **Morphologie de CSM sur surfaces Poli, 2T et HTE.** **A** : Images obtenues par microscopie à 72 h de culture des CSM. Les cellules ont été marquées pour l'actine (en niveaux de gris) et pour le noyau (bleu), barre d'échelle 50 µm. **B** : Microscopie à 96 h de CSM marquées pour l'actine, barre d'échelle 100 µm.

Le marquage par immunofluorescence de l'actine permet entre autre l'observation de la morphologie (Figure 61). Il est ainsi possible d'observer sur ces images de microscopie des différences d'étalement cellulaire avec notamment des CSM plus étalées sur surfaces Poli et HTE, comparé à la surface 2T (Figure 61 A et B). Ces observations microscopiques ont servi de base pour la quantification de l'aire, de l'aspect ratio et de paramètres morphologiques du noyau.

### 2.1.1. Paramètre d'étalement : aire cellulaire

L'aire est un indicateur de l'affinité de la cellule pour une surface. Pour se faire une idée globale des modulations morphologiques induites par nos topographies, nous avons sélectionné trois temps de culture : 24 h, 48 h et 72 h (Figure 62).

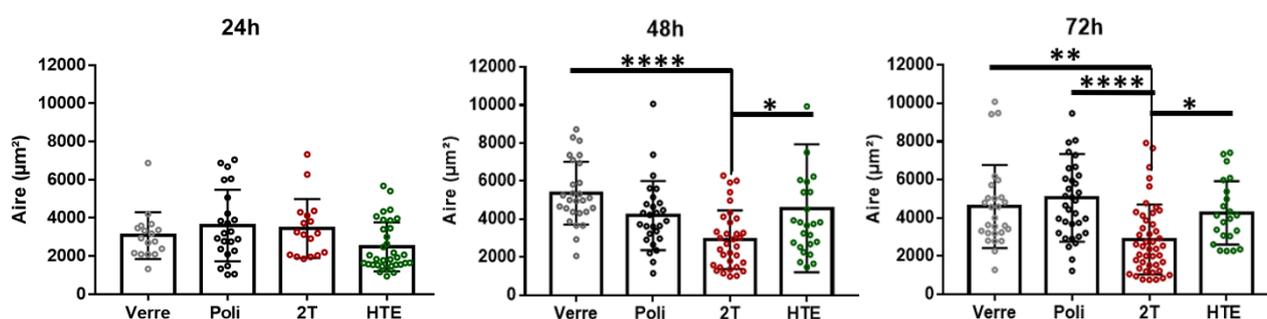


Figure 62 : **Analyse morphologique de CSM cultivées sur différentes surfaces : aire des cellules.** Les CSM ont été cultivées sur les différentes surfaces pendant 24 h, 48 h ou 72 h. Le calcul de l'aire s'est fait par quantification sur logiciel ImageJ suite à un marquage de l'actine. Chaque point représente une cellule analysée. Significativité testée par test de Kruskal-Wallis ou one-way ANOVA pour les données de distribution normale, \*\*\*\* : p-value<0,0001 ; \*\* : p-value<0,01 ; \* : p-value<0,05.

Le recours à différents temps de culture dans cette analyse permet d'observer une évolution morphologique entre différents temps. Au temps 24h, aucune différence significative ne peut être identifiée entre les différentes surfaces. L'aire des CSM est alors comprise autour de 3000 µm<sup>2</sup> avec un maximum sur Poli à 3600 µm<sup>2</sup> et un minimum pour HTE à 2480 µm<sup>2</sup>. Concernant les supports 2T, on note ensuite une diminution significative de l'aire des CSM par rapport à Poli à 48 et 72 h. L'aire des cellules diminue de 3440 µm<sup>2</sup> à 2877 µm<sup>2</sup> en l'espace de 48h. Sur Poli et HTE, les cellules ne sont pas encore totalement étalées à un temps de 24h. En effet, l'aire des CSM sur ces surfaces évolue pour finalement atteindre des valeurs moyennes comprises entre 4000 et 5000 µm<sup>2</sup> à 48 et 72 h. Il existe donc de profondes différences de morphologie cellulaire en fonction de la surface sur laquelle sont cultivées les CSM. Cela suggère l'induction de différentes voies de mécanotransduction par la suite.

### 2.1.2. Paramètre de forme : aspect ratio

L'aspect ratio est un terme anglais qui fait référence à un paramètre d'allongement cellulaire. Il consiste en un ratio entre la longueur de la cellule et son diamètre. De façon assez similaire à ce qui a été observé pour l'aire, on retrouve une différence induite par la topographie 2T en comparaison aux autres surfaces (Figure 63, 48 h et 72 h). Une augmentation significative de l'aspect ratio des CSM sur 2T est visible à 48 h en comparaison aux cellules sur verre et Poli. Même si les valeurs ne sont pas significatives, on peut distinguer cette augmentation dès 24h et elle se retrouve aussi à 72 h de culture avec une augmentation significative sur 2T en comparaison à HTE. La topographie HTE, quant à elle, n'induit pas de modulation de l'élongation cellulaire en comparaison de

la surface lisse. L'analyse de morphologie et de l'aspect ratio donnent donc des résultats assez comparables l'un avec l'autre.

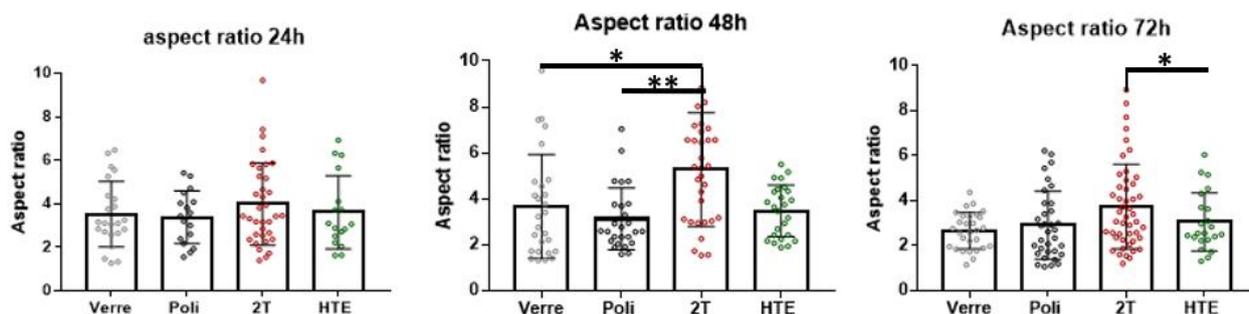


Figure 63 : **Analyse morphologique de CSM cultivées sur différentes surfaces : aspect ratio des cellules.** Les CSM ont été cultivées sur les différentes surfaces pendant 24 h, 48 h ou 72 h. Le calcul de l'aspect ratio s'est fait par quantification sur logiciel ImageJ suite à un marquage de l'actine. Chaque point représente une cellule analysée. Significativité testée par test de Kruskal-Wallis ou one-way ANOVA pour les données de distribution normale, \*\* : p-value<0,01 ; \* : p-value<0,05.

### 2.1.3. Modulation de la morphologie nucléaire

Une élongation cellulaire plus importante peut impliquer des modifications de la morphologie nucléaire. Pour visualiser ces potentielles modifications, nous avons étudié le ratio entre l'aire de la cellule et l'aire du noyau (Figure 64). Chez les eucaryotes, on observe en général une forte corrélation entre le volume cellulaire et le volume nucléaire<sup>327</sup>. Les cellules sont conscientes de leur volume et maintiennent une taille de leur noyau proportionnelle à la taille de la cellule. Une modification de ce ratio en présence de nos nanostructures pourrait être un signe de modification du cytosquelette et indicatif de l'induction d'une voie de mécanotransduction.

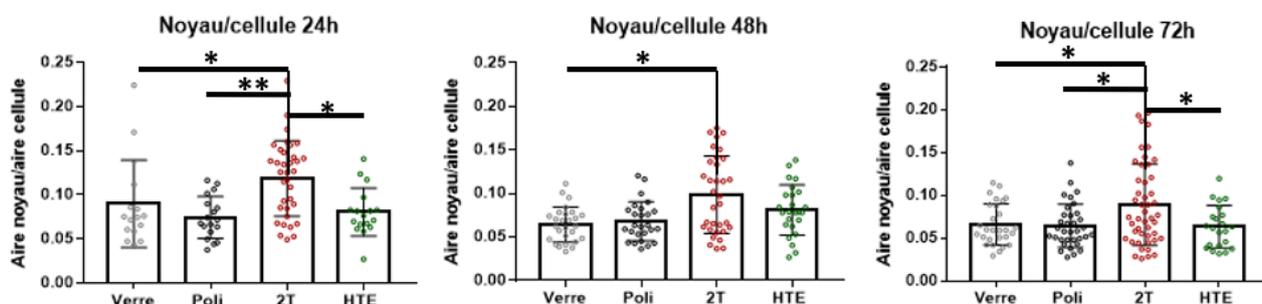


Figure 64 : **Analyse morphologique de CSM cultivées sur différentes surfaces : Aire des noyaux relative à l'aire des cellules.** Les CSM ont été cultivées sur les différentes surfaces pendant 24 h, 48 h ou 72 h. Les calculs d'aire se sont fait par quantification sur logiciel ImageJ suite à un marquage de l'actine et du noyau. Chaque point représente une cellule analysée. Significativité testée par test de Kruskal-Wallis ou one-way ANOVA pour les données de distribution normale, \*\* : p-value<0,01 ; \* : p-value<0,05.

Les différences morphologiques des CSM sur surface 2T se traduisent également par des différences de taille du noyau. Après 24 h de culture, la topographie 2T induit une augmentation du ratio aire noyau/aire cellule de 0,045 par rapport à la surface Poli. En d'autres termes, on a une augmentation de 4,5% de la surface cellulaire recouverte par le noyau par rapport à la surface Poli. Cette augmentation est validée statistiquement en comparaison à toutes les autres surfaces à 24 h et 72h de culture.

En conclusion, la topographie 2T induit une modulation significative de la morphologie des CSM à sa surface en comparaison à celle observée sur surface lisse. En revanche, la topographie HTE ne semble pas être inductrice de modification morphologique, du moins, pas avec les paramètres analysés. Ceci sous-entend une certaine

différence entre la topographie 2T et HTE dans l'effet qu'elles ont sur les CSM. La chimie de surface ne semble pas ici pouvoir expliquer ces différences, puisqu'aucune variation morphologique n'a été identifiée entre une surface lisse en verre et une surface lisse en titane.

## **2.2. Transduction du message mécanique et réponse cellulaire des CSM aux topographies de surface**

Suite à l'adhérence des cellules sur les surfaces en titane, on peut s'attendre à l'apparition de différents phénomènes de mécanotransduction induit par les nanostructures. Ces phénomènes sont capables de favoriser un comportement ostéogénique des CSM, avec l'expression de marqueurs représentatifs de la maturation en ostéoblastes. Nous avons eu la volonté d'essayer de suivre l'évolution de cette différenciation, en commençant tout d'abord par en déterminer l'origine.

### **2.2.1. Distribution cellulaire de YAP en réponse aux nanostructures**

Notre intérêt s'est tout d'abord porté à l'étude de la protéine YAP et notamment de sa localisation cellulaire. Cette protéine est très décrite dans la transduction du message mécanique de topographie. Cette protéine, en complexe avec la protéine TAZ, peut être internalisée dans le noyau en réponse à un réarrangement du cytosquelette. Cette relocalisation nucléaire lui permet d'induire la transcription de différents gènes, dont une partie sont impliqués dans la différenciation ostéogénique (Voir Intro IV 3.2). Nous avons analysé l'internalisation nucléaire de YAP induite par nos topographies. Pour cela, nous avons marqué cette protéine par immunofluorescence. L'analyse d'images qui a suivi est basée sur la comparaison des intensités de fluorescence de YAP entre le noyau et une zone périnucléaire délimitée pour être représentative de la protéine YAP cytoplasmique (Annexe 8). La Figure 65 présente le résultat de ce ratio exprimé en log. Plus la valeur est élevée, plus la proportion de YAP dans le noyau est importante. Après 72h, la localisation nucléaire de YAP est significativement diminuée en présence de nanostructures HTE par rapport à Poli (Figure 65). Cette observation est également présente entre Poli et 2T, mais non significative.

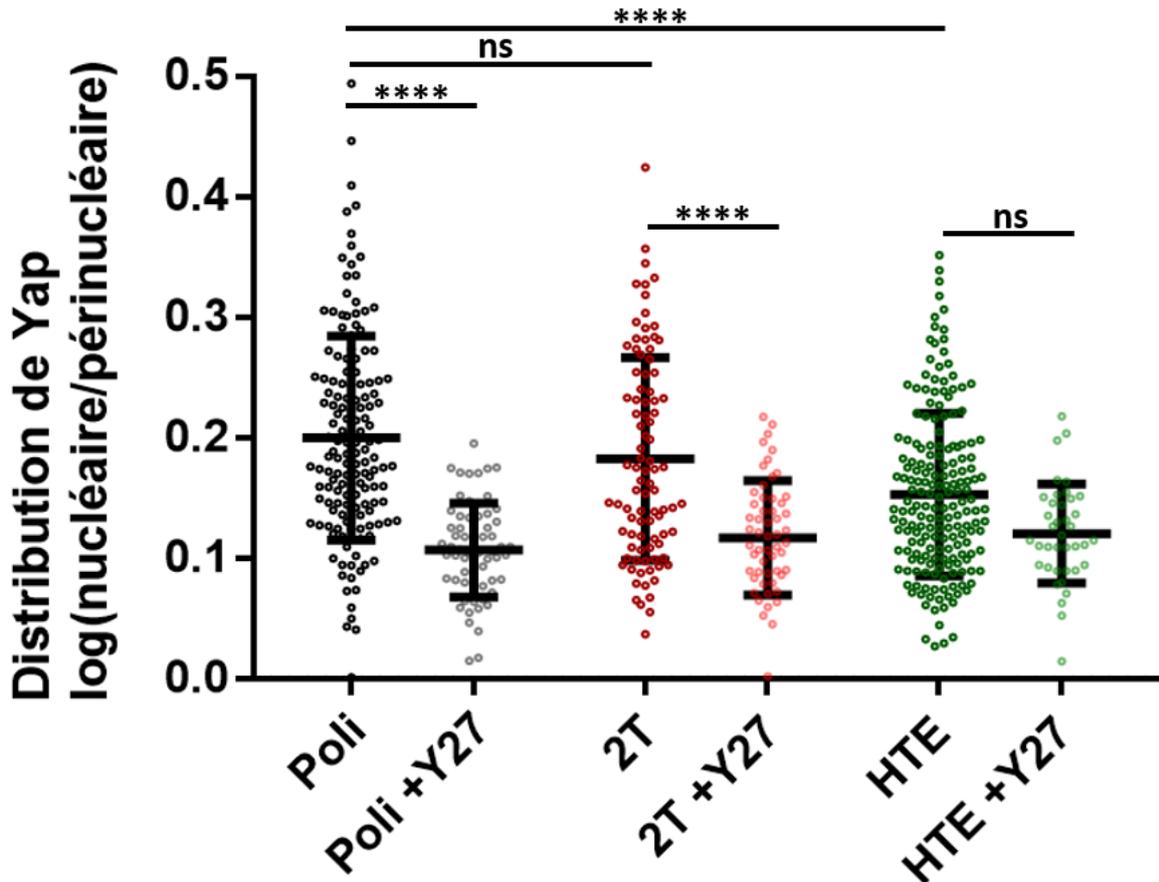


Figure 65 : Localisation de la protéine YAP dans des CSM cultivées 72 h sur différentes surfaces. Ratio de l'intensité de fluorescence de YAP dans le noyau par rapport au cytoplasme. Les cellules ont été cultivées avec ou sans 10  $\mu$ M d'inhibiteur de ROCK (Y27632). Chaque point représente une cellule analysée. Significativité testée par test de one-way ANOVA, \*\*\*\* : p-value < 0,0001.

Pour identifier la dépendance à des mécanismes connus de mécanotransduction, nous avons reproduit l'expérience, mais cette fois-ci en présence d'un inhibiteur de ROCK (Y27632). Cette protéine est décrite comme l'un des acteurs de la relocalisation nucléaire de YAP en réponse à une rigidité croissante. Après 72 h de culture et en ayant été en contact avec l'inhibiteur pendant 48h, YAP est significativement moins présente dans le noyau (Figure 65, condition+Y27). On retrouve la même distribution de YAP dans toutes les cellules, quelle que soit la surface considérée, qu'elle soit lisse ou nanostructurée. La transduction du message mécanique induit par les nanostructures, qu'elle soit dépendante de YAP ou non, va avoir une action sur la transcription de gènes liés à l'ostéogénèse. Différentes protéines sont connues pour être responsable de cette transition vers des cellules sécrétrices de la matrice osseuse. C'est notamment le cas du facteur de transcription Runx2 et de Smad4.

### 2.2.2. Analyse de l'expression Smad4 en réponse aux nanostructures.

Nous avons préalablement établi que suite à une induction de l'ostéogénèse, Smad4 était surexprimée sur des temps de 3 et 5 jours, le temps de culture de 5 jours étant celui montrant la plus grande quantité de protéine (Figure 60). La Figure 66 A1 montre un western blot effectué contre Smad4 sur un lysat protéique de CSM à 5 jours de culture. La Figure 66 A2 représente l'abondance relative de Smad4 calculée à partir du logiciel ImageJ par analyse de l'intensité des bandes de signal sur les différentes membranes réalisées. Les valeurs ont été représentées en facteur de changement par rapport à la condition Poli qui est fixée arbitrairement à 1 (en pointillés). Les valeurs sont très disparates et il y a une forte hétérogénéité entre les différents réplicas. La

comparaison au temps 5 jours suggère tout de même une tendance à une augmentation de l'expression de Smad4 sur 2T par rapport à Poli.

Pour gagner en sensibilité et en reproductibilité, nous avons utilisé le *in cell ELISA* comme alternative. Cette méthode est brièvement illustrée Figure 66 B1: c'est une technique qui mêle ELISA et immunofluorescence. Nous observons toujours une forte hétérogénéité inter-expériences et également intra-expériences, c'est-à-dire entre chaque réplica technique. Il nous est tout de même possible de valider statistiquement une augmentation de l'expression de Smad4 sur nos deux topographies. En effet, on peut observer en moyenne deux fois plus de Smad4 sur surface 2T et 1,5 fois plus sur surfaces HTE par rapport à la surface Poli (Figure 66 B2).

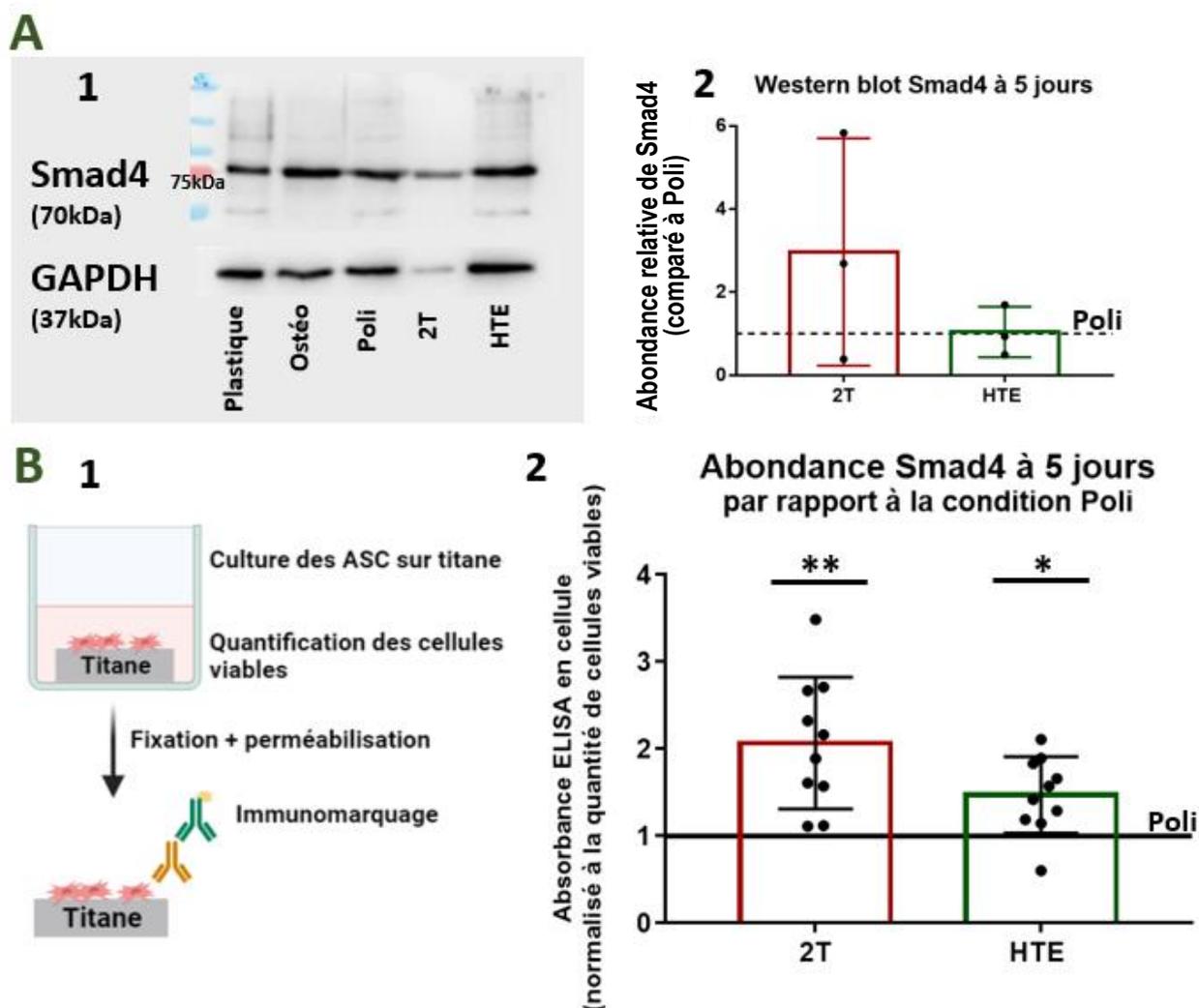


Figure 66 : **Expression de la protéine Smad4 par les CSM après 5 jours de culture à la surface de titane.** **A1** : Western blot contre la protéine Smad4 (70kDa). La GAPDH a été utilisée comme protéine de ménage. **A2** : Analyse semi quantitative des Western blots. L'intensité du signal de Smad4 a été normalisée par rapport au signal de la GAPDH. L'analyse est ici exprimée en ratio par rapport au signal de la condition Poli. Les points représentent trois réplicas indépendants. **B2** : Illustration du principe de l'ELISA en cellule (*in cell ELISA*). Les CSM ont été cultivées pendant 5 jours à la surface des supports en titane. A l'issue de la culture, une analyse de la viabilité cellulaire (Prestoblué) a été effectuée afin de normaliser le signal de l'ELISA. Les cellules ont par la suite été fixées et perméabilisées pour permettre un immunomarquage contre la protéine Smad4. **B2** : Quantification de la protéine Smad4 par ELISA en cellule après 5 jours de culture sur les surfaces titane. Les valeurs représentent l'intensité du signal de l'immunomarquage normalisée à la quantité de cellules viables et exprimée en ratio par rapport à la condition Poli. L'expérience a été effectuée sur 4 réplicas indépendants. Chaque point représente un réplica technique. Significativité par rapport à Poli testée par test de Friedman, \*\*: p-value<0,01 ; \* : p-value<0,05.

### 2.2.3. Modulation de l'expression de Runx2 en réponse aux paramètres topographiques

On a souhaité étudier la présence de Runx2 à 2 temps de culture: 5 et 7 jours. L'hétérogénéité des résultats obtenus ne nous a pas permis d'identifier la moindre modification significative dans l'abondance de cette protéine (Figures 67 et 68). On peut tout de même observer quelques tendances. Ainsi, les CSM cultivées sur HTE possèdent une abondance de Runx2 1,2 fois plus élevée que sur Poli (Figure 67).

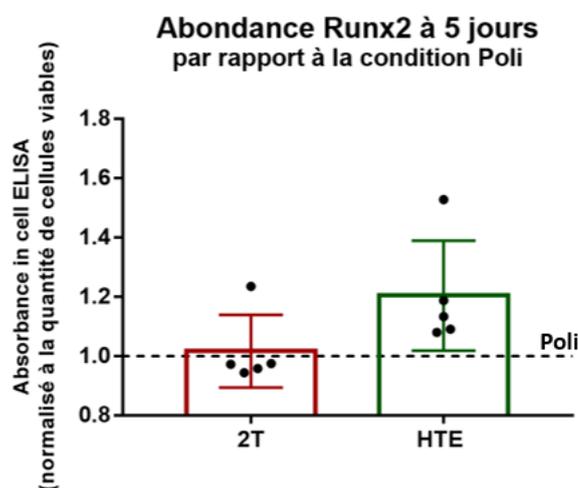


Figure 67 : **Modulation de la quantité de protéine Runx2 dans des CSM à 5 jours de culture.** Quantification de la protéine Runx2 par in cell ELISA après 5 jours de culture sur les surfaces titane. Les valeurs représentent l'intensité du signal de l'immunomarquage normalisée à la quantité de cellules viables et exprimée en ratio par rapport à la condition Poli. L'expérience a été effectuée sur 5 répliques indépendants.

Nous avons cherché à identifier si cette protéine perdurait à des temps plus tardifs en étudiant un temps de culture de 7 jours (Figure 68). Ce temps de 7 jours est un temps généralement analysé dans des études comparables<sup>210,328</sup>. Les WB (Figure 68 A) et l'ELISA en cellules (Figure 68 B) n'indiquent pas de différences significatives entre les conditions, ce qui est confirmé par les données de RTqPCR (Figure 68 C). On observe tout de même une tendance à une augmentation de l'expression de RunX2 induite par les nanostructures par rapport à Poli

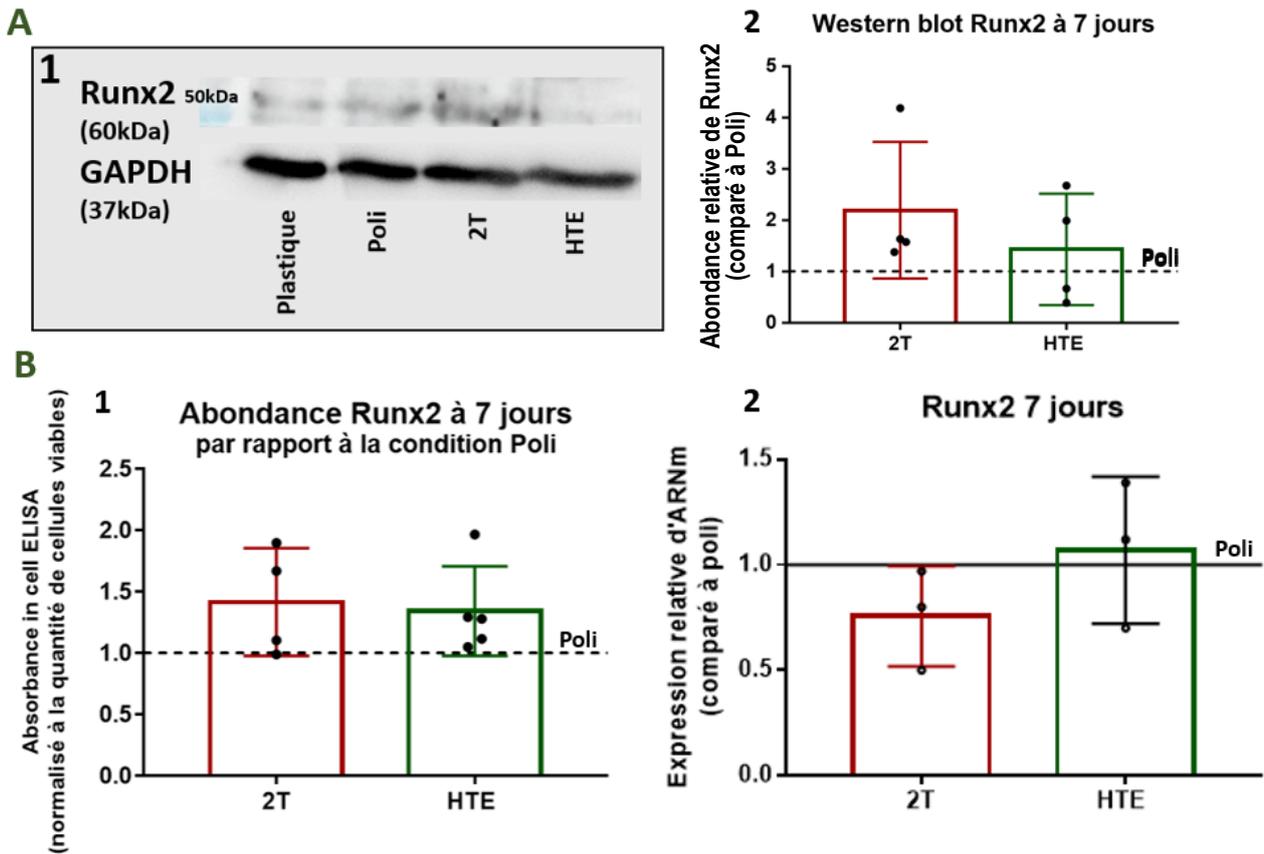


Figure 68 : **Modulation de l'expression de la protéine Runx2 par des CSM suite à leur culture pendant 7 jours sur différentes surfaces en titane.** A1 : Western blot contre la protéine Runx2 (60kDa). La GAPDH a été utilisée comme protéine de ménage. A2 : Analyse semi quantitative de 4 Western blot indépendants. L'intensité du signal de Runx2 a été normalisée au signal de la GAPDH. L'analyse est ici exprimée en ratio par rapport au signal de la condition Poli. B1 : Quantification de la protéine Runx2 par in cell ELISA après 7 jours de culture sur les surfaces titane. Les valeurs représentent l'intensité du signal de l'immunomarquage normalisée à la quantité de cellules viables et exprimée en ratio par rapport à la condition Poli. L'expérience a été effectuée sur plus de 3 réplicas indépendants. B2 : Analyse de l'expression de Runx2 établie par RT-qPCR. Valeur de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  par rapport à la condition Poli. L'analyse a été effectuée sur trois réplicas indépendants.

L'analyse de RunX2, marqueur de différenciation précoce, n'a donc pas permis d'identifier une ostéoinduction par nos nanostructures. Certaines tendances observées sur Runx2 et Smad4 sont tout de même indicatives d'une augmentation de ces marqueurs ostéogéniques sur nos surfaces nanostructurées. Toutefois, selon la méthode utilisée et le temps de culture étudié (5 ou 7 jours), les observations semblent en partie contradictoires dans la recherche de différences entre 2T et HTE. C'est notamment le cas de Runx2 qui est plus représenté sur HTE à 5 jours et sur 2T à 7 jours. La topographie 2T induit pourtant une augmentation importante de Smad4 à 5 jours.

Afin d'identifier la dépendance de ces marqueurs ostéogéniques avec un phénomène de mécanotransduction, une expérience préliminaire a été faite sur l'évaluation de la quantité de Runx2 à 7 jours avec ou sans Y27632. L'inhibition de ROCK n'a induit aucune différence significative dans la quantité de Runx2 présente dans les CSM cultivées sur les surfaces en titane nanostructurées (Figure 69).

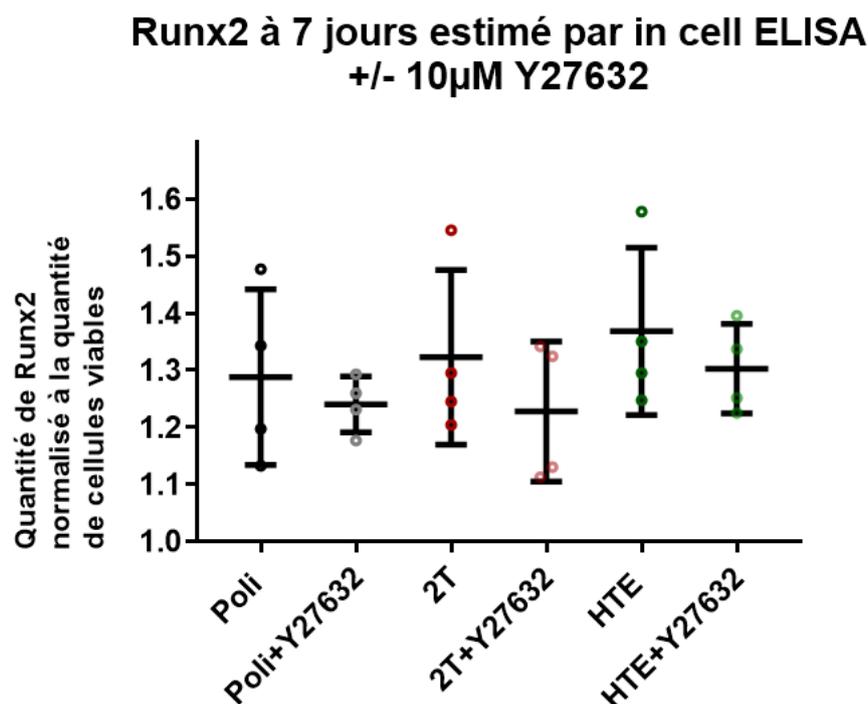


Figure 69 : Modulation de l'expression de la protéine Runx2 à 7 jours avec ou sans traitement par 10 $\mu$ M Y27632. L'abondance de Runx2 a été évalué par in cell ELISA. Chaque point représente un réplica technique.

### 3. Suivi de la différenciation ostéoblastique de CSM suite à une ostéoinduction mécanique

Après les phases initiales d'une ostéoinduction, les CSM se retrouvent dans un stade plus avancé de différenciation. Cette transition en ostéoblastes immatures est médiée par l'action de Runx2 sur la transcription de gènes ostéogéniques. C'est notamment le cas des gènes de l'ALP, du collagène de type 1 (Col1A1) et de l'OPN<sup>329</sup>. Les CSM commencent ainsi à montrer des propriétés physiologiques des ostéoblastes et notamment la sécrétion d'une matrice extracellulaire. *In vitro*, cette phase de sécrétion s'étale sur un temps relativement long. On considère généralement l'étude de cette phase à des temps compris entre 7 et 21 jours.

#### 3.1. Modulation de la cinétique d'activité de l'alkaline phosphatase par les surfaces en titane nanostructurées

L'alkaline phosphatase (ALP) est une enzyme importante pour la minéralisation. La présence et l'activité de l'ALP indiquent la différenciation des CSM en ostéoblastes. La possibilité d'évaluer son activité par test colorimétrique en a fait un marqueur de choix pour déterminer un potentiel ostéogénique, qu'il s'agisse d'études de topographies ou de molécules ostéoinductrices.

L'expression génique de l'ALP a été étudiée à 7 jours de culture par RT-qPCR (Figure 70). Aucune modification significative n'a été induite par la présence de nanostructures. L'expression relative indique tout de même une légère surexpression sur surface HTE.

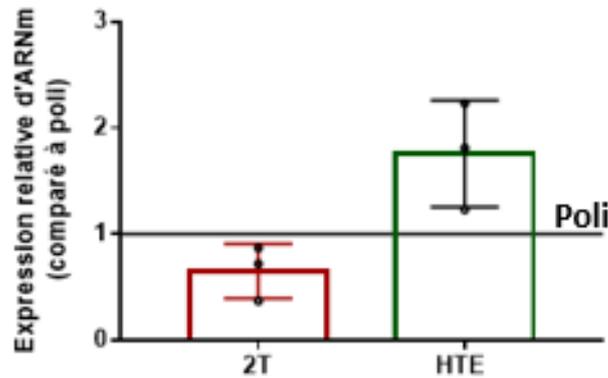


Figure 70 : **Expression du gène codant pour l'ALP à 7 jours de culture.** Analyse de l'expression de l'ALP établie par RT-qPCR. Valeur de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  par rapport à la condition Poli. L'analyse a été effectuée sur trois réplicas indépendants.

L'analyse de l'activité de l'ALP intracellulaire a permis l'obtention de plus d'informations. Même si une grande variabilité est observable entre les réplicas (Tableau 10), on peut tout de même mettre en avant une augmentation significative de l'activité de l'ALP pour 2T à 7 et 14 jours (Figure 71). L'augmentation est aussi visible pour la condition HTE à ces différents temps, mais moins prononcée que celle sur 2T et uniquement significative à un temps de 7 jours.

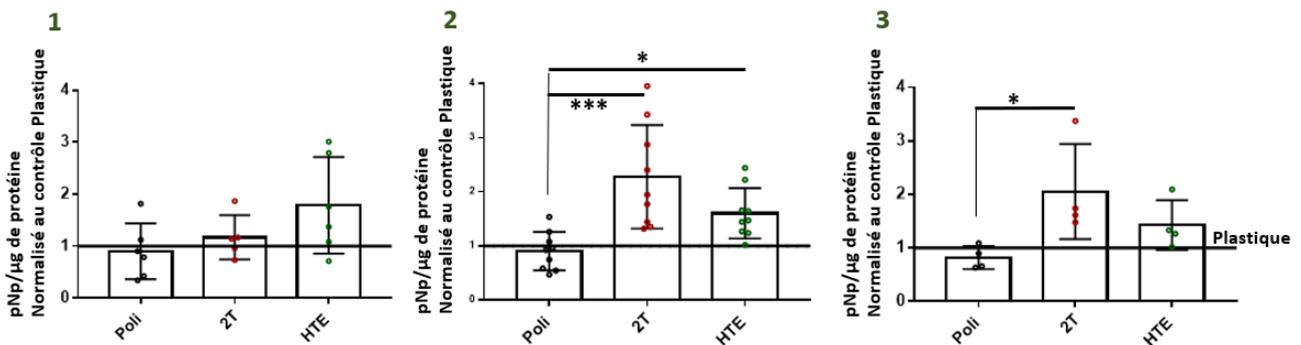


Figure 71 : **Activité de l'alkaline phosphatase à différents temps de culture de CSM sur surfaces en titane.** Les Figures 1, 2 et 3 représentent respectivement l'analyse de CSM à 5, 7 et 14 jours. L'activité de l'ALP est exprimée en quantité de pNP produit par  $\mu\text{g}$  de protéines et normalisée à la condition sur plastique de culture. Le pNP est le produit de la catalyse de pNPP par l'ALP. Chaque point représente un réplica indépendant. Significativité testée par test de Kruskal-Wallis ou one-way ANOVA pour les données de distribution normale, \*\*\* :  $p\text{-value} < 0,001$  ; \* :  $p\text{-value} < 0,05$

Ce format de représentation graphique ne permet pas de visualiser l'évolution dans le temps de l'ALP pour une même condition. Toutefois, une augmentation de la quantité de pNP est bien présente dans le temps (Tableau 10). Elle s'observe principalement entre 5 et 7 jours et sur la surface 2T. Globalement, on n'observe pas d'évolution de l'activité ALP au cours du temps sur les autres supports (Poli et HTE).

Tableau 10 : Valeurs de l'activité de l'ALP à différents temps de culture. Valeurs moyennes de la quantité de produit de la catalyse du pNpp par l'ALP, normalisées à la quantité totale de protéines utilisées. Les moyennes sont exprimées  $\pm$  déviation standard.

pNP/ $\mu$ g de protéines			
	Poli	2T	HTE
5 jours	3,05 $\pm$ 1,99	3,71 $\pm$ 1,4	5,87 $\pm$ 4,16
7 jours	3,42 $\pm$ 2,67	6,3 $\pm$ 5,5	5,20 $\pm$ 3,3
14 jours	3,01 $\pm$ 1,24	7,66 $\pm$ 5,23	5,30 $\pm$ 2,50

### 3.2. Sécrétion de la matrice extracellulaire : le collagène 1

Le collagène de type 1 (Col1) est une conséquence de l'activation de Runx2 dans les phases précoces de l'engagement ostéoblastique. Cette protéine agit comme un échafaudage tissulaire pour l'ancrage des cellules. Via sa fixation à certaines intégrines, le collagène régule la croissance et les propriétés ostéogéniques des cellules et est déterminant pour la maturation des ostéoblastes.

La présence de topographie HTE augmente l'expression génique de collagène 1 à 7 jours (Figure 72). En revanche, les topographies 2T semblent induire une expression plus faible de Col1 en comparaison à Poli.

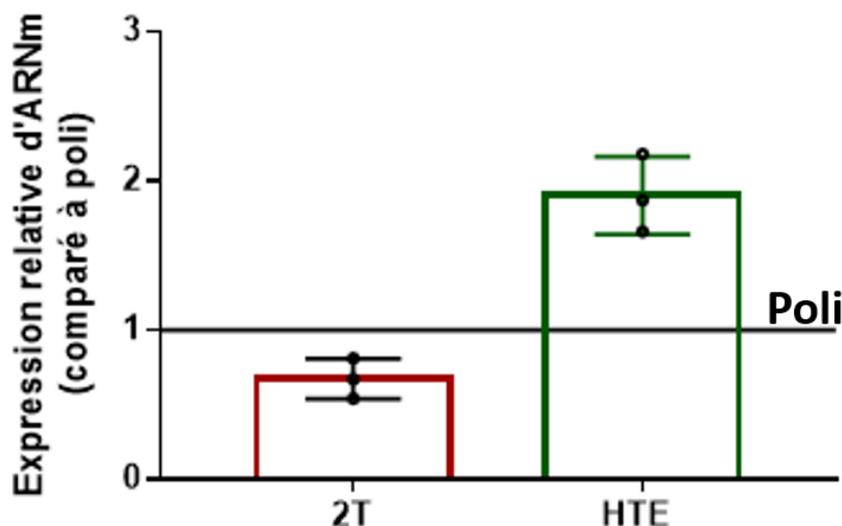


Figure 72 : Impact des nanotopographies de titane sur l'expression de collagène 1 de CSM après 7 jours de culture. Analyse de l'expression de la chaîne alpha 1 de collagène par RT-qPCR. L'histogramme représente la valeur de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  par rapport à la condition Poli. L'analyse a été effectuée sur trois répliques indépendantes. Les données sont fournies en moyenne  $\pm$  SD, normalisée à l'expression du gène de la GAPDH.

Nous avons aussi cherché à récupérer des informations sur la quantité de Col1 sécrété par les CSM. La méthode mise en place consiste en un ELISA direct effectué sur un extrait protéique de la MEC sécrétée par les CSM à la surface des supports en titane.

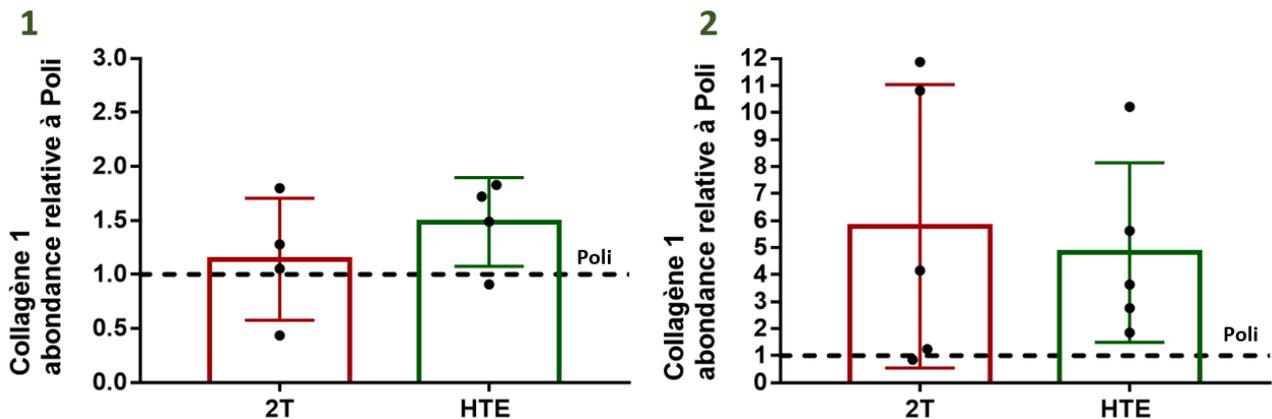


Figure 73 : **Evaluation des niveaux de sécrétion de collagène 1 par les CSM.** Quantité de collagène 1 sécrétée dans la matrice extracellulaire par les CSM sur différentes surfaces. 1 : sécrétion à 7 jours, 2 : sécrétion à 14 jours. Les données sont fournies en moyenne  $\pm$  SD du facteur de changement par rapport à la condition Poli, avec un minimum de 4 expériences indépendantes.

Au temps 7 jours, les observations d'expression génique sont assez cohérentes avec les variations en quantité de Col1 sécrétée à la surface des surfaces titane. Les topographies HTE augmentent la quantité de Col1 de 1,49 fois, là où l'expression génique était augmentée de 1,90 (Figure 73, histogramme 1). En comparaison, on note une sécrétion relativement similaire sur topographie 2T et surface Poli. Les différentes concentrations sont comprises entre 30 à 45 ng/mL au temps 7 jours. Elles atteignent des valeurs moyennes de 50 ng/mL à un temps de 14 jours pour les deux surfaces nanostructurées, démontrant d'une augmentation de collagène dans le temps. Ainsi, à 14 jours, les surfaces 2T et HTE induisent la sécrétion d'environ 5 fois plus de collagène que sur Poli (Figure 73, histogramme 2). Toutefois, toutes ces données ne sont qu'informatives sur la modulation de la sécrétion de collagène 1 induite par les topographies de surface. En effet, aucune conclusion statistique n'a pu être obtenue.

### 3.3. Sécrétion de la matrice extracellulaire : l'ostéopontine

Que ce soit au temps 7 jours (Figure 74- 1) ou 14 jours de culture (Figure 74- 2), nous avons cherché à identifier la déposition d'ostéopontine dans la MEC. L'ostéopontine est une protéine non collagénique très présente dans le tissu osseux. Elle peut être sécrétée par une multitude de cellules de l'organisme. Son arsenal de motifs de liaison (Calcium, RGD, collagène, hydroxyapatite) lui permet d'endosser une multitude de rôles dans l'adhérence et la migration cellulaires, mais aussi dans l'inflammation et l'ossification. Bien que le rôle de cette protéine dans l'ostéogénèse ne soit pas complètement établi, on sait qu'elle est sécrétée par les CSM durant la différenciation ostéogénique. De légères différences sont visibles dans la quantité d'ostéopontine retrouvée dans la MEC sur les différentes surfaces. Ainsi, à 7 jours, une augmentation de 1,1 fois et de 1,2 fois est observable sur les topographies 2T et HTE respectivement en comparaison à Poli. Cette même échelle d'augmentation est visible à 14 jours, même si elle est plus en faveur de 2T, avec une augmentation significative de 1,17 fois de la quantité d'ostéopontine.

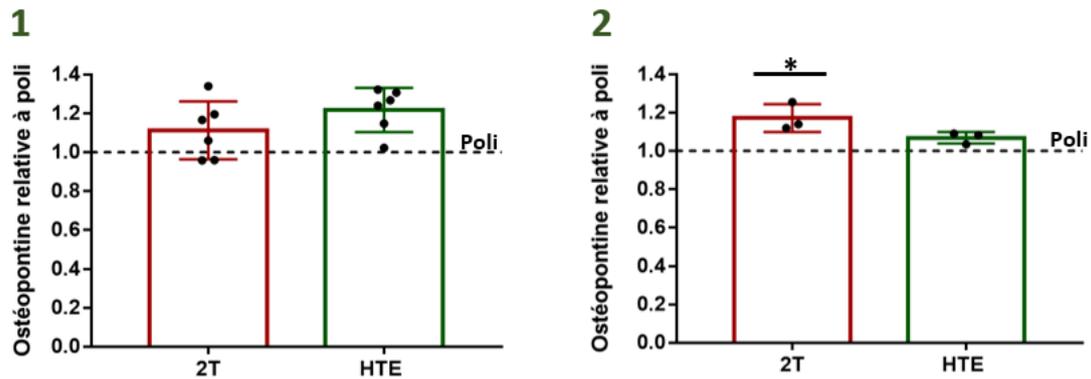


Figure 74 : **Evaluation des niveaux de sécrétion d'ostéopontine par les CSM.** Quantité d'ostéopontine sécrétée dans la matrice extracellulaire par les CSM sur différentes surfaces. A gauche: sécrétion à 7 jours, à droite: sécrétion à 14 jours. Les données sont fournies en moyenne  $\pm$  SD du facteur de changement à la condition Poli, avec un minimum de 4 expériences indépendantes. Significativité testée par test de Kruskal-Wallis, \* : p-value<0,05 comparée à la condition Poli.

### 3.4. Minéralisation de la matrice : quantification des dépôts calciques

Un des marqueurs les plus commun est un marquage des dépôts calciques par l'alizarin red. Cette coloration permet la visualisation du matériel calcifié sur la surface de culture (Figure 75). La coloration au rouge d'alizarine a ensuite été quantifiée en mesurant l'absorbance de la coloration extraite.

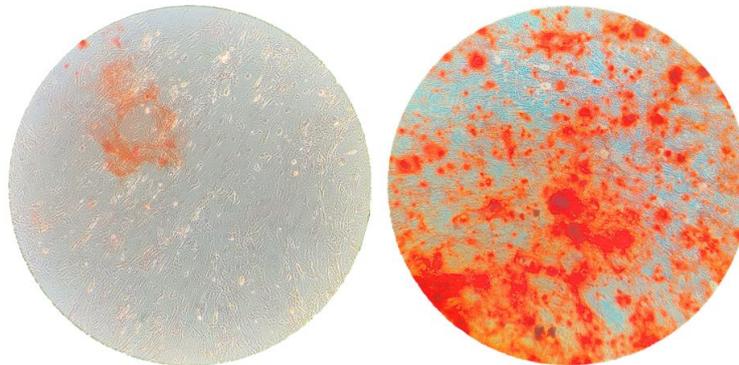


Figure 75 : **Photos d'un tapis cellulaire de CSM marqué à l'Alizarin red.** La photo de gauche illustre une coloration en présence d'une très faible quantité de dépôts calciques sur la surface de culture plastique dans du milieu de culture MSC2. A droite, une grande quantité de dépôts calciques est visible (culture dans du milieu de différenciation ostéogénique). On peut distinguer les CSM qui ont adhéré en arrière-plan.

Les données sont illustrées en rapport de l'intensité d'absorbance par rapport à la condition titane Poli. A partir du jour 14, on peut identifier un effet positif de la présence de topographies sur la minéralisation de la matrice (Figure 76).

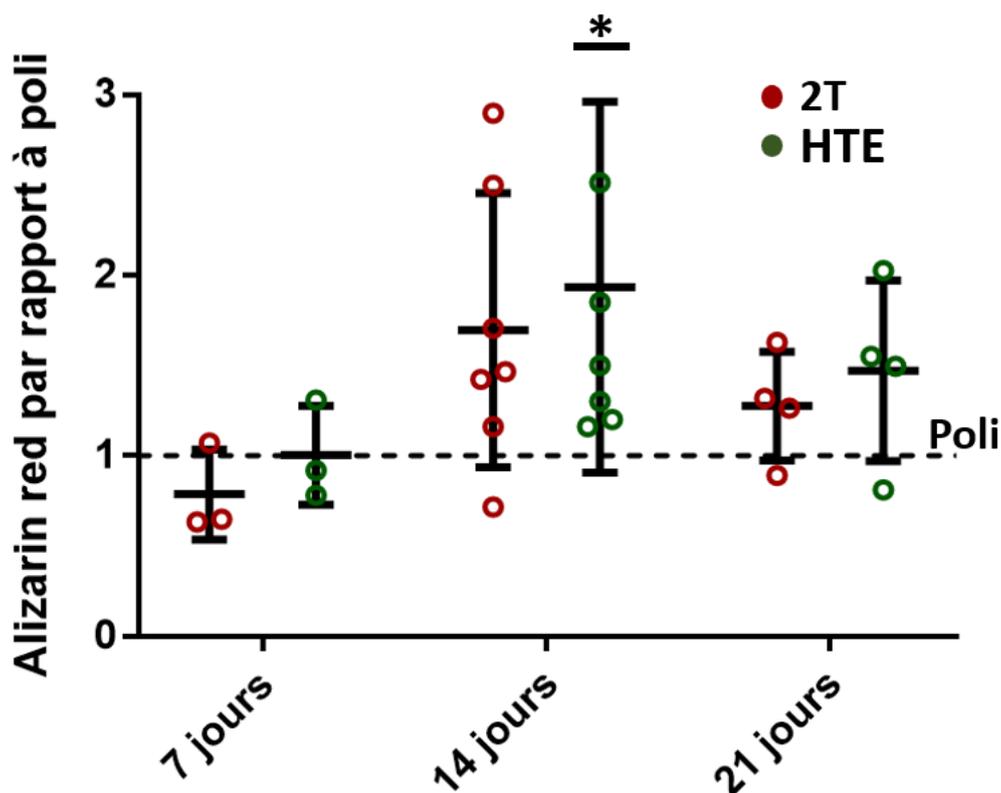


Figure 76 : **Évaluation de la différenciation ostéogénique par analyse des dépôts calciques.** Analyse semi quantitative de dépôts de calcium à 7, 14 et 21 jours de culture de CSM sur les surfaces en titane. Les résultats sont affichés comme le rapport de la valeur d'absorbance sur supports avec nanotopographies par rapport à la condition Poli. Une valeur d'absorbance haute indique l'augmentation de la formation de dépôts calciques. Chaque point représente une expérience indépendante. La significativité a été testée par 2way ANOVA et comparé à la condition Poli, \* : p-value<0,05.

Cette tendance persiste à 21 jours, avec toujours une absorbance plus importante pour HTE comparé à 2T. En termes de valeurs brutes d'absorbance, le temps 21 jours est celui pour lequel la déposition calcique est la plus élevée (Tableau 11). L'accumulation sur 21 jours permet l'obtention d'absorbances comprises entre 0,5 et 0,64. Ainsi, en l'espace de 7 jours (entre 14 et 21 jours), les valeurs d'absorbance ont doublé pour HTE et ont triplé pour Poli et 2T.

Tableau 11 : **Valeurs d'absorbance suite à l'extraction de la coloration Alizarin red à différents temps de culture.** Les moyennes sont exprimées  $\pm$  déviation standard.

Absorbance			
	Poli	2T	HTE
<b>7 jours</b>	0,097 $\pm$ 0,066	0,087 $\pm$ 0,036	0,17 $\pm$ 0,1
<b>14 jours</b>	0,14 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,15
<b>21 jours</b>	0,51 $\pm$ 0,29	0,59 $\pm$ 0,16	0,64 $\pm$ 0,1

Nos résultats ont confirmé que les surfaces de titane nanostructurées présentent des capacités ostéoinductrices. Malgré une significativité inatteignable pour une grande partie des marqueurs évalués, l'ensemble des tendances observées est conforme avec une ostéoinduction liée aux effets de la topographie de surface sur les CSM.

## II. Angiogenèse

### 1. Introduction

Pour diversifier nos approches dans l'étude du potentiel thérapeutique des topographies 2T et HTE, nous avons cherché à intégrer le paramètre d'angiogenèse. L'angiogenèse correspond à la croissance de vaisseaux sanguins à partir de la vascularisation existante. C'est un événement primordial à l'ossification, la cicatrisation osseuse, mais aussi à l'ostéointégration. En effet, la néovascularisation sur un site permet à la fois l'approvisionnement en oxygène, nutriments et cellules.

De plus en plus d'études s'accordent sur la démonstration d'un effet synergique pro-ostéogénique entre les cellules souches mésenchymateuses et les cellules endothéliales<sup>65</sup>. Les raisons de ce phénomène s'expliquent notamment par les sécrétions des CSM dans leur environnement local. La topographie d'une surface serait un facteur capable de moduler ces sécrétions, régulant ainsi l'angiogenèse et le pouvoir ostéogénique des cellules endothéliales<sup>137</sup>.

Outre les effets directs sur les CSM que nous avons présentés précédemment, les topographies modulent également les communications intercellulaires. Pour déterminer l'impact des topographies sur ces phénomènes de communication des CSM avec les cellules endothéliales, notre approche repose sur l'utilisation de milieux conditionnés (mcCSM). Ils représentent les sécrétions de CSM entre leurs sixièmes et septièmes jours de culture sur les différentes surfaces en titane.

L'objectif derrière l'utilisation de milieux conditionnés est de développer des modèles *in vitro* plus complexes. Les milieux conditionnés diffèrent du modèle de coculture par leur capacité à étudier uniquement les communications paracrines dans l'environnement cellulaire. Ainsi, on imagine qu'une variété de molécules paracrines sont sécrétées dans la communication qui se met en place entre les CSM et les cellules endothéliales<sup>330</sup>. Il s'agit de pouvoir déterminer lesquelles sont modulables par la présence de topographies et quelle réponse cellulaire elles peuvent engendrer sur une lignée cellulaire endothéliale humaine de cordon ombilical (Huvec).

#### 1.1. Impact de la présence de nanostructures sur la capacité de sécrétion de VEGF par les CSM

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est connu pour ses propriétés angiogéniques. A ce jour, plusieurs études ont démontré le lien entre les propriétés physiques des surfaces sur lesquelles se développent les CSM et leur capacité sécrétoire de VEGF. Ainsi, la rigidité du substrat est un facteur régulateur de la sécrétion de VEGF par les cellules<sup>331,332</sup>, tout comme le sont les paramètres topographiques de la surface<sup>137,333</sup>. Il nous a été possible de confirmer ce principe via l'analyse par ELISA direct de la quantité de VEGF présente dans nos différents mcCSM (Figure 77). Pour éliminer toute contamination par des facteurs non issus des CSM, les mcCSM ont été produits dans du milieu sans sérum.

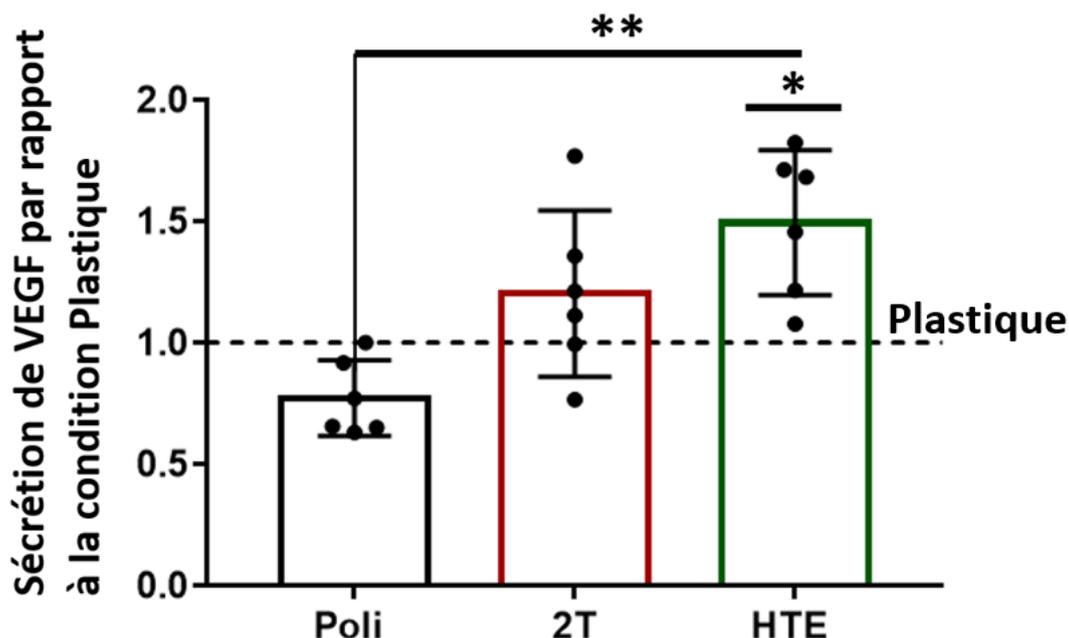


Figure 77 : **Etude de la modulation de la capacité sécrétoire des CSM après culture sur nanostructures.** L'histogramme présente la quantité de VEGF sécrété par les CSM, normalisée à la quantité de cellules viables et par rapport à la condition plastique. Les données ont été acquises de 2 expériences indépendantes et avec 6 mcCSM différents pour chaque condition. La p-value a été calculée par test one-way ANOVA, \* : p-value < 0,05.

Après normalisation des concentrations de VEGF à la quantité de cellules ayant contribué à la production du mcCSM, on voit que topographie HTE augmente significativement (p-value = 0,0105) la sécrétion de VEGF par les CSM cultivées à sa surface en comparaison au titane Poli. Le titane en lui-même semble diminuer la capacité sécrétoire de VEGF par les CSM. Nos résultats montrent une baisse de la concentration de VEGF indépendante de la topographie entre deux surfaces lisses, Poli et Plastique. La présence de topographies, quant à elle, semble compenser cette diminution de VEGF. En effet, que ce soit 2T ou HTE, les valeurs sont supérieures à celles observées sur les surfaces lisses. Notre expérience ne permettait pas de déterminer les valeurs de concentration; néanmoins des études comparables s'accordent sur des concentrations de l'ordre d'une centaine de pg/mL<sup>334-337</sup>.

## 2. Evaluation des réponses cellulaires d'Huvec aux milieux conditionnés issus de CSM

Les données sur la sécrétion de VEGF induite par la présence de nanostructures nous poussent à identifier les différentes propriétés fonctionnelles conférées par les mcCSM sur les Huvec. Lorsque l'on étudie l'angiogenèse, on décrit trois événements centraux. Une première phase de dégradation de la matrice, suivie par la migration et la prolifération cellulaire pour enfin être finalisée avec une morphogenèse permettant la formation de vaisseaux<sup>338</sup>. Les expériences présentées dans cette partie tentent d'établir un lien entre la présence de nanostructures et les capacités angiogéniques des Huvec.

### 2.1. Prolifération des Huvec suite à leur culture en mcCSM

Nous voulions tout d'abord vérifier la prolifération des Huvec en culture dans ces milieux, afin d'écartier la possibilité d'une cytotoxicité sur les Huvec induite par certaines des molécules secrétées dans le mcCSM. La

Figure 78 montre l'effet d'une culture de 48 h au contact des mcCSM sur la croissance des Huvec. La quantité de cellules viables dans chaque échantillon a augmenté en comparaison au contrôle négatif. Le contrôle négatif correspond au milieu de culture MSC2, le même milieu que celui ayant servi à produire les mcCSM. Cet effet induit par les milieux est indépendant de la topographie présente à la surface du titane étant donné que la quantité d'Huvec est la même pour Poli, 2T et HTE. La tendance en faveur d'une augmentation de VEGF dans le mcCSM HTE ne s'est donc pas traduite par une augmentation de la prolifération des Huvec.

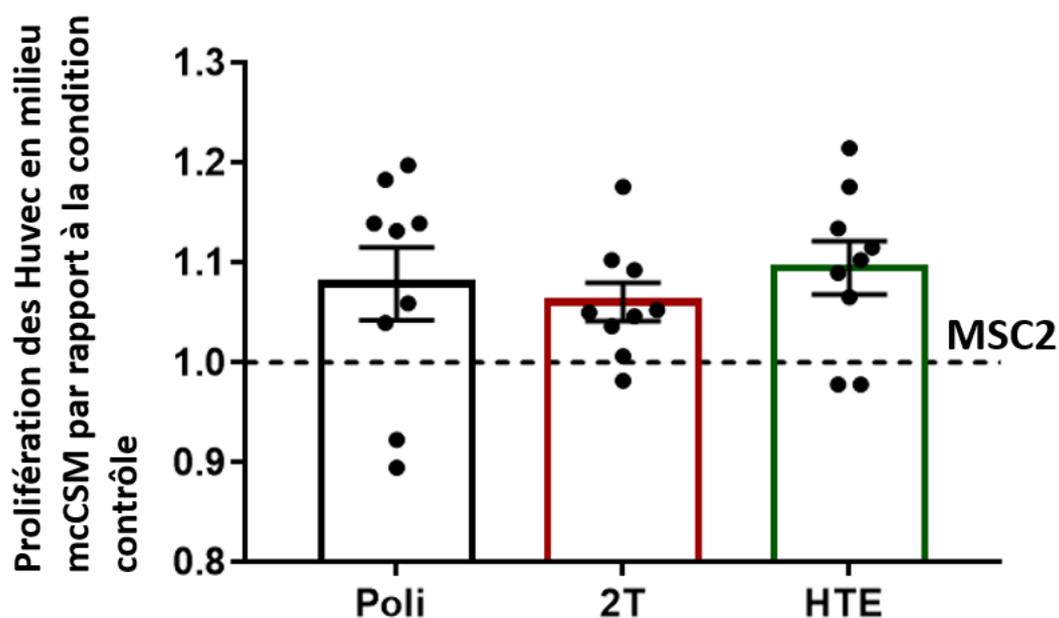


Figure 78 : **Analyse de l'effet de différents milieux conditionnés sur la prolifération des Huvec.** Test de viabilité cellulaire sur des Huvec cultivées pendant 48h avec différents milieux conditionnés. Les milieux conditionnés correspondent à du milieu MSC2 mis au contact de CSM en culture sur les supports en titane. Les données sont représentées comme le facteur de changement comparé au contrôle (milieu MSC2). Les points correspondent à différents répliques techniques de trois expériences indépendantes. Représentation de la moyenne pour chaque lot de données  $\pm$  déviation standard.

Ainsi, les mcCSM produits sur nos différentes surfaces en titane ne semblent pas cytotoxiques pour les Huvec. L'ensemble des molécules sécrétées par les CSM sur l'espace de 24 h dans le milieu de culture est capable d'améliorer la prolifération de ces dernières. Malheureusement, notre méthode d'évaluation de la prolifération ne permet pas de déterminer le pourcentage de viabilité des cellules. Toutefois, des expériences complémentaires (non présentées dans ce manuscrit) ont montré que le milieu MSC2 est adéquate pour maintenir les Huvec en culture. Ce milieu initialement destiné à la culture de CSM induit même une meilleure prolifération des Huvec. Sur cette base, on est en droit d'estimer que l'effet observé Figure 78 est probablement lié à un effet sur la prolifération cellulaire.

## 2.2. Caractérisation de la migration d'Huvec en présence de CSM : co-cultures en Transwell

La capacité migratoire peut être évaluée par l'utilisation d'inserts de culture avec membrane poreuse (appelés Transwells ou chambres de Boyden)<sup>338,339</sup>. Cette méthode est classiquement utilisée afin d'évaluer les capacités angiogéniques ou anti-angiogéniques de molécules. Notre modèle consiste à démontrer une communication paracrine mise en place par les CSM. Effectivement, l'augmentation de la sécrétion de VEGF par les CSM sur

nanostructures 2T et HTE nous laisse penser que ces topographies ont un rôle dans l'établissement d'une communication pro-angiogénique. Différentes études ont déjà démontré une amélioration de la migration d'Huvec à travers un Transwell suite à l'utilisation de VEGF<sup>340,341</sup>.

Des CSM ont été cultivées sur nos 3 surface en titane pendant 7 jours. Le milieu de culture a alors été remplacé par du milieu MSC2 frais. Des Transwells préalablement recouverts d'Huvec sur la face supérieure de la membrane ont été placés dans les puits contenant les supports en titane recouverts de CSM (Figure 46). Après 24 h, une coloration au cristal violet a permis d'estimer la quantité de cellules ayant migré à travers la membrane (Figure 79). Cette expérience préliminaire indique une migration favorisée lorsque les Transwells étaient placés dans des puits en présence de CSM cultivées sur les supports 2T ou HTE. Les supports HTE donnent les meilleurs résultats, suivis des 2T et enfin des Poli.

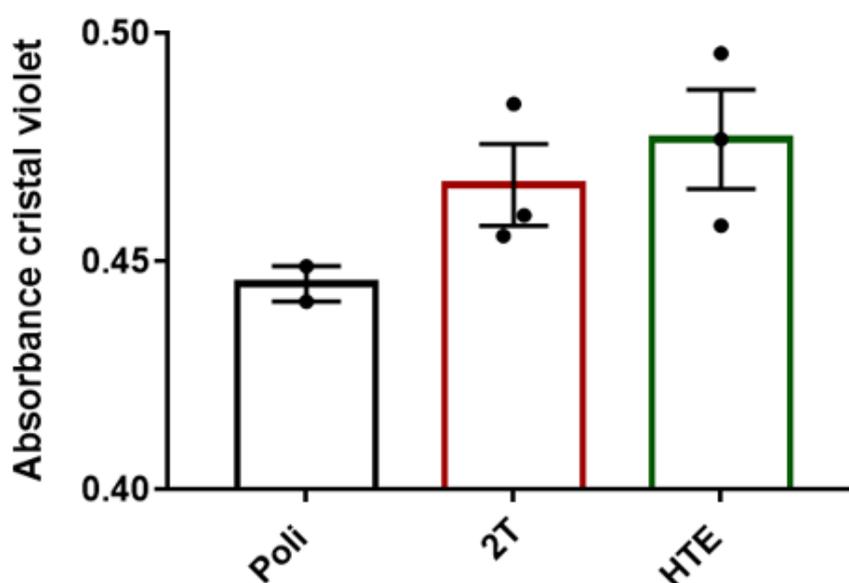


Figure 79 : **Etude de la modulation du potentiel chimiotactique de CSM par les nanostructures de titane.** Capacité de migration d'Huvec à travers des pores de 8  $\mu\text{m}$  suite à une coculture avec des CSM. L'absorbance correspond à la quantité d'Huvec ayant migré à travers la membrane du transwell. Les points représentent différents réplicas techniques.

On serait ainsi en présence de deux nanostructures améliorant le pouvoir angiostimulant des CSM. En l'état, ces expériences sont encore préliminaires, mais étant donné l'intérêt des informations apportées, elles seront reproduites pour confirmer nos observations. De plus, la tendance est relativement homogène avec celle observée dans la sécrétion de VEGF. Cela constitue un argument supplémentaire pour justifier le besoin de reproduire cette expérience.

### 2.3. Caractérisation de la migration d'Huvec en mcCSM : test de cicatrisation

Toujours dans cet objectif d'identifier les capacités migratoires, une méthode alternative peut être mise en place. Cette méthode est basée sur une analyse microscopique et consiste à quantifier la fermeture d'une blessure créée dans un tapis cellulaire. Brièvement, après obtention d'un tapis cellulaire d'Huvec, une blessure a été effectuée à l'aide d'un cône de 200  $\mu\text{l}$ . Cette blessure crée un espace vide au sein du tapis cellulaire. Le suivi

par microscopie permet d'évaluer la vitesse de fermeture en étudiant le rapprochement des deux fronts de migration de part et d'autre de la blessure (Figure 47).

Après création de la blessure, les Huvec ont été incubées en présence de nos différents mcCSM. L'analyse microscopique s'est étalée sur 12 h avec une photo prise par puits toutes les heures. Ce temps de 12h est considéré assez court pour s'exonérer du paramètre de prolifération des cellules.

La Figure 80 représente le taux de fermeture de la blessure observable au temps 12 h, en comparaison au temps 0. Le mcCSM généré après culture des CSM sur les supports en titane HTE augmente significativement la capacité migratoire des Huvec par rapport au milieu mcCSM Poli. Par contre, on n'observe pas de différence d'effet entre les mcCSM issus de cellules cultivées sur Poli ou 2T.

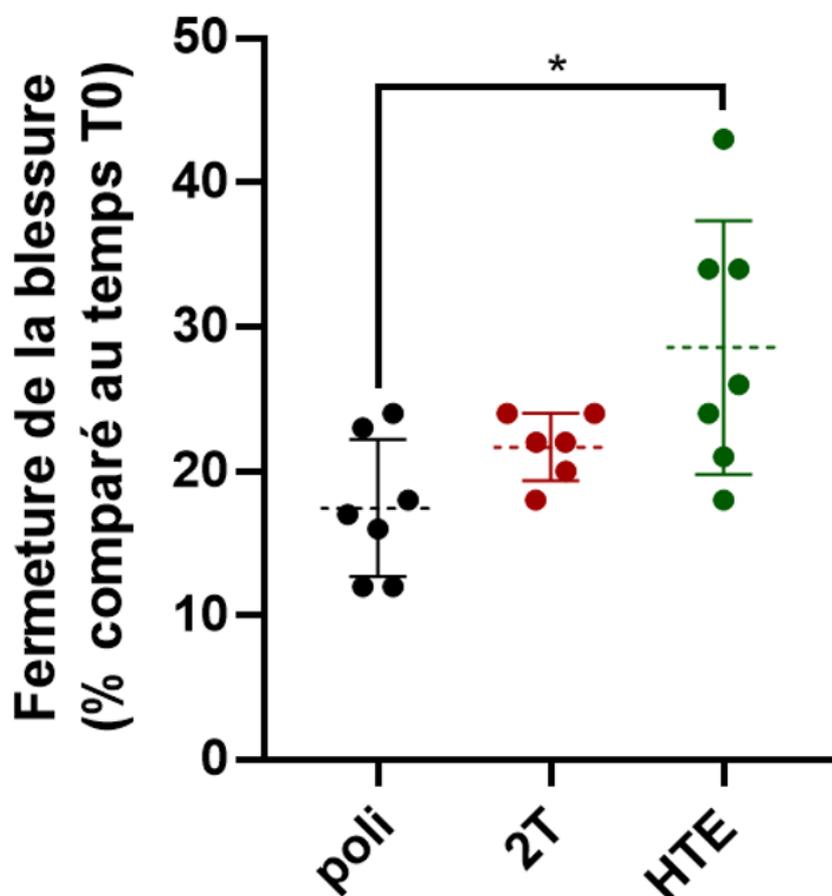


Figure 80 : **Analyse de la migration d'huvec incubées avec différents mcCSM (Wound healing assay)**. Les échantillons de mcCSM ont été obtenus après conditionnement des CSM cultivées pendant 7 jours à la surface des supports Poli, 2T ou HTE. Une fois la blessure réalisée dans le tapis d'huvec, les cellules ont été cultivées en présence des mcCSM pendant 12 h. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  déviation standard. La p-value a été calculée par test de Brown-Forsythe and Welch ANOVA, \*\*\* : p-value<0,0005 ; \* : p-value<0,05.

## 2.4. Evaluation de la morphogenèse des Huvec en Matrigel

L'angiogenèse nécessite l'organisation des cellules endothéliales en forme de vaisseaux. Cette étape de formation de vaisseaux peut être modélisée *in vitro*. Ces modèles reposent sur la culture de cellules endothéliales avec des composants de la MEC. L'essai le plus largement utilisé consiste à placer des Huvec sur du Matrigel. Le Matrigel est une matrice extracellulaire extraite de sarcome de souris. Une fois placées sur cette matrice, les Huvec vont former un réseau ramifié (Figure 81).

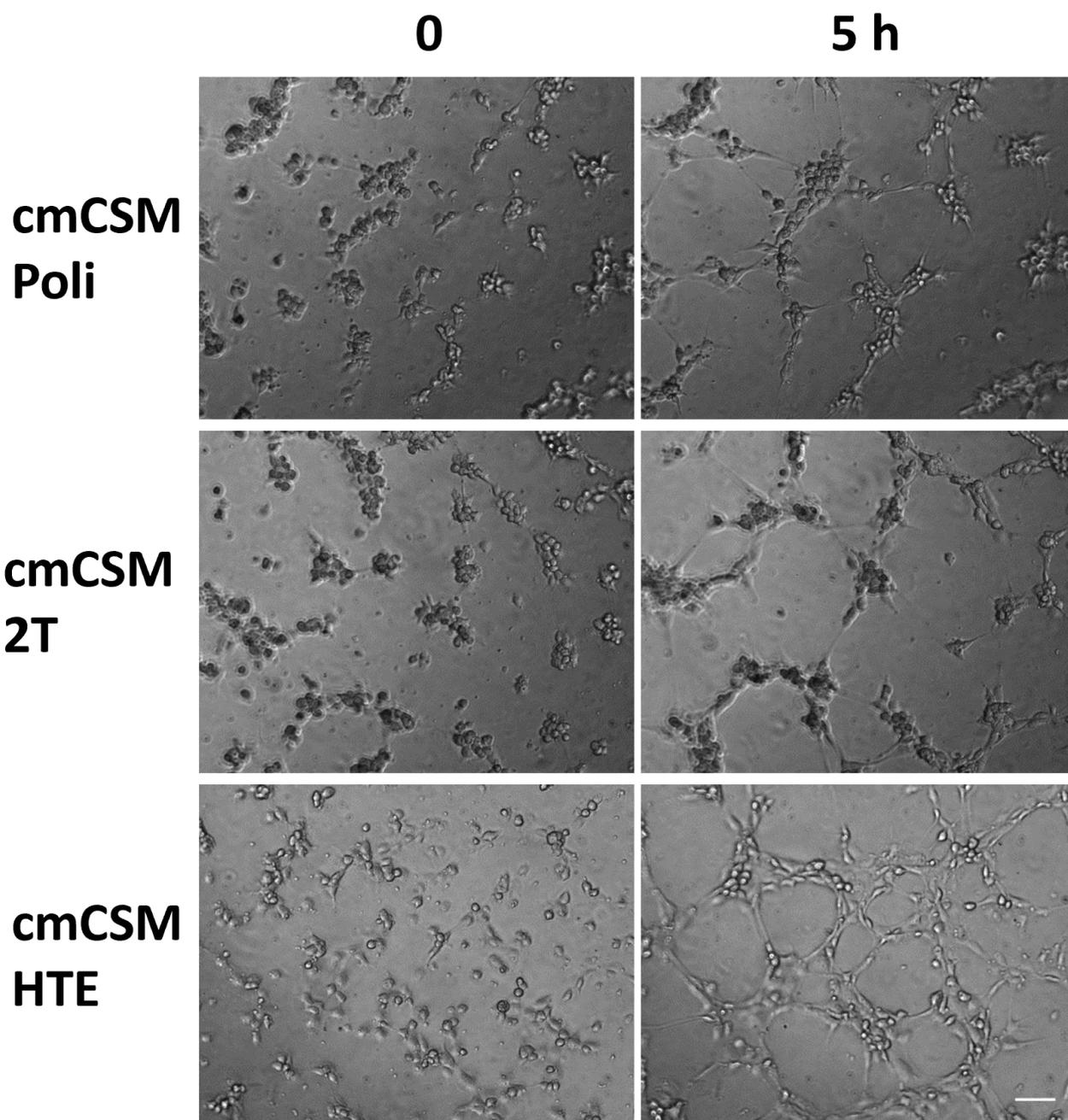


Figure 81 : **Observation en microscopie à contraste de phase de la morphogenèse d'Huvec cultivées sur matrigel.** Les cellules Huvec ont étéensemencées sur du matrigel dans différents mcCSM. Un suivi de leur organisation au cours du temps a été réalisé par microscopie. La barre d'échelle est de 500µm.

Les cultures sont alors photographiées dans le temps et il est possible d'évaluer la morphogenèse en mesurant différents paramètres de ces structures capillaires<sup>342</sup>. Parmi les paramètres obtenus suite à l'analyse d'images, nous avons sélectionné celui consistant à quantifier le nombre de nœuds (embranchements) créés par cette structure en maille. Le paramètre de longueur des branches suit le même profil de modulation que celui des nœuds (non montré).

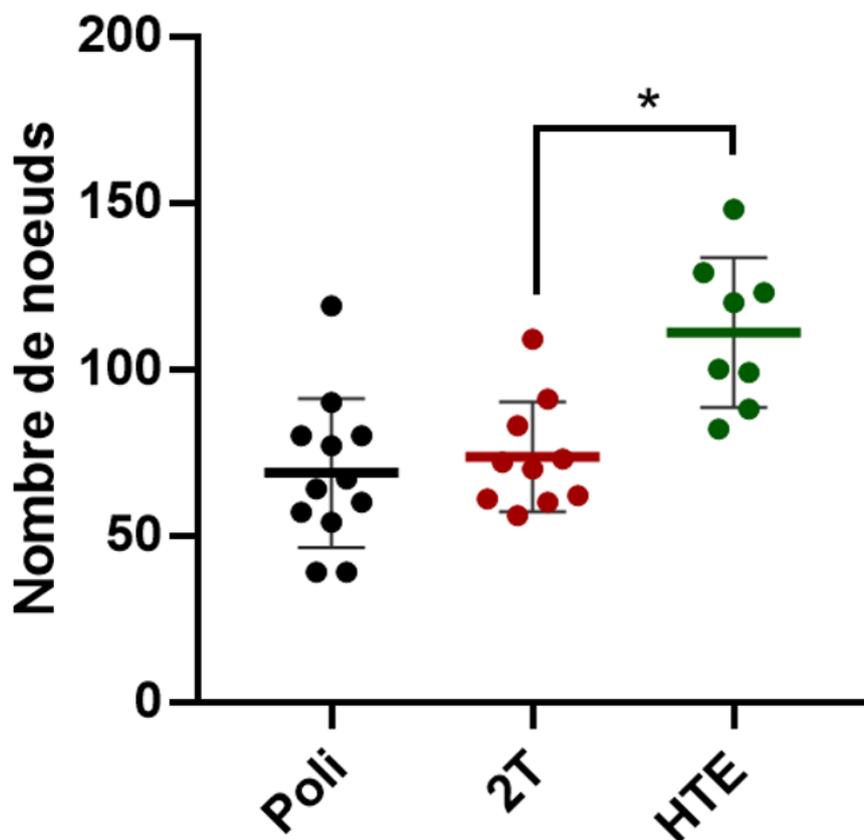


Figure 82 : **Evaluation du potentiel angiogénique de différents mcCSM obtenus après culture des CSM sur nos supports en titane nanostructurés.** Les données ont été acquises de 3 répliques indépendants et sont présentées en moyenne ± SEM. La p-value a été calculée par test one-way ANOVA, \* : p-value<0,05 ; \*\* : p-value<0,01.

Nous avons réalisé un test d'angiogenèse *in vitro* en utilisant un matrigel dépourvu de facteurs de croissance. Les cellules Huvec ont été suivies par vidéomicroscopie pendant 5 h. Là encore, on a une augmentation significative du nombre de nœuds induit par le mcCSM produit sur HTE en comparaison à 2T, qui n'apporte pas d'amélioration par rapport à du mcCSM provenant de CSM sur Poli (Figure 82). Les nanostructures HTE induisent donc chez les CSM la sécrétion de signaux favorisant la morphogenèse des Huvec.

### III. Modélisation *in vivo* de l'ostéogenèse induite par des implants nanostructurés

Compte tenu de la complexité du corps humain, les modèles expérimentaux *in vitro* sont limités dans leur capacité à refléter correctement la réaction *in vivo* face à un biomatériau. L'expérimentation animale reste essentielle pour établir les performances d'un biomatériau. Une grande variété de modèles de défauts osseux a été développée pour tester des implants pour différentes applications (Figure 83).

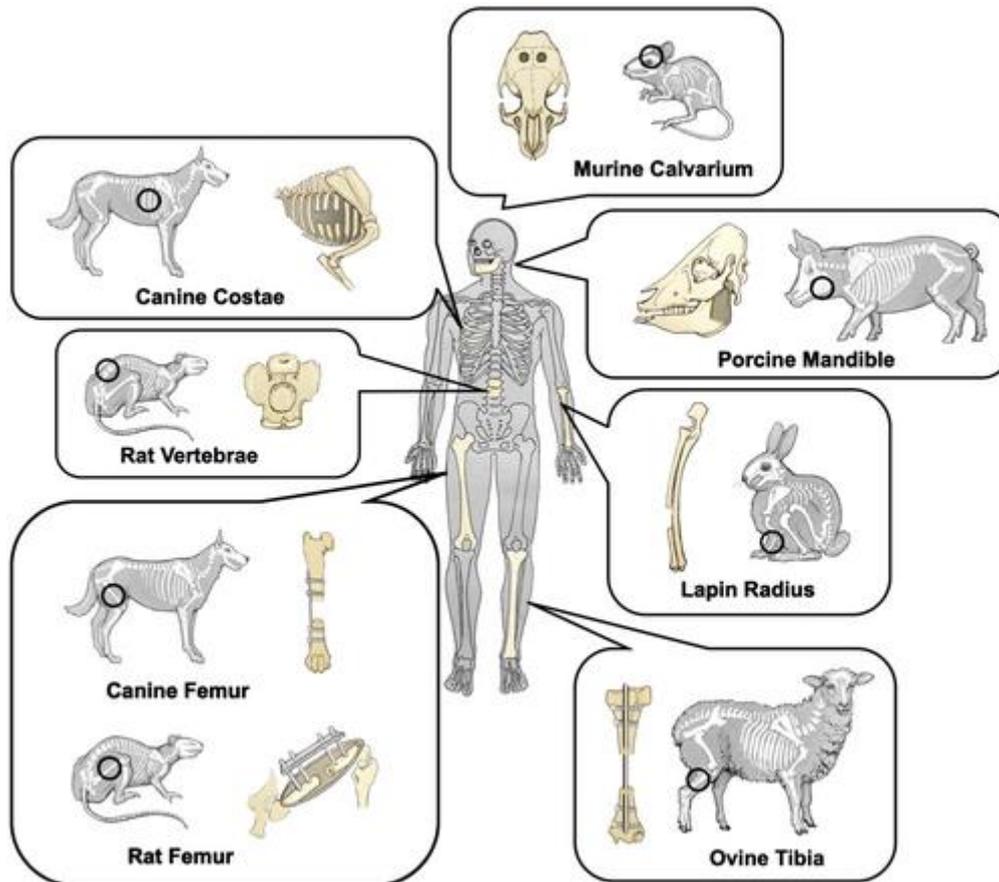


Figure 83 : Représentation schématique de modèles de défaut osseux courants (d'après <sup>316</sup>).

L'étude de l'ostéointégration de biomatériau est dépendant du type de lésion induit à l'os, mais également de l'animal sélectionné. Trois grands principes régissent le choix du modèle animal :

- **La faisabilité** : ce principe est d'ordre pratique. Il considère la compatibilité du modèle sur le plan éthique, économique mais prend aussi en compte les exigences quant au matériel nécessaire ou à la période expérimentale.
- **La reproductibilité** : Elle est liée à la standardisation du modèle. Le modèle doit pouvoir être reproduit à plusieurs reprises avec le minimum de variabilité introduite selon le lieu d'expérimentation, l'expérimentateur ou le matériel.
- **La similarité** : Le modèle animal sélectionné doit pouvoir simuler, dans un cadre expérimental, la situation clinique. Il est ainsi nécessaire d'avoir connaissances des différences physiologiques inter espèces.

En terme de similarité avec l'Homme, les modèles les plus adaptés sont les gros animaux (cochons, moutons, chiens, primates). En effet, la composition, la structure et la biomécanique de leurs os sont assez comparables à l'humain. Toutefois, leur utilisation implique beaucoup de contraintes de faisabilité. Pour citer des exemples : le temps de régénération de l'os est relativement long et peut être inadéquate dans la temporalité de l'expérience. De plus, la maturité osseuse, qui est nécessaire pour assurer une reproductibilité et une similitude, arrive à un âge assez avancé des animaux. Pour toutes ces raisons, les petits animaux et notamment les rongeurs sont préférés. Environ 80% des modèles de fractures concernent l'utilisation de souris, rats et lapins<sup>343</sup>. Bien que la structure osseuse des rongeurs diffère grandement de celle des humains, le processus de cicatrisation osseuse est très similaire<sup>344</sup>.

## **1. Déficit crânien de taille critique chez le rat**

### **1.1. Présentation du modèle**

Notre attention s'est portée sur le modèle de déficit crânien de taille critique chez le rat. Ce modèle est bien décrit dans la littérature et a notamment fait l'objet d'un protocole publié dans *Nature*, très détaillé et qualitatif <sup>317</sup>. Brièvement, ce modèle consiste à créer un déficit circulaire au niveau de la voûte crânienne. La structure osseuse de cette partie de la boîte crânienne permet l'établissement d'un déficit uniforme, reproductible et standardisé à l'aide d'un trépan. De plus, comme synthétisé dans la revue de Hatt et al. <sup>345</sup>, l'emplacement anatomique facilite l'accès chirurgical et la manipulation peropératoire. Par ailleurs, la dure-mère et la peau qui la recouvre constituent un support adéquat pour les matériaux implantés, sans qu'il soit nécessaire de procéder à une fixation interne ou externe. Malgré tous les avantages apportés par ce modèle, il est néanmoins important de souligner qu'il ne modélise pas la reconstruction d'un os recevant des sollicitations mécaniques dues au poids du corps. Il est donc impossible d'évaluer l'impact de forces mécaniques sur le processus de régénération et la capacité de l'os nouvellement formé à y répondre. Toutefois, nous avons vu dans ce modèle une très bonne analogie à l'une des situations cliniques impliquant l'utilisation de titane. Je parle notamment des cranioplasties, pour lesquels les chirurgiens requièrent l'utilisation d'implants se présentant sous la forme de grilles en titane. Un des avantages que confère ce modèle est la possibilité de créer plusieurs déficits sur le même animal, à condition que le déficit soit de diamètre  $\leq 6$  mm. Cependant, la littérature ne s'accorde pas sur le diamètre à partir duquel on considère le déficit critique. Comme vous pouvez le voir en Annexe 9, la majorité des études se partagent entre 5 mm et 8 mm et concernent une variété de biomatériaux. Bien que de nombreuses études sont effectuées sur des déficits de 5 mm de diamètre, nous avons préféré nous placer dans une situation de déficit avec moins de doute quant à son caractère critique. Nous avons ainsi opté pour la création de déficit unique sur chaque crâne de 8 mm de diamètre.

Nous avons validé la sûreté de notre intervention sur le comportement de l'animal via des vérifications visuelles mais également par un suivi du poids qui a été effectué tous les deux jours sur les premières semaines suivant l'intervention. Le suivi du poids d'un animal est l'un des paramètres le plus parlant pour s'assurer du bien-être de l'animal suite à une intervention chirurgicale. Aucune baisse significative n'a été observée sur l'ensemble des animaux inclus dans cette étude, indiquant un comportement alimentaire inchangé après l'implantation des supports en titane (Figure 84).

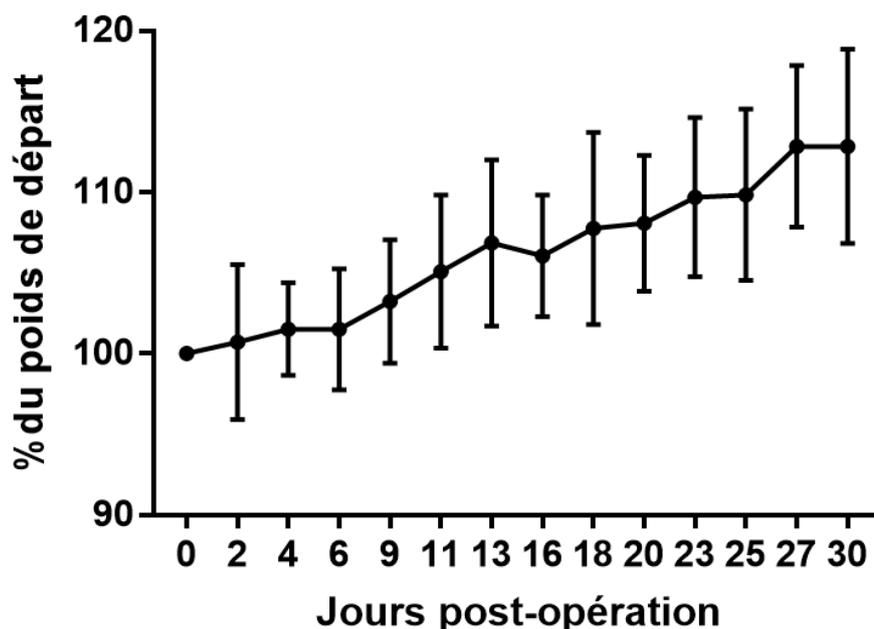


Figure 84 : Evolution du poids des rats sur les 30 premiers jours suite à la chirurgie. Les rats faisaient en moyenne 480 g à leur inclusion dans l'étude.

## 1.2. Modalité de suivi expérimental

Lorsqu'on se penche sur les méthodes recommandées pour l'évaluation des performances d'un implant, deux méthodes prédominent : le scan  $\mu$ Ct et l'histologie. Une analyse de 33 articles a permis d'identifier les habitudes expérimentales (Annexe 10). Ces articles ont été ciblés sur la base de l'utilisation du modèle de défaut crânien du rat pour l'évaluation des capacités ostéoinductrices et ostéointégratrices de biomatériaux. Ces études s'étalent sur les dix dernières années et illustrent la variété d'approches existantes dans le domaine de la reconstruction osseuse. Concernant les méthodes utilisées, sur les 33 articles, seuls 2 ne faisaient pas mention de scan  $\mu$ Ct et 3 ne faisaient pas mention d'analyses histologiques. Ces deux méthodes se présentent donc comme des incontournables pour identifier l'ossification dans ce modèle animal. La moitié des articles ont combiné ces deux méthodes avec des analyses additionnelles adaptées à leurs études. On peut citer l'utilisation d'imagerie à fluorescence, des analyses biomécaniques ou de vascularisation par  $\mu$ Ct, mais également des analyses d'expression génique par RT-qPCR ou de l'imagerie PET et IRM. Selon les paramètres de régénération et les méthodes utilisées, les analyses sont réparties sur plusieurs temps post-chirurgie. La majorité des études ont eu recours à au moins deux temps différents, situés entre 2 et 12 semaines après l'implantation.

Pour évaluer en détail la quantité d'os régénéré au contact de nos implants en titane, nous avons opté pour une combinaison d'analyse de scans  $\mu$ Ct et d'histologie. Nous souhaitons pouvoir quantifier la régénération au cours du temps. Généralement, cela implique l'euthanasie des animaux à différents temps. Toutefois, cela engendre inéluctablement l'augmentation du nombre de rats inclus dans l'étude pour maintenir une puissance statistique suffisante à chaque temps étudié. Pour des raisons éthiques de réduction du nombre d'animaux, nous souhaitons limiter le nombre de lots expérimentaux. Notre solution a ainsi consisté à effectuer les scans  $\mu$ Ct avec des animaux vivants. Effectivement, les scans pratiqués dans la littérature se font presque exclusivement *post mortem*. Par exemple, sur les 33 articles mentionnés en Annexe 10, aucun n'a procédé à une étude par scan sur rats vivants.

## 2. Cinétique d'ossification en fonction de la topographie à la surface de l'implant en titane

En s'abstenant d'un effet amené par le périoste, un défaut circulaire de 8 mm s'avère être critique, comme en témoignent les reconstructions 3D des défauts contrôles à 12 semaines (Annexes 11). C'est-à-dire que le défaut est trop étendu pour que le processus naturel d'autoréparation puisse, à lui seul, induire une consolidation osseuse. La guérison par régénération osseuse n'a ainsi lieu qu'après l'implantation de biomatériaux permettant la régénération osseuse. Dans notre cas précis, la guérison est permise par la présence d'implants en titane. L'objectif est de déterminer l'ampleur de la guérison induite selon la topographie du titane implanté.

Pour analyser le potentiel ostéogénique de nos différents implants, notre étude a été effectuée en mettant l'accent sur l'utilisation de la  $\mu$ Ct. Des scans ont été effectués toutes les deux semaines jusqu'à 12 semaines post-chirurgie. Tous ces scans ont été analysés informatiquement avec le logiciel SCANCO. L'analyse quantitative des scans s'est faite en délimitant une zone rectangulaire à 150  $\mu$ m sous l'implant, et cela, sur la totalité de la surface de l'implant (Figure 85). Les deux paramètres les plus recommandés pour étudier l'os nouvellement formé par  $\mu$ Ct sont le paramètre BV/TV et la densité minérale osseuse (BMD)<sup>346</sup>.

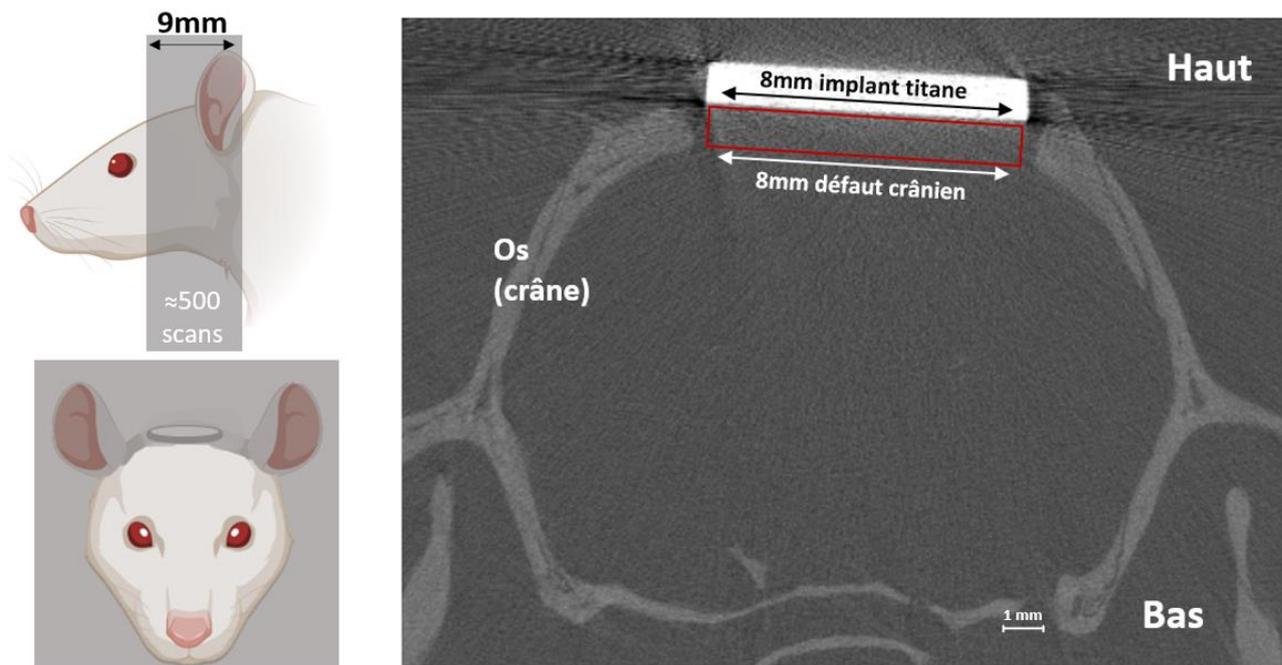


Figure 85 : illustration de la délimitation de la zone de scan et zone d'analyse de l'ossification. A gauche : représentation en vue de profil ou de face de la zone à scanner (en gris clair). L'ensemble de la zone correspond à 500 coupes en séries. A droite : coupe en  $\mu$ Ct, sur laquelle on peut identifier le crâne du rat en gris clair, le défaut créé et l'implant en titane. Le rectangle délimité en rouge représente la zone ciblée pour analyser la quantité d'os régénéré.

Le BV/TV correspond au volume d'os sur le volume total. Il représente ainsi une proportion du volume de l'os (en  $\text{mm}^3$ ) par rapport au volume de notre zone d'intérêt. Cette proportion augmente significativement pour les implants HTE en comparaison au implants 2T et Poli (Figure 86). En effet, nos résultats montrent des différences importantes dans la quantité d'os nouvellement formé selon la topographie. Ainsi, les implants 2T et Poli ont une formation osseuse sur un délai de 10 semaines assez similaire. Pour chacun, une augmentation entre 2 et 12 semaines est visible, mais très légère, avec environ un facteur d'augmentation de 1,48. En comparaison, les

implants HTE montrent 3,18 fois plus de volume osseux à 12 semaines par rapport au volume à 2 semaines. Le choix de la  $\mu\text{Ct}$  *in vivo* nous permet d'avoir le détail de la cinétique de formation osseuse. Ainsi, les implants HTE commencent à se dissocier significativement du profil d'ossification de 2T dès 6 semaines post-chirurgie, et dès 8 semaines par rapport à Poli.

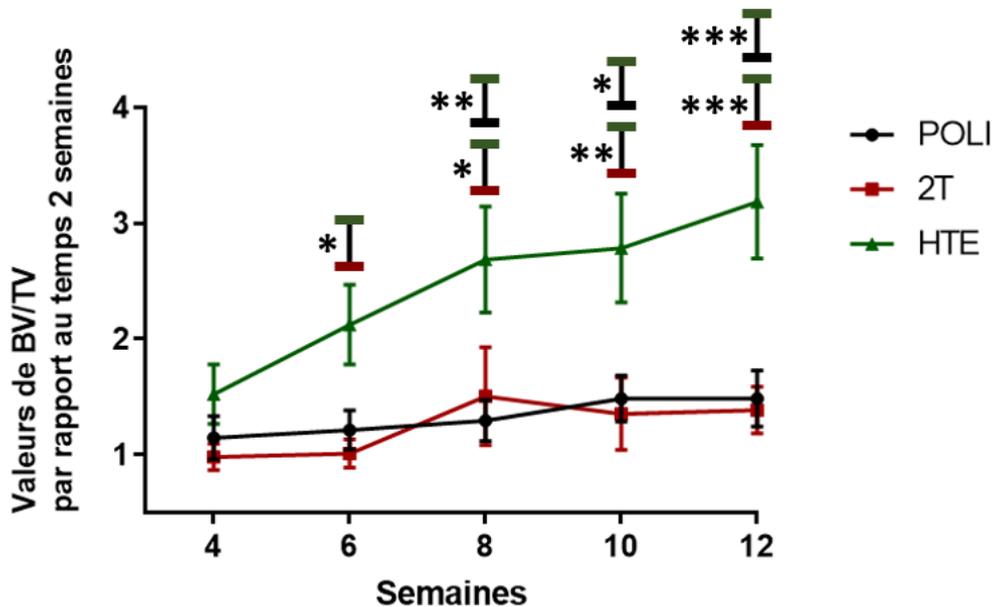


Figure 86 : **Cinétique d'ossification : volume osseux/volume total.** Evolution de la quantité d'os nouvellement formé au contact de l'implant. Le ratio volume d'os sur volume total permet de suivre l'évolution volumétrique de l'os dans la zone d'intérêt. Les valeurs de BV/TV sont présentées par rapport à la valeur à 2 semaines pour chaque individu. Pour chacune des conditions, l'effectif est de : poli : 10 rats ; 2T : 9 rats ; HTE : 11 rats. La p-value a été calculée par test 2way ANOVA, \*\*\* : p-value<0,001 ; \*\* : p-value<0,01 ; \* : p-value<0,05.

L'analyse de la densité minérale de cet os nouvellement formé possède un profil relativement similaire à celui établi par BV/TV (Figure 87). Ainsi, nous pouvons faire les mêmes observations quant à la similitude entre Poli et 2T. En comparaison, une augmentation significative de la BMD est visible pour les implants HTE en comparaison à Poli et 2T à 8, 10 et 12 semaines.

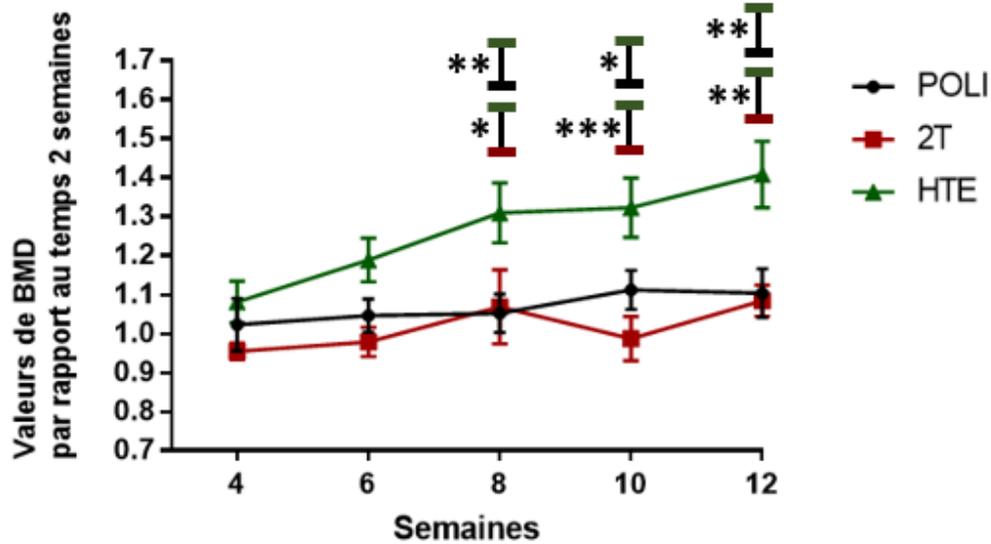


Figure 87 : **Cinétique d'ossification : Densitométrie osseuse.** Evolution de la quantité d'os nouvellement formé au contact de l'implant. La densité osseuse est un paramètre permettant d'associer une notion de densité de l'os analysé en plus d'une quantification volumétrique. Les valeurs de densité osseuse sont présentées par rapport à la valeur à 2 semaines pour chaque individu. Pour chacune des conditions, l'effectif est de : poli : 10 rats ; 2T : 9 rats ; HTE : 11 rats. La p-value a été calculée par test 2way ANOVA, \*\*\* : p-value<0,001 ; \*\* : p-value<0,01 ; \* : p-value<0,05.

### 3. Evaluation visuelle

#### 3.1. Description du score

En soutien aux informations de quantification de l'os nouvellement formé, nous avons procédé à une évaluation visuelle des scans. Chaque scan a été converti en une vidéo et un score a été attribué pour chacune de ces vidéos par 5 évaluateurs, aveugles quant aux conditions expérimentales et temps post-chirurgie. Deux scores ont été établis pour chaque scan. Un premier score a permis d'évaluer la quantité d'os visible dans la zone du défaut (Figure 88 A). Brièvement, le score va de 0 (pas d'ossification) à 4 (os visible sur plus de 90 % de la zone du défaut).

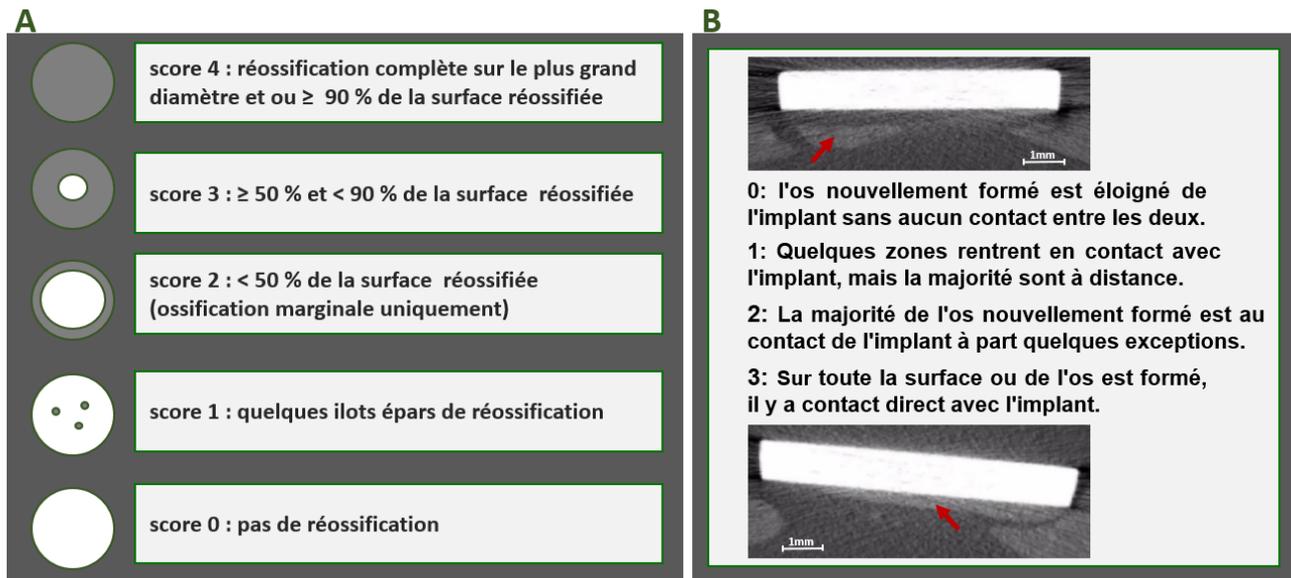


Figure 88 : **description des scores d'évaluation de régénération osseuse.** **A** : Score d'ossification en 5 grades : du score 0 sans os nouvellement formé au sein du défaut au score 4 avec un comblement presque total par de l'os nouvellement formé. **B** : Score de contact avec 4 grades. Ce score établit visuellement une estimation de la proportion d'os nouvellement formé qui est en contact direct avec l'implant. Il est établi pour les rats ayant eu un score d'ossification  $\geq 1$ .

De plus, un score de contact a été effectué (Figure 88 B). Comme cela a été évoqué précédemment, l'utilisation de scan  $\mu\text{Ct}$  en association avec des implants titane crée des artefacts qui peuvent gêner l'analyse des résultats. Parmi les paramètres dont l'analyse peut être compromise par ces signaux de titane, on trouve l'analyse de contact os-implant (BIC). Cette analyse détermine la distance séparant l'os de l'implant et représente un paramètre primordial à l'évaluation de l'ostéointégration d'un implant. En effet, l'analyse du BIC permet d'identifier s'il y a une interposition de tissu fibreux entre l'os nouvellement formé et l'implant. Étant dans l'incapacité de l'évaluer par  $\mu\text{Ct}$ , nous avons établi un score visuel qui puisse nous fournir une information de cette notion de contact. Les scans Figure 88 B vous illustrent à l'aide des flèches rouges les informations visuelles recherchées. Le scan du haut témoigne d'une présence d'os au sein du défaut, cependant cet os n'est pas en contact avec l'implant. Un espace vide est observable entre l'os et l'implant. Une formation osseuse comme celle-ci s'apparente à un score de 0. En comparaison, on peut attribuer un score de 3 lorsque la totalité de l'ossification identifiable se fait au contact de l'implant (Figure 88 B scan du bas).

### 3.2. Score de quantité osseuse

Nos résultats de BV/TV et de BMD sont cohérents avec l'évaluation que l'on peut faire visuellement. En effet, les 5 examinateurs ont conclu sur une ossification plus importante sur scan HTE comparé aux scans 2T et Poli (Figure 89). Les scores sont significativement plus élevés à 6 et 12 semaines. Il semblerait qu'une ossification en faveur de HTE soit visible dès 2 semaines post-chirurgie. A 12 semaines, il a été jugé qu'en moyenne les implants HTE correspondent à un score de  $2,6 \pm 0,9$ . Un score de cet ordre-là correspond à la présence d'os nouvellement formé à la périphérie de l'implant et qui se rapproche du centre. En comparaison, les implants Poli et 2T ont un score moyen de 1,18 et 1,11 respectivement. Cela correspond à la présence de quelques îlots d'os nouvellement formés.

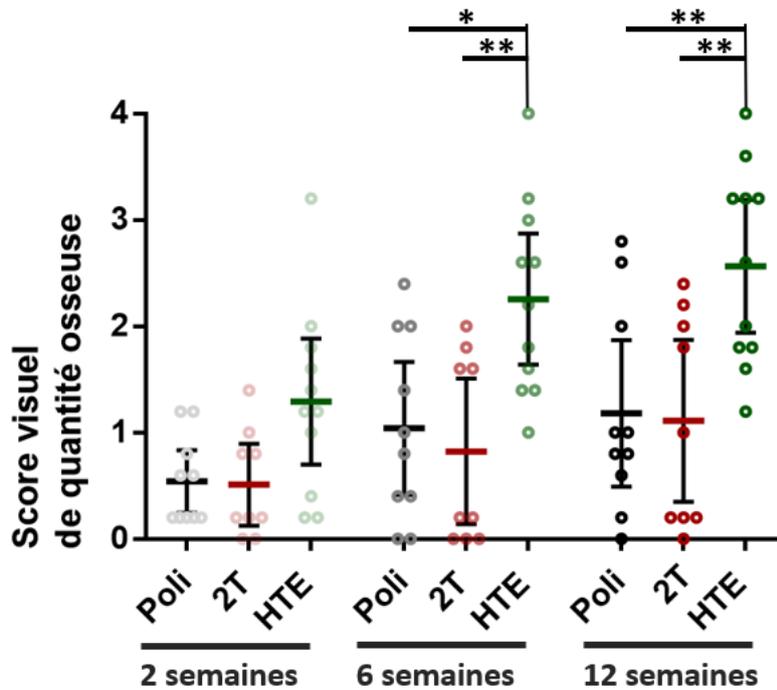


Figure 89 : **Evaluation visuelle de la quantité d'os nouvellement formé selon la topographie à la surface d'implant en titane.** Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SD des scores établis par 5 évaluateurs. La p-value a été calculée par test 2way ANOVA \*\*: p-value<0,01 ; \* : p-value<0,05.

Un des points qui caractérise l'ossification sur 2T est la présence de ce qui semble être des rats non répondeurs. Effectivement, si on comptabilise le nombre de rats qui ne montrent aucune ossification, on observe à 2 semaines 5 rats concernés (Tableau 12). A 12 semaines, 4 rats ne possèdent toujours pas d'ossification visible, ce qui représente presque la moitié des rats 2T (10 rats au total). Cette observation s'applique également à Poli. Néanmoins, elle concerne moins de rats. A 12 semaines, seuls 2 rats implantés avec Poli ne montrent aucune ossification. Par contre, tous les rats implantés avec HTE ont une ossification de leur implant dès 6 semaines *in vivo*.

Tableau 12 : **Nombre de rats pour lesquels un score de 0 a été attribué.** Un score de 0 correspond à une absence d'os nouvellement formé. Un rat est considéré à 0 lorsqu'au moins 4 évaluateurs lui ont attribué un score de 0.

	Nombre de scans sans ossification		
	2 semaines	6 semaines	12 semaines
<b>Poli</b>	5	2	2
<b>2T</b>	5	5	4
<b>HTE</b>	2	0	0

### 3.3. Contact os-implant

Ce score est moins informatif qu'une analyse BIC. Cependant, on est tout de même en capacité d'observer un lien entre l'augmentation d'os nouvellement formé sur HTE est le contact os-implant. Il semblerait que la surface de l'implant HTE augmente la quantité d'os formé directement au contact de la surface (Figure 90). A 12

semaines, on observe 3 rats avec un score de contact de 0 pour Poli et 2T, alors que le groupe HTE n'en possède aucun. Cela nous suggère la présence de plus d'ostéogénèse directement au contact des surfaces HTE.

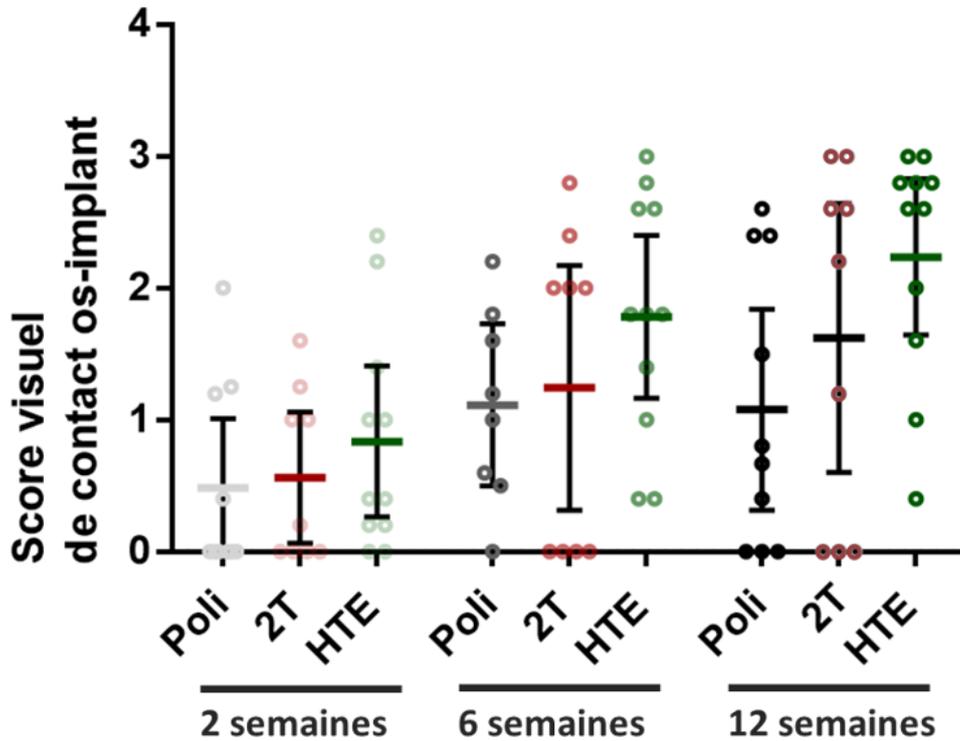


Figure 90 : Evaluation visuelle de la quantité d'os nouvellement formé selon la topographie de surface de l'implant en titane. Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SD des scores établis par 5 évaluateurs.

## 4. Analyse histologique

L'analyse histologique a pour objectif de pouvoir identifier visuellement, en détail, les tissus biologiques. Il est ainsi possible d'analyser par microscopie les tissus au contact de l'implant. Un des intérêts est de pouvoir rechercher la présence de tissu conjonctif qui ne peut pas être imagé par radiographie. Des coupes de la zone du défaut ont été obtenues par microtomie laser après 12 semaines *in vivo*. Ces coupes ont été faites au niveau de la plus grande longueur de l'implant (8 mm), afin de pouvoir visualiser les tissus présents au milieu de l'implant. La présence de tissu osseux sous l'implant a été révélée par une coloration hématoxyline éosine. Ce marquage histologique se caractérise par une coloration de l'os en rose/violet (Figure 91), des noyaux en bleus et du tissu conjonctif en rose.

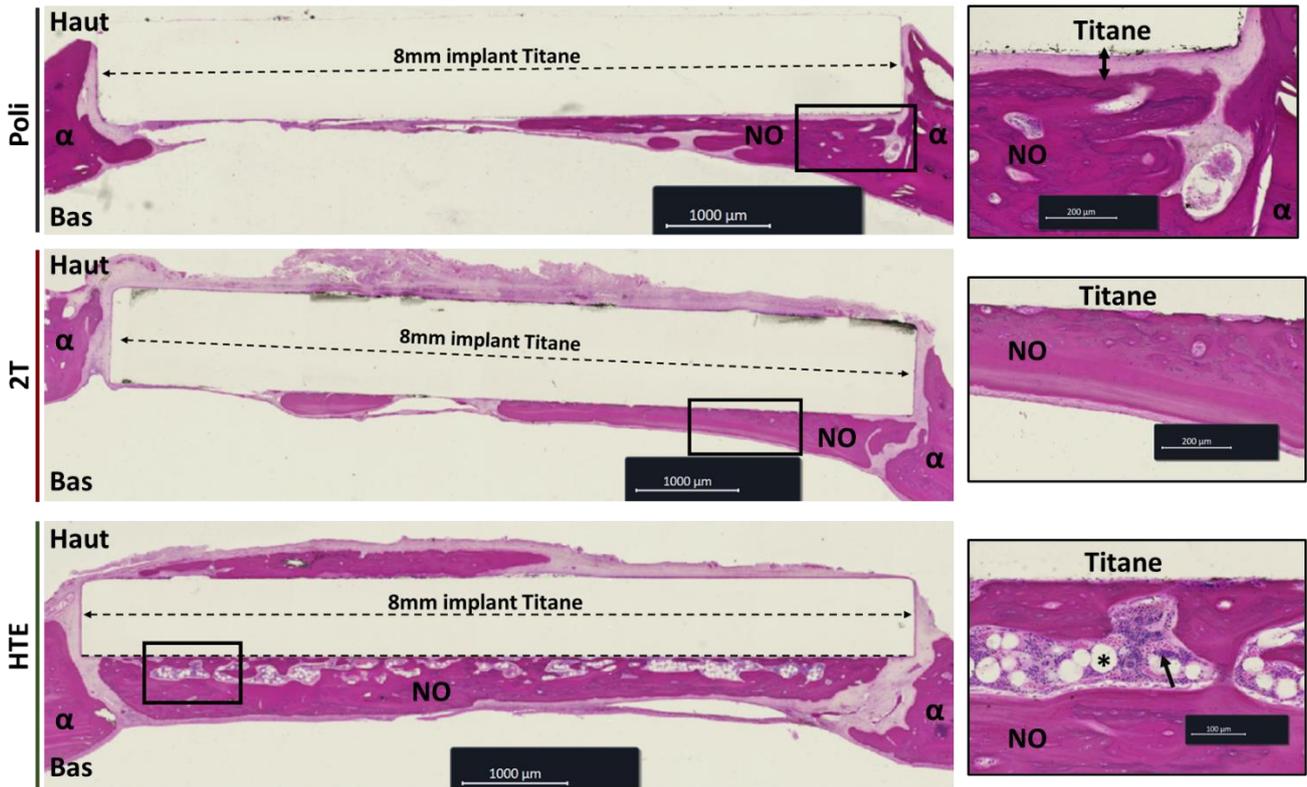


Figure 91 : Coloration à l'hématoxyline éosine des coupes d'implants Poli, 2T et HTE après 12 semaines *in vivo*. De haut en bas, implant Poli, 2T et HTE. Les images représentent l'implant (Titane) au niveau de sa longueur maximale (8 mm) et les tissus sous-jacents. On identifie le défaut créé dans le crâne, présent entre les deux extrémités d'os de l'hôte ( $\alpha$ ). Les encadrés en noir sur la droite correspondent à une zone légèrement agrandie. NO : os nouvellement formé ; \* : Adipocytes ;  $\rightarrow$  : tissu hématopoïétique, caractéristique de la moelle osseuse ;  $\leftrightarrow$  : tissu interposé entre l'os et l'implant.

Les différentes coupes histologiques présentent de l'os nouvellement formé sous les implants en titanes indépendamment de la topographie à la surface de cet implant (NO). On identifie tout de même une différence dans la quantité d'os formé. L'implant HTE montre ainsi de l'os sur l'entièreté de la surface et sur une épaisseur d'environ 400 à 600  $\mu\text{m}$ . Les surfaces en titane Poli et 2T montrent toutes deux une formation osseuse assez comparable en terme de quantité, de l'ordre de 200-300  $\mu\text{m}$ . Cette formation osseuse est partielle à la surface de l'implant, recouvrant moins de la moitié du diamètre de l'implant. On distingue dans le cas de l'implant Poli la présence d'un tissu conjonctif ( $\leftrightarrow$ ) d'environ 50  $\mu\text{m}$  intercalé entre le tissu osseux et l'implant en titane. Un tissu comparable ne se retrouve pas en présence de l'implant 2T et HTE, qui montrent tout deux une proximité importante du tissu osseux formé à la surface de l'implant. A plus fort grossissement, on observe l'organisation de l'os formé à la surface de l'implant HTE avec la présence de moelle osseuse identifié par la présence d'adipocytes (\*) intercalés au sein d'un tissu très cellularisé (bleu/violet) correspondant à un tissu hématopoïétique ( $\rightarrow$ ).

Notre étude du potentiel ostéogénique des topographies 2T (gravure plasma) et HTE (gravure hydrothermale) conclut sur une efficacité *in vivo* des surfaces HTE en comparaison aux surfaces 2T et Poli. En comparant à nos résultats *in vitro*, il semblerait que l'étude de l'ostéogénèse *in vitro* n'est pas représentative du potentiel ostéogénique *in vivo*. Un résumé des principales caractéristiques biologiques observées sur nos surfaces est disponible Figure 92.

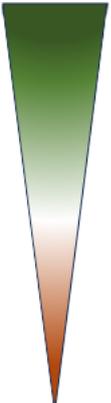
	<b>Paramètres favorables à la différenciation ostéogénique</b>	<b>2T</b>	<b>HTE</b>	<b>Différenciation ostéogénique</b> 
<b>Contact avec le sang</b>	Adsorption de la BSA			
	Fibronectine			
	Coagulation			
<b>Mécanotransduction</b>	Aire			
	Distribution nucléaire de YAP			
<b>Marqueurs de la différenciation ostéogénique</b>	Smad4			
	Runx2			
	Activité de l'ALP			
	Sécrétion de collagène 1			
	Sécrétion d'ostéopontine			
	Minéralisation			
<b>Effet de milieu conditionnés de CSM</b>	Sécrétion de VEGF			
	Migration en Transwell			
	Wound Healing Assay			
	Morphogénèse			
<b>Modèle de défaut critique crânien de rat</b>	BV/TV			
	BMD			
	Score d'ossification			
	Score contact			

Figure 92 : Récapitulatif des principaux résultats de l'étude *in vitro* et *in vivo* de surfaces mécanobactéricides pour la régénération osseuse. Ce tableau résume le comportement de CSM sur 2T et HTE comparé à Poli et vis-à-vis de paramètres décrits dans la littérature comme favorisant la différenciation ostéogénique. La comparaison pour chacun de ces paramètres est effectuée en fonction d'un gradient de couleur, de vert (plus ostéogénique comparé à Poli) à rouge (moins ostéogénique comparé à Poli).

L'ensemble de nos résultats *in vitro* permettent tout de même d'amener des hypothèses justifiant de l'échec de la topographie 2T et du succès de la topographie HTE. Cette étude apporte de nouvelles informations du potentiel de surfaces mécanobactéricides et a permis de comparer l'effet potentiellement ostéoinducteur de topographies obtenues par gravure plasma et par gravure hydrothermale.



# Chapitre IV :

## Discussion



Les traumatismes subit par le corps sont fréquents et le squelette en est la première victime. En outre, avec le vieillissement de la population, les troubles osseux qui affaiblissent l'os, comme l'ostéoporose, sont de plus en plus fréquents. Dans ces situations cliniques, l'insertion d'implants dans le tissu osseux est devenue une pratique courante en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. La demande de matériaux pour réparer les défauts osseux ne cesse de croître<sup>349-351</sup>. Ils sont de composition, de structures et de propriétés différentes et se distinguent par leur capacité à être tolérés par le corps humain. Le succès des implants est généralement limité par un manque d'intégration à l'interface os-implant et par le risque d'infections liées à l'implant. L'interface biologique entre l'implant et le tissu de l'hôte est essentielle dans la détermination des performances du biomatériau. L'ingénierie de surface qui se développe depuis maintenant quelques années a permis d'introduire un éventuel contrôle de l'interface des biomatériaux en vue d'en améliorer le comportement. Dans l'optique de l'amélioration des pratiques chirurgicales de réparation de l'os, il est primordial de rechercher des biomatériaux qui puissent sélectivement favoriser l'intégration de l'implant par les cellules de l'hôte, tout en assurant une protection contre la présence de micro-organismes, ce qui permettrait d'augmenter grandement la sûreté des interventions requérant l'utilisation d'implants destinés à l'os. Bien qu'il existe de nombreuses méthodes, à ce jour aucun consensus n'a été trouvé quant à l'approche la plus prometteuse. Un des paramètres les plus complexes à atteindre est l'obtention de propriétés antibactériennes qui puissent être stables et durables. Dans le but de répondre à ce besoin, une solution consiste à s'aider de caractéristiques topographiques. Au cours de ma thèse, j'ai étudié les propriétés de deux surfaces en titane nanostructurées, qui présentent deux échelles de structuration de surface différentes leur conférant des propriétés mécanobactéricides très prometteuses.

Les topographies 2T et HTE diffèrent principalement par la taille et la forme de leurs nanostructures. La gravure plasma (surface 2T) induit la formation de pics qui provoquent la mort des cellules bactériennes par étirement excessif de la membrane bactérienne. En revanche, le traitement hydrothermal (surface HTE) induit la formation de "nanoarêtes" tranchantes qui induisent la formation de pores dans les bactéries, entraînant la fuite de matériel cytoplasmique et la mort des cellules. Outre cet aspect mécanobactéricide, j'ai étudié l'efficacité potentielle de ces surfaces en terme de régénération osseuse. En particulier, je me suis intéressé au comportement des tissus de l'hôte en contact avec ces surfaces nanostructurées. Les résultats que j'ai obtenus démontrent une meilleure ostéogenèse du titane apportée par la topographie HTE et une inefficacité de la topographie 2T. Ainsi, la surface HTE est multifonctionnelle, puisqu'elle est à la fois antibactérienne et favorise à l'ostéointégration de l'implant.

## **1. Effet de la nanotopographie de surface sur les phases précoces de la régénération osseuse**

Les travaux précédents menés au laboratoire sur ces supports avaient évalué la cytotoxicité potentielle de ces surfaces vis-à-vis des CSM<sup>301</sup>. Les 3 surfaces en titane (Poli, 2T, HTE) ne montraient pas de différences significatives dans la prolifération des CSM sur plusieurs jours. Il nous semblait tout de même important de vérifier le paramètre d'hémolyse. L'hémolyse correspond à la libération d'hémoglobine par des globules rouges endommagés. Ce paramètre apparaît dans la norme ISO 10993-4:2017 en tant qu'essai pour étudier les interactions de dispositifs médicaux avec le sang. C'est un paramètre qu'il est peu probable de faire varier par l'ajout d'une topographie de surface<sup>352</sup>, même si de faibles variations ont été démontrées<sup>353</sup>. Il existe effectivement un doute qui ne peut être écarté pour tous les types de structures (en particulier celles dont la taille se situe entre le nanomètre et le micromètre). Les globules rouges ont une taille de 5-7  $\mu\text{m}$ . Connaissant l'effet

de nos nanostructures 2T et HTE sur des cellules de 1  $\mu\text{m}$  comme les bactéries *Staphylococcus aureus*, il était important de vérifier une éventuelle hématotoxicité. Nos résultats confirment l'absence d'effet sur l'intégrité de la membrane des globules rouges après incubation 2 h à 37°C en contact avec nos surfaces.

La coagulation est le premier évènement qui apparaît à l'interface entre l'implant et les tissus de l'hôte. Le coagulat favorise la création d'une matrice et d'un environnement riche en facteurs de croissance. La coagulation permet la régulation des processus angiogénique, ostéogénique et immunitaire. Elle exerce ainsi un rôle central dans l'ostéointégration future de l'implant. Ce paramètre est rarement étudié dans les phases de développement des implants. Les expériences qui ont été menées sur les surfaces 2T et HTE ne sont pas suffisantes pour caractériser en détail l'action du coagulat. Néanmoins, les informations recueillies vont dans le sens d'une augmentation de la coagulation en présence de nanostructures et nous poussent à croire en un effet potentiellement bénéfique sur l'ostéogénèse.

## 1.1. Capacité de la topographie de surface à moduler l'adsorption protéique

Au moment de l'implantation, l'implant rentre en contact avec le sang. En quelques secondes, une couche de protéines plasmatiques est adsorbée rapidement à la surface de l'implant<sup>130</sup>. L'albumine, le fibrinogène et le facteur XII sont les protéines les plus abondantes du plasma et sont considérées comme déterminantes dans l'interaction entre le sang et l'implant<sup>354</sup>. Nous avons choisi d'utiliser la BSA, car c'est une protéine relativement proche de son homologue humain. La fibronectine a quant à elle été utilisée pour simuler l'adsorption du fibrinogène. En effet, ces deux protéines sont toutes deux fibrillaires et de poids moléculaire élevé (300 et 340 kDa respectivement).

On sait que la topographie de surface ainsi que ses caractéristiques de mouillabilité jouent un rôle essentiel dans l'adsorption des protéines<sup>129</sup>. Notre étude confirme que la topographie est modulatrice des propriétés d'adsorption, et que cette modulation est dépendante de la taille et de la forme des structures<sup>130,133</sup>, mais également de la forme de la protéine<sup>353</sup>. Effectivement, nous avons pu observer une adsorption de l'albumine significativement favorisée par la présence des nanostructures HTE comparée aux surfaces Poli et 2T. A la différence de l'albumine, qui est une protéine globulaire, la fibronectine est une protéine fibrillaire. L'adsorption de la fibronectine est favorisée par la présence de structure à la surface du titane, que ce soit 2T ou HTE.

L'adsorption sur 2T et HTE laisse à penser que la surface accessible pour l'adsorption est plus importante que celle d'une surface lisse comme Poli<sup>51</sup>. Toutefois, la différence de surface disponible entre HTE et 2T est moins apparente. Cependant, malgré la hauteur plus importante des nanostructures en pic sur 2T, la densité élevée des nanostructures HTE pourrait représenter une surface plus importante pour l'adsorption des protéines et notamment de protéine globulaire comme l'albumine (2T :  $6.69 \pm 1.4$  picier/ $\mu\text{m}^2$  ; HTE :  $20 \pm 13$  arêtes/ $\mu\text{m}^2$  <sup>301</sup>)<sup>51</sup>.

Un des paramètres le plus décrit modulant l'adsorption protéique est la mouillabilité. Plusieurs études ont à ce jour montré une absorbance préférentielle sur une surface hydrophobe<sup>354-356</sup>. Sur cet aspect, la topographie 2T possède l'angle de contact à l'eau le plus élevé et HTE le plus faible (Poli:  $60.1 \pm 8.0$ , 2T:  $98.4 \pm 5.8$ , HTE:  $22 \pm 2.2$ ). L'effet observé s'oppose à ce que l'on pourrait attendre en considérant la mouillabilité uniquement. Des observations similaires ont déjà été reportées dans la littérature<sup>353,357</sup>, remettant en doute le postulat de base.

Des surfaces hydrophiles présentant des nanostructures comparables à HTE ont déjà démontré des adsorptions favorables pour la BSA ou la fibronectine<sup>305,358</sup>. En réalité, ces liens entre mouillabilité et adsorption sont assez complexes à déterminer. Ils sont variables selon la rugosité, la forme des structures, mais plus particulièrement des protéines considérées<sup>356,359</sup>.

On peut également questionner la méthode de quantification utilisée. Des contrôles négatifs établis avec des supports en titane sans incubation préalable avec des protéines montraient un bruit de fond assez important. Ce signal était surtout très hétérogène d'une surface à l'autre au sein de la même condition, nous empêchant d'établir un contrôle négatif par condition qui puisse servir pour une normalisation. En outre, les surfaces nanostructurées sont possiblement plus complexes à laver.

Malgré tout, vu les différences liées à l'adsorption de protéines entre Poli, 2T et HTE, cela pourrait avoir un impact sur des phases plus tardives comme la thrombogénèse et l'adhérence cellulaire.

## 1.2. La topographie comme facteur thrombogénique

Si on se replace dans un contexte physiologique, l'adsorption protéique sur l'implant permet une meilleure adhérence des différents facteurs sanguins. Des travaux précédents ont montré que la fibronectine et le fibrinogène présentent des capacités à s'adsorber assez similaires<sup>51</sup>. Suite à nos tests préliminaires *in vitro* sur l'adsorption de la fibronectine (Figure 54), on s'attend à ce que nos surfaces 2T et HTE attirent plus de fibrinogène qu'une surface lisse en titane. Il a été montré qu'une plus grande adsorption de fibronectine et de fibrinogène serait capable d'induire une plus importante adhérence plaquettaire<sup>360</sup> mais peut aussi induire une plus grande activation plaquettaire<sup>133,353,361</sup>. Cette adsorption protéique promeut également la déposition d'une matrice extracellulaire ostéogénique<sup>362</sup>, et notamment la création d'un réseau riche en fibrine à la surface de l'implant<sup>133</sup>. L'augmentation de la coagulation observée sur 2T et HTE pourrait être une conséquence des paramètres d'adsorption protéique. Une perspective d'amélioration consiste à étudier la densité plaquettaire au  $\mu\text{m}^2$  et la morphologie des plaquettes (Annexe 12). En effet, l'étalement plaquettaire est en partie corrélé à leur activation. Lorsqu'on parle d'activation, on sous-entend une action dans la cascade de coagulation, mais aussi dans la sécrétion de facteurs de croissance et de chimiokines dans l'environnement. Le paramètre clé suite à cette modulation de la coagulation serait d'étudier la réponse plaquettaire via l'analyse des sécrétions. Un des facteurs sécrétés par les plaquettes lors de l'initiation de la réparation osseuse est le TGF- $\beta$ . A ce jour, quelques études pointent une certaine corrélation entre la sécrétion de TGF- $\beta$  par les plaquettes et l'ostéogénèse ainsi induite. C'est notamment une des justifications principales à l'injection de plasma riche en plaquettes chez les patients pour aider la régénération osseuse<sup>131,363</sup>.

Étant donné l'importance de ces événements précoces dans l'ostéointégration future de l'implant, l'étude de ces paramètres devrait être intégrée dans les phases de développement de nouveaux biomatériaux pour la reconstruction osseuse. Cela nécessite néanmoins d'optimiser les différentes méthodes pour gagner en standardisation et en capacité de comparaison entre surfaces d'intérêt. Il serait envisageable d'essayer d'encourager l'étude systématique de l'adsorption de deux ou trois protéines ainsi qu'une estimation rapide du pouvoir coagulant d'une surface. Dans tous les cas, ce paramètre a été trop peu considéré dans la caractérisation de surfaces possédant des topographies particulières. Il en découle un certain manque de données permettant de déterminer les différents liens de causalité existant entre adsorption, coagulation et ostéointégration *in vivo*.

Par exemple, dans notre cas, nos données avec les surfaces 2T suggèrent une compatibilité avec la coagulation qui, dans notre modèle *in vivo*, ne se concrétise pas dans une meilleure ostéointégration comparé à la surface Poli. Ce paramètre, aussi essentiel qu'il soit, n'est donc pas suffisant pour assurer une bonne ostéointégration<sup>133,364</sup>.

### 1.3. L'adhérence des CSM sur les topographies 2T et HTE

Lors de la régénération osseuse et suite à la coagulation, les CSM sont rapidement recrutées sur le site de la blessure/fracture. Elles vont donc rentrer en contact avec la surface de l'implant. Or, le comportement des CSM est affecté par la topographie de surface de l'implant. Dans le cas de nos surfaces 2T et HTE, il avait été précédemment montré que même si ces topographies permettent l'adhérence de CSM, elles en modifient toutefois certaines caractéristiques. En réponse à l'adhérence sur les nanostructures, les cellules vont rapidement s'organiser pour se stabiliser sur leur substrat. On l'observe en partie via l'augmentation de l'étalement cellulaire pendant les 48 premières heures suivant l'ensemencement. Morphologiquement parlant, la topographie HTE n'est pas source de modification du comportement des CSM, avec une aire et un aspect ratio identiques à ceux observés sur une surface lisse (Poli). Par contre, les structures en pics micrométriques de la topographie 2T induisent une diminution de l'aire cellulaire dès 48 h et qui perdure après 72 h de culture. Il en va de même pour l'aspect ratio, qui indique des cellules plus allongées sur ces structures. Des observations similaires ont déjà été reportées pour d'autres nanostructures en pic<sup>365</sup>. La flexibilité des CSM les pousserait à changer leur morphologie pour s'adapter à ce relief. Ces paramètres sont généralement considérés comme peu propices à l'ostéogenèse, qui se caractérise habituellement par des cellules étalées avec des filopodes et une forte contraction du cytosquelette au niveau des fibres de stress d'actine. La mise en place de caractéristiques semblables est dépendante de la quantité et de l'état de maturation des adhérences focales<sup>366</sup>.

Il existe donc un lien fort entre adhérences focales, cytosquelette d'actine et aire cellulaire. Dans le cas de nos surfaces 2T et HTE, les précédents travaux du laboratoire nous suggèrent que les modifications morphologiques des CSM sur nanostructures pourraient être liées à la faible quantité de sites d'adhérence disponibles en comparaison à la surface Poli. Cette diminution du nombre de points d'adhérence a également été observée en présence de nanostructures HTE, même si elle est plus modérée qu'avec 2T<sup>301</sup>. Cette réduction du nombre d'adhérences focales suggère une diminution des capacités mécanotransductives des cellules. Ainsi, l'aspect des nanotopographies semblerait déterminant dans le contrôle de ces paramètres. Effectivement, il a été montré que la taille de nanopiliers représente un facteur régulateur de l'aire et de la taille des adhérences focales. Ce qui est particulièrement intéressant est qu'il existe une corrélation entre ces caractéristiques d'aire des cellules / nombre d'adhérences focales, et expression de marqueurs ostéogéniques. Ainsi, entre 20 et 100 nm de hauteur, les piliers induisent une réduction de l'aire des cellules, de la taille des adhérences focales et de l'expression de gènes ostéogéniques<sup>367</sup>. Or, en terme de forme, les surfaces 2T sont assez comparables à des piliers. On peut toutefois se demander si ces informations sont transposables aux surfaces 2T étant donné la différence de taille. En effet, les piliers étudiés sont de l'ordre du nanomètre, là où les pics 2T sont de l'ordre du micromètre. La présence d'une différenciation ostéogénique induite par la surface 2T *in vitro* suggère que les répercussions de topographies en piliers/pics diffèrent selon si on est au nanomètre ou au micromètre<sup>143</sup>.

Les quelques notions de mécanotransduction que nous avons introduites dans notre étude ne nous permettent pas de conclure quant à l'origine de l'ostéoinduction, mais permettent néanmoins de proposer quelques hypothèses.

## **2. Mécanotransduction et ostéoinduction**

### **2.1. La transduction du message induit par les topographies 2T et HTE**

Parmi les nombreux acteurs impliqués dans la traduction de stimuli mécaniques en signaux biochimiques, YAP et TAZ, effecteurs de la voie Hippo, jouent un rôle central dans la transmission de signaux mécaniques extracellulaires jusqu'au noyau. Une solution pour visualiser l'activation de YAP est d'étudier sa distribution cellulaire. On sait, de par la littérature existante sur la mécanotransduction dépendante de YAP, que les surfaces possédant une forte rigidité sont inductrices d'une relocalisation nucléaire de YAP. Cette relocalisation de YAP participerait à la transcription de gènes ostéoblastiques. Cette relocalisation en fonction de la rigidité est dépendante de l'action de ROCK. Toutefois, la topographie est également un paramètre régulateur de la distribution de YAP.

Bien que toutes nos surfaces en titane aient la même rigidité, les nanoarêtes HTE induisent une faible relocalisation nucléaire de YAP quel que soit l'état d'activation de ROCK. En comparaison, les pics 2T montrent une distribution de YAP relativement similaire à la condition lisse Poli. Une hypothèse possible serait qu'il y aurait différentes voies de signalisation indépendantes mises en jeu sur Poli, 2T et HTE. Un des phénomènes décrits dans l'internalisation de YAP en réponse à la rigidité repose sur l'application d'une tension au noyau. Nos résultats de microscopie suggèrent que ce mécanisme intervient en réponse aux surfaces 2T. En effet, le noyau des cellules cultivées sur les surfaces 2T représente une plus grande proportion de la surface cellulaire en comparaison aux CSM cultivées sur les surfaces Poli et HTE. Cela suggère que sur 2T, le noyau est soumis à une plus forte tension du cytosquelette, qui le pousse à s'étirer. Or, il est connu qu'un des mécanismes de régulation de l'internalisation de YAP repose sur le contrôle de l'ouverture des pores nucléaires en réponse à des forces induites par le cytosquelette<sup>368,369</sup> (Figure 93). Il a en effet été montré que la tension appliquée sur le noyau provoque un étirement et une incurvation des pores nucléaires qui se retrouvent plus exposés face au cytoplasme, favorisant ainsi l'import de YAP dans le noyau. Ce mécanisme pourrait être mis en jeu sur 2T puisqu'on a une augmentation de la proportion de l'aire du noyau par rapport à l'aire de la cellule. Ce mécanisme a aussi lieu sur les surfaces Poli et s'observerait par un aspect ratio plus important de Poli comparé à HTE (Annexe 13). Ces résultats seraient en accord avec les résultats obtenus avec l'inhibiteur de ROCK. En effet, cette protéine régule la tension du cytosquelette d'actine. Son inhibition réduit l'import nucléaire sur les surfaces Poli et 2T. Ces observations pourraient expliquer en partie l'action des nanostructures 2T sur l'ostéoinduction des CSM, mais ne sont pas suffisantes. YAP est relocalisée dans le noyau sur 2T mais aussi sur Poli, qui est pourtant la moins ostéoinductrice des trois surfaces en titane. De plus, HTE ne présente pas une augmentation de l'internalisation de YAP comme cela est généralement observé sur les topographies de surface et comme on aurait pu s'y attendre étant donné la rigidité du titane.

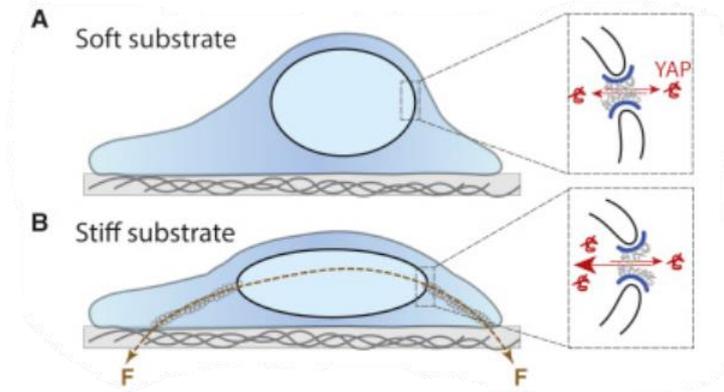


Figure 93 : **Modèle de l'internalisation nucléaire de YAP en réponse à un stimuli mécanique.** **A** : lorsque les cellules sont sur des substrats mous, le noyau n'est pas soumis à des forces. Par conséquent, l'importation et l'exportation de YAP à travers les pores nucléaires sont équilibrées. **B** : en revanche, sur des substrats rigides, des adhérences focales et des fibres de stress se forment, exerçant des forces sur le noyau et le comprimant. Cette déformation étire et courbe les pores nucléaires, les exposant du côté cytoplasmique. Cela entraîne une augmentation de l'importation de YAP.

Ainsi, nos quelques informations quant à la mécanotransduction de HTE suggèrent des mécanismes différents. La recherche d'un régulateur de la signalisation de YAP pouvant justifier la plus faible internalisation de YAP dans le noyau comparé à Poli et 2T, nous ouvre à l'hypothèse de l'autophagie. Ce mécanisme de recyclage cellulaire est de plus en plus étudié dans sa capacité à réguler différentes réponses cellulaires comme la prolifération dépendante de YAP<sup>370</sup>, la migration cellulaire, mais aussi l'ostéogenèse<sup>211,230</sup>. L'autophagie est régulée par des informations mécaniques telles que la rigidité ou les topographies<sup>246</sup>. Cette régulation se ferait par l'intermédiaire d'une communication entre les intégrines, les kinases associées aux intégrines et une signalisation par la voie des MAP kinases (MAPK)<sup>371,372</sup>. Une récente étude a ainsi mis en lumière un mécanisme de différenciation ostéogénique induite par la nanotopographie via une signalisation médiée par l'autophagie de YAP<sup>211</sup>. Selon leur postulat, leur nanotopographie obtenue par gravure chimique du titane promeut l'autophagie de YAP, diminuant ainsi sa localisation nucléaire. Cette autophagie favoriserait la relocalisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine qui serait capable d'induire une ostéogenèse. La similitude avec nos topographies HTE avec celles décrites dans cette étude nous pousse à croire en cette hypothèse permettant d'expliquer l'origine mécanique de l'ostéoinduction dépendante de HTE. De plus, des observations du marquage de YAP en microscopie sur quelques CSM cultivées sur HTE, montrent une localisation de YAP en points distribués autour du noyau, suggérant la possibilité d'une localisation de YAP dans des autophagosomes (Annexe 14).

La littérature sur l'impact des topographies de surface sur la régulation des voies mécanotransduction bénéficie d'une quantité importante de données. Toutefois, ces études sont généralement effectuées sur des surfaces dont les paramètres topographiques sont hautement contrôlés. Les topographies désordonnées créées par gravure pour des applications en implantologie ont fait l'objet de moins d'études sur le lien avec la mécanotransduction. Connaissant l'hétérogénéité des nanostructures obtenues avec les méthodes de fabrication de nos supports en titane 2T et HTE, il est difficile de comparer avec certitude des effets décrits dans la littérature avec ceux que nous avons observés au laboratoire. Ainsi, des observations faites sur une topographie obtenue par gravure chimique ne pourront pas forcément être transposable à une autre gravure chimique développée par un autre laboratoire. Nous sommes tout de même en présence d'hypothèses qui mériteraient d'être analysées expérimentalement.

## 2.2. Initiation de l'osté induction

Malgré nos incertitudes concernant la voie de mécanotransduction mise en jeu, nous sommes tout de même en mesure de montrer une ostéogenèse qui serait initiée par des protéines telles que Runx2 et Smad4. Le rôle de Smad4 dans l'ostéogenèse est peu décrit dans la littérature. Cette protéine est connue pour être un intermédiaire dans la réponse à la signalisation par les BMP et le TGF- $\beta$ . Certaines études commencent à évoquer le rôle de cette protéine dans l'ostéogenèse induite par la mécanotransduction. Il a été constaté qu'une contrainte mécanique appliquée à des ostéoblastes augmentait l'expression de la phosphatase alcaline (ALP) et activait la voie de signalisation BMPs/Smad. L'expression de l'ALP induite par la contrainte mécanique est atténuée par un petit ARN interférant de Smad4. Cette signalisation serait dépendante de l'activation de la MAPK p38 en réponse à un stress mécanique<sup>373-375</sup>. Cependant, la transcription de gènes ostéogéniques n'est pas effectuée par Smad4, mais par le facteur de transcription bien connu : Runx2. Ainsi, Smad4 a un rôle dans l'action ostéogénique de Runx2 suite à la formation d'un complexe avec les Smad 1/5/8. Une étude a montré que dans des MC3T3 (pré-ostéoblastes murins) cultivées sur des nanostructures, une diminution de l'expression de 3 microARN (miR-4448, -4708 and -4773) était responsable d'une atténuation de la dégradation de Smad1 et Smad4<sup>376</sup>. Cela induit une meilleure transduction du signal issu de BMP2 et une meilleure ostéogenèse identifiée par une augmentation de Runx2 et de l'activité de l'ALP<sup>377</sup>. Ces deux protéines ont une responsabilité dans l'osté induction par des micro/nanotopographies<sup>328</sup>. Elles seraient également responsables d'une sensibilisation des CSM à la signalisation BMP2 et TGF- $\beta$  en réponse à des signaux topographiques<sup>378</sup>.

Étant donné les connexions existantes entre la protéine Runx2 et Smad4, on peut chercher à interpréter les deux en parallèle. Cependant, même si ces deux protéines semblent être plus exprimées après 5 jours sur nos nanostructures, le profil d'expression de ces protéines entre 2T et HTE diffère. En effet, à 5 jours de culture des CSM sur les surfaces en titane, la quantité la plus élevée de SMAD4 s'observe sur 2T, alors qu'à ce même temps de culture, HTE est la seule topographie à montrer une augmentation de Runx2 en comparaison à Poli. A 7 jours, aucune différence n'est réellement identifiable entre les surfaces en titane. La protéine Runx2 est pourtant régulatrice d'une différenciation qui s'étale sur plusieurs jours de culture, allant de 14 à 21 jours, voire plus jusqu'à la maturation totale des ostéoblastes. Il est effectivement décrit que Runx2 est inhibitrice de la maturation des ostéoblastes, mais *in vitro* cette phase arrive sur des temps plus longs. Il est ainsi possible d'observer l'expression de Runx2 dans des cellules cultivées à la surface de surface nanostructurées et ce même jusqu'à 14 jours de culture<sup>379</sup>. Néanmoins, le manque d'information quant à la cinétique d'expression de Runx2 ne nous permet pas d'éliminer la possibilité d'une baisse de l'expression à certaines phases précises de la différenciation. Les résultats de RT-qPCR suggèrent une diminution de Runx2 après 7 jours de culture sur les nanostructures 2T et HTE.

Nos résultats suggèrent que Smad4 pourrait représenter un marqueur intéressant de l'osté induction induite par la topographie. Cependant, tout comme pour Runx2, des recherches additionnelles sont nécessaires pour pleinement comprendre leurs implications dans la différenciation.

### 2.3. La phase de minéralisation

La littérature ne fait mention d'aucune priorité dans le choix des marqueurs à analyser pour étudier l'ostéogenèse *in vitro*. On peut tout de même identifier des marqueurs et des méthodes plus efficaces que d'autres. Dans l'une de leurs études, Li et al. montrent 4 fois plus de minéralisation à la surface d'une topographie sur titane, correspondant à un enchevêtrement de nanofils (noté NW-Ti, Figure 34) obtenu par pulvérisation plasma, en comparaison à une surface lisse de titane. Néanmoins, l'analyse d'un ensemble de 8 gènes, dont les fonctions s'étalent sur les différentes phases de la différenciation ostéogénique, n'a montré aucune différence pour 7 de ces gènes<sup>51</sup>. Cela suggère que l'analyse de l'expression génique seule ne serait pas adaptée pour identifier la différenciation ostéogénique. Généralement, les deux méthodes les plus utilisées sont en lien avec la fonction ostéoblastique. Il s'agit de l'analyse de l'activité de l'ALP et de la minéralisation.

La surexpression de Runx2 peut directement stimuler la transcription de gènes impliqués dans l'ostéogenèse comme Col1<sup>30</sup> et ALP<sup>380</sup>. Nos travaux suggèrent que l'augmentation de Runx2 à 5 jours est relativement coordonnée avec la phase de sécrétion de la MEC. Effectivement, nos résultats RT-qPCR vont dans ce sens, puisqu'à 7 jours, sur les surfaces HTE, on observe une légère augmentation de l'expression génique de l'ALP et de Col1. De façon intéressante, et même si aucune différence significative n'a pu être obtenue entre 2T et HTE, il semble que ces deux topographies induisent une différenciation ostéogénique des CSM différente. Là où les surfaces 2T montrent un effet favorable sur l'activité de l'ALP et l'ostéopontine, les surfaces HTE quant à elles semblent plus propices à la sécrétion de collagène et à la minéralisation.

Même si plusieurs travaux ont montré que la surexpression de l'ALP ou la minéralisation indiquent un effet ostéoinducteur, aucun de ces marqueurs ne permet de prédire l'efficacité de la surface *in vivo*. Notre étude permet de le confirmer. L'apparente ostéoinduction traduite par l'augmentation significative de Smad4 et de l'ALP, ainsi que la minéralisation de la matrice en réponse à nos surfaces 2T, ne s'est effectivement pas traduite par une ossification à la surface des implants *in vivo*. Ce type de résultat a déjà été observé, notamment à la surface de nanotubes de titane de diamètres différents (5 ou 20 nm)<sup>381</sup>. L'augmentation *in vitro* de l'ostéogenèse sur nanotubes de 20 nm n'a pas atteint *in vivo* le niveau d'ossification attendu. L'ensemble de ces informations pointent vers la présence d'autres facteurs justifiant ces résultats *in vivo*, que ce soit comme on vient de le voir pour 2T, mais également pour HTE dont les résultats *in vivo* sont à l'inverse étonnamment prometteurs comparés à ce qu'il nous a été possible de mettre en évidence *in vitro*.

Ainsi, les données d'ostéogenèse récoltées illustrent un point en particulier: le suivi des marqueurs classiques de l'ostéogenèse dans ce format *in vitro* n'est pas le plus représentatif d'une ostéointégration future. Ce n'est pas une chose rare d'identifier des études *in vitro* comparables à la nôtre, qui peinent à mettre en avant des différences là où l'efficacité de l'implant est significativement visible *in vivo*.

L'étude de l'ostéogenèse est rendue difficile par le manque de reproductibilité des expériences, notamment d'expériences clés comme la mesure de l'activité de l'ALP ou le dosage de l'alizarine red pour la quantification de la minéralisation<sup>143,382</sup>. Ce manque de reproductibilité est inhérent aux CSM, qui sont des cellules souches avec des phénotypes et des comportements assez variables. De plus, dans notre cas, nous avons suivi ces paramètres au cours d'une cinétique de différenciation; l'échelle de temps est donc très importante. Effectivement, l'expression de la protéine Runx2 peut être totalement différente et avoir une autre signification à

5 ou 10 jours. Enfin, nous travaillons sur des supports en titane avec une surface qui s'altère après plusieurs utilisations. La majorité des analyses d'ostéogénèse nécessitent l'utilisation d'une importante quantité de supports pour obtenir suffisamment de matériel biologique. Par exemple, pour effectuer un western blot avec 20 µg de protéines déposées, il est nécessaire de mettre en culture entre 4 à 6 supports d'une même condition qui seront regroupés et lysés ensemble. Étant limité dans la quantité de supports neufs auxquels nous avons accès, il a été nécessaire de réutiliser les supports. Or, la surutilisation endommage les surfaces comme cela est visible sur 2T (Annexe 15). Il est cependant difficile d'établir à partir de quel moment la surface est usée et qu'elles en seront les répercussions biologiques. Nous avons tout de même été rigoureux sur l'état visuel des supports pour mieux contrôler les variabilités des conditions expérimentales. De plus, les expériences *in vivo* ont été réalisées avec des supports neufs.

Un autre point qu'il est important de mentionner est dans la difficulté de se comparer à d'autres études dans la littérature. La moindre modification des paramètres de traitement de la surface peut induire des changements profonds dans les capacités ostéogéniques qu'elle induit. De plus, les conditions expérimentales diffèrent. La majorité des études étudie le pouvoir ostéogénique en se plaçant préalablement dans un environnement très ostéogénique, en cultivant des CSM ou des MC3T3 (pré-ostéoblastes) dans un milieu de différenciation. On peut se demander si cet environnement très ostéogénique ne pourrait pas changer l'effet des nanotopographies. Une chose est sûre, les valeurs observées pour les différents marqueurs dans ces études sont plus élevées que celles que nous avons obtenues en utilisant juste un milieu d'entretien des CSM, contenant seulement 2% de SVF. Une des raisons est qu'il est plus facile de voir des modulations lorsqu'on est déjà dans un cadre activateur de la différenciation. Par exemple, en immunologie, lorsqu'on étudie l'activation des cellules immunitaires, on les stimule au préalable avec des lipopolysaccharides (LPS) avant d'évaluer les propriétés induites par les conditions expérimentales.

Nous sommes de l'avis que l'utilisation de milieux de différenciation peut potentiellement représenter un paramètre interférant avec l'identification de certains marqueurs précoces de la différenciation induite mécaniquement. Toutefois, aucune des deux situations n'est idéale et ne simule réellement l'environnement des CSM dans les premiers jours suite à l'implantation. Le milieu de différenciation utilise des concentrations non physiologiques de molécules ostéoinductrices ( $\beta$ -glycérophosphate, dexaméthasone et vitamine C). Dans notre cas, nous sommes en absence totale de molécules ostéoinductrices. En réalité, les cellules pré-ostéoblastiques ou CSM qui rentrent en contact avec l'implant baignent dans un environnement riche en facteurs variés. Elles se retrouvent en présence de molécules ostéoinductrices comme le TGF- $\beta$  sécrété par les plaquettes ou BMP2, libérée par les macrophages ou les cellules endothéliales. Il nous est impossible de reproduire avec fiabilité cet environnement dans des conditions *in vitro*. Certains modèles cellulaires se développent et s'en rapprochent de plus en plus. Ils reposent sur des cocultures, avec également la possibilité de simuler la formation du coagulat pour former un meilleur environnement moléculaire<sup>133</sup>.

### 3. Amélioration des modèles *in vitro* : vers une meilleure prise en compte des communications intercellulaires

Depuis quelques années, il est plus fréquent d'étudier des implants dans un contexte cellulaire plus complexe. En particulier, il est maintenant admis que peu importe le type d'implant utilisé, il aura un impact à la fois sur les CSM mais également sur les plaquettes, les cellules immunitaires et les cellules endothéliales. Ces types cellulaires que l'on a pu considérer secondaires dans l'ostéointégration, s'avèrent être finalement des acteurs clés que l'on ne peut plus négliger. Il est ainsi fréquent de diriger la preuve de concept d'un implant à la fois sur son potentiel ostéoinducteur sur CSM seules, mais également en association avec des cellules immunitaires ou des cellules endothéliales. Intégrer l'étude de cet environnement dans le développement de nouveaux implants apparaît maintenant essentielle et apporte de nouvelles perspectives pour trouver des synergies entre tous ces types cellulaires vers l'objectif commun de créer du tissu osseux fonctionnel.

Ainsi, il existe tout un réseau de communications intercellulaires qui intervient à la suite d'un défaut osseux. Plusieurs études ont montré que le VEGF endogène et l'administration de VEGF exogène amélioraient la formation et la cicatrisation osseuse en améliorant l'angiogenèse<sup>68</sup>. Une des premières preuves a été apportée par Street et al., qui ont transplanté un hématome de fracture en sous cutané dans un modèle murin. Suite à la résorption de l'hématome, ils ont pu observer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Pour expliquer ce phénomène, leur attention s'est portée sur le VEGF. Il était 15 fois plus concentré dans l'hématome, que dans le plasma<sup>383</sup>. Ils ont ainsi pu conclure que l'effet angiogénique observé est médié par les concentrations importantes de ce facteur de croissance dans l'endothélium vasculaire de l'hématome. Les CSM sont capables de sécréter du VEGF et, comme l'indique nos résultats, cette sécrétion est modulable en fonction des informations topographiques perçues par les CSM. Ainsi, que ce soit sur 2T, mais surtout sur HTE, la sécrétion de VEGF par les CSM est augmentée par rapport à la surface Poli. En outre, il a été signalé qu'une topographie en maille augmente la sécrétion de VEGF des CSM via l'activation de FAK (kinase clé des adhérences focales) et de la voie de signalisation Akt en aval. L'implication de FAK a été confirmée par l'utilisation d'un inhibiteur de FAK<sup>331,333</sup>.

Le VEGF agit essentiellement sur les cellules endothéliales, en régulant entre autres leur prolifération et leur migration. En réponse aux milieux conditionnés provenant de CSM cultivées sur nos supports HTE, les cellules endothéliales Huvec voient leurs capacités de migration (à travers une membrane) et d'organisation en tubes dans du matrigel (angiogenèse *in vitro*) significativement augmentées par rapport au support Poli. Ces paramètres sont généralement liés et sont indicatifs du niveau d'angiogenèse<sup>137</sup>. Le VEGF est le facteur de croissance le plus décrit dans le potentiel angiogénique des CSM. Effectivement, suite à sa fixation au VEGFR, il permet d'augmenter la synthèse d'oxyde d'azote (NO) dans les Huvec<sup>137,384</sup>. Le NO est connu comme déterminant pour permettre la fonctionnalité des cellules endothéliales. De plus, il a été montré que l'inhibition du récepteur au VEGF abolit l'effet paracrine des CSM<sup>66</sup>. Les profils d'augmentation de l'angiogenèse sur les trois paramètres que l'on a étudiés sont similaires au profil de sécrétion du VEGF. En effet, on a une augmentation significative de la sécrétion de VEGF sur HTE par rapport à Poli. D'ailleurs, dans le cas des supports 2T où l'on n'observe pas de différence significative dans la sécrétion de VEGF par rapport à Poli, on ne note pas non plus d'effet stimulant sur l'angiogenèse. On peut donc penser qu'il existe un lien direct entre la présence de nanostructures à la surface de nos supports et le comportement des Huvec. Ce lien serait garant d'une vascularisation du défaut *in vivo*.

Les données de la littérature démontrent que cette communication ne s'arrête pas là. Effectivement, la modélisation en coculture, avec<sup>244</sup> ou sans contact cellulaire<sup>66</sup>, a permis de mettre en évidence une réponse pro-ostéogénique des Huvec en réponse à la stimulation angiogénique par les CSM. Ainsi, l'étude de Chen et al., montre une augmentation d'un facteur 2 de l'expression d'ALP si des Huvec sont en culture avec des CSM sur des surfaces nanostructurées. Cet effet s'explique par la sécrétion de BMP2<sup>66</sup>, de FGF<sup>137</sup> et possiblement de TGF- $\beta$ 1<sup>139</sup> par les Huvec en réponse à une stimulation au VEGF (Intro II.1.2.). Cette réponse crée une synergie où l'ostéoinduction des CSM promeut la sécrétion de VEGF qui stimulera l'accumulation de BMP2 et ainsi l'ostéogenèse<sup>244</sup>.

L'étude de l'impact direct ou indirect des topographies 2T et HTE sur l'immunité, et notamment sur les macrophages, est une partie essentielle qui manque malheureusement dans notre évaluation *in vitro*. En effet, l'analyse du rôle de l'immunité, et plus précisément de l'ostéoimmunomodulation, s'impose de plus en plus ces dernières années (Annexe 16). Trois raisons justifient de l'intérêt d'évaluer l'impact des implants sur les cellules immunitaires. Dans un premier temps, les concepts de communication intercellulaires avec les CSM, présentés précédemment avec les cellules endothéliales, s'appliquent également aux macrophages. De plus, les macrophages sont sensibles aux informations mécaniques de la topographie de surface, suggérant un rôle de la topographie dans la régulation de leur comportement. Enfin, les macrophages ont le pouvoir d'empêcher l'ostéointégration dans le cas d'une promotion d'un phénotype pro-inflammatoire M1 (Introduction IV 4.2).

Une fois que le processus est lancé et que les molécules nécessaires sont sécrétées, les différents types cellulaires fonctionnent en synergie dans la promotion de la réparation osseuse. La coculture de CSM et de macrophages augmente l'expression de marqueurs de la différenciation ostéogénique<sup>385</sup>. Dans l'étude de Li et al. présentée précédemment (Partie 2.3), l'étude de CSM seules sur nanofils de titane induisait une ostéogenèse, mais ils étaient dans l'incapacité d'observer une augmentation de l'expression génique de marqueurs de l'ostéogenèse. Dans la suite de leur étude, ils ont cocultivés les CSM avec des macrophages et ce format expérimental induisait une augmentation pour 7 des 8 gènes ostéogéniques étudiés, avec en moyenne un facteur 3 pour la topographie étudiée comparé à la surface polie<sup>51</sup>. Cet effet ostéogène semble en partie dépendant de la présence de BMP2, comme cela a pu être mis en évidence via l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-BMP2<sup>385</sup>. Au cours de la phase inflammatoire précoce, les macrophages piégés dans le tissu de fibrine libèrent des molécules qui favorisent la différenciation et la prolifération de CSM et des ostéoblastes<sup>85</sup>. L'expression de l'ALP augmente dans des CSM cultivées dans un milieu conditionné de macrophages murin. Cette induction est bloquée si l'on ajoute un anticorps anti-BMP-2 ou anti-TGF- $\beta$ 1, démontrant le rôle crucial de ces deux facteurs de croissance dans la communication des macrophages avec les CSM<sup>386</sup>. De plus, d'après le rôle de Runx2 et de Smad4 dans la signalisation de BMP2 et du TGF- $\beta$ , les informations topographiques pourraient jouer un rôle médiateur de la sensibilisation des CSM à leur environnement en facteurs de croissance ostéoinductifs.

Contrairement aux cellules endothéliales, qui sont rarement amenées à rentrer en contact avec l'implant, les macrophages adhèrent à l'implant pendant la phase inflammatoire initiale. Similairement aux CSM, ils sont sensibles aux informations mécaniques issues de la topographie de surface<sup>387</sup>. Différents comportements des macrophages peuvent être induits selon la topographie. Par exemple, l'étude de réseaux de nanopoints (« nanodots » dans l'article) plus ou moins espacés a permis d'introduire des pistes quant aux liens entre topographie et profil inflammatoire. Des nanopoints trop espacés (100-200 nm) compromettent l'organisation du cytosquelette des macrophages, ce qui se traduit par l'expression de gènes pro-inflammatoires<sup>245</sup>. L'étude de Ma

et al. va plus loin dans ces observations. Ils comparent deux surfaces en titane possédant des nanotubes de 5 nm (NT5) ou 20 nm (NT20) de diamètre. Ces deux surfaces induisent *in vitro* une différenciation des CSM, avec une légère tendance en faveur de NT20. Les nanotubes de 5 nm stimulent la sécrétion de TGF- $\beta$  et d'IL-10 (anti-inflammatoires) par les macrophages, augmentant ainsi l'ostéogenèse *in vivo*. Les NT20, pour leur part, augmentent la sécrétion en cytokines pro inflammatoires (IL-6 et IL-1  $\beta$ ), ce qui se traduit par un faible contact os-implant *in vivo* en comparaison au contrôle lisse et à NT5<sup>381</sup>. En effet, un problème courant à l'interface os-implant est la formation de tissu fibreux, causée par la réponse inflammatoire qui affecte l'ostéointégration de l'implant.

L'ensemble de ces informations encourage à l'utilisation de modèles *in vitro* intégrant plusieurs acteurs cellulaires et si possible l'évaluation de l'effet pro/anti-inflammatoire des nanostructures étudiées. Les résultats obtenus *in vivo* avec nos implants HTE suggèrent que ces surfaces sont adéquates à l'établissement du processus de réparation osseuse. On ne peut toutefois pas affirmer la promotion d'un phénotype M2 des macrophages sans expériences complémentaires. A l'inverse, nos données suggèrent la promotion d'un cadre pro-inflammatoire induit par les surfaces 2T. Effectivement, les pics sur 2T sont en moyenne espacés de 1,7  $\mu\text{m}$  contre 100 nm entre les arêtes pour HTE<sup>301</sup>. Cet espacement est certainement responsable d'une mécanotransduction favorable au phénotype M1. De plus, il avait préalablement été observé que la surface 2T induit une sénescence des CSM<sup>301</sup>. La sénescence des CSM est connue pour être pro-inflammatoire<sup>388,389</sup>.

## 4. Evaluation de l'ostéointégration d'implants en titane nanostructurés

Une étude *in vivo* de la compatibilité de nos surfaces pour des applications en lien avec l'os était donc nécessaire pour compléter nos observations faites à partir de nos modèles *in vitro*.

Aborder la transition de l'*in vitro* à l'*in vivo* pose la question essentielle du choix du modèle animal. Les modèles animaux sont la pierre angulaire du développement technologique. C'est un défi qui permet de confronter les technologies à un environnement systémique complexe. Avoir à sa disposition un modèle faisant preuve de reproductibilité, partageant une forte analogie avec les conditions cliniques visées et offrant le minimum de risque procédural et péri procédural pour l'animal, sont des conditions essentielles pour assurer la robustesse et la fiabilité d'une étude préclinique. Dans le cas de la reconstruction osseuse, de multiples modèles existent et sont envisageables. Ces modèles impliquent la création d'un défaut osseux de taille critique permettant de rassembler les conditions nécessaires à la réparation tissulaire. Ils permettent ensuite l'étude de la régénération osseuse mais aussi de l'ostéointégration.

Le terme d'ostéointégration a été introduit en 1950 par Branemark<sup>170</sup>. Il décrit l'attachement direct du tissu osseux à un biomatériau inerte, sans interposition de tissu conjonctif. Un problème courant à l'interface os-implant est en effet la formation de tissu fibreux, causée par une réponse inflammatoire, qui peut affecter l'ostéointégration de l'implant. L'ostéointégration est garante d'un maintien de l'implant dans le temps et est une condition pour prévenir les descellements aseptiques. Bien que ce concept ait été décrit et soit majoritairement utilisé pour parler d'implants dentaires, il s'applique en réalité aux différents types d'implants osseux. L'ostéointégration met en jeu une cascade de mécanismes physiologiques similaires à la cicatrisation osseuse. Initialement, une coagulation conduit à la polymérisation d'une matrice de fibrine servant à la néoangiogenèse, à l'invasion de cellules

immunitaires et osseuses et enfin au dépôt d'une matrice osseuse. Dans le cadre d'expériences *in vivo*, on peut décrire deux types de formation osseuse<sup>390</sup> (Figure 94) :

- **L'ostéogenèse à distance** : apposition de nouvel os à partir du tissu osseux de l'hôte, c'est-à-dire à partir des bords du défaut. L'os se forme en direction de l'implant.
- **L'ostéogenèse de contact** : les cellules ostéogéniques migrent directement sur la surface de l'implant et forment un tissu osseux au contact de l'implant.

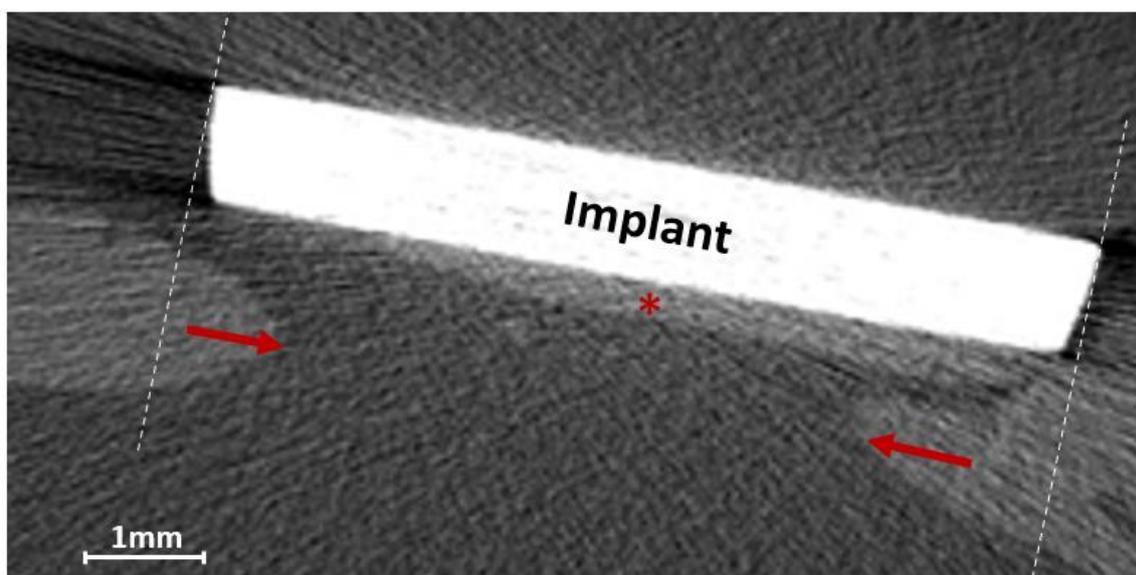


Figure 94 : **Illustration des deux types d'ostéogenèse mises en jeu lors de l'ostéointégration d'un implant.** Illustration de l'ostéogenèse à distance (flèches rouges) et de l'ostéogenèse de contact (étoile rouge). L'os correspond au signal gris clair. Une image de scan d'un des rats implantés avec un support HTE est utilisée pour illustrer ces principes. Les pointillés blancs délimitent le défaut osseux d'origine.

Généralement, les deux types d'ostéogenèse interviennent dans l'ostéointégration d'un implant, même si l'ostéogenèse directe est plus parlante quant à la capacité ostéogénique de la surface. Le paramètre clé recherché dans un modèle *in vivo* est la quantité d'os nouvellement formé, ainsi qu'une notion de contact os-implant (BIC, pour bone implant contact) garant de la stabilité de l'implant dans le temps. L'étude de ces paramètres est obtenue par une combinaison de méthodes radiographiques et d'analyses histologiques.

Nos implants en titane nanostructurés ont été étudiés dans un modèle de défaut crânien du rat comme cela a été introduit précédemment (Résultats III.1.1.). Brièvement, ce modèle consiste en la création d'un défaut circulaire dans le crâne de rat. Les défauts sont de taille critique, c'est-à-dire que la cicatrisation osseuse physiologique est incapable à elle seule de refermer le défaut. Les défauts créés dans cette étude étaient de 8 mm et nos contrôles négatifs avec le défaut laissé vide ont effectivement montré une absence de formation osseuse (Annexe 11).

Contrairement aux analyses histologiques, qui nécessitent l'euthanasie de l'animal, l'imagerie par  $\mu$ Ct présente l'intérêt de pouvoir être effectuée *in vivo*. Il est ainsi possible d'acquérir des données de haute résolution sur une étude longitudinale. Cela présente l'avantage de pouvoir réduire le nombre d'animaux inclus dans l'étude. Nos résultats ont été obtenus sur 10 rats pour Poli, 9 rats pour 2T et 11 rats pour HTE.

En réalité, ce protocole de suivi est assez rare et les articles de la littérature sur ce modèle *in vivo* procèdent généralement à des analyses  $\mu\text{Ct}$  post mortem<sup>156,391,392</sup>. Cela conduit à ce que la majorité de ces études se retrouvent avec un effectif compris entre 3 et 5 rats disponibles à chaque temps pour chacune des conditions. Le choix d'un suivi sur animaux vivants nous a permis d'avoir des effectifs beaucoup plus élevés à chacun de nos temps d'évaluation. Cela conduit à pouvoir mettre en évidence une augmentation significative du volume d'os nouvellement formé avec un implant HTE en comparaison aux implants 2T et Poli, et cela, sur 3 des 6 temps évalués. Ce même résultat est obtenu si l'on regarde la densité minérale de l'os nouvellement formé et a aussi été confirmé visuellement à l'aide d'un score établi aux temps 6 et 12 semaines. Ce score d'ossification (Figure 88) est présenté de telle manière que chaque point représente le score moyen de régénération osseuse pour un même rat, établi par 5 évaluateurs différents. Cette figure nous permet d'observer la présence de rats plus ou moins répondeurs. Que ce soit pour Poli ou 2T, il y a en général peu d'ossification visible à la surface de l'implant. Toutefois, on peut voir une variabilité dans les réponses avec 3 à 4 rats ayant formé plus d'os. Cette observation renforce l'intérêt de l'analyse  $\mu\text{Ct}$  *in vivo* pour augmenter l'effectif. En effet, avec un effectif plus faible de l'ordre de 4-5 rats par condition, il y aurait eu un risque de ne pas pouvoir confirmer statistiquement l'amélioration de l'ostéogénèse sur HTE.

Au final, cette méthode d'acquisition  $\mu\text{Ct}$  *in vivo* permettant une analyse cinétique pour chaque rat de ces 3 paramètres (volume osseux, densité minérale, score d'ossification), donne des résultats fiables pour attester de l'effet favorable sur l'ostéogénèse des nanostructures HTE. En comparaison, aucune différence significative n'est induite par les implants 2T en comparaison des Poli pour chacun de ces trois critères d'évaluation. Ces données ont pu être corroborées par les coupes histologiques effectuées. On observe rapidement une nette amélioration de la formation osseuse en présence de l'implant HTE en comparaison à Poli et 2T. De plus, ces images suggèrent la mise en place d'une ostéogénèse au contact de l'implant HTE. L'ostéogénèse au contact semblerait également prendre place en contact avec l'implant Poli et 2T, mais de plus faible ampleur. On identifie également la mise en place d'une ostéogénèse à distance, particulièrement avec l'implant Poli, mais qui semble moins propice pour contribuer à l'ostéointégration de l'implant.

L'augmentation de la formation osseuse avec les implants HTE s'est également traduite par une augmentation du contact os-implant. Le score de contact nous indique que dès 6 semaines post chirurgie, de l'os est formé à la surface de tous les implants HTE. L'analyse histologique d'un implant 2T et HTE montre la formation d'un tissu osseux au contact direct de l'implant. L'implant Poli montre quant à lui la présence d'un tissu fibreux intercalé entre l'implant et le tissu osseux en formation. La présence de tissu comparable peut représenter un facteur de risque et d'instabilité de l'implant. On peut émettre l'hypothèse que ce tissu puisse être le résultat d'une inflammation trop importante à la surface de cet implant Poli, diminuant l'ostéogénèse. La coupe histologique 2T ne montre pas de tissu comparable. Toutefois, à la vue des résultats de  $\mu\text{Ct}$  similaires entre 2T et Poli, on ne peut pas exclure qu'une situation comparable a pu survenir sur d'autres implants 2T n'ayant pas fait l'objet de coupes histologiques. Les rats 2T et Poli considérés comme non-répondeurs pourraient correspondre à la survenue d'une inflammation pendant le processus de formation osseuse.

Généralement, l'analyse du contact os / implant est effectuée par quantification du BIC sur scan  $\mu\text{Ct}$ <sup>393</sup>. Ce critère n'a malheureusement pas pu être intégré dans notre étude. En effet, le titane absorbe les rayons X et dégage un bruit de fond très important. A l'origine, le scan d'un implant titane génère des artefacts qui irradient jusqu'à 48 $\mu\text{m}$  de l'implant avec nos paramètres de résolution<sup>394</sup>. L'acquisition  $\mu\text{Ct}$  *in vivo*, malgré ses avantages<sup>345,346</sup>, est

également associée à plus d'artéfacts du titane, provenant en partie des mouvements associés à la respiration du rat. Nous avons donc placé notre zone d'intérêt analysée à une distance de 150  $\mu\text{m}$  de l'implant. Cette distance nous fait perdre de l'information, mais nous semble adaptée pour limiter les biais amenés par les artéfacts dus au titane. Malgré ces précautions, nos résultats de BMD (densité osseuse) et de BV/TV (volume osseux) sont tout de même contaminés par du signal du titane. Ce signal pouvait être très variable selon les acquisitions. Une étape de normalisation a permis de l'éliminer en partie, mais pas totalement. Un problème associé à cela est l'impossibilité de comparer l'efficacité de nos implants à des alternatives dans la littérature. Il aurait donc été intéressant d'inclure un contrôle positif à notre étude *in vivo*, qui pourrait correspondre à une greffe autologue. Il serait aussi envisageable de comparer l'efficacité de nos surfaces HTE par rapport à des implants en titane disponibles dans le commerce, tels que le sablage avec gravure à l'acide (SLA)<sup>395</sup>.

Notre étude nous permet aussi de conclure sur la reproductibilité et la fiabilité du modèle de défaut crânien du rat. D'un point de vue expérimentation animale, trois rats sont morts sur l'ensemble des rats inclus dans l'étude. Parmi eux, deux rats ont servi à la prise en main du geste chirurgical. En effet, des prétests avaient été effectués au préalable, car ce modèle animal était utilisé pour la première fois au sein de l'équipe par le Pr. Bettega. Malgré la relative simplicité et sûreté du modèle, il était tout de même nécessaire de calibrer au mieux le geste. Ces deux rats sont morts à la suite d'une hémorragie à priori liée à des dommages induits à la dure-mère. Une fois le geste bien établi sur les prétests, aucun rat n'est mort par la suite d'une cause associée à la chirurgie. Le troisième rat est mort à cause d'une dose prolongée d'isoflurane pendant un dysfonctionnement du scanner. En addition à cela, on a pu observer trois cas de déplacement d'implants post chirurgie. Les implants se sont légèrement décalés, ne recouvrant plus la totalité du défaut. Cela témoigne d'un faible risque de variabilité des paramètres expérimentaux qui est associé à l'absence de fixation. Au final, l'absence de complication pour les 30 rats inclus dans l'étude est un argument fort en faveur de ce modèle.

Ce modèle s'est ainsi avéré très adapté pour démontrer l'efficacité de nos implants, notamment via l'utilisation de la  $\mu\text{Ct}$ . La  $\mu\text{Ct}$  est à prioriser dans des études comparables, d'une part, pour l'ensemble des informations qu'elle est capable d'apporter et, d'autre part car l'évaluation clinique de la formation osseuse est basée sur la  $\mu\text{Ct}$ . Il est donc fortement recommandé de l'inclure dans les études précliniques<sup>345</sup>.

## 5. Perspectives

Le succès des implants en applications orthopédiques, dentaires ou maxillo-faciales est généralement limité par un manque d'intégration à l'interface os-implant et par le risque d'infections liées à l'implant. L'interface biologique entre l'implant et le tissu de l'hôte est essentielle dans la détermination des performances du biomatériau. L'ingénierie de surface qui se développe depuis maintenant quelques années a permis d'introduire la possibilité d'un meilleur contrôle de l'interface des biomatériaux avec les tissus en vue d'en améliorer leur efficacité. De plus, la création de nanostructures à la surface des implants peut leur conférer des propriétés bactéricides. La possibilité de combiner un effet bactéricide à une meilleure ostéointégration permettrait d'augmenter grandement la sûreté des interventions requérant l'utilisation d'implants destinés à l'os.

Concernant les perspectives d'amélioration de nos surfaces 2T, celles-ci sont très réduites. La gravure plasma de titane par GIR (gravure ionique réactive) a été développée à l'origine pour créer des nanostructures ayant un effet bactéricide. Peu d'études ont à ce jour étudié le potentiel de telles surfaces vis-à-vis de cellules humaines. Toutefois, la compréhension que l'on a acquise sur l'effet mécanobactéricide de ces surfaces nous indique une dépendance de celui-ci à la taille, l'espacement et l'aspect ratio élevé de ces nanostructures<sup>143,396</sup>. Ces mêmes paramètres semblent en partie être ceux responsables de la non-traduction de l'ostéogenèse *in vitro* en ostéogenèse *in vivo*. La recherche sur l'ostéomodulation pourra à terme apporter les connaissances nécessaires pour conclure sur cette hypothèse. Cependant, il est difficile de généraliser nos résultats à l'ensemble des nanostructures obtenues par gravure plasma.

Les surfaces HTE ont un effet bactéricide différent. Les nanoarêtes présentes à la surface sont semblables à des lames et leur action dépend principalement de l'épaisseur de leurs bords (10-20 nm). La densité d'arêtes à la surface semblerait représenter un environnement moins contraignant pour les cellules eucaryotes. Ces nanostructures méritent d'être étudiées plus en détail. En effet, les résultats obtenus quant au potentiel d'ostéointégration de ces surfaces sont très prometteurs. Néanmoins, deux aspects nécessiteraient des expériences complémentaires : l'évaluation du potentiel bactéricide de ces surfaces *in vivo* et l'étude d'implants de formes différentes, plus adaptées aux situations rencontrées en clinique.

Là où de nombreux modèles *in vivo* sont accessibles pour évaluer l'ostéointégration, la caractérisation *in vivo* du potentiel bactéricide est plus complexe à mettre en œuvre. Cela nécessite des modèles assez complexes avec l'utilisation de grands animaux. En général, ces modèles consistent à inoculer une souche de *Staphylococcus aureus* soit au contact de l'implant avant chirurgie, soit par injection sur le site opératoire, soit par injection dans la circulation sanguine<sup>397</sup>. Les critères d'évaluation sont parfois peu précis. Ils utilisent des méthodes radiologiques pour suivre certains paramètres associés à la survenue d'une infection, comme une ostéolyse. L'alternative est généralement de mener des études bactériologiques sur l'implant *ex vivo* (histologie ou test de formation de colonies bactériennes sur gélose). Cependant, de nouveaux modèles se développent pour répondre aux besoins de la recherche. Ainsi Sheppard et al. présentent un nouveau modèle de souris pour l'étude des infections sur implants. Leur protocole permet le suivi longitudinal de l'infection. Ils utilisent pour cela une souche de *Staphylococcus aureus* bioluminescente et un anticorps fluorescent ciblant les bactéries<sup>398</sup>, leur permettant de suivre l'activité bactérienne *in vivo*. Un modèle comparable pourrait apporter des informations en termes d'efficacité, mais également pour étudier l'action mécanobactéricide de nos surfaces *in vivo*. Effectivement, plusieurs questions persistent. L'accumulation de débris bactériens à la surface de l'implant pourrait-elle

compromettre l'ostéointégration ? Les nanostructures seraient-elles une protection suffisante pour agir sur des infections présentes dans les tissus environnants l'implant ? Un aspect qui va dans notre sens est que les infections les plus complexes à enrayer par le système immunitaire sont généralement celles qui s'établissent directement à la surface de l'implant, contre lesquelles les surfaces HTE semblent fournir une protection. Tout porte à croire que les nanostructures HTE fournissent un avantage aux cellules dans la "course à la surface" (de l'anglais "Race for the surface")<sup>382</sup>. Ce concept a été introduit pour parler de la rivalité entre les bactéries et les cellules eucaryotes pour coloniser la surface d'un biomatériau<sup>399,400</sup>.

Enfin, l'optimisation de nos surfaces HTE pour une utilisation clinique nécessite de les tester dans des conditions se rapprochant encore plus des situations cliniques pour lesquelles nos nanostructures seraient une alternative innovante. La suite de l'étude devra donc porter sur le développement d'implants avec une forme fonctionnelle. Les surfaces mécanobactéricides HTE pourraient déboucher sur une variété d'applications et être produites sous différentes formes :

- implants dentaires <sup>395,401</sup>
- parties en titane des prothèses orthopédiques<sup>402,403</sup>
- grilles en titane pour la cranioplastie<sup>162,404</sup>
- implants 3D poreux pour la régénération osseuse <sup>405-409</sup>

Il serait ainsi possible de cibler des nouveaux critères d'évaluation de l'ostéointégration adaptée à chaque situation clinique, avec notamment l'introduction de contraintes de charge mécanique sur l'implant. On peut ainsi imaginer le recourt à un modèle de défaut osseux porteur de charge<sup>160</sup>. Ces modèles sont relativement plus complexes à mettre en œuvre, mais sont plus adaptés pour reproduire certains contextes cliniques. Ils sont généralement établis sur les os longs et étudient l'implant dans sa capacité à garantir une mise en charge rapide du membre affecté. Outre le paramètre fonctionnel, il est ainsi possible d'évaluer la récupération fonctionnelle suite au défaut<sup>408</sup>.

De plus, une étude récente de l'équipe d'Elena Ivanova, laisse entrevoir la possibilité d'améliorer les surfaces HTE. L'ajout d'une topographie micrométrique par gravure à l'acide chlorhydrique (HCl) ou à l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en addition à la topographie nanométrique HTE, permet l'adhérence, la prolifération et la différenciation ostéogénique de cellules MG-63 (comparables à des ostéoblastes) à leur surface. Aucune comparaison directe n'a été effectuée entre une surface nanostructurée et micro/nanostructurée. Toutefois, les résultats laissent à penser que l'ajout de microstructures pourrait être bénéfique à l'ostéogénèse induite par les nanostructures. De plus, le niveau de bactéricidie n'est pas impacté et semble même s'améliorer pour la surface micro/nanostructurée avec de l'acide HCl<sup>286</sup>. Nos résultats renforcent l'intérêt d'optimiser ces surfaces HTE.

A ce jour, des traitements de surface sont utilisés pour des implants commercialisés ou en cours d'étude clinique. C'est le cas majoritairement de traitements de sablage et gravures à l'acide qui ont déjà fait leurs preuves, mais aussi d'abrasion laser ou d'oxydation anodique. On peut citer une étude sur 511 implants dentaires traités par sablage et gravure à l'acide (SLA) qui ont montré un taux de succès à 10 ans de 97 %<sup>410</sup>. De la même manière, de nouveaux implants (Kontakt N) sont actuellement en étude clinique sur 165 patients (NCT03582657, voir Annexe 18). Visuellement, le traitement appliqué s'apparente à un traitement SLA. À noter que les implants dentaires ne sont pas des situations très exigeantes quant aux propriétés d'ostéointégration de l'implant. On ne

peut pas en dire de même d'autres applications comme en orthopédie où les descellements liés à une mauvaise ostéointégration sont relativement fréquents. Lorsqu'on regarde la littérature, les perspectives sont en majorité orientées vers des approches de recouvrement avec des molécules bioactives. En comparaison, les surfaces HTE possèdent plusieurs avantages industriels :

- Faible coût associé aux traitements de surface
- La gravure hydrothermale peut être facilement adaptée à différentes tailles d'implants
- Le traitement peut être fait sur plusieurs implants en simultané
- Les nanostructures sont amenées par la réaction avec la solution. Il est donc possible de traiter un implant poreux en 3D (Annexe 17). En comparaison, la gravure plasma nécessite la projection d'ions à la surface de l'implant. Il est donc compliqué de traiter des surfaces poreuses
- Des techniques de gravure chimique sont déjà commercialisées, témoignant de la possibilité d'industrialiser ces méthodes

Cependant, la gravure hydrothermale HTE présente l'inconvénient de nécessiter l'utilisation d'une solution de KOH, qui est toxique et corrosive. Même si la production de surfaces HTE est compatible avec un usage industriel, l'impact environnemental qui peut être associé à son utilisation doit être pris en compte.

En comparaison, la complexité des nouvelles méthodes de traitement proposées par la littérature est un frein à leur valorisation en clinique. Vu la quantité d'implants dentaires utilisés avec succès en chirurgie orthodontique, on peut penser que pour le bénéfice apporté, des approches reposant sur des recouvrements de surface des implants avec des molécules bioactives, qui nécessitent des outils pas forcément encore industrialisés, comporte peu d'intérêt économique et de gains pour les patients. Cela est différent pour les substituts osseux. Effectivement, le traitement de non-union ou de reconstruction osseuse de défaut critique représente une réelle difficulté thérapeutique et un fort enjeu économique. Ce domaine est ainsi plus propice au développement de biomatériaux composites qui présente potentiellement des propriétés ostéogéniques supérieures à celles de nanostructures.

Notre projet est très prometteur. L'innovation clé n'est pas dans le traitement ostéoinducteur lui-même, qui est un domaine très compétitif avec énormément de propositions très viables scientifiquement, même si pour certaines, elles ne le sont pas économiquement. L'innovation réside dans la double caractéristique de nos surfaces qui sont intrinsèquement bactéricides et ostéogéniques.

# Conclusion

Face à un besoin croissant d'implants en titane, régler la question de l'ostéointégration tout en se protégeant d'infections nosocomiales est primordial. Effectivement, les échecs d'implants en titane sont encore trop fréquents en clinique. Ces échecs sont à la fois difficiles à anticiper, mais également compliqués à prévenir. La recherche ces dernières années a permis de mettre en avant la topographie de surface comme l'un des paramètres les plus importants et des plus prometteurs pour l'ostéointégration d'un implant. Ce paramètre se voit de plus en plus considéré en clinique. Des propositions nouvelles, sûres et économiques montrent une efficacité d'ostéointégration plus élevée que les alternatives en titane lisse. Toutefois, les traitements de surface mis en place ne font qu'effleurer le réel potentiel contenu par les topographies de surface. Outre l'espoir de trouver des topographies plus propices à l'ostéointégration, il est également nécessaire de développer des surfaces empêchant l'apparition d'infections péri-implants. Il est donc primordial de trouver le bon compromis entre prévention des infections et amélioration de l'interface avec les tissus de l'hôte.

Ce projet de thèse alliant modèles *in vitro* et *in vivo* est une preuve supplémentaire du caractère innovant de surfaces en titane mécanobactéricides. Cette nouvelle approche biomimétique s'impose comme une alternative viable à l'utilisation de molécules antibiotiques. A notre connaissance, ces recherches représentent la première caractérisation *in vivo* de surfaces par gravure plasma et gravure hydrothermale mécanobactéricides dans un contexte d'ostéointégration. C'est pourquoi, les travaux présentés dans cette thèse ouvrent de nouvelles perspectives et pistes de recherche. Force est de constater que face au processus complexe de la réparation osseuse, les expériences *in vitro* sont peu prédictives des réponses observées *in vivo*. À l'issue de ce projet, nous sommes tout de même en mesure d'identifier des expériences clés qui seraient capables d'éliminer des surfaces telles que 2T en amont de tests précliniques.

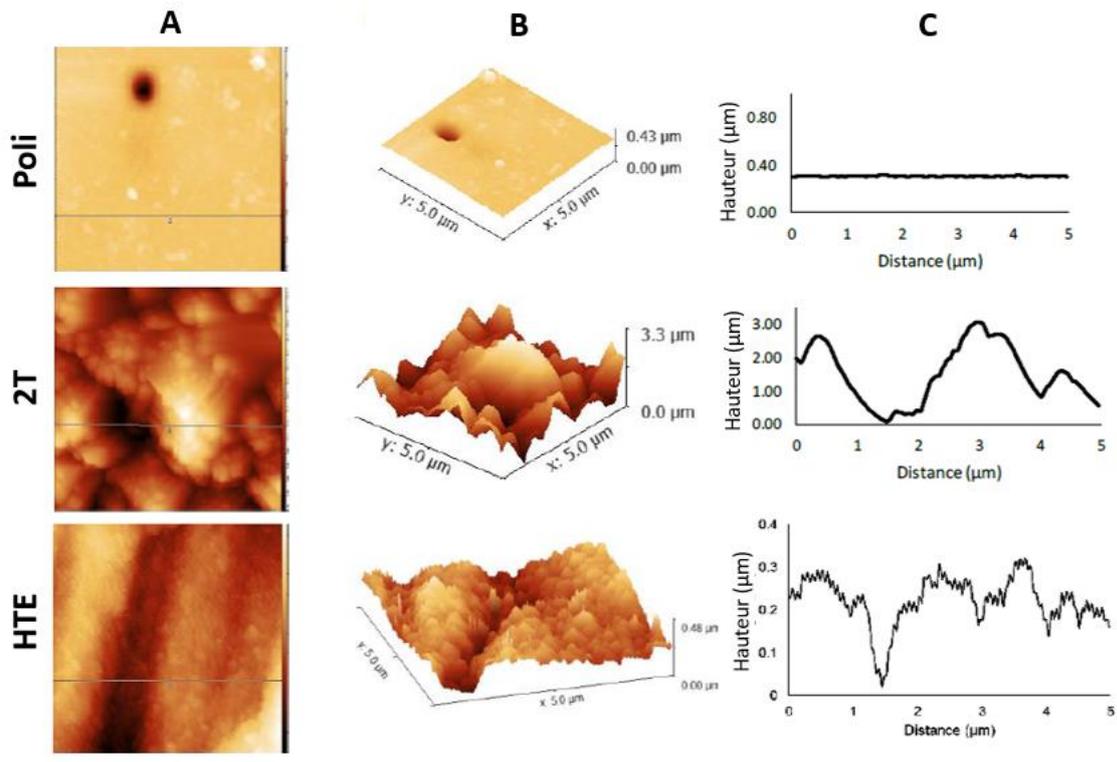
Ainsi, comme nous l'ont prouvé les surfaces HTE, une modification adaptée de la surface d'un implant permettrait d'atteindre cet objectif double d'ostéointégration et de bactéricidie. Dans ce projet, nous avons démontré le potentiel ostéogénique des surfaces HTE, dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Une question subsiste tout de même et représente la perspective directe à l'issue de cette thèse : démontrer les propriétés mécanobactéricides *in vivo*. Dans l'éventualité d'une validation du caractère bactéricide en préclinique, les surfaces HTE ou des surfaces comparables pourront être valorisées en clinique dans les années à venir.



# Annexes

	CSM multipotentes	Ostéoprogéniteurs immatures	Ostéoprogéniteurs matures	Pré-ostéoblastes	Ostéoblastes
	Prolifération				Différenciation ostéoblastes
Runx2	-	+	++	+	+/-
Alcaline phosphatase (ALP)	+/-	+	++	+++	++
Collagène de type 1	-	+	++	+++	++
Ostéopontine	+/-	+/-	+/-	++	++
Ostérix	-	-	+	++	++
Ostéocalcine	-	-	+	+	++
Sialoprotéine osseuse	-	-	-	+	++

Annexe 1 : **Tableau récapitulatif de l'expression de marqueurs de la différenciation des ostéoblastes.** Les CSM entrent tout d'abord dans une phase initiale de prolifération qui diminue lorsque les cellules ostéoprogénitrices avancent dans la différenciation. Les marqueurs présentés ici sont les plus fréquemment utilisés pour décrire la différenciation. La présence de ces marqueurs aux différentes étapes de la différenciation est représenté par les signes « - » et « + », avec - correspondant à une absence d'expression de ce marqueur et +++ correspondant à une forte expression<sup>10,411,412</sup>.

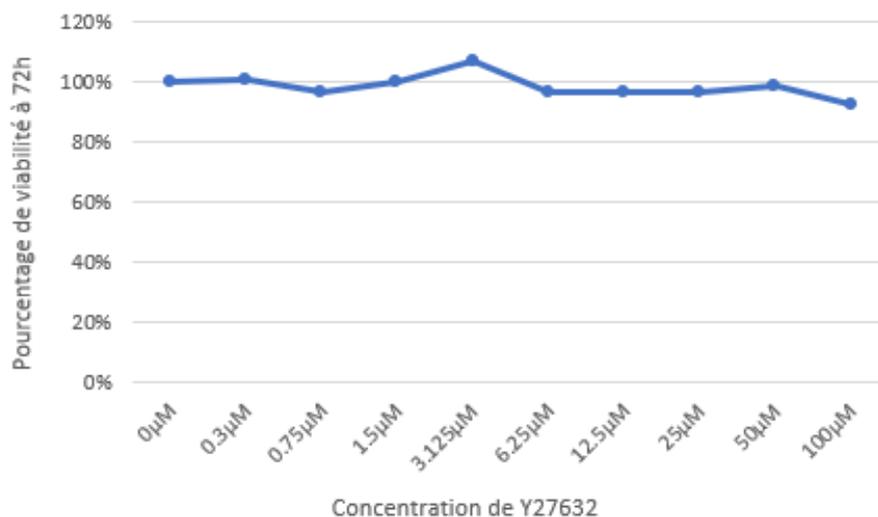


<b>D</b> Rugosité de surface			
Nom de l'échantillon	<b>Poli</b>	<b>2T</b>	<b>HTE</b>
Hauteur médiane (nm)	17 ± 2	1511 ± 317	385,1 ± 110,9
Rugosité moyenne Ra (S <sub>a</sub> )	2,5 ± 0,3	567 ± 11	109,9 ± 44,8

Annexe 2 : Analyse de la rugosité des surfaces Poli, 2T et HTE<sup>301</sup>. Analyse par microscopie à force atomique **A** : Scans de hauteur des surfaces de titane sur une zone de scan de 5x5μm. **B** : reconstruction 3D des scans de hauteur. **C** : Scans en ligne correspondant à une coupe représentée par la ligne en gris sur les scans en A. **D** : Tableaux de paramètres de rugosité calculés par microscopie à force atomique.

<b>Paramètres géométriques de surface</b>			
Nom de l'échantillon	<b>Poli</b>	<b>2T</b>	<b>HTE</b>
Largeur des pointes/arêtes	-	158 ± 40	10
Densité des piliers/arêtes	-	6,69 ± 14 (piliers/μm <sup>2</sup> )	20 ± 13 (arête/μm <sup>2</sup> )
Hauteur des piliers/ longueur des arêtes	-	3,5 ± 0,5 μm	8 ± 1,8 (μm/μm <sup>2</sup> )
<b>Mouillabilité</b>			
Angle de contact à l'eau	60,1 ± 8	98,4 ± 5,8	22 ± 2,2
<b>Composition élémentaire (en %)</b>			
O	34,275 ± 1,33	29,945 ± 0,33	56,65 ± 1,24
C	19,25 ± 0,31	26,605 ± 0,33	13,5 ± 0,25
Ti	32,98 ± 7,7	29,27 ± 2,52	22,65 ± 3,5
Cl	-	1,075 ± 0,05	-
K	-	-	7,25 ± 0,11

Annexe 3 : Caractérisation physicochimique des surfaces en titane<sup>8</sup>.



Annexe 4 : **Viabilité cellulaire de CSM à 72h de culture en présence de concentration croissante de Y27632** . La viabilité a été quantifiée par MTT à 72 h de culture, soit après 48h en présence de l'inhibiteur. L'utilisation de l'inhibiteur Y27632 n'induit pas de cytotoxicité et la littérature recommande une utilisation à 10 µM, qui démontre une inhibition de ROCK.

<b>Tampon de Migration 1X</b>	25mM Tris, 192mM Glycine, 0,1% SDS
<b>Tampon de transfert 1X</b>	25mM Tris, 192mM Glycine, 20% Ethanol
<b>TBS 1X</b>	10mM Tris, 150mM NaCl
<b>Laemmli</b>	100mM Tris, 20% Glycérol, 50mM DTT, 2% SDS, bleu de bromophénol

Annexe 5 : **Composition des tampons pour la procédure de Western blot.**

---

**-Runx2 length: 81 / Tm: 58/60**

Sens: TCAACGATCTGAGATTTGTGGG

Antisens: GGGGAGGATTTGTGAAGACGG

**-Opn length: 101 / Tm: 59/58.8**

Sens: GCCGAGGTGATAGTGTGGTT

Antisens: TGAGGTGATGTCCTCGTCTG

**-ALP length: 136 / Tm: 59/59**

Sens: GCACCATGAAGGAAAAGCCA

Antisens: TGTGAAGACGTGGGAATGGT

**-Col I (COL1A1) length: 200 / Tm: 59/59**

Sens: CTGGAAGAGTGGAGAGTACTGG

Antisens: GGAATCCATCGGTCATGCTCT

**-GAPDH length: 127 / Tm: 60/58**

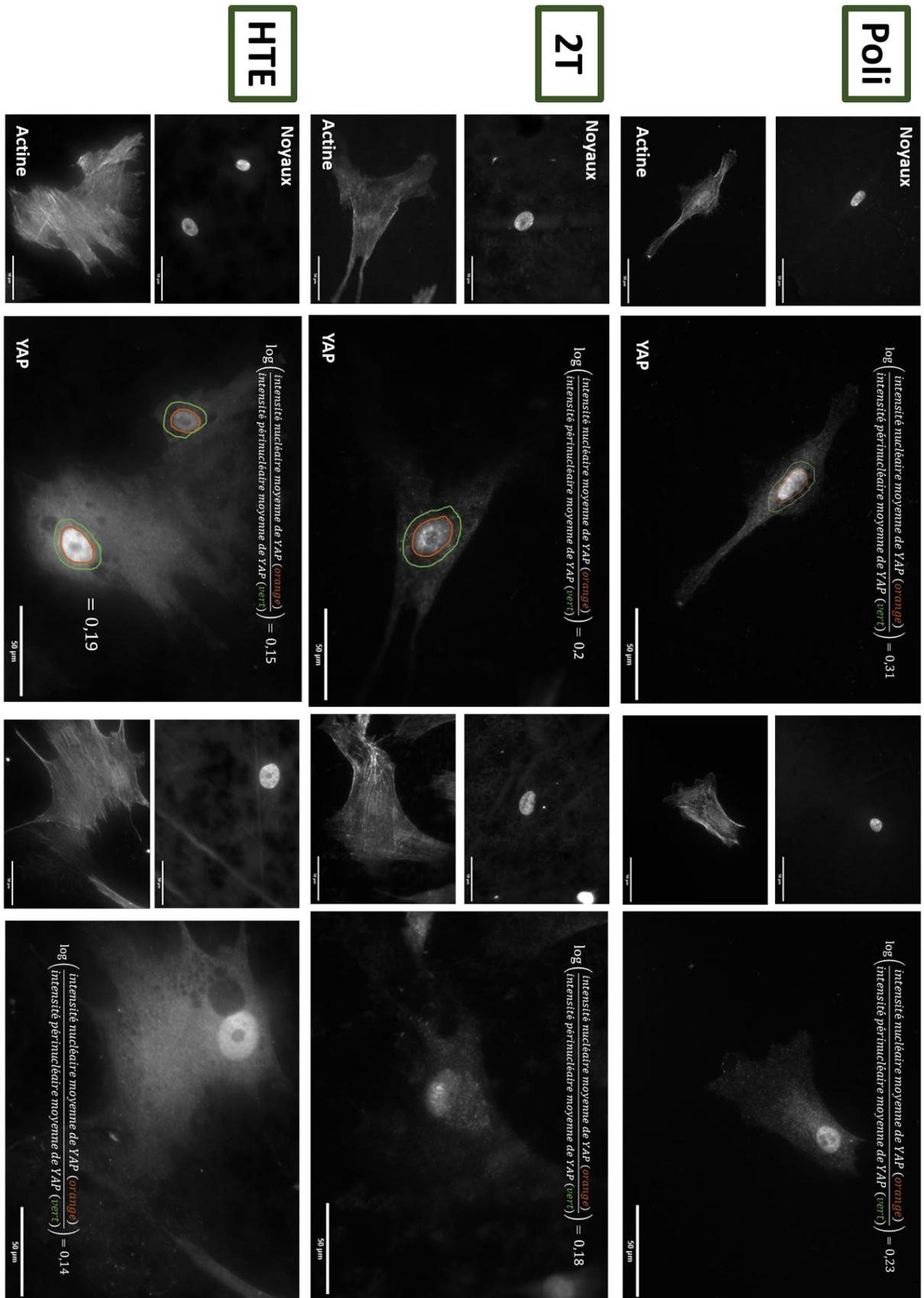
Sens: GACAGTCAGCCGCATCTTCT

Antisens: TTAAAAGCAGCCCTGGTGAC

Annexe 6 : Liste des amorces de RT-qPCR utilisées pour l'analyse de l'expression de gènes ostéogéniques. Length : taille du produit de l'amplification ; Tm : température de fusion.

Cible	Espèce	Référence	Dilution
<b>Primaire</b>			
Runx2	Souris	ab76956	WB: 1/1000 Elisa: 1/200
GAPDH	Souris		WB: 1/1000
Osteopontin	Chèvre		WB: 1/1000 Elisa: 1/1000
Paxillin	Lapin	12065S	WB: 1/1000 Elisa: 1/500
YAP1	Lapin	GTX129151	IF: 1/1000
Vinculin	Souris	Sigma V4505	WB: 1/1000
LC3B	Lapin	ab192890	WB: 1/2000
Collagen I	Souris	C2456	WB: 1/1000 Elisa: 1/500
Fak	Lapin	71433S	WB: 1/1000 Elisa: 1/500
p-Fak	Lapin	3283S	WB: 1/1000 Elisa: 1/500
Active $\beta$ cat	Lapin	8814S	WB: 1/1000
p-Src	Lapin	Invitrogen 44660G	WB: 1/1000 Elisa: 1/500
Src	Lapin	CellSignaling 2108	WB: 1/1000 Elisa: 1/500
Smad4	Lapin	GTX112980	WB: 1/1000 Elisa: 1/200
VEGF	Souris	RD Systems MAB293	Elisa: 1/1000
<b>Secondaire</b>			
$\alpha$ -lapin alexa 488		biolegend 406416	1/1000
$\alpha$ -goat alexa 488		A11055	1/1000
$\alpha$ -mouse Alexa 488		405319	1/1000
$\alpha$ -lapin HRP		Cell signaling 7074P2	1/10000
$\alpha$ -souris HRP		Cell signalling 7076S	1/5000

Annexe 7 : **Liste des anticorps utilisés.** La cible, l'espèce et la référence pour chaque anticorps sont présentées. Pour information, les dilutions selon l'utilisation sont précisées.



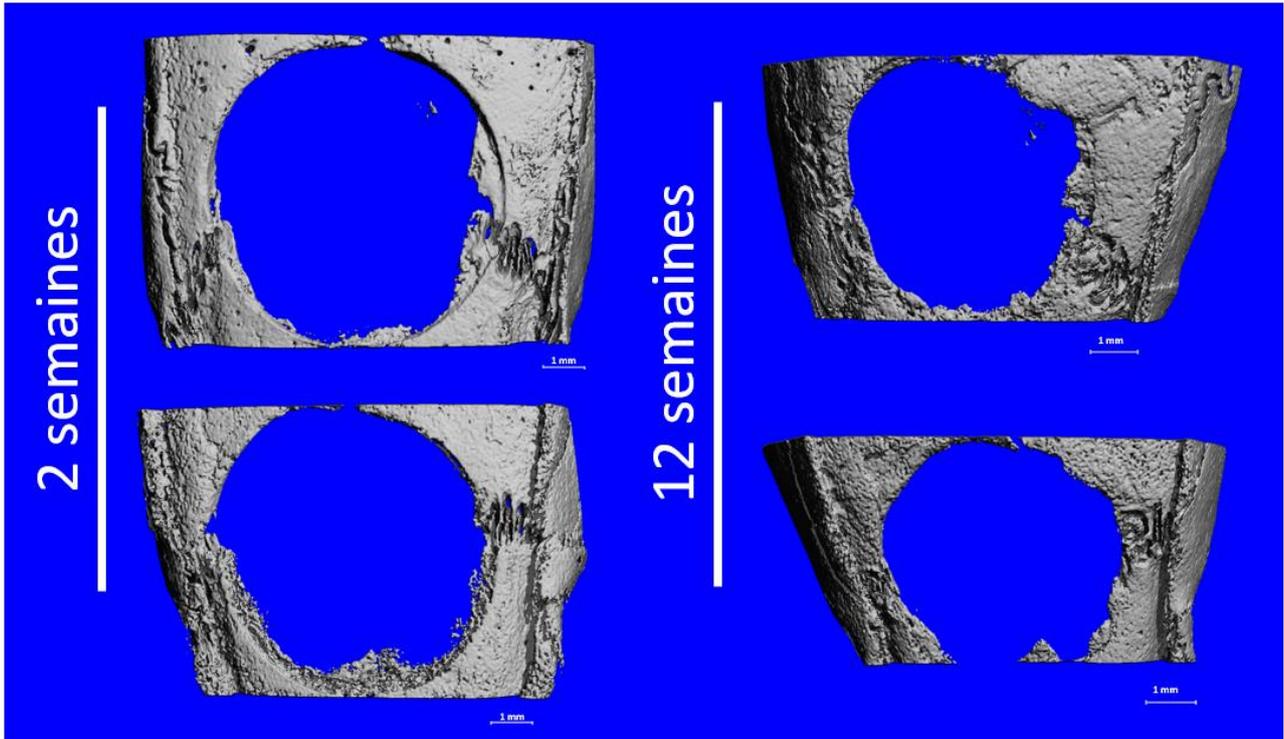
Annexe 8 : Distribution de la protéine YAP après trois jours de culture de CSM sur différentes surfaces : Poli, 2T et HTE. Illustration du protocole d'acquisition des valeurs de distribution de YAP. Les valeurs correspondent au logarithme du ratio d'intensité de YAP nucléaire (dans le cercle orange) et de l'intensité périnucléaire (entre le cercle vert et orange).

Référence	Espèce (rat)	Age	Taille du défaut	Nombre	Biomatériau testé
A. sheikh et al 2016	Sprague-dawley	N/A	3mm	2	PLGA+Silk+Hap
Yuan et al 2018	Sprague-dawley	9-10 week	5mm	2	Anorganic bovine bone + hDPSCs + aspirine
Li et al 2020	Sprague-dawley	6 week	5mm	2	Nano-MgO/PMMA bone cement
Wang et al 2015	Sprague-dawley	12 week	5mm	2	BG-15Fe3O4 bioactive scaffolds
Zhang et al 2022	Sprague-dawley	6 week	5mm	2	3D printing Mg + shape memory polyurethane scaffold
Cheng et al 2021	Wistar	3 month	5mm	2	PLGA+B-TCP + cucurbitacin B
Xuan et al. 2023	Sprague-Dawley	8-10 weeks	5mm	2	ordered or random Bredigite (bioceramic) scaffold
Lam et al. 2019	NIH nude rats	11-12 weeks	5mm	2	Polycaprolactone microcarriers + hMSC
Chen et al. 2023	Sprague-Dawley	10-12 weeks	5mm	1	Mucin-monetite composite materials (hydrogels)
Zhang et al. 2015	Sprague-Dawley	8 weeks	5mm	1	porous PLA/HA / B-TCP / demineralized bone matrix
Wang et al. 2015	Sprague dawley	12 weeks	5mm	2	Borosilicate Glass + Zn scaffold
Zhao et al 2020	Sprague-dawley	8 week	6mm	2	Mg-6Zn-2.7RE alloy membranes
Guo et al. 2020	Sprague-Dawley	10 weeks	6mm	1	Zinc membranes with or without pores
Nguyen et al. 2016	Sprague-Dawley	8 weeks	8mm	1	Surface-modified & pristine titanium membranes
Patel et al. 2011	Fischer-344	12 weeks	8mm	1	Porous PFF scaffold with loaded gelatin (VEGF and/or BMP2)
Wang et al. 2017	Fischer 344	6 weeks	8mm	1	BMSC/B-TCP scaffolds additioned with local administration of GDF15
Zheng et al. 2021	Sprague-Dawley	5-6 weeks	8mm	1	Nanoclay functionalized 3D bioglass scaffold (hypoxia properties)
Liu et al. 2020	Sprague-Dawley	N/A	8mm	1	MSC loaded gelatin/alginate/Laponite nanocomposite hydrogel
lohmman et al. 2016	Fischer 344	N/A	8mm	1	3D architected hydrogel (ArcGel)
Jamshidi Adegani et al. 2014	Sprague-Dawley	N/A	8mm	1	Willemite coated PLGA
Zhang et al. 2017	Wistar	N/A	8mm	1	Biomimetic periosteum + B-TCP scaffold

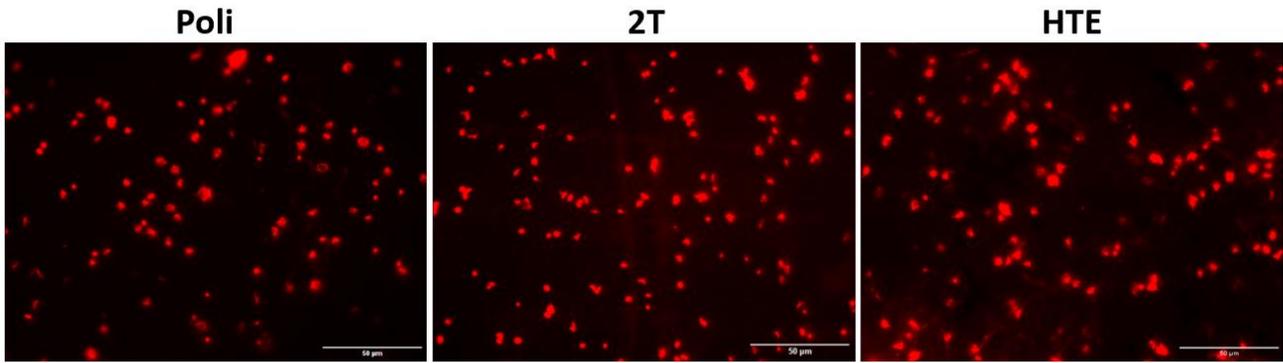
Annexe 9 : **Modèles de défauts de l'os calvarial pour l'évaluation des biomatériaux.** Ce tableau présente l'espèce animale utilisée, l'âge des animaux, la taille et le nombre de défauts créés dans l'os du crâne et une brève description du biomatériau étudié.

Référence	Biomatériau testé	Scan $\mu$ Ct	Histologie	Biomécaniques	Vascularisation	Imagerie à fluorescence	Significativité des résultats in vivo	Score subjectif des performances
Ahmed Abdullah 2015	(50 / 50) of PRF(platelet rich fibrin) mixed with $\beta$ -TCP	X					*	+
A. sheikh et al 2016	PLGA+Silk+Hap	X	X				ns	++
Zhang et al 2015	gelatin/ $\beta$ -TCP composite nanofibrous scaffolds	X	X				*	++
Chatzipetros et al 2018	75/25 w/w nanoHydroxyapatite/Chitosan (nHAp/CS) scaffolds		X				+/- *	
Yuan et al 2018	Anorganic bovine bone + hDPSCs + aspirine	X	X				***	+++
Annibali et al 2013	Granular deproteinized bovine bone (GDPB) and Beta-tricalcium phosphate, ( $\beta$ -TCP) +/- DPSC (stem cell)	X					*	++
Li et al 2020	Nano-MgO/PMMA bone cement	X	X	X			**	++
Wang et al 2015	BG-15Fe3O4 bioactive scaffolds	X	X			X	*	+
Zhang et al 2022	3D printing Mg + shape memory polyurethane scaffold	X	X	X			*	++
Cheng et al 2021	PLGA+B-TCP + cucurbitacin B	X	X		X		*	++
Xuan et al. 2023	ordered or random Bredigite (bioceramic) scaffold	X	X				***	+++
Sun et al. 2016	P28 incorporated nano-hydroxyapatite scaffold	X	X				**	++
Zou et al. 2012	Gelatin sponge scaffold + active HIF-1a BMSC	X	X		X		**	++
Lam et al. 2019	Polycaprolactone microcarriers + hMSC	X	X				**	+
Chen et al. 2023	Mucin-monetite composite materials (hydrogels)	X	X				*	++
Liu et al. 2023	Pristine 3D-printed scaffold + graphene oxide + Black phosphorous nanosheets + IL-4	X	X				*	++
Sun et al. 2021	3D bioprinted scaffold with RAW and BMSC + BMP4 loaded mesoporous silica nanoparticles	X	X				*	++
Lee et al. 2023	Electrostatic spraying of Hydroxyapatite microbeads containing BMP2 and quercetin	X					*	++
Zong et al. 2014	PLGA vs nHAP/PLA scaffolds	X	X				*	+
Zhang et al. 2015	porous PLA/HA / B-TCP / demineralized bone matrix	X	X				*	+
Wang et al. 2015	Borosilicate Glass + Zn scaffold	X	X			X	*	++
Zhao et al 2020	Mg-6Zn-2.7RE alloy membranes	X	X				*	+
Guo et al. 2020	Zinc membranes with or without pores	X	X				**	++
Nguyen et al. 2016	Surface-modified & pristine titanium membranes	X	X			X	*	++
Patel et al. 2011	Porous PFF scaffold with loaded gelatin (VEGF and/or BMP2	X	X		X		*	++
Wang et al. 2017	BMSC/B-TCP scaffolds additioned with local administration of GDF15	X	X		X		**	++
Zheng et al. 2021	Nanoclay functionalized 3D bioglass scaffold (hypoxia properties)	X	X				*	+
Liu et al. 2020	MSC loaded gelatin/alginate/Laponite nanocomposite hydrogel	X	X			X	**	++
lohmann et al. 2016	3D architected hydrogel (ArcGel)	X	X	X			*	+
Kuttappan et al. 2020	Nanocomposite fibrous scaffold (silica coated nanoHA + gelatin + PLLA filaments) absorpted with ONO-1301 and /or BMP2		X				*	+
Jamshidi Adegani et al. 2014	Willemite coated PLGA	X	X				*	++
Zhang et al. 2017	Biomimetic periosteum + B-TCP scaffold	X	X				*	++

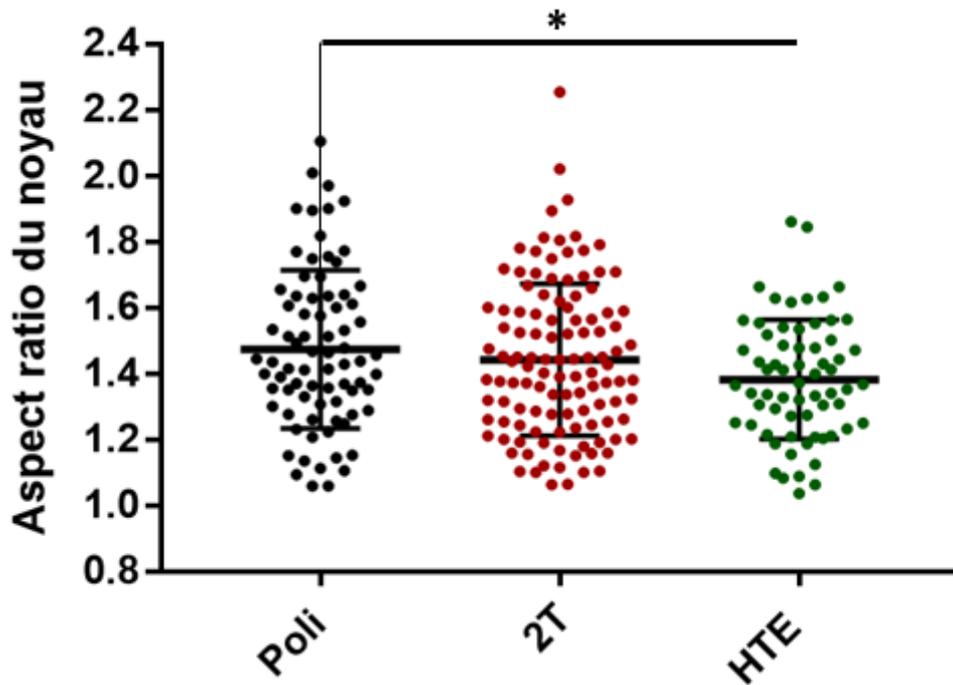
Annexe 10 : Méthodes d'évaluation des performances de biomatériaux dans un modèle de défaut calvarial du rat. Analyse bibliographique effectuée sur 33 articles. Ces articles sont résumés selon les méthodes appliquées pour évaluer la formation osseuse. On identifie l'utilisation de scans  $\mu$ Ct, l'usage de colorations histologiques, des analyses des paramètres mécaniques de l'implant et de l'os, des études *in vivo* de vascularisation et l'usage de la fluorescence pour imager la régénération osseuse. X : analyse présente ; \* : p-value<0,05 ; \*\* : p-value<0,01 ; \*\*\* : p-value<0,001. Les + correspondent à un score subjectif de 1 à 3 sur la qualité et le potentiel des résultats *in vivo* décrit, +++ étant le score le plus haut.



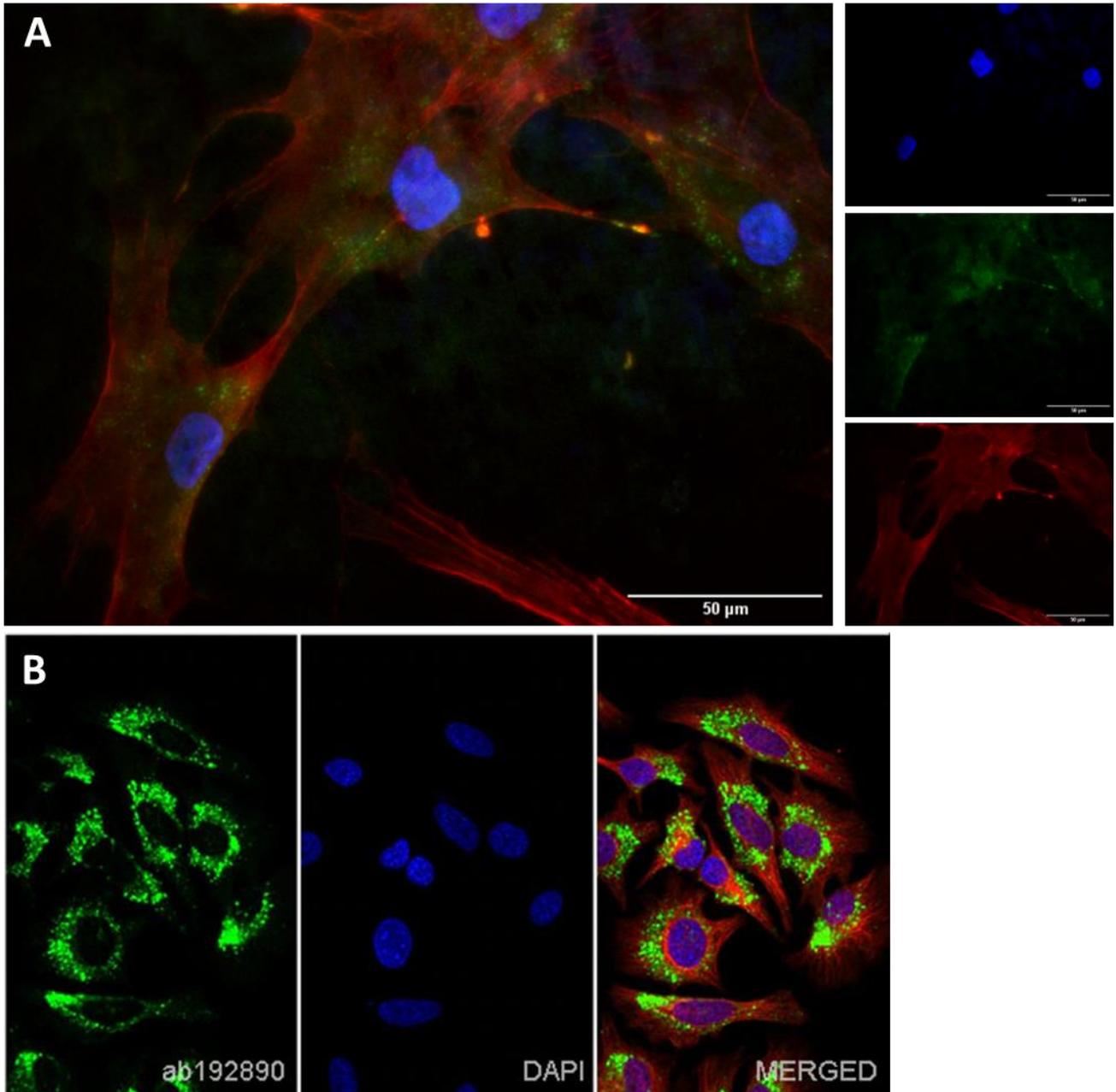
Annexe 11: Reconstruction 3D de scan  $\mu$ Ct des défauts vides à 2 semaines et 12 semaines.



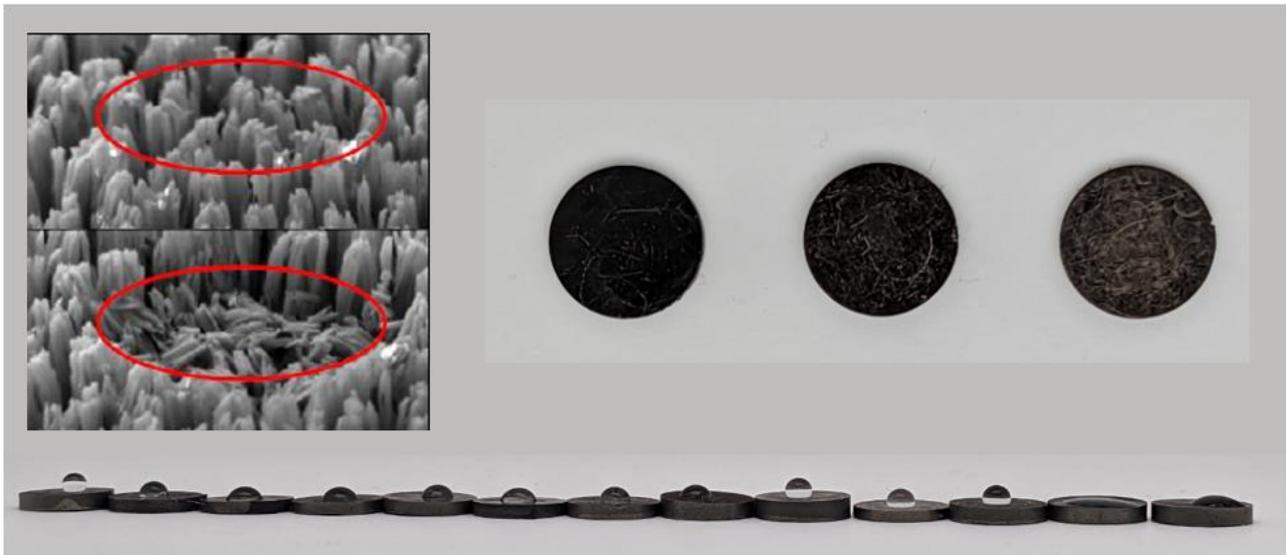
Annexe 12 : **Contact des plaquettes avec les surfaces en titane nanostructurées.** Immunofluorescence contre l'actine de plaquettes isolées de sang de rats.



Annexe 13 : **Aspect ratio du noyau de CSM à la surface de nanostructures de titane.** Le calcul de l'aspect ratio s'est fait par quantification sur logiciel ImageJ suite à un marquage de l'actine. Chaque point représente une cellule analysée. Significativité testée par test de one-way ANOVA, \* : p-value<0,01



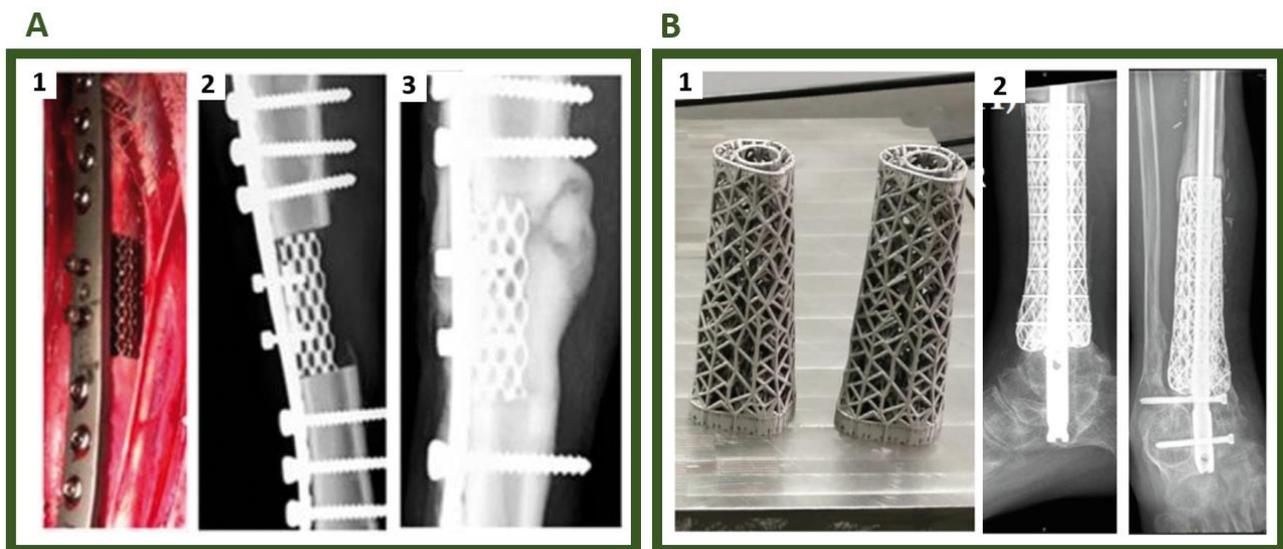
Annexe 14 : **Analyse de la localisation périnucléaire de YAP.** **A** : Immunofluorescence contre YAP de CSM cultivées 72h sur HTE. Les marquages correspondent au Hoechst en bleu, à YAP en vert et à l'actine en rouge. Le marquage YAP montre des similitudes avec celui obtenu en **B** : Marquage à l'aide d'un cocktail de marqueurs de l'autophagie sur des cellules HeLa traitées pour développer une forte activité autophagique (site abcam reference ab192890).



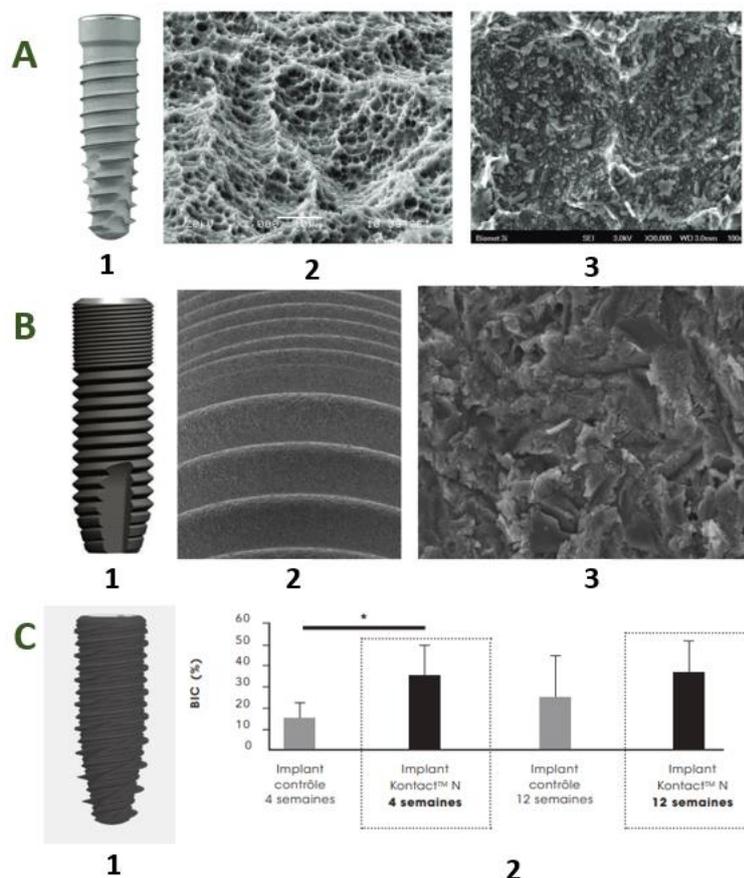
Annexe 15: **Illustration de l'usure des nanostructures 2T.** En haut à gauche: Images MEB de nanostructures avant et après l'application d'une pression avec une pointe. En haut à droite : Photographies de trois supports 2T plus ou moins utilisés. Les surfaces perdent de leur capacité à bloquer la lumière, se caractérisant par une perte de la couleur noire. En bas : Test de la goutte d'eau pour visualiser les propriétés de mouillabilité de différents supports 2T plus ou moins utilisés.

Title	Authors	Date	Nano-structures	Coating	Titanium	Prot adsorption	MSC	MC3T3	Endothelial cell	Immune cell	Proliferation	Morphology	ALP activity	Alizarin	RT-qPCR	Western blot	Immunofluo (other than morpho)	Co-culture	Conditioned medium	ELISA secretion	wound assay	Capillary like assay	
Response of monocultured and co-cultured human microvascular endothelial cells and MSC to macroporous granules of nanostructured-hydroxyapatite agglomerates	M.S. Laranjeira	2013	+				+	+	+	+			+	+	+				+			+	
Synergistic effects of nanotopography and co-culture with endothelial cells on osteogenesis of MSC	Jangho Kim	2013	+				+	+	+	+	+			+		+	+	+		+			
Bone mesenchymal stem cell secretion of sRANKL/OPG/M-CSF in response to macrophage-mediated inflammatory response influences osteogenesis on nanostructured Ti surfaces	Qian-li Ma	2018	+	+			+		+	+			+	+	+				+	+			
Titanium with nanotopography induces osteoblast differentiation through regulation of integrin $\alpha$ V	Helena Bacha Lopes	2019	+	+			+								+	+							
Effects of nanotopography regulation and silicon doping on angiogenic and osteogenic activities of hydroxyapatite coating on titanium implant	Xi Fu	2020	+	+	+	+		+	+						+				+	+		+	+
Mechano-bactericidal titanium surfaces for bone tissue engineering	Tristan Le Clairche	2020	+		+		+				+	+	+	+									
Titanium with nanotopography attenuates the osteoclast-induced disruption of osteoblast differentiation by regulating histone methylation	rayana L. Bighetti-Trevisan	2021	+		+			+	~				+		+	+	+	+					
A micro/nano-biomimetic coating on titanium orchestrates osteo/angio-genesis and osteoimmunomodulation for advanced osseointegration	Long Bai	2021	+		+		+		+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+
Optimized nanointerface engineering of micro/nanostructured titanium implants to enhance cell-nanotopography interactions and osseointegration	Kai Li	2021	+		+	+	+		+	+			+	+	+				+	+	+		
Immunomodulatory Properties and Osteogenic Activity of Polyetheretherketone Coated with Titanate Nanonetwork Structures	Yuanyuan Yang	2022	+		+		+		+	+			+	+	+				+				

Annexe 16 : Résumé des méthodes les plus communément utilisées pour l'étude du potentiel ostéogénique de biomatériaux pour l'os. Les signes « + » signifient la présence de la méthode dans l'article.



Annexe 17 : **Exemple d'implants en titane poreux pour des applications orthopédiques.** **A** : démonstration du potentiel d'implants en titane poreux fabriqués par fusion par faisceau d'électrons dans la reconstruction d'un défaut du tibia de mouton. **A1** : photographie du site opératoire après implantation. **A2** : radiographie de l'implant juste après la chirurgie, et 2 mois après (**A2**)<sup>408</sup>. **B** : création d'implants en titane par imprimerie 3D pour la reconstruction d'un défaut osseux créé suite à la résection d'un ostéosarcome. **B1** : photographie des treillis de titane avant la chirurgie. **B2** : radiographie du patient 6 mois après la chirurgie<sup>407</sup>.



Annexe 18 : **Exemple d'implants dentaires traités pour augmenter l'ostéointégration.** **A1, B1 et C1** : Photographies des implants dentaires. **A2-3 et B3** : Images MEB des nanostructures présentes à la surface des implants dentaires. **A** : 3i T3 (BIOMET 3i, USA). Des particules de phosphate de calcium (20-100nm) sont déposées sur une surface gravée à l'acide. **B** : OsseoSpeed implant (DENTSPLY Implants, Germany). La nanotopographie de l'implant OsseoSpeed résulte d'un décapage à l'oxyde de titane suivi d'une gravure à l'acide fluorhydrique. (source<sup>390</sup>) **C** : Kontakt N (BiotechDental, France). Un traitement de surface (non spécifié) crée des nanostructures à la surface de l'implant. **C2** : Résultats de BIC des implants Kontakt N à 4 et 12 semaines suite à l'implantation comparé à des implants dont la surface n'a pas été traitée pour induire des nanostructures.

---

**Inspired by insects:  
New implants for bone repair**



## INSPIRED BY INSECTS: NEW IMPLANTS FOR BONE REPAIR

**Théo Ziegelmeyer<sup>1</sup>, Tristan Le Clainche<sup>1</sup>, Jean-Luc Coll<sup>1</sup>, Elena P. Ivanova<sup>2</sup> and Véronique Martel-Frchet<sup>1,3\*</sup>**

<sup>1</sup>Cancer Target and Experimental Therapeutics, Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, UMR CNRS 5309, Grenoble Alpes University, La Tronche, France

<sup>2</sup>School of Science, RMIT University, Melbourne, VIC, Australia

<sup>3</sup>EPHE, PSL Research University, Paris, France

### YOUNG REVIEWERS:



**CLAUDIA**

AGE: 13



**ELLIOT**

AGE: 12



**RONI**

AGE: 12

Bones are vital and strong, but not invincible—they can be broken. Normally, bones can repair themselves. However, sometimes broken bones must be supported using what is called an implant. An implant is a man-made device used to replace or support a missing part of the human body. In the case of a bone, an implant aims at helping the bone regain its natural function. However, inserting a foreign object into the body has several possible complications. In particular, bone-repair implants are often associated with difficult-to-fight bacterial infections. Many approaches and materials are being studied to improve bone implants. Our team based our bone implants on the bacteria-killing structures present on certain insects. Our results provide evidence that these natural structures could help us develop materials to improve bone repair, while helping to prevent bacterial infections.

## OSTEOBLASTS

Bone-producing cells.

## BONE REGENERATION

Natural process of bone formation, which is involved during fracture healing.

## ANTIBIOTICS

Medicines to treat infections by killing bacteria.

## HELPING THE BONE REPAIR ITSELF

Bone is an incredible tissue that changes dramatically throughout life. It continually breaks itself down and produces new bone, in a way that you cannot see or feel. Bones are primarily made of minerals, such as calcium and phosphate, but the key players are several types of cells that supply, organize, and shape the minerals. Bone-forming cells called **osteoblasts** give bone its ability to repair itself after a bone is broken (read more about it in [this Frontier for Young Minds article](#)). This repair process is called **bone regeneration**. Doctors put casts on broken limbs to immobilize them, so that the bone can slowly regenerate. However, in some situations, the defect (the hole created in the bone by the break) is too large to allow the recovery of full function. In this situation, doctors can use implants to fill the defect and help the body to repair the bone. However, inserting a foreign material into the body can lead to several complications.

## THE CHALLENGE OF BACTERIAL INFECTIONS

Bacteria are the most abundant form of life and are present almost everywhere on Earth. There are bacteria in the soil, water, air, and even in and on our bodies. These tiny organisms are essential to life on Earth and generally do not harm us. However, some types of bacteria tend to grow in tissues where they should not—this is what we call infection. In most cases, the body can defend itself against infection and return to normal. But in some cases, if the bacteria are aggressive or if the body is too weak to fight them efficiently, doctors must treat infections with drugs called **antibiotics**. If bacteria are present in the environment during implantation, they will multiply rapidly on the surface of the implant. This is a real problem for doctors because, although antibiotics are effective at killing bacteria, these drugs struggle to control bacteria growing on bone implants. In these cases, the implant often must be removed, which means more risk and pain for the patient.

In recent years, doctors and scientists have begun to realize that the more antibiotics are used, the more bacteria can adapt and find ways to survive in the presence of antibiotics (see [this Frontiers for Young Minds article](#)). Today, antibiotics are still incredibly useful, but we must start finding other ways to defend ourselves against bacteria.

## GETTING INSPIRED BY NATURE

In our search for a strategy to protect ourselves from bacteria, one approach is to mimic methods that already exist in nature. Researchers have observed such a feature on the wings of insects like the cicada. Very small pillars, several times smaller than bacteria, are present

## NANOSTRUCTURES

Small structures, at the nanometer scale, on top of a surface. A nanometer is one billionth of a meter.

### Figure 1

Nanostructures from an insect's wings can kill bacteria. Zooming in on the wings of a cicada using a powerful microscope, we can see that the surface is not smooth—it has many small pillars. On the right you can see a bacterium (orange) trying to stick to the surface. The pillars on the surface of the cicada wings pierce the bacterium, leading to its death. (Figure adapted from [1] and created with BioRender.com).

on the entire surface of the cicada's wings (Figure 1). These sharp pillars can pierce and kill the bacteria that try to stick to the wings. This is a natural solution to the threat of bacterial infection. It is important to note that the size of these pillar structures is in the nanometer (nm) range, thus they are called **nanostructures**. One nanometer is one billionth of a meter. If you look at the size of a millimeter on a ruler, try to imagine that, in that tiny space, you could fit 1,000,000 nanometers.

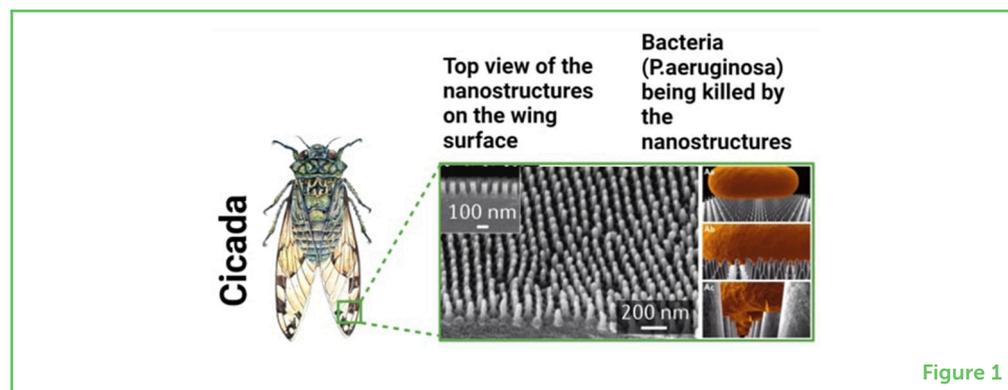


Figure 1

Elena Ivanova is one of the researchers who saw great potential in mimicking these small structures to develop materials with antibiotic properties. For this purpose, she and her group created artificial pillars, similar to those found in nature, on the surface of various materials. They have developed two types of pillar-like structures that look like spikes or sharp edges, and which are very effective at killing bacteria (Figure 2).

This discovery was of great interest to us, because we believed we could use these findings to develop a new generation of bone implants with the ability to kill bacteria—without the need to use antibiotics [1]. We hope that implants with bacteria-killing nanostructures on them will prevent infections and improve the quality of life of patients who need implants to repair their bone defects.

## TITANIUM—A GOOD MATERIAL FOR BONE IMPLANTS

The first difficulty scientists face when developing implants for bone repair is the **biocompatibility** of the material, which means that this material must not be toxic to the host or cause immunological rejection. Since the materials used to create implants are foreign to the body, the body could consider the implant a threat and attempt to reject it. Therefore, scientists must look for materials that do not trigger harmful processes in the body but that *do* remain stable in the body over time. To accomplish this, the pillar-like nanostructures on cicada wings were created on titanium surfaces. Titanium is a well-known metal often used in medicine because it has mechanical properties close to those of the bone, it remains stable over time, and the body is

## BIOCOMPATIBILITY

To be biocompatible, that means compatible with a living organism, a material must not be toxic to the host or cause immune reactions.

## Figure 2

(A) If we use a microscope to zoom in on the surface of our engineered titanium, we can see the details of the nanostructures created by Ivanova's team. On the left, you can see the smooth surface of titanium, and the two different types of nanostructured titanium are on the right. (B) Illustrations of the same surfaces shown in (A) (Figure adapted from [2]). (C) The engineered titanium surfaces were tested for their ability to kill bacteria. When we put bacteria on titanium that had nanostructures 1 or 2, the bacteria died.

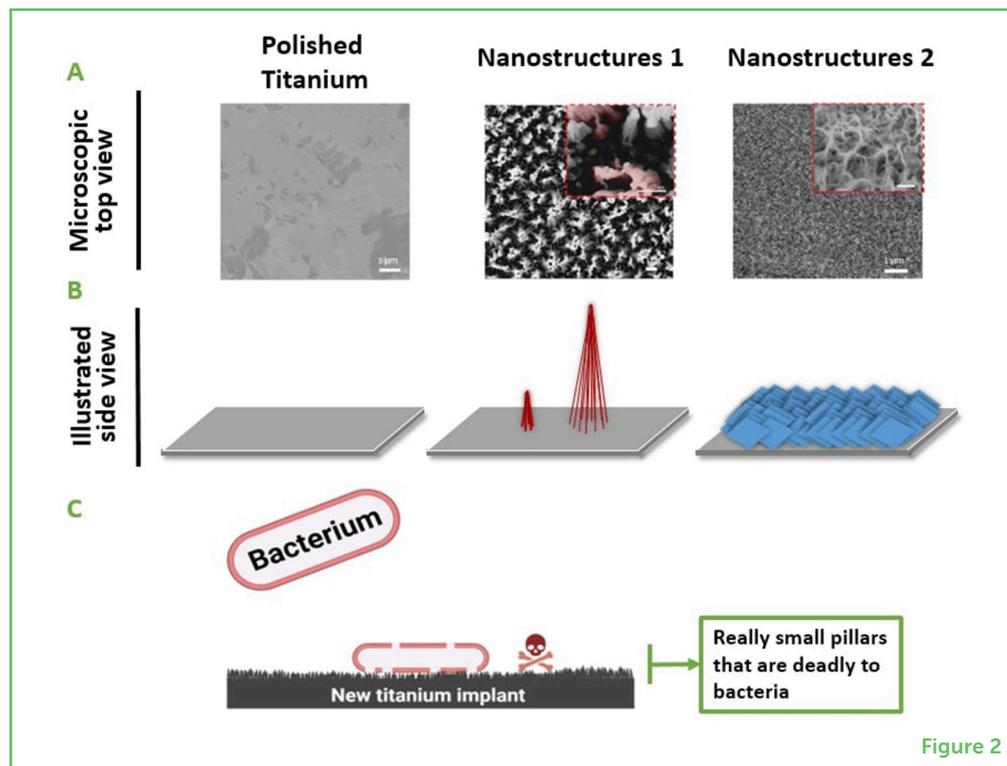


Figure 2

unlikely to react to it. Therefore, titanium appears to be a safe material for medical implants that are in close contact with various body tissues over a long period of time.

## TESTING THE MATERIAL

When developing devices for medical purposes, it is mandatory to put the devices through various types of testing. Testing can tell us whether the device is toxic to the body and can give us a preliminary idea of how effective the device might be. To get this information, we must conduct what is called an *in vitro* study. This means that we perform laboratory experiments using cells or microorganisms. By studying the behavior of cells, we can get a partial picture of what might happen in an organism. Humans have many types of cells, each with their own jobs. We needed to test our devices using cells that would tell us the most about bone regeneration, because that is what we wanted our titanium implants to help with. One cell type is of great interest for bone repair—**mesenchymal stem cells (MSCs)**. MSCs are amazing in that they can develop into many different types of cells depending on their environment. When MSCs are present at the site of a bone defect, they normally pick up signals from the environment and become osteoblasts—the bone-forming cells. So, we used MSCs in our experiments to mimic what would occur on our titanium implant once it was inside the body. We grew MSCs on our implants for several days.

### IN VITRO

This term refers to experiments that are done in laboratory out of a living organism.

### MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs)

Immature cells that can become many different cell types, including fat cells, bone cells, or cartilage cells, depending on signals from the environment.

## WHAT DID WE FIND?

Remember that the titanium we are studying kills bacteria thanks to the nanostructures on its surface. Therefore, we wondered if our nanostructures would also be harmful to human cells. Fortunately, this was not the case! MSCs survived and grew normally on the surfaces of our engineered titanium (Figure 3). What was even more surprising was that the MSCs on our nanostructured titanium started to become osteoblasts. A cocktail of molecules in the MSC environment usually controls the transition from one cell type to another, but we did not use any known molecule to trigger this switch in our experiments. We deduced that the nanostructures were probably perceived as a signal for the MSCs to become osteoblasts [3]. This could be another great feature of our nanostructured titanium implants.

### Figure 3

Our engineered titanium surfaces have two functions. First, they can cause bacterial death. Secondly, they can stimulate MSCs to become osteoblasts once the MSCs adhere to the nanostructures. This opens the possibility of creating new bone implants that would help bone reconstruction, while limiting the bacterial infections that are common in this type of surgery (Figure created with BioRender.com).

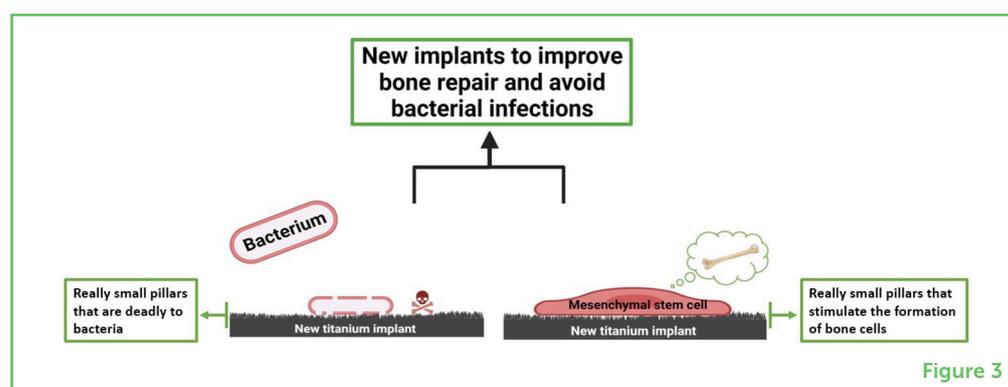


Figure 3

## CONCLUSION

Our nanostructured titanium has incredible potential. Without adding antibiotics, the material itself can kill bacteria. Additionally, the nanostructures can help the body to create new bone. So, by mimicking structures that exist in nature, we developed a new type of material that could be extremely useful in medicine. Thanks to our preliminary exciting results, we are working to extend the study to other cell types involved in bone regeneration. This will help us to understand how nanostructures affect the behavior of those cells. Ultimately, we hope to prevent bacterial infections on implants and to create implants that are well-accepted by the human body. This would be a major step toward safe, effective bone-repair surgery that would improve the lives of many patients while simultaneously reducing the need for antibiotics.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Gueules Cassées Foundation for their support.

## ORIGINAL SOURCE ARTICLE

Le Clainche, T., Linklater, D., Wong, S., Le, P., Juodkazis, S., Le Guével, X., et al. 2020. Mechano-bactericidal titanium surfaces for bone tissue engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 12:48272–83. doi: 10.1021/acsami.0c11502

## REFERENCES

1. Linklater, D. P., Baulin, V. A., Juodkazis, S., Crawford, R. J., Stoodley, P., and Ivanova, E. P. 2021. Mechano-bactericidal actions of nanostructured surfaces. *Nat. Rev. Microbiol.* 19:8–22. doi: 10.1038/s41579-020-0414-z
2. Le Clainche, T., Linklater, D., Wong, S., Le, P., Juodkazis, S., Le Guével, X., et al. 2020. Mechano-bactericidal titanium surfaces for bone tissue engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 12:48272–83. doi: 10.1021/acsami.0c11502
3. Halim, A., Ariyanti, A. D., Luo, Q., and Song, G. 2020. Recent progress in engineering mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cell Rev. Rep.* 16:661–74. doi: 10.1007/s12015-020-09979-4

**SUBMITTED:** 23 June 2022; **ACCEPTED:** 23 March 2023;

**PUBLISHED ONLINE:** 17 April 2023.

**EDITOR:** Tansy C. Hammarton, University of Glasgow, United Kingdom

**SCIENCE MENTORS:** Wendy E. Huddleston and Marcio Chaim Bajgelman

**CITATION:** Ziegelmeier T, Le Clainche T, Coll J-L, Ivanova EP and Martel-Frchet V (2023) Inspired by Insects: New Implants for Bone Repair. *Front. Young Minds* 11:976634. doi: 10.3389/frym.2023.976634

**CONFLICT OF INTEREST:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

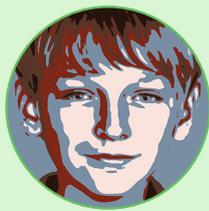
**COPYRIGHT** © 2023 Ziegelmeier, Le Clainche, Coll, Ivanova and Martel-Frchet. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## YOUNG REVIEWERS

### CLAUDIA, AGE: 13

Hi, I am Brazilian, and I am a 13 years old 8 grade student. I like science a lot and as my father is a scientist he inspired me to do these reviews. I also love reading, drawing and listening to music!



**ELLIOT, AGE: 12**

Elliot loves almost all science, especially cell biology, engineering and robotics/coding. He also loves playing soccer, playing cello and doing almost anything outside.

**RONI, AGE: 12**

Roni loves to read, write and play soccer. She also enjoys singing. She is very creative and loves to design and construct all sorts of things.

**AUTHORS****THÉO ZIEGELMEYER**

As a Ph.D. student at the University of Grenoble Alpes in France, I am studying the interactions of cells with titanium biomaterials for bone regeneration. I am very interested in this subject, which uses many cell biology concepts to understand the communication between a material and a living cell. Cell biology is a fascinating and challenging field, and I enjoy studying and sharing what I have learned. I am convinced that cells still have many surprises in store for us and that, by studying them, we can develop new therapeutic strategies.

**TRISTAN LE CLAINCHE**

As a cell biologist and biotechnologist, I have always been interested in the interaction between cells and their environments, and in how engineered biomaterials could trigger specific cell behaviors, notably for therapeutic purposes. During my Ph.D. at the Institute for Advanced Biosciences of Grenoble, I observed the bone-stimulating properties of titanium nanostructured biomaterials. Nowadays, I am involved in the development of new biotechnological devices to improve the efficiency of cancer treatments. Although my research subjects are quite diverse, I believe that the development of new biotechnological systems could contribute to better human healthcare in the future.

**JEAN-LUC COLL**

Jean-Luc Coll is the director of research at INSERM. His initial training was in molecular biology, and then he focused on cancer. During the last 20 years, he has been working at the interface between biology, chemistry, physics, and medicine with a clinical (veterinary and human) and industrial vision. In particular, Dr. Coll develops nano-particles (i.e., particles of very small size, in the nanometer range) for medical applications such as diagnostic (for example, some of these particles could be detected by medical imaging) or treatment.

**ELENA P. IVANOVA**

I am a distinguished professor at RMIT University. Due to the global increase in untreatable infections caused by antibiotic-resistant bacteria, I am focusing on the design and creation of a new generation of biomaterials. As pioneers in antibacterial surfaces inspired by what can be found in nature, my colleagues, students, and I are developing an innovative concept of eco-friendly bactericidal biomimetic

nanostructured materials, which are capable of killing of all types of bacterial cells including antibiotic-resistant “super-bugs.”



### **VÉRONIQUE MARTEL-FRACHET**

As an associate professor at the Ecole Pratique des Hautes Etudes, I am teaching subjects such as cell biology, cell signaling, and cancerology. I am fascinated by the dialog between cells and their environments. Indeed, extracellular (from the outside) signals collected by cells control their functions and their fates. Even if cells are the basic units of life, we should not consider them as isolated units, but as integrated parts of their environment. I hope that a better understanding of the impact of extracellular signals on cells will help us to develop new therapeutic strategies.

\*[veronique.frachet@ephe.psl.eu](mailto:veronique.frachet@ephe.psl.eu)

## Bibliographie

1. Oury J, Oury F. L'os, un organe pas si inerte.... *médecine/sciences*. 2018;34(1):54-62. doi:10.1051/medsci/20183401014
2. Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab*. 2006;4(5):341-348. doi:10.1016/j.cmet.2006.10.008
3. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 2007;130(3):456-469. doi:10.1016/j.cell.2007.05.047
4. Kanazawa I, Tanaka K, Ogawa N, Yamauchi M, Yamaguchi T, Sugimoto T. Undercarboxylated osteocalcin is positively associated with free testosterone in male patients with type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2013;24(3):1115-1119. doi:10.1007/s00198-012-2017-7
5. Biomaterials: An Introduction - Joon Park, R. S. Lakes - Google Livres. Accessed May 14, 2023. [https://books.google.fr/books?id=bb68wb0R\\_EAC&printsec=frontcover&hl=fr#v=onepage&q&f=false](https://books.google.fr/books?id=bb68wb0R_EAC&printsec=frontcover&hl=fr#v=onepage&q&f=false)
6. Elbourne A, Crawford RJ, Ivanova EP. Nano-structured antimicrobial surfaces: From nature to synthetic analogues. *J Colloid Interface Sci*. 2017;508:603-616. doi:10.1016/j.jcis.2017.07.021
7. Ivanova EP, Linklater DP, Werner M, et al. The multi-faceted mechano-bactericidal mechanism of nanostructured surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(23):12598-12605. doi:10.1073/pnas.1916680117
8. Clainche TL, Linklater D, Wong S, et al. Mechano-Bactericidal Titanium Surfaces for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(43):48272-48283. doi:10.1021/acsami.0c11502
9. Courbebaisse M, Souberbielle JC. Équilibre phosphocalcique : régulation et explorations. *Néphrologie Thérapeutique*. 2011;7(2):118-138. doi:10.1016/j.nephro.2010.12.004
10. Safadi FF, Barbe MF, Abdelmagid SM, et al. Bone Structure, Development and Bone Biology. In: Khurana JS, ed. *Bone Pathology*. Humana Press; 2009:1-50. doi:10.1007/978-1-59745-347-9\_1
11. Cooper DML, Kawailak CE, Harrison K, Johnston BD, Johnston JD. Cortical Bone Porosity: What Is It, Why Is It Important, and How Can We Detect It? *Curr Osteoporos Rep*. 2016;14(5):187-198. doi:10.1007/s11914-016-0319-y
12. McNamara L. 2.210 - Bone as a Material. In: Ducheyne P, ed. *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier; 2011:169-186. doi:10.1016/B978-0-08-055294-1.00068-4
13. Grémare A. Développement d'un modèle original pour étudier la communication des cellules osseuses. In: ; 2014. Accessed June 18, 2023. <https://www.semanticscholar.org/paper/D%C3%A9veloppement-d'un-mod%C3%A8le-original-pour-%C3%A9tudier-la-Gr%C3%A9mare/6693f291575a25249b66763735ff7efe27db587c>
14. Choi K, Kuhn JL, Ciarelli MJ, Goldstein SA. The elastic moduli of human subchondral, trabecular, and cortical bone tissue and the size-dependency of cortical bone modulus. *J Biomech*. 1990;23(11):1103-1113. doi:10.1016/0021-9290(90)90003-L

15. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2008;3(Suppl 3):S131-S139. doi:10.2215/CJN.04151206
16. Liu JY, Wang D, Cheng HH. Experimental study of the osteogenic capacity of periosteal allografts: a preliminary report. *Microsurgery*. 1994;15(2):87-92. doi:10.1002/micr.1920150202
17. Kojimoto H, Yasui N, Goto T, Matsuda S, Shimomura Y. Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *J Bone Joint Surg Br*. 1988;70(4):543-549. doi:10.1302/0301-620X.70B4.3403595
18. Porter JL, Varacallo M. Osteoporosis. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2023. Accessed May 16, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441901/>
19. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys*. 1998;20(2):92-102. doi:10.1016/s1350-4533(98)00007-1
20. Meyrueis P, Cazenave A, Zimmermann R. Biomécanique de l'os. Application au traitement des fractures. *EMC - Rhumatol-Orthopédie*. 2004;1(1):64-93. doi:10.1016/j.emcrho.2003.11.005
21. Walker DG. Osteopetrosis cured by temporary parabiosis. *Science*. 1973;180(4088):875. doi:10.1126/science.180.4088.875
22. Mostov K, Werb Z. Journey Across the Osteoclast. *Science*. 1997;276(5310):219-220. doi:10.1126/science.276.5310.219
23. Weivoda MM, Bradley EW. Macrophages and Bone Remodeling. *J Bone Miner Res*. 2023;38(3):359-369. doi:10.1002/jbmr.4773
24. Kobayashi S, Takahashi HE, Ito A, et al. Trabecular minimodeling in human iliac bone. *Bone*. 2003;32(2):163-169. doi:10.1016/s8756-3282(02)00947-x
25. Ruff C, Holt B, Trinkaus E. Who's afraid of the big bad Wolff?: "Wolff's law" and bone functional adaptation. *Am J Phys Anthropol*. 2006;129(4):484-498. doi:10.1002/ajpa.20371
26. Inoue M, Tanaka H, Moriwake T, Oka M, Sekiguchi C, Seino Y. Altered biochemical markers of bone turnover in humans during 120 days of bed rest. *Bone*. 2000;26(3):281-286. doi:10.1016/s8756-3282(99)00282-3
27. Lerebours C, Buenzli PR. Towards a cell-based mechanostat theory of bone: the need to account for osteocyte desensitisation and osteocyte replacement. *J Biomech*. 2016;49(13):2600-2606. doi:10.1016/j.jbiomech.2016.05.012
28. Pathak JL, Bravenboer N, Klein-Nulend J. The Osteocyte as the New Discovery of Therapeutic Options in Rare Bone Diseases. *Front Endocrinol*. 2020;11. Accessed May 18, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.00405>
29. Hall B. The Embryonic Development of Bone. *Am Sci*. 1988;76:174-181.
30. Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturation Arrest of Osteoblasts.

31. Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone Physiology as Inspiration for Tissue Regenerative Therapies. *Biomaterials*. 2018;185:240-275. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.09.028
32. Hall BK, Miyake T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol*. 1995;39(6):881-893.
33. Provot S, Schipani E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(3):658-665. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.068
34. Lee FY, Choi YW, Behrens FF, DeFouw DO, Einhorn TA. Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 1998;16(1):144-150. doi:10.1002/jor.1100160124
35. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(1):45-54. doi:10.1038/nrrheum.2014.164
36. Sheen JR, Garla VV. Fracture Healing Overview. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2023. Accessed May 12, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551678/>
37. Cheung C. The Future of Bone Healing. *Clin Podiatr Med Surg*. 2005;22(4):631-641. doi:10.1016/j.cpm.2005.07.002
38. Kim PH, Leopold SS. Gustilo-Anderson Classification. *Clin Orthop*. 2012;470(11):3270-3274. doi:10.1007/s11999-012-2376-6
39. Bigham-Sadegh A, Oryan A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. *Int Wound J*. 2015;12(3):238-247. doi:10.1111/iwj.12231
40. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater*. 2017;2(4):224-247. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.05.007
41. Colnot C. Skeletal Cell Fate Decisions Within Periosteum and Bone Marrow During Bone Regeneration. *J Bone Miner Res*. 2009;24(2):274-282. doi:10.1359/jbmr.081003
42. Rosenberg N, Rosenberg O, Soudry M. Osteoblasts in Bone Physiology—Mini Review. *Rambam Maimonides Med J*. 2012;3(2):e0013. doi:10.5041/RMMJ.10080
43. Lo Sicco C, Tasso R. Harnessing Endogenous Cellular Mechanisms for Bone Repair. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;5:52. doi:10.3389/fbioe.2017.00052
44. Bayer EA, Gottardi R, Fedorchak MV, Little SR. The scope and sequence of growth factor delivery for vascularized bone tissue regeneration. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2015;219:129-140. doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.004
45. Yu YY, Lieu S, Lu C, Colnot C. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone*. 2010;47(1):65-73. doi:10.1016/j.bone.2010.03.012
46. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*. 2000;142(1):9-21. doi:10.1530/eje.0.1420009
47. Sales A, Khodr V, Machillot P, et al. Differential bioactivity of four BMP-family members as function of biomaterial stiffness. *Biomaterials*. 2022;281:121363. doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121363

48. Moreno-Miralles I, Schisler JC, Patterson C. New insights into bone morphogenetic protein signaling: focus on angiogenesis. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(3):195-201. doi:10.1097/MOH.0b013e32832a07d6
49. Jiang F, Qi X, Wu X, et al. Regulating macrophage-MSC interaction to optimize BMP-2-induced osteogenesis in the local microenvironment. *Bioact Mater*. 2023;25:307-318. doi:10.1016/j.bioactmat.2023.02.001
50. Dube PR, Birnbaumer L, Vazquez G. Evidence for constitutive bone morphogenetic protein-2 secretion by M1 macrophages: Constitutive auto/paracrine osteogenic signaling by BMP-2 in M1 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491(1):154-158. doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.065
51. Li K, Liu S, Hu T, et al. Optimized Nanointerface Engineering of Micro/Nanostructured Titanium Implants to Enhance Cell–Nanotopography Interactions and Osseointegration. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(2):969-983. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b01717
52. Wilson CG, Martín-Saavedra FM, Vilaboa N, Franceschi RT. Advanced BMP Gene Therapies for Temporal and Spatial Control of Bone Regeneration. *J Dent Res*. 2013;92(5):409-417. doi:10.1177/0022034513483771
53. Wang X, Matthews BG, Yu J, et al. PDGF Modulates BMP2-Induced Osteogenesis in Periosteal Progenitor Cells. *JBMR Plus*. 2019;3(5):e10127. doi:10.1002/jbm4.10127
54. de Gorter DJ, van Dinther M, Korchynskiy O, ten Dijke P. Biphasic effects of transforming growth factor  $\beta$  on bone morphogenetic protein–induced osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2011;26(6):1178-1187. doi:10.1002/jbmr.313
55. Kempen DHR, Creemers LB, Alblas J, et al. Growth Factor Interactions in Bone Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(6):551-566. doi:10.1089/ten.teb.2010.0176
56. Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S, Friedlaender GE. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90 Suppl 1:48-54. doi:10.2106/JBJS.G.01231
57. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*. 2001;19(11):1029-1034. doi:10.1038/nbt1101-1029
58. Magnusson PU, Looman C, Ahgren A, Wu Y, Claesson-Welsh L, Heuchel RL. Platelet-derived growth factor receptor-beta constitutive activity promotes angiogenesis in vivo and in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(10):2142-2149. doi:10.1161/01.ATV.0000282198.60701.94
59. Phipps MC, Xu Y, Bellis SL. Delivery of Platelet-Derived Growth Factor as a Chemotactic Factor for Mesenchymal Stem Cells by Bone-Mimetic Electrospun Scaffolds. *PLOS ONE*. 2012;7(7):e40831. doi:10.1371/journal.pone.0040831
60. Marden LJ, Fan RS, Pierce GF, Reddi AH, Hollinger JO. Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration induced by osteogenin, a bone morphogenetic protein, in rat craniotomy defects. *J Clin Invest*. 1993;92(6):2897-2905. doi:10.1172/JCI116912
61. Zhang M, Yu W, Niibe K, et al. The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Bone Marrow Stromal Cell-Mediated Vascularized Bone Regeneration. *Stem Cells Int*. 2018;2018:3272098. doi:10.1155/2018/3272098

62. Ekaputra AK, Prestwich GD, Cool SM, Hutmacher DW. The three-dimensional vascularization of growth factor-releasing hybrid scaffold of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/collagen fibers and hyaluronic acid hydrogel. *Biomaterials*. 2011;32(32):8108-8117. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.022
63. Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie ABM. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci*. 2012;4(2):64-68. doi:10.1038/ijos.2012.33
64. Massena S, Christoffersson G, Vågesjö E, et al. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood*. 2015;126(17):2016-2026. doi:10.1182/blood-2015-03-631572
65. Wu P, Zhang X, Hu Y, et al. Co-culture with Endothelial Progenitor Cells promotes the Osteogenesis of Bone Mesenchymal Stem Cells via the VEGF-YAP axis in high-glucose environments. *Int J Med Sci*. 2021;18(7):1628-1638. doi:10.7150/ijms.52316
66. Jiang YN, Zhao J, Chu FT, Jiang YY, Tang GH. Tension-loaded bone marrow stromal cells potentiate the paracrine osteogenic signaling of co-cultured vascular endothelial cells. *Biol Open*. 2018;7(6). doi:10.1242/bio.032482
67. Mehta M, Schmidt-Bleek K, Duda GN, Mooney DJ. Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(12):1257-1276. doi:10.1016/j.addr.2012.05.006
68. Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 2016;91:30-38. doi:10.1016/j.bone.2016.06.013
69. Bone & Joint Research Group, Centre for Human Development, Stem Cells and Regeneration, Developmental Origins of Health and Disease, Institute of Developmental Sciences, University of Southampton, Southampton, SO16 6YD, U.K., Kanczler J, Oreffo R. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008;15:100-114. doi:10.22203/eCM.v015a08
70. Rabinovsky ED, Draghia-Akli R. Insulin-like Growth Factor I Plasmid Therapy Promotes in Vivo Angiogenesis. *Mol Ther*. 2004;9(1):46-55. doi:10.1016/j.ymthe.2003.10.003
71. Borges J, Müller MC, Momeni A, Björn Stark G, Torio-Padron N. In vitro analysis of the interactions between preadipocytes and endothelial cells in a 3D fibrin matrix. *Minim Invasive Ther Allied Technol*. 2007;16(3):141-148. doi:10.1080/13645700600935398
72. Tengood JE, Ridenour R, Brodsky R, Russell AJ, Little SR. Sequential Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor for Angiogenesis. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(9-10):1181-1189. doi:10.1089/ten.tea.2010.0551
73. Jin S, Yang C, Huang J, et al. Conditioned medium derived from FGF-2-modified GMSCs enhances migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11:68. doi:10.1186/s13287-020-1584-3
74. Salhotra A, Shah HN, Levi B, Longaker MT. Mechanisms of bone development and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(11):696-711. doi:10.1038/s41580-020-00279-w
75. Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: An update. *Gene*. 2012;498(1):1-4. doi:10.1016/j.gene.2012.01.086

76. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y*. 1992;200(2):165-170. doi:10.3181/00379727-200-43410a
77. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2002;17(3):513-520. doi:10.1359/jbmr.2002.17.3.513
78. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J Cell Physiol*. 1989;140(3):530-537. doi:10.1002/jcp.1041400319
79. You J, Liu M, Li M, et al. The Role of HIF-1 $\alpha$  in Bone Regeneration: A New Direction and Challenge in Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9):8029. doi:10.3390/ijms24098029
80. Tao J, Miao R, Liu G, et al. Spatiotemporal correlation between HIF-1 $\alpha$  and bone regeneration. *FASEB J*. 2022;36(10):e22520. doi:10.1096/fj.202200329RR
81. Tian Y, Shao Q, Tang Y, et al. HIF-1 $\alpha$  regulates osteoclast activation and mediates osteogenesis during mandibular bone repair via CT-1. *Oral Dis*. 2022;28(2):428-441. doi:10.1111/odi.13745
82. Sadowska JM, Ginebra MP. Inflammation and biomaterials: role of the immune response in bone regeneration by inorganic scaffolds. *J Mater Chem B*. 2020;8(41):9404-9427. doi:10.1039/D0TB01379J
83. Almeida CR, Caires HR, Vasconcelos DP, Barbosa MA. NAP-2 Secreted by Human NK Cells Can Stimulate Mesenchymal Stem/Stromal Cell Recruitment. *Stem Cell Rep*. 2016;6(4):466-473. doi:10.1016/j.stemcr.2016.02.012
84. Wang C, Zhao Q, Chen C, et al. CD301b+ macrophage: the new booster for activating bone regeneration in periodontitis treatment. *Int J Oral Sci*. 2023;15:19. doi:10.1038/s41368-023-00225-4
85. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T hua, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, Fracture and Bone Repair. *Bone*. 2016;86:119-130. doi:10.1016/j.bone.2016.02.020
86. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 2016;44(3):450-462. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.015
87. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-Dependent PGE2 Secretion by Mesenchymal Stem Cells Inhibits Local Inflammation in Experimental Arthritis. *PLoS ONE*. 2010;5(12):e14247. doi:10.1371/journal.pone.0014247
88. Wang J, Liu Y, Ding H, Shi X, Ren H. Mesenchymal stem cell-secreted prostaglandin E2 ameliorates acute liver failure via attenuation of cell death and regulation of macrophage polarization. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):15. doi:10.1186/s13287-020-02070-2
89. Moutsitsi NS. Management of infected nonunion of long bones: The last decade (1996–2006). *Injury*. 2008;39(2):155-160. doi:10.1016/j.injury.2007.08.032
90. Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, et al. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone*. 2018;106:78-89. doi:10.1016/j.bone.2015.10.019
91. Morgan EF, Salisbury Palomares KT, Gleason RE, et al. Correlations between Local Strains and Tissue Phenotypes in an Experimental Model of Skeletal Healing. *J Biomech*. 2010;43(12):2418-2424. doi:10.1016/j.jbiomech.2010.04.019

92. Groothuis A, Duda GN, Wilson CJ, et al. Mechanical stimulation of the pro-angiogenic capacity of human fracture haematoma: involvement of VEGF mechano-regulation. *Bone*. 2010;47(2):438-444. doi:10.1016/j.bone.2010.05.026
93. Chen Y, Ju L, Rushdi M, Ge C, Zhu C. Receptor-mediated cell mechanosensing. *Mol Biol Cell*. 2017;28(23):3134-3155. doi:10.1091/mbc.E17-04-0228
94. Mécanobiologie du chondrocyte. Application à l'ingénierie du cartilage – Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps. Accessed May 30, 2023. <https://www.academie-medecine.fr/mecanobiologie-du-chondrocyte-application-a-lingenierie-du-cartilage/>
95. Luo J, Walker M, Xiao Y, Donnelly H, Dalby MJ, Salmeron-Sanchez M. The influence of nanotopography on cell behaviour through interactions with the extracellular matrix - A review. *Bioact Mater*. 2022;15:145-159. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.11.024
96. Zhou DW, Fernández-Yagüe MA, Holland EN, et al. Force-FAK signaling coupling at individual focal adhesions coordinates mechanosensing and microtissue repair. *Nat Commun*. 2021;12(1):2359. doi:10.1038/s41467-021-22602-5
97. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Dev Cell*. 2004;6(4):483-495. doi:10.1016/S1534-5807(04)00075-9
98. Hwang JH, Byun MR, Kim AR, et al. Extracellular Matrix Stiffness Regulates Osteogenic Differentiation through MAPK Activation. Engler AJ, ed. *PLOS ONE*. 2015;10(8):e0135519. doi:10.1371/journal.pone.0135519
99. Killaars AR, Walker CJ, Anseth KS. Nuclear mechanosensing controls MSC osteogenic potential through HDAC epigenetic remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(35):21258-21266. doi:10.1073/pnas.2006765117
100. Stewart S, Darwood A, Masouros S, Higgins C, Ramasamy A. Mechanotransduction in osteogenesis. *Bone Jt Res*. 2020;9(1):1-14. doi:10.1302/2046-3758.91.BJR-2019-0043.R2
101. M T. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 24). doi:10.1242/jcs.075150
102. Parodi V, Jacchetti E, Bresci A, et al. Characterization of Mesenchymal Stem Cell Differentiation within Miniaturized 3D Scaffolds through Advanced Microscopy Techniques. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):E8498. doi:10.3390/ijms21228498
103. Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):802-812. doi:10.1038/nrm3896
104. Bell A, Templeman D, Weinlein JC. Nonunion of the Femur and Tibia. *Orthop Clin North Am*. 2016;47(2):365-375. doi:10.1016/j.ocl.2015.09.010
105. Thomas JD, Kehoe JL. Bone Nonunion. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2023. Accessed May 26, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554385/>
106. Schemitsch EH. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *J Orthop Trauma*. 2017;31 Suppl 5:S20-S22. doi:10.1097/BOT.0000000000000978

- 107.Sanders DW, Bhandari M, Guyatt G, et al. Critical-sized defect in the tibia: is it critical? Results from the SPRINT trial. *J Orthop Trauma*. 2014;28(11):632-635. doi:10.1097/BOT.000000000000194
- 108.Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, Yang YP, Gardner MJ. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur J Orthop Surg Traumatol Orthop Traumatol*. 2018;28(3):351-362. doi:10.1007/s00590-017-2063-0
- 109.Keating JF, Simpson AHRW, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg Br*. 2005;87(2):142-150. doi:10.1302/0301-620x.87b2.15874
- 110.Dobson MA, McDonald DJ, Wessell DE, Friedman MV. Imaging evaluation of treated benign bone tumours. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2015;59(5):599-604. doi:10.1111/1754-9485.12329
- 111.Ki HJ, Lee HJ, Lee HJ, Yi JS, Yang JH, Lee IW. The Risk Factors for Hydrocephalus and Subdural Hygroma after Decompressive Craniectomy in Head Injured Patients. *J Korean Neurosurg Soc*. 2015;58(3):254. doi:10.3340/jkns.2015.58.3.254
- 112.Haeseker B. Mr. Job van Meekeren (1611-1666) and surgery of the hand. *Plast Reconstr Surg*. 1988;82(3):539-546. doi:10.1097/00006534-198809000-00034
- 113.de Boer HH. The history of bone grafts. *Clin Orthop*. 1988;(226):292-298.
- 114.Hampel GA, Yilmaz E, Massrey C, et al. History of Bone Grafts in Spine Surgery. *Cureus*. 14(5):e24655. doi:10.7759/cureus.24655
- 115.Turner WG. The Use of the Bone Graft in Surgery. *Can Med Assoc J*. 1915;5(2):103-109.
- 116.Sun Y, Zhang C, Jin D, et al. Free vascularised fibular grafting in the treatment of large skeletal defects due to osteomyelitis. *Int Orthop*. 2010;34(3):425-430. doi:10.1007/s00264-009-0761-x
- 117.Pape HC, Evans A, Kobbe P. Autologous Bone Graft: Properties and Techniques. *J Orthop Trauma*. 2010;24:S36. doi:10.1097/BOT.0b013e3181cec4a1
- 118.Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941-2953. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023
- 119.Tamaddon M, Samizadeh S, Wang L, Blunn G, Liu C. Intrinsic Osteoinductivity of Porous Titanium Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Int J Biomater*. 2017;2017:e5093063. doi:10.1155/2017/5093063
- 120.Lotz EM, Olivares-Navarrete R, Berner S, Boyan BD, Schwartz Z. Osteogenic response of human MSCs and osteoblasts to hydrophilic and hydrophobic nanostructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2016;104(12):3137-3148. doi:10.1002/jbm.a.35852
- 121.Xing Z, Cai J, Sun Y, et al. Altered Surface Hydrophilicity on Copolymer Scaffolds Stimulate the Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Polymers*. 2020;12(7). doi:10.3390/polym12071453
- 122.Huang J, Chen Y, Tang C, et al. The relationship between substrate topography and stem cell differentiation in the musculoskeletal system. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2019;76(3):505-521. doi:10.1007/s00018-018-2945-2

- 123.Zhang Y, Fan Z, Xing Y, Jia S, Mo Z, Gong H. Effect of microtopography on osseointegration of implantable biomaterials and its modification strategies. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:981062. doi:10.3389/fbioe.2022.981062
- 124.Yun Y, Dong Z, Lee N, et al. Revolutionizing biodegradable metals. *Mater Today.* 2009;12(10):22-32. doi:10.1016/S1369-7021(09)70273-1
- 125.Annibali S, Bellavia D, Ottolenghi L, et al. Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial “critical size” defect: Preliminary data: Micro-Ct/Pet Study Of Bone Regeneration in Critical Size Defect. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014;102(4):815-825. doi:10.1002/jbm.b.33064
- 126.Eliaz N. Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review. *Materials.* 2019;12(3):407. doi:10.3390/ma12030407
- 127.Lv H, Wang H, Zhang Z, et al. Biomaterial stiffness determines stem cell fate. *Life Sci.* 2017;178:42-48. doi:10.1016/j.lfs.2017.04.014
- 128.Hou Y, Yu L, Xie W, et al. Surface Roughness and Substrate Stiffness Synergize To Drive Cellular Mechanoreponse. *Nano Lett.* 2020;20(1):748-757. doi:10.1021/acs.nanolett.9b04761
- 129.Galli C, Collaud Coen M, Hauert R, et al. Protein adsorption on topographically nanostructured titanium. *Surf Sci.* 2001;474(1):L180-L184. doi:10.1016/S0039-6028(00)01054-2
- 130.Manzi BM, Werner M, Ivanova EP, Crawford RJ, Baulin VA. Simulations of Protein Adsorption on Nanostructured Surfaces. *Sci Rep.* 2019;9(1):4694. doi:10.1038/s41598-019-40920-z
- 131.Etulain J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. *Platelets.* 2018;29(6):556-568. doi:10.1080/09537104.2018.1430357
- 132.R H, Z W, H W, et al. Matrix stiffness-induced platelet activation determines immunomodulation of macrophages. *Biomater Adv.* 2023;148. doi:10.1016/j.bioadv.2023.213356
- 133.Bai L, Zhao Y, Chen P, et al. Targeting Early Healing Phase with Titania Nanotube Arrays on Tunable Diameters to Accelerate Bone Regeneration and Osseointegration. *Small Weinh Bergstr Ger.* 2021;17(4):e2006287. doi:10.1002/smll.202006287
- 134.van Oeveren W, Haan J, Lagerman P, Schoen P. Comparison of Coagulation Activity Tests In Vitro for Selected Biomaterials. *Artif Organs.* 2002;26(6):506-511. doi:10.1046/j.1525-1594.2002.06872.x
- 135.Kumaravel TS, Brabu B, Parthiban N, Murugan SS, Jha AN. “Site of contact genotoxicity” assessment for implants - Potential use of single cell gel electrophoresis in biocompatibility testing of medical devices. *Toxicol Lett.* 2021;341:59-67. doi:10.1016/j.toxlet.2021.01.024
- 136.Bajantri P, Rodrigues SJ, Shama Prasada K, et al. Cytotoxicity of Dental Cements on Soft Tissue Associated with Dental Implants. *Int J Dent.* 2022;2022:4916464. doi:10.1155/2022/4916464
- 137.Fu X, Liu P, Zhao D, et al. Effects of Nanotopography Regulation and Silicon Doping on Angiogenic and Osteogenic Activities of Hydroxyapatite Coating on Titanium Implant. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:4171-4189. doi:10.2147/IJN.S252936
- 138.Renard E, Amiaud J, Delbos L, et al. Dental pulp inflammatory/immune response to a chitosan-enriched fibrin hydrogel in the pulpotomised rat incisor. *Eur Cell Mater.* 2020;40:74-87. doi:10.22203/eCM.v040a05

139. Bai L, Chen P, Zhao Y, et al. A micro/nano-biomimetic coating on titanium orchestrates osteo/angiogenesis and osteoimmunomodulation for advanced osseointegration. *Biomaterials*. 2021;278:121162. doi:10.1016/j.biomaterials.2021.121162
140. Hosseinpour S, Walsh LJ, Xu C. Modulating Osteoimmune Responses by Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Biomater Sci Eng*. Published online November 13, 2021. doi:10.1021/acsbomaterials.1c00899
141. Liu X, Li S, Meng Y, et al. Osteoclast differentiation and formation induced by titanium implantation through complement C3a. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;122:111932. doi:10.1016/j.msec.2021.111932
142. Lopes HB, Freitas GP, Fantacini DMC, et al. Titanium with nanotopography induces osteoblast differentiation through regulation of integrin  $\alpha$ V. *J Cell Biochem*. 2019;120(10):16723-16732. doi:10.1002/jcb.28930
143. Modaresifar K, Ganjian M, Angeloni L, et al. On the Use of Black Ti as a Bone Substituting Biomaterial: Behind the Scenes of Dual-Functionality. *Small*. 2021;17(24):2100706. doi:10.1002/smll.202100706
144. Bighetti-Trevisan RL, Almeida LO, Castro-Raucci LMS, et al. Titanium with nanotopography attenuates the osteoclast-induced disruption of osteoblast differentiation by regulating histone methylation. *Mater Sci Eng C*. Published online November 13, 2021:112548. doi:10.1016/j.msec.2021.112548
145. Thomas S, Jaganathan BG. Signaling network regulating osteogenesis in mesenchymal stem cells. *J Cell Commun Signal*. Published online July 8, 2021. doi:10.1007/s12079-021-00635-1
146. Olivares-Navarrete R, Lee EM, Smith K, et al. Substrate Stiffness Controls Osteoblastic and Chondrocytic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells without Exogenous Stimuli. van Wijnen A, ed. *PLOS ONE*. 2017;12(1):e0170312. doi:10.1371/journal.pone.0170312
147. Park JS, Chu JS, Tsou AD, et al. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- $\beta$ . *Biomaterials*. 2011;32(16):3921-3930. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.019
148. Comino-Garayoa R, Cortés-Bretón Brinkmann J, Peláez J, López-Suárez C, Martínez-González JM, Suárez MJ. Allergies to Titanium Dental Implants: What Do We Really Know about Them? A Scoping Review. *Biology*. 2020;9(11):404. doi:10.3390/biology9110404
149. Thomas P, Summer B. Implant allergy. *Allergol Sel*. 2017;1(1):59-64. doi:10.5414/ALX01394E
150. Pessková V, Kubies D, Hulejová H, Himmlová L. The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(3):465-473. doi:10.1007/s10856-007-2006-0
151. Wang Z, Han T, Zhu H, et al. Potential Osteoinductive Effects of Hydroxyapatite Nanoparticles on Mesenchymal Stem Cells by Endothelial Cell Interaction. *Nanoscale Res Lett*. 2021;16(1):67. doi:10.1186/s11671-021-03522-1
152. Böhner M, Santoni BLG, Döbelin N.  $\beta$ -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater*. 2020;113:23-41. doi:10.1016/j.actbio.2020.06.022
153. Deng K, Liu Z, Dou W, Cai Q, Ma W, Wang S. HA/ $\beta$ -TCP Biphasic Calcium Phosphate Ceramics Derived From Butterfish Bones Loaded With Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Osteogenesis. *Front Mater*. 2022;9. Accessed June 1, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmats.2022.928075>

154. Faruq O, Sayed S, Kim B, Im S, Lee B. A biphasic calcium phosphate ceramic scaffold loaded with oxidized cellulose nanofiber–gelatin hydrogel with immobilized simvastatin drug for osteogenic differentiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. Published online August 13, 2019;jbm.b.34471. doi:10.1002/jbm.b.34471
155. Calabrese G, Giuffrida R, Fabbi C, et al. Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Human Adipose Derived Stem Cells Osteogenic Differentiation In Vitro. Vanella L, ed. *PLOS ONE*. 2016;11(3):e0151181. doi:10.1371/journal.pone.0151181
156. Zhang D, Gao P, Li Q, et al. Engineering biomimetic periosteum with  $\beta$ -TCP scaffolds to promote bone formation in calvarial defects of rats. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8:134. doi:10.1186/s13287-017-0592-4
157. Bellis SL. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*. 2011;32(18):4205-4210. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.029
158. Yuan Z, Tao B, He Y, et al. Biocompatible MoS<sub>2</sub>/PDA-RGD coating on titanium implant with antibacterial property via intrinsic ROS-independent oxidative stress and NIR irradiation. *Biomaterials*. 2019;217:119290. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119290
159. Schwartz J, Avaltroni MJ, Danahy MP, et al. Cell attachment and spreading on metal implant materials. *Mater Sci Eng C*. 2003;23(3):395-400. doi:10.1016/S0928-4931(02)00310-7
160. Kon E, Salamanna F, Filardo G, et al. Bone Regeneration in Load-Bearing Segmental Defects, Guided by Biomimetic, Hierarchically Structured Apatitic Scaffold. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9. Accessed May 2, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.734486>
161. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474-5491. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002
162. Senoo M, Hasuike A, Yamamoto T, et al. Comparison of Macro-and Micro-porosity of a Titanium Mesh for Guided Bone Regeneration: An In Vivo Experimental Study. *In Vivo*. 2022;36(1):76-85. doi:10.21873/invivo.12678
163. Mour M, Das D, Winkler T, et al. Advances in Porous Biomaterials for Dental and Orthopaedic Applications. *Materials*. 2010;3(5):2947-2974. doi:10.3390/ma3052947
164. Kazimierczak P, Przekora A. Osteoconductive and Osteoinductive Surface Modifications of Biomaterials for Bone Regeneration: A Concise Review. *Coatings*. 2020;10(10):971. doi:10.3390/coatings10100971
165. Xuan Y, Li L, Zhang C, Zhang M, Cao J, Zhang Z. The 3D-Printed Ordered Bredigite Scaffold Promotes Pro-Healing of Critical-Sized Bone Defects by Regulating Macrophage Polarization. *Int J Nanomedicine*. 2023;18:917-932. doi:10.2147/IJN.S393080
166. Chen H, Wang C, Zhu X, Zhang K, Fan Y, Zhang X. Fabrication of porous titanium scaffolds by stack sintering of microporous titanium spheres produced with centrifugal granulation technology. *Mater Sci Eng C*. 2014;43:182-188. doi:10.1016/j.msec.2014.07.026
167. Zhang H, Mao X, Du Z, et al. Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *Sci Technol Adv Mater*. 2016;17(1):136-148. doi:10.1080/14686996.2016.1145532

168. Dec P, Modrzejewski A, Pawlik A. Existing and Novel Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1):529. doi:10.3390/ijms24010529
169. Amarasekara DS, Kim S, Rho J. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):2851. doi:10.3390/ijms22062851
170. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983;50(3):399-410. doi:10.1016/s0022-3913(83)80101-2
171. Zhang J, Liu J, Wang C, Chen F, Wang X, Lin K. A comparative study of the osteogenic performance between the hierarchical micro/submicro-textured 3D-printed Ti6Al4V surface and the SLA surface. *Bioact Mater.* 2020;5(1):9-16. doi:10.1016/j.bioactmat.2019.12.008
172. Jordana F, Visage CL, Weiss P. Substituts osseux. *médecine/sciences.* 2017;33(1):60-65. doi:10.1051/medsci/20173301010
173. Rahyussalim AJ, Supriadi S, Marsetio AF, Pribadi PM, Suharno B. The potential of carbonate apatite as an alternative bone substitute material. *Med J Indones.* 2019;28(1):92-97. doi:10.13181/mji.v28i1.2681
174. Singh R, Singh D, Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World J Radiol.* 2016;8(4):355-369. doi:10.4329/wjr.v8.i4.355
175. Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng.* 2018;9:2041731418776819. doi:10.1177/2041731418776819
176. Bhatt RA, Rozental TD. Bone graft substitutes. *Hand Clin.* 2012;28(4):457-468. doi:10.1016/j.hcl.2012.08.001
177. Gillman CE, Jayasuriya AC. FDA-Approved Bone Grafts and Bone Graft Substitute Devices in Bone Regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021;130:112466. doi:10.1016/j.msec.2021.112466
178. Pawelec KM, Planell JA, eds. Copyright. In: *Bone Repair Biomaterials (Second Edition)*. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Woodhead Publishing; 2019:iv. doi:10.1016/B978-0-08-102451-5.12001-3
179. Clainche TL. Optimisation de microporteurs pour l'amplification de cellules souches mésenchymateuses et étude des propriétés ostéogéniques de nouveaux biomatériaux bactéricides.
180. Kaur M, Singh K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. *Mater Sci Eng C.* 2019;102:844-862. doi:10.1016/j.msec.2019.04.064
181. Shekhawat D, Singh A, Bhardwaj A, Patnaik A. A Short Review on Polymer, Metal and Ceramic Based Implant Materials. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* 2021;1017(1):012038. doi:10.1088/1757-899X/1017/1/012038
182. Plecko M, Sievert C, Andermatt D, et al. Osseointegration and biocompatibility of different metal implants - a comparative experimental investigation in sheep. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012;13(1):32. doi:10.1186/1471-2474-13-32

183. Chao L, Jiao C, Liang H, Xie D, Shen L, Liu Z. Analysis of Mechanical Properties and Permeability of Trabecular-Like Porous Scaffold by Additive Manufacturing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9. Accessed June 5, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.779854>
184. Sampath TK, Reddi AH. Discovery of bone morphogenetic proteins - A historical perspective. *Bone.* 2020;140:115548. doi:10.1016/j.bone.2020.115548
185. Alt V, Donell ST, Chhabra A, Bentley A, Eicher A, Schnettler R. A health economic analysis of the use of rhBMP-2 in Gustilo–Anderson grade III open tibial fractures for the UK, Germany, and France. *Injury.* 2009;40(12):1269-1275. doi:10.1016/j.injury.2009.02.007
186. Tollemar V, Collier ZJ, Mohammed MK, Lee MJ, Ameer GA, Reid RR. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. *Genes Dis.* 2015;3(1):56-71. doi:10.1016/j.gendis.2015.09.004
187. Hanawa T. Titanium-Tissue Interface Reaction and Its Control With Surface Treatment. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:170. doi:10.3389/fbioe.2019.00170
188. Street F. INTERNATIONAL TITANIUM ASSOCIATION.
189. Merola M, Affatato S. Materials for Hip Prostheses: A Review of Wear and Loading Considerations. *Materials.* 2019;12(3):495. doi:10.3390/ma12030495
190. Hernigou P. Les prothèses totales de hanche. *Bull Académie Natl Médecine.* 2018;202(5-6):1063-1070. doi:10.1016/S0001-4079(19)30273-0
191. BENOKBA DK. Luxation de la prothèse totale de hanche (PTH). Santé Orthopédique. Published June 25, 2018. Accessed June 8, 2023. <https://sante.orthodz.com/2018/06/25/luxation-de-la-prothese-totale-de-hanche-pth/>
192. Morales-Gómez JA, Garcia-Estrada E, Leos-Bortoni JE, et al. Cranioplasty with a low-cost customized polymethylmethacrylate implant using a desktop 3D printer. *J Neurosurg.* 2018;130(5):1721-1727. doi:10.3171/2017.12.JNS172574
193. Chattopadhyay C. Reconstruction of Acquired Frontal Bone Defects Using Titanium Mesh Implants: A Retrospective Study. *J Maxillofac Oral Surg.* 2019;18(1):34-39. doi:10.1007/s12663-018-1083-6
194. Yang J, Sun T, Yuan Y, Li X, Yu H, Guan J. Evaluation of titanium mesh cranioplasty and polyetheretherketone cranioplasty: protocol for a multicentre, assessor-blinded, randomised controlled trial. *BMJ Open.* 2019;9(12):e033997. doi:10.1136/bmjopen-2019-033997
195. Mousa M, Eissa S, Raslan M, Abu EINaga B, Balaha A. Evaluation of three different methods of cranioplasty; a comparative prospective randomized study. *Pan Arab J Neurosurg.* 2021;16(2):71-79. doi:10.21608/pajn.2021.86841.1030
196. Delanois RE, Mistry JB, Gwam CU, Mohamed NS, Choksi US, Mont MA. Current Epidemiology of Revision Total Knee Arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty.* 2017;32(9):2663-2668. doi:10.1016/j.arth.2017.03.066
197. Williams LR, Fan KF, Bentley RP. Custom-made titanium cranioplasty: early and late complications of 151 cranioplasties and review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(5):599-608. doi:10.1016/j.ijom.2014.09.006

198. Wiggins A, Austerberry R, Morrison D, Ho KM, Honeybul S. Cranioplasty with custom-made titanium plates--14 years experience. *Neurosurgery*. 2013;72(2):248-256; discussion 256. doi:10.1227/NEU.0b013e31827b98f3
199. Mukherjee S, Thakur B, Haq I, Hettige S, Martin AJ. Complications of titanium cranioplasty--a retrospective analysis of 174 patients. *Acta Neurochir (Wien)*. 2014;156(5):989-998; discussion 998. doi:10.1007/s00701-014-2024-x
200. Hill CS, Luoma AMV, Wilson SR, Kitchen N. Titanium cranioplasty and the prediction of complications. *Br J Neurosurg*. 2012;26(6):832-837. doi:10.3109/02688697.2012.692839
201. Fallatah MA, Aldahlawi A, Babateen EM, et al. Outcomes of Cranioplasty: A Single-Center Experience. *Cureus*. Published online February 20, 2023. doi:10.7759/cureus.35213
202. Zhao Y, Bai L, Zhang Y, et al. Type I collagen decorated nanoporous network on titanium implant surface promotes osseointegration through mediating immunomodulation, angiogenesis, and osteogenesis. *Biomaterials*. 2022;288:121684. doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121684
203. Huanhuan J, Pengjie H, Sheng X, Binchen W, Li S. The effect of strontium-loaded rough titanium surface on early osseointegration. *J Biomater Appl*. 2017;32(5):561-569. doi:10.1177/0885328217735953
204. Zhao Q, Yi L, Jiang L, Ma Y, Lin H, Dong J. Surface functionalization of titanium with zinc/strontium-doped titanium dioxide microporous coating via microarc oxidation. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2019;16:149-161. doi:10.1016/j.nano.2018.12.006
205. Lee JS, Lee JC, Heo JS. Polydopamine-assisted BMP-2 immobilization on titanium surface enhances the osteogenic potential of periodontal ligament stem cells via integrin-mediated cell-matrix adhesion. *J Cell Commun Signal*. 2018;12(4):661-672. doi:10.1007/s12079-018-0468-0
206. Souza ATP, Bezerra BLS, Oliveira FS, et al. Effect of bone morphogenetic protein 9 on osteoblast differentiation of cells grown on titanium with nanotopography. *J Cell Biochem*. 2018;119(10):8441-8449. doi:10.1002/jcb.27060
207. Díaz-Gómez L, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, et al. Biodegradable electrospun nanofibers coated with platelet-rich plasma for cell adhesion and proliferation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;40:180-188. doi:10.1016/j.msec.2014.03.065
208. Zhao DW, Zuo KQ, Wang K, et al. Interleukin-4 assisted calcium-strontium-zinc-phosphate coating induces controllable macrophage polarization and promotes osseointegration on titanium implant. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;118:111512. doi:10.1016/j.msec.2020.111512
209. Bright R, Hayles A, Wood J, et al. Bio-Inspired Nanostructured Ti-6Al-4V Alloy: The Role of Two Alkaline Etchants and the Hydrothermal Processing Duration on Antibacterial Activity. *Nanomaterials*. 2022;12(7):1140. doi:10.3390/nano12071140
210. Huang L, Cai B, Huang Y, et al. Comparative Study on 3D Printed Ti6Al4V Scaffolds with Surface Modifications Using Hydrothermal Treatment and Microarc Oxidation to Enhance Osteogenic Activity. *ACS Omega*. 2021;6(2):1465-1476. doi:10.1021/acsomega.0c05191
211. Li L, Yang S, Xu L, et al. Nanotopography on titanium promotes osteogenesis via autophagy-mediated signaling between YAP and  $\beta$ -catenin. *Acta Biomater*. 2019;96:674-685. doi:10.1016/j.actbio.2019.07.007

212. Alves SA, Patel SB, Sukotjo C, et al. Synthesis of calcium-phosphorous doped TiO<sub>2</sub> nanotubes by anodization and reverse polarization: A promising strategy for an efficient biofunctional implant surface. *Appl Surf Sci.* 2017;399:682-701. doi:10.1016/j.apsusc.2016.12.105
213. Hao L, Yang H, Du C, et al. Directing the fate of human and mouse mesenchymal stem cells by hydroxyl-methyl mixed self-assembled monolayers with varying wettability. *J Mater Chem B Mater Biol Med.* 2014;2(30):4794-4801. doi:10.1039/C4TB00597J
214. Huang YZ, He SK, Guo ZJ, et al. Nanostructured titanium surfaces fabricated by hydrothermal method: Influence of alkali conditions on the osteogenic performance of implants. *Mater Sci Eng C.* 2019;94:1-10. doi:10.1016/j.msec.2018.08.069
215. Steward AJ, Kelly DJ. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J Anat.* 2015;227(6):717-731. doi:10.1111/joa.12243
216. Saidova AA, Vorobjev IA. Lineage Commitment, Signaling Pathways, and the Cytoskeleton Systems in Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019;26(1):13-25. doi:10.1089/ten.teb.2019.0250
217. Doss BL, Pan M, Gupta M, et al. Cell response to substrate rigidity is regulated by active and passive cytoskeletal stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(23):12817-12825. doi:10.1073/pnas.1917555117
218. Sabra H, Brunner M, Mandati V, et al.  $\beta$ 1 integrin-dependent Rac/group I PAK signaling mediates YAP activation of Yes-associated protein 1 (YAP1) via NF2/merlin. *J Biol Chem.* 2017;292(47):19179-19197. doi:10.1074/jbc.M117.808063
219. Wang K, Bruce A, Mezan R, et al. Nanotopographical Modulation of Cell Function through Nuclear Deformation. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(8):5082-5092. doi:10.1021/acsami.5b10531
220. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater.* 2007;6(12):997-1003. doi:10.1038/nmat2013
221. Metavarayuth K, Sitasuwan P, Zhao X, Lin Y, Wang Q. Influence of Surface Topographical Cues on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *ACS Biomater Sci Eng.* 2016;2(2):142-151. doi:10.1021/acsbmaterials.5b00377
222. Bertrand AA, Malapati SH, Yamaguchi DT, Lee JC. The Intersection of Mechanotransduction and Regenerative Osteogenic Materials. *Adv Healthc Mater.* 2020;9(20):2000709. doi:https://doi.org/10.1002/adhm.202000709
223. Teo BKK, Wong ST, Lim CK, et al. Nanotopography Modulates Mechanotransduction of Stem Cells and Induces Differentiation through Focal Adhesion Kinase. *ACS Nano.* 2013;7(6):4785-4798. doi:10.1021/nn304966z
224. Lopes HB, Freitas GP, Elias CN, et al. Participation of integrin  $\beta$ 3 in osteoblast differentiation induced by titanium with nano or microtopography. *J Biomed Mater Res A.* 2019;107(6):1303-1313. doi:10.1002/jbm.a.36643
225. Yang L, Gao Q, Ge L, et al. Topography induced stiffness alteration of stem cells influences osteogenic differentiation. *Biomater Sci.* 2020;8(9):2638-2652. doi:10.1039/D0BM00264J
226. Niethammer P. Components and Mechanisms of Nuclear Mechanotransduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2021;37:233-256. doi:10.1146/annurev-cellbio-120319-030049

227. Doolin MT, Ornstein TS, Stroka KM. Nuclear Deformation in Response to Mechanical Confinement is Cell Type Dependent. *Cells*. 2019;8(5):427. doi:10.3390/cells8050427
228. Zhao Y, Sun Q, Wang S, Huo B. Spreading Shape and Area Regulate the Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Regen Med*. 2019;16(6):573-583. doi:10.1007/s13770-019-00213-y
229. Ji Z, Wan Y, Wang H, et al. Effects of surface morphology and composition of titanium implants on osteogenesis and inflammatory responses: a review. *Biomed Mater*. 2023;18(4):042002. doi:10.1088/1748-605X/acd976
230. Chen M, Hu Y, Hou Y, et al. Osteogenesis regulation of mesenchymal stem cells via autophagy induced by silica–titanium composite surfaces with different mechanical moduli. *J Mater Chem B*. 2020;8(40):9314-9324. doi:10.1039/D0TB01412E
231. Hasegawa M, Saruta J, Hirota M, et al. A Newly Created Meso-, Micro-, and Nano-Scale Rough Titanium Surface Promotes Bone-Implant Integration. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):783. doi:10.3390/ijms21030783
232. Yu M, Wan Y, Ren B, et al. 3D Printed Ti–6Al–4V Implant with a Micro/Nanostructured Surface and Its Cellular Responses. *ACS Omega*. 2020;5(49):31738-31743. doi:10.1021/acsomega.0c04373
233. Wang W, Xiong Y, Zhao R, Li X, Jia W. A novel hierarchical biofunctionalized 3D-printed porous Ti6Al4V scaffold with enhanced osteoporotic osseointegration through osteoimmunomodulation. *J Nanobiotechnology*. 2022;20:68. doi:10.1186/s12951-022-01277-0
234. Chen M, Hu Y, Hou Y, et al. Magnesium/gallium-layered nanosheets on titanium implants mediate osteogenic differentiation of MSCs and osseointegration under osteoporotic condition. *Chem Eng J*. 2022;427:130982. doi:10.1016/j.cej.2021.130982
235. Calabrese G, Franco D, Petralia S, et al. Dual-Functional Nano-Functionalized Titanium Scaffolds to Inhibit Bacterial Growth and Enhance Osteointegration. *Nanomaterials*. 2021;11(10):2634. doi:10.3390/nano11102634
236. Xu R, Cui X, Xin Q, et al. Zwitterionic PMCP-functionalized titanium surface resists protein adsorption, promotes cell adhesion, and enhances osteogenic activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2021;206:111928. doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111928
237. Yin X, Yang C, Wang Z, et al. Alginate/chitosan modified immunomodulatory titanium implants for promoting osteogenesis in vitro and in vivo. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;124:112087. doi:10.1016/j.msec.2021.112087
238. Park JW, Han SH, Hanawa T. Effects of Surface Nanotopography and Calcium Chemistry of Titanium Bone Implants on Early Blood Platelet and Macrophage Cell Function. *BioMed Res Int*. 2018;2018:1362958. doi:10.1155/2018/1362958
239. Chen Z, Bachhuka A, Wei F, et al. Nanotopography-based strategy for the precise manipulation of osteoimmunomodulation in bone regeneration. *Nanoscale*. 2017;9(46):18129-18152. doi:10.1039/C7NR05913B
240. Ouyang L, Cao J, Dai Q, Qiu D. New insight of immuno-engineering in osteoimmunomodulation for bone regeneration. *Regen Ther*. 2021;18:24-29. doi:10.1016/j.reth.2021.03.003

241. Zhao T, Chu Z, Ma J, Ouyang L. Immunomodulation Effect of Biomaterials on Bone Formation. *J Funct Biomater*. 2022;13(3):103. doi:10.3390/jfb13030103
242. Kim J, Kim HN, Lim KT, et al. Synergistic effects of nanotopography and co-culture with endothelial cells on osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2013;34(30):7257-7268. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.029
243. Steward AJ, Cole JH, Ligler FS, Lobo EG. Mechanical and Vascular Cues Synergistically Enhance Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(15-16):997-1005. doi:10.1089/ten.TEA.2015.0533
244. Chen J, Deng L, Porter C, et al. Angiogenic and Osteogenic Synergy of Human Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells Cocultured on a Nanomatrix. *Sci Rep*. 2018;8(1):15749. doi:10.1038/s41598-018-34033-2
245. Mohiuddin M, Pan HA, Hung YC, Huang GS. Control of growth and inflammatory response of macrophages and foam cells with nanotopography. *Nanoscale Res Lett*. 2012;7(1):394. doi:10.1186/1556-276X-7-394
246. Chen Z, Bachhuka A, Han S, et al. Tuning Chemistry and Topography of Nanoengineered Surfaces to Manipulate Immune Response for Bone Regeneration Applications. *ACS Nano*. 2017;11(5):4494-4506. doi:10.1021/acsnano.6b07808
247. Hotchkiss KM, Reddy GB, Hyzy SL, Schwartz Z, Boyan BD, Olivares-Navarrete R. Titanium Surface Characteristics, Including Topography and Wettability, Alter Macrophage Activation. *Acta Biomater*. 2016;31:425-434. doi:10.1016/j.actbio.2015.12.003
248. Wu Z, Xu Y, Li H. Synergetic stimulation of nanostructure and chemistry cues on behaviors of fibroblasts and endothelial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;160:500-509. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.10.002
249. Greiner AM, Sales A, Chen H, Biela SA, Kaufmann D, Kemkemer R. Nano- and microstructured materials for in vitro studies of the physiology of vascular cells. *Beilstein J Nanotechnol*. 2016;7:1620-1641. doi:10.3762/bjnano.7.155
250. Bai L, Du Z, Du J, et al. A multifaceted coating on titanium dictates osteoimmunomodulation and osteo/angio-genesis towards ameliorative osseointegration. *Biomaterials*. 2018;162:154-169. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.02.010
251. Raines AL, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Cochran DL, Schwartz Z, Boyan BD. Regulation of angiogenesis during osseointegration by titanium surface microstructure and energy. *Biomaterials*. 2010;31(18):4909-4917. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.071
252. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(7):397-409. doi:10.1038/s41579-018-0019-y
253. Song Z, Borgwardt L, Høiby N, Wu H, Sørensen TS, Borgwardt A. Prosthesis Infections after Orthopedic Joint Replacement: The Possible Role of Bacterial Biofilms. *Orthop Rev*. 2013;5(2):e14. doi:10.4081/or.2013.e14
254. Stracquadanio S, Musso N, Costantino A, Lazzaro LM, Stefani S, Bongiorno D. Staphylococcus aureus Internalization in Osteoblast Cells: Mechanisms, Interactions and Biochemical Processes. What Did We Learn from Experimental Models? *Pathogens*. 2021;10(2):239. doi:10.3390/pathogens10020239

255. Dogan KH. *Wound Healing: Current Perspectives*. BoD – Books on Demand; 2019.
256. Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19(4):349-356. doi:10.1097/01.qco.0000235161.85925.e8
257. Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(7):465-478. doi:10.1038/nrmicro3270
258. Maimaiti Z, Li Z, Xu C, et al. Host Immune Regulation in Implant-Associated Infection (IAI): What Does the Current Evidence Provide Us to Prevent or Treat IAI? *Bioengineering*. 2023;10(3):356. doi:10.3390/bioengineering10030356
259. Lu X, Wu Z, Xu K, et al. Multifunctional Coatings of Titanium Implants Toward Promoting Osseointegration and Preventing Infection: Recent Developments. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9. Accessed June 6, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.783816>
260. Akshaya S, Rowlo PK, Dukle A, Nathanael AJ. Antibacterial Coatings for Titanium Implants: Recent Trends and Future Perspectives. *Antibiotics*. 2022;11(12):1719. doi:10.3390/antibiotics11121719
261. Liu J, Liu J, Attarilar S, et al. Nano-Modified Titanium Implant Materials: A Way Toward Improved Antibacterial Properties. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8. Accessed June 17, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.576969>
262. Modaresifar K, Azizian S, Ganjian M, Fratila-Apachitei LE, Zadpoor AA. Bactericidal effects of nanopatterns: A systematic review. *Acta Biomater*. 2019;83:29-36. doi:10.1016/j.actbio.2018.09.059
263. Liu D, He C, Liu Z, Xu W. Gentamicin coating of nanotubular anodized titanium implant reduces implant-related osteomyelitis and enhances bone biocompatibility in rabbits. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:5461-5471. doi:10.2147/IJN.S137137
264. Hickok NJ, Shapiro IM. Immobilized antibiotics to prevent orthopedic implant infections. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(12):1165-1176. doi:10.1016/j.addr.2012.03.015
265. Nie B, Ao H, Zhou J, Tang T, Yue B. Biofunctionalization of titanium with bacitracin immobilization shows potential for anti-bacteria, osteogenesis and reduction of macrophage inflammation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;145:728-739. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.05.089
266. Gunes H, Gulen D, Mutlu R, Gumus A, Tas T, Topkaya AE. Antibacterial effects of curcumin: An in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicol Ind Health*. 2016;32(2):246-250. doi:10.1177/0748233713498458
267. Aksakal B, Demirel M. In vitro study of antimicrobial and cell viability on newly synthesized bioglass-based bone grafts: Effects of selenium and silver additions. *Proc Inst Mech Eng [H]*. 2018;232(10):1039-1047. doi:10.1177/0954411918797968
268. Zhang Y, Liu X, Li Z, et al. Nano Ag/ZnO-Incorporated Hydroxyapatite Composite Coatings: Highly Effective Infection Prevention and Excellent Osteointegration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(1):1266-1277. doi:10.1021/acsami.7b17351
269. Gritsch L, Lovell C, Goldmann WH, Boccaccini AR. Fabrication and characterization of copper(II)-chitosan complexes as antibiotic-free antibacterial biomaterial. *Carbohydr Polym*. 2018;179:370-378. doi:10.1016/j.carbpol.2017.09.095

270. Sergi R, Bellucci D, Candidato RT, et al. Bioactive Zn-doped hydroxyapatite coatings and their antibacterial efficacy against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Surf Coat Technol.* 2018;352:84-91. doi:10.1016/j.surfcoat.2018.08.017
271. Jin G, Cao H, Qiao Y, Meng F, Zhu H, Liu X. Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc ion implanted titanium. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;117:158-165. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.025
272. Zhao QM, Sun YY, Wu CS, Yang J, Bao GF, Cui ZM. Enhanced osteogenic activity and antibacterial ability of manganese-titanium dioxide microporous coating on titanium surfaces. *Nanotoxicology.* 2020;14(3):289-309. doi:10.1080/17435390.2019.1690065
273. Atefyekta S, Pihl M, Lindsay C, Heilshorn SC, Andersson M. Antibiofilm elastin-like polypeptide coatings: functionality, stability, and selectivity. *Acta Biomater.* 2019;83:245-256. doi:10.1016/j.actbio.2018.10.039
274. Liu Z, Yi Y, Song L, et al. Biocompatible mechano-bactericidal nanopatterned surfaces with salt-responsive bacterial release. *Acta Biomater.* 2022;141:198-208. doi:10.1016/j.actbio.2022.01.038
275. Lv Y, Wu Y, Lu X, et al. Microstructure, bio-corrosion and biological property of Ag-incorporated TiO<sub>2</sub> coatings: Influence of Ag<sub>2</sub>O contents. *Ceram Int.* 2019;45(17, Part A):22357-22367. doi:10.1016/j.ceramint.2019.07.265
276. Bandara CD, Singh S, Afara IO, et al. Bactericidal Effects of Natural Nanotopography of Dragonfly Wing on *Escherichia coli*. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9(8):6746-6760. doi:10.1021/acsami.6b13666
277. Bhadra CM, Truong VK, Pham VTH, et al. Antibacterial titanium nano-patterned arrays inspired by dragonfly wings. *Sci Rep.* 2015;5:16817. doi:10.1038/srep16817
278. Ivanova EP, Linklater DP, Aburto-Medina A, et al. Antifungal versus antibacterial defence of insect wings. *J Colloid Interface Sci.* 2021;603:886-897. doi:10.1016/j.jcis.2021.06.093
279. Linklater DP, Baulin VA, Juodkazis S, Crawford RJ, Stoodley P, Ivanova EP. Mechano-bactericidal actions of nanostructured surfaces. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(1):8-22. doi:10.1038/s41579-020-0414-z
280. Stratakis E, Bonse J, Heitz J, et al. Laser engineering of biomimetic surfaces. *Mater Sci Eng R Rep.* 2020;141:100562. doi:10.1016/j.mser.2020.100562
281. Shao H, Ma M, Wang Q, et al. Advances in the superhydrophilicity-modified titanium surfaces with antibacterial and pro-osteogenesis properties: A review. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:1000401. doi:10.3389/fbioe.2022.1000401
282. Spengler C, Nolle F, Mischo J, et al. Strength of bacterial adhesion on nanostructured surfaces quantified by substrate morphometry. *Nanoscale.* 2019;11(42):19713-19722. doi:10.1039/C9NR04375F
283. Linklater DP, Juodkazis S, Crawford RJ, Ivanova EP. Mechanical inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* by titanium substrata with hierarchical surface structures. *Materialia.* 2019;5:100197. doi:10.1016/j.mtla.2018.100197
284. Elbourne A, Chapman J, Gelmi A, Cozzolino D, Crawford RJ, Truong VK. Bacterial-nanostructure interactions: The role of cell elasticity and adhesion forces. *J Colloid Interface Sci.* 2019;546:192-210. doi:10.1016/j.jcis.2019.03.050

285. Jaggessar A, Yarlagadda PKDV. Modelling the growth of hydrothermally synthesised bactericidal nanostructures, as a function of processing conditions. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;108:110434. doi:10.1016/j.msec.2019.110434
286. Martins de Sousa K, Linklater DP, Murdoch BJ, et al. Modulation of MG-63 Osteogenic Response on Mechano-Bactericidal Micronanostructured Titanium Surfaces. *ACS Appl Bio Mater*. 2023;6(3):1054-1070. doi:10.1021/acsabm.2c00952
287. Jaggessar A, Mathew A, Wang H, Tesfamichael T, Yan C, Yarlagadda PK. Mechanical, bactericidal and osteogenic behaviours of hydrothermally synthesised TiO<sub>2</sub> nanowire arrays. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;80:311-319. doi:10.1016/j.jmbbm.2018.02.011
288. Vishnu J, K Manivasagam V, Gopal V, et al. Hydrothermal treatment of etched titanium: A potential surface nano-modification technique for enhanced biocompatibility. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2019;20:102016. doi:10.1016/j.nano.2019.102016
289. Zhao S, Li Z, Linklater DP, et al. Programmed Death of Injured *Pseudomonas aeruginosa* on Mechano-Bactericidal Surfaces. *Nano Lett*. 2022;22(3):1129-1137. doi:10.1021/acs.nanolett.1c04243
290. Jin G, Qin H, Cao H, et al. Synergistic effects of dual Zn/Ag ion implantation in osteogenic activity and antibacterial ability of titanium. *Biomaterials*. 2014;35(27):7699-7713. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.074
291. Yu S, Guo D, Han J, et al. Enhancing Antibacterial Performance and Biocompatibility of Pure Titanium by a Two-Step Electrochemical Surface Coating. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(40):44433-44446. doi:10.1021/acsami.0c10032
292. Zemtsova EG, Kozlova LA, Yudincheva NM, et al. Creation of a Composite Bioactive Coating with Antibacterial Effect Promising for Bone Implantation. *Molecules*. 2023;28(3):1416. doi:10.3390/molecules28031416
293. Zhang C, Li X, Xiao D, et al. Cu<sup>2+</sup> Release from Polylactic Acid Coating on Titanium Reduces Bone Implant-Related Infection. *J Funct Biomater*. 2022;13(2):78. doi:10.3390/jfb13020078
294. Sehgal RR, Carvalho E, Banerjee R. Mechanically Stiff, Zinc Cross-Linked Nanocomposite Scaffolds with Improved Osteostimulation and Antibacterial Properties. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(22):13735-13747. doi:10.1021/acsami.6b02740
295. Zhou J, Wang X. The osteogenic, anti-oncogenic and antibacterial activities of selenium-doped titanium dioxide coatings on titanium. *Surf Coat Technol*. 2020;403:126408. doi:10.1016/j.surfcoat.2020.126408
296. Noreen S, Wang E, Feng H, Li Z. Functionalization of TiO<sub>2</sub> for Better Performance as Orthopedic Implants. *Materials*. 2022;15(19):6868. doi:10.3390/ma15196868
297. Gulati K, Scimeca JC, Ivanovski S, Verron E. Double-edged sword: Therapeutic efficacy versus toxicity evaluations of doped titanium implants. *Drug Discov Today*. 2021;26(11):2734-2742. doi:10.1016/j.drudis.2021.07.004
298. Florea DA, Albuleț D, Grumezescu AM, Andronescu E. Surface modification – A step forward to overcome the current challenges in orthopedic industry and to obtain an improved osseointegration and antimicrobial properties. *Mater Chem Phys*. 2020;243:122579. doi:10.1016/j.matchemphys.2019.122579

299. Widyaratih DS, Hagedoorn PL, Otten LG, et al. Towards osteogenic and bactericidal nanopatterns? *Nanotechnology*. 2019;30(20):20LT01. doi:10.1088/1361-6528/ab0a3a
300. Shahali H, Hasan J, Mathews A, et al. Multi-biofunctional properties of three species of cicada wings and biomimetic fabrication of nanopatterned titanium pillars. *J Mater Chem B*. 2019;7(8):1300-1310. doi:10.1039/c8tb03295e
301. Clainche TL, Linklater D, Wong S, et al. Mechano-Bactericidal Titanium Surfaces for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(43):48272-48283. doi:10.1021/acsami.0c11502
302. Roy A, Chatterjee K. Bactericidal Anisotropic Nanostructures on Titanium Fabricated by Maskless Dry Etching. *ACS Appl Nano Mater*. 2022;5(3):4447-4461. doi:10.1021/acsanm.2c00555
303. Ghosh LD, Hasan J, Jain A, Sundaresan NR, Chatterjee K. Nanopillar Array on Black Titanium Prepared by Reactive Ion Etching Augments Cardiomyogenic Commitment of Stem Cells.
304. Hasan J, Jain S, Chatterjee K. Nanoscale Topography on Black Titanium Imparts Multi-biofunctional Properties for Orthopedic Applications. *Sci Rep*. 2017;7(1):41118. doi:10.1038/srep41118
305. Manivasagam VK, Popat KC. In Vitro Investigation of Hemocompatibility of Hydrothermally Treated Titanium and Titanium Alloy Surfaces. *ACS Omega*. 2020;5(14):8108-8120. doi:10.1021/acsomega.0c00281
306. Chen H, Wang C, Yang X, et al. Construction of surface HA/TiO<sub>2</sub> coating on porous titanium scaffolds and its preliminary biological evaluation. *Mater Sci Eng C*. 2017;70:1047-1056. doi:10.1016/j.msec.2016.04.013
307. Sabino RM, Popat KC. Evaluating Whole Blood Clotting in vitro on Biomaterial Surfaces. *Bio-Protoc*. 2020;10(3):e3505. doi:10.21769/BioProtoc.3505
308. Golubovskaya VM, Nyberg C, Zheng M, et al. A small molecule inhibitor 1,2,4,5-Benzenetetraamine tetrahydrochloride, targeting the Y397 site of Focal Adhesion Kinase decreases tumor growth. *J Med Chem*. 2008;51(23):7405-7416. doi:10.1021/jm800483v
309. Peng Y, Qu R, Feng Y, et al. Regulation of the integrin  $\alpha\beta3$ - actin filaments axis in early osteogenesis of human fibroblasts under cyclic tensile stress. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12:523. doi:10.1186/s13287-021-02597-y
310. Wang T, Kang W, Du L, Ge S. Rho-kinase inhibitor Y-27632 facilitates the proliferation, migration and pluripotency of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Mol Med*. 2017;21(11):3100-3112. doi:10.1111/jcmm.13222
311. Zhang C, Zhu H, Ren X, et al. Mechanics-driven nuclear localization of YAP can be reversed by N-cadherin ligation in mesenchymal stem cells. *Nat Commun*. 2021;12(1):6229. doi:10.1038/s41467-021-26454-x
312. Sero JE, Bakal C. Multiparametric Analysis of Cell Shape Demonstrates that  $\beta$ -PIX Directly Couples YAP Activation to Extracellular Matrix Adhesion. *Cell Syst*. 2017;4(1):84-96.e6. doi:10.1016/j.cels.2016.11.015
313. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
314. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262

- 315.Saino E, Maliardi V, Quartarone E, et al. In vitro enhancement of SAOS-2 cell calcified matrix deposition onto radio frequency magnetron sputtered bioglass-coated titanium scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(3):995-1008. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0051
- 316.Taguchi T, Lopez MJ. An overview of de novo bone generation in animal models. *J Orthop Res*. 2021;39(1):7-21. doi:10.1002/jor.24852
- 317.Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012;7(10):1918-1929. doi:10.1038/nprot.2012.113
- 318.Kunert-Keil C, Richter H, Zeidler-Rentzsch I, Bleeker I, Gredes T. Histological comparison between laser microtome sections and ground specimens of implant-containing tissues. *Ann Anat - Anat Anz*. 2019;222:153-157. doi:10.1016/j.aanat.2018.12.001
- 319.Mesenchymal Stem Cells (MSCs): A Comprehensive Overview of Their Properties and Uses. Accessed June 25, 2023. <https://www.dvcstem.com/post/what-are-mesenchymal-stem-cells>
- 320.Pini J. Modélisation du syndrome d'Andersen dans les cellules souches pluripotentes induites : implication du canal potassique Kir2.1 dans la morphogenèse osseuse. *undefined*. Published online 2016. Accessed August 26, 2021. <https://www.semanticscholar.org/paper/Mod%C3%A9lisation-du-syndrome-d%27Andersen-dans-les-%3A-du-Pini/90b1d17f5ea6a86e8179a957aceb9670bfe4c9fb>
- 321.Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;754:144855. doi:10.1016/j.gene.2020.144855
- 322.Przekora A. The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;97:1036-1051. doi:10.1016/j.msec.2019.01.061
- 323.Ansari S, Ito K, Hofmann S. Alkaline Phosphatase Activity of Serum Affects Osteogenic Differentiation Cultures. *ACS Omega*. 2022;7(15):12724-12733. doi:10.1021/acsomega.1c07225
- 324.Shen C, Yang C, Xu S, Zhao H. Comparison of osteogenic differentiation capacity in mesenchymal stem cells derived from human amniotic membrane (AM), umbilical cord (UC), chorionic membrane (CM), and decidua (DC). *Cell Biosci*. 2019;9(1):17. doi:10.1186/s13578-019-0281-3
- 325.Yan J, Li J, Hu J, et al. Smad4 deficiency impairs chondrocyte hypertrophy via the Runx2 transcription factor in mouse skeletal development. *J Biol Chem*. 2018;293(24):9162-9175. doi:10.1074/jbc.RA118.001825
- 326.Pakravan K, Razmara E, Mahmud Hussen B, Sattarikia F, Sadeghizadeh M, Babashah S. SMAD4 contributes to chondrocyte and osteocyte development. *J Cell Mol Med*. 2022;26(1):1-15. doi:10.1111/jcmm.17080
- 327.Huber MD, Gerace L. The size-wise nucleus: nuclear volume control in eukaryotes. *J Cell Biol*. 2007;179(4):583-584. doi:10.1083/jcb.200710156
- 328.Castro-Raucci LMS, Francischini MS, Teixeira LN, et al. Titanium With Nanotopography Induces Osteoblast Differentiation by Regulating Endogenous Bone Morphogenetic Protein Expression and Signaling Pathway. *J Cell Biochem*. 2016;117(7):1718-1726. doi:10.1002/jcb.25469

- 329.Liu TM, Lee EH. Transcriptional Regulatory Cascades in Runx2-Dependent Bone Development. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(3):254-263. doi:10.1089/ten.teb.2012.0527
- 330.Gunawardena TNA, Rahman MT, Abdullah BJJ, Abu Kasim NH. Conditioned media derived from mesenchymal stem cell cultures: The next generation for regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(4):569-586. doi:10.1002/term.2806
- 331.Shen J, Xie Y, Liu Z, et al. Increased myocardial stiffness activates cardiac microvascular endothelial cell via VEGF paracrine signaling in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;122:140-151. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.08.014
- 332.Nasser M, Wu Y, Danaoui Y, Ghosh G. Engineering Microenvironments Towards Harnessing Pro-angiogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;102:75-84. doi:10.1016/j.msec.2019.04.030
- 333.Xiang J, Zhou L, Xie Y, et al. Mesh-like electrospun membrane loaded with atorvastatin facilitates cutaneous wound healing by promoting the paracrine function of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13:190. doi:10.1186/s13287-022-02865-5
- 334.Sagaradze G, Grigorieva O, Nimiritsky P, et al. Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stromal Cells: Towards the Clinical Translation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1656. doi:10.3390/ijms20071656
- 335.Yang Y, Chen Q hong, Liu A ran, Xu X ping, Han J bin, Qiu H bo. Synergism of MSC-secreted HGF and VEGF in stabilising endothelial barrier function upon lipopolysaccharide stimulation via the Rac1 pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):250. doi:10.1186/s13287-015-0257-0
- 336.Ge Q, Zhang H, Hou J, et al. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms. *Mol Med Rep.* 2018;17(1):1667-1675. doi:10.3892/mmr.2017.8059
- 337.Zisa D, Shabbir A, Suzuki G, Lee T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(3):834-838. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.058
- 338.Goodwin AM. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc Res.* 2007;74(2-3):172-183. doi:10.1016/j.mvr.2007.05.006
- 339.Copes F, Chevallier P, Loy C, Pezzoli D, Boccafoschi F, Mantovani D. Heparin-Modified Collagen Gels for Controlled Release of Pleiotrophin: Potential for Vascular Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7. doi:10.3389/fbioe.2019.00074
- 340.Short SM, Derrien A, Narsimhan RP, Lawler J, Ingber DE, Zetter BR. Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by  $\beta$ 1 integrins. *J Cell Biol.* 2005;168(4):643-653. doi:10.1083/jcb.200407060
- 341.Nareshkumar RN, Sulochana KN, Coral K. Inhibition of angiogenesis in endothelial cells by Human Lysyl oxidase propeptide. *Sci Rep.* 2018;8(1):10426. doi:10.1038/s41598-018-28745-8
- 342.DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, et al. Endothelial Cell Tube Formation Assay for the In Vitro Study of Angiogenesis. *J Vis Exp JoVE.* 2014;(91):51312. doi:10.3791/51312

343. Gao H, Huang J, Wei Q, He C. Advances in Animal Models for Studying Bone Fracture Healing. *Bioengineering*. 2023;10(2):201. doi:10.3390/bioengineering10020201
344. Haffner-Luntzer M, Kovtun A, Rapp AE, Ignatius A. Mouse Models in Bone Fracture Healing Research. *Curr Mol Biol Rep*. 2016;2(2):101-111. doi:10.1007/s40610-016-0037-3
345. Hatt LP, Thompson K, Helms JA, Stoddart MJ, Armiento AR. Clinically relevant preclinical animal models for testing novel cranio-maxillofacial bone 3D-printed biomaterials. *Clin Transl Med*. 2022;12(2):e690. doi:10.1002/ctm2.690
346. Boussein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-1486. doi:10.1002/jbmr.141
347. Jin K, Li B, Lou L, et al. In vivo vascularization of MSC-loaded porous hydroxyapatite constructs coated with VEGF-functionalized collagen/heparin multilayers. *Sci Rep*. 2016;6:19871. doi:10.1038/srep19871
348. Wu G, Liu Y, Iizuka T, Hunziker EB. The effect of a slow mode of BMP-2 delivery on the inflammatory response provoked by bone-defect-filling polymeric scaffolds. *Biomaterials*. 2010;31(29):7485-7493. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.06.037
349. Lalloo R, Lucchesi LR, Bisignano C, et al. Epidemiology of facial fractures: incidence, prevalence and years lived with disability estimates from the Global Burden of Disease 2017 study. *Inj Prev*. 2020;26(Suppl 2):i27-i35. doi:10.1136/injuryprev-2019-043297
350. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol*. 2019;46 Suppl 21:92-102. doi:10.1111/jcpe.13058
351. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, et al. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*. 2014;45 Suppl 2:S3-7. doi:10.1016/j.injury.2014.04.002
352. Llopis-Grimalt MA, Forteza-Genestra MA, Alcolea-Rodriguez V, Ramis JM, Monjo M. Nanostructured Titanium for Improved Endothelial Biocompatibility and Reduced Platelet Adhesion in Stent Applications. *Coatings*. 2020;10(9):907. doi:10.3390/coatings10090907
353. Pan C, Hu Y, Gong Z, et al. Improved Blood Compatibility and Endothelialization of Titanium Oxide Nanotube Arrays on Titanium Surface by Zinc Doping. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(4):2072-2083. doi:10.1021/acsbomaterials.0c00187
354. Xu LC, Siedlecki CA. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*. 2007;28(22):3273-3283. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.03.032
355. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2050-2055. doi:10.1073/pnas.0608582104
356. Barberi J, Spriano S. Titanium and Protein Adsorption: An Overview of Mechanisms and Effects of Surface Features. *Materials*. 2021;14(7):1590. doi:10.3390/ma14071590
357. Gong Z, Hu Y, Gao F, et al. Effects of diameters and crystals of titanium dioxide nanotube arrays on blood compatibility and endothelial cell behaviors. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;184:110521. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110521

358. Zeng Y, Yang Y, Chen L, et al. Optimized Surface Characteristics and Enhanced in Vivo Osseointegration of Alkali-Treated Titanium with Nanonetwork Structures. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1127. doi:10.3390/ijms20051127
359. Vittaladevaram V, Cheung DL. Adsorption of Heparin-Binding Fragments of Fibronectin onto Hydrophobic Surfaces. *Biophysica*. 2023;3(3):409-424. doi:10.3390/biophysica3030027
360. Takahashi A, Takahashi S, Tsujino T, et al. Platelet adhesion on commercially pure titanium plates in vitro I: effects of plasma components and involvement of the von Willebrand factor and fibronectin. *Int J Implant Dent*. 2019;5(1):5. doi:10.1186/s40729-019-0160-z
361. Yang Y, Li X, Qiu H, et al. Polydopamine Modified TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays for Long-Term Controlled Elution of Bivalirudin and Improved Hemocompatibility. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(9):7649-7660. doi:10.1021/acsami.7b06108
362. Wang J, Sun Y, Liu Y, et al. Effects of platelet-rich fibrin on osteogenic differentiation of Schneiderian membrane derived mesenchymal stem cells and bone formation in maxillary sinus. *Cell Commun Signal*. 2022;20(1):88. doi:10.1186/s12964-022-00844-0
363. Yokota J, Chosa N, Sawada S, et al. PDGF-induced PI3K-mediated signaling enhances the TGF- $\beta$ -induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a TGF- $\beta$ -activated MEK-dependent manner. *Int J Mol Med*. 2014;33(3):534-542. doi:10.3892/ijmm.2013.1606
364. Kim UG, Choi JY, Lee JB, Yeo ISL. Platelet-rich plasma alone is unable to trigger contact osteogenesis on titanium implant surfaces. *Int J Implant Dent*. 2022;8(1):25. doi:10.1186/s40729-022-00427-1
365. Silverwood RK, Fairhurst PG, Sjöström T, et al. Analysis of Osteoclastogenesis/Osteoblastogenesis on Nanotopographical Titania Surfaces. *Adv Healthc Mater*. 2016;5(8):947-955. doi:10.1002/adhm.201500664
366. Dalby MJ, Gadegaard N, Oreffo ROC. Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. *Nat Mater*. 2014;13(6):558-569. doi:10.1038/nmat3980
367. Dobbenga S, Fratila-Apachitei LE, Zadpoor AA. Nanopattern-induced osteogenic differentiation of stem cells - A systematic review. *Acta Biomater*. 2016;46:3-14. doi:10.1016/j.actbio.2016.09.031
368. Elosegui-Artola A, Andreu I, Beedle AEM, et al. Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell*. 2017;171(6):1397-1410.e14. doi:10.1016/j.cell.2017.10.008
369. Shiu JY, Aires L, Lin Z, Vogel V. Nanopillar force measurements reveal actin-cap-mediated YAP mechanotransduction. *Nat Cell Biol*. 2018;20(3):262-271. doi:10.1038/s41556-017-0030-y
370. Ravasio A, Morselli E, Bertocchi C. Mechanoautophagy: Synergies Between Autophagy and Cell Mechanotransduction at Adhesive Complexes. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10. Accessed June 22, 2022. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2022.917662>
371. Vlahakis A, Debnath J. The Interconnections Between Autophagy and Integrin-Mediated Cell Adhesion. *J Mol Biol*. 2017;429(4):515-530. doi:10.1016/j.jmb.2016.11.027
372. Dahl SV, Schliess F, Reissmann R, et al. Involvement of Integrins in Osmosensing and Signaling toward Autophagic Proteolysis in Rat Liver. *J Biol Chem*. 2003;278(29):27088-27095. doi:10.1074/jbc.M210699200

- 373.Luu AK, Vilorio-Petit AM. Targeting Mechanotransduction in Osteosarcoma: A Comparative Oncology Perspective. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7595. doi:10.3390/ijms21207595
- 374.Wang L, Li J, Zhang X, et al. Involvement of p38MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathways in osteoblasts differentiation in response to mechanical stretch. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(9):1884-1894. doi:10.1007/s10439-012-0548-x
- 375.Wang L, Zhang X, Guo Y, et al. Involvement of BMPs/Smad Signaling Pathway in Mechanical Response in Osteoblasts. *Cell Physiol Biochem.* 2011;26(6):1093-1102. doi:10.1159/000323987
- 376.KATO RB, ROY B, DE OLIVEIRA FS, et al. Nanotopography Directs Mesenchymal Stem Cells to Osteoblast Lineage through Regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 Circuit. *J Cell Physiol.* 2014;229(11):1690-1696. doi:10.1002/jcp.24614
- 377.Moon YJ, Yun CY, Choi H, et al. Smad4 controls bone homeostasis through regulation of osteoblast/osteocyte viability. *Exp Mol Med.* 2016;48(9):e256-e256. doi:10.1038/emm.2016.75
- 378.Vermeulen S, Roumans N, Honig F, et al. Mechanotransduction is a context-dependent activator of TGF- $\beta$  signaling in mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2020;259:120331. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120331
- 379.Pokrovskaya LA, Nadezhdin SV, Zubareva EV, Burda YE, Gnezdyukova ES. Expression of RUNX2 and Osterix in Rat Mesenchymal Stem Cells during Culturing in Osteogenic-Conditioned Medium. *Bull Exp Biol Med.* 2020;169(4):571-575. doi:10.1007/s10517-020-04931-5
- 380.Weng JJ, Su Y. Nuclear matrix-targeting of the osteogenic factor Runx2 is essential for its recognition and activation of the alkaline phosphatase gene. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(3):2839-2852. doi:10.1016/j.bbagen.2012.12.021
- 381.Ma QL, Fang L, Jiang N, et al. Bone mesenchymal stem cell secretion of sRANKL/OPG/M-CSF in response to macrophage-mediated inflammatory response influences osteogenesis on nanostructured Ti surfaces. *Biomaterials.* 2018;154:234-247. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.11.003
- 382.Wandiyanto JV, Truong VK, Al Kobaisi M, et al. The Fate of Osteoblast-Like MG-63 Cells on Pre-Infected Bactericidal Nanostructured Titanium Surfaces. *Materials.* 2019;12(10):1575. doi:10.3390/ma12101575
- 383.Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop.* 2000;(378):224-237. doi:10.1097/00003086-200009000-00033
- 384.Pan H, Xie Y, Zhang Z, et al. Immunomodulation effect of a hierarchical macropore/nanosurface on osteogenesis and angiogenesis. *Biomed Mater Bristol Engl.* 2017;12(4):045006. doi:10.1088/1748-605X/aa6b7c
- 385.Pirrao RP, Reis RL, Marques AP. Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013;7(5):392-400. doi:https://doi.org/10.1002/term.535
- 386.Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S, Cooper LF. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone.* 2002;30(1):26-31. doi:10.1016/s8756-3282(01)00638-x

387. Lee S, Choi J, Shin S, et al. Analysis on migration and activation of live macrophages on transparent flat and nanostructured titanium. *Acta Biomater.* 2011;7(5):2337-2344. doi:10.1016/j.actbio.2011.01.006
388. Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):1164. doi:10.3390/ijms17071164
389. Sepúlveda JC, Tomé M, Fernández ME, et al. Cell Senescence Abrogates the Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells in the Lethal Endotoxemia Model. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2014;32(7):1865-1877. doi:10.1002/stem.1654
390. Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, et al. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. *BioMed Res Int.* 2016;2016:1-16. doi:10.1155/2016/6285620
391. Nguyen TD, Moon SH, Oh TJ, Seok JJ, Lee MH, Bae TS. Comparison of Guided Bone Regeneration Between Surface-Modified and Pristine Titanium Membranes in a Rat Calvarial Model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2016;31(3):581-590. doi:10.11607/jomi.4317
392. Zhang Y, Li C, Zhang W, et al. 3D-printed NIR-responsive shape memory polyurethane/magnesium scaffolds with tight-contact for robust bone regeneration. *Bioact Mater.* 2021;16:218-231. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.12.032
393. Meagher MJ, Parwani RN, Viridi AS, Sumner DR. Optimizing a micro-computed tomography-based surrogate measurement of bone-implant contact. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2018;36(3):979-986. doi:10.1002/jor.23716
394. Liu S, Broucek J, Viridi AS, Sumner DR. Limitations of Using Micro Computed Tomography to Predict Bone-Implant Contact and Mechanical Fixation. *J Microsc.* 2012;245(1):34-42. doi:10.1111/j.1365-2818.2011.03541.x
395. Marchezini E, De Almeida TCS, Oliveira FDP, et al. Comparative Study of Nanostructured TiO<sub>2</sub> and SLA Surface Modifications for Titanium Implants: Surface Morphology and in vitro Evaluation. *Mater Res.* 2022;25:e20210613. doi:10.1590/1980-5373-mr-2021-0613
396. Linklater DP, Baulin VA, Juodkakis S, Crawford RJ, Stoodley P, Ivanova EP. Mechano-bactericidal actions of nanostructured surfaces. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(1):8-22. doi:10.1038/s41579-020-0414-z
397. An YH, Friedman RJ. Animal models of orthopedic implant infection. *J Investig Surg Off J Acad Surg Res.* 1998;11(2):139-146. doi:10.3109/08941939809032193
398. Sheppard WL, Mosich GM, Smith RA, et al. Novel in vivo mouse model of shoulder implant infection. *J Shoulder Elbow Surg.* 2020;29(7):1412-1424. doi:10.1016/j.jse.2019.10.032
399. Martínez-Pérez M, Conde A, Arenas MA, et al. The "Race for the Surface" experimentally studied: In vitro assessment of Staphylococcus spp. adhesion and preosteoblastic cells integration to doped Ti-6Al-4V alloys. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019;173:876-883. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.10.076
400. Shiels SM, Mangum LH, Wenke JC. Revisiting the "race for the surface" in a pre-clinical model of implant infection. *Eur Cell Mater.* 2020;39:77-95. doi:10.22203/eCM.v039a05
401. Hoornaert A, Vidal L, Besnier R, Morlock JF, Louarn G, Layrolle P. Biocompatibility and osseointegration of nanostructured titanium dental implants in minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2020;31(6):526-535. doi:10.1111/clr.13589

402. Jäger M, Jennissen HP, Dittrich F, Fischer A, Köhling HL. Antimicrobial and Osseointegration Properties of Nanostructured Titanium Orthopaedic Implants. *Materials*. 2017;10(11):1302. doi:10.3390/ma10111302
403. Durmus NG, Webster TJ. Nanostructured titanium: the ideal material for improving orthopedic implant efficacy? *Nanomed*. 2012;7(6):791-793. doi:10.2217/nnm.12.53
404. Cavalu S, Antoniac IV, Fritea L, et al. Surface modifications of the titanium mesh for cranioplasty using selenium nanoparticles coating. *J Adhes Sci Technol*. 2018;32(22):2509-2522. doi:10.1080/01694243.2018.1490067
405. Zumofen L, Kopanska KS, Bono E, Kirchheim A, De Haller EB, Graf-Hausner U. Properties of Additive-Manufactured Open Porous Titanium Structures for Patient-Specific Load-Bearing Implants. *Front Mech Eng*. 2022;7. Accessed July 19, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmech.2021.830126>
406. Schouman T, Schmitt M, Adam C, Dubois G, Rouch P. Influence of the overall stiffness of a load-bearing porous titanium implant on bone ingrowth in critical-size mandibular bone defects in sheep. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;59:484-496. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.02.036
407. Benady A, Meyer SJ, Golden E, Dadia S, Katarivas Levy G. Patient-specific Ti-6Al-4V lattice implants for critical-sized load-bearing bone defects reconstruction. *Mater Des*. 2023;226:111605. doi:10.1016/j.matdes.2023.111605
408. Crovace AM, Lacitignola L, Forleo DM, et al. 3D Biomimetic Porous Titanium (Ti6Al4V ELI) Scaffolds for Large Bone Critical Defect Reconstruction: An Experimental Study in Sheep. *Animals*. 2020;10(8):1389. doi:10.3390/ani10081389
409. Lucca EGRD, Kelly C, Gall K. Review of In-Vivo Behavior of Porous Titanium Implants for Orthopedic Applications. 2021;6(6).
410. Buser D, Janner SFM, Wittneben JG, Brägger U, Ramseier CA, Salvi GE. 10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303 partially edentulous patients. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012;14(6):839-851. doi:10.1111/j.1708-8208.2012.00456.x
411. Avery SJ, Ayre WN, Sloan AJ, Waddington RJ. Interrogating the Osteogenic Potential of Implant Surfaces *In Vitro* : A Review of Current Assays. *Tissue Eng Part B Rev*. 2020;26(3):217-229. doi:10.1089/ten.teb.2019.0312
412. Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2007;12:3068-3092.

## Résumé français

La réparation tissulaire est un processus physiologique particulièrement intéressant grâce à sa capacité à répondre spontanément à des situations traumatiques pouvant affecter l'intégrité des tissus. Une des propriétés les plus remarquables de l'os est sa capacité à se réparer par lui-même. Toutefois, cette capacité naturelle est insuffisante pour de grandes pertes de tissu et nécessite de faire appel à des implants. Malgré des progrès techniques considérables dans le développement des biomatériaux pour la reconstruction osseuse, une partie des échecs est liée aux infections nosocomiales. On observe en effet 5 à 10 % d'infections péri-implantaires, qui vont conduire à des complications empêchant une récupération fonctionnelle complète, voire engager le pronostic vital des patients. Ces infections sur prothèse sont en effet très difficiles à traiter et une antibiothérapie seule est rarement suffisante. Le développement de biomatériaux combinant à la fois une activité ostéogénique et antibiotique représente donc un enjeu de santé publique crucial, mais demeure un réel défi. C'est dans ce contexte que ce projet de thèse portait sur l'étude de nouveaux supports en titane développés par Elena Ivanova (RMIT, Australie) et présentant deux types de modifications de surface les rendant mécano-bactéricides. Des travaux précédents du laboratoire ont en effet montré que la topographie de ces surfaces induit la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses (MSC) *in vitro*. Cette thèse avait pour objectif de décrypter les voies de signalisation mises en jeu dans les MSC suite à leur adhérence sur ces surfaces nanostructurées. Nous avons aussi étudié *in vitro* l'impact de ces topographies de surface sur la coagulation et les cellules endothéliales. Enfin, nous avons développé un modèle animal afin de tester l'efficacité thérapeutique de nos supports en titane sur la réparation osseuse.

Les surfaces obtenues par gravure plasma (2T) et celles obtenues par gravure hydrothermale (HTE) ont des capacités similaires concernant l'effet sur la coagulation et sur la différenciation ostéogénique *in vitro*, qu'elles favorisent en comparaison à du titane lisse. Néanmoins, les surfaces HTE sont les seules à promouvoir les capacités pro-angiogéniques des CSM cultivées à leur surface. Cela se traduit par une ostéointégration *in vivo* dans un modèle de défaut crânien de taille critique chez le rat. A l'inverse, la gravure plasma 2T n'apporte pas de bénéfice par rapport à du titane lisse. Les surfaces HTE ouvrent donc de nouvelles perspectives pour le développement d'implants osseux à la fois mécano-bactéricides et ostéoinducteurs.

---

## English abstract

Tissue repair is a particularly interesting physiological process because of its ability to respond spontaneously to traumatic situations that can affect tissue integrity. One of the most remarkable properties of bone is its ability to repair itself. However, this natural capacity is insufficient for large losses of tissue and requires the use of implants. Despite considerable technical progress in the development of biomaterials for bone reconstruction, some of the failures are linked to hospital-acquired infections. Peri-implant infections occur in 5 to 10% of cases, leading to complications that prevent full functional recovery and may even be life-threatening. These infections on prostheses are very difficult to treat, and antibiotic therapy alone is rarely sufficient. The development of biomaterials combining osteogenic and antibiotic activity therefore represents a crucial public health issue, but remains a real challenge. It is in this context that this thesis project focused on the study of new titanium supports developed by Elena Ivanova (RMIT, Australia) and featuring two types of surface modification that make them mechanobactericidal. Previous work in the laboratory has shown that the topography of these surfaces induces osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSC) in vitro. The aim of this thesis was to decipher the signalling pathways involved in MSCs following their adhesion to these nanostructured surfaces. We also studied the impact of these surface topographies on coagulation and endothelial cells in vitro. Finally, we have developed an animal model to test the therapeutic efficacy of our titanium surfaces on bone repair.

Surfaces obtained by plasma etching (2T) and those obtained by hydrothermal etching (HTE) have similar capacities in terms of their effect on coagulation and osteogenic differentiation in vitro, which they promote in comparison with smooth titanium. However, HTE surfaces are the only ones to promote the pro-angiogenic capacities of MSCs cultured on their surface. This resulted in in vivo osseointegration in a critical size cranial defect model in rats. Conversely, 2T plasma etching offers no benefit compared with smooth titanium. HTE surfaces therefore open up new prospects for the development of bone implants that are both mechanobactericidal and osteoinductive.

---