



**HAL**  
open science

## Mise en forme par fabrication additive de céramique phosphocalcique mimant l'os humain.

Paul Danty

► **To cite this version:**

Paul Danty. Mise en forme par fabrication additive de céramique phosphocalcique mimant l'os humain.. Autre. Université de Limoges, 2023. Français. NNT : 2023LIMO0052 . tel-04523938

**HAL Id: tel-04523938**

**<https://theses.hal.science/tel-04523938v1>**

Submitted on 27 Mar 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.

**Université de Limoges**  
**ED 653 - Sciences et Ingénierie (SI)**  
**Institut de recherche sur les céramiques CNRS IRCER UMR 7315**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Matériaux céramiques et Traitement de Surface

Présentée et soutenue par

**Paul Danty**

Le 21 décembre 2023

## **Mise en forme par fabrication additive de céramiques phosphocalciques mimant l'os humain**

Thèse dirigée par Patricia Pascaud-Mathieu, Eric Champion et Philippe Meseure

### **JURY :**

#### Rapporteurs :

M. Laurent Gremillard, Directeur de recherche CNRS, INSA Lyon, MATEIS UMR 5510

M. David Grossin, Maître de conférences HDR, Toulouse INP, CIRIMAT UMR 5085

#### Examineurs :

M. Bruno Bujoli, Directeur de recherche CNRS, Université de Nantes, CEISAM UMR 6230

M. Eric Champion, Professeur, Université de Limoges, IRCER UMR 7315

Mme. Marie Lasgorceix, Maître de conférences, Université Polytechnique Hauts-de-France, LMCPA, Maubeuge

M. Philippe Meseure, Professeur, Université de Poitiers, XLIM Poitiers UMR 7252

Mme. Patricia Pascaud-Mathieu, Maître de conférences, Université de Limoges, IRCER UMR 7315

M. Vincent Pateloup, Maître de conférences HDR, Université de Limoges, IRCER UMR 7315

#### Invité :

Mme. Amandine Magnaudeix, Maître de conférences, Université de Limoges, IRCER UMR 7315





*A mes parents,*

*A mon frère*



*C'est en prenant des décisions, bonnes ou mauvaises, que l'on devient un Homme.*

**Patchou**

## Remerciements

---

Je tiens dans un premier temps à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. L'ensemble de vos remarques pertinentes et constructives m'ont permis de finaliser ce document final.

Ce travail de recherche a été réalisé à l'institut de Recherche sur les céramiques (IRCER) de l'université de Limoges dans l'axe 4. Ainsi je souhaite remercier le directeur du laboratoire, Philippe Thomas et Sylvie Foucaud responsable de l'axe 4 pour leurs accueils au sein de ce laboratoire.

Un immense merci à mes encadrants de thèse, Patricia Pascaud Mathieu et Eric Champion. L'ensemble de vos conseils scientifiques et professionnels, vos disponibilités et votre compréhension m'ont permis de passer un cap à la fois professionnel et personnel. Merci sincèrement et du fond du cœur pour ces trois années à vos côtés.

Un grand merci à Amandine Magnaudeix, Souad Hamraoui et Alice Abélanet de m'avoir appris les bases théoriques et pratiques de la biologie, d'avoir pris le temps de m'aider dans cette étude préliminaire et enfin de m'avoir avisé de tous vos conseils. Merci.

L'ensemble de ces travaux, financés par la région Nouvelle Aquitaine, a été possible par les échanges scientifiques de grande qualité avec l'institut Pprime avec Fanny Leborgne, Valéry Valle, Arnaud Germaneau et Laetitia Caille et également le laboratoire XLIM avec Philippe Meseure, Agnes Arnould, Samuel Peltier, Hakim Ferrier et Soukayna Qarboua, merci à vous tous.

Je remercie mes collègues de l'IRCER et notamment de l'équipe Biocéramiques, Karine Giry, Betty Laverdet, Chantal Damia pour leurs conseils et leurs gentillesse durant ces trois ans. Merci également à Isabelle Julien, Sylvie Foucaud et Rémy Boulesteix, pour tous leurs précieux conseils afin de dispenser au mieux des TPs et TDs. Merci à Julie Useglio, chirurgienne maxillo-faciale du CHU de Limoges pour son avis pratique sur ces travaux. Enfin je tiens à remercier du fond du cœur Emeline Renaudie pour son aide précieuse, sa bienveillance et son soutien tout au long de cette thèse.

J'aimerais ensuite adresser mes remerciements à mes collègues de l'IRCER qui ont contribué de près à ces travaux de recherche, Julie pour les mesures IR, Marion et Paul pour les traitements thermiques, Séverine et Marina pour les caractérisations des poudres, Richard pour la DRX et enfin Yann pour microscopie (et sa forte contribution pour mon retour en triathlon).

Un grand Merci également à toutes les personnes qui ont participé à rendre cette expérience agréable et enrichissante : Henrique, Dylan, Arthur, Marine, Rémi, Arthur, Delphine, Marion ...

Je tiens à remercier mes amis proches, cette famille que j'ai pu me faire en arrivant ici à Limoges, avec par ordre d'arrivée, Antoine, Florian, Dylan puis Charlotte, Alice et Mehdi qui ont très rapidement rejoint l'aventure. Puis, Tom, Louis, Emma et enfin Dorian. Sans vous tous, la thèse aurait eu, une tout autre saveur alors merci à vous pour tous ces moments passés dans le bureau et surtout, en dehors !!

Merci à toi, Anne Sophie, tu es arrivée dans ma vie dans la dernière ligne droite, pas la plus simple et pourtant nous en sommes là aujourd'hui. Nous, qui avions peur de nous ennuyer après alors que bien au contraire, de nouvelles aventures s'offrent à nous et j'ai hâte de toutes les vivre avec toi.

Alice ... Alice ! Alice et Mehdi (et tes parents aussi je ne les oublie pas !) vous avez été les personnes les plus importantes pour moi durant des trois années merci du fond du cœur pour votre soutien, vos encouragements et tous ces bons moments passés ensemble durant ces trois années de thèse qui n'auraient pas été les mêmes sans votre belle amitié.

Luc, Papa, maman je vous dois tout. Tous vos conseils, remarques, embrassades, engueulades, rigolades qui, m'ont permis d'être ici, fier d'écrire ces lignes.

Merci à vous tous.

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

Introduction générale.....	17
Chapitre I. Étude bibliographique .....	20
I.1. Fonctions et architectures de l'os.....	20
I.1.1. Généralités.....	20
I.1.2. Fonctions des os et du système squelettique .....	21
I.1.2.1. Soutien, protection et assistance dans le mouvement.....	22
I.1.2.2. Homéostasie des minéraux.....	22
I.1.3. Macro et microstructure osseuse.....	23
I.1.3.1. Structure anatomique macroscopique de l'os.....	24
I.1.3.2. Os compact et trabéculaire : l'adaptation biologique .....	26
I.1.4. Architecture des os en réponse aux sollicitations mécaniques .....	29
I.1.4.1. Optimisation du rapport masse-résistance de l'os .....	29
I.1.4.2. Régénération osseuse en réponse aux sollicitations mécaniques .....	32
I.2. Mise en forme des implants pour le comblement osseux .....	34
I.2.1. Les biomatériaux inorganiques.....	35
I.2.1.1. Les métaux .....	35
I.2.1.2. Les (bio)Céramiques.....	36
I.2.2. Mise en forme de biomatériaux.....	38
I.2.2.1. Techniques de mise en forme non additive .....	39
I.2.2.2. Émergence des procédés de fabrication additive .....	41
I.2.2.3. Procédés de fabrication additive appliqués aux substituts bio-inspirés.....	43
I.2.2.3.1. Frittage sélectif laser.....	43
I.2.2.3.2. Impression par jet de liant.....	44
I.2.2.3.3. Impression par jet d'encre .....	45
I.2.2.3.4. Extrusion 3D : Robocasting .....	46
I.2.2.3.5. Stéréolithographie .....	48
I.3. Évaluation biologique des implants .....	50
I.3.1. Influence structurelle de l'implant.....	52
I.3.1.1. Impact de la microstructure .....	53
I.3.1.2. Impact de la macrostructure.....	53
I.3.2. : Réponses des évaluations biologiques <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	56
I.3.2.1. Réponse <i>in vitro</i> .....	56
I.3.2.2. Réponse <i>in vivo</i> .....	59
I.4. Conclusion du chapitre 1.....	63
Chapitre II. Mise en forme d'une céramique trabéculaire bio-inspirée.....	66
II.1. Acquisition du modèle numérique bio-inspiré humain par micro-tomographie RX .....	66
II.2. Mise en forme par stéréolithographie d'architectures céramique 3D .....	69
II.2.1. Suspension céramique .....	70
II.2.2. Stéréolithographie, principe et fonctionnement .....	71
II.2.3. Élaboration des architectures céramiques bio-inspirées .....	73
II.2.3.1. Essais préliminaires .....	73
II.2.3.2. Plan d'expériences.....	76
II.2.4. Caractérisations des architectures bio-inspirées en 2D .....	79
II.2.4.1. Démarches expérimentales.....	79
II.2.4.2. Résultats et analyses des réponses du plan d'expériences.....	81

II.2.4.3. Étude de l'influence des paramètres d'impression .....	89
II.2.4.4. Modèle prédictif.....	91
II.2.4.5. Détermination de la combinaison de paramètres optimale .....	95
II.2.5. Caractérisations des architectures en 3D .....	96
II.2.5.1. Étude du volume et de la superficie totale .....	98
II.2.5.2. Étude du degré d'anisotropie .....	99
II.2.5.3. Connectivité .....	101
II.2.5.4. L'épaisseur des trabécules.....	102
II.3. Traitement thermique .....	107
II.3.1.1. Déliantage.....	108
II.3.1.2. Frittage.....	109
II.3.1.3. Étude dimensionnelle après frittage .....	114
II.4. Réalisation d'architecture osseuse volumineuse (> 1 cm <sup>3</sup> ).....	118
II.5. Conclusion du chapitre 2.....	122
Chapitre III. Évaluation biologique .....	123
III.1. Approche bibliographique .....	123
III.1.1. Le remodelage osseux .....	123
III.1.2. Le lignage ostéoblastique .....	125
III.1.2.1. Les ostéoblastes .....	125
III.1.2.2. Les cellules bordantes .....	127
III.1.2.3. Les ostéocytes .....	128
III.1.3. Les cellules stromales mésenchymateuses .....	128
III.2. Approche biologique : matériels et méthodes.....	130
III.2.1. Plan expérimental.....	130
III.2.2. Matériels et méthodes .....	131
III.2.2.1. Culture cellulaire .....	131
III.2.2.2. Test de l'activité métabolique cellulaire .....	133
III.2.2.3. Marquage des cellules par immunofluorescence.....	134
III.2.2.4. Réaction en chaine par polymérase après transcription inverse (RT-qPCR)	
.....	135
III.2.2.5. Mise en évidence d'une matrice extracellulaire minéralisée .....	138
III.3. Caractérisation biologique.....	138
III.3.1. Activité métabolique des cellules .....	138
III.3.2. Analyses par immunofluorescence .....	141
III.3.3. Résultats de la caractérisation par le rouge Alizarine .....	158
III.3.4. Analyses par RT-qPCR .....	159
III.4. Conclusion du chapitre 3.....	163
Conclusion générale et perspectives .....	166
Références bibliographiques .....	169
Annexes .....	188

## Table des illustrations

Figure 1 : Coupe partielle d'un os long (figure adaptée « <i>Servier medical art</i> ») .....	25
Figure 2 : Représentation schématique adaptée de l'os compact « <i>Servier medical art</i> ».....	27
Figure 3 : Représentation schématique adaptée des trabécules de l'os spongieux « <i>Servier medical art</i> ».....	28
Figure 4 : Moment quadratique d'un cylindre plein et d'un tube creux avec leurs formules associées .....	30
Figure 5 : Structure trabéculaire d'une tête fémorale a) coupe anatomique b) représentation schématique des trabécules [10]. .....	31
Figure 6 : Organisation lamellaire des travées [12].....	32
Figure 7 : Matériaux inorganiques classés selon leur solubilité en milieu physiologique .....	35
Figure 8 : Prothèses de hanche dont les tiges sont en Titane destinée à la chirurgie orthopédique [65]. .....	36
Figure 9 : Implant modélisé sur le scan d'un patient (A) Implant macroporeux en HA réalisé par stéréolithographie dans le cadre d'une étude menée par J. Brie et ses collaborateurs (B) [67].....	37
Figure 10 : Élaboration d'une architecture en géopolymère-hydroxyapatite par imprégnation de mousse [92].....	40
Figure 11 : Élaboration d'une architecture poreuse par billes de PMMA sacrificielles de tailles comprises entre 600 µm et 1000 µm. ....	40
Figure 12 : Élaboration d'une architecture poreuse en polymère par freeze casting [95]. ....	41
Figure 13 : Classification des différents procédés additifs [143].....	43
Figure 14 : Illustration du procédé de frittage sélectif laser (SLS) ; A) Architecture en PLLA/PEEK- β-TCP obtenus par Feng et son équipe B) [149] .....	44
Figure 15: Illustration du procédé de jet par liant A) Implants de tailles réduites pour l'articulation interphalangienne B) [153].....	45
Figure 16 : Illustration du procédé d'impression jet d'encre A) ; B) Pièce crue en SiO <sub>2</sub> -H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> obtenue par C. Liang et al. [114] .....	46
Figure 17 : Illustration du procédé de robocasting A). Différentes architectures en HA réalisées par Dellinger et son équipe (a, b, c et d) [163].....	47
Figure 18 : Illustration du procédé de stéréolithographie A) Mise en forme d'HA par stéréolithographie en fonction de plusieurs motifs (a, b et c) [168] .....	49
Figure 19 : Bioréacteurs pour de la culture cellulaire en mode dynamique, A) par flasque rotative, B) par perfusion de flux [152].....	51
Figure 20 : Classification des architectures des macropores basée sur les travaux de Hao Chen [112] et repris par Susheem Kanwar [106] (TPMS : Triply Periodic Minimal Surface) .55	
Figure 21 : Coupe de section de l'implant après 12 semaines, A avec une interconnexion de 30 µm et B avec une interconnexion de 130 µm et une ostéogénèse plus importante.....	61

Figure 22: A) Os de tibia entier avant découpe B) Partie de l'os trabéculaire après découpe .....	66
Figure 23 : A) Le $\mu$ -Tomographe UltraTom légendé B) exemple d'une coupe recalculée de l'échantillon obtenu en Figure 22 C) Reconstruction de l'objet en 3D .....	67
Figure 24 : Représentation du modèle mère A) et du modèle fils B) extrait du modèle A) ....	68
Figure 25 : Schéma du système optique de la machine de stéréolithographie utilisé pour mettre en forme les architectures bio-inspirées [197].....	71
Figure 26 : Schéma du principe de fonctionnement de la technologie de stéréolithographie adaptée du site internet de 3DCeram ( <a href="https://3dceram.com/fr/stereolithographie">https://3dceram.com/fr/stereolithographie</a> ).....	73
Figure 27 : Éprouvette de longueur de 49,1 mm, de largeur de 5 mm et d'une épaisseur de 40 couches de 100 $\mu$ m mise en forme par stéréolithographie en HA. ....	74
Figure 28 : Élaboration d'une architecture trabéculaire du modèle fils avec le lot 1 de suspension céramique et une puissance laser de 500 mW .....	75
Figure 29 : Représentation schématique de l'interaction laser-suspension [198] .....	76
Figure 30 : Vue schématique de certains paramètres de fonctionnement de la SLA : épaisseur de couche, espacement des hachures [199]. ....	77
Figure 31 : Représentation schématique du plan d'expérience à trois paramètres d'entrée : puissance laser, nombre de passage laser et épaisseur de couche. ....	78
Figure 32 : Zoom d'une couche du modèle fils. La zone bleue représente la surface polymérisée d'une entité, le contour violet délimite une aire. ....	79
Figure 33 : Représentation de l'étude de caractérisation des architectures réalisées par SLA. A) Représentation de la N <sup>ième</sup> couche du fichier STL. B) Photographie de la N <sup>ième</sup> couche de la pièce crue (contour des entités en jaune, logiciel ImageJ). C) Représentation 3D du modèle fils. ....	80
Figure 34 : Représentation schématique d'une trabécule tranchée selon différentes épaisseurs, 50 $\mu$ m, 70 $\mu$ m et 100 $\mu$ m .....	81
Figure 35 : A) à D) Photographies de pièces crues, E50-P100-N1 et E50-P500-N2, obtenues après nettoyage, à différentes échelles et E) portion du modèle fils à reproduire .....	83
Figure 36 : Détermination des maxima et minima de désirabilité pour chaque épaisseur de couche .....	84
Figure 37 : Représentation graphique de la désirabilité globale, moyenne de la désirabilité de nombre d'aires et de la surface polymérisée pour une architecture en fonction de toutes les conditions du plan d'expérience .....	85
Figure 38 : Représentation graphique de la désirabilité globale en fonction de : A) nombre de passage laser, B) la puissance laser et C) l'épaisseur de couche .....	86
Figure 39 : Représentation schématique d'une architecture élaborée par stéréolithographie à l'aide d'un support [200]. ....	88
Figure 40 : A) Photographie de la pièce crue E100-P500-N2 et B) Modèle fils de la dernière couche correspondante. Les flèches permettent d'observer les aires manquantes vis-à-vis du fichier STL fils et les zones entourées, la différence de nombre d'aire.....	88



Figure 41 : Représentation graphique des valeurs prédites par les valeurs mesurées pour la surface polymérisée (A) et pour le nombre d'aire (B).....	94
Figure 42 : Représentation graphique des valeurs, mesurées et cibles, de surface polymérisée et de nombre d'aire pour chacune des 30 architectures élaborées. ....	95
Figure 43 : Représentation 3D de toutes les architectures mises en forme par stéréolithographie. Reconstruction 3 D d'images acquises par $\mu$ -tomographie RX. ....	98
Figure 44 : Représentation graphique des résultats de la superficie totale (A) et du volume (B) des 5 architectures crues caractérisés par $\mu$ -tomographie RX après analyse par le plugin BoneJ.....	99
Figure 45 : Représentation des changements de phases générés par le plugin BoneJ lors de l'évaluation du degré d'anisotropie.....	100
Figure 46 : Degré d'anisotropie (DA) obtenu pour les 5 architectures crues évaluées par $\mu$ -tomographie RX à l'aide du plugin BoneJ.....	101
Figure 47 : Valeurs de connectivité des trabécules obtenues pour les 5 architectures crues évaluées par $\mu$ -tomographie RX à l'aide du plugin BoneJ.....	102
Figure 48 : Valeurs des épaisseurs des trabécules, épaisseur minimale (A), épaisseur maximale (B) et épaisseur moyenne (C) obtenues pour les 5 architectures évaluées par $\mu$ -tomographie RX à l'aide du plugin BoneJ.....	104
Figure 49 : Représentation 3D des 5 architectures évaluées par $\mu$ -tomographie RX avec un gradient de couleur fonction de l'épaisseur des trabécules (0 à 918 $\mu$ m).....	106
Figure 50 : Évolution de la densité relative au cours des étapes de densification [202] .....	107
Figure 51 : Courbes d'analyse thermogravimétrique et d'analyse thermique différentielle d'un échantillon de poudre obtenu après mise en forme par stéréolithographie d'une pastille puis broyage de celle-ci. ....	109
Figure 52 : Représentation schématique des cycles thermiques évalués en fonction du temps (U.A = unité arbitraire) .....	110
Figure 53 : Micrographies d'architectures (E70-P100-N1) frittées pendant 2h à 1 220°C A et 1 270°C B.....	112
Figure 54 : Courbes de température et de retrait linéaire, en fonction du cycle thermique (montée à 1270°C et en palier à 1 270°C).....	113
Figure 55 : Diffractogrammes des échantillons frittés à 1270°C pendant 2h sans lavage de l'architecture aux ultrasons (A) et après lavage des architectures aux ultrasons pendant 45 min (B) .....	114
Figure 56 : Représentations dimensionnelles des architectures aux différentes étapes de fabrication, A) la coupe de l'os trabéculaire B) le modèle fils, C) le modèle STL agrandi 1,6 fois, D) la pièce crue agrandie 1,6 fois et E) la pièce frittée agrandie 1,3 fois par rapport à l'os trabéculaire imagé.....	115
Figure 57 : Représentation 3D des architectures (A, crue et B, frittée) avec un gradient de couleur fonction de l'épaisseur des trabécules, dont la valeur maximum (918 $\mu$ m) correspondant à la trabécule la plus importante observée pour l'architecture E70-P500-N2 .....	117

Figure 58 : Représentation schématique de la position de l'architecture sur le plateau de fabrication. La flèche 1 correspond à une position au centre du plateau, la flèche 2 correspond à la position la plus proche de la paroi. ....	120
Figure 59 : Architectures réalisées avec des paramètres aboutissant à un décalage de la structure sur les premières couches de la fabrication .....	120
Figure 60 : Architectures volumineuses crues (à gauche) et frittées (à droite) avec des flèches représentant le support. ....	121
Figure 61 : Schéma représentatif des 4 étapes du remodelage osseux : Activation ; Résorption ; Inversion ; Minéralisation [205] (+ cours d'Amandine Magnaudeix). ....	124
Figure 62 : Différentes niches cellulaires présentes dans le tissu osseux (schémas adaptés [207]) .....	125
Figure 63 : Différenciation des cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) en ostéoblastes avec un stade intermédiaire, les pré-ostéoblastes. Les gènes exprimés par les cellules (de couleur orange) en fonction de leurs différents stades sont également détaillés ainsi que les protéines exprimées (en couleur bleue). Les signes « + » caractérisent la proportion de cette protéine exprimée. L'ensemble des acronymes présentés dans ce schéma sont repris dans le Tableau 9 [209]. ....	126
Figure 64 : Représentation schématique de l'ensemencement des architectures et des pastilles. ....	133
Figure 65 : Représentation schématique des mécanismes de test d'immunofluorescence .	134
Figure 66 : Représentation schématique des marquages des cellules .....	135
Figure 67 : Représentation schématique de la réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse .....	136
Figure 68 : Gènes évalués par la méthode de RT-qPCR et les protéines correspondantes. ....	137
Figure 69 : Analyse de la viabilité cellulaire des MSCs par le taux d'activité métabolique à 48h, 7J, 15J et 21J sur pastille et architecture avec comme référence l'activité métabolique obtenue pour la condition pastille en MC à 48h. ....	139
Figure 70 : Images en microscopie à épifluorescence des MSCs adhérant aux pastilles et architectures trabéculaires après 48h en milieux de culture MC et MD. Le marquage en bleu révèle les noyaux (A,B,C,D), le marquage vert révèle les fibres d'actine (E,F,G,H), le marquage rouge révèle le collagène de type I (I,J,K,L) et M,N,O,P représentent l'ensemble des trois marquages. ....	142
Figure 71 : Images en microscopie à épifluorescence des MSCs adhérant sur les architectures trabéculaires après 48h de culture en milieux MC (A) et MD (B). ....	143
Figure 72 : Macrographie des cellules en culture sur l'architecture trabéculaire à 48h en MD. Le marquage en bleu révèle les noyaux, le marquage vert révèle les fibres d'actine et le marquage rouge révèle le collagène de type I .....	144
Figure 73 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant aux pastilles et architectures trabéculaires après 7J de culture en milieux MC et MD. Le marquage en bleu révèle les noyaux (A,B,C,D), le marquage vert révèle les fibres d'actine (E,F,G,H), le	

marquage rouge révèle le collagène de type I (I,J,K,L) et M,N,O,P représentent l'ensemble des trois marquages. ....	145
Figure 74 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant aux pastilles après 48h (A) et 7J (B) de culture en MC. Le marquage rouge marque le collagène de type I. ....	146
Figure 75 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant à la pastille en MC et à l'architecture trabéculaire en MD après 7J de culture. Le marquage en bleu marque les noyaux des cellules. Les flèches blanches mettent en évidence les noyaux de forme allongée, ovale et les flèches rouges, les chevauchements entre noyaux. ....	147
Figure 76 : Image en microscopie à épifluorescence des MSCs adhérant à l'architecture trabéculaire après 7J de culture en MD. Le marquage en bleu révèle les noyaux, le marquage vert révèle les fibres d'actine, le marquage rouge révèle le collagène de type I. ....	147
Figure 77 : Macrographies des cellules en culture sur l'architecture trabéculaire à 7J en milieu MD et MC. Le marquage en bleu révèle les noyaux, le marquage vert révèle les fibres d'actine et le marquage rouge révèle le collagène de type I. ....	148
Figure 78 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant aux pastilles et architectures trabéculaires après 15J de culture. Le marquage en bleu révèle les noyaux (A,B,C,D), le marquage vert révèle les fibres d'actine (E,F,G,H), le marquage rouge révèle le collagène de type I (I,J,K,L) et M,N,O,P représentent l'ensemble des trois marquages. ....	149
Figure 79 : Macrographie des cellules en culture sur les architectures trabéculaires à 15 J en MC (A) et MD (B) où le marquage en bleu révèle les noyaux, le marquage vert révèle les fibres d'actine et le marquage rouge révèle le collagène de type I. ....	150
Figure 80 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant aux pastilles et architectures trabéculaires après 21J de culture. Le marquage en bleu révèle les noyaux (A,B,C,D), le marquage vert révèle les fibres d'actine (E,F,G,H), le marquage rouge révèle le collagène de type I (I,J,K,L) et MNOP représentent l'ensemble des trois marquages. ....	151
Figure 81 : Macrographie des cellules en culture sur les architectures trabéculaires à 21J en MC (A) et MD (B) où le marquage en bleu révèle les noyaux, le marquage vert révèle les fibres d'actine et le marquage rouge révèle le collagène de type I. ....	152
Figure 82 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant à l'architecture trabéculaire en MD après 21J de culture. Le marquage en bleu marque les noyaux des cellules, les flèches rouges mettent en évidence des noyaux dans les angles, plus petits que les noyaux mis en évidence par les flèches blanches, noyaux sur des surfaces planes. ....	153
Figure 83 : Schéma récapitulatif des observations et analyses visuelles réalisées sur les micrographies d'immunofluorescences pour les conditions 48h, 7J, 15J et 21J des pastilles et architectures bio-inspirées en MC et MD. ....	157
Figure 84 : Caractérisation de toutes les conditions à 7 jours, 15 jours et 21 jours au rouge Alizarine permettant d'observer les dépôts de calcium et à un stade plus avancé la matrice minéralisée. ....	158
Figure 85 : Analyse par RTqPCR des conditions pastilles et architectures en MC et MD de l'expression (A) de <i>Collagène 1</i> sur les temps de 48h, 7J, 15J, 21J, de (B) <i>ALPL</i> sur les temps de 15J et 21J et de (C) <i>Runx2</i> sur 21J. ....	160

## Table des tableaux

---

Tableau 1 : Avantages et limites des modèles entiers .....	55
Tableau 2 : Études <i>in vitro</i> sur des architectures de céramiques phosphocalciques recensées dans la littérature (NI = Non Indiqué).....	58
Tableau 3 : Études <i>in vivo</i> sur des architectures céramiques recensées dans la littérature ..	60
Tableau 4 : Données représentatives des valeurs cibles pour chaque épaisseur (Ep) de couche correspondante.....	81
Tableau 5 : Référencement des réponses obtenues en accord avec la démarche expérimentale explicitée à la partie II.2.4.1 pour toutes les architectures élaborées .....	82
Tableau 6 : Tableau répertorient les résultats de l'ANOVA sur les variables quantitatives, la surface polymérisée et le nombre d'aire avec P correspondant à la puissance laser, E à l'épaisseur de couche et N au nombre de passage laser. Le signe « x » signifiant en interaction avec.....	90
Tableau 7 : Valeurs de la largeur, la longueur et l'épaisseur des architectures E70-P100-N1 crues et frittées obtenues par analyse d'images à l'aide du logiciel ImageJ ®.....	116
Tableau 8 : Étude dimensionnelle de l'architecture E70-P100-N1 crue, frittée avec le modèle fils. Évaluation par $\mu$ -tomographie RX à l'aide de l'utilisation du plugin BoneJ.....	116
Tableau 9 : Tableau référençant les gènes et protéines marqueurs principaux de la différenciation ostéoblastique avec leurs rôles associés.....	127
Tableau 10 : Caractéristiques principales des matériaux évalués biologiquement : pastille à gauche et Architecture bio-inspirée de l'os humain à droite .....	132
Tableau 11 : Fiches PDF de références utilisées pour indexer les différents composés pouvant être détectés par DRX .....	193



## Introduction générale

---

Le tissu osseux est un tissu en perpétuel renouvellement. Cependant, dans le cas de pertes de substance osseuse importante lors de pathologies spécifiques ou accident, le renouvellement osseux naturel ne permet pas une réparation complète. Plusieurs options s'offrent alors au patient dans le cadre de la régénération osseuse. Aujourd'hui, la solution privilégiée par les équipes médicales est l'autogreffe. Ce type de greffe favorise la régénération osseuse par l'architecture des greffons, de forme trabéculaire notamment. Cependant, l'autogreffe présente des limites. Une alternative à l'autogreffe est l'apport de substance synthétique pour le comblement et la restauration osseuse.

Dans ce contexte, de nombreuses architectures poreuses ont été mises en forme et évaluées en vue d'applications en ingénierie tissulaire osseuse. L'ensemble de ces études montre une grande variabilité de résultats sur la régénération osseuse. Parmi ces études, la macroporosité est un paramètre très largement étudié afin de déterminer les caractéristiques de la macrostructure adéquate à la régénération osseuse. Cependant, la macroporosité englobe un grand nombre de caractéristiques structurales allant de la taille des pores à leurs formes en passant par leur interconnectivité. Tous ces paramètres peuvent dans certains cas promouvoir la régénération osseuse, mais aujourd'hui aucun consensus sur ces caractéristiques structurales n'existe.

La composition chimique de la partie minérale de l'os est similaire à celle des apatites phosphocalciques, mal cristallisée, polysubstituée et lacunaire. Cette composition chimique est proche de l'hydroxyapatite phosphocalcique (HA) synthétique de formule chimique  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Cette similitude de composition chimique fait de l'HA un standard dans l'ingénierie tissulaire osseuse. Cette céramique biocompatible permet la formation osseuse à sa surface. Améliorer les propriétés de biocompatibilité de l'HA permettrait d'élargir l'utilisation de ces céramiques dans l'ingénierie tissulaire osseuse pour la restauration osseuse, notamment lors de grands défauts osseux.

La mise en forme de céramique d'architecture complexe est un enjeu de taille. En effet, la capacité à élaborer des architectures personnalisées avec une grande précision n'est possible que depuis quelques années avec l'émergence des procédés de fabrication additive. Ces procédés de prototypage rapide sont basés sur l'ajout de matière afin de réaliser des pièces dans les trois dimensions de l'espace.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse : déterminer une architecture en HA capable de promouvoir la régénération osseuse. La piste privilégiée dans ce contexte reprendra l'architecture des implants utilisés lors d'opérations d'autogreffes. En effet,

l'utilisation d'architecture trabéculaire permet de favoriser la régénération osseuse de l'os. C'est pourquoi l'objectif de ce travail a été de réaliser une architecture bio-inspirée de l'os trabéculaire et de l'évaluer biologiquement.

Le premier chapitre de ce manuscrit a pour objectif de faire un état de l'art des différentes thématiques abordées au cours de ces travaux. Dans un premier temps, une large description de l'os sera faite avec notamment un point d'intérêt sur les phénomènes physiologiques permettant la génération de l'os trabéculaire. Puis, dans le cadre de la réparation osseuse, une deuxième partie sera focalisée sur la mise en forme des implants osseux, le choix des matériaux et des techniques permettant leur élaboration. Enfin, la dernière partie de ce chapitre présentera les différents modèles d'évaluation biologique d'implants poreux.

Le développement d'un protocole permettant l'obtention d'une architecture céramique bio-inspirée de l'os trabéculaire humain fait l'objet du deuxième chapitre. Dans un premier temps, l'acquisition d'un modèle 3D à haute résolution de l'os trabéculaire sera décrite. Une deuxième partie sera consacrée à la mise en forme de ce modèle 3D par le procédé de stéréolithographie, méthode de fabrication additive adaptée au besoin de cette étude. Afin de définir les paramètres permettant d'obtenir une pièce réaliste de l'os trabéculaire, un plan d'expérience sera détaillé ainsi que toutes les méthodes permettant la caractérisation de ces architectures 3D. Enfin, une étude consacrée au traitement thermique de ces architectures complexes céramique et au retrait dimensionnel au cours de leur densification sera réalisée.

Le troisième chapitre est dédié à l'évaluation biologique de ces implants. Une description bibliographique consacrée au remodelage osseux et aux cellules utilisées lors de cette évaluation biologique sera effectuée dans un premier temps. Puis, une étude sur l'évaluation du comportement de cellules souches mésenchymateuses sera présentée lors d'une étude *in vitro* sur des architectures céramiques bio-inspirées de l'os trabéculaire humain optimisées. Cette partie aura pour objectif de déterminer l'impact de cette architecture trabéculaire sur le comportement et la différenciation des cellules.





# Chapitre I. Étude bibliographique

---

## I.1. Fonctions et architectures de l'os

### I.1.1. Généralités

Longtemps considérés comme la charpente inerte de l'organisme, les os nous définissent aujourd'hui comme appartenant à la famille des vertébrés. L'activité physiologique, les perpétuels remodelages et les incessants échanges avec les différents systèmes de notre corps constituent des preuves que les os sont formés de tissus vivants. Cette vision dynamique du système squelettique a ouvert la voie à de nombreux travaux de recherche afin de déterminer l'ensemble de ces fonctions fondamentales. Les os font l'objet d'études dans de nombreux domaines tels que : la biomécanique, car les tissus osseux sont les plus résistants de l'organisme ; la biologie, les os étant des organes, ils sont constitués d'édifices tissulaires dont la moelle osseuse ; ou encore la paléohistologie, car une minéralisation élevée des os est conservée après la mort et restent donc une trace du passé.

Les premières études concernant le système squelettique remontent à l'Antiquité avec Hippocrate, Aristote et Galien qui spéculèrent sur la nature et la fonction d'un tel système. Galilée fut le premier à faire le lien entre la forme des os et leurs fonctions mécaniques en 1638. Cette découverte a permis de nombreux travaux de recherche allant dans ce sens (K. Culmann (1867), J. Wolff (1892) [1], A. Benninghoff (1927) [2]). Des découvertes majeures dans la biomécanique et les lois qui en résultent expliquent parfaitement aujourd'hui la relation entre les contraintes mécaniques et l'architecture osseuse.

D'un point de vue biologique, de nombreuses avancées et descriptions de cet organe ont été réalisées en premier par C. Havers (1691) qui put observer et étudier la microstructure des os. De nombreux autres scientifiques ont pu apporter leurs contributions afin d'atteindre notre niveau de compréhension actuel (A. von Koelliker (1853) [3] et V. von Ebner (1875) [4]). Enfin, c'est au milieu du XVIII<sup>ème</sup> siècle que la composition chimique des os fut étudiée par M. Hérissant (1758). Ces études ont notamment permis de démontrer la présence simultanée de composants minéraux et organiques.

De par sa complexité, l'os fut étudié dans diverses disciplines (biologie, anatomie, chirurgie, chimie, physique ...) au cours de ces derniers siècles. C'est pourquoi le terme « os »

peut définir plusieurs parties différentes, à la fois pour un segment osseux (avec donc une signification d'organe anatomique) pour la texture et l'organisation des tissus (histologie osseuse) ou encore pour l'aspect chimique. Afin d'avoir une meilleure compréhension de cet organe, une description de ses fonctions est alors essentielle.

### **I.1.2. Fonctions des os et du système squelettique**

L'os est un organe composé de plusieurs tissus :

- Le tissu osseux, capable de minéraliser des cristaux d'apatite phosphocalcique. Les apatites ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)^3\text{X}$ ; X= OH, F, Cl) forment une famille de composés isomorphes [5], [6]. Le tissu osseux compose 25% des os. Ce tissu est la charpente de l'os. C'est le tissu le plus résistant de l'organisme par les fibres qui le composent, fibres de collagène et fibroblastes. Le tissu osseux compose 90 à 95% de la partie organique des os.
- Le tissu conjonctif dense, ayant un rôle de support structural et métabolique. Le fait qu'il soit dense dénote la prédominance de fibres augmentant les propriétés de résistance mécanique.
- Le cartilage, tissu avec pour fonction de transmettre et répartir les charges mécaniques mises en jeu sur les articulations.
- L'épithélium, tissu formant la limite entre les organes du corps, c'est un tissu mince.
- Le tissu adipeux, regroupant des cellules spécialisées dans l'accumulation de graisse appelées cellules adipeuses.
- Le tissu nerveux, ayant un rôle particulièrement important lors de la croissance et la maturation du squelette.
- Le sang, circulant dans nos os recueillant des cellules sanguines qui y sont produites.

Ce récapitulatif montre bien toute la complexité de cet organe composé de nombreux tissus ayant tous un rôle bien précis relatif aux différentes fonctions fondamentales des os. L'ensemble des fonctions, qui vont être décrites par la suite, sont alors nécessaires à notre survie.

### **I.1.2.1. Soutien, protection et assistance dans le mouvement**

Le corps humain est formé de systèmes, d'organes, de tissus et de cellules agencées. Cet ensemble est soumis à des contraintes exercées par l'environnement et plus particulièrement la gravité. L'absence de soutien entraînerait une déformation de notre organisme et aurait pour conséquence un affaissement sous notre poids. Le squelette va donc soutenir la forme définie par notre corps, grâce à sa structure. Il est également appelé endosquelette du fait de sa localisation à l'intérieur de notre organisme. Comme évoqué précédemment, le squelette est composé de tissus osseux, tissus rigides qui restent cependant relativement flexibles, lui conférant cette fonction de soutien et lui permettant de ne pas être déformé sous l'influence de la gravité. Le squelette sert donc de support pour les tissus mous et sert également de point d'insertion pour les tendons de la plupart des muscles squelettiques.

Certains os spécifiques ont un rôle différent de celui de soutien. En effet, les os du crâne ou des côtes vont avoir une localisation plus superficielle. Ces os vont constituer une enveloppe flexible et rigide assurant la protection des organes les plus importants des traumatismes de l'environnement externe tels que des contraintes mécaniques, des chocs, des tensions et des compressions. Le système nerveux est alors protégé par les os de la cavité crânienne, ou encore les vertèbres. La cage thoracique quant à elle va protéger le cœur et les poumons.

La dernière fonction relative aux propriétés de rigidité des tissus osseux est l'assistance des os dans les mouvements. En effet, les muscles étant insérés sur le squelette, la contraction ou le relâchement de ces derniers va provoquer un déplacement de l'os. À la manière d'un levier, les muscles vont produire l'effet de mouvement comme la locomotion.

### **I.1.2.2. Homéostasie des minéraux**

Le poids du tissu osseux représente 18% du poids du corps. Ce dernier sert de réservoir à certains minéraux comme le calcium et le phosphore. Ces minéraux sont à l'origine de la résistance des os. De plus, 99% du calcium du corps est stocké dans les tissus osseux. La partie minérale de l'os est composée de phosphate de calcium carbonaté de structure apatitique. Il est difficile de donner une formule chimique intrinsèque précise de l'apatite osseuse tant elle est dépendante de nombreux facteurs environnementaux (âge, type d'os, activité métabolique ...). Cependant, les analyses montrent que le rapport molaire Ca/P se situe entre 1,61 et 1,66 avec 34,80 % massique de calcium et 15,20 % massique de phosphore. Le reste de la composition massique de cette structure sont des ions qui se

substituent notamment aux précédents. Ces substitutions sont nombreuses et rendues possibles par la structure cristalline de type apatite, de maille hexagonale.

Le tissu osseux régule aussi l'équilibre minéral (l'homéostasie) dans le sang. Cette fonction de contrôle des minéraux est étroitement reliée aux différentes pressions mécaniques exercées sur le tissu osseux. Il y a alors libération ou stockage de ces minéraux. Ainsi, conjointement avec l'intestin et les reins, les tissus osseux assurent le contrôle du métabolisme phosphocalcique.

L'os a donc un impact sur l'ensemble de notre système physiologique et chacune de ces fonctions fait appel à différentes échelles temporelle et spatiale qui seront détaillées par la suite.

### **I.1.3. Macro et microstructure osseuse**

Les os vont au cours de la vie de l'organisme, répondre à deux grandes classes de fonctions : biomécanique et biologique. Il existe alors plusieurs conséquences à cette diversité fonctionnelle, des phénomènes physico-chimiques et mécaniques se situant à des échelles dimensionnelles différentes :

- Macroscopique, avec les différents efforts et contraintes mécaniques
- Cellulaire, avec notamment la production de globules rouges ou encore le remodelage osseux
- Microscopique, avec la gestion des flux physiologiques.

Des phénomènes existent à chaque échelle spatiale de l'os qui inclut là aussi des échelles temporelles multiples :

- De la seconde ou moins lors d'un choc ou contrainte mécanique
- De plusieurs minutes ou heures pour la production de cellules et le stockage de calcium
- De semaines ou mois pour la réparation de traumatismes tels que les fractures.

L'ensemble de ces dynamiques implique une adaptation du tissu et principalement sa géométrie. En effet, les principaux constituants de la phase minérale sont le collagène, des phosphates de calcium et de l'eau. Il convient alors de dire que ces composants très répandus dans la nature ne sont pas à eux seuls suffisants pour induire une telle diversité de fonction. C'est pourquoi l'optimisation de ces fonctions et donc les propriétés de cet organe sont obtenues par une architecture complexe.

### I.1.3.1. Structure anatomique macroscopique de l'os

Les os se distinguent en deux catégories structurelles : les os courts, irréguliers ou plats ayant des structures simples et les os longs ayant des structures plus complexes. Leurs structures sont dépendantes de leurs fonctions diverses.

#### *La structure des os longs*

Les os longs ont une structure adaptée à la mobilité (Figure 1), agissant comme des leviers tout en soutenant le poids du corps. Leurs structures se décomposent de la même manière pour tous :

- La diaphyse représente la partie longitudinale de l'os, appelé le corps de l'os du fait qu'elle en soit la partie principale. De forme cylindrique, compact, il renferme un canal médullaire central contenant la moelle jaune.
- Les épiphyses, plus épaisses que la diaphyse, se situent aux extrémités de l'os. Deux zones sont distinguées au sein de l'épiphyse : l'os spongieux et l'os compact. Ce dernier représente généralement une fine couche tandis que l'os spongieux est formé à l'intérieur.
- Les métaphyses, régions situées entre la diaphyse et les épiphyses, abritent une couche de cartilage permettant à la diaphyse de croître en longueur. Lorsque l'os finit de croître, ce cartilage est remplacé par de l'os.

Les os sont entourés par une couche externe, le périoste. Cette double membrane comporte essentiellement des cellules osseuses telles que les ostéoblastes (cellules productrices de matière osseuse) et les ostéoclastes (cellules détruisant la matière osseuse) permettant à l'os de croître en longueur et non en largeur. Cette double paroi joue également le rôle de point d'ancrage aux ligaments et tendons, de protection pour l'os, mais aussi favorise la consolidation des fractures.

L'endoste, dernier élément structurel des os longs, est une fine membrane qui borde la cavité centrale interne. Recouvrant l'os spongieux, cette couche interne abrite également des ostéoblastes et ostéoclastes.

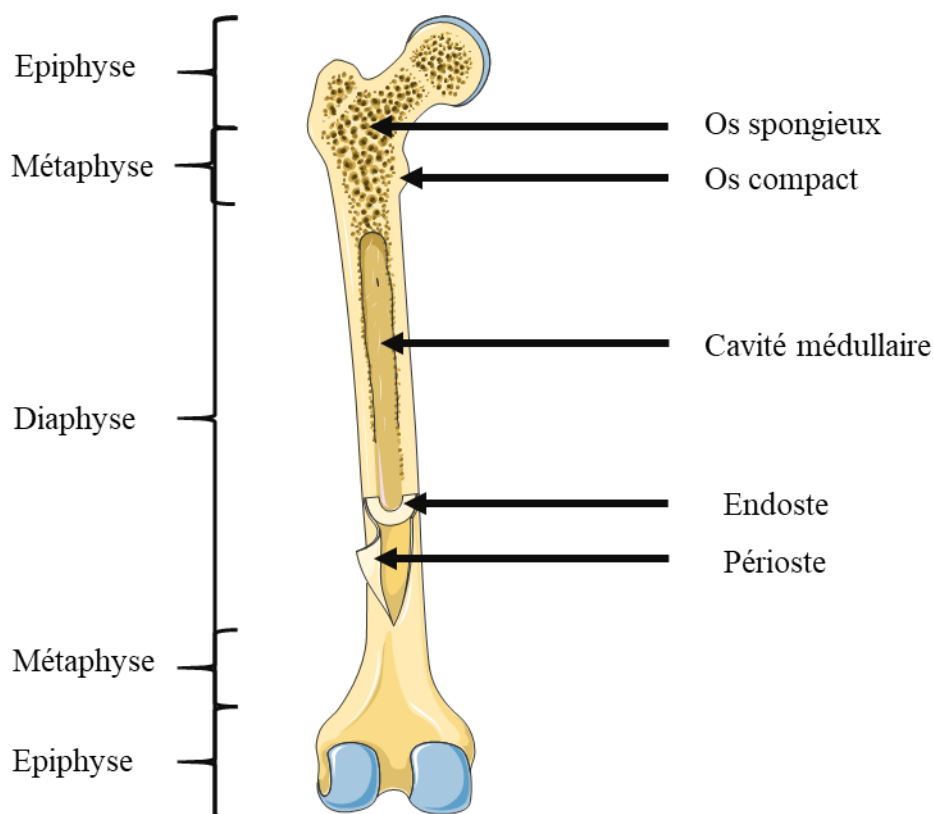


Figure 1 : Coupe partielle d'un os long (figure adaptée « *Servier medical art* »)

### *La structure des os courts, irréguliers ou plats*

Ces différents types d'os bien que remplissant des fonctions différentes ont tous une structure simple comparable. C'est pourquoi nous pouvons décrire la structure de ces os communément, tout en ayant bien précisé leurs différents rôles.

Les os courts permettent une stabilité du système squelettique ainsi qu'une amplitude de mouvement grâce à leurs morphologies s'apparentant à un cube (ex : les carpiens du poignet). Les os irréguliers, quant à eux, présentent des formes complexes leur permettant de protéger des organes internes, comme les vertèbres protégeant la moelle épinière. Les os plats jouent un rôle protecteur des organes internes. Les os plats se trouvent dans le crâne ou encore la cage thoracique. La surface externe de ces os est composée d'une fine couche d'os compact recouverte de périoste. L'intérieur est formé d'os spongieux tapissé d'endoste entre les travées et la moelle osseuse. Leurs géométries n'étant pas cylindriques, il n'y a pas de diaphyse ni d'épiphyse.

Il existe donc différentes structures macroscopiques osseuses. Cependant, un point commun découlant de leur formation paraît important d'être précisé. La formation de ces os se fait de manière directionnelle et plus particulièrement suivant des axes ou perpendiculaires

à des plans bien définis. En effet, l'os doit assurer plusieurs fonctions biologiques comme expliqué précédemment, c'est pourquoi il y a une nécessité à compartimenter plus ou moins partiellement les différents constituants tels que la moelle, le réseau vasculaire et cellulaire. Il en résulte alors la formation de deux types de tissus osseux, l'os compact et l'os spongieux qui vont être détaillés en suivant.

### **I.1.3.2. Os compact et trabéculaire : l'adaptation biologique**

Le tissu osseux est caractérisé par une matrice extracellulaire et des cellules. Il y a 2 catégories de cellules qui caractérisent ce tissu : les cellules ostéoformatrices et les cellules ostéorésorbantes. Les cellules du tissu osseux seront plus largement décrites dans le chapitre III de ce manuscrit.

La matrice extracellulaire constitue, quant à elle, le lien entre les cellules disséminées dans l'os. Elle est composée d'environ 15% d'eau, 30% de fibres de collagène et 55% de sels minéraux. Une phase organique et une phase minérale sont alors distinguées dans la composition de cette matrice extracellulaire.

- Phase organique : la matrice organique des tissus osseux est pauvre en eau. C'est le tissu le moins hydraté du corps. Cette matrice est essentiellement composée de fibres de collagène de type 1. Ces fibres orientées selon les lignes de force vont conférer aux os ses propriétés de rigidité et de résistance mécanique.
- Phase minérale : cette phase est une spécificité de ce tissu. Constituée de cristaux de phosphate de calcium (appelé aussi hydroxyapatite), elle se localise entre et/ou à l'intérieur des fibres de collagène. Ces cristaux d'hydroxyapatite représentent à eux seuls 70% du poids sec de la matrice.

L'os n'est pas entièrement solide. De nombreux espaces entre ses cellules et les composants de la matrice existent. Certains de ces espaces sont des accès pour les vaisseaux sanguins, d'autres des zones de stockage pour la moelle osseuse rouge. La taille et la distribution de ces espaces caractérisent deux types de tissus osseux, compact ou spongieux. L'ensemble du système squelettique est composé de 80% d'os cortical/compact et de 20% d'os spongieux/trabéculaire.

## L'os compact

L'os compact (Figure 2) se situe toujours en périphérie des os. Il comporte peu d'espaces, ce qui fait de lui le tissu le plus solide des tissus osseux. L'os compact est concentrique autour d'un canal central appelé ostéon. Cet ostéon renferme un ensemble de cylindres (6 à 15 par ostéon) disposés autour d'un canal central (canal de Havers) contenant des capillaires sanguins et des fibres nerveuses. Chaque cylindre est une lamelle d'ostéon. Ces lamelles abritent des fibres de collagène toutes parallèles au sein d'un même cylindre, mais dans des directions opposées entre deux cylindres. Cette organisation structurale à l'échelle microscopique explique en partie la résistance des os longs aux forces de torsion. Les ostéons sont, de plus, tous orientés dans la direction des sollicitations mécaniques (celui de la diaphyse dans le cas des os longs) conférant à l'os compact un maximum de résistance.

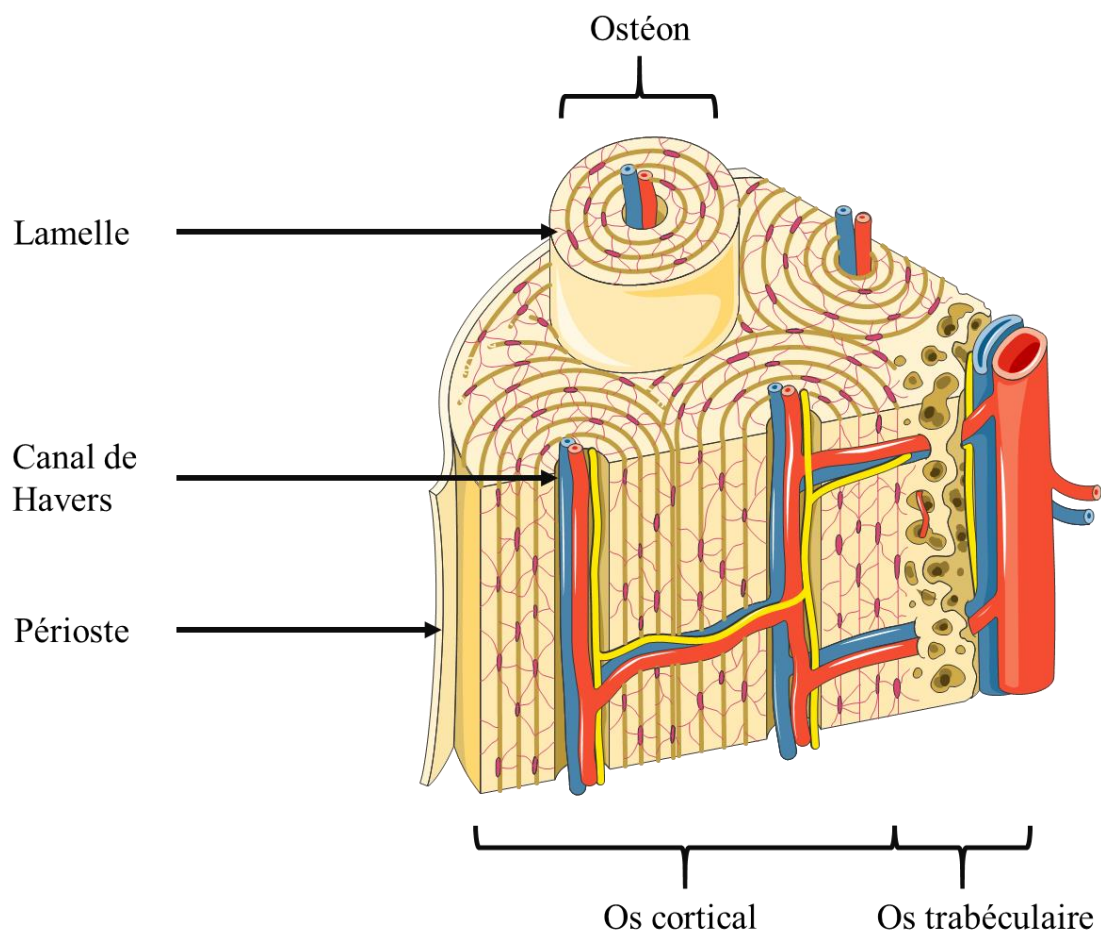


Figure 2 : Représentation schématique adaptée de l'os compact « *Servier medical art* »



### *L'os trabéculaire*

L'os trabéculaire est toujours situé à l'intérieur d'un os, protégé par une couche d'os compact. Il permet de renforcer les parties les plus soumises aux efforts mécaniques en s'organisant suivant des directions privilégiées. Contrairement à l'os compact, l'os trabéculaire ne présente pas d'ostéons. Il est organisé de façon irrégulière en trabécules osseuses (Figure 3). L'espace entre ces trabécules est visible à l'œil nu et abrite la moelle osseuse rouge dans les os qui produisent les cellules sanguines et la moelle osseuse jaune. Dans les deux cas, ces deux types de moelles abritent des vaisseaux sanguins apportant des nutriments.

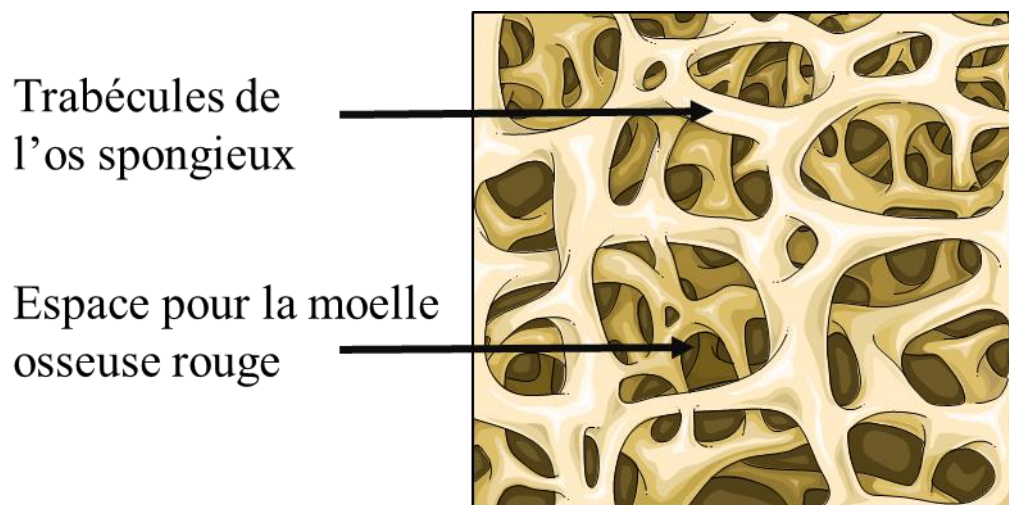


Figure 3 : Représentation schématique adaptée des trabécules de l'os spongieux « *Servier medical art* »

Afin de conclure cette partie sur la présentation des os, il est important de souligner qu'il existe différents niveaux de porosités dues à la formation osseuse, des macropores et des micropores de plusieurs tailles :

- Des macropores millimétriques pour l'espace occupé par la moelle
- Puis, des micropores de différentes tailles : plusieurs dizaines de microns pour le canal de Havers abritant les réseaux vasculaire et nerveux, quelques microns pour l'espace occupé par les cellules et de l'ordre de 0,5 micron pour les ramifications entre les cellules.

L'os est donc un organe complexe présentant à la fois une macroporosité et une microporosité interconnectées. Le paragraphe suivant va aborder le développement de l'os d'un point de vue architectural en fonction des contraintes mécaniques qu'il rencontre.

#### **I.1.4. Architecture des os en réponse aux sollicitations mécaniques**

Le tissu osseux a pour principale mission de transmettre les contraintes en tension/compression, en cisaillement et en torsion sur de longues distances. Le squelette est soumis à cet ensemble de contraintes par la gravité ou lorsque l'individu fournit une activité musculaire. Il est également très sensible aux stimulations mécaniques auxquelles il est soumis ainsi l'os pourra se réarranger en fonction. En effet, les périodes d'alitement ou les voyages spatiaux par exemple, ont un impact direct sur la masse du squelette ainsi que sur la morphologie du tissu osseux. Le tissu osseux croît ou se résorbe en fonction de nombreux médiateurs chimiques résultant de l'activité de l'homme.

Le remodelage osseux est le résultat de deux réponses physiologiques :

- L'impact des molécules bioactives influençant l'équilibre et le déséquilibre de la masse osseuse. Cette réponse se fait en tout temps.
- Biomécanique, étudiée grâce aux modèles numériques permettant la simulation de charge et la réponse osseuse. Les réponses biomécaniques sont dépendantes des interactions de l'os en fonction de leur environnement.

Le résultat de ces deux mécanismes est l'optimisation des capacités autrement appelée « loi de Wolff »[1][7]. Cet anatomiste et chirurgien présenté en introduction de ce chapitre explique que la forme externe d'un os s'adapte aux contraintes auxquelles l'os est soumis. Ce principe sera décrit tout au long de cette partie.

##### **I.1.4.1. Optimisation du rapport masse-résistance de l'os**

La loi de Wolff [1] décrit l'adaptabilité de l'os, sa structure externe et sa structure trabéculaire, en fonction des charges auxquelles il est soumis. L'objectif étant d'optimiser l'espace mis à disposition : comment distribuer la matière osseuse de manière à en maximiser la solidité tout en réduisant la quantité de tissu au minimum. Notre corps va donc modifier et optimiser son rapport masse / résistance mécanique. Le métabolisme osseux demande énormément d'énergie c'est pourquoi les os longs ont une configuration sous forme de tube et non de cylindre plein. Cette géométrie de l'os s'explique par les formules de moment quadratique d'un cylindre plein et d'un tube creux (Figure 4). Un tube creux aura moins de résistance qu'un cylindre plein de diamètre identique. Cependant, un tube creux est beaucoup moins lourd, ainsi, le diamètre sera augmenté afin d'obtenir une résistance équivalente. Il en résulte également que les portions internes d'un cylindre contribuent faiblement à la résistance de la pièce comparée aux zones périphériques. En effet, un cylindre plein de 7 cm aura la

même valeur de moment quadratique qu'un tube creux de  $d_0= 10$  cm et un  $d_1= 9$  cm soit une zone périphérique de 1 cm. Le tube creux aura un diamètre plus large pour une même résistance, mais un poids moindre. C'est pourquoi les os longs adoptent une forme « tube creux » sur la diaphyse et non pleine.

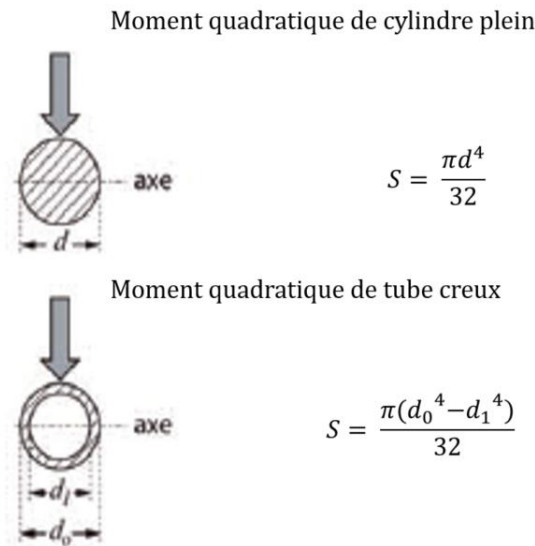


Figure 4 : Moment quadratique d'un cylindre plein et d'un tube creux avec leurs formules associées

Tous les os sont alors construits de manière optimum entre leurs masses et leurs résistances mécaniques. Cette étude sur l'os cortical nous amène à la deuxième contribution de Wolff : l'optimisation de l'architecture interne des os, soit l'os trabéculaire. L'arrangement des trabécules se fait là aussi en fonction des sollicitations extérieures.

L'étude du tissu osseux trabéculaire remonte aux premières observations de l'anatomiste allemand Von Meyer en 1867 [8]. Ce dernier a étudié les postures squelettiques et décrit les différentes orientations des travées. L'ingénieur suisse Culmann fit un parallèle entre la distribution spatiale des travées et les lignes de contrainte [9]. L'anatomiste Wolff confirma en 1892 ces découvertes avec ces deux contributions majeures. C'est-à-dire que la microarchitecture de l'os peut s'adapter et répondre aux variations mécaniques. L'anatomiste Mr. Koch valida les travaux de J. Wolff [1]. Ces études ont également pu montrer des densités osseuses plus élevées dans les zones sujettes à de fortes contraintes. La masse osseuse est donc distribuée afin d'obtenir une masse minimale du matériau pour une adaptation maximale.

En effet, l'os trabéculaire est composé en majorité de trabécules. Ce tissu osseux en majorité poreux est 50 à 90% moins dense et moins rigide que l'os cortical. Sur la Figure 5 est représentée une tête fémorale [10]. Les trabécules sont alors formées selon les trajectoires des contraintes principales ; contraintes de tension et compression et non de cisaillement,

torsions générées dans le sens de la flèche sur la Figure 5. Une pression sur la tête fémorale entraîne alors une flexion sur la partie supérieure. Pour répondre au mieux à ces contraintes mécaniques, les trabécules vont donc s'orienter selon ces lignes de contraintes.

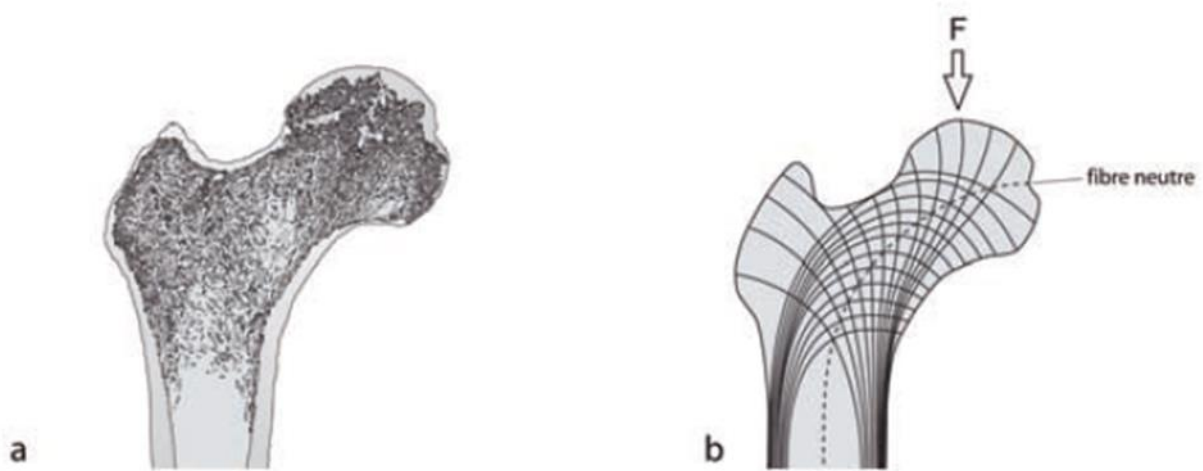


Figure 5 : Structure trabéculaire d'une tête fémorale a) coupe anatomique b) représentation schématique des trabécules [10].

De plus, les lamelles osseuses (Figure 6) qui composent le tissu osseux trabéculaire [11] vont être formées de manière à être parallèles aux contraintes majoritaires, contrairement à l'os cortical. Cette découverte initiée de A. Parfitt dans les années 80 a permis une nouvelle compréhension de la microarchitecture du tissu osseux trabéculaire. Les premières modélisations réalisées par A. Parfitt de cette microarchitecture ont montré une répartition non homogène dans l'espace. Cette anisotropie est d'autant plus marquée à mesure que l'os devient poreux [12]–[14]. Une réponse adaptée de notre organisme contre les différentes charges fonctionnelles est donc le développement de l'os trabéculaire de manière anisotrope en relation avec la loi de Wolff [15]–[17]. À titre d'exemple, le degré d'anisotropie trabéculaire d'une vertèbre dans le sens de la longueur sera supérieur aux valeurs transversales avec des facteurs respectifs de 3,4 et 2,8 [13]. Ainsi, les travées qui disparaissent les premières lors de l'ostéoporose sont celles qui subissent le moins de contraintes mécaniques, augmentant également l'anisotropie.

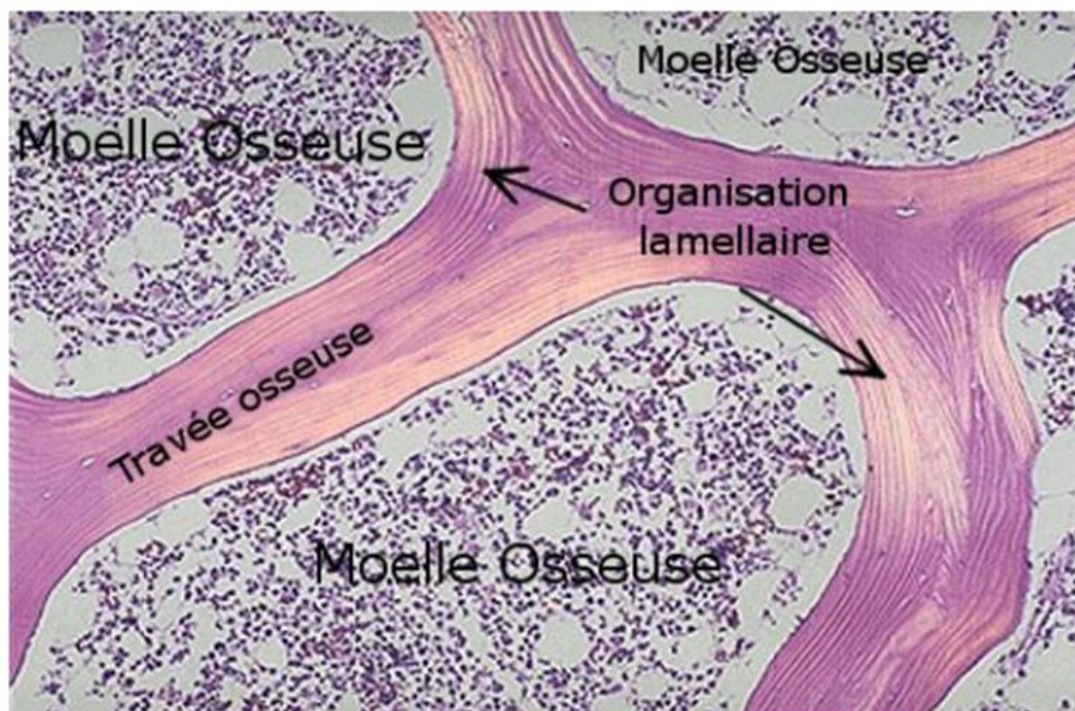


Figure 6 : Organisation lamellaire des travées [12]

#### I.1.4.2. Régénération osseuse en réponse aux sollicitations mécaniques

L'os va donc s'adapter à son environnement en fonction des contraintes mécaniques exercées. Au cours de son perpétuel renouvellement, de l'os ancien va être détruit ou résorbé et remplacé par de l'os nouveau. Le chirurgien allemand, Pr. Roux, fut le premier à suggérer que des cellules contenues à l'intérieur de l'os pouvaient ainsi répondre au stress mécanique en régulant la création ou la résorption du tissu osseux. C'est dans la continuité de ces premières suggestions que J. Frost, chirurgien américain, découvrit que le remodelage osseux était le mécanisme permettant l'adaptation de la microarchitecture osseuse [18]. Deux théories émergent alors de ces travaux (Théories détaillées dans Chapitre 3) :

- La première, la théorie du BMU : « Basic multicellular unit » qui détermine l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes dans le temps et l'espace [19]. Le rôle des ostéoclastes (cellules détruisant la matrice) et des ostéoblastes (cellules synthétisant la matrice) alors décrit permet de comprendre comment l'os se crée (formation de l'os) et se remodèle.
- La seconde théorie, quant à elle, la théorie de la mécano-transduction, explique l'adaptation des cellules aux différentes intensités des contraintes mises en jeu sur les os [20], [21].

Ces études sont une base importante afin d'analyser les mécanismes de formation de l'os et prédire ces changements de structure [22]–[26]. C'est en effet un des enjeux d'aujourd'hui, d'améliorer la compréhension des caractéristiques spatiales de la microarchitecture osseuse trabéculaire [27]. Ces résultats permettraient alors d'optimiser la fabrication d'implants, améliorant leur incorporation et répondant au mieux aux charges quotidiennes imposées à nos os.

## I.2. Mise en forme des implants pour le comblement osseux

Depuis de nombreuses années, une grande variété d'implants osseux a été mise au point pour combler les défauts osseux critiques. Ce terme de « défaut critique » a été introduit par Schmitz et Hollinger pour définir le plus petit défaut osseux sur un site anatomique particulier qui ne cicatrise pas de façon spontanée et totale sur une durée donnée [28]. Ces défauts critiques sont généralement induits par des traumatismes, chirurgies ou résections de tumeur primaire (> 2cm ou 50% de perte de la circonférence du site anatomique [29]) [30]–[32].

Afin de réparer au mieux ce type de défauts, l'autogreffe est la solution privilégiée. Plus de deux millions de greffes sont réalisées chaque année [33], car elle présente les résultats les plus favorables pour la réparation osseuse avec un implant doté de propriétés d'ostéoconduction et d'ostéoinduction sur le site implanté [34]–[36]. Cependant, elle présente de nombreuses limitations :

- Morbidité de l'implant [37], [38]
- Disponibilité limitée de greffon [34], [35], [38]
- Nécessité d'une intervention chirurgicale supplémentaire [39], [40]
- Résorption excessive [34], [39]
- Stress supplémentaire pour le chirurgien, car l'autogreffe est une opération complexe

Une solution à ces problèmes est l'utilisation d'implants synthétiques. Ces implants devront répondre à deux missions principales, combler la perte osseuse et être support de la matrice osseuse. Afin de répondre à ces missions, ces implants doivent intégrer plusieurs propriétés :

- Être biocompatible : Aptitude à ne pas avoir d'effet indésirable dans l'environnement biologique.
- Être ostéoconducteur, capable de permettre la croissance de tissus osseux le long de l'implant [41].
- Être ostéoinducteur, capable d'induire une formation osseuse, notamment via l'implication de cellules de différenciation [41].
- Avoir un potentiel angiogénique, processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins.



Ces implants doivent aussi répondre au cahier des charges défini par le défaut osseux en termes de :

- Taille et forme, afin de s'incorporer au mieux sur le site implanté.
- Support mécanique dû aux différentes charges et forces exercées sur le site.
- Durée de vie afin de ne pas opérer le patient à plusieurs reprises.
- Coût de fabrication, représentant 2,5 milliards de dollars par an au États-Unis [42].

Plusieurs biomatériaux permettent de répondre à ces critères : les matériaux organiques tels que les polymères synthétiques ou naturels [43]–[45], les matériaux hybrides ou composites [46]–[50], et les matériaux inorganiques comme les céramiques et les métaux. Cette dernière catégorie, les matériaux inorganiques, présente de nombreux avantages comme une bonne tenue mécanique et une bonne rigidité tout en étant biocompatible. Ces matériaux inorganiques sont classés en trois grandes catégories, selon leur solubilité en milieu physiologique (Figure 7) allant des matériaux céramiques ou métalliques dits inertes [51], faiblement solubles, aux céramiques bioactives et biorésorbables, fortement solubles [52]. Ces matériaux inorganiques feront l'objet d'une description plus détaillée dans cette partie.

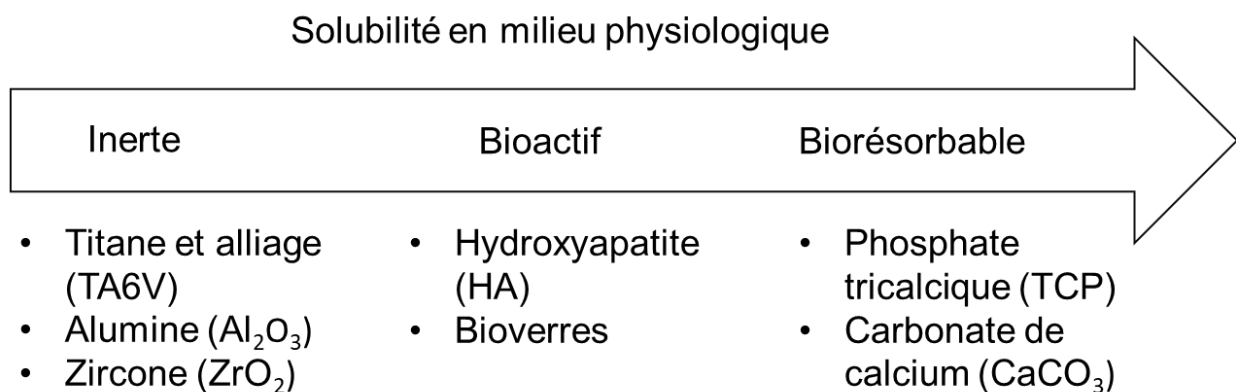


Figure 7 : Matériaux inorganiques classés selon leur solubilité en milieu physiologique

## I.2.1. Les biomatériaux inorganiques

### I.2.1.1. Les métaux

Les propriétés mécaniques des matériaux métalliques en font de très bons candidats pour l'ingénierie du tissu osseux. Le titane, le tantale, le cobalt ainsi que leurs alliages sont les métaux inertes les plus utilisés. Parmi eux, le titane pur et l'alliage Ti6Al4V (TA6V) sont les plus couramment utilisés dans les applications cliniques [53], [54]. Le titane pur et ses alliages



ont une haute résistance à l'environnement physiologique, mais le titane pur présente une plus faible solidité et résistance que l'alliage TA6V. Cet alliage présente une haute ténacité à la rupture, également une haute résistance aux contraintes mécaniques [55] ainsi qu'une haute résistance à l'usure [56]. Il est cependant intéressant de rajouter un revêtement d'hydroxyapatite afin d'améliorer l'activité biologique du titane et alliages du fait de leur caractère inerte. Leur surface peut être chimiquement modifiée afin de permettre la nucléation de phosphate de calcium favorisant la biocompatibilité de l'implant [57]–[60]. Pour toutes ces propriétés, le titane et ses alliages sont particulièrement plébiscités dans le domaine de la dentisterie et de l'orthopédie (Figure 8) [61].

Malgré tout, le titane et ses alliages ne sont pas biodégradables. Ils ne sont donc pas considérés comme un biomatériau idéal pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse [62]. De plus, des inquiétudes subsistent suite à la découverte de débris particulaires induits par l'usure des structures en titane au contact de l'os et l'existence de potentielles réactions inflammatoires, qui en résulteraient [62]–[64].

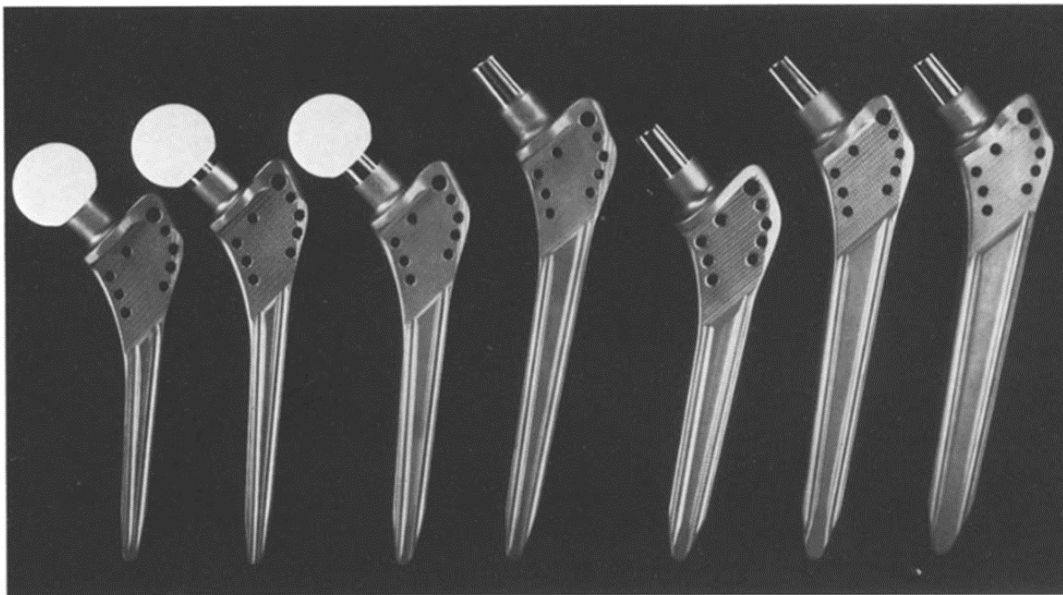


Figure 8 : Prothèses de hanche dont les tiges sont en Titane destinée à la chirurgie orthopédique [65].

### I.2.1.2. Les (bio)Céramiques

De nombreuses céramiques présentent des propriétés de biocompatibilité ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ , HA ...), réduisant ainsi le risque d'inflammation ou de réactions indésirables.

Les biocéramiques inertes ont une résistance intrinsèque élevée. En effet, des matériaux tels que l'alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) ou la zircone ( $\text{ZrO}_2$ ) présentent de bonnes propriétés

mécaniques avec une résistance à l'usure élevée et un faible coefficient de frottement. Ces propriétés sont très intéressantes pour des implants qui seront amenés à subir de fortes contraintes telles que les articulations ou les implants dentaires.

Certaines céramiques peuvent également être considérées comme actives dans les processus de régénération osseuse, ce sont les céramiques bioactives et biorésorbables. Les céramiques bioactives telles que l'hydroxyapatite (HA), de par leur faible résorptions sont utilisées comme implants permanents (Figure 9) [66][67]. Ces céramiques bioactives sont capables de se lier à certaines protéines ou ions, ce qui permettra aux implants de mieux s'intégrer dans le tissu vivant [68]. Les céramiques biorésorbables, telles que le phosphate tricalcique beta ( $\beta$ -TCP), sont quant à elles généralement utilisées pour de petits volumes de comblement osseux avec pour objectif, d'être complètement résorbées et remplacées par des tissus vivants.

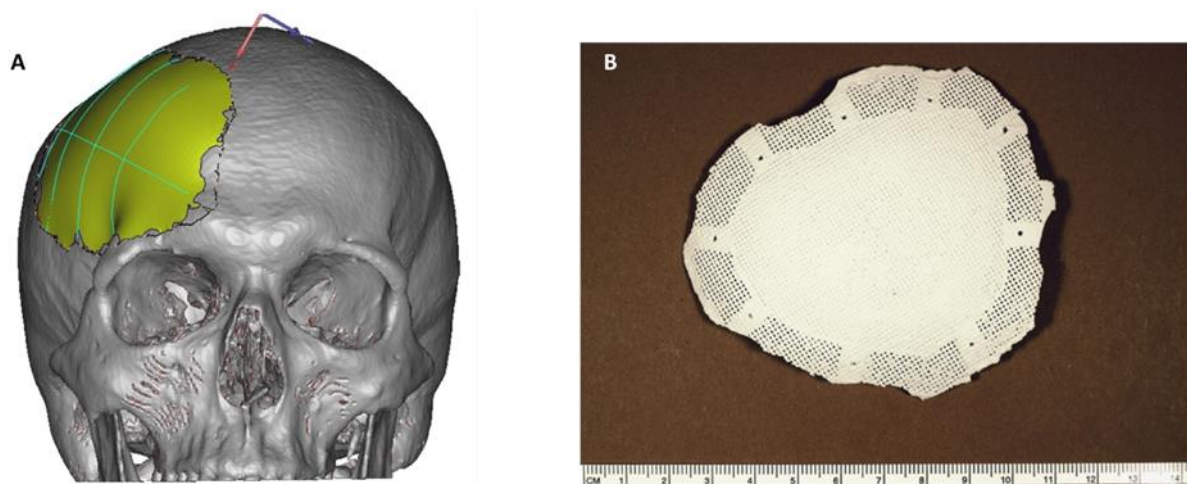


Figure 9 : Implant modélisé sur le scan d'un patient (A) Implant macroporeux en HA réalisé par stéréolithographie dans le cadre d'une étude menée par J. Brie et ses collaborateurs (B) [67]

Les phosphates de calcium sont une classe importante des biocéramiques. Les céramiques phosphocalciques comme l'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) ont la réputation d'être de bonnes candidates pour la substitution osseuse par leur composition chimique proche de la composition du minéral osseux. Cependant, parmi les phosphates de calcium, il existe d'autres composés thermodynamiquement stables avec des propriétés bien différentes comme décrits plus haut, tels que le  $\beta$ -TCP, le TCP ou encore des composés biphasés HA/ $\beta$ -TCP. Ces composés sont différents par leur composition chimique et notamment leurs ratios molaires Ca/P. La solubilité des phosphates de calcium augmente lorsque le rapport molaire Ca/P du composé diminue. L'hydroxyapatite, avec un ratio molaire Ca/P de 1,67 possède la

meilleure résistance mécanique des phosphates de calcium [69], [70] permettant une bonne stabilité de l'implant lors de la reconstruction osseuse. Sa composition chimique lui confère une excellente biocompatibilité et également la propriété d'être ostéoconductrice [6], [71]. L'hydroxyapatite est donc un très bon candidat pour l'ingénierie tissulaire osseuse [72].

Cependant, l'hydroxyapatite est peu résorbable et n'est pas ostéoinductrice. Alors qu'un des enjeux de l'ingénierie tissulaire osseuse a pour objectif de développer des implants permettant un remodelage et une régénération osseuse efficace. Cette propriété est recherchée afin de favoriser la repousse osseuse dans le cas de défaut osseux critique [73]. Pour améliorer la bioactivité des implants céramiques et favoriser les mécanismes de remodelage osseux, il est possible de fonctionnaliser leur surface [74], mais également de renforcer certaines propriétés par la modification de l'architecture de l'implant [75]–[77].

Pour finir, les céramiques peuvent être mises en forme par différents procédés permettant d'atteindre des formes et géométries complexes pour une meilleure intégration de l'implant sur le site du défaut osseux (granules, blocs microporeux et architectures 3D [78], [79]). Cette combinaison unique de propriétés fait des céramiques un excellent biomatériau et une solution adéquate aux implants pour le comblement osseux.

### **1.2.2. Mise en forme de biomatériaux**

Le développement de nouvelles techniques de mise en forme des matériaux et plus particulièrement les méthodes de fabrication additive ont permis le développement de nouvelles architectures pour le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse. L'efficacité, la précision et la répétabilité sont les atouts de ces méthodes de fabrication [80]. De nombreux matériaux peuvent être mis en forme par ces techniques de fabrication additive et notamment pour des applications biomédicales. Cette technologie est également très appropriée pour développer des structures complexes sans moule ou usinage [81]–[83]. Depuis le début du 21<sup>ème</sup> siècle, l'ingénierie tissulaire osseuse a été fortement impactée par cette technologie au travers du développement de prothèses ou encore d'implants dentaires [84]–[86].

L'os est le second tissu le plus implanté dans le monde avec un marché qui devrait atteindre les 4 milliards de dollars par an en 2027 [87], [88]. Dans ce contexte, la fabrication additive doit permettre de réduire les coûts de fabrication, mais également de réduire la production de déchets [89]. Les avancées dans les technologies de fabrication additive permettent aujourd'hui de créer des formes de plus en plus complexes avec pour objectif principal, de réaliser des implants personnalisés à façon. En effet, par cette technologie, des porosités multi-échelle interconnectées de dimensions contrôlées sont élaborées. Ces

caractéristiques sont indispensables à l'adhésion et la prolifération des cellules ainsi qu'à la vascularisation et à l'angiogenèse.

Pour obtenir des architectures poreuses capables de répondre à l'ensemble de ce cahier des charges, il est opportun de s'inspirer de la nature du fait de la complexité de l'os évoquée en première partie de ce chapitre [90]. Un fort caractère biomimétique chimique et structurel des substituts permettrait d'obtenir une meilleure intégration de ceux-ci. L'objectif émergent est donc de créer un substitut osseux synthétique s'inspirant de l'architecture osseuse dans toute sa complexité structurelle à l'aide des technologies de fabrication additive.

### **I.2.2.1. Techniques de mise en forme non additive**

Le besoin d'obtenir des architectures poreuses et interconnectées avec une microstructure contrôlée précède la mise au point des nouvelles technologies de fabrication additive. En effet, plusieurs techniques d'élaboration ont ainsi permis d'obtenir des architectures pour l'ingénierie tissulaire osseuse avec notamment l'obtention de bloc poreux. L'imprégnation de mousse, l'utilisation de billes sacrificielles ou encore le freeze casting font partie de ces méthodes.

L'imprégnation de mousses : Cette technique consiste en l'imprégnation d'une mousse polymère par une suspension céramique. L'efficacité de l'imprégnation va dépendre de la viscosité de la suspension, ainsi une suspension visqueuse permettra une meilleure adhésion aux parois. La mousse polymère est alors éliminée au déliantage puis le « positif » de la mousse obtenu sera fritté [91]. La macroporosité dépendra alors du type de mousse choisi avant imprégnation. Cette technique dépend donc des propriétés physico-chimiques de la suspension céramique allant de la viscosité de la suspension au taux de chargement afin d'optimiser l'imprégnation de la mousse. Par cette technique des matériaux composites à base d'HA sont réalisés Figure 10 [92].

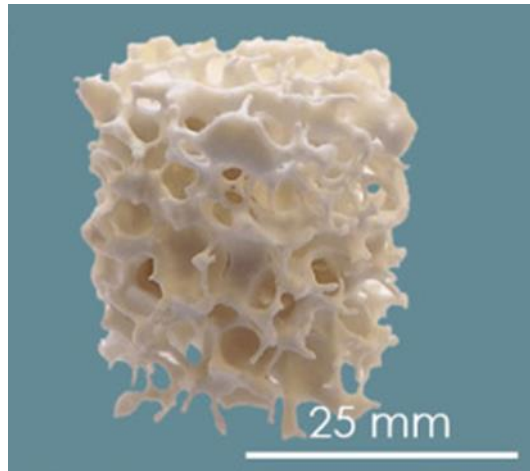


Figure 10 : Élaboration d'une architecture en géopolymère-hydroxyapatite par imprégnation de mousse [92].

L'utilisation de billes sacrificielles : Les billes utilisées dans ce procédé sont réalisées en polymère comme le poly méthacrylate de méthyle acrylique (PMMA) par exemple. Il est ainsi possible de contrôler la taille des billes, les préformes de billes, par deux voies, la voie thermique ou la voie chimique. La voie chimique consiste en la création d'une dissolution contrôlée de la surface des billes afin d'obtenir des billes collées formant ainsi la préforme [93]. La voie thermique consiste à fritter un empilement de billes. Lorsque la préforme de billes est obtenue, une imprégnation de suspension céramique est utilisée permettant l'obtention d'un « négatif » de l'empilement préalablement obtenu après des étapes de séchage, déliantage et frittage (Figure 11).

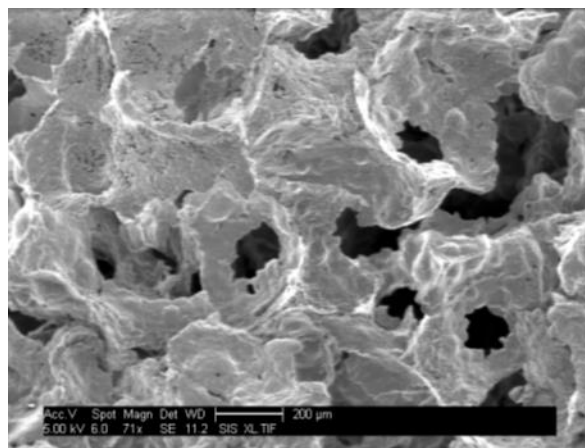


Figure 11 : Élaboration d'une architecture poreuse par billes de PMMA sacrificielles de tailles comprises entre 600 µm et 1000 µm.

Freeze casting : Cette technique consiste en la congélation d'une suspension céramique. La congélation va induire la formation de cristaux de solvant emprisonnant les

particules de céramique. Un lyophilisateur va ensuite permettre la sublimation du solvant permettant ainsi la formation de pores [94] (Figure 12). La dernière étape consiste donc en un frittage de la pièce crue.

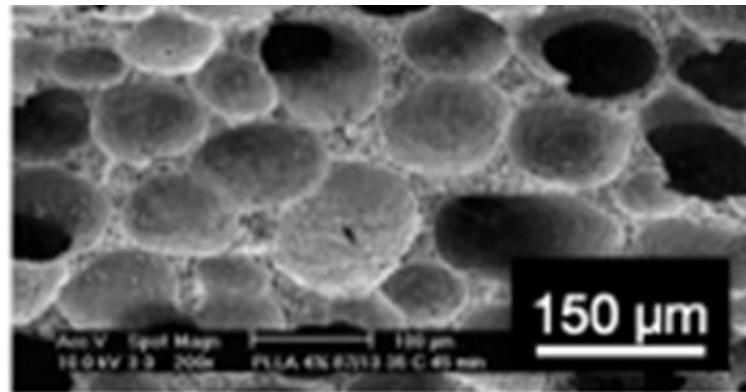


Figure 12 : Élaboration d'une architecture poreuse en polymère par freeze casting [95].

L'ensemble des techniques présentées ici permettent l'obtention de céramiques poreuses et interconnectées. Cependant, elles ne présentent pas les mêmes versatilités que les méthodes de fabrication additive présentées en suivant notamment dans la personnalisation des pièces et le contrôle direct de la macrostructure.

#### **1.2.2.2. Émergence des procédés de fabrication additive**

Le développement des outils informatiques et notamment les capacités de calcul des ordinateurs ont permis l'émergence des procédés de fabrication additive. La conception assistée par ordinateur (CAO), la fabrication assistée par ordinateur (FAO) et les machines à commande numérique (MCN) sont les résultats de ce progrès. Ces outils, mis au point dans les années 1960 à 1980, ont permis de modéliser des objets en 3D nécessaires à la création de protocoles pour les procédés de prototypage rapide [96]. De nombreux brevets décrivant de nouveaux procédés comme la stéréolithographie ou encore le frittage sélectif par laser sont déposés dans les années 80-90. La majorité de ces brevets est alors rendue publique dans les années 2010-2015, ce qui a permis la généralisation des machines de fabrication additive. Aujourd'hui, il est possible de trouver de nombreuses machines d'impression 3D peu chères du fait de cette généralisation, adaptées pour tous matériaux allant du grand public aux échelles industrielles. La mise en forme par fabrication additive est un des enjeux de ce siècle dans de nombreux domaines et notamment pour les applications biomédicales.

L'objet à imprimer est dans un premier temps simulé par CAO. Ce fichier CAO est ensuite converti en un fichier .STL (deux significations possibles : **ST**éréo**L**ithographie ou

Standard Triangle Language). Cette conversion permet notamment : la facettisation de l'objet, afin que ce fichier puisse être traité par les outils numériques relatifs à la fabrication additive ; le tranchage de l'objet numérique en couches planes généralement. Cette étape de tranchage permet d'obtenir les différentes strates à créer. Une fois ce fichier obtenu, l'objet est ensuite mis en forme par la méthode de fabrication additive adaptée. Suivant la méthode, d'éventuels post-traitements peuvent être effectués [97].

L'ensemble de ces étapes présente de nombreux avantages :

- Un contrôle précis des paramètres architecturaux, car tous les aspects sont vus et modélisés avant l'impression.
- Une haute résolution, qui dépend cependant de la méthode de fabrication additive choisie.
- Une grande reproductibilité des objets imprimés, grâce à l'automatisation de chaque étape.
- La possibilité de coupler plusieurs méthodes, permettant d'obtenir des objets bi- ou multi-matériaux soit dans l'architecture soit comme revêtement pour un objet 2D ou 3D.

Ces étapes sont communes à l'ensemble des techniques de fabrication additive retrouvées aujourd'hui dans la littérature. Les principales techniques utilisées pour des applications biomédicales sont répertoriées dans la Figure 13 et décrites dans la prochaine partie.

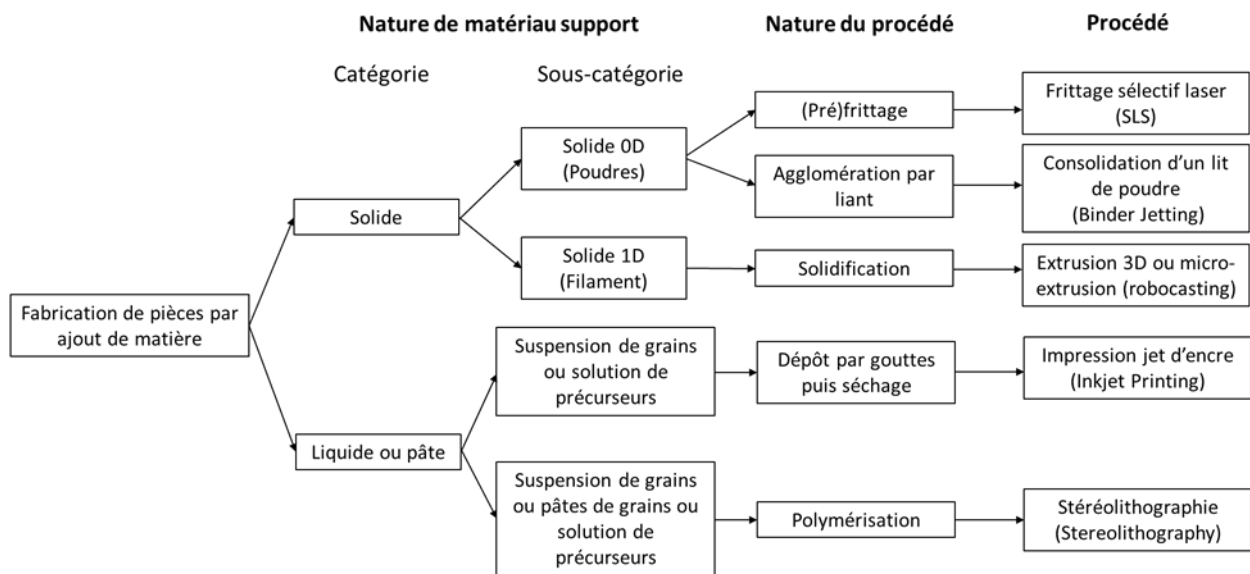


Figure 13 : Classification des différents procédés additifs [143].

### I.2.2.3. Procédés de fabrication additive appliqués aux substituts bio-inspirés

#### I.2.2.3.1. Frittage sélectif laser

Le frittage sélectif laser (SLS Selective Laser Sintering) consiste à fritter de façon sélective des particules/grains de poudre préalablement étalées sur un plateau de fabrication. Ce frittage se fait à l'aide d'un faisceau laser qui peut balayer l'ensemble du plateau (Figure 14). Chaque strate peut avoir une épaisseur allant de 50  $\mu\text{m}$  à 500  $\mu\text{m}$ , selon la nature du matériau et la puissance du laser utilisé. La précision dimensionnelle dépend également de ces deux paramètres, mais surtout des phénomènes thermiques résultant de l'interaction laser-substrat. Il est possible d'atteindre des résolutions dimensionnelles de 10  $\mu\text{m}$  à 120  $\mu\text{m}$  [98]. Cette technique présente deux avantages majeurs : sa rapidité d'exécution et l'utilisation de matières premières brutes pulvérulentes. Cependant, il est difficile de contrôler le retrait et les différents gradients thermiques lors du lasage des couches, ce qui peut engendrer la détérioration des propriétés mécaniques [99].

Cette technique de fabrication additive est particulièrement efficace pour des matériaux à bas point de fusion contrairement aux matériaux à haut point de fusion comme certains métaux et les céramiques, car la densification se déroule à l'état solide. Ainsi, Tan et son équipe [100] ont réalisé des implants orthopédiques en alliage de titane (Ti-6Al-4V). Des implants en céramique sont aussi réalisés par cette méthode de mise en forme adaptée à la fabrication d'objet de géométries complexes avec une précision suffisante [101]. Le SLS étant utilisé à l'origine pour mettre en forme des polymères permet également la réalisation de



matériaux composites, polymère/céramique [102]–[104]. Ainsi Feng et son équipe [105] ont réalisé une architecture à base d'Acide polylactique (PLLA) mélangé avec un polymère biodégradable (Polyétheréthercétone PEEK), associé à du  $\beta$ -TCP. Cette architecture avec une taille de pores de 450 à 500  $\mu\text{m}$  testée *in vivo* et *in vitro* a montré de très bons résultats de biodégradation au terme des 8 semaines d'évaluation (Figure 14. B).

Le fait de pouvoir imprimer des objets 3D composites permet d'améliorer l'ostéogénèse. Une étude a exploré l'utilisation des microsphères PCL/HA grâce au procédé SLS [106]. Des constructions multicouches allant d'une couche de PCL pure à une couche de PCL combinée aux nanoparticules d'HA à 30 % en poids par incrément de 5 % en poids sur sept couches de 400  $\mu\text{m}$  ont été créées. La construction à gradient biomimétique, de haut en bas, était destinée à répliquer le cartilage articulaire et l'os sous-chondral. Après une implantation de 12 semaines dans un modèle de lapin, les constructions à gradient ont montré une formation osseuse trabéculaire améliorée par rapport aux échafaudages PCL purs, après analyse au  $\mu\text{tomographe}$  ( $\mu\text{CT}$ ). La technique de SLS permet de mettre en forme des matériaux composites, mais aussi des céramiques à condition de maîtriser les phénomènes thermiques inhérents à l'interaction rayonnement-matière. Néanmoins, les hautes résolutions dimensionnelles restent compliquées à obtenir du fait de cette interaction difficile à maîtriser.

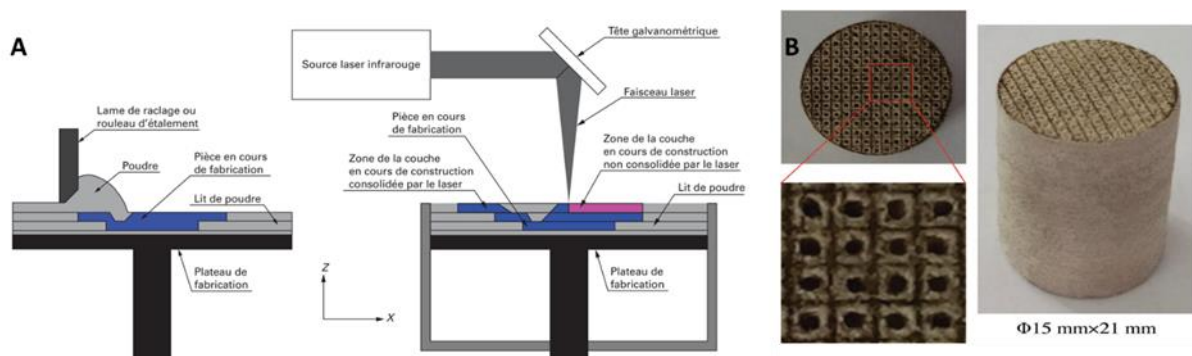


Figure 14 : Illustration du procédé de frittage sélectif laser (SLS) ; A) Architecture en PLLA/PEEK-  $\beta$ -TCP obtenus par Feng et son équipe B) [149]

### I.2.2.3.2. Impression par jet de liant

L'impression par jet de liant est également une technique de fabrication additive utilisant la poudre comme matière première. La tête d'impression se déplace au-dessus du plateau de fabrication recouvert d'un lit de poudre pour déverser des gouttes de liant. Un pontage est alors réalisé avec les grains de poudre céramique notamment aux endroits où les strates doivent être construites (Figure 15). Il est ensuite nécessaire de réaliser un déliantage

afin d'éliminer le liant à base aqueuse. La hauteur des strates est de l'ordre de la centaine de microns avec une résolution dimensionnelle de l'ordre de 50 à 100 microns. Ce procédé est facile à mettre en place, peu coûteux et rapide.

Cependant, les pièces crues présentent un état de surface rugueux et une faible rigidité, rendant leur manipulation délicate. L'impression par jet de liant est notamment utilisée pour la fabrication de substituts osseux [107] ou d'implants dentaires en céramique [108]. Cependant, cette technique ne permet pas l'impression d'objet 3D de grandes dimensions, ce qui limite son utilisation pour l'obtention de substituts osseux. Sheydaeian et son équipe [109] ont mis au point des implants de taille réduite pour l'articulation interphalangienne en céramique poreuse (Figure 15). La spécificité de cette technique de fabrication a permis l'obtention de céramique dense avec des propriétés mécaniques intéressantes (45 MPa).

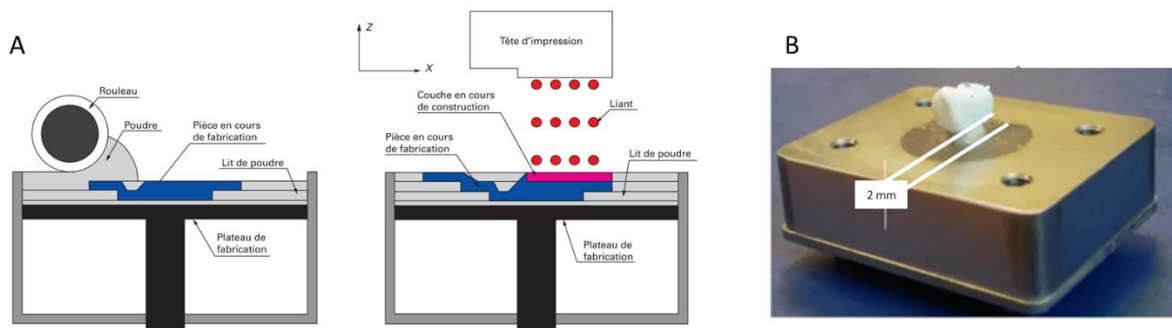


Figure 15: Illustration du procédé de jet par liant A) Implants de tailles réduites pour l'articulation interphalangienne B) [153]

### I.2.2.3.3. Impression par jet d'encre

L'impression par jet d'encre utilise également le système de gouttes pour mettre en forme la matière. Cependant, contrairement aux techniques décrites précédemment, il n'y a pas de lit de poudre. La goutte projetée sur le plateau de fabrication contient la matière à lier et c'est l'ajout successif de gouttes sur ce plateau par strates qui permet d'obtenir un objet 3D de faible dimension spatiale (Figure 16). L'impression par jet d'encre permet d'obtenir des détails de l'ordre de 40 microns. Cette technique très précise, permet d'obtenir un bon état de surface des matériaux (lisse sans fissure) et permet également d'obtenir des objets 3D multimatériaux. La difficulté de cette technique repose sur la mise au point des encres, ce qui rend le procédé cher. De plus, la vitesse de réalisation est lente et ne permet pas d'obtenir des objets d'une hauteur en Z plus grande que la centaine de microns.

L'impression par jet d'encre permet notamment de déposer sur les substrats ou implants, des biomolécules, des polymères ou encore des cellules vivantes afin d'améliorer le

potentiel ostéogénique et angiogénique du matériau [110]. La bonne précision de dépôt de cette technique permet également de recouvrir des architectures complexes [111]. Cette technique permet de bio-mimer la matrice extracellulaire de l'os afin de promouvoir l'activité, la prolifération et la différenciation cellulaire [112], [113]. L'impression par jet d'encre ne permet d'imprimer que des objets visqueux avec de faibles propriétés mécaniques. Le fort potentiel de cette technique dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse réside dans le fait de pouvoir incorporer des cellules dans un environnement contrôlé directement sur des substituts complexes.

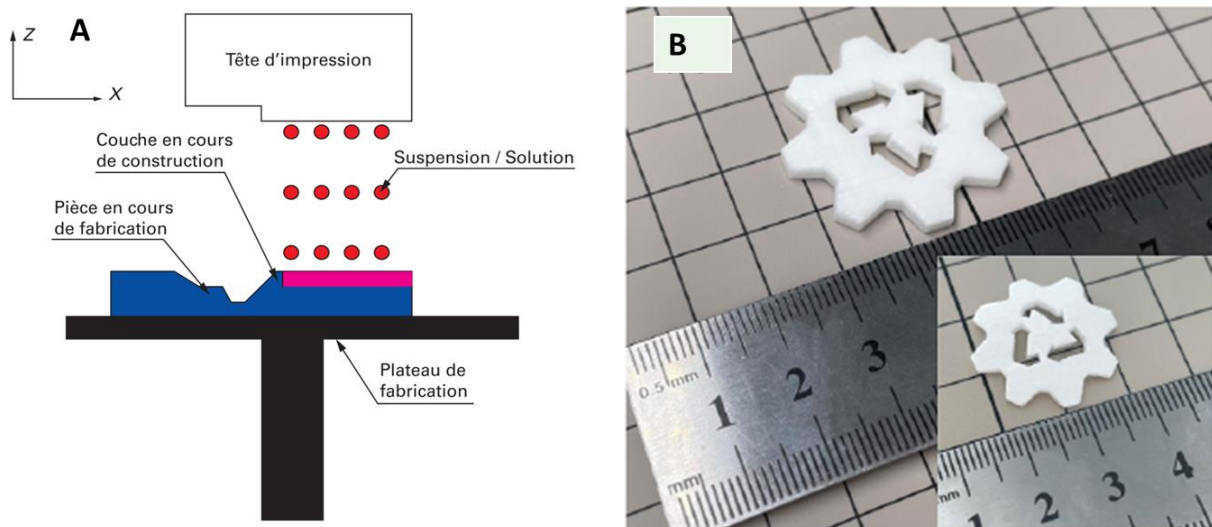


Figure 16 : Illustration du procédé d'impression jet d'encre A) ; B) Pièce crue en  $\text{SiO}_2\text{-H}_3\text{BO}_3$  obtenue par C. Liang et al. [114]

#### I.2.2.3.4. Extrusion 3D : Robocasting

L'extrusion 3D est la technique de fabrication additive la plus démocratisée. De nombreuses machines d'extrusion 3D sont vendues dans le commerce pour le grand public à des prix réduits. Cette généralisation fait que cette technique d'impression a été beaucoup plus étudiée. Le principe repose sur l'extrusion d'un cordon du matériau voulu (polymère, métal ou céramique) sur un plateau de fabrication au travers d'une buse. La précision dimensionnelle va dépendre ici de la taille du cordon et donc directement de la taille de la buse utilisée pour l'extrusion (Figure 17). C'est un procédé peu coûteux avec de nombreux logiciels *open source* permettant la programmation de la machine. Cependant, la mise en place d'un protocole d'extrusion nécessite de faire de nombreux essais afin de trouver les bons paramètres d'extrusion ce qui entraîne la perte d'un volume important de matière première notamment

lorsqu'il s'agit d'obtenir une bonne résolution dimensionnelle. En effet, la formulation de la pâte nécessite une taille de particules adaptée à la taille de la buse et doit garantir un comportement rhéologique adapté à son extrusion. L'utilisation de buses d'un diamètre inférieur à la centaine de microns est délicate.

De nombreuses architectures à base de polymère ou céramique dédiée à l'ingénierie tissulaire ont été mises au point par cette technique [115]–[117]. Singh et son équipe [118] ont réalisé notamment l'impression d'une oreille humaine à taille réelle avec une composition relativement proche du cartilage humain. Cette technique permet également l'impression de substituts en hydrogel permettant la reconstruction osseuse *in vivo* [119]. Cependant, la difficulté à obtenir une précision correcte et une rugosité de surface adaptée subsiste au regard des fortes pressions d'extrusion imposées, inhérentes aux propriétés mécaniques recherchées (Figure 17)[120], [121]. En effet, l'extrusion par la buse génère un écoulement de la pâte d'une forme donnée (cylindre, étoiles ...) générant des macropores particuliers. L'architecture de la pièce sera donc faite autour de cette contrainte relative à la forme de la buse.

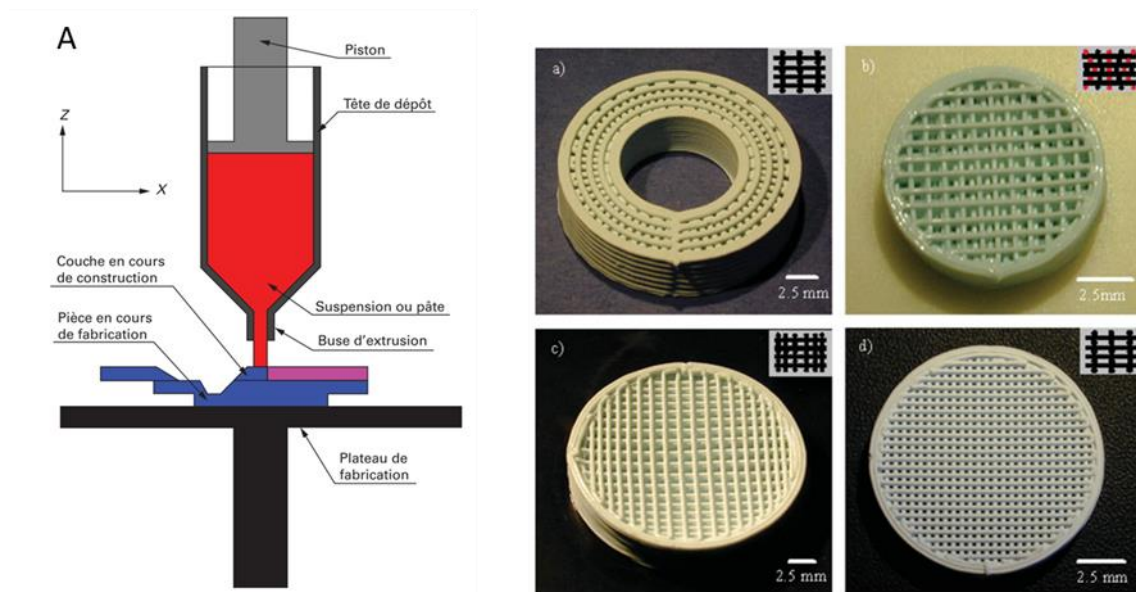


Figure 17 : Illustration du procédé de robocasting A). Différentes architectures en HA réalisées par Dellinger et son équipe (a, b, c et d) [163]

Cette méthode de fabrication additive peut aussi permettre une mise en forme de l'objet 3D de manière indirecte. Ce processus revient à fabriquer un négatif de l'architecture à mettre en forme puis de combler ce négatif par une suspension céramique ou une poudre céramique. Le moule, réalisé en polymère, sera brûlé après l'étape de déliantage permettant le maintien de la structure durant tout le processus. Cette méthode permet de s'abroger de la réalisation

d'une suspension polymère-organique utilisée dans le cadre de la fabrication additive directe [122], [123].

#### **I.2.2.3.5. Stéréolithographie**

La photopolymérisation en cuve, plus communément dénommée stéréolithographie, permet, quant à elle, de combler ce manque de résolution tout en ayant un bon état de surface. Cette technique de fabrication repose sur le principe de photopolymérisation soit la polymérisation initiée par photons. Le procédé se fait comme suit, une pâte photosensible va préalablement être étalée sur le plateau de fabrication d'une épaisseur voulue. Puis, un laser UV va polymériser les zones de la strate pour former l'objet 3D (Figure 18). Cette suspension photosensible contient des composés organiques comme des dispersants, des photo-initiateurs et une résine photopolymérisable. La résolution en Z va donc dépendre de l'épaisseur des couches. C'est un procédé rapide permettant d'obtenir des pièces denses avec une faible rugosité de surface. Cependant, la pâte photopolymérisable coûte chère et les pièces crues, noyées dans la cuve de pâte une fois imprimées sont difficiles à nettoyer [124]. Cette technique de mise en forme permet l'élaboration de nombreuses architectures complexes, ce qui s'inscrit parfaitement dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse et de la médecine personnalisée (Figure 18) [125]–[128]. De plus, cette technique est particulièrement efficace pour la mise en forme de céramiques et notamment à base d'hydroxyapatite pour des architectures poreuses [67], [124], [129].

Il est également possible de remplacer la source laser par une source lumineuse UV. Cette variante induit l'éclairage d'une matrice de micro-miroirs digitaux (autrement appelée système DMD pour Digital Micromirrors Device). Par ce dispositif, le procédé de microstéréolithographie, c'est l'ensemble de la couche à polymériser qui est éclairé en une seule fois diminuant ainsi le temps nécessaire à l'impression d'une pièce. Cependant, la maîtrise de la jonction entre deux couches est bien plus complexe. Ce procédé peu populaire dans les années 2000 se voit être aujourd'hui beaucoup plus prisé avec notamment la promotion de cette technologie par des entreprises de la fabrication additive de céramique, comme 3DCeram<sup>®</sup>, Lithoz<sup>®</sup> et Admatec<sup>®</sup>, permettant la réalisation d'architectures complexes de grands volumes [130], [131].

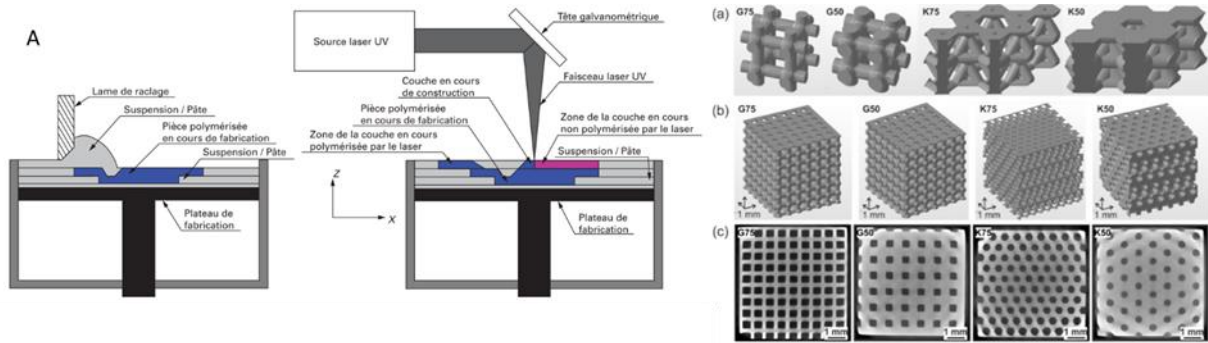


Figure 18 : Illustration du procédé de stéréolithographie A) Mise en forme d'HA par stéréolithographie en fonction de plusieurs motifs (a, b et c) [168]

### I.3. Évaluation biologique des implants

Il existe plusieurs modèles d'évaluation biologique : le modèle *in vivo* et le modèle *in vitro*. Le premier permet d'étudier la réponse d'organismes vivants en implantant des substituts sur des animaux, tandis que le second modèle permet l'étude de substituts lors d'expériences de cultures cellulaires. Ces méthodes sont largement utilisées afin de tester la cytotoxicité des implants et leur bioactivité, bien qu'il n'existe pas de protocoles expérimentaux standards de ces deux modèles. Ces modèles permettent de suivre la différenciation des cellules au contact des implants par mesures quantitatives d'expression, de gènes ou de protéines. Il est également possible d'étudier la progression de la régénération de défauts osseux par des méthodes d'imagerie ou encore des mesures histomorphométriques.

Le modèle *in vitro* est une méthode non physiologique. Il se décline sous la forme de culture cellulaire en 3D ou 2D pour des implants en 3D ou en 3D dynamique avec l'utilisation de bioréacteurs à flux. Ce bioréacteur à flux permet de se rapprocher des conditions auxquelles les implants sont soumis dans le corps humain [132]–[134]. Ces évaluations de cultures cellulaires sur un biomatériau peuvent être : (1) réalisées par culture directe, un type cellulaire est en contact direct avec le matériau ; (2) par co-culture, avec l'interaction de deux ou plusieurs types cellulaires au contact du matériau et (3) par culture indirecte où les effets des différents facteurs sécrétés par les cellules sont étudiés. Les types cellulaires principalement utilisés lors d'études de cytotoxicité et de bioactivité sont :

- Les ostéoclastes et ostéoblastes, cellules intervenant dans le remodelage osseux ayant la capacité de résorber l'os (ostéoclastes) et de générer de l'os (ostéoblastes) [135]–[137].
- Les cellules souches mésenchymateuses (MSC), cellules qui ne sont pas encore différenciées en cellules osseuses, provenant de l'Homme [138]–[140].
- Des cellules précurseurs d'ostéoblastes, c'est-à-dire des cellules dont la différenciation en cellules osseuses est déjà enclenchée comme les cellules murines MC3T3 [141]–[143].
- Les macrophages, cellules ayant un rôle important dans les réactions immunobiologiques impactant directement le processus de réparation osseuse [144].
- Les cellules endothéliales, cellules ayant un rôle primordial dans le maintien et le développement des fonctions vasculaires [145].

Le modèle *in vitro* est principalement utilisé comme étude préliminaire avant l'utilisation du modèle *in vivo*. Il n'en reste pas moins que le modèle *in vitro* a de nombreux avantages.



Plus simple à mettre en œuvre, il est moins coûteux, demande moins de matériel et permet l'obtention de résultats plus rapidement, respectant le bien-être animal [146]. De plus, ce modèle permet d'obtenir des résultats répétables par le contrôle de chaque paramètre de l'expérimentation [147]. Deux systèmes sont à différencier dans les études *in vitro*, les évaluations statiques et les évaluations dynamiques. Les modèles basés sur une évaluation statique n'ont pas de mouvement de flux et sont considérés comme des modèles très simplifiés [148]. À l'inverse, des évaluations biologiques en modèle dynamique permettent aujourd'hui de se rapprocher des conditions physiologiques. Ces modèles incluent une dimension supplémentaire avec une culture dynamique des cellules rendue possible par la mise en place de flux semblables au modèle physiologique de l'os. Ce type de modèle permet d'induire un microenvironnement physiologique pour les cellules en contrôlant par exemple l'apport en nutriments, le pH ou encore l'oxygénation dans le but d'obtenir des réponses plus réalistes [149]. Il existe plusieurs dispositifs permettant la mise en place d'une évaluation biologique dynamique comme le système de flasque rotative ou encore les systèmes de flux par perfusion (Figure 19). Ces types de bioréacteurs sont de plus en plus populaires bien qu'il n'y ait pas encore de protocoles standardisés mis en place pour des objectifs ciblés et l'étude de réponses cellulaires.

En revanche, le manque de conditions proches de notre système physiologique ne permet pas la validation de l'implant. En effet, une réponse positive de l'implant lors d'évaluation *in vitro* n'est pas suffisante et ne permet pas de conclure définitivement. Les cellules peuvent avoir un comportement différent du fait des conditions de l'étude *in vitro* ce qui aura pour impact de modifier les capacités cellulaires par rapport aux modèles *in vivo* [150]. Enfin, la non-présence des mécanismes de défense que l'on retrouve dans notre corps aura un impact sur la régulation des substances toxiques et donc sur les résultats cytotoxiques [151].

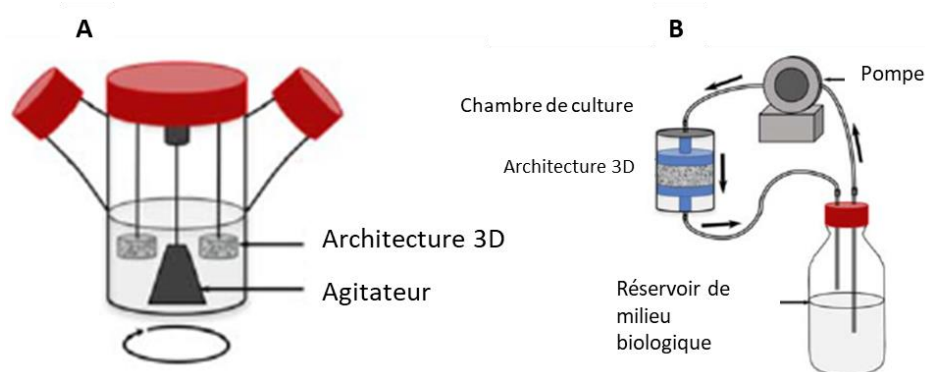


Figure 19 : Bioréacteurs pour de la culture cellulaire en mode dynamique, A) par flasque rotative, B) par perfusion de flux [152]



Le modèle *in vivo* vient donc compléter l'étude *in vitro*. Ce modèle permet d'obtenir des conditions plus proches du corps humain, mais dans un système animal, soit toujours un système différent de celui de l'humain. Ces évaluations sont donc plus coûteuses et moins reproductibles que la culture cellulaire, mais apportent une réponse plus concrète des capacités de l'implant sur le site du défaut osseux. De nombreux animaux (rat [153], lapin [154], mouton [155], cochon [156], chien [157], chèvre [158] ...) et sites de défauts osseux (crâne [159], fémur [160], cubitus [161]...) ont fait l'objet d'études. Le modèle *in vivo* joue un rôle important dans la compréhension des mécanismes relatifs au comblement osseux comme l'ostéoconduction, l'ostéoinduction, la biocompatibilité, les propriétés mécaniques, la dégradation et l'interaction de l'implant avec les tissus osseux. Une étude *in vivo* ne pourra cependant pas simuler des conditions cliniques. Y. Li et son équipe [162], recommandent alors de se servir des résultats obtenus sur modèle animal comme des indications pour une étude clinique après avoir remarqué que de trop nombreuses publications faisaient directement le lien entre résultats *in vivo* et simulation clinique.

Afin de mieux comprendre l'impact du modèle *in vivo* et *in vitro* sur la réponse des implants céramiques, la suite de ce chapitre a pour objectif de comparer les résultats et les conclusions de chaque modèle en fonction d'un aspect structurel de l'implant.

### **I.3.1. Influence structurelle de l'implant**

De nombreuses études permettent d'expliquer aujourd'hui le rôle de l'architecture de l'implant dans la reconstruction osseuse. Bien que Bohner explique qu'il ne peut pas y avoir d'architecture d'implant optimum, les réponses biologiques et mécaniques sont bien impactées par les différents paramètres que présentent les implants poreux [163]. Ces caractéristiques sont définies en fonction de deux échelles spatiales, la macrostructure et la microstructure. La macrostructure est la structure interne de l'architecture comprenant des macropores d'une échelle de l'ordre de 0,1 mm à 1 mm. La macrostructure comprend la forme et la taille de l'implant qui peut être définie par son taux de macroporosité, la taille des macropores, la géométrie et l'interconnectivité de ceux-ci. Ces paramètres dépendent surtout de la technique de fabrication utilisée pour mettre en forme l'implant. La microstructure est quant à elle caractérisée par la taille des grains et la présence éventuelle de microporosité ; microporosité dont la taille des micropores est de l'ordre de 0,1 micron à quelques dizaines de microns. La microporosité est un paramètre qui dépend du frittage de la céramique et de la capacité du matériau à se densifier. Chacun de ces paramètres à leurs échelles respectives influence la réponse biologique et précise l'intérêt et les potentialités du matériau pour l'ingénierie tissulaire osseuse [77],[164].

### **I.3.1.1. Impact de la microstructure**

Le contrôle de la microporosité est un paramètre essentiel dont il faut tenir compte dans le processus d'élaboration de matériaux céramiques notamment destinés à la régénération osseuse. Ce paramètre, gouverné par le frittage, va influencer à la fois les propriétés mécaniques, mais aussi biologiques de l'architecture.

D'un point de vue mécanique, la taille des grains est directement corrélée avec les propriétés mécaniques du matériau. En effet, le frittage entraîne la croissance des grains or des travaux réalisés sur l'HA ont montré qu'une taille de grain inférieure à 0,3  $\mu\text{m}$  ou une taille de grain supérieure à 0,8  $\mu\text{m}$  s'avère délétère pour les propriétés mécaniques [165].

D'un point de vue biologique, de nombreuses études mettent en évidence l'intérêt des architectures denses exemptes de microporosité sur la colonisation et la viabilité cellulaire [77]. De plus, un impact positif sur la dynamique d'ostéointégration des cellules sur des implants denses a été démontré [166]. Ainsi à l'échelle de la microstructure, l'absence de pore est bénéfique aux évaluations biologiques.

C'est pourquoi le cahier des charges retenu pour la microstructure des architectures mises en forme est une céramique dense avec des grains fins. La présente étude a donc pour objectif de s'intéresser à la macrostructure de l'implant et à ses effets.

### **I.3.1.2. Impact de la macrostructure**

La macroporosité totale de l'architecture est définie comme le rapport des volumes vides sur le volume total de l'échantillon si celui-ci est totalement densifié (absence de microporosité résiduelle après frittage). Du point de vue mécanique, plus le substitut est macroporeux moins il sera résistant. Le taux de macroporosité aussi a un impact direct sur les propriétés biologiques. D'un point de vue biologique, un substitut présentant un taux élevé de macroporosité interconnectée doit améliorer la diffusion des flux de nutriments aux cellules ainsi que la migration cellulaire [167]. Les substituts ayant les meilleures réponses aux évaluations biologiques ont un taux de macroporosité compris entre 50% et 80%. Une densité de macropores supérieure à 65% devrait permettre un meilleur flux au sein du substitut et donc une meilleure repousse osseuse [168]. À titre de comparaison, l'os trabéculaire a un taux de macroporosité allant de 50% à 90% en fonction du type d'os [169]. Le taux de macroporosité à lui seul ne permet pas de bien définir l'influence des paramètres architecturaux de l'implant. Il est dépendant de critères tels que la taille des macropores, l'interconnexion entre ces

macropores et la forme de ces derniers. Chacun de ces paramètres a également un impact sur la reconstruction osseuse au sein de l'implant et sur la tenue mécanique de celui-ci [163].

La taille des macropores va être définie par un facteur limitant, la taille des cellules. En perpétuel mouvement, les cellules peuvent se retrouver agglomérées si la taille des macropores est trop petite entraînant la mort prématurée des cellules. Les cellules les plus volumineuses de l'ostéogénèse sont les ostéoclastes pouvant atteindre la taille de 100  $\mu\text{m}$ . D'un autre côté, des pores trop grands ( $> 1\ 000\ \mu\text{m}$ ) ne permettent pas une bonne angiogénèse et une bonne reconstruction osseuse [164]. En effet, si la vascularisation, qui permet l'apport de nutriments aux cellules nécessaire à leur bon développement, est restreinte par la taille des macropores, l'ostéogénèse est impactée [170]. La taille des macropores doit alors être comprise en 100  $\mu\text{m}$  et 1 000  $\mu\text{m}$ .

La taille des macropores est à mettre en relation avec le paramètre d'interconnectivité. Le passage des cellules au travers des macropores se fait via la connexion entre ces pores et permet une bonne pénétration vasculaire et cellulaire [171]–[174]. L'interconnexion des pores est fonction de la taille des macropores et du taux de macroporosité de l'implant. La taille des interconnexions d'intérêt étudiée dans la littérature est de l'ordre de 20  $\mu\text{m}$  à 160  $\mu\text{m}$ .

Enfin il existe de nombreuses géométries d'implants capables de favoriser la repousse osseuse. Deux catégories permettent de classer les architectures des implants céramiques :

- Les architectures réalisées sur la répétition d'un motif prédéfini
- Les architectures basées sur un modèle entier

Ces géométries ont pour objectif de favoriser l'intégration du substitut dans le corps. Tout comme l'architecture de l'os trabéculaire, les implants à destination de l'ingénierie tissulaire osseuse peuvent prendre plusieurs formes (Figure 20). La conception des motifs prédéfinis peut être classée en deux catégories de conception, les conceptions paramétriques et les conceptions non-paramétriques. Les modèles paramétriques sont les modèles les plus standardisés, établis par des algorithmes spécifiques alors que les modèles non-paramétriques englobent des géométries connues. Ces dernières sont par ailleurs prometteuses grâce à leur rapport résistance/poids élevé.

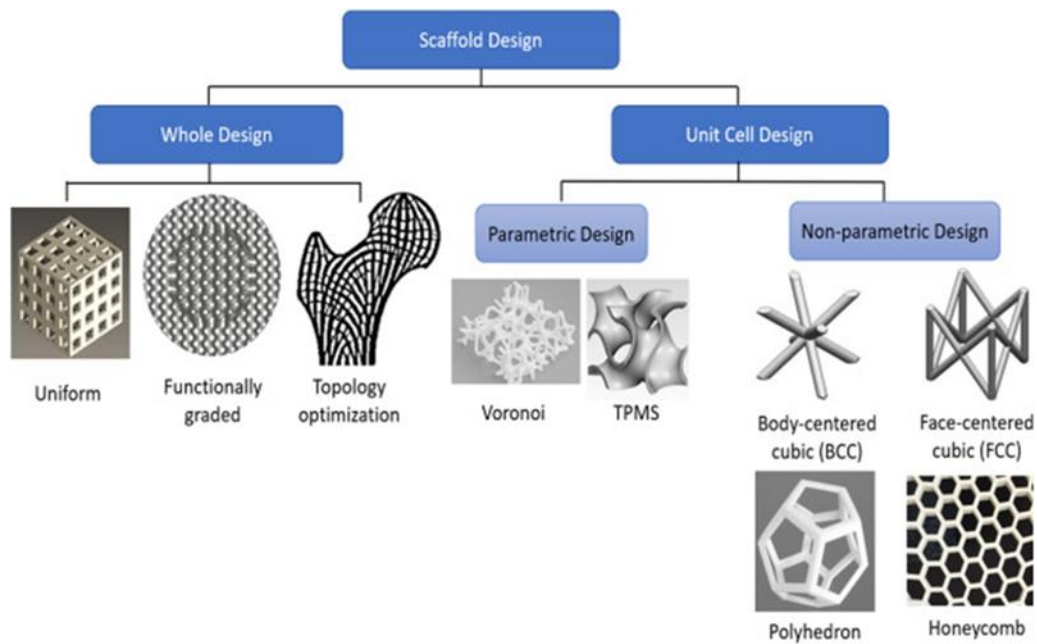


Figure 20 : Classification des architectures des macropores basée sur les travaux de Hao Chen [112] et repris par Susheem Kanwar [106] (TPMS : Triply Periodic Minimal Surface)

Enfin les architectures réalisées sur un modèle entier sont réparties en trois catégories et présentent chacune des avantages et des inconvénients au regard d'une reproduction de l'os naturel (Tableau 1). Ainsi, selon les modèles architecturaux, la réponse de la repousse osseuse est différente. Le comportement cellulaire est alors observé afin de comprendre pourquoi et comment la géométrie des pores l'impacte [77].

Designs	Avantages	Limites
Plan uniforme	Facile à élaborer	Mauvaise reproduction du caractère anisotrope de l'os
Design sous forme de gradient	Reproduction de la nature anisotrope de l'os naturel. Robustesse grâce à leur grande résilience. Équilibre optimal atteint entre les propriétés mécaniques et biologiques.	Contraintes mécaniques plus importantes aux points de transitions
Topologie optimisée		Difficulté de mise en forme

Tableau 1 : Avantages et limites des modèles entiers

La suite de cette partie décrira successivement les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* en fonction des différents paramètres architecturaux.

## I.3.2. : Réponses des évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo*

### I.3.2.1. Réponse *in vitro*

Le début des années 2000 fut marqué par les premières études biologiques menées sur des architectures céramiques pour la reconstruction osseuse. L'étude par modèle *in vitro* sur des architectures complexes à base de phosphate de calcium a pris de l'ampleur avec l'émergence des techniques de fabrication additive. Un résumé de quelques résultats, relatifs à l'architecture des implants de ces deux dernières décennies, est reporté dans le Tableau 2.

Ces études *in vitro* sont pour la majeure partie réalisées sur des temps courts (minimum 7 jours allant parfois jusqu'à 28 jours). Ces études font principalement varier deux paramètres : la taille des macropores et la forme de ces macropores.

L'étude sur la géométrie des pores a permis de mettre en évidence une organisation cellulaire modifiée [175][176] notamment les angles concaves de ces géométries [77][177]. Ces changements morphologiques peuvent modifier le comportement cellulaire allant jusqu'à engendrer la différenciation cellulaire des lignées MC3T3 [178] ou de cellules souches mésenchymateuses (MSC) [179]. La géométrie des pores est un paramètre étudié généralement avec la taille des macropores. Cette dernière est aussi largement étudiée dans la littérature [77], [176], [177]. Ainsi les différentes études regroupées dans le Tableau 2, évaluant une taille de macropore, ne concluent pas sur une taille de macropores favorable, mais sur une gamme de tailles de macropores permettant la promotion de la repousse osseuse [180]. Cette gamme est comprise entre 300  $\mu\text{m}$  et 1 000  $\mu\text{m}$ , soit celle définie dans la partie I.3.1.2. En effet, il semblerait que la géométrie des macropores soit plus déterminante dans la bonne prolifération des cellules.

L'étude de Bouet et al. [149] a montré l'impact d'une gamme d'interconnexions allant de 150  $\mu\text{m}$  à 280  $\mu\text{m}$  sur la répartition des cellules pré-ostéoblastes au sein de l'implant. La culture a été réalisée à l'aide d'un bioréacteur afin de générer un flux constant. La répartition des cellules a été caractérisée par imagerie d'immunofluorescence. Ainsi il a été observé une meilleure densification des cellules dans les interconnexions les plus grandes, proche de 280  $\mu\text{m}$  du fait d'un meilleur apport en nutriment par le flux généré.

Ces études biologiques *in vitro* sur des temps très courts permettent notamment de mieux comprendre certains mécanismes biologiques. Par exemple, le fait de pouvoir isoler un certain type cellulaire et de l'observer de manière répétable et dans des conditions contrôlées a permis d'étudier plus précisément l'expression du gène ALP (gène exprimé lors de la

différenciation cellulaire) , des protéines collagéniques et non collagéniques (protéines synthétisées lors de la différenciation) par Meesuk et son équipe et d'observer avec des critères quantitatifs la différenciation osseuse [181].

Le fait d'étudier un seul paramètre architectural peut créer un biais sur les conclusions de morphologie du substitut, car il est nécessaire de prendre en considération l'ensemble des paramètres architecturaux impactant la différenciation osseuse. Pour finir le fait de n'étudier qu'un seul type cellulaire, crée également un biais sur les interprétations de résultats obtenus lors d'études sur la taille de différents macropores, car plusieurs types cellulaires sont nécessaires pour l'ostéogénèse [182].

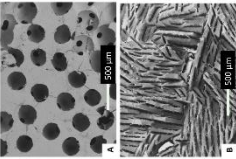
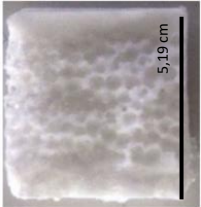
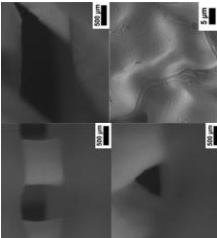
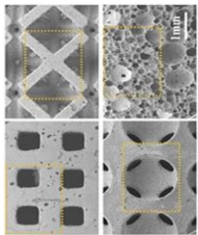
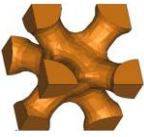

<b>Méthode d'élaboration</b>	Freeze casting								
<b>Matériaux</b>	HA - $\beta$ TCP	HA - TCP	HA - $\beta$ TCP	HA	HA	HA	HA	SiHA	Micro-stéréolithographie
<b>Taux de macroporosité</b>	65%	NI	53%	70%	54,50%	NI	NI	NI	NI
<b>Taille des macropores</b>	350 $\mu$ m	380 $\mu$ m	500 $\mu$ m à 1 000 $\mu$ m	50 à 500 $\mu$ m	300 $\mu$ m à 600 $\mu$ m	300 $\mu$ m et 600 $\mu$ m	100 $\mu$ m	300 $\mu$ m et 600 $\mu$ m	300 $\mu$ m et 600 $\mu$ m
<b>Inter-connexion</b>	105 $\mu$ m	150 $\mu$ m à 280 $\mu$ m	NI	>500 $\mu$ m	100 $\mu$ m	NI	NI	NI	NI
<b>Forme des macropores</b>									
<b>Durée de l'expérience</b>	7 jours	7 jours	7 jours	7 jours	14 jours	7 jours	7 jours	7 jours	7 jours
<b>Résultats</b>	L'architecture avec rainures permet une différenciation plus rapide des MSCs	Minéralisation de la matrice par des pré-ostéoblastes	Taux de prolifération et activité des MC3T3 améliorés avec les macropores en forme de parallélogramme	Différenciation ostéoblastique induite par les macropores sphériques et concaves (MSC)	Architecture est biocompatible (MC3T3)	Angles concaves des architectures denses sont favorables à la prolifération des cellules (MC3T3)			
<b>Référence</b>	Panseri <i>et al</i> [179]	Bouet <i>et al</i> [149]	Xu <i>et al</i> [176]	Wang <i>et al</i> [177]	Liu <i>et al</i> [180]	Rüdrich <i>et al</i> [77]			

Tableau 2 : Études *in vitro* sur des architectures de céramiques phosphocalciques recensées dans la littérature (NI = Non Indiqué)

### I.3.2.2. Réponse *in vivo*

À l'inverse des études *in vitro*, les évaluations biologiques *in vivo* sont beaucoup plus longues afin de permettre au substitut de s'intégrer complètement dans le corps hôte. L'ensemble des paramètres relatifs à la macrostructure peut ainsi être évalué. Un panel d'expériences reprenant l'ensemble de ces paramètres macrostructuraux est répertorié dans le Tableau 3.

Le taux de porosité peut correctement être évalué grâce aux observations biologiques et également mécaniques. Contrairement aux études *in vitro* réalisées, l'os nouvellement formé va permettre la modification de l'environnement mécanique local. Ainsi si les performances initiales de l'implant sont faibles, elles seront compensées par la repousse osseuse suivant notamment la loi de Wolff lorsque l'implant permet une bonne reconstruction osseuse, phénomène visible sur des évaluations longues.



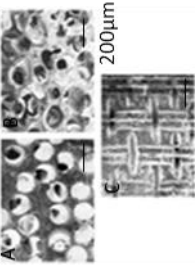
<b>Paramètres de la macrostructure étudiés</b>	Taille des macropores	Taux de porosité	Interconnexion	Géométries des macropores
<b>Méthode de mise en forme</b>	Émulsion de calcium phosphate	Imprégnation d' os spongieux	Par microbilles de PMMA comme agent porogène	Préparation de blocs avec porosité contrôlée par fibres de polyester
<b>Matériaux</b>	$\beta$ TCP	HA	HA	HA
<b>Gamme testée</b>	Pores de 150, 260, 510 et 1220 $\mu$ m	Porosité de 60 et 80%	Connexions de 30, 60, 100 et 130 $\mu$ m	
<b>Implantation chez l' animal</b>	Os long de mouton sur 6, 12 et 24 semaines	Fémur de lapin 5, 13 et 26 semaines	Fémur de lapin 12 semaines	Tibia de lapin 4 et 8 semaines
<b>Résultats</b>	Meilleure résorption pour les pores de 510 et 1220 $\mu$ m, mais plus faible ostéogénèse que pour les pores de 150 et 260 $\mu$ m	Un taux de porosité de 60% permet une meilleure croissance osseuse à moyen et long terme après implantation	Interconnexion de 130 $\mu$ m permet une meilleure pénétration cellulaire et vasculaire	Ostéoconduction et formation d'os pour les implants avec les pores dit « trabéculaires » de 300 $\mu$ m et 500 $\mu$ m
<b>Références</b>	Von Doernberg <i>et al</i> [186]	Hing <i>et al</i> [185]	Flautre <i>et al</i> [184]	Chang <i>et al</i> [183]

Tableau 3 : Études *in vivo* sur des architectures céramiques recensées dans la littérature

La pénétration cellulaire dans l'implant est dépendante de la taille des macropores. Aujourd'hui, il est admis que des pores supérieurs à 300  $\mu\text{m}$  sont recommandés afin de favoriser la croissance osseuse [163]. La taille des macropores a aussi un impact sur l'angiogenèse et l'apport d'oxygène sur le site de l'implant améliorant la repousse osseuse [182]. Les études *in vitro* ne permettant pas de prendre en compte à la fois l'angiogenèse et l'ostéogénèse ce sont donc les évaluations *in vivo* qui ont permis de mettre en évidence une ostéogénèse favorisée pour des macropores de taille supérieure à 300  $\mu\text{m}$  grâce à une angiogenèse elle aussi favorisée [186].

Hing et son équipe [185] ont également étudié le rôle de l'interconnexion émettant ainsi l'hypothèse que le simple fait d'avoir une interconnexion permettrait une meilleure pénétration cellulaire et vasculaire. Au cours de leurs études, ils ont pu observer que le taux de pénétration cellulaire et vasculaire influence le taux de formation osseuse à court et moyen termes. Flautre et son équipe [184] conforteront ces résultats en montrant qu'une interconnexion de 130  $\mu\text{m}$  (sur la gamme de 30  $\mu\text{m}$ / 60  $\mu\text{m}$ / 100  $\mu\text{m}$ / 130  $\mu\text{m}$ ) favoriserait l'infiltration des nutriments et de l'oxygène à l'intérieur de l'implant favorisant ainsi la colonisation osseuse au sein de l'implant (Figure 21).

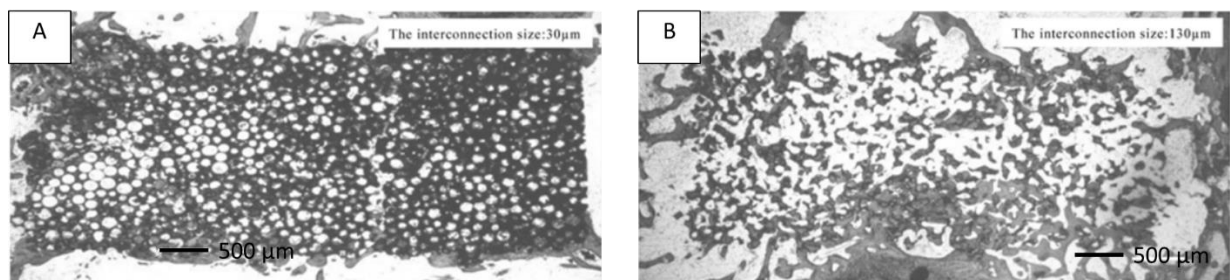


Figure 21 : Coupe de section de l'implant après 12 semaines, A avec une interconnexion de 30  $\mu\text{m}$  et B avec une interconnexion de 130  $\mu\text{m}$  et une ostéogénèse plus importante

Enfin les travaux menés par Chang et son équipe [183] ont mis en évidence que certaines géométries permettraient une meilleure reconstruction osseuse et notamment lorsque cette architecture se rapproche de l'architecture trabéculaire humaine.

Pour conclure, les deux modèles *in vitro* et *in vivo* sont complémentaires afin d'obtenir une évaluation biologique complète de l'architecture étudiée. Certains articles reportent à la fois les résultats *in vitro* et *in vivo* pour une même architecture [177], [187]–[190]. Il est alors intéressant de remarquer que l'expérimentation *in vitro* sert principalement à étudier les interactions cellules-substrats, la prolifération des cellules ainsi que leur différenciation. Les modèles *in vivo* permettent, quant à eux, d'étudier les phénomènes beaucoup plus

physiologiques autour de la reconstruction osseuse, comme le remodelage osseux, l'ostéogénèse ou encore l'angiogénèse.

Cependant il est important de bien prendre en compte les limites de ces deux modèles. En effet, l'étude de la cytotoxicité d'un implant peut, suivant le type de modèle *in vitro* tel que la culture en conditions statiques, donner des résultats négatifs alors que cet implant pourrait donner des résultats positifs sur un modèle *in vivo* de par la dynamique des fluides présente dans le corps et les mécanismes de défense. Le modèle *in vivo* est quant à lui difficile à mettre en place, coûteux à réaliser à grande échelle. C'est pourquoi aujourd'hui de nombreux efforts sont mis dans la création de modèles dynamiques *in vitro* s'inspirant des différents systèmes physiologiques présents dans le corps humain [191].

Enfin, cette partie a mis en évidence différents critères architecturaux permettant la promotion de la régénération osseuse avec une taille de macropores supérieure à 300  $\mu\text{m}$ , la présence d'angles concaves, une interconnexion permettant le déplacement des cellules, etc. L'ensemble de ces critères est caractéristique de l'os trabéculaire humain. De plus, une microstructure dense est plus favorable à la colonisation cellulaire du matériau. La réalisation d'un implant permettant la promotion de la régénération osseuse doit prendre en compte l'influence de ces critères structuraux.

#### I.4. Conclusion du chapitre 1

La première partie de ce chapitre bibliographie a permis d'avoir une vision d'ensemble de l'os en tant qu'organe. L'architecture de l'os qui résulte des nombreuses missions auxquelles il doit faire face est complexe avec une partie organique et une partie inorganique. Il est donc important de bien comprendre chacune des fonctions permettant à l'os de fonctionner afin de proposer un substitut similaire à nos os.

La deuxième partie de ce chapitre a mis en exergue les propriétés relatives à l'architecture et la composition des implants poreux ; la macrostructure jouant un rôle déterminant dans l'angiogenèse et l'ostéogénèse et la composition chimique impactant la biocompatibilité et la bioactivité. De plus, un comparatif des évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* a permis de mettre en évidence les conclusions possibles de chaque modèle.

Enfin, au vu des différentes contraintes architecturales et chimiques nécessaires à la mise en forme d'implants poreux, un focus a été réalisé sur les méthodes d'impression 3D. De nombreuses études répondent alors à la définition de biomimétisme décrite par Sprio et al. [90].

Cependant aujourd'hui, est considérée comme biomimétique une architecture présentant simplement une porosité contrôlée et interconnectée. L'avancée technologique dans la modélisation 3D et les techniques de fabrication additive présentées dans ce chapitre permettraient la mise en forme d'architectures ayant pour modèle l'homme et notamment l'os trabéculaire. De nombreuses études simulent numériquement des modèles poreux sans se baser sur le modèle humain [192], [193].





## Chapitre II. Mise en forme d'une céramique trabéculaire bio-inspirée

Ce chapitre comporte deux objectifs distincts. Le premier est de mettre en forme une architecture 3D bio-inspirée de l'os trabéculaire humain. Cette architecture 3D devra être réalisée en hydroxyapatite. Le second objectif est de développer et explorer une procédure capable de comparer l'architecture obtenue avec le modèle humain.

Le chapitre est divisé en quatre parties : 1) l'acquisition du modèle numérique bio-inspiré, 2) la mise en forme de l'architecture 3D céramique bio-inspirée, 3) la caractérisation et l'évaluation des architectures élaborées et frittées et 4) la réalisation d'architectures de plus grand volume ( $> 1 \text{ cm}^3$ )

### II.1. Acquisition du modèle numérique bio-inspiré humain par micro-tomographie RX

Ce travail de thèse a pour objectif de réaliser une architecture bio-inspirée. L'élaboration de cette architecture nécessite donc un modèle numérique imprimable de l'os humain. Dans ce contexte, une collaboration avec plusieurs institutions et notamment le Centre Hospitalier Universitaire de Limoges a été mise en place. En accord avec le règlement éthique mis en place lors de cette collaboration, un tibia humain nous a été remis (aucune information concernant le donneur n'a été fournie). Une découpe à l'aide d'une scie à ruban a été réalisée pour obtenir différents échantillons d'un volume proche de  $1 \text{ cm}^3$  (B, Figure 22).

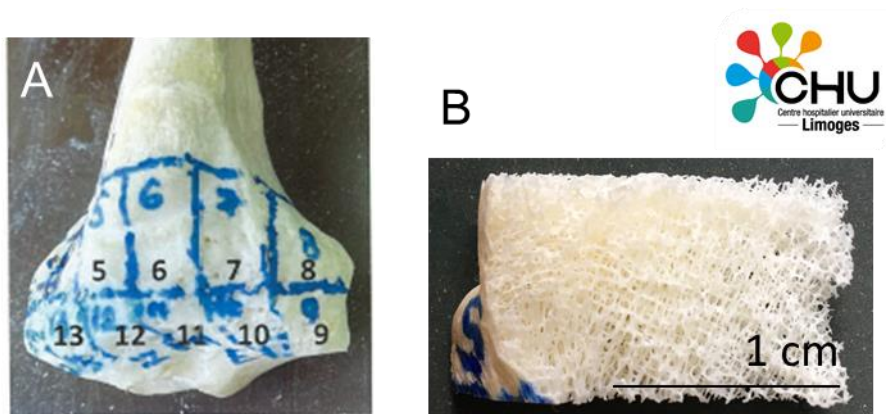


Figure 22: A) Os de tibia entier avant découpe B) Partie de l'os trabéculaire après découpe

Afin d'obtenir une architecture 3D céramique la plus analogue au modèle humain, il est nécessaire d'établir un modèle 3D numérique d'une grande résolution. Ces échantillons ont été utilisés par l'Institut Pprime, institut également collaborateur de ce projet, pour réaliser des images scan 2D de ces échantillons osseux à l'aide d'un micro-tomographe RX ( $\mu$ -CT) et

reconstruire des images numériques 3D. Le  $\mu$ -tomographe UltraTom de la société RX solutions est l'appareil utilisé pour cette acquisition (A, Figure 23). Cet équipement permet l'obtention de radiographies de haute résolution avec une taille de voxel de 15  $\mu\text{m}$  permettant la réalisation de modèle numérique de haute précision.

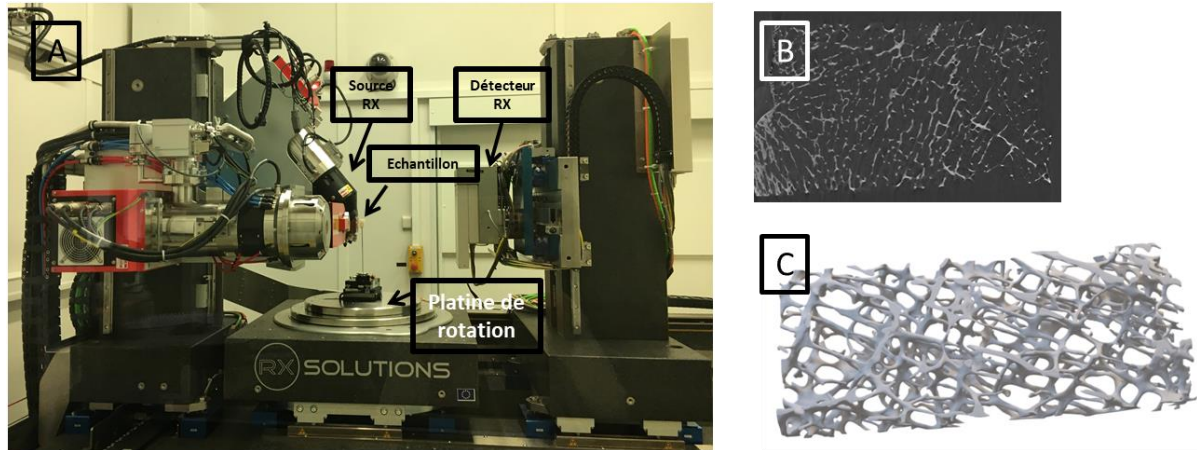


Figure 23 : A) Le  $\mu$ -Tomographe UltraTom légendé B) exemple d'une coupe recalculée de l'échantillon obtenu en Figure 22 C) Reconstruction de l'objet en 3D

Cette technique repose sur l'imagerie X à 360° afin de reconstituer une image volumique. L'utilisation de rayons X permet d'obtenir des informations sur la structure interne d'un objet. Cette technique rend également état de la nature et de la densité du matériau par absorption des rayons X. En effet, les rayons X vont se propager dans le matériau et seront atténués par absorption et diffusion. La collecte des rayons X sur le récepteur met en exergue la mesure d'atténuation et permet alors de révéler la présence de pores ou de distinguer deux phases différentes. La position de la source de rayon X étant les variables  $x$  et  $y$ . La transmission des rayons X dans le matériau est décrite par la loi de Beer-Lambert (Eq. 1) :

$$I_1 = I_0 \exp \left[ \int \mu(x, y) dx \right]$$

Équation 1 : Loi de Beer-Lambert

$I_1$  correspondant à l'intensité du faisceau transmis,  $I_0$  à celle du faisceau émis et  $\mu$  au coefficient d'atténuation linéaire dépendant du numéro atomique de l'élément traversé ainsi que de sa masse volumique. Cette méthode de caractérisation non destructive permet alors d'obtenir un modèle 3D de l'objet caractérisé et de nombreuses informations sur l'échantillon comme ses dimensions, sa répartition spatiale, sa forme ou encore ses défauts (inclusions, pores ...).



Les conditions d'expérimentales utilisées pour imager les échantillons osseux sont les suivantes :

- Une tension du tube de 50 kV
- Une intensité de 400  $\mu$ A
- Une taille de voxel de 15  $\mu$ m soit l'acquisition de 1120 scans afin d'obtenir cette résolution

Le rayonnement X capté est ensuite converti dans le domaine du visible à l'aide d'un scintillateur avant d'être numérisé par un capteur. Pour cet échantillon, 1 120 radiographies obtenues à différents angles d'incidence du faisceau de rayon X sur l'échantillon (Figure 23 B).

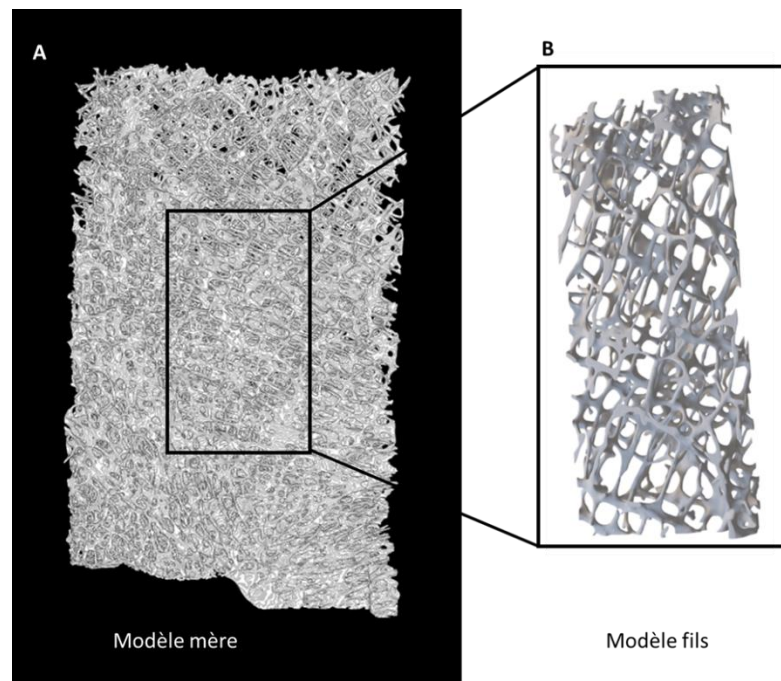


Figure 24 : Représentation du modèle mère A) et du modèle fils B) extrait du modèle A)

L'ensemble des radiographies est transformé en un volume 3D en utilisant la transformée de Radon. L'utilisation du logiciel X-act<sup>®</sup> a permis d'obtenir ce rendu. Plusieurs étapes importantes de traitement d'images sont nécessaires afin d'une part, d'éliminer le bruit acquis durant la capture des scans, mais également, d'obtenir le volume mesuré avec le plus de précision. Il est nécessaire dans un premier temps de délimiter le volume à reconstruire puis de corriger les artefacts dus aux mouvements de l'échantillon et du faisceau de photons. La reconstruction est réalisée à l'aide d'un algorithme de rétroprojection filtrée (Figure 23 C) [194]. Le fichier volumique obtenu est ensuite converti en fichier .STL, format d'extension du

fichier nécessaire à la bonne lecture et gestion des commandes machine quelle que soit la méthode de fabrication additive utilisée. Cependant le volume des fichiers .STL généré correspond à un volume d'un morceau d'os supérieur à 1 cm<sup>3</sup>. Afin d'élaborer des architectures d'un volume inférieur, une « découpe » en volume de 20mm de longueur, 15 mm de largeur et 3 mm d'épaisseur, a été réalisée au sein du modèle numérique du morceau d'os. Dans la suite de ce manuscrit, le modèle initial (du morceau d'os entier, supérieur à 1 cm<sup>3</sup>) sera désigné par l'appellation modèle mère et le modèle découpé, correspondra au modèle fils (A, B, Figure 24).

## II.2. Mise en forme par stéréolithographie d'architectures céramique 3D

Le procédé de stéréolithographie, ou photopolymérisation en cuve, est une technique de fabrication additive de prototypage rapide. Le principe basé sur la photopolymérisation sélective couche par couche de suspension photosensible, chargée en particules céramique a été utilisé dans le cas de cette étude. Le phénomène de photopolymérisation est initié par l'énergie incidente de faisceau laser UV. La pièce crue obtenue est ensuite traitée thermiquement afin de consolider la pièce et de lui conférer ses propriétés mécaniques. La qualité de la pièce céramique va donc reposer sur 3 facteurs importants : la suspension céramique, la mise en forme et le traitement thermique.

La suspension céramique doit répondre à un cahier des charges particulier afin d'optimiser les interactions entre la résine photopolymérisable chargée en poudre céramique et le laser UV. Ces interactions sont décrites par la loi de Beer-Lambert-Bouguer (Eq. 2) :

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

Équation 2 : Loi de Beer-Lambert-Bouguer

Cette loi permet de relier la densité d'énergie  $E$  reçue par la suspension à la profondeur de polymérisation  $z$ , au coefficient d'extinction  $\alpha$  et à la densité d'énergie du faisceau incident  $E_i$ . La densité d'énergie  $E$  reçue par la suspension se calcule donc grâce à l'Équation 2. Dans le cas de l'utilisation de suspensions céramiques mises en forme par stéréolithographie, un autre phénomène physique affecte ce procédé, la diffusion du faisceau sur les particules solides. Ce dernier aura une incidence sur l'épaisseur polymérisée et donc sur la résolution de la pièce. Ce phénomène décrit par l'équation de Jacobs (Eq. 3) prend en compte la profondeur de pénétration du faisceau laser  $D_p$ , la densité d'énergie du faisceau incident  $E_i$ , et la densité d'énergie critique  $E_c$  afin de déterminer l'épaisseur de polymérisation  $C_d$  [195] :

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

Équation 3 : Équation de Jacobs

La densité d'énergie critique  $E_c$  et donc l'épaisseur de polymérisation  $Cd$ , sont des paramètres empiriques. Les caractéristiques de la suspension céramique comme la nature des oligomères ou encore la taille, l'indice de réfraction et le taux de chargement des particules céramiques sont déterminants dans l'étude des phénomènes de photopolymérisation. Ainsi ces valeurs ( $E_c$  et  $Cd$ ) doivent être déterminées pour chaque formulation.

### II.2.1. Suspension céramique

La suspension céramique est un mélange d'oligomères, de monomères, d'un photoinitiateur, de poudre céramique et de dispersant. Selon la littérature, un taux de chargement de 50 % en volume de poudre céramique est requis pour assurer le maintien de la pièce crue durant le déliantage et également une densification suffisante pendant le frittage [97]. Cette suspension doit répondre à des propriétés rhéologiques bien définies pour permettre son bon étalement. Le comportement de la suspension doit être rhéofluidifiant afin d'obtenir une superposition de couches fines de l'épaisseur voulue sur le support. La viscosité doit être inférieure à 3 Pa.s pour un taux de cisaillement de  $100 \text{ s}^{-1}$  calculé sur la base des contraintes imposées par le racleur lors de l'étalement de la suspension céramique. Elle doit comporter une contrainte seuil d'écoulement afin de conserver une épaisseur de couche contrôlée et constante après étalement. De plus, les suspensions doivent être stables, homogènes et photosensibles à la longueur d'onde du faisceau UV disponible sur l'équipement présent au laboratoire ( $\lambda = 355 \text{ nm}$ ). Bien que la formulation de ce type de suspension soit maîtrisée au laboratoire [196], les contraintes de temps nécessaires à la synthèse de poudre d'hydroxyapatite en quantité suffisante et à la réalisation des suspensions pour les besoins de l'ensemble de l'étude ont conduit à utiliser une suspension commerciale adaptée à l'équipement de mise en forme par stéréolithographie dont le laboratoire dispose. La suspension a donc été commandée auprès du fournisseur 3DCERAM, aussi fabricant de machines de stéréolithographie basé sur Limoges. Il s'agit de suspensions céramiques à base d'hydroxyapatite référencée « HAP-F02 » (fiche de sécurité en Annexe 1). Ce choix s'explique notamment par le fait que l'équipement prototype de stéréolithographie utilisé au laboratoire a été conçu conjointement avec cette entreprise. Ainsi, le cahier des charges relatif à la suspension céramique défini précédemment est parfaitement adapté à notre machine.

## II.2.2. Stéréolithographie, principe et fonctionnement

Le procédé de stéréolithographie utilisé dans cette étude repose sur l'utilisation d'un faisceau laser balayant point par point la surface de la suspension céramique. L'architecture obtenue est fabriquée couche par couche par la polymérisation ponctuelle définie par le fichier STL généré comme expliqué dans la partie II.2 de ce chapitre. Le schéma du système optique de la machine de stéréolithographie est présenté en Figure 25.

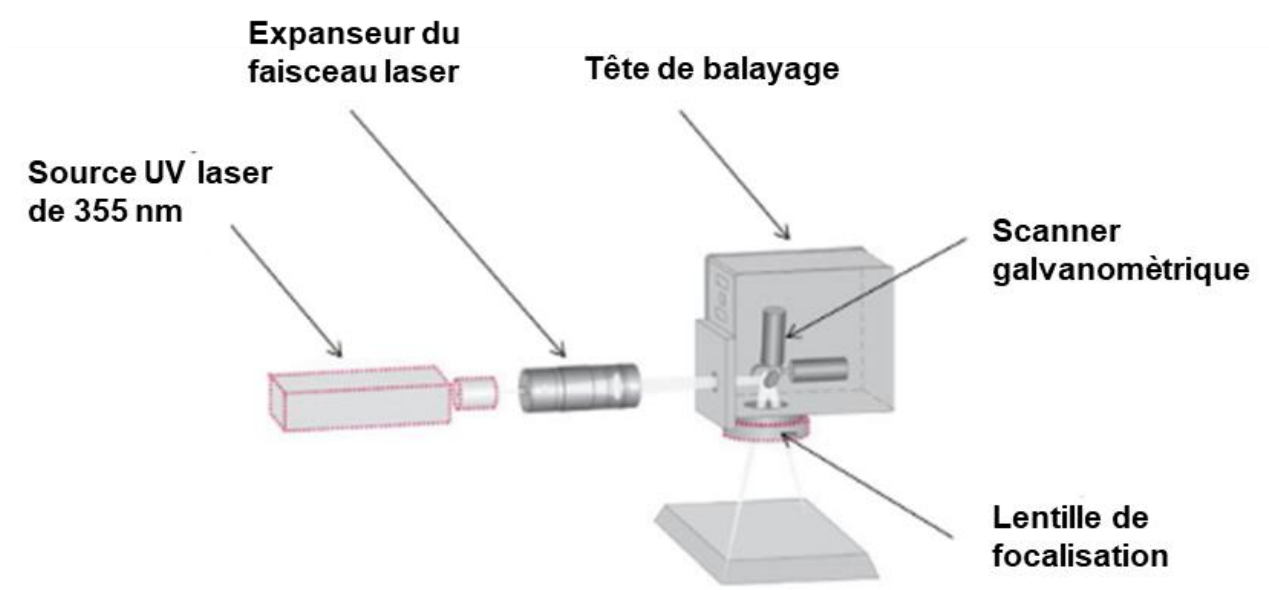


Figure 25 : Schéma du système optique de la machine de stéréolithographie utilisé pour mettre en forme les architectures bio-inspirées [197]

La projection du faisceau laser à une longue distance, ici jusqu'au plateau de fabrication distant de plus de 30 cm, est assurée grâce à l'expandeur du faisceau laser. La tête de balayage composée de deux miroirs mobiles galvanométriques va permettre le guidage du faisceau laser avec une grande précision et répétabilité. La lentille F-Theta va, quant à elle, focaliser le laser en un point focal sur la surface de la suspension avec une taille du spot rond formé dont le diamètre est égal à  $21,6 \mu\text{m}$  (déterminé par le constructeur machine au moment de la livraison).

Le système optique de ce montage permet d'obtenir des pièces de grande qualité. Néanmoins, la résolution de cette machine dépend de plusieurs facteurs tels que, la vitesse du laser, l'écart des hachures (distance entre deux passages parallèles et juxtaposés du faisceau laser), la puissance du laser. Ces facteurs auront un impact sur la surface de suspension polymérisée, qui sera soit plus grande lorsque ces conditions opératoires ne seront pas correctement réglées. Pour obtenir la résolution adéquate de l'architecture à mettre

en forme, différents facteurs seront étudiés afin de ne polymériser que la suspension nécessaire. La résolution de la pièce obtenue après impression dépendra de ces paramètres d'impression.

Un ordre chronologique des étapes successives du protocole est défini pour permettre la mise en forme d'architecture céramique :

- Dans un premier temps, il est nécessaire de faire le niveau du plateau en accord avec la position du racleur.
- Descente du plateau de fabrication correspondant à l'épaisseur de couche choisie.
- Étalement de la suspension manuellement à l'aide d'une spatule sur le plateau de fabrication
- Étalement de la suspension à l'aide du racleur sur l'ensemble du plateau de fabrication afin d'obtenir une surface plane et lisse.
- Émission d'un faisceau UV ( $\lambda = 355 \text{ nm}$ ) par une source UV laser comme présenté sur le schéma (Figure 26). La vitesse de déplacement du laser est de 2500 mm/s avec un écart des hachures de 20  $\mu\text{m}$ . L'écart des hachures correspond à la distance entre chaque passage de laser afin de permettre une bonne accroche horizontale, car le diamètre du faisceau est de 21,6  $\mu\text{m}$ .

La mise en forme d'architecture céramique nécessite une succession d'étapes précisées ci-après :

- 1) Réglage de la hauteur du plateau de fabrication : Après vérification de l'affleurement du racleur sur le plateau, le plateau est descendu à l'épaisseur de couche voulue
- 2) Étalement de la suspension : à l'aide du racleur sur l'ensemble du plateau de fabrication afin d'obtenir une surface plane et lisse
- 3) Émission du faisceau laser ( $\lambda = 355 \text{ nm}$ ) avec une vitesse de déplacement de 2500 mm/s et un écart des hachures de 20  $\mu\text{m}$ .

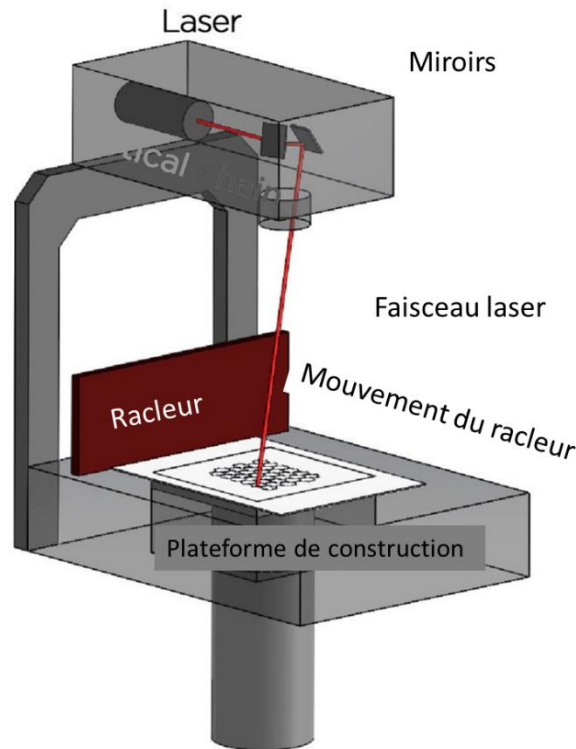


Figure 26 : Schéma du principe de fonctionnement de la technologie de stéréolithographie adaptée du site internet de 3DCeram (<https://3dceram.com/fr/stereolithographie>)

Cette succession d'étapes précédemment décrite est répétée autant que nécessaire jusqu'à obtention de l'architecture 3D complète.

La pièce est ensuite sortie de la cuve de fabrication et nettoyée. Le nettoyage de la pièce se fait selon les recommandations de notre fournisseur avec de l'éthanol. Afin d'éliminer l'entièreté de la pâte non photopolymérisée de la pièce crue, les architectures sont nettoyées par ultrasons dans un béccher rempli d'éthanol pendant 5 minutes. Les pièces sont ensuite séchées toute la nuit à l'air libre.

## II.2.3. Élaboration des architectures céramiques bio-inspirées

### II.2.3.1. Essais préliminaires

Aucune architecture de ce type, des pores de grandes dimensions par rapport au volume de la pièce avec des trabécules fins, n'a été élaborée au laboratoire. La prise en main de la machine de stéréolithographie s'est faite avec la réalisation de poutres céramique en HA destinées à être caractérisées mécaniquement lors de tests de flexion Figure 27. Des poutres de 4 hauteurs correspondant à 10, 25 et 40 couches ont été réalisées. Les paramètres machine correspondaient aux paramètres suggérés par l'entreprise 3DCeram pour la mise en

forme à partir de leur suspension : une puissance laser de 50 mW, un seul passage laser, une épaisseur de couche de 100  $\mu\text{m}$ , une vitesse laser de 2500 mm/s et un hachurage de 20  $\mu\text{m}$ . Trente éprouvettes ont été réalisées, 10 pour chaque hauteur de poutre.

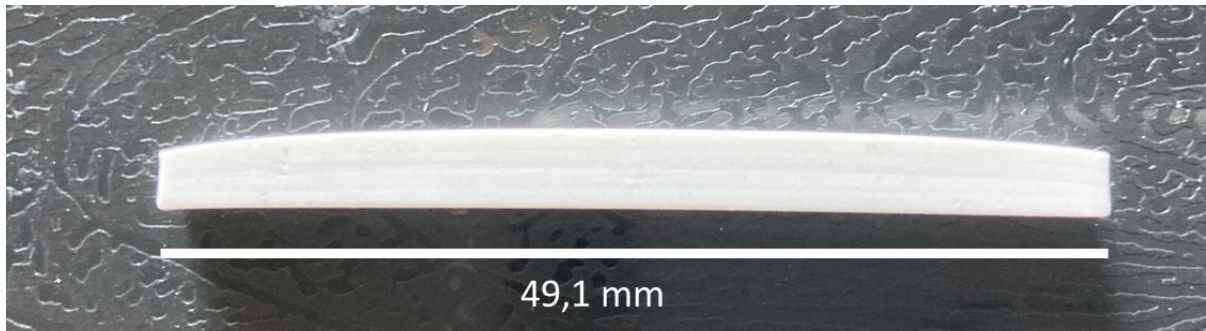


Figure 27 : Éprouvette de longueur de 49,1 mm, de largeur de 5 mm et d'une épaisseur de 40 couches de 100  $\mu\text{m}$  mise en forme par stéréolithographie en HA.

Ces premiers essais ont permis une prise en main de la machine, mais également de l'impact de certains paramètres sur l'élaboration de pièce. Lors de cet essai, des pièces de plusieurs couches différentes ont été réalisées. Visuellement, l'épaisseur n'était pas constante sur l'ensemble de l'éprouvette. Les éprouvettes présentent alors un léger fluage pour les pièces à 40 couches. Ce fluage est beaucoup plus important pour les éprouvettes à 10 couches.

En complément de cet essai préliminaire, une étude de vieillissement de la suspension a été réalisée afin de connaître le délai d'utilisation de la suspension garantissant ainsi une maîtrise et une répétabilité de la mise en forme des architectures. En effet, 3DCeram recommande d'utiliser leurs suspensions céramiques dans les 6 mois après fabrication du fait de l'oxydation de la suspension qui détériore les propriétés rhéologiques de celle-ci. Le premier lot de suspension céramique fabriqué et ouvert depuis 8 mois (lot 1) a été comparé à un lot neuf (lot 2). Pour cela, la même architecture a été mise en forme avec des lots de suspension différents (lot 1 et 2) et des puissances laser différentes. Les puissances laser évaluées lors de cette étude de vieillissement sont de : 50mW, 125 mW, 250 mW, 300 mW, 500 mW et 600 mW. Le fichier STL utilisé sera celui du modèle fils (Figure 24 B). Tous les autres paramètres, hormis donc la puissance laser, sont identiques à ceux utilisés pour la mise en forme des éprouvettes. Ce test marque ainsi les premières élaborations d'architectures trabéculaires.

Pour le lot 1, les impressions à 50 mW, 125 mW, 250 mW, 300 mW n'ont pas donné de résultats. Aucune structure entière (l'entièreté du modèle numérique) n'a pu être obtenue, mais une structure partielle a cependant été obtenue à 500 mW et 600 mW (Figure 28). Pour le lot 2, la puissance laser de 50 mW n'a pas permis l'obtention d'une structure trabéculaire.



Cependant, toutes les autres conditions de puissance laser ont permis de mettre en forme une architecture trabéculaire. De plus, par observation visuelle, les trabécules obtenues pour de fortes puissances laser (250 mW à 600 mW) sont plus volumineuses que les trabécules obtenues par une faible puissance laser (125 mW)

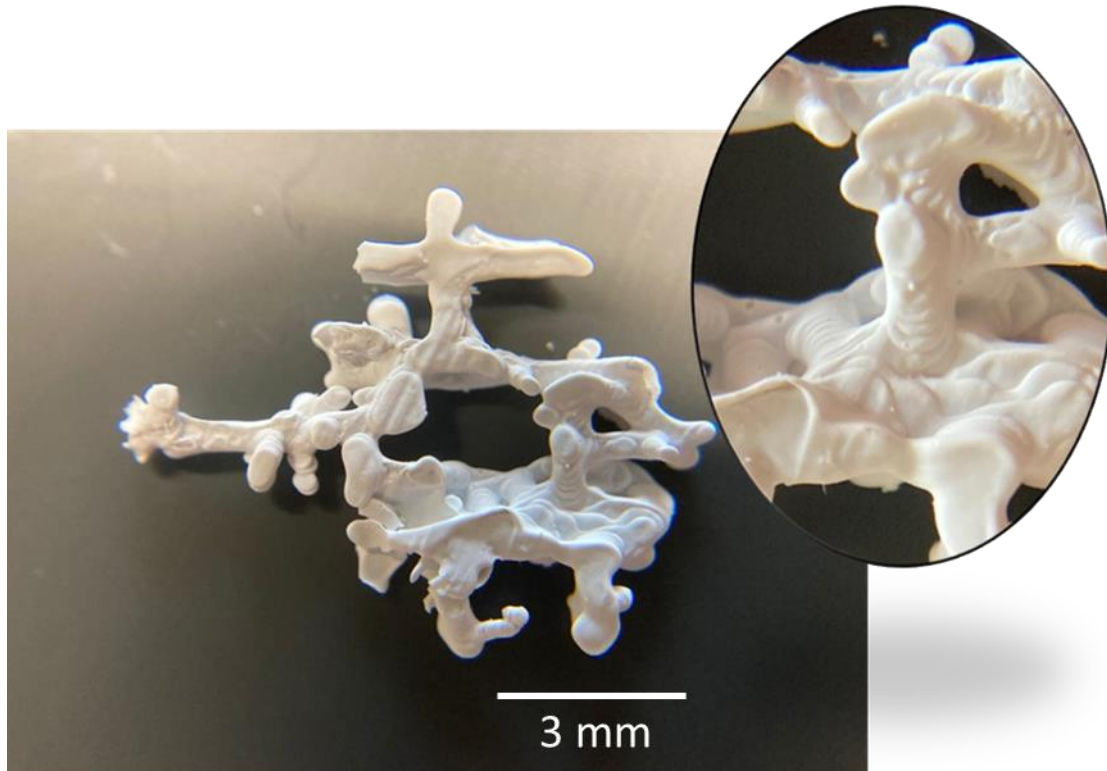


Figure 28 : Élaboration d'une architecture trabéculaire du modèle fils avec le lot 1 de suspension céramique et une puissance laser de 500 mW

Cette étude permet de mettre en évidence la dégradation de la suspension céramique au cours du temps et son impact sur la mise en forme d'architecture trabéculaire. De plus, l'augmentation de la puissance laser modifie la définition de l'architecture trabéculaire, une augmentation de la puissance laser engendre une augmentation superflue du volume des trabécules. Cependant, cette augmentation de volume accroît considérablement la perte de définition de l'architecture à 500 mW.

Un essai préliminaire supplémentaire a été réalisé afin de connaître l'incidence du nombre de passage laser par couche sur la résolution des pièces à partir du modèle fils. Dans un premier temps, deux passages lasers ont été évalués avec une puissance laser de 300 mW et 500 mW afin de définir si la pièce crue est plus résistante avec deux passages laser sans perdre en résolution. La pièce crue semble plus résistante lors de leur manipulation, mais la perte de résolution est importante dans ce cas.



### II.2.3.2. Plan d'expériences

Comme indiqué dans le paragraphe II.2.2, de nombreux paramètres impactent la résolution horizontale et verticale de l'architecture obtenue. Les essais préliminaires décrits dans le paragraphe précédent tendent à confirmer ces effets. C'est pourquoi, afin d'obtenir la meilleure précision possible dans la reproduction du modèle fils, un plan d'expériences a été réalisé. Ce plan d'expériences a pour but de déterminer la combinaison de paramètres permettant la meilleure résolution d'architecture. Cependant, le coût de la matière première vendue par 3DCeram étant élevé, les paramètres ont été sélectionnés de manière à minimiser le nombre d'expériences tout en testant le maximum de conditions possibles. Ainsi, trois paramètres ont été sélectionnés (Figure 31) :

- *La puissance laser.* La puissance laser impacte la densité énergétique fournie à la suspension. Une augmentation de la puissance laser signifie une augmentation de l'épaisseur de polymérisation (*Cured depth : Cd*) favorisant l'accroche entre les couches, mais aussi une augmentation de la largeur de polymérisation (*Line width : Lw*) délétère à la résolution Figure 29.

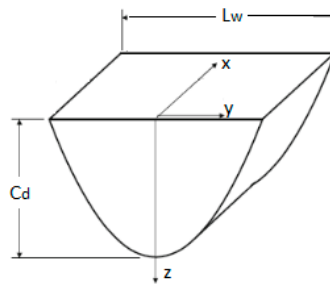


Figure 29 : Représentation schématique de l'interaction laser-suspension [198]

Après la réalisation de tests préliminaires, la gamme choisie pour évaluer ce paramètre est de 100 mW, 200 mW, 300 mW, 400 mW et 500 mW.

- *Le nombre de passage laser.* Ici aussi, le nombre de passage laser va avoir un impact sur la photopolymérisation et donc les phénomènes d'absorption et de diffusion.

Des architectures mises en forme à l'aide d'un seul passage laser et de deux passages laser pour une même couche ont ainsi été réalisées.

- *L'épaisseur de la couche.* L'épaisseur d'une couche influence les phénomènes d'absorption du faisceau laser. Elle doit être choisie de telle sorte qu'il y ait cohésion entre les couches successives. L'épaisseur de couche doit être

inférieure à la profondeur de polymérisation ce qui engendre une surpolymérisation à l'interface entre deux couches permettant leur « accrochage ». (Figure 30) De plus, au vu de la tortuosité de l'architecture trabéculaire à imprimer à partir du fichier STL, le tranchage peut avoir une incidence sur la taille et le nombre de surfaces à polymériser sur une couche en étant plus adapté pour une certaine épaisseur que pour une autre comme il sera détaillé par la suite.

Trois épaisseurs de couches ont été évaluées : 50  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$ . En effet, il est recommandé par le fournisseur d'utiliser des épaisseurs de couches comprises entre 50  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$ .

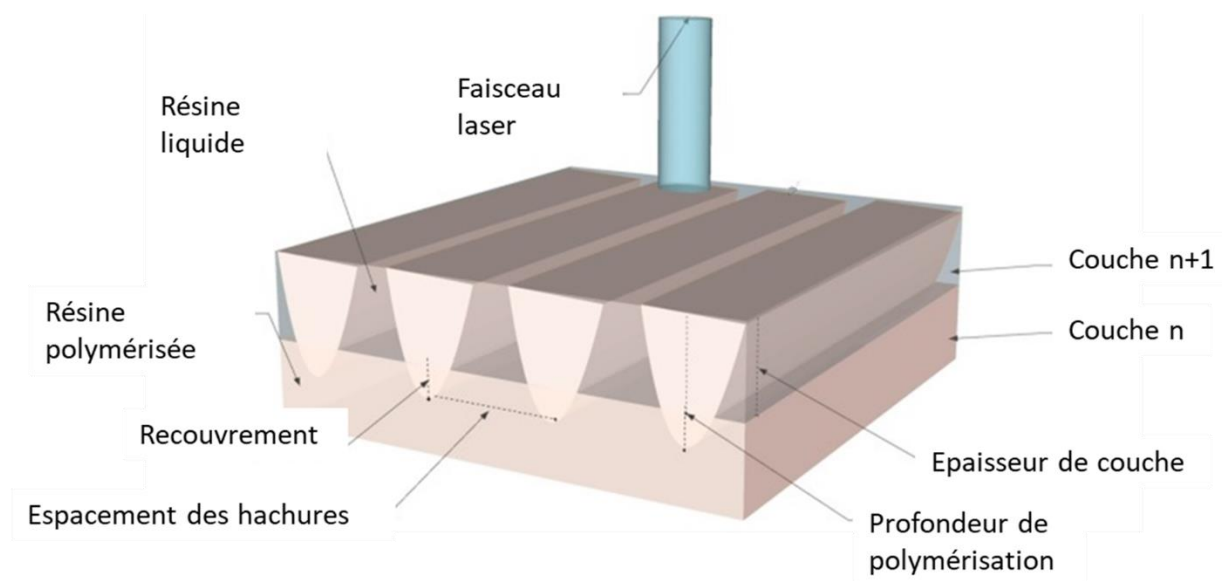


Figure 30 : Vue schématique de certains paramètres de fonctionnement de la SLA : épaisseur de couche, espacement des hachures [199].

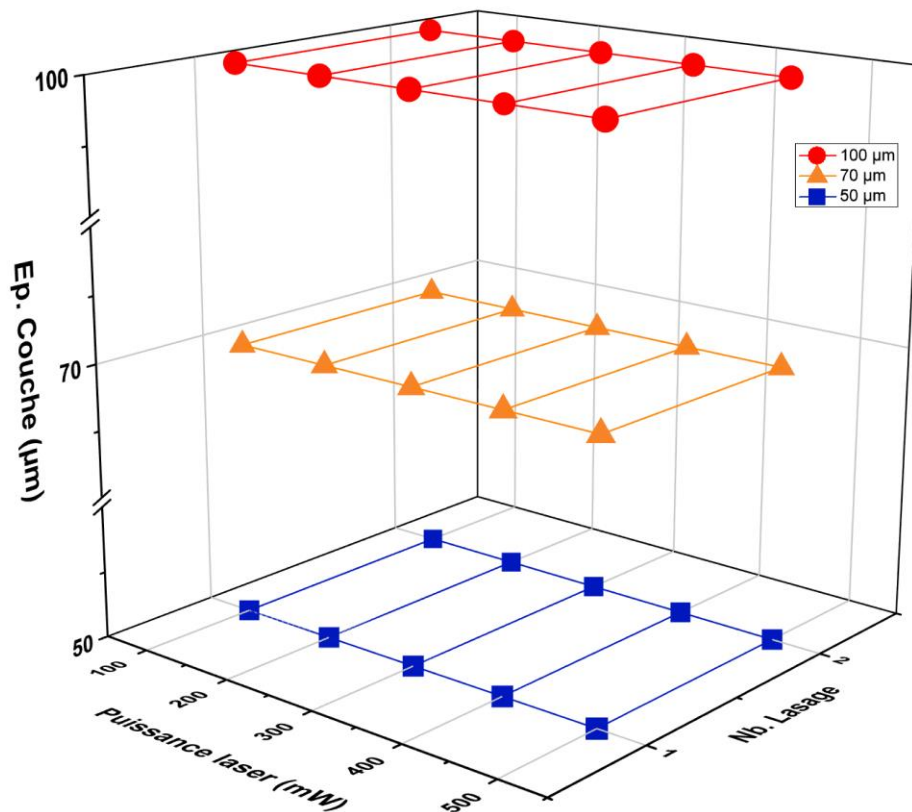
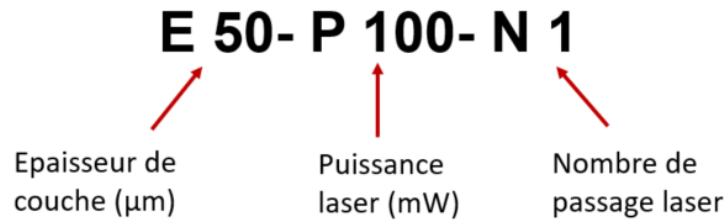


Figure 31 : Représentation schématique du plan d'expérience à trois paramètres d'entrée : puissance laser, nombre de passage laser et épaisseur de couche.

Ce plan d'expériences a nécessité la mise en forme de 30 architectures comme indiqué dans la Figure 31. Ce plan d'expériences permettra de connaître l'influence des paramètres d'impression pour déterminer la configuration de paramètres optimale pour la réalisation d'une architecture céramique bio-inspirée. Ce plan d'expériences aura pour objectifs de répondre aux problématiques suivantes :

- L'architecture reproduit-elle fidèlement le modèle STL ?
- Quels paramètres sont les plus impactants lors de la mise en forme ?
- Peut-on prédire la qualité de futures architectures en changeant les paramètres ?

Pour la suite, la nomenclature des échantillons a été définie comme ceci :



## II.2.4. Caractérisations des architectures bio-inspirées en 2D

### II.2.4.1. Démarches expérimentales

En suivant les conditions opératoires présentées dans la partie précédente (II.2.3.2), l'entièreté des architectures du plan d'expérience a pu être réalisée. Les paramètres d'entrées de ce plan d'expérience sont donc, les paramètres d'impression à savoir : puissance du laser, nombre de passage laser par couche et épaisseur de couche. Cependant, il est nécessaire de mesurer et d'évaluer des paramètres de sortie. Pour cette étude, deux réponses ont été déterminées : le nombre d'aire et la surface polymérisée (Figure 32). Sur la Figure 32, le contour violet délimite une aire (ici, le nombre d'aires est égal à 3) et la zone bleue représente la surface polymérisée d'une entité. Ainsi, les entités distinctes ont été dénombrées (nombre d'aire) et la surface totale ayant réagi sous l'effet du faisceau laser UV a été mesurée (surface polymérisée). Ces deux réponses quantitatives vont permettre de déterminer l'influence de chaque paramètre de mise en forme sur la qualité d'une couche par comparaison avec les valeurs mesurées sur la coupe correspondant du fichier STL.

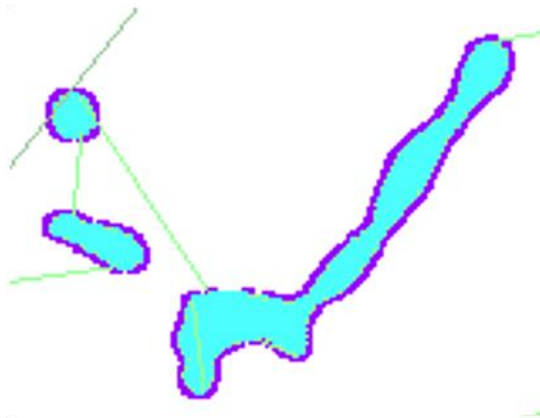


Figure 32 : Zoom d'une couche du modèle fils. La zone bleue représente la surface polymérisée d'une entité, le contour violet délimite une aire.

Afin de répondre à l'objectif de ce travail de thèse, chaque architecture du plan d'expérience a été analysée sur la base de ces deux caractéristiques. Ainsi, après la fabrication de toutes les architectures d'épaisseur similaire, leur dernière couche mise en forme a été comparée avec la couche correspondante du fichier STL (Figure 33, A et B). Chaque pièce crue a été photographiée à l'aide d'un appareil Canon EOX 1200 D équipé d'un objectif macroscopique 18-55. Le contour des entités a été réalisé manuellement sur ImageJ, logiciel permettant la détermination de régions d'intérêts, (ROI) (Figure 33, B). La surface polymérisée totale a, quant à elle, été calculée à l'issue du tracé des contours. Ainsi, grâce à cette méthode, la surface polymérisée totale et le nombre d'aire ont pu être collectés pour chacune des 30 architectures.

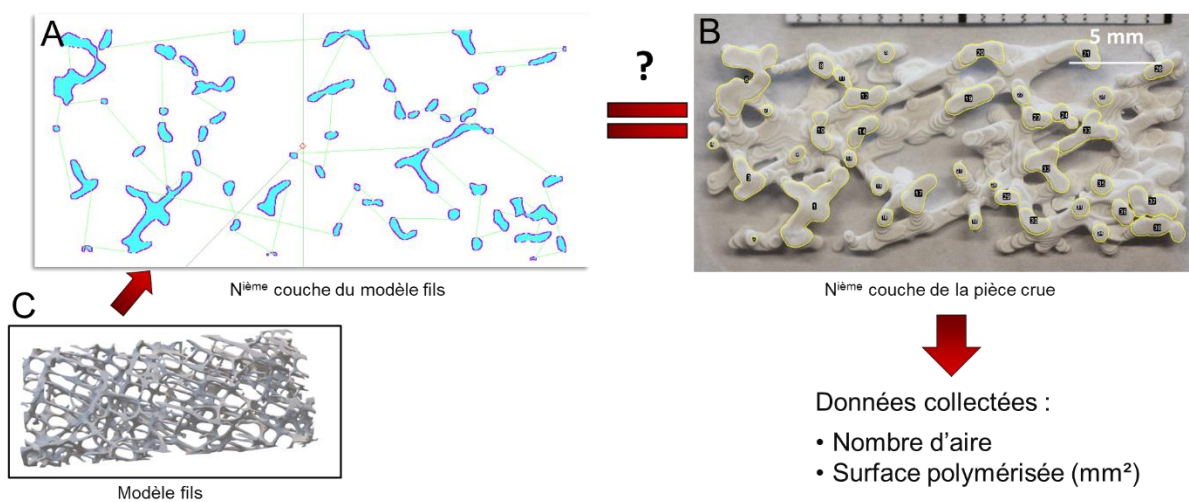


Figure 33 : Représentation de l'étude de caractérisation des architectures réalisées par SLA. A) Représentation de la N<sup>ième</sup> couche du fichier STL. B) Photographie de la N<sup>ième</sup> couche de la pièce crue (contour des entités en jaune, logiciel ImageJ). C) Représentation 3D du modèle fils.

Durant ce plan d'expériences, 3 épaisseurs différentes ont été évaluées. Chaque épaisseur de couches entraîne un tranchage différent réalisé par le logiciel de mise en forme. C'est pourquoi il existe des valeurs cibles différentes répertoriées dans le Tableau 4, pour chaque épaisseur de couche. En effet, le tranchage entraîne un nombre d'aires et une surface polymérisée différente dépendant de l'épaisseur de couche Figure 34.

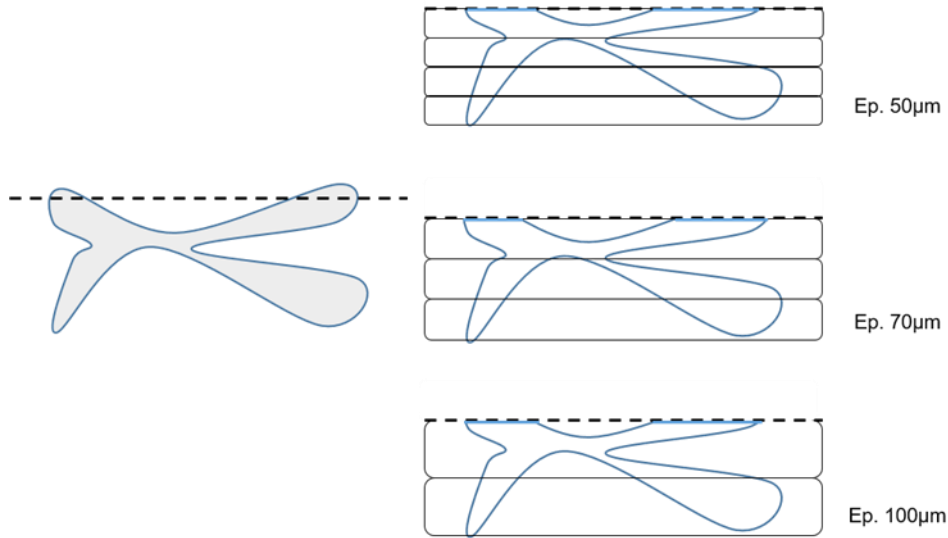


Figure 34 : Représentation schématique d'une trabécule tranchée selon différentes épaisseurs, 50  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$

Une fois les valeurs cibles définies, ces dernières sont ensuite comparées avec les valeurs obtenues lors des mesures réalisées sur les architectures trabéculaires.

Ep	Nombre d'aires	Surface polymérisée (mm <sup>2</sup> )	Ep	Nombre d'aires	Surface polymérisée (mm <sup>2</sup> )	Ep	Nombre d'aires	Surface polymérisée (mm <sup>2</sup> )
100 $\mu\text{m}$	54	10,5	70 $\mu\text{m}$	51	12,1	50 $\mu\text{m}$	48	1

Tableau 4 : Données représentatives des valeurs cibles pour chaque épaisseur (Ep) de couche correspondante.

#### II.2.4.2. Résultats et analyses des réponses du plan d'expériences

L'ensemble des mesures réalisées selon la méthodologie explicitée précédemment (II.2.4.1) est reporté dans le Tableau 5. Les valeurs du nombre d'aire et de surface polymérisée obtenues pour chaque combinaison de paramètres ( $E_x$ - $P_y$ - $N_z$ ) sont comparées avec les valeurs cibles rappelées à la fin du Tableau 5.

Échantillons	Nombre d'aires	Surface polymérisée (mm <sup>2</sup> )	Échantillons	Nombre d'aires	Surface polymérisée (mm <sup>2</sup> )	Échantillons	Nombre d'aires	Surface polymérisée (mm <sup>2</sup> )
E100-P500-N2	34	31,1	E70-P500-N2	33	28,8	E50-P500-N2	28	30,1
E100-P400-N2	36	29,1	E70-P400-N2	32	24,9	E50-P400-N2	33	24,9
E100-300-N2	37	27	E70-P300-N2	33	23,7	E50-P300-N2	32	23,1
E100-P200-N2	40	22,6	E70-P200-N2	38	21,9	E50-P200-N2	36	21
E100-P100-N2	39	20,4	E70-P100-N2	38	19,2	E50-P100-N2	35	18,1
E100-P500-N1	37	26,2	E70-P500-N1	39	20,2	E50-P500-N1	32	25,5
E100-P400-N1	38	24,1	E70-P400-N1	40	20,1	E50-P400-N1	40	19,2
E100-P300-N1	37	21	E70-P300-N1	40	17,2	E50-P300-N1	40	17,1
E100-P200-N1	38	20,9	E70-P200-N1	46	15,7	E50-P200-N1	42	15,8
E100-P100-N1	42	18,2	E70-P100-N1	46	14,6	E50-P100-N1	45	14,2
<b>Ep. 100µm</b>	<b>54</b>	<b>10,5</b>	<b>Ep. 70µm</b>	<b>51</b>	<b>12,1</b>	<b>Ep. 50µm</b>	<b>48</b>	<b>10,4</b>

Tableau 5 : Référencement des réponses obtenues en accord avec la démarche expérimentale explicitée à la partie II.2.4.1 pour toutes les architectures élaborées

Ces résultats montrent que, quelle que soit l'épaisseur de couche, la combinaison des paramètres associant une puissance minimale (100mW) et un seul passage laser (N1) donne

les résultats les plus proches des valeurs cibles. Tandis qu'une puissance laser maximale (500mW) associée à deux passages laser (N2) sont les paramètres machine les moins probants.

Ces différences de réponse sont observables à l'œil nu (Figure 35). Cette figure représente les images de deux pièces crues obtenues après nettoyage (Figure 35, A à D) à savoir E50-P100-N1 et E50-P500-N2 au regard du modèle fils à reproduire (Figure 35, E). Plusieurs différences sont à noter entre les deux échantillons. Le phénomène de surpolymérisation est amplifié par une puissance élevée (P500) impactant ainsi : 1) la finesse des travées à reproduire (surface polymérisée augmente), réduisant par la même la macroporosité de la pièce, et 2) la définition des travées (nombre d'aire diminue). Il est ainsi possible de dénombrer 3 entités sur l'échantillon E50-P100-N1 (Figure 35, C) contre une seule entité sur l'échantillon E50-P500-N2 (Figure 35, D).

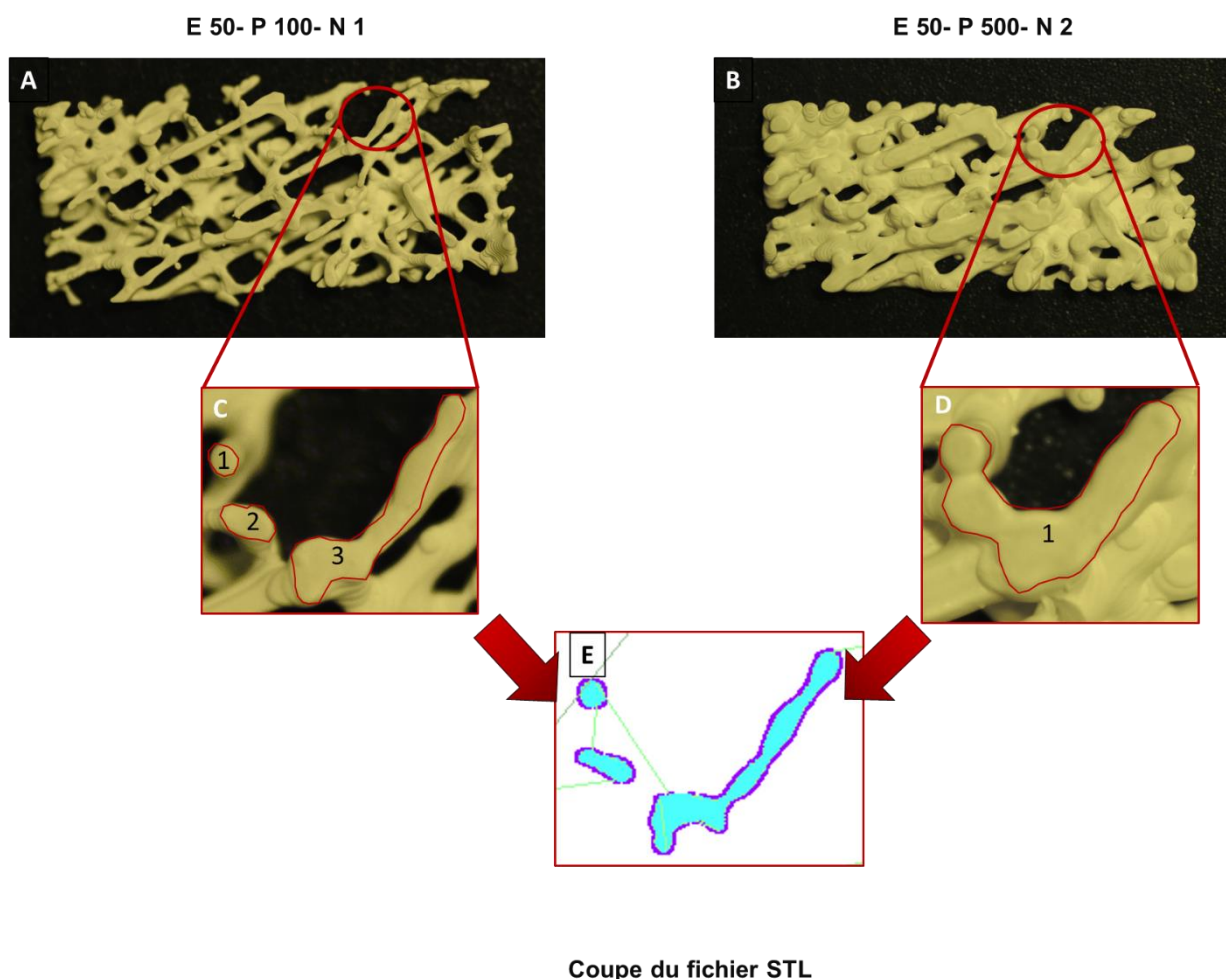


Figure 35 : A) à D) Photographies de pièces crues, E50-P100-N1 et E50-P500-N2, obtenues après nettoyage, à différentes échelles et E) portion du modèle fils à reproduire



Pour effectuer au mieux la comparaison entre les réponses obtenues et les valeurs cibles, des calculs de désirabilité sont réalisés. La Figure 36 renvoie à la méthode utilisée pour ces calculs de désirabilité. La détermination des maxima et minima de chacune des réponses a été déterminé selon un cahier des charges pour chacune des épaisseurs évaluées. En effet, pour le nombre d'aire, la désirabilité de 100% correspond aux valeurs cibles du fichier STL fils. Une désirabilité de 0% correspond pour cette réponse au fait de n'avoir qu'une seule aire. Pour la réponse surface polymérisée, la désirabilité de 100% correspond là aussi aux valeurs cibles tandis que toute réponse supérieure à 30 mm<sup>2</sup> c'est-à-dire environ 3 fois la valeur cible, sera considérée comme une réponse hors des valeurs cibles du cahier des charges.

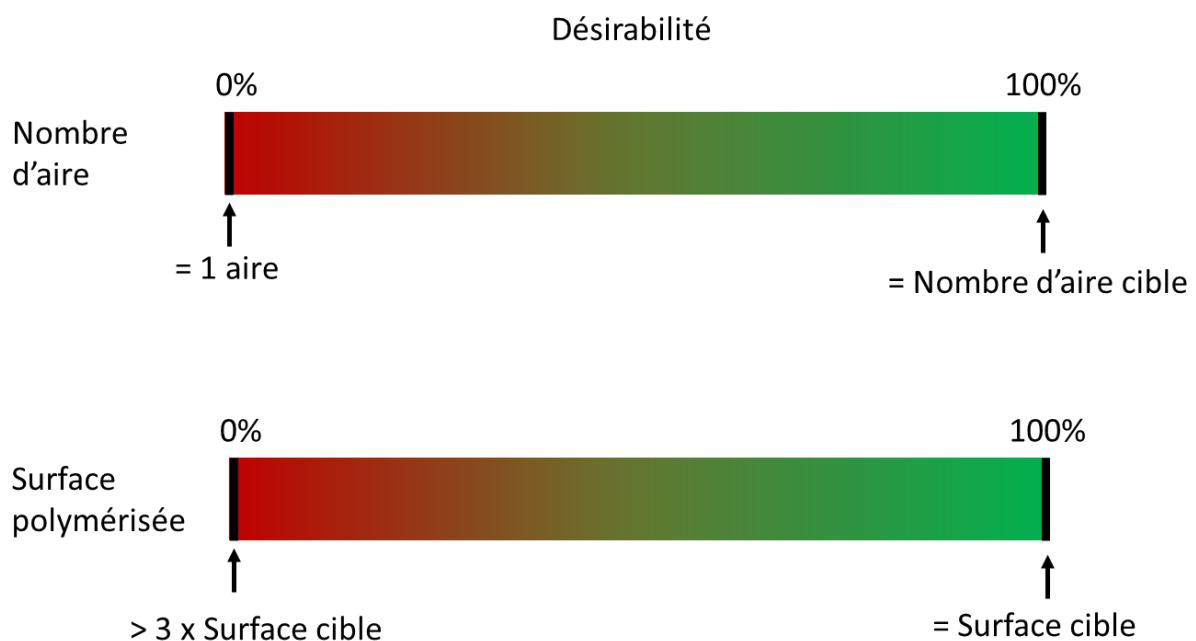


Figure 36 : Détermination des maxima et minima de désirabilité pour chaque épaisseur de couche

Ces réponses sont reportées dans un graphique prenant en compte la désirabilité globale de toutes les architectures c'est-à-dire en fonction du nombre de passages laser et de la puissance laser (Figure 37). La désirabilité globale est obtenue en faisant la moyenne des désirabilités des deux réponses obtenues, surface polymérisée et nombre d'aire, pour chaque échantillon.

Cette représentation graphique permet de comparer les valeurs de désirabilité globale entre chaque architecture. Tout d'abord, sur l'ensemble des résultats, les meilleures désirabilités globales sont obtenues lorsque le nombre de passage laser est égal à 1 et avec

les puissances laser les plus faibles (100 mW, 200mW et 300 mW) avec une gamme de désirabilité globale allant de 65 % à 88%. Des désirabilités de 0% sont obtenues pour les puissances laser les plus fortes (400 mW et 500 mW) et un nombre de passage laser égal à 2. Il est également possible de distinguer des valeurs équivalentes entre les épaisseurs de couche de 50  $\mu\text{m}$  et 70  $\mu\text{m}$ . À l'inverse une épaisseur de 100  $\mu\text{m}$  semble entrainer des désirabilités globales plus basses que pour les deux autres épaisseurs de couche.

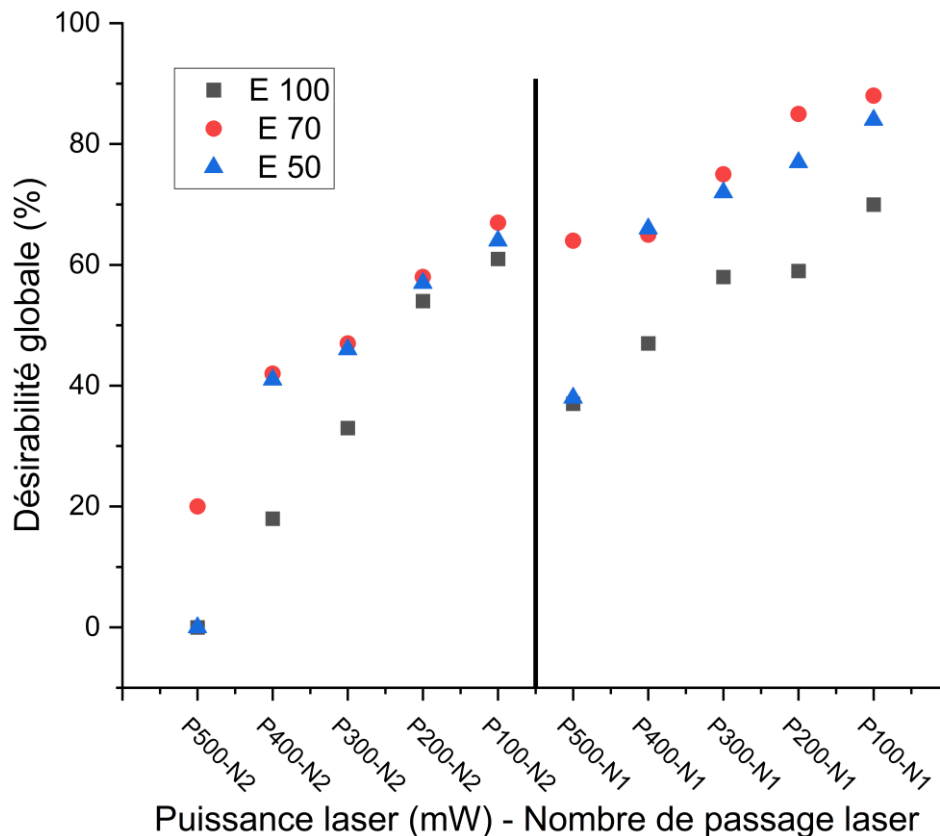


Figure 37 : Représentation graphique de la désirabilité globale, moyenne de la désirabilité de nombre d'aires et de la surface polymérisée pour une architecture en fonction de toutes les conditions du plan d'expérience

Chaque paramètre a été évalué par ce calcul de désirabilité présenté en Figure 38. Tout d'abord, le graphique A de la Figure 38 montre l'impact délétère d'une augmentation du nombre de passages laser avec une désirabilité globale de 66% pour 1 seul passage laser contre 41 % pour deux passages laser. Le fait de n'avoir qu'un passage laser permet d'augmenter du tiers la désirabilité obtenue. Le graphique B de la Figure 38 permet d'observer une baisse de la désirabilité globale inversement proportionnelle avec l'augmentation de la puissance laser. Une diminution de la puissance laser de 500mW à 100mW mène à une

augmentation de la désirabilité globale de 26% à 73% tout en améliorant la résolution des architectures obtenues. Le graphique C de la Figure 38 montre la plus faible désirabilité globale pour une épaisseur de couche de 100  $\mu\text{m}$ , puis de 50  $\mu\text{m}$ . Une épaisseur de couche de 70  $\mu\text{m}$  permet d'atteindre les meilleures résolutions pour cette architecture trabéculaire.

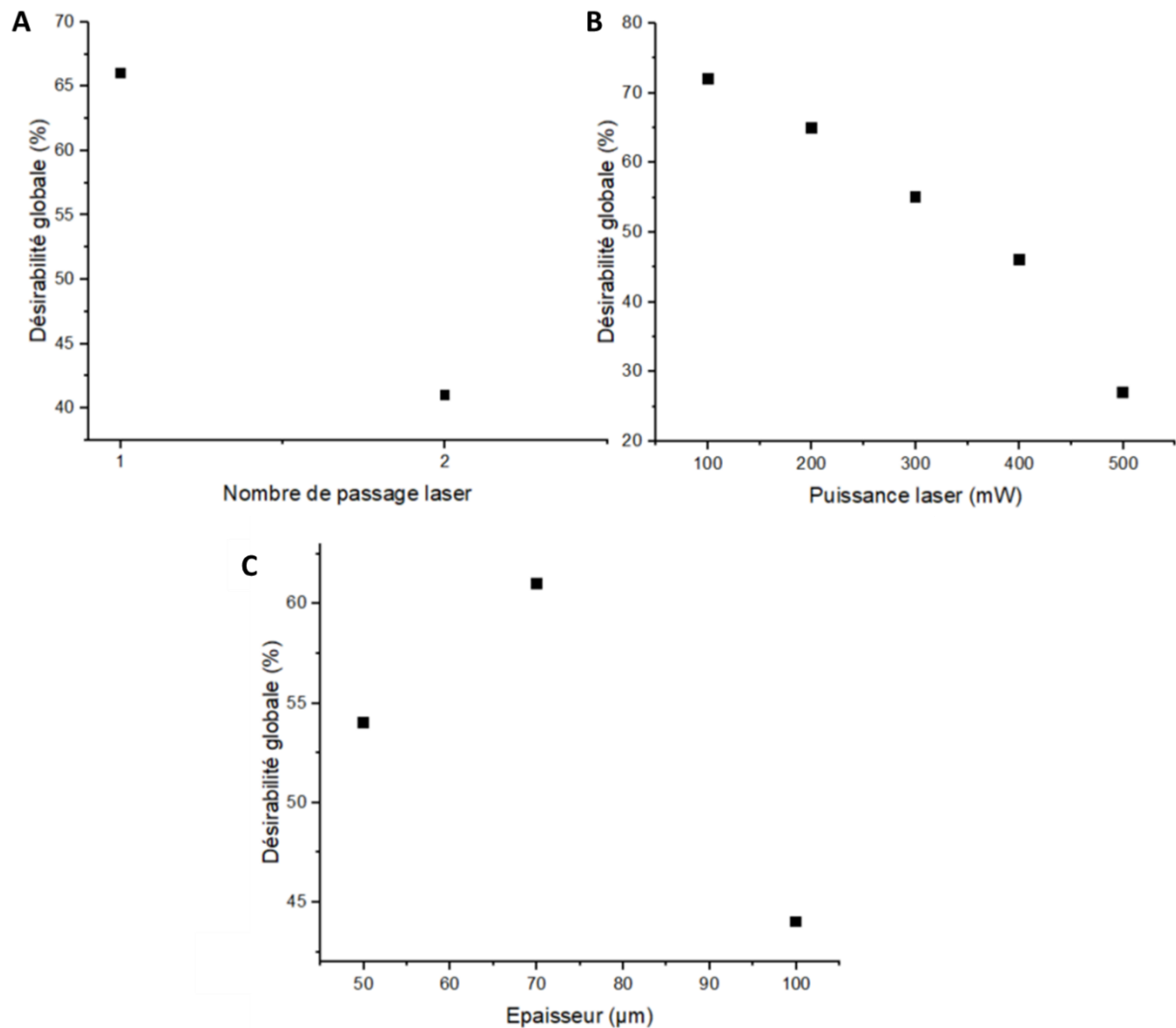


Figure 38 : Représentation graphique de la désirabilité globale en fonction de : A) nombre de passage laser, B) la puissance laser et C) l'épaisseur de couche

Deux phénomènes sont à l'origine de ces différences mesurées. Le premier est la surpolymérisation, c'est-à-dire la surexposition imposée par le faisceau laser UV. Ce phénomène est intrinsèquement lié à la diffusion du faisceau dans la suspension céramique. Une grande diffusion au sein de la suspension céramique va entraîner une surpolymérisation latérale dans le cadre de cette architecture. Ce phénomène est représenté dans la Figure 40.

En effet, certaines zones (entourées en noir) détaillant plusieurs aires distinctes sur le modèle fils (Figure 40, A) n'en présente qu'une seule sur la pièce crue (Figure 40, B). La résolution des pores et donc des trabécules sera impactée ce qui aura pour conséquence des architectures non conformes au modèle 3D, car la surface polymérisée sera plus grande que celle définie par le modèle fils. De plus, du fait de la latéralité du phénomène ( $L_w$ ), le nombre d'aires sera réduit. En effet, la diffusion de l'énergie reçue par la suspension peut entraîner la jonction, la fusion, de deux aires proches. Cette perte de résolution rend cependant la structure plus solide, plus cohésive et la pièce plus facile à manipuler.

Le second phénomène engendrant des modifications sur la pièce crue est lié au procédé de stéréolithographie et plus particulièrement du racleur. En effet, lorsque le racleur est en position basse, c'est-à-dire lors de l'étape d'étalement de la suspension céramique à la surface de la couche précédente, des contraintes de cisaillement sont exercées sur l'architecture. Ces forces peuvent entraîner le détachement d'une aire trop petite ou trop faiblement rattachée à l'aire de la couche inférieure. Ainsi certaines zones (pointées par une flèche, Figure 40) composées de petites aires distinctes sur le modèle fils (Figure 40, A) sont absentes sur la pièce crue (Figure 40, B).

De plus, la mise en forme de ces architectures par ce procédé de fabrication additive ne permet pas l'utilisation de supports. Les supports sont des rajouts (zones polymérisées) mis en forme lors de l'impression pour soutenir des portions qui ne sont pas soutenues par une couche inférieure et seraient donc imprimées dans le vide Figure 39. Ces supports sont souvent moins résistants afin de les enlever plus facilement. Ici, du fait des petites dimensions de l'architecture et de sa fragilité, il ne serait pas possible d'enlever ces supports sans endommager l'architecture. Ainsi, certaines aires n'étant pas rattachées au reste de l'architecture, elles peuvent se déplacer sur la couche ou être emportées par le passage du racleur.

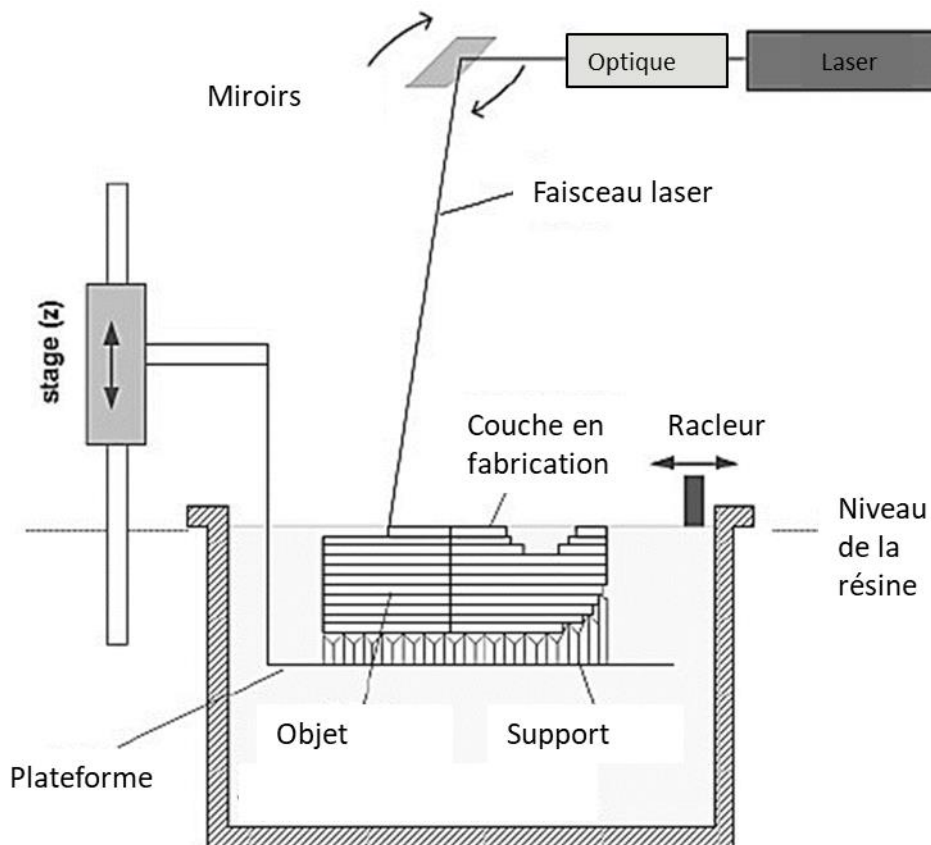


Figure 39 : Représentation schématique d'une architecture élaborée par stéréolithographie à l'aide d'un support [200].

L'ensemble de ces phénomènes impactent donc directement les deux réponses mesurées engendrant la diminution du nombre d'aire et de la surface polymérisée. Néanmoins, la présence moindre de petites aires sur le modèle fils rend le second phénomène marginal.

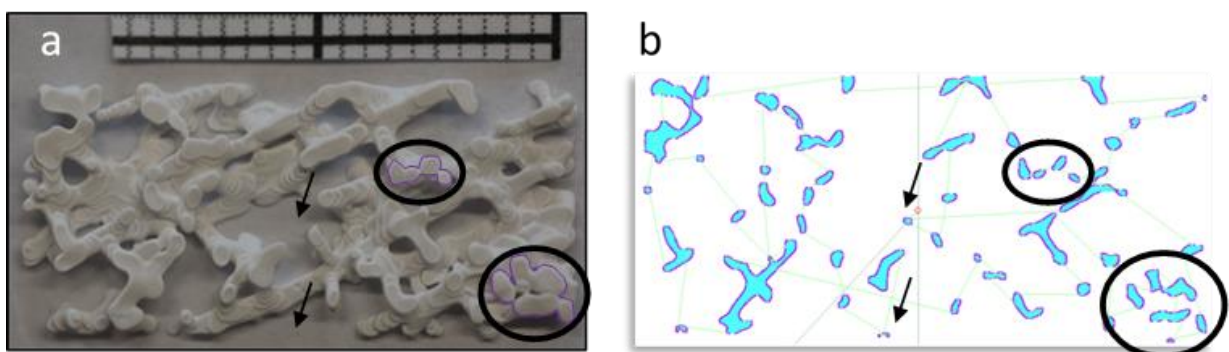


Figure 40 : A) Photographie de la pièce crue E100-P500-N2 et B) Modèle fils de la dernière couche correspondante. Les flèches permettent d'observer les aires manquantes vis-à-vis du fichier STL fils et les zones entourées, la différence de nombre d'aire.

### II.2.4.3. Étude de l'influence des paramètres d'impression

Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée afin de rendre compte de l'impact de chaque paramètre sur la résolution finale de l'architecture 3D. Cette ANOVA a été réalisée avec les réponses obtenues grâce au plan d'expériences et développée sur le logiciel R 4.3.2<sup>®</sup>. Cette méthode statistique permet d'examiner les interactions entre plusieurs variables qui sont ici les paramètres étudiés : la puissance laser, le nombre de passage laser et l'épaisseur de couche. Dans le cadre de cette étude, les trois paramètres sont évalués en fonction de deux réponses, la surface polymérisée et le nombre d'aires, c'est pourquoi la donnée numérique la plus déterminante lors de la réalisation de l'ANOVA sera la valeur de  $p$ . Cette valeur mesure la significativité statistique des résultats observés, indiquant si l'hypothèse nulle testée est validée ou non. La valeur  $p$  est donc un indicateur de la probabilité d'obtenir les résultats observés si l'hypothèse nulle est vraie. Plus la valeur  $p$  est faible, plus il y a de chances que les différences observées entre les groupes soient réelles et non le fruit du hasard. Il est également possible par cette analyse d'étudier les effets des différents paramètres et de leurs combinaisons (interactions) deux à deux notées  $P \times E$ ,  $P \times N$  et  $E \times N$  et des trois notée  $P \times E \times N$  dans le Tableau 6.

La valeur de  $p$  sera très significative lorsque  $p < 0,0001$ , significative lorsque  $p < 0,001$  et peu significative quand  $p < 0,01$ . Les résultats de cette ANOVA sont présentés dans le Tableau 6.

Paramètres	Valeur de $\rho$ pour la surface polymérisée	Valeur de $\rho$ pour le nombre d'aire
P	1 e-11	4 e-07
E	2 e-05	0,1
N	1 e-09	2 e-07
P x E	0,6	0,09
P x N	0,1	0,5
E x N	0,3	1 e-03
P x E x N	0,5	0,2

Tableau 6 : Tableau répertoriant les résultats de l'ANOVA sur les variables quantitatives, la surface polymérisée et le nombre d'aire avec P correspondant à la puissance laser, E à l'épaisseur de couche et N au nombre de passage laser. Le signe « x » signifiant en interaction avec.

Les résultats relatifs à la surface polymérisée mettent en évidence 3 facteurs significatifs à savoir les 3 paramètres évalués (P, E et N). Il n'y a pas d'interactions significatives entre les différents paramètres pour cette réponse. Les facteurs les plus significatifs pour cette réponse sont la puissance laser (P) et le nombre de lasages (N).

Pour la réponse nombre d'aires, il y a deux facteurs très significatifs, la puissance laser (P) et le nombre de lasages (N). Une interaction pourrait être significative, l'interaction E x N.

L'ensemble de ces résultats met en avant la nécessité de prendre en compte chacun de ces trois paramètres dans la réalisation d'architectures par ce procédé de fabrication.

#### II.2.4.4. Modèle prédictif

L'utilisation d'un plan d'expériences permet de quantifier l'influence de chacun de ces paramètres significatifs sur le résultat par l'établissement d'un modèle mathématique polynomial du premier degré avec interactions prédictif des résultats (Équation 4).

$$R = A_0 + A_1 * N + A_2 * P + A_3 * E + A_4 * P * N + A_5 * P * E + A_6 * N * E + A_7 * N * E * P$$

Équation 4 : Équation polynomiale générale (R = réponse et les  $A_i$  sont les coefficients calculés)

Ce modèle prédictif a également été calculé sous le logiciel R 4.3.2 ®. Pour établir ce modèle, une régression multilinéaire par la méthode des moindres carrés a été utilisée afin de déterminer les coefficients des effets significatifs établis dans la partie précédente (II.2.4.3). Puis pour valider les modèles prédictifs établis, une régression linéaire est effectuée afin de valider le polynôme généré.

Les régressions multilinéaires ont permis l'obtention de deux polynômes pour la réponse surface polymérisée repris dans l'Équation 5 et pour la réponse nombre d'aires, repris dans l'Équation 6. Les coefficients de chaque polynôme (avec pour variable : P pour la puissance ; E pour l'épaisseur de couche et N pour le nombre de passage laser) correspondent au poids des facteurs significatifs. Il est également à noter que les variables (P ; E ; N) sont dans leurs unités originelles et n'ont pas été réduites à des variables centrées réduites. Comme il n'a pas été utilisé de variables centrées réduites et afin de hiérarchiser les différents facteurs, les valeurs minimales et maximales du facteur associé à sa variable seront données. Les valeurs minimales des variables sont 100 mW pour P ; 50  $\mu$ m pour E et 1 pour N. Les valeurs maximales des variables sont 500 mW pour P ; 100  $\mu$ m pour E et 2 pour N.

$$S = 0,023 * (P) + 0,067 * (E) + 5,062 * (N)$$

Équation 5 : Polynôme établi par régression multilinéaire de la réponse surface polymérisée

$$A = -0,017 * (P) - 5,2 * (N) + 50,58$$

Équation 6 : Polynôme établi par régression multilinéaire de la réponse nombre d'aires



Les équations sont utilisées afin de prédire les valeurs pour chaque jeu de paramètres évalué dans le plan d'expériences. Les valeurs prédites sont comparées aux valeurs mesurées afin de vérifier la validité statistique du modèle prédictif Figure 41. Une régression linéaire est alors effectuée afin d'obtenir le coefficient de détermination :  $R^2$ . Ce coefficient de détermination est un indice de la qualité de prédiction de la régression linéaire. Ainsi, plus ce coefficient est proche de 1, plus la régression linéaire est en adéquation avec les données collectées.

Pour la surface polymérisée (Figure 41 A), un  $R^2$  de 0,91 est obtenu. Cette valeur relativement proche de 1 est satisfaisante et permet de valider statistiquement le polynôme généré. Ces données confortent également les résultats ANOVA obtenus précédemment dans la détermination des paramètres les plus significatifs.

À l'inverse, pour la réponse, nombre d'aires, (Figure 41 B) un  $R^2$  de 0,72 est obtenu. Ici, les points sont plus dispersés autour de la régression linéaire. La principale cause est l'incertitude générée de la non-présence de l'interaction entre la variable épaisseur de couche avec la variable nombre de passage laser. Cependant, une valeur de 0,72 pour le  $R^2$  reste globalement satisfaisante.

L'Équation 5 va donc reprendre les trois paramètres significatifs qui agissent indépendamment les uns des autres. Ainsi, pour la puissance, la valeur minimale possible est de 2,3 (soit  $0,023 \times 100$  (mW)) à 11,5 pour la valeur maximale, ces valeurs correspondent au poids du facteur associé sur la réponse mesurée. Pour l'épaisseur de couche, le poids des facteurs minimum est de 3,35 et le poids des facteurs maximum est de 6,7. Enfin, pour le nombre de lasages, le poids des facteurs minimum sera de 5,06 et le poids des facteurs maximum sera de 10,1. Deux cas sont ainsi dissociés pour l'étude de la réponse surface polymérisée. Lorsque les poids des facteurs sont les plus hauts, la puissance laser et le nombre de passages sont prédominants pour la réponse surface polymérisée. Le paramètre épaisseur de couche est significatif statistiquement, mais presque deux fois moins influent que le paramètre puissance du laser. Lorsque les poids des facteurs sont les plus bas, le paramètre le plus influent est le nombre de passages laser puis l'épaisseur de couche et enfin la puissance laser. Le nombre de passages laser reste donc le paramètre le plus important de la réponse surface polymérisée. Plus le poids du facteur sera haut et plus la surface polymérisée sera grande donc s'écartera de la valeur cible.

L'Équation 6 va reprendre les deux paramètres significatifs qui agissent indépendamment les uns des autres, car l'interaction n'est pas considérée comme suffisamment significative II.2.4.3. Ainsi, pour la puissance, la valeur minimale possible est de 1,7 à 8,5 pour la valeur maximale. Le nombre de lasages quant à lui aura une valeur minimale

de 5,2 et la valeur maximale sera de 10,4. Le nombre de lasages est là encore le paramètre avec le plus de poids. Le terme constant du polynôme (Eq. 6) est à rapprocher de la valeur cible du nombre d'aires (Tableau 4). L'influence des facteurs P et N étant négative (Eq. 6) il convient donc de minimiser leur valeur pour augmenter le nombre d'aires et tendre vers la valeur cible.

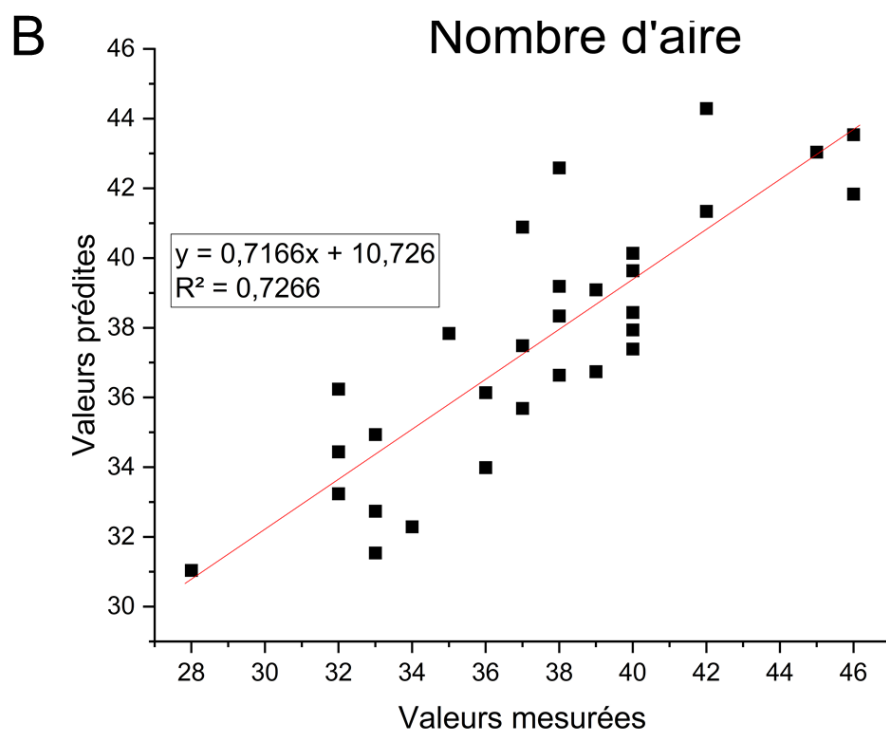
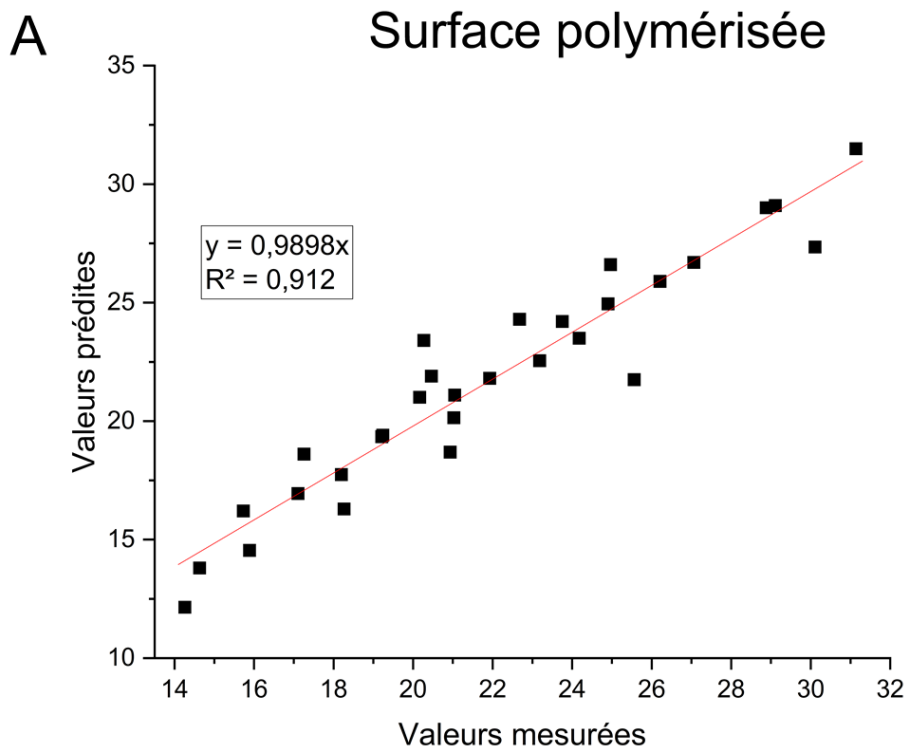


Figure 41 : Représentation graphique des valeurs prédites par les valeurs mesurées pour la surface polymérisée (A) et pour le nombre d'aire (B)

## II.2.4.5. Détermination de la combinaison de paramètres optimale

L'architecture, la plus conforme au modèle fils, réalisée par stéréolithographie, va donc dépendre des 3 paramètres évalués jusqu'ici. Afin de déterminer quelle est la combinaison de paramètres la plus optimale, les résultats obtenus pour chaque architecture ont été représentés graphiquement en fonction de leur nombre d'aire et de leur surface polymérisée en regard des valeurs cibles définies par le modèle fils (Figure 42).

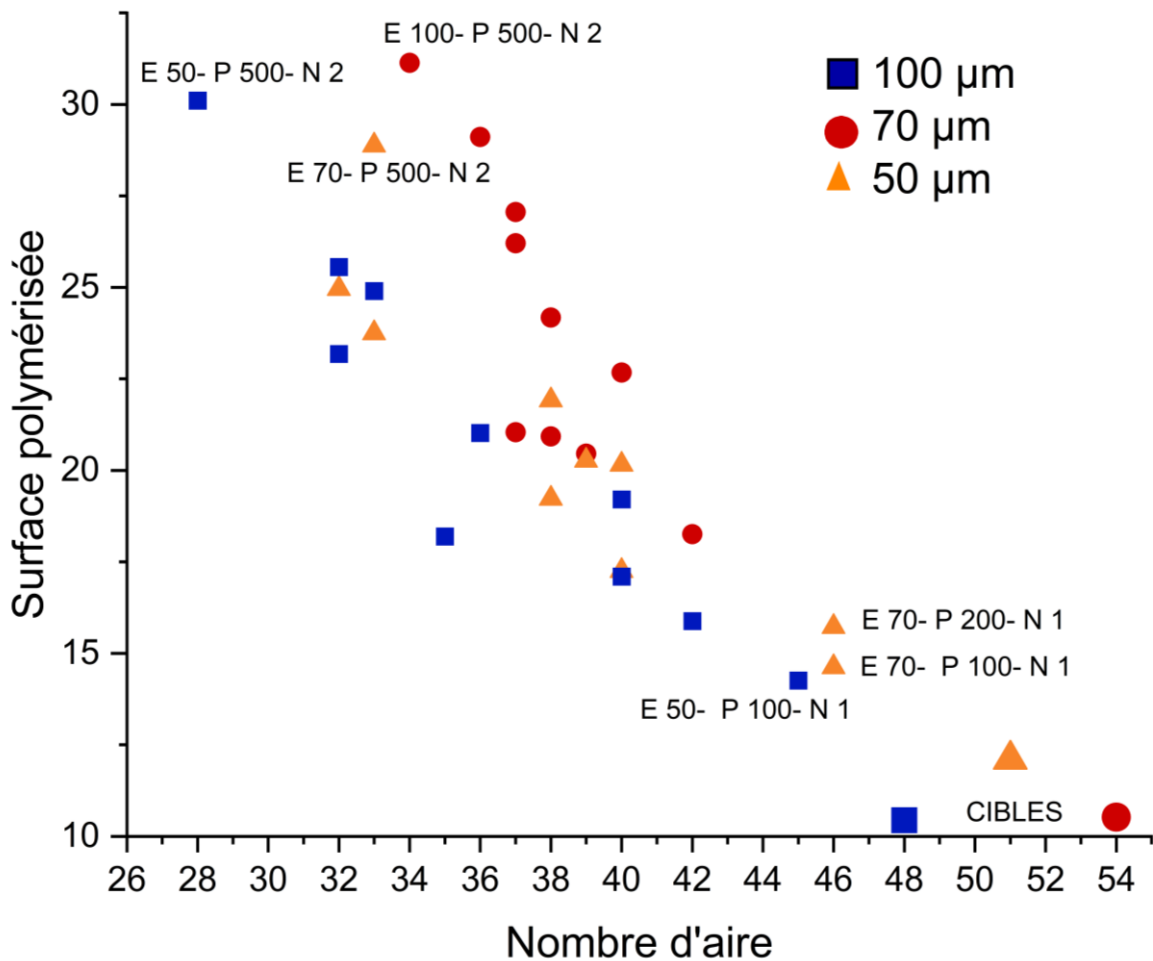


Figure 42 : Représentation graphique des valeurs, mesurées et cibles, de surface polymérisée et de nombre d'aire pour chacune des 30 architectures élaborées.

En accord avec les résultats de désirabilités, les architectures les plus éloignées des valeurs cibles ont été réalisées avec le nombre de passage laser (N) et la puissance laser (P) les plus élevés tandis que les architectures mises en forme avec une puissance laser de 100 et 200 mW, un nombre de lasage de 1 et une épaisseur de couche de 50  $\mu\text{m}$  et 70  $\mu\text{m}$  sont bien les plus proches des valeurs cibles. La désirabilité obtenue pour ces trois combinaisons de paramètres : E50-P100-N1 ; E70-P200-N1 et E70-P100-N1 sont respectivement de 84%,

85% et 88%. Ces paramètres permettent donc d'obtenir des architectures proches du modèle fils. Néanmoins, une seule combinaison de paramètre sera retenue pour la production de pièces 3D en vue de leur étude biologique *in vitro*.

La détermination de l'architecture utilisée par la suite pour l'étude biologique a été faite sur la base de critères qualitatifs relatifs au rendement de la production (minimisation du temps d'impression) et à la robustesse de la pièce (en vue de leurs manipulations avec des pincettes notamment).

- L'impression d'une série de 6 pièces sur le plateau de fabrication (maximum de pièces que peut comporter le plateau de fabrication) avec une épaisseur de 50  $\mu\text{m}$  nécessite un temps d'impression de 27 minutes (Tandis que pour imprimer la même série de pièces avec une épaisseur de couches de 70  $\mu\text{m}$ , 19 minutes suffisent.
- Une épaisseur de couches de 50  $\mu\text{m}$  accroît la fragilité des pièces et rend leur manipulation plus délicate que dans le cas des architectures réalisées avec une épaisseur de couches de 70  $\mu\text{m}$ .

Bien que peu de différences existent entre l'architecture réalisée avec la combinaison de paramètres E70-P200-N1 et E70-P100-N1, la mise en forme avec une puissance laser de 100 mW, un nombre de passage laser de 1 et une épaisseur de couches de 70  $\mu\text{m}$  (E70-P100-N1) sera sélectionnée aux vues de la désirabilité obtenue.

### **II.2.5. Caractérisations des architectures en 3D**

L'analyse 2D des architectures permet de se rendre compte des interactions, rayonnement laser-matière au cours de l'impression. Cependant, cette méthode ne permet pas d'obtenir un rendu sur l'ensemble de l'architecture 3D, mais seulement sur une couche. C'est pourquoi certaines architectures ont été imagées au  $\mu$ -tomographe RX à l'institut Pprime puis analysées. La  $\mu$ -tomographie RX permet la visualisation complète de l'architecture par seuillage et maillage après traitement informatique. Ce traitement a été réalisé aux moyens des logiciels ImageJ et 3D Slicers. Les analyses réalisées sur ces images ont pour objectif de comparer le modèle STL généré à partir de l'os avec les architectures réalisées avec différents paramètres de mise en forme. La  $\mu$ -tomographie RX étant coûteuse, il n'a pas été possible de caractériser les 30 échantillons du plan d'expériences. C'est pourquoi, au regard de l'étude 2D, 6 échantillons ont été sélectionnés pour être analysés par  $\mu$ -tomographie RX. Il a ainsi été sélectionné l'architecture réalisée avec les paramètres E70- P100-N1. Pour cette architecture, qui est aussi celle retenue pour l'étude biologique finale, une pièce crue ainsi qu'une pièce

frittée ont été analysées afin de préciser également l'influence du traitement thermique post-mise en forme et de disposer des caractéristiques complètes des échantillons céramiques testés biologiquement. Les résultats obtenus concernant l'architecture frittée E70- P100-N1 seront analysés dans la partie II.3.1.3. Les 4 autres échantillons crus sélectionnés de manière à rendre compte de l'influence de chaque paramètre d'impression sont les architectures mises en forme avec les paramètres suivants : E50-P100-N1, E100-P100-N1, E70-P500-N1 et E70-P500-N2.

Ainsi il est possible de caractériser l'influence de la puissance laser, de l'épaisseur de couche et du nombre de passages laser sur les architectures après mise en forme. La Figure 43 est une représentation des architectures par  $\mu$ -tomographie RX.

La caractérisation de ces volumes 3D obtenus par  $\mu$ -tomographie RX est effectuée à l'aide du logiciel Fiji via l'utilisation du plugin BoneJ [201]. L'utilisation de cet outil permet d'obtenir des informations sur le volume, la superficie totale de matière, le degré d'anisotropie, l'épaisseur des trabécules et le nombre de connectivités des trabécules de chaque architecture évaluée. Ce plugin se sert de l'intégralité des scans collectés durant l'acquisition au  $\mu$ -tomographe RX pour procéder aux mesures de volume, de superficie totale de matière.

Pour rappel, les architectures ont été réalisées à partir du modèle fils. Ce modèle fait partie intégrante du modèle mère, comme expliqué dans la partie II.1. Cependant, les scans 2D ne sont disponibles que pour le modèle mère et non le modèle fils. De ce fait, il n'a pas été possible d'obtenir le nombre de connectivités, ni le degré d'anisotropie et l'épaisseur des trabécules du modèle fils. Les comparaisons de ces valeurs se feront alors avec les valeurs obtenues pour le modèle mère. Le modèle mère va dans ce cas permettre d'obtenir des valeurs de taille de trabécules et de degrés d'anisotropie représentatives d'un échantillon d'os d' $1 \text{ cm}^3$ . Ces valeurs seront donc représentatives d'un plus grand volume osseux.

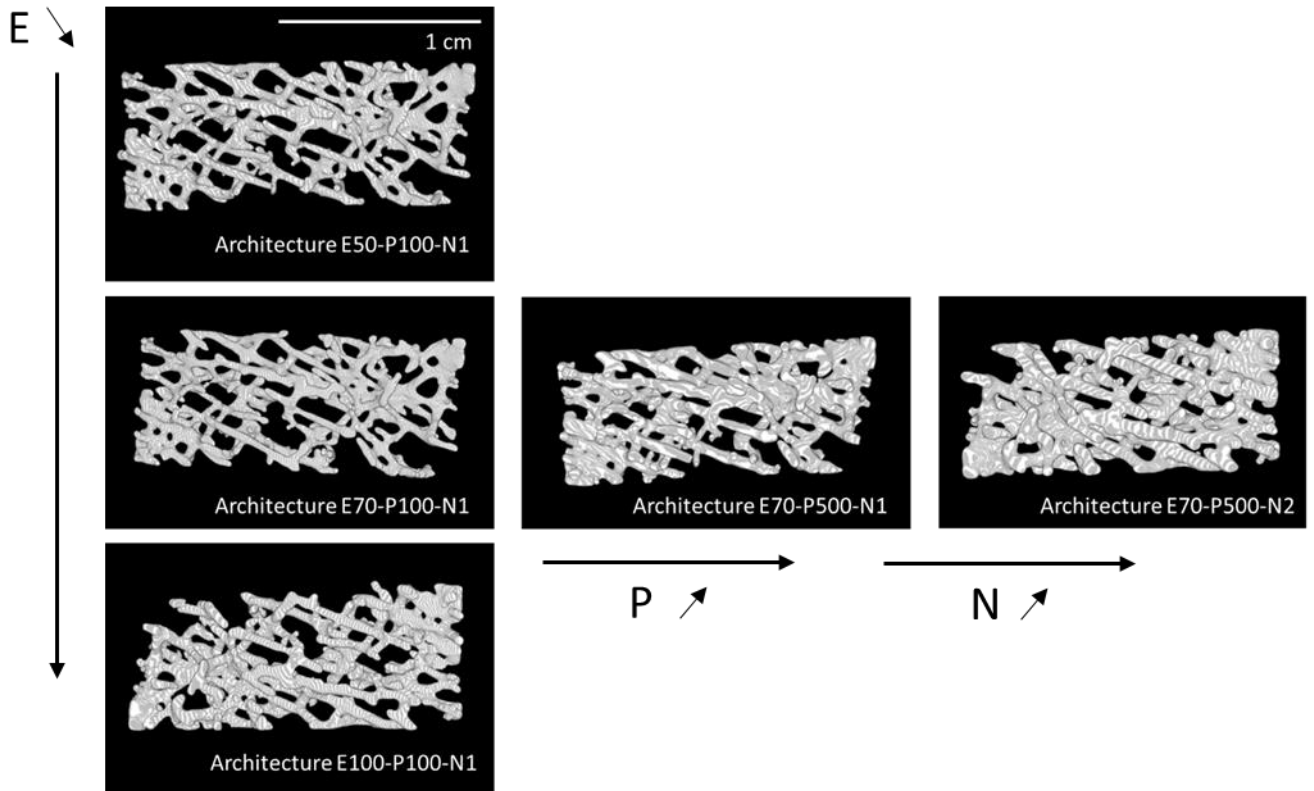


Figure 43 : Représentation 3D de toutes les architectures mises en forme par stéréolithographie. Reconstruction 3 D d'images acquises par  $\mu$ -tomographie RX.

### II.2.5.1. Étude du volume et de la superficie totale

Le calcul de la superficie totale est réalisé par le plugin BoneJ. Ce dernier va réaliser le maillage de l'architecture 3D à l'aide de triangles. La superficie totale représente la somme des aires de ces triangles. Le volume est calculé à partir du volume 3D et non des stacks 2D. La valeur correspond au volume compris à l'intérieur du maillage réalisé pour la détermination de la superficie totale.

La Figure 44 met en évidence le volume de matière polymérisée et la superficie totale représentative des architectures en comparaison des valeurs correspondant au modèle fils. Il est à noter que le volume et la superficie totale évoluent tous deux de la même manière. Trois valeurs relativement proches de l'ordre de  $31 \text{ mm}^3$  pour le volume et  $300 \text{ mm}^2$  pour la superficie sont obtenues pour une même puissance laser (100 mW) et nombre de lasages (1) quelles que soient les couches de 50 à 100  $\mu\text{m}$ . Des valeurs bien plus élevées sont obtenues pour une puissance laser de 500 mW et encore plus pour un second passage laser. Avec un volume de  $31,1 \text{ mm}^3$ , l'architecture E70- P100-N1 a le volume le plus proche du fichier STL soit  $13,1 \text{ mm}^3$ . Il en est de même pour la superficie totale, avec une valeur de  $291 \text{ mm}^2$  pour

l'architecture E70- P100-N1 et une valeur de 238,1 mm<sup>2</sup> pour le fichier STL. Cette différence de volume s'explique notamment par le phénomène de surpolymérisation qui peut engendrer des différences de plus de 100% entre les deux valeurs (allant de 31,1 mm<sup>3</sup> pour l'architecture E70- P100-N1 à 72,5 mm<sup>3</sup> pour l'architecture E70- P500-N2. Cet effet aura également un impact sur la taille des trabécules, ce point sera discuté plus tard. Ces conclusions vont donc bien dans le sens des résultats obtenus lors de l'étude 2D où il était noté des différences entre l'architecture la plus volumineuse et la moins volumineuse (Figure 42)

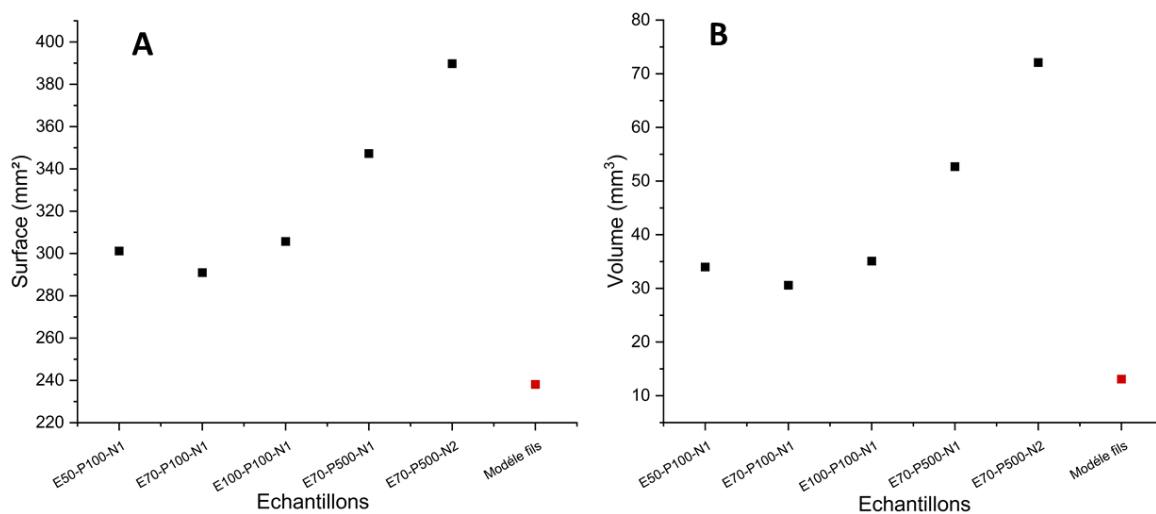


Figure 44 : Représentation graphique des résultats de la superficie totale (A) et du volume (B) des 5 architectures crues caractérisés par  $\mu$ -tomographie RX après analyse par le plugin BoneJ.

### II.2.5.2. Étude du degré d'anisotropie

Le degré d'anisotropie est utilisé pour quantifier la direction des trabécules de l'os trabéculaire. L'obtention de cette donnée nécessite une succession d'étapes bien définie :

- Un tracé de ligne parallèle sur les stacks 2D dans une direction aléatoire.
- Des segments sont ensuite déterminés lorsqu'ils rencontrent un changement de phase Figure 45. Les points rouges marquent les changements de phase.
- Un vecteur MIL (Mean Intercept Length) est ensuite créé pour cette direction. La longueur de ce vecteur correspond à la longueur totale des segments répertoriés divisés par le nombre total de changements de phase.

Ces étapes sont répétées pour l'ensemble des directions des trabécules. L'ensemble de ces vecteurs sont ensuite analysés : ils sont représentés autour de l'origine sous forme de



nuage de points et l'algorithme tente de résoudre l'équation d'une ellipsoïde qui s'ajusterait à ce nuage de point. Les rayons de cet ellipsoïde déterminent le degré d'anisotropie.

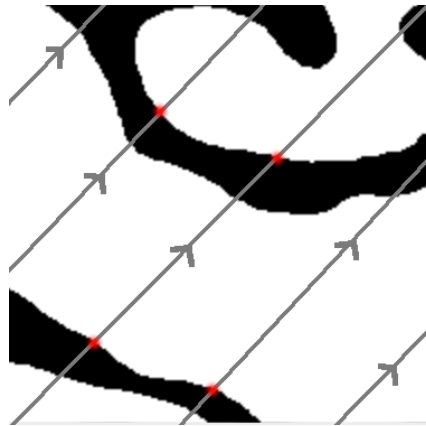


Figure 45 : Représentation des changements de phases générés par le plugin BoneJ lors de l'évaluation du degré d'anisotropie

Dans cette étude, cette valeur est comprise entre 0 et 1. La valeur 0 signifie que l'objet est complètement isotrope, soit qu'il n'y a pas de direction privilégiée des trabécules. À l'inverse la valeur 1 signifie que l'objet est anisotrope c'est-à-dire qu'une direction des trabécules est privilégiée.

La Figure 46 représente les différents degrés d'anisotropie (DA) obtenus pour chacun des 5 échantillons testés. La valeur du DA a été obtenue à partir du modèle mère avec une valeur de 0,5. Les résultats montrent 3 architectures proches de cette valeur et deux autres architectures plus anisotropes, présentant la puissance laser la plus forte (500 mW). L'architecture se rapprochant le plus de la valeur du modèle mère est celle réalisée avec les paramètres E70-P100-N1 avec une valeur de 0,55. Il y a donc une relation entre le DA et la puissance laser et donc la surpolymérisation. Le fait d'augmenter la surface polymérisée de l'architecture diminue le nombre d'aires (II.2.4.2). Cette diminution du nombre d'aires entraîne une diminution du nombre de trabécules, ce qui aura pour effet d'obtenir des architectures plus anisotropes et donc des architectures perdant le caractère bio-inspiré.

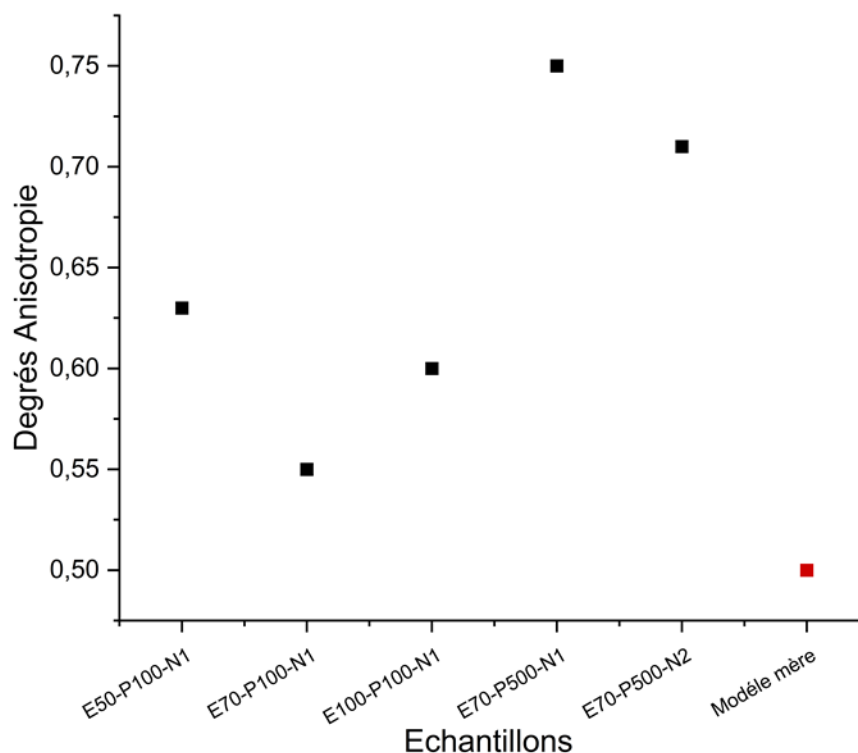


Figure 46 : Degré d'anisotropie (DA) obtenu pour les 5 architectures crues évaluées par  $\mu$ -tomographie RX à l'aide du plugin BoneJ.

### II.2.5.3. Connectivité

La connectivité désigne ici le nombre de trabécules dans le réseau trabéculaire. Cette donnée est mesurée grâce à la caractéristique d'Euler ( $\chi$ ). La caractéristique d'Euler décrit la forme ou la structure d'un espace donné. Dans le cadre de cette caractérisation  $\chi$  est décrit par :  $\chi = \text{objets} - \text{trous} + \text{cavités}$ . Les trous sont caractérisés par le fait qu'ils soient entièrement traversants à l'objet et les cavités comme étant enfermés au sein de l'objet, correspondant à de la porosité fermée. Un facteur correctif est également calculé :  $\Delta x$  permettant le calcul du nombre de trabécules par :  $1 - (\chi - \Delta x)$ .

L'ensemble des connectivités est répertorié dans la Figure 47. Comme pour les caractéristiques précédentes, deux groupes se distinguent : celui avec la plus faible puissance laser (100mW) et celui avec la plus forte valeur de puissance laser (500mW). Comme expliqué en introduction de cette partie, la valeur de connectivité provenant du modèle mère n'est pas pertinente au regard de ces valeurs, car le nombre de connectivités est très supérieur dans le volume de  $1 \text{ cm}^3$  (modèle mère) comparativement à notre volume de  $200 \text{ mm}^3$  (issu du modèle fils).

Le plus grand nombre de connectivités est obtenu avec l'architecture E70- P100-N1. Cette connectivité va dépendre à la fois du nombre d'aires et de la surface polymérisée. Ainsi, comme il a été déterminé dans la partie II.2.4, le plus grand nombre d'aires définies en 2D donnera le plus grand nombre de connectivités. La surpolymérisation engendre une diminution du nombre d'aires et donc également de la connectivité entre les trabécules.

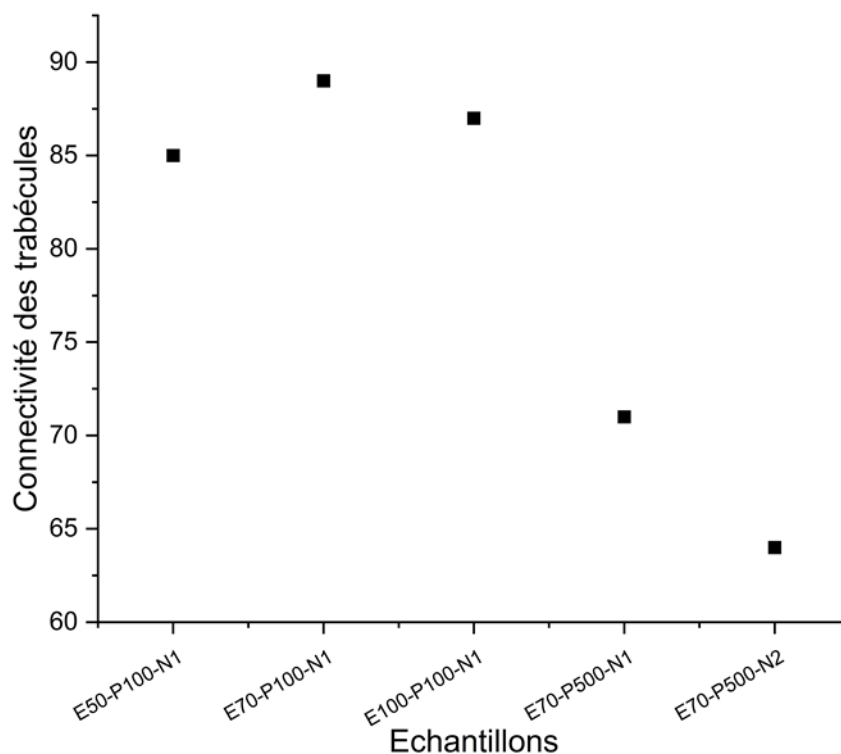


Figure 47 : Valeurs de connectivité des trabécules obtenues pour les 5 architectures crues évaluées par  $\mu$ -tomographie RX à l'aide du plugin BoneJ.

#### II.2.5.4. L'épaisseur des trabécules

La Figure 48 présente les différentes mesures d'épaisseur de trabécules obtenues sur les 5 architectures au regard de la valeur de référence du modèle mère. Le graphique A de la Figure 48 recense les valeurs minimales d'épaisseur de trabécules, le graphique B les valeurs maximales et le graphique C la valeur des moyennes de l'ensemble des épaisseurs de trabécules de l'architecture. Une fois encore, les valeurs obtenues dépendent des paramètres laser utilisés pour la mise en forme des pièces avec des graphiques comprenant deux groupes distincts, le groupe des architectures réalisées avec une puissance laser de 100 mW et les architectures réalisées avec une puissance laser de 500 mW.

Le modèle mère représentant un plus grand volume que le modèle fils, il comporte donc un plus grand nombre de trabécules. La pertinence de cette étude réside dans la restitution des données comparativement au modèle osseux représentatif d'une plus large gamme de trabécules. Le graphique A, présente une épaisseur minimale de trabécules pour le modèle mère égale à 74,8  $\mu\text{m}$  proche de celle de l'architecture E70- P100-N1 (80,7  $\mu\text{m}$ ). La proximité de ces valeurs atteste d'une part de la grande reproductibilité du modèle en céramique, mais explique également pourquoi l'architecture réalisée avec une épaisseur de couche de 70  $\mu\text{m}$  obtient des résultats plus satisfaisants. En effet, pour une épaisseur minimale de trabécules à reproduire de 74,8  $\mu\text{m}$ , une épaisseur de couches de 100  $\mu\text{m}$  va alors surestimer, lors du tranchage, la matière à polymériser tandis qu'une épaisseur de couches de 50  $\mu\text{m}$  sera insuffisante pour reproduire l'épaisseur dans son entièreté. Dans ce second cas, le logiciel de tranchage va alors imposer une seconde couche obtenant ainsi une surestimation au tranchage exactement comme pour le cas d'une épaisseur de 100  $\mu\text{m}$ . L'épaisseur de couches de 70  $\mu\text{m}$  sera, quant à elle, adaptée à la réalisation d'une couche reproduisant l'épaisseur minimale de trabécules.

Cette hypothèse est d'autant plus pertinente que l'épaisseur maximale mesurée de 715,8  $\mu\text{m}$  et l'épaisseur moyenne de 212,2  $\mu\text{m}$  sont des multiples de 70  $\mu\text{m}$ . Le tranchage par le slicer de la machine de stéréolithographie doit ainsi être plus optimisé pour cette valeur d'épaisseur de couche (70  $\mu\text{m}$ ) que pour un tranchage de 50  $\mu\text{m}$  ou 100  $\mu\text{m}$ .

Enfin, concernant la largeur des trabécules, celle-ci sera limitée par la taille du spot laser (21,6  $\mu\text{m}$  de diamètre). La résolution des trabécules imprimées par la machine de stéréolithographie ne pourra donc pas être inférieure à cette valeur. Ainsi, la largeur des trabécules sera forcément supérieure ou égale à cette valeur.

Cependant, bien que les épaisseurs minimales et maximales des trabécules soient proches entre l'architecture E70-P100-N1 et le modèle mère, la valeur moyenne des trabécules entre ces deux objets est éloignée, 212,2  $\mu\text{m}$  pour le modèle mère et 396,9  $\mu\text{m}$  pour l'architecture E70-P100-N1. La différence obtenue viendrait donc de la comparaison entre deux modèles non identiques, laissant entrevoir une potentielle proportion de trabécules plus fines dans le modèle mère. De plus, il est ici comparé les valeurs obtenues pour des pièces crues et non frittées, les résultats relatifs à la pièce frittée E70-P100-N1 seront présentés en partie II.3.1.3.

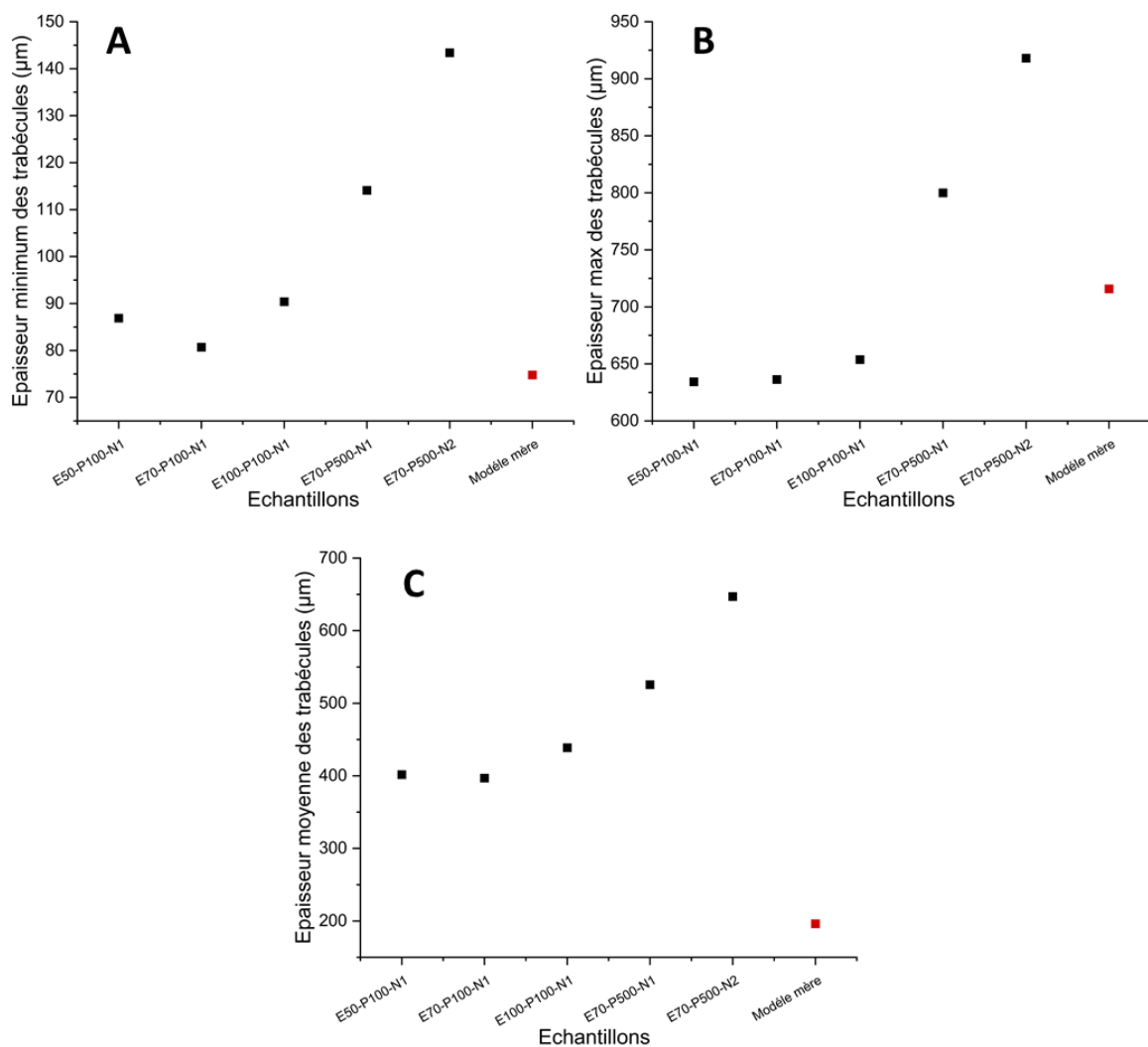


Figure 48 : Valeurs des épaisseurs des trabécules, épaisseur minimale (A), épaisseur maximale (B) et épaisseur moyenne (C) obtenues pour les 5 architectures évaluées par  $\mu$ -tomographie RX à l'aide du plugin BoneJ

En complément à ces graphiques, les architectures sélectionnées ont été représentées avec un gradient de couleur relatif aux différentes épaisseurs de trabécules dans la Figure 49. L'échelle a été définie en fonction de la trabécule maximale de l'architecture E70- P500- N2, c'est-à-dire la trabécule la plus importante, soit une épaisseur de 918  $\mu\text{m}$ . Comme attendu, les architectures ayant été mises en forme avec une puissance laser de 500 mW présentent un gradient de couleur bien plus jaune et blanc (Figure 49 D et E) que les architectures réalisées avec une puissance de laser de 100 mW qui elles présentent un gradient de couleur, orange, rose, (Figure 49 A, B et C) attestant de la finesse des trabécules. De plus, les représentations graphiques tendent à montrer que l'ensemble des architectures présente des épaisseurs de trabécules plus fines à leurs extrémités, soit des trabécules ne présentant en majorité qu'une seule couche.

Ainsi, il est possible d'observer l'évolution des épaisseurs de trabécules en fonction des paramètres de lasage. L'augmentation des valeurs de ces derniers, nombre de passage laser et puissance laser sont délétères pour la résolution de l'architecture du fait du phénomène de surpolymérisation visible grâce au gradient de couleur (jaune et orange).

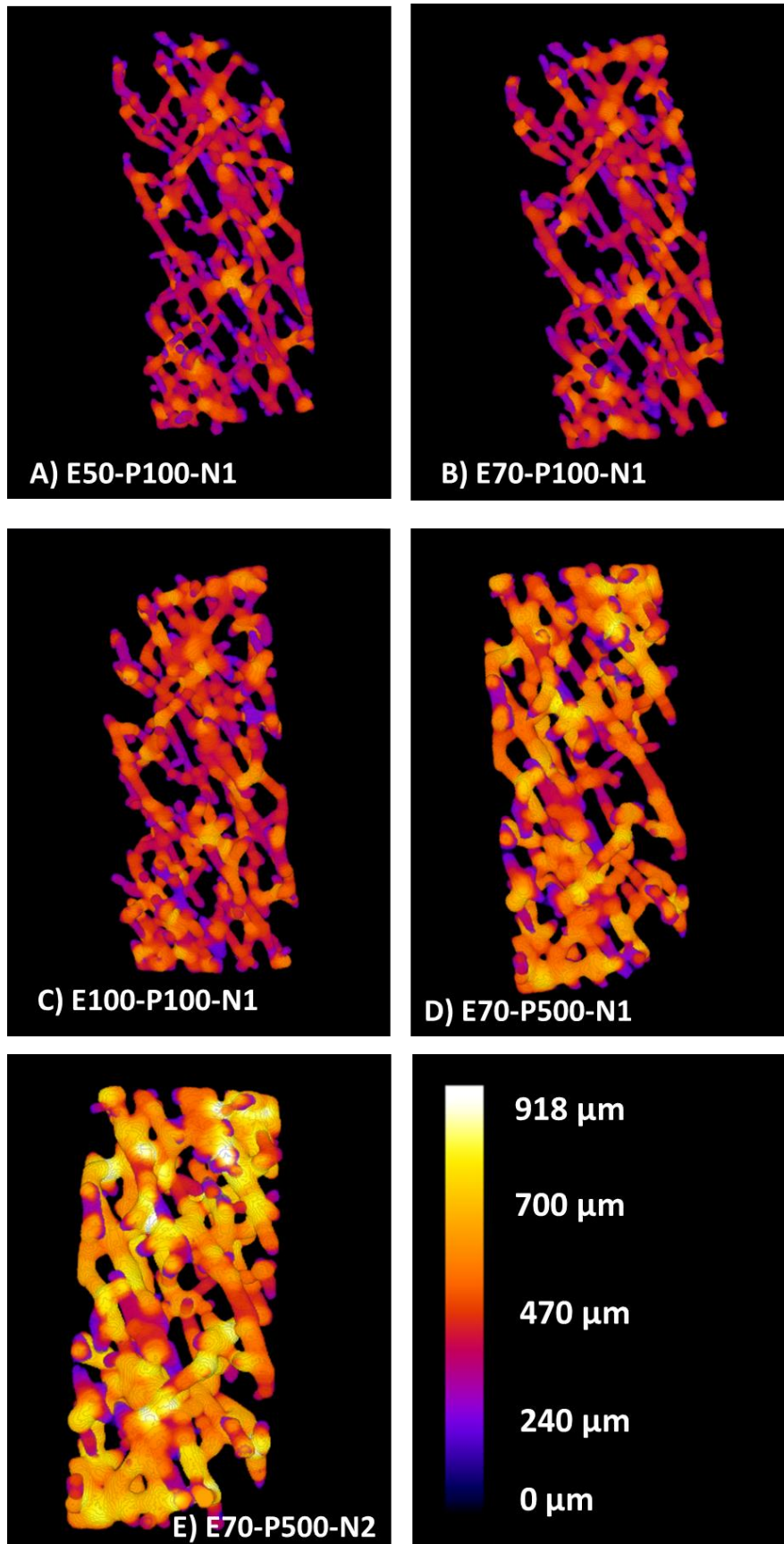


Figure 49 : Représentation 3D des 5 architectures évaluées par  $\mu$ -tomographie RX avec un gradient de couleur fonction de l'épaisseur des trabécules (0 à 918  $\mu\text{m}$ )

### II.3. Traitement thermique

Le traitement thermique est une étape clé dans l'élaboration d'une céramique. Le contrôle de cette étape permet d'obtenir des pièces de microstructure voulue sans détérioration de l'architecture générale (par exemple des déformations, fissures ...) et de l'état de surface. Cette étape consiste à traiter thermiquement à haute température une poudre compacte, mais à une température inférieure au point de fusion. Durant ce processus, plusieurs phénomènes physiques induisent la consolidation et la densification de la pièce. La jonction entre les grains entraîne la consolidation du matériau, c'est la coalescence des grains. L'augmentation de la densité est due à l'élimination de la porosité délimitée par ces grains et à la coalescence des grains. La densité relative ou taux de densification est défini par le rapport de la densité de l'échantillon (mesurée par la méthode d'Archimède par exemple) sur celle de l'échantillon supposé totalement dense. La densité relative est impactée par deux paramètres : la température de frittage et la durée du frittage. Trois étapes successives interviennent lors de l'augmentation du taux de densification (Figure 50). Lors de l'étape initiale, les premiers joints de grains vont se former, les ponts vont s'établir entre les grains impactant faiblement la densité, mais rendant le matériau progressivement résistant mécaniquement. La deuxième étape permet une diminution de la microporosité ouverte, jusqu'à son élimination. Enfin, lors de la dernière étape, la porosité fermée sera progressivement éliminée. La microporosité de la céramique finale est donc gouvernée par le cycle de frittage.

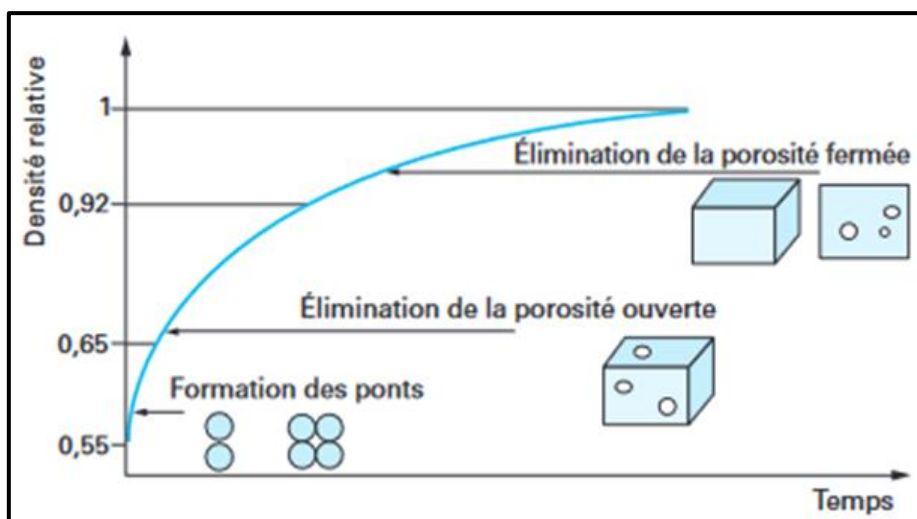


Figure 50 : Évolution de la densité relative au cours des étapes de densification [202]



La présence ou l'absence de cette microporosité régie par le traitement thermique est un facteur important à maîtriser, car outre son influence sur la tenue mécanique de la pièce, elle va notamment impacter l'environnement cellulaire de cette biocéramique [77]. Une précédente étude menée au laboratoire sur des céramiques à base d'HA synthétique, évaluée biologiquement au contact de cellules MC3T3, a notamment mis en évidence une meilleure prolifération cellulaire sur les céramiques denses comparativement aux matériaux poreux. Ainsi, l'objectif visé pour le frittage sera d'obtenir des architectures denses en vue des évaluations biologiques à venir. Une microstructure à grains fins sera recherchée pour maximiser les propriétés mécaniques de ces céramiques trabéculaires.

### **II.3.1.1. Déliantage**

Une étape de déliantage permettant l'évacuation de la phase organique contenue dans la pièce crue est nécessaire. Les composés organiques présents dans la suspension étant nocifs pour la santé, l'étape de déliantage est réalisée dans un four (CERADEL) sous hotte aspirante. Une analyse thermogravimétrique a été réalisée sur une pastille réalisée par SLA avec la même suspension céramique que celle utilisée pour l'élaboration des architectures, avant d'être broyée (Figure 51 et protocole en Annexe 2.1). La perte de masse totale est de 20% avec une perte de masse de 18% de 100°C à 400°C. Ces résultats mettent en évidence que la volatilisation des composés organiques de cette suspension se produit essentiellement de 100°C à 400°C. Le programme de déliantage utilisé dans ces travaux a été construit sur la base de ces résultats et de ceux des travaux de thèse réalisés par Marie Lasgorceix [203] lors d'élaboration par microstéréolithographie de pièces céramiques à base d'HA dopée au silicium. L'utilisation d'une suspension céramique de composition similaire à celle présentée dans ce manuscrit, justifie ce choix. Lors de ces travaux, une rampe de 1°C/min jusqu'à 400°C et un palier de 6 min à cette température avait été utilisés pour le déliantage des pièces mises en forme par microstéréolithographie. La montée lente de 1°C/min permet l'élimination de la phase organique de manière progressive sans observer de modification de la structure de l'architecture.

Afin de consolider les empilements granulaires céramiques, il est nécessaire de réaliser un second traitement thermique à plus haute température, le frittage.

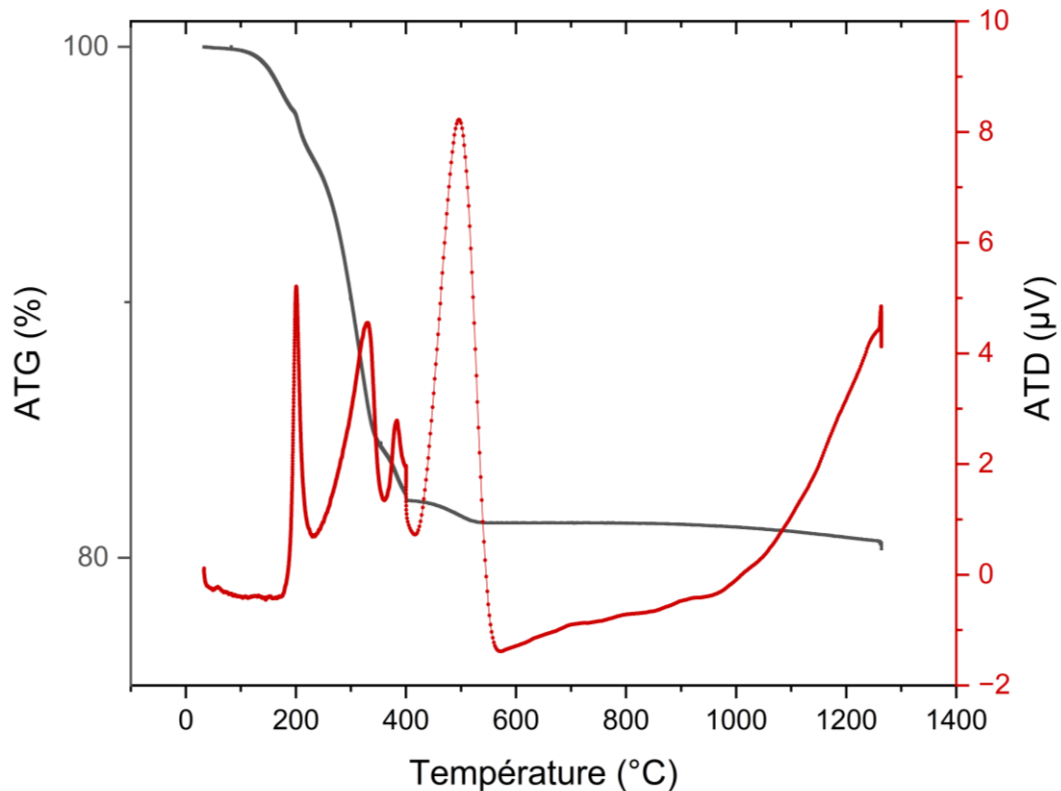


Figure 51 : Courbes d'analyse thermogravimétrique et d'analyse thermique différentielle d'un échantillon de poudre obtenu après mise en forme par stéréolithographie d'une pastille puis broyage de celle-ci.

### II.3.1.2. Frittage

Les architectures (E70-P100-N1) sont déliantées puis frittées selon le cycle représenté dans la Figure 52. Une fois le déliantage opéré, débute alors le cycle de frittage dans un second four (Nabertherm® LHT). L'objectif est d'obtenir des architectures denses, car cette microstructure est plus propice à la prolifération et à l'adhésion des cellules, avec des grains fins pour maximiser leur résistance mécanique comme indiqué précédemment. Deux températures de palier de frittage ont été évaluées dans ce cadre, 1 220°C et 1 270°C sous air, pour un temps de palier de 2h, sur des architectures similaires (E70-P100-N1). Ces températures de paliers ont également été étudiées lors des travaux de thèse de Marie Lasgorceix [203]. Ces cycles comprennent notamment une montée en température plus rapide que celle utilisée pour le déliantage car la quasi-totalité de la phase organique a été brûlée après ce premier cycle thermique. Il n'y a donc plus de risque d'endommagement de la structure céramique qui résulterait d'un grand volume de gaz produit par les organiques à évacuer de celle-ci.

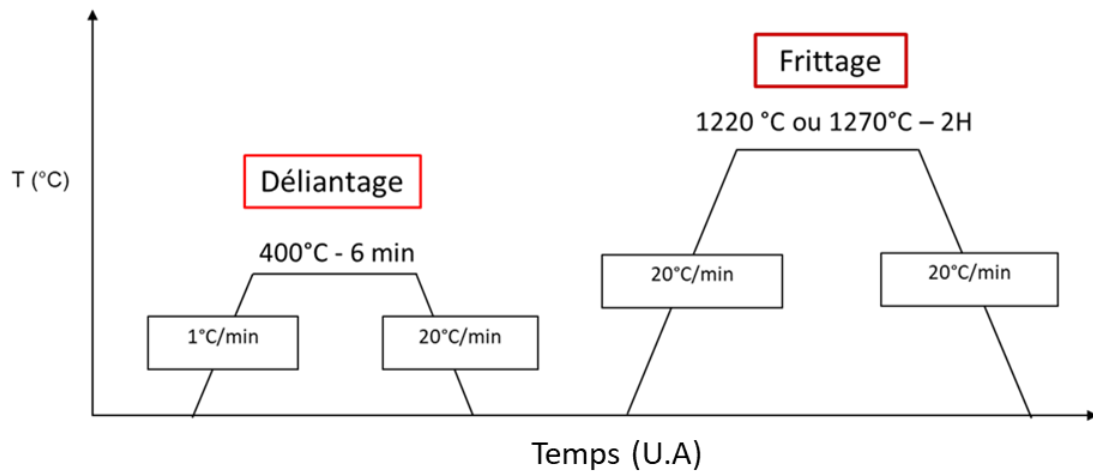


Figure 52 : Représentation schématique des cycles thermiques évalués en fonction du temps (U.A = unité arbitraire)

Des mesures du taux de microporosité ouverte et de la densité apparente sont réalisées par la méthode d'Archimède afin de déterminer le cycle de frittage privilégié pour le reste de l'étude.

L'échantillon fritté est séché pendant 24h à 100°C puis pesé à l'aide d'une balance de précision. Afin de déterminer la masse sèche,  $m_{sèche}$  une architecture sèche est placée dans un cristalliseur contenant un dessiccateur. L'air est pompé jusqu'à obtenir un vide d'environ 30 mbar pendant 15 min. De l'éthanol est alors introduit dans des quantités suffisantes pour recouvrir entièrement l'échantillon. Le vide est à nouveau créé permettant la pénétration de l'éthanol dans les pores de l'architecture. Ce vide est maintenu pendant 30 min. Les échantillons sont ensuite repesés dans une nacelle suspendue dans un bécher d'éthanol, afin de connaître sa masse immergée :  $m_{immergée}$ . L'architecture est ensuite essuyée à l'aide d'une éponge de façon à éviter d'enlever l'éthanol des pores ouverts par capillarité en vue de déterminer sa masse humide :  $m_{imbibée}$ .

La masse volumique du liquide d'immersion, l'éthanol ici, est de 0,79 g.cm<sup>3</sup>. La masse volumique de l'hydroxyapatite vaut 3,15 g.cm<sup>3</sup>, donnée de la littérature [204]. Dans notre cas, la porosité ouverte ( $P_o$ ) est calculée à l'aide de l'Équation 7, le calcul de la masse volumique apparente ( $\rho_{app}$ ) à l'aide de l'Équation 8, le taux de densification apparent ( $\tau_{app}$ ) à l'aide de l'Équation 9 et le calcul du taux de porosité totale ( $P_\tau$ ) est donné par l'Équation 10.

$$P_o = \left( \frac{m_{imbibée} - m_{sèche}}{m_{imbibée} - m_{immergée}} \right) \times 100$$

Équation 7 : Calcul du taux de porosité ouverte des architectures frittées par la technique de la poussée d'Archimède

$$\rho_{app} = \left( \frac{m_{sèche}}{m_{imbibée} - m_{immergée}} \right) \times \rho_L$$

Équation 8 : Calcul de la masse volumique apparente des architectures frittées par la technique de la poussée d'Archimède

$$\tau_{app} = \frac{\rho_{app}}{\rho_{HA \text{ théorique}}}$$

Équation 9 : Calcul du taux de densification apparent des architectures frittées par la technique de poussée d'Archimède

$$P_{\tau} = 100 \times (1 - \tau_{app})$$

Équation 10 : Calcul du taux de porosité totale des architectures frittées par la technique de la poussée d'Archimède

Pour un cycle de frittage à 1 220°C pendant 2h, le taux de densification atteint 69 % tandis qu'un taux de densification de 91 % est obtenu pour l'architecture frittée à 1 270°C pendant 2h. Le taux de porosité ouverte passe de 26% pour la plus basse température de frittage à 2% pour la température la plus élevée. Ainsi une augmentation de la température de 50 °C a permis l'obtention d'architectures quasi-denses.

Ces résultats sont confortés par les observations réalisées au microscope électronique à balayage environnemental (FEI Quanta 450 FEG) présentées en Figure 53 et Annexe 3. La réalisation de micrographies à l'aide de ce microscope électronique à balayage ne nécessite aucune préparation des échantillons. Sur la micrographie A de la Figure 53, la présence de nombreux pores ouverts accompagnés de la présence de joints de grains atteste d'une densification partielle de l'échantillon à 1 220°C. À l'inverse la micrographie B) de la Figure 53, témoigne de l'absence de porosité ouverte et de la présence d'une coalescence granulaire. Ainsi une augmentation de la température de frittage de 50°C a permis d'obtenir une architecture plus dense, exempte de porosité ouverte, tout en contrôlant la croissance granulaire qui reste modérée.

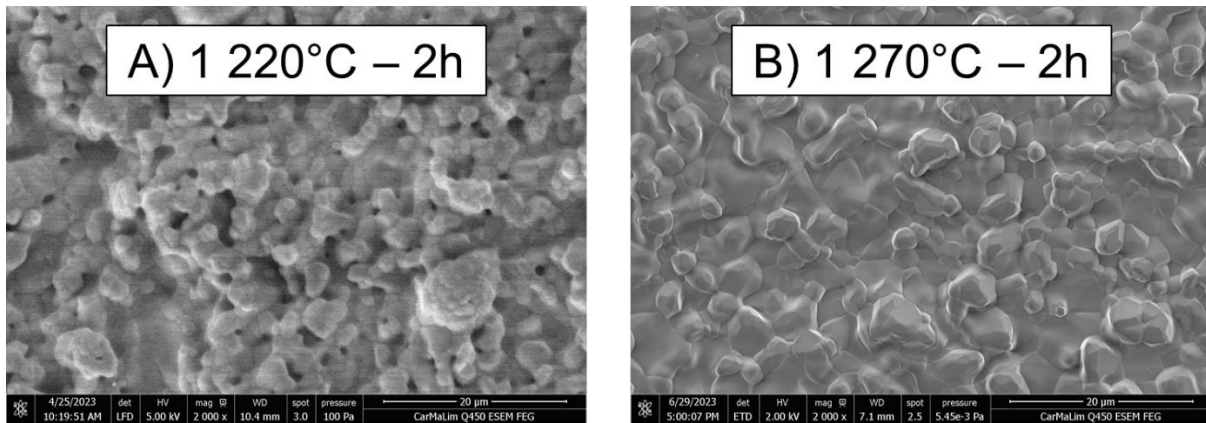


Figure 53 : Micrographies d'architectures (E70-P100-N1) frittées pendant 2h à 1 220°C A et 1 270°C B.

Une température de frittage égale à 1 270°C a donc été sélectionnée. Afin de valider le temps de palier du frittage utilisé, une analyse dilatométrique a été réalisée sur une pastille réalisée dans les mêmes conditions que les architectures (même suspension céramique, même procédé de mise en forme et mêmes paramètres laser) dont le protocole est présenté en Annexe 2.2. La Figure 54 présente le retrait linéaire en fonction du temps de palier à 1 270°C. Afin de déterminer le temps de palier minimal nécessaire à la densification et ainsi limiter le grossissement des grains, un palier de 4h a été évalué sur une pastille réalisée par stéréolithographie avec la suspension céramique utilisée tout au long de cette étude. Au terme des 4h de temps de palier, le retrait linéaire est de 17,1% tandis qu'il est de 16,7% au bout de 2h de palier. Un palier de 2h est donc suffisant pour densifier l'échantillon sans induire de grossissement granulaire.

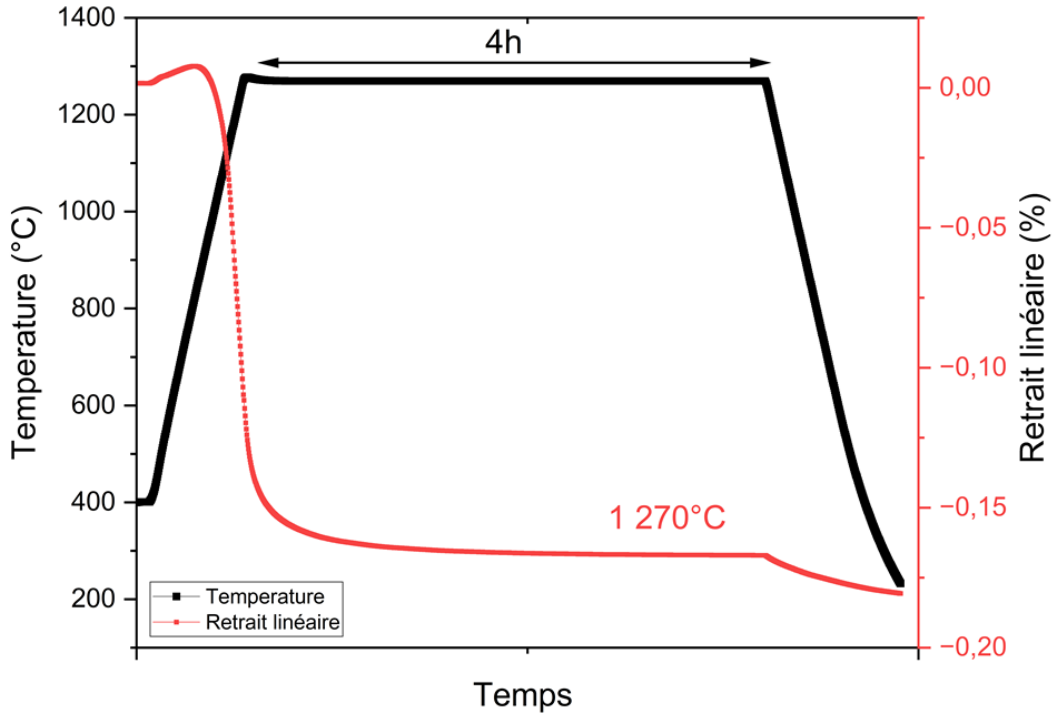


Figure 54 : Courbes de température et de retrait linéaire, en fonction du cycle thermique (montée à 1270°C et en palier à 1 270°C)

Afin de vérifier la pureté de l'échantillon fritté à 1 270°C pendant 2h, des analyses par diffraction des rayons X ont été réalisées (Figure 55 et protocole en Annexe 4). Le diffractogramme A de la Figure 55 met en évidence la présence d'une phase secondaire identifiée par le pic à 37°. Ce pic est caractéristique de l'oxyde de calcium CaO, composé indésirable, nocif pour les cellules. L'HA présente dans la suspension commerciale commandée auprès du fournisseur par l'entreprise 3D Ceram® n'est donc pas pure. Une étape de nettoyage à l'eau sous ultrason pendant 45 min des architectures après frittage est donc envisagée. Une analyse DRX a été menée sur la pièce après frittage puis nettoyage (diffractogramme B de la Figure 55) afin de valider ce processus de nettoyage. Sur ce diffractogramme il n'est présent qu'une seule phase correspondant à l'hydroxyapatite. Après nettoyage l'architecture exempte de chaux peut donc faire l'objet d'une évaluation biologique *in vitro*.

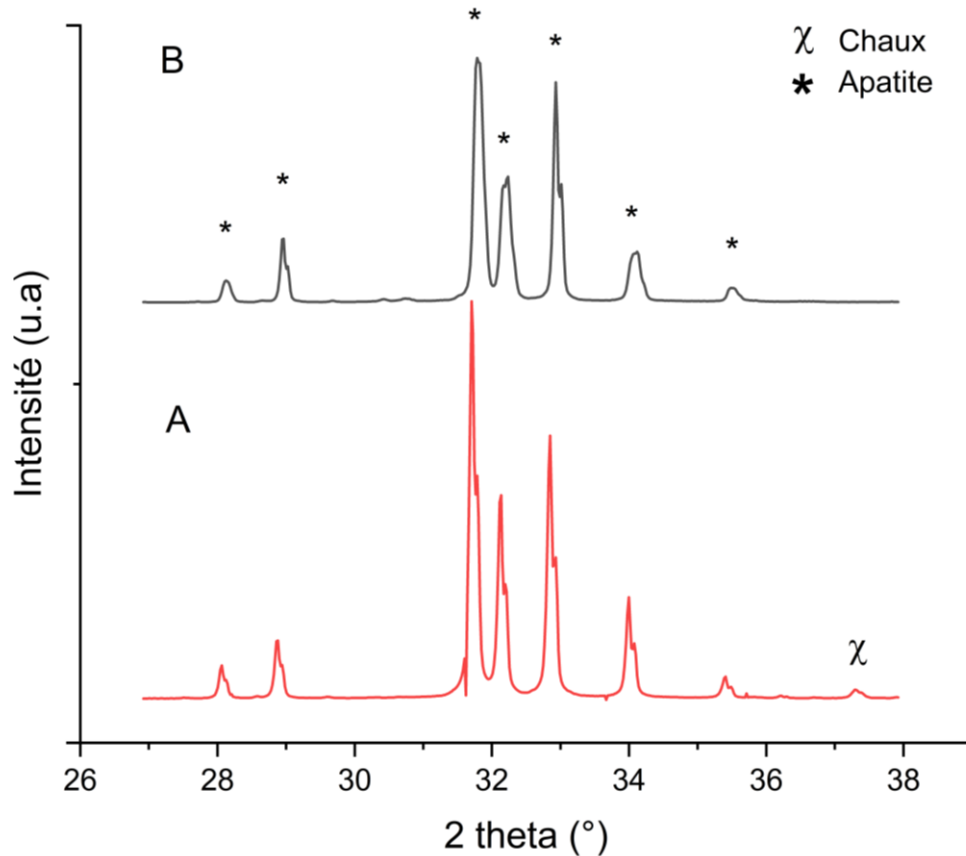


Figure 55 : Diffractogrammes des échantillons frittés à 1270°C pendant 2h sans lavage de l'architecture aux ultrasons (A) et après lavage des architectures aux ultrasons pendant 45 min (B)

### II.3.1.3. Étude dimensionnelle après frittage

La mise en forme d'une céramique d'architecture bio-inspirée, implique d'obtenir des dimensions similaires au modèle osseux. Le retrait en volume lié à la densification au cours du frittage doit donc être anticipé. C'est pourquoi les dimensions du fichier STL reproduisant l'architecture osseuse ont été augmentées pour la mise en forme de la pièce crue. En effet, l'étude dilatométrique réalisée sur une pastille élaborée dans les mêmes conditions que l'architecture E70- P100- N1 indique un retrait linéaire de 17 % inhérent à l'étape de frittage. Un agrandissement du fichier .STL (modèle fils de départ) est donc nécessaire afin de prendre en compte ce retrait. Plusieurs agrandissements à hauteur de  $\times 1,2$  /  $\times 1,6$  /  $\times 2$  correspondant à des coefficients de grossissement appliqués pour la mise en forme ont ainsi été étudiés. Les pièces obtenues ont subi un traitement thermique à 1 270°C pendant 2h.

L'étude dimensionnelle menée sur les pièces frittées a mis en évidence qu'une architecture de même dimension que le modèle osseux est obtenue en appliquant un coefficient de grossissement de  $\times 1,2$ . Cependant, cette architecture restait bien trop fragile

lors de sa manipulation pour être conservée comme modèle pour une évaluation biologique. Tandis que l'architecture frittée avec un grossissement de x1,6 vis-à-vis du modèle fils a permis l'obtention d'une architecture grossie x 1,3 qui était elle, manipulable Figure 56. C'est donc un grossissement du modèle STL x1,6 engendrant un grossissement de x1,3 de la pièce qui a été privilégié pour la réalisation du plan d'expérience et pour l'étude *in vitro*. Le Tableau 7 présente les différentes mesures dimensionnelles de l'architecture E70- P100- N1 frittée et crue réalisée par analyse d'image sur le logiciel ImageJ®.

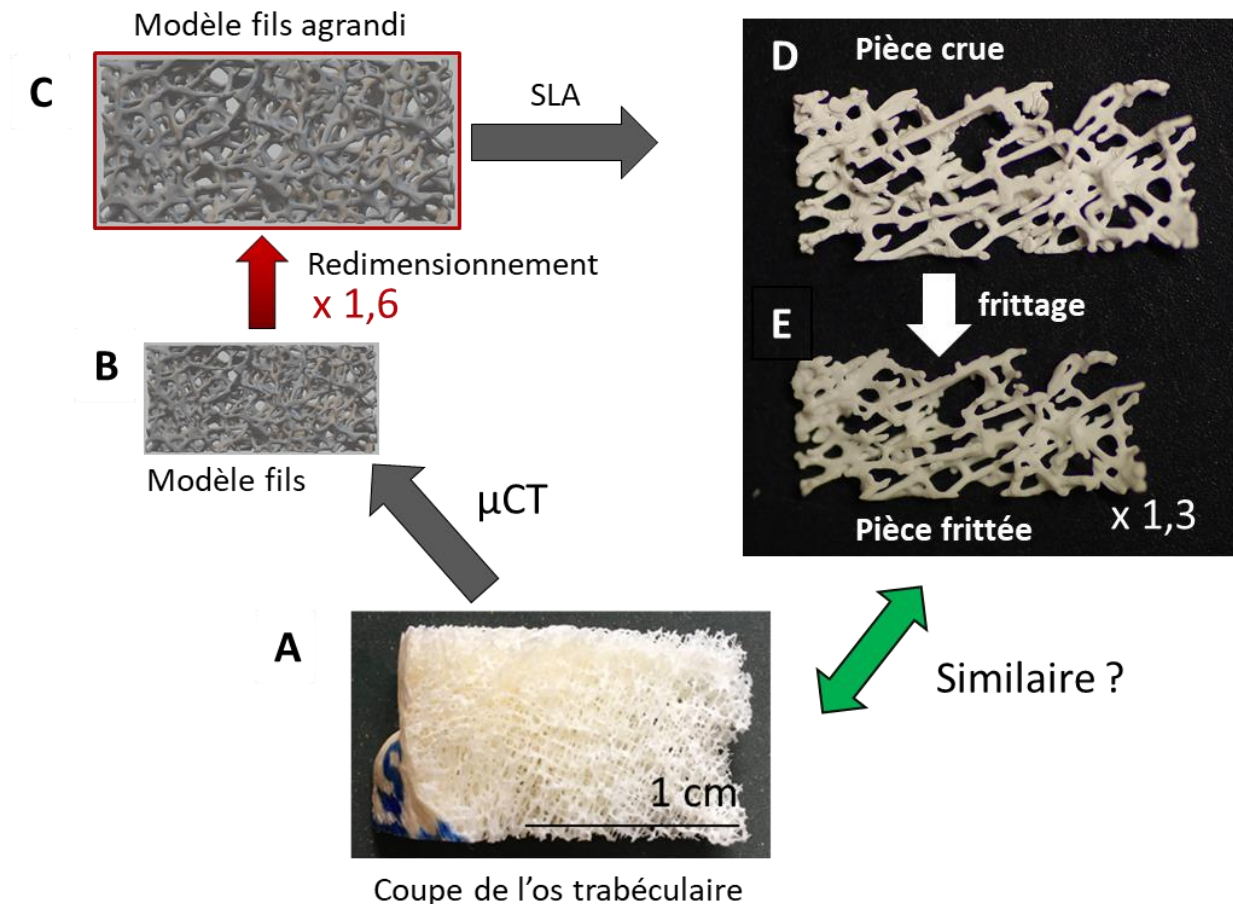


Figure 56 : Représentations dimensionnelles des architectures aux différentes étapes de fabrication, A) la coupe de l'os trabéculaire B) le modèle fils, C) le modèle STL agrandi 1,6 fois, D) la pièce crue agrandie 1,6 fois et E) la pièce frittée agrandie 1,3 fois par rapport à l'os trabéculaire imagé.



	Largeur (mm)	Longueur (mm)	Épaisseur (mm)
Pièce crue	7,5	17,7	1,5
Pièce frittée	6,4	15,1	1,1

Tableau 7 : Valeurs de la largeur, la longueur et l'épaisseur des architectures E70-P100-N1 crues et frittées obtenues par analyse d'images à l'aide du logiciel ImageJ ®.

Afin de compléter cette étude dimensionnelle, le Tableau 8 reprend les valeurs de superficie totale, de volume et des dimensions des trabécules obtenues pour l'architecture E70-P100-N1, crue, frittée avec le modèle fils correspondant. Cette analyse a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ ® et l'utilisation du plugin BoneJ et des données acquises par  $\mu$ tomographie RX.

Échantillons	Pièce crue	Pièce frittée	Modèle fils
Superficie totale (mm <sup>2</sup> )	291	233,1	238,1
Volume (mm <sup>3</sup> )	30,6	21,5	13,1
Épaisseur moyenne des trabécules ( $\mu$ m)	396,1	361,7	Non disponible
Épaisseur minimum des trabécules ( $\mu$ m)	80,7	78,9	Non disponible
Épaisseur max des trabécules ( $\mu$ m)	636,4	578,8	Non disponible

Tableau 8 : Étude dimensionnelle de l'architecture E70-P100-N1 crue, frittée avec le modèle fils. Évaluation par  $\mu$ -tomographie RX à l'aide de l'utilisation du plugin BoneJ.

Les résultats montrent que le frittage engendre un retrait volumique de la pièce crue de l'ordre de 22%. La valeur de la superficie totale de la pièce frittée ainsi obtenue est bien en accord avec celle du modèle fils à reproduire, de l'ordre de 235 mm<sup>2</sup>. Cependant, le volume de la pièce frittée (24,2 mm<sup>3</sup>) est de l'ordre du double du volume du modèle fils, le volume cible pour cette architecture (13,1 mm<sup>3</sup>). Cette différence de résultats s'explique certainement par la différence de macroporosité qui réside entre le modèle fils et la pièce frittée. Plus la macroporosité est grande et plus la surface totale est importante. Cette explication permet d'expliquer la différence de volume entre le modèle fils et la pièce frittée dû au phénomène de surpolymérisation.

Concernant l'impact du frittage sur la taille des trabécules imprimées, les valeurs d'épaisseur minimales, moyennes et maximales des trabécules n'évoluent pas de la même façon. Les trabécules les plus fines restent de taille équivalente entre la pièce crue (80,7  $\mu\text{m}$ ) et la pièce frittée (78,9  $\mu\text{m}$ ) tandis qu'une diminution de l'épaisseur moyenne des trabécules de l'ordre de 8% et une diminution de l'épaisseur maximale des trabécules de l'ordre de 10% (passant de 636,4  $\mu\text{m}$  pour la pièce crue à 578,8  $\mu\text{m}$  pour la pièce frittée) sont, quant à elles, constatées.

L'analyse de ce tableau met donc en évidence une forte diminution des grosses trabécules plutôt que des petites trabécules. Ce phénomène est également visible sur la Figure 57. En effet, la représentation par gradient de couleur montre un plus grand décalage de couleur (passage de la couleur orange à violet) au niveau des nœuds de connexions plutôt que sur les trabécules (passage de la couleur rose à violet). Le retrait est donc plus important au niveau des connectivités et pour les trabécules plus épaisses améliorant ainsi la résolution de cette architecture.

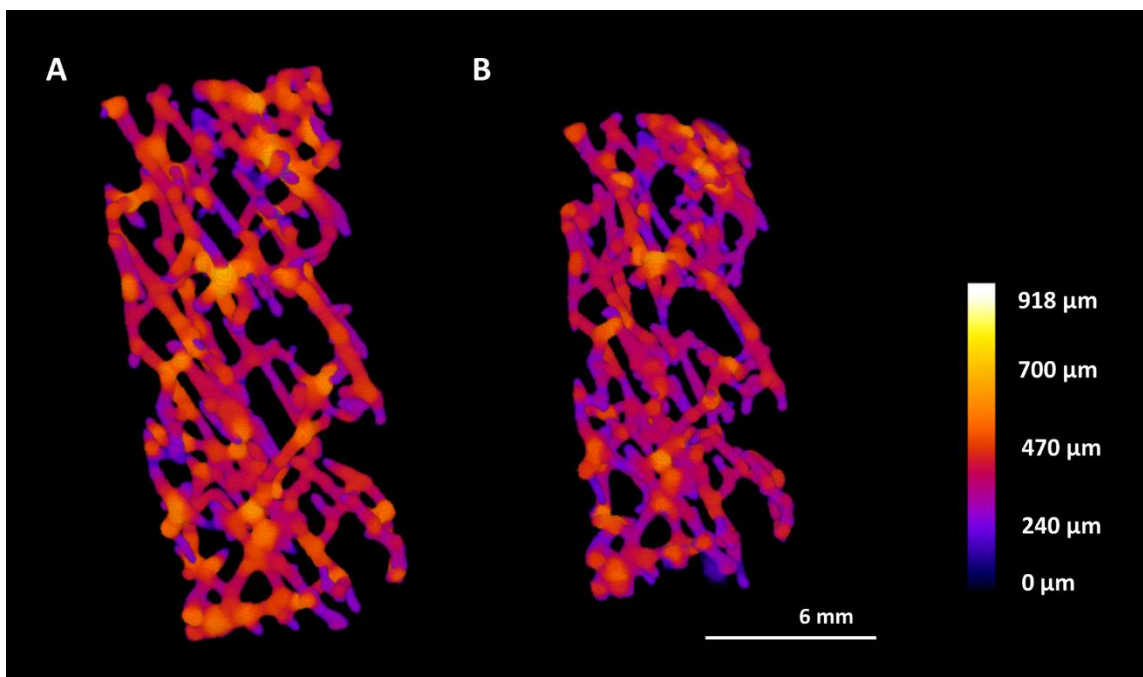


Figure 57 : Représentation 3D des architectures (A, crue et B, frittée) avec un gradient de couleur fonction de l'épaisseur des trabécules, dont la valeur maximum (918  $\mu\text{m}$ ) correspondant à la trabécule la plus importante observée pour l'architecture E70-P500-N2

## II.4. Réalisation d'architecture osseuse volumineuse (> 1 cm<sup>3</sup>)

Les données recueillies et analysées, associées à l'expérience acquise lors de la mise en forme par stéréolithographie, ont permis l'élaboration d'architecture volumineuse (> 1 cm<sup>3</sup>). Les dimensions de l'architecture sont alors 1,4 cm de hauteur, soit l'équivalent de 140 couches de 100 µm, avec une base carrée de côté 1,1 cm. L'impression d'architectures de si grand volume était un challenge à la fois d'un point de vue de la faisabilité, mais également de la reproductibilité puisque plusieurs architectures similaires ont été produites afin de confirmer cette faisabilité.

La première difficulté a été la mise en place d'un protocole permettant la réalisation de telles architectures. En effet, il a dans un premier temps dû être nécessaire de découper le fichier STL en 10 parties, les performances de l'ordinateur n'étant pas suffisantes pour trancher et afficher un volume si grand avec une si grande résolution. Découper le fichier STL en 10 parties a permis de réduire la taille du fichier facilitant le tranchage réalisé par l'ordinateur.

La seconde difficulté a été d'ajuster les paramètres machine au mieux pour mettre en forme cette architecture en tenant en compte du changement d'échelle. Les architectures réalisées avec une puissance laser de 100 µm, une épaisseur de couche de 70 µm et un seul passage laser (E70-P100-N1) ayant permis la réalisation de l'architecture la plus résolue (à petite échelle), c'est donc cette combinaison de paramètres qui fut utilisée pour ce premier essai d'impression à grande échelle. Cependant, ces paramètres n'ont pas permis l'élaboration de cette architecture dans toute sa hauteur. En effet, lors de la fabrication, sous les contraintes exercées entre la suspension céramique et le racleur, la pièce s'est délitée progressivement laissant une multitude de parties polymérisées de la pièce non rattachées à l'architecture. Un grand nombre de morceaux de suspension polymérisée est remonté à la surface du plateau de fabrication empêchant la réalisation de couches successives lisses de suspension céramique. La réalisation d'une architecture de 1,4 cm de hauteur soit l'équivalent de 200 couches d'une épaisseur de couche de 70 µm dans son entièreté n'a donc pas été possible. L'architecture est plus fragile du fait de la hauteur élevée de l'édifice (entraînant des couples de torsion) et également de la multiplication du nombre de passage du racleur sur le plateau de fabrication (exaltant ces torsions).

C'est pourquoi il a fallu trouver de nouveaux paramètres permettant la mise en forme de cette architecture. Une augmentation de l'épaisseur de couches afin de réduire le nombre de passage du racleur sur le plateau de fabrication, permettant également de diminuer le temps de fabrication, peut être envisagée. Il est difficile d'estimer le temps nécessaire à l'élaboration de cette pièce, du fait des différents chargements des fichiers STL et du nombre

de couches réduit (passage de 200 couches d'une épaisseur de 70  $\mu\text{m}$  à 140 couches d'une épaisseur de 100  $\mu\text{m}$ ), mais ce gain de temps demeure non négligeable. Une augmentation de la puissance laser et du nombre de passage laser permettrait, quant à elle, d'améliorer l'accroche entre les différentes couches. Cependant, il demeure nécessaire d'arriver à un compromis afin d'élaborer une architecture trabéculaire bio-inspirée proche du modèle de départ (épaisseur de couches, connectivité, volume...).

De plus, il est à noter que, lors de l'élaboration d'une pièce par stéréolithographie, l'opacité de la suspension céramique rend impossible le suivi de la progression de la construction de l'architecture. La suspension céramique onéreuse doit également être utilisée avec précaution. Or, pour une architecture de ces dimensions, un grand volume de suspension est perdu, car inutilisable pour une prochaine architecture du fait de la grande proportion de morceaux polymérisés répartis dans la suspension céramique sur le plateau de fabrication. Ainsi l'absence de suivi de l'état de la pièce à chaque stade d'impression et de maîtrise de la tenue et de la forme de la pièce, limite le nombre d'essais possible pour la mise en forme de cette architecture. Le choix s'est alors porté sur les paramètres E100-P300-N2, soit, une puissance laser de 300 mW, un nombre de passage laser de 2 et une épaisseur de couche de 100  $\mu\text{m}$ . Cette combinaison de paramètres a permis la réalisation d'une architecture entière (Figure 59 A). Cependant, après nettoyage, un décalage des couches sur la hauteur de la pièce a été observé. En fin d'impression, la dernière couche était bien située à la position voulue. Le décalage a donc eu lieu dès l'impression des premières couches qui n'ont vraisemblablement pas adhéré au support, entraînant un décalage progressif des couches successives à chaque passage du racleur.

Plusieurs solutions ont été envisagées pour contrer l'impact des forces exercées par le racleur sur le déplacement de l'architecture. Afin de renforcer la tenue de la première couche sur le support, cette couche a été polymérisée 4 fois. Le reste de l'impression s'est déroulé dans les mêmes conditions que lors de la première impression. Cependant, cette solution n'a malheureusement pas permis l'obtention d'une architecture sans décalage progressif.

Une autre approche envisagée fut de modifier l'emplacement de l'architecture sur le plateau de fabrication. La pièce était initialement imprimée au milieu du plateau de fabrication (un carré de 5 cm de côté). Afin de réduire au maximum l'effet des forces appliquées par le racleur et le mouvement de la pâte, la zone idéale d'impression doit se situer au plus proche de la paroi dans le sens de raclage du racleur (Figure 58).

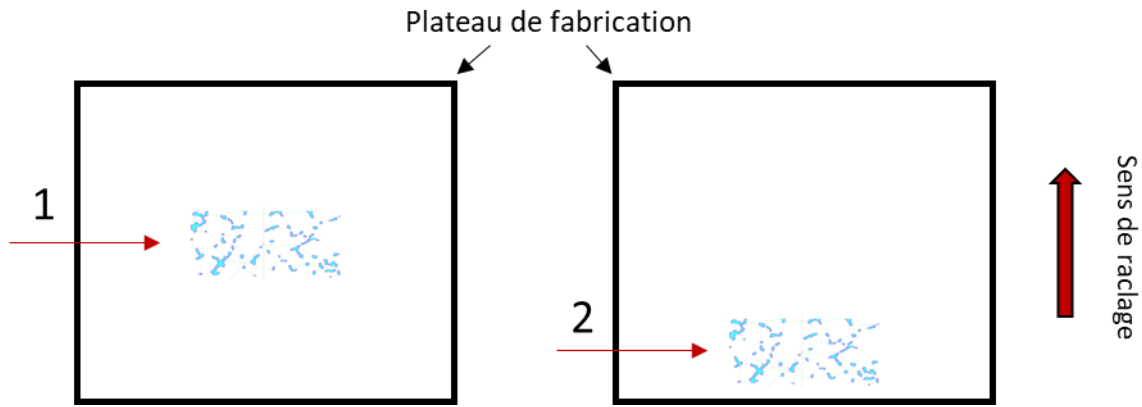


Figure 58 : Représentation schématique de la position de l'architecture sur le plateau de fabrication. La flèche 1 correspond à une position au centre du plateau, la flèche 2 correspond à la position la plus proche de la paroi.

La pièce obtenue (Figure 59 B.) présente alors un décalage modéré suggérant une atténuation des forces exercées par le racleur. Néanmoins, le décalage des premières couches s'est fait relativement tôt attestant d'une accroche au support du plateau encore insuffisante.

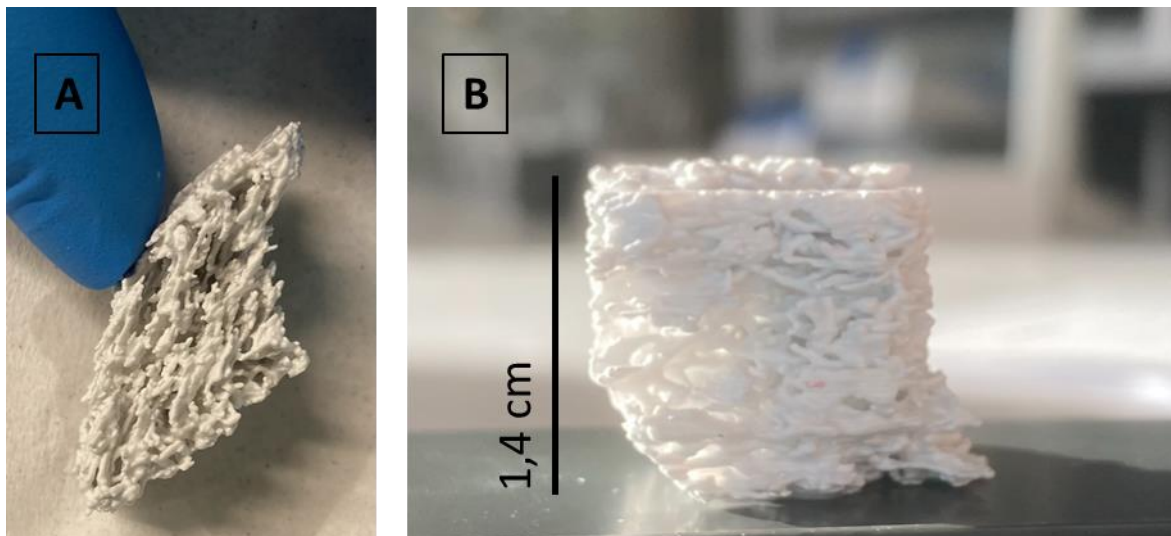


Figure 59 : Architectures réalisées avec des paramètres aboutissant à un décalage de la structure sur les premières couches de la fabrication

Afin de rectifier ce décalage, l'impression d'un support préalablement au reste de l'architecture a été envisagée afin d'éviter le glissement des premières couches (flèches de la Figure 60). Un support de base carrée de 2 cm de côté avec une hauteur de 1,6 mm réalisée à une puissance laser de 400 mW avec un double passage laser et une épaisseur de couche de 100  $\mu\text{m}$  a ainsi été réalisé. La création de ce support a permis d'obtenir une architecture

sans décalage (Figure 60). Sur ces photographies, il est possible d'observer une architecture crue (à gauche) et une architecture frittée (à droite). Le programme de frittage utilisé est le même que celui utilisé pour les architectures E70-P100-N1 à savoir : un déliantage à 400°C puis un frittage à 1270 °C pendant 2h. Cependant, une marge d'optimisation des paramètres d'impression sur ces pièces existe, car la mise en place d'une procédure modifiée par la présence d'un support et un positionnement ajusté de l'architecture sur le plateau, afin de compenser les forces exercées par le racleur, devraient permettre de diminuer les valeurs de puissance laser voire diminuer le nombre de passage laser à 1 seul, ce qui, selon l'étude sur les architectures précédentes de petit volume devrait permettre l'obtention de pièces se rapprochant davantage de la structure osseuse modèle.

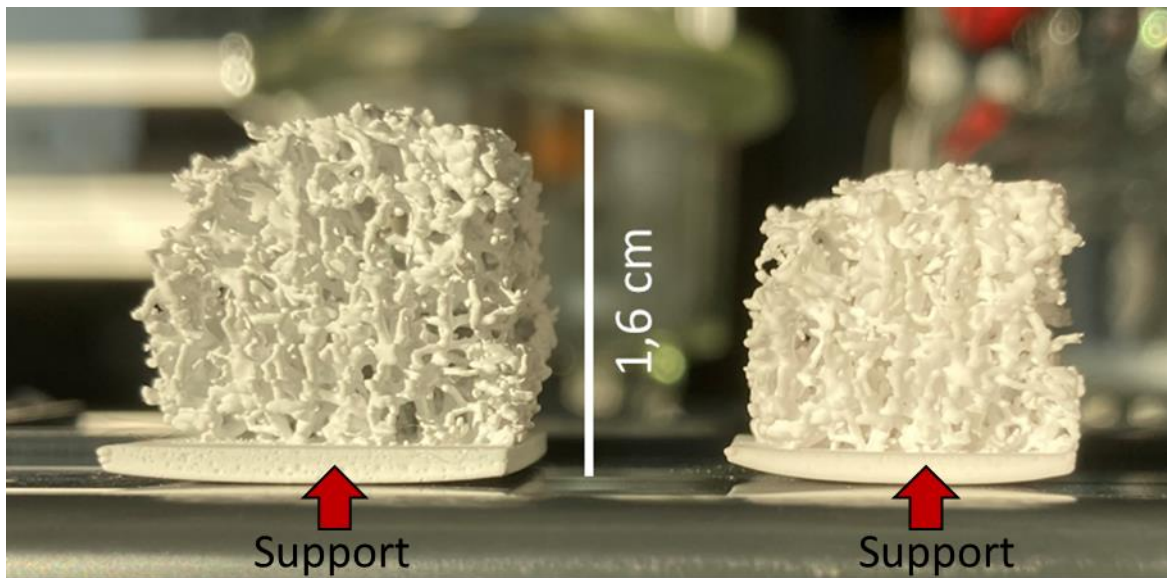


Figure 60 : Architectures volumineuses crues (à gauche) et frittées (à droite) avec des flèches représentant le support.

## II.5. Conclusion du chapitre 2

La maîtrise de la mise en forme d'architectures trabéculaires bio-inspirées nécessite une large gamme de caractérisations. C'est pourquoi au cours de ce chapitre des caractérisations en 2D puis en 3D ont été effectuées afin de vérifier la bonne reproductibilité d'un modèle osseux.

Tout d'abord, cette étude 2D a permis la détermination de réponses adaptées (surface polymérisée et nombre d'aires) pour la réalisation d'un plan d'expériences sur 30 architectures distinctes permettant leurs caractérisations. Ces réponses ont permis d'identifier les phénomènes interagissant de manière négative sur la résolution des architectures : la surpolymérisation et les forces exercées par le racleur. L'ensemble de ces résultats a également permis la réalisation d'un modèle prédictif validant ainsi les données obtenues lors du plan d'expériences.

En complément de cette étude 2D, une étude 3D a été réalisée grâce à la caractérisation des architectures, mises en forme par SLA, par  $\mu$ -tomographie RX. Ces volumes 3D ont permis d'obtenir des données caractéristiques relatives à l'os trabéculaire, telles que des mesures : d'épaisseur de trabécules, de degré d'anisotropie, de connectivité ainsi que des volumes et des surfaces totales.

Cette double étude présente des résultats concomitants. En effet, les conclusions de ces deux études montrent toutes deux l'impact négatif d'une augmentation des paramètres laser sur la résolution des architectures. La complémentarité de ces études est primordiale dans la compréhension des paramètres étudiés et de leurs impacts, négatifs ou positifs, sur la résolution et donc la mise en forme de ces architectures trabéculaires bio-inspirées.

Lorsque la pièce crue fut entièrement caractérisée, une étude du frittage sur ces architectures a été réalisée. Ainsi des pièces denses ont été obtenues par une étape de déliantage et un frittage à 1 270°C pendant 2h.

Pour conclure sur cette étude de mise en forme de céramique phosphocalcique bio-inspirée de l'os trabéculaire humain, une architecture d'un volume plus important ( $>1 \text{ cm}^3$ ) a été élaborée puis frittée.

## Chapitre III. Évaluation biologique

---

Afin d'évaluer l'influence de la macrostructure bio-inspirée de l'os sur la réponse cellulaire, des cellules primaires ont été cultivées sur les architectures mises au point par stéréolithographie. Différents critères tels que la biocompatibilité, la prolifération, la morphologie ou encore la différenciation des cellules ont ainsi été évalués afin de mettre en évidence l'impact ou non d'une architecture trabéculaire sur le comportement cellulaire.

L'évaluation biologique d'un implant nécessite de réaliser un protocole strict en fonction des différents objectifs définis en amont. C'est dans ce contexte que ce chapitre comporte une première partie bibliographique focalisée sur les cellules osseuses avec une attention particulière portée sur le type cellulaire utilisée au cours de ce travail de thèse. La seconde partie détaille les différents protocoles utilisés au cours de cette évaluation biologique. La troisième partie de ce chapitre est, quant à elle, consacrée aux résultats expérimentaux obtenus lors de cette étude *in vitro* et à leurs analyses.

### III.1. Approche bibliographique

#### III.1.1. Le remodelage osseux

Différentes cellules présentes au sein du tissu osseux assurent le remodelage osseux. Le remodelage osseux est une succession d'étapes permettant d'assurer le renouvellement de la matrice osseuse. L'os ancien sera ainsi remplacé par une nouvelle matrice minérale afin de maintenir les caractéristiques mécaniques de l'os. L'ensemble des os est concerné par ce phénomène cependant il est plus fréquent au niveau de l'os trabéculaire. Ce phénomène physiologique fait intervenir trois types cellulaires sur un cycle de quatre étapes : l'activation ; la résorption ; l'inversion et la minéralisation (Figure 61).

L'étape d'activation du remodelage osseux est déclenchée par les ostéocytes de la matrice osseuse. C'est également lors de cette étape que les ostéoclastes vont adhérer à la matrice.

Ensuite, la phase de résorption correspondant à la détérioration de la matrice minérale de l'os vieux par les ostéoclastes du lignage hématopoïétique et plus précisément du précurseur commun avec les monocytes/macrophages va avoir lieu. Ces cellules vont proliférer puis se différencier à la surface de la matrice osseuse à résorber.



Cette phase de résorption va être aussitôt suivie de la phase d'inversion. En effet, lors de la résorption de la matrice osseuse. Les facteurs de croissance piégés dans la matrice extracellulaire osseuse sont ainsi libérés et vont agir sur la prolifération et la différenciation des cellules ostéogéniques, attirant notamment les cellules pré-ostéoblastiques. Les ostéoblastes vont alors remplacer les ostéoclastes c'est « l'inversion ». La phase de résorption est donc nécessaire pour engendrer cette formation osseuse.

Enfin, la minéralisation va être menée par les ostéoblastes. La sécrétion de la matrice extra-cellulaire osseuse composée de collagène et de certaines protéines non collagéniques est assuré par les ostéoblastes.

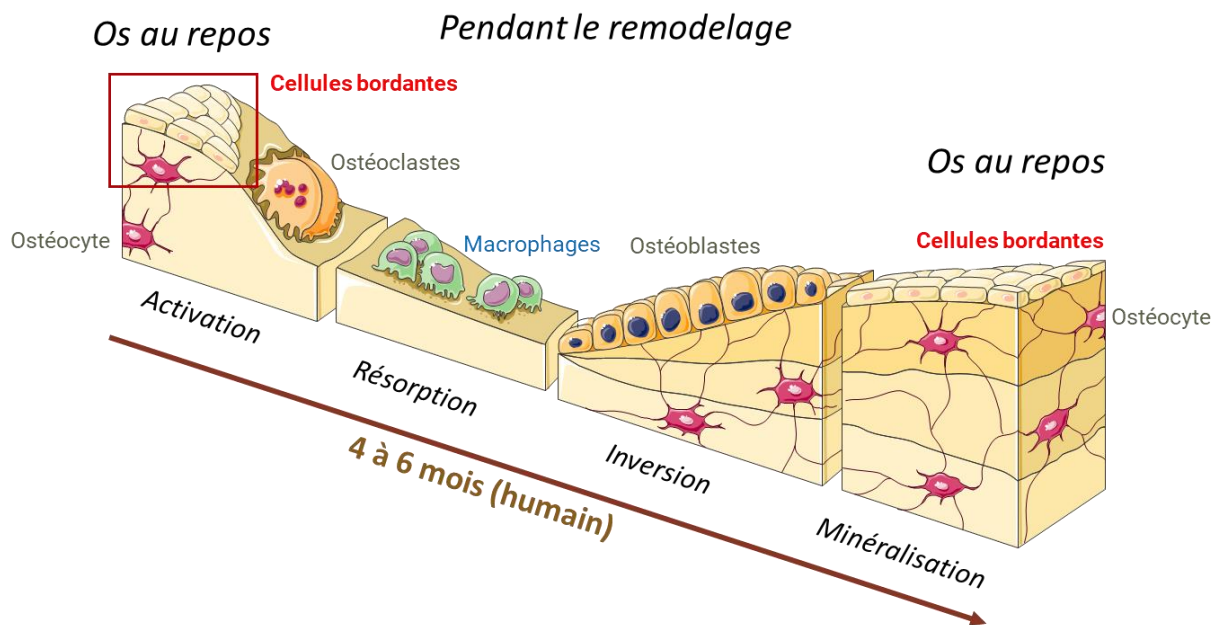


Figure 61 : Schéma représentatif des 4 étapes du remodelage osseux : Activation ; Résorption ; Inversion ; Minéralisation [205] (+ cours d'Amandine Magnaudeix).

Le tissu osseux héberge donc plusieurs types de cellules avec des caractéristiques et des fonctions différentes. Le choix de la lignée cellulaire lors de l'évaluation biologique est donc important en vue des objectifs présentés dans l'introduction de ce chapitre. Les cellules de l'os sont regroupées en niches cellulaires, c'est-à-dire un micro-environnement spécifique situé dans le tissu osseux. Au sein de ce tissu se retrouvent des cellules souches, cellules ayant la capacité de proliférer et de se différencier (Figure 62). Il existe au sein de ce tissu, trois niches distinctes [206]:

- La niche stromale, avec la présence des cellules souches/stromales mésenchymateuses. Ces cellules sont à l'origine des cellules de la lignée des ostéoblastes.

- La niche vasculaire, caractérisée par la présence de cellules progénitrices, cellules plus différenciées que les cellules stromales mésenchymateuses.

La niche hématopoïétique avec la présence de cellules précurseurs des cellules sanguines et des cellules immunitaires.

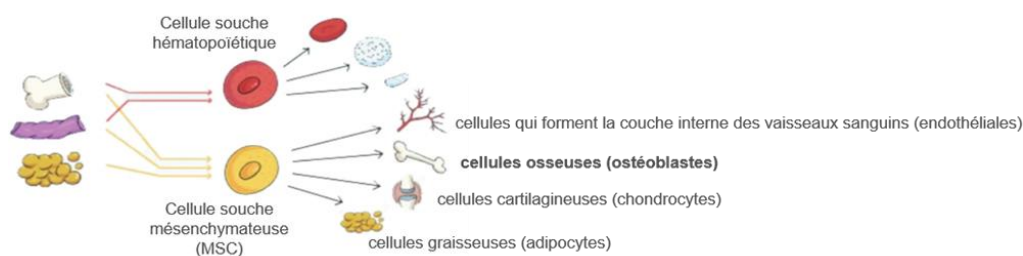


Figure 62 : Différentes niches cellulaires présentes dans le tissu osseux (schémas adaptés [207])

Ce travail de thèse ayant pour objectif d'étudier la différenciation des cellules osseuses, une plus large description de la niche stromale sera réalisée.

### III.1.2. Le lignage ostéoblastique

Les ostéoblastes, les cellules bordantes et les ostéocytes sont les trois types cellulaires que comprend la lignée ostéoblastique.

#### III.1.2.1. Les ostéoblastes

La formation osseuse est engendrée par les ostéoblastes et s'effectue en trois étapes :

- Le recrutement des cellules ostéoprogénitrices
- Sécrétion de la matrice extracellulaire osseuse
- La minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse

Les ostéoblastes dérivent de la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses (MSCs), avec une différenciation s'effectuant en plusieurs étapes (Figure 63). Dans un premier temps, la cellule stromale mésenchymateuse n'est pas différenciée. Ces cellules sont attirées, sur la matrice osseuse, par les différents facteurs de croissance libérés par les ostéoclastes (dans le cas du remodelage osseux). Le gène *Runx2* commence alors à être exprimé au sein des MSCs permettant la génération du facteur de transcription le plus en amont de la différenciation osseuse de ces cellules. Le facteur de transcription *Runx2* entraîne l'expression de tous les autres gènes de la différenciation ostéoblastique par l'expression de

ce facteur de transcription, répertorié dans le Tableau 9 [208]. La cellule stromale mésenchymateuse devient alors un pré-ostéoblaste. Puis au contact de cette matrice osseuse, les pré-ostéoblastes vont pouvoir commencer à exprimer également certains gènes de la différenciation ostéoblastique à savoir : le collagène 1 (Col.IA1) et la phosphatase alcaline (ALPL), qui participe à la minéralisation de la matrice osseuse, exprimée en moindre proportion à ce stade (Tableau 9).

Le passage d'une cellule du stade de pré-ostéoblaste au stade d'ostéoblaste est marqué par une expression plus forte du gène SP7, permettant l'expression du facteur de transcription le plus important de la différenciation. Ce facteur de transcription permet l'expression de l'ostéopontine et l'ostéocalcine responsable du contrôle de la génération de la matrice osseuse (Figure 63). Ainsi, au stade d'ostéoblaste, des protéines entraînant la minéralisation de la matrice osseuse sont exprimées (ALP) tout comme des protéines responsables de l'inhibition de la matrice osseuse remplissant le rôle de régulateur de cette matrice (ostéopontine et ostéocalcine).

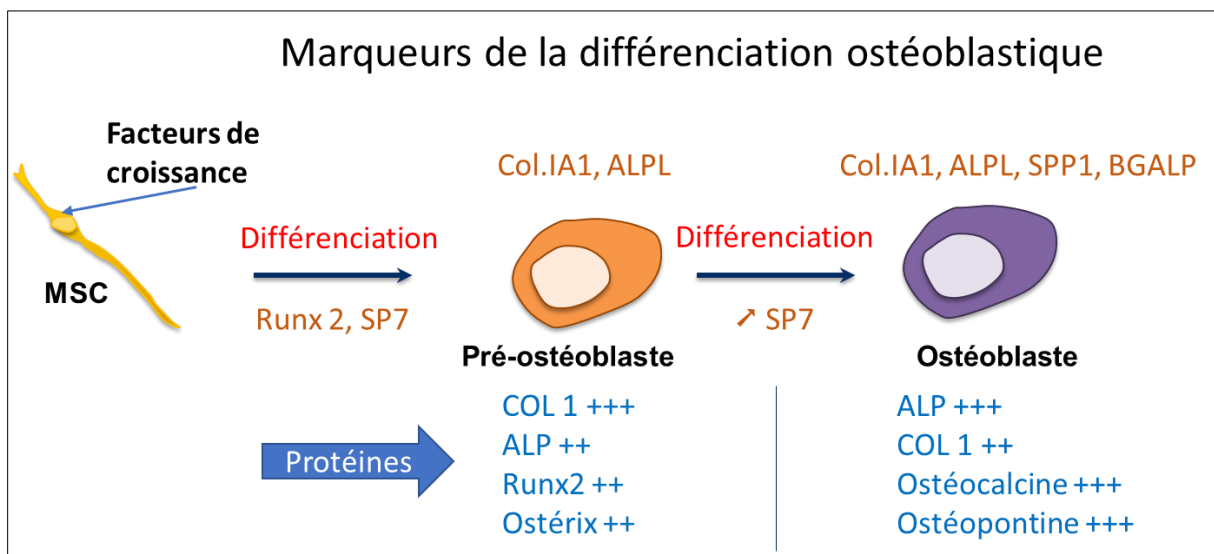


Figure 63 : Différenciation des cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) en ostéoblastes avec un stade intermédiaire, les pré-ostéoblastes. Les gènes exprimés par les cellules (de couleur orange) en fonction de leurs différents stades sont également détaillés ainsi que les protéines exprimées (en couleur bleue). Les signes « + » caractérisent la proportion de cette protéine exprimée. L'ensemble des acronymes présentés dans ce schéma sont repris dans le Tableau 9 [209].

Gènes	Protéines associées au gène	Rôle
RUNX2	RUNX2 (Facteur de transcription 2 de type Runt)	La protéine Runx2 est le facteur de transcription le plus en amont de la différenciation osseuse
Col.1a1	COL 1 (Collagène de type 1)	Régulé par la protéine Runx2, le collagène est constitutif de la matrice osseuse
ALPL	ALP (Alcaline phosphatase)	Protéine permettant la production de phosphate favorisant la formation d'HA
SP7	Ostérix	SP7 code la protéine ostérix, facteur de transcription crucial pour la différenciation
BGLAP	Ostéocalcine	L'ostéocalcine, protéine non collagénique, permet la régulation de la matrice de par sa forte affinité avec le calcium
SPP1	Ostéopontine	L'ostéopontine, protéine non collagénique, contrôle la nucléation de l'HA

Tableau 9 : Tableau référençant les gènes et protéines marqueurs principaux de la différenciation ostéoblastique avec leurs rôles associés.

### III.1.2.2. Les cellules bordantes

Après la phase d'inversion et la sécrétion de la matrice osseuse par les ostéoblastes, certains de ces ostéoblastes survivants au processus vont se transformer en cellules bordantes. Ces cellules de forme allongée vont former une couche cellulaire recouvrant la matrice osseuse. Cette couche va protéger la matrice osseuse des ostéoclastes. Ainsi, lorsque ces cellules vont se rétracter, les ostéoclastes pourront accéder à la matrice osseuse pour la résorber. Ces événements sont contrôlés par différents facteurs hormonaux.

### III.1.2.3. Les ostéocytes

Les ostéocytes sont le stade ultime de la différenciation ostéoblastiques. Ces derniers sont issus de la dernière étape de différenciation des cellules stromales mésenchymateuses selon le lignage ostéoblastique. Emmurées dans la matrice osseuse (Figure 61), ces cellules sont dotées de fins prolongements cellulaires générant la création d'un réseau complexe permettant aux ostéocytes de communiquer entre eux [210]. C'est par ces prolongements que les ostéocytes communiquent les informations relatives aux contraintes mécaniques en réponses bio-chimiques relatives au phénomène du remodelage osseux. En effet, plusieurs hypothèses subsistent concernant les mécanismes permettant à ces cellules de détecter les différentes contraintes mécaniques [211] :

- La déformation de la matrice osseuse entrainerait une déformation de la cellule, information perçue comme un signal par l'ostéocyte [212].
- Lorsque l'os est sous contrainte, le fluide entourant les ostéocytes pourrait induire une contrainte relative à la pression hydrostatique. Cette contrainte pourrait être responsable de la détection de l'information mécanique par les ostéocytes [213].
- Lorsque les fibres de collagène, constitutives de la partie organique de l'os, subissent un stress mécanique, des effets piézoélectriques stimulés dans ces fibres vont être potentiellement détectés par les ostéocytes.

Les ostéocytes, en plus de synthétiser du collagène de type 1, vont impacter le métabolisme humain par l'une de ces hypothèses.

Les cellules stromales mésenchymateuses sont à l'origine de la majorité des cellules comprises dans la niche stromale. Les architectures réalisées dans le cadre de ce projet ont pour objectif d'étudier la différenciation de ces cellules sur une architecture bio-inspirée, les MSCs seront alors décrites dans la prochaine partie de manière approfondie.

### III.1.3. Les cellules stromales mésenchymateuses

Les MSCs sont définies comme des progéniteurs non hématopoïétiques. En effet, comme vu dans la partie précédente, ce sont des cellules capables de se différencier en cellules ostéoprogénitrices ce qui justifie leur utilisation dans de nombreux modèles expérimentaux. Ce sont des cellules stromales adultes qui peuvent être isolées à partir d'un grand nombre de tissus comme la moelle osseuse, le tissu adipeux, la peau, les reins, le cœur ou le foie. Elles présentent l'avantage d'adhérer facilement au plastique lors de culture

cellulaire, mais elles possèdent également un potentiel de prolifération élevé. Leur résistance aux conditions de congélation permet de générer facilement une banque cellulaire et donc de pouvoir amplifier facilement ces cellules *in vitro* afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour une évaluation biologique *in vitro* [214].

L'ensemble de ces avantages justifie aisément leur utilisation privilégiée dans les différentes stratégies d'évaluation *in vitro* de biomatériaux [215]. Il est également possible de pré-orienter les MSCs vers un lignage ostéoblastique.

Bien que dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse, les MSCs soient couramment utilisées dans les études *in vitro*, ces cellules peuvent également être utilisées lors d'études *in vivo*. En effet, des implants peuvent être colonisés par des MSCs afin de promouvoir la régénération osseuse notamment dans le cadre de défauts de taille critique au niveau des os longs.

Il existe cependant des limites à l'utilisation de ces cellules [216]–[218] :

- L'ensemble des lois éthiques relatives à l'usage de telles cellules en France doit être strictement respecté.
- L'utilisation de ces cellules humaines nécessite un prélèvement sur un patient. Ce prélèvement est réalisé lors d'une intervention chirurgicale. Des protocoles d'extraction de ces cellules sont ensuite nécessaires afin d'isoler les MSCs.
- L'âge, le sexe et la pathologie osseuse du donneur auront un impact sur les capacités prolifératives des MSCs issues de ce donneur. Ces différences entre les donneurs peuvent également apporter des biais ou une variabilité importante dans les résultats d'évaluation biologique réalisés avec des MSCs venant de plusieurs donneurs différents.
- La quantité de cellules disponibles varie d'un prélèvement à l'autre. Ces variations sont à prendre en considération lors de la mise en culture.
- Le temps d'expansion cellulaire nécessaire pour obtenir suffisamment de cellules pour mener une évaluation biologique nécessite 4 à 6 semaines d'amplification pour réaliser des expériences dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse.

Bien qu'il subsiste des contraintes à l'utilisation des MSCs comme type cellulaire pour les évaluations biologiques, ces dernières sont les plus adaptées pour répondre aux objectifs fixés dans le cadre de ce travail de thèse.

## III.2. Approche biologique : matériels et méthodes

Afin d'évaluer l'influence d'une architecture bio-inspirée sur la prolifération et la différenciation cellulaire, des MSCs ont été utilisées. Différents critères et paramètres ont été évalués :

- La viabilité des cellules au contact de l'architecture
- L'aspect morphologique des cellules
- La prolifération et la différenciation cellulaire

Il sera présenté dans ce manuscrit une évaluation biologique menée avec une culture cellulaire isolée d'un seul patient, la réalisation des essais avec des cellules isolées de deux autres patients étant à venir. Les MSCs utilisées dans cette évaluation ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration entre le Centre Hospitalier Universitaire de Limoges et l'équipe de recherche « Biocéramiques » de l'IRCER. Les prélèvements qui en découlent sont réalisés dans le respect des lois éthiques : CODECOH selon la déclaration n°DC-2008-604 afin de protéger le donneur notamment. Ces prélèvements sont encadrés par le centre de ressource biologique du CHU de Limoges (CRBioLim).

### III.2.1. Plan expérimental

L'évaluation de la différenciation cellulaire des MSCs nécessite un temps d'incubation long (3 semaines). Cette évaluation biologique sera réalisée sur différents temps d'incubation afin de suivre les différents stades d'évolution cellulaire. Les temps définis pour cette étude sont de 2 jours, 7 jours, 15 jours et 21 jours.

Le matériel évalué au cours de ce plan expérimental est l'architecture E70-P100-N1 réalisée dans les conditions décrites dans le Chapitre II. La détermination du nombre d'architectures nécessaire pour la réalisation de ce plan expérimental a été définie par le nombre de caractérisations à réaliser à chaque stade temporel. Au cours de chaque étape, il sera réalisé des caractérisations par immunofluorescence et par RT-qPCR afin d'évaluer la morphologie des cellules et l'expression des gènes impliqués dans la différenciation. Il est donc nécessaire d'avoir deux architectures par stade du plan expérimental, soit une architecture pour chaque méthode de caractérisation.

Cependant, la validation des résultats obtenus nécessite un contrôle positif. Ce contrôle positif a pour objectif de valider le modèle cellulaire utilisé et de comparer ces résultats avec ceux de l'architecture bio-inspirée. Le contrôle positif sera ici une pastille d'hydroxyapatite

réalisée par stéréolithographie dans les mêmes conditions que les architectures E70-P100-N1. De plus, afin de contrôler la bonne différenciation des MSCs sur les architectures et les pastilles, à chaque stade temporel, deux architectures et deux pastilles seront évaluées dans du milieu de culture complet et deux architectures et deux pastilles seront évaluées dans du milieu de culture de différenciation ostéogénique. Ce milieu de différenciation permet aux cellules de se différencier en induisant l'expression de gènes spécifique à la différenciation cellulaire ostéogénique en ostéoblastes.

Ce plan d'expérience nécessite donc la mise en forme par stéréolithographie de 16 architectures et 16 pastilles pour une lignée cellulaire prélevée sur un patient (n=1).

### **III.2.2. Matériels et méthodes**

Dans cette partie, les différents protocoles utilisés au cours de l'évaluation biologique des architectures seront détaillés.

#### **III.2.2.1. Culture cellulaire**

Les MSCs ont été isolées à partir de tissu adipeux, enregistrées au Centre de Ressources Biologiques. Les MSCs ont été caractérisées selon les normes internationales en validant notamment la présence ou absence de marqueurs de surface cellulaire par cytométrie en flux (kit de phénotypage des MSC humaines, Miltenyi Biotec).

Les MSCs ont ensuite été amplifiées avant d'être cultivées sur les différents matériaux soit dans un milieu de croissance complet (MC) composé d' $\alpha$ -MEM sans acide ascorbique, complété avec 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques (100 U/ml de pénicilline et 100  $\mu$ g/ml de streptomycine), soit dans un milieu d'ostéodifférenciation (MD) composé de MC contenant 100 nM de dexaméthasone (Applichem), 50 mM d'acide ascorbique (Applichem) et 10 mM de  $\beta$ -glycérophosphate (Applichem).

Les matériaux utilisés dans cette évaluation sont donc des architectures bio-inspirées de l'os trabéculaire humain et des pastilles mises en forme à partir de la suspension HAP-F02 (3DCERAM) avec les paramètres d'impression « E70-P100-N1 » et frittées à 1270°C pendant 2h dont les caractéristiques dimensionnelles sont répertoriées dans le Tableau 10.



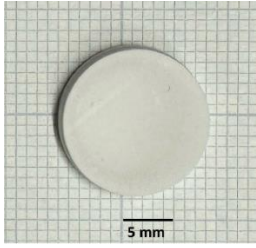
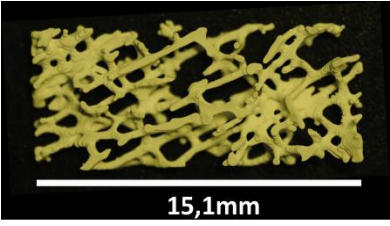
Échantillons	<p style="text-align: center;">Pastille</p> 	<p style="text-align: center;">Architecture bio-inspirée</p> 
Dimensions	<p style="text-align: center;">Rayon = 7mm Épaisseur = 2,5mm</p>	<p style="text-align: center;">Largeur = 6,4 mm Longueur = 15,1 mm Épaisseur = 1,1 mm</p>
Surface totale disponible pour l'ensemencement	<p style="text-align: center;">153,9 mm<sup>2</sup> = <math>\pi \times r^2</math></p>	<p style="text-align: center;">233,1 mm<sup>2</sup> = <i>Superficie totale calculée à l'aide du plugin BoneJ</i></p>

Tableau 10 : Caractéristiques principales des matériaux évalués biologiquement : pastille à gauche et Architecture bio-inspirée de l'os humain à droite

Du fait des grandes surfaces de colonisation cellulaire disponibles sur les échantillons, les cellules ont étéensemencées en 2D, à haute densité de 25 000 cm<sup>2</sup> sur du verre borosilicaté (Contrôle interne), à la surface des pastilles ou des architectures, et cultivées pendant 48 heures, 7, 15 ou 21 jours (Figure 64). Ces cultures sont réalisées dans des puits de culture de surface de 4 cm<sup>2</sup>, plaque 12 puits, avec 2mL de milieu pour chaque condition. Un jour après l'ensemencement, les architectures et les pastilles ont été disposées dans de nouveaux puits de culture afin de ne prendre en compte que les cellules présentes sur les matériaux et non celles tombées au fond du puit. Les cellules ont ainsi été cultivées dans un incubateur à 37°C, sous CO<sub>2</sub> (à 5%) et atmosphère humide. Le milieu de culture a été changé tous les 2 ou 3 jours.

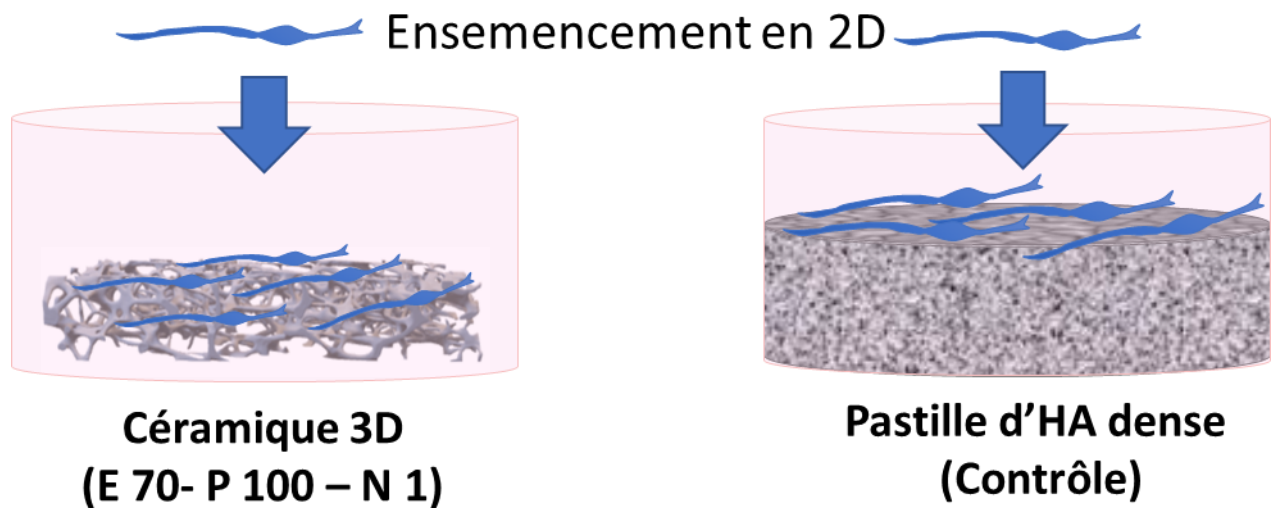


Figure 64 : Représentation schématique de l'ensemencement des architectures et des pastilles.

### III.2.2.2. Test de l'activité métabolique cellulaire

Ce test permet de mesurer l'activité métabolique des cellules et plus particulièrement l'activité mitochondriale à un temps défini. Les mitochondries sont des organites intracellulaires, lieu de la respiration cellulaire, dont la fonction première est de fournir aux cellules l'énergie dont elles ont besoin pour assurer leur survie et les fonctions qu'elles sont censées accomplir. Lors de ces tests de viabilité cellulaire, la résazurine, indicateur rédox qui change de couleur en fonction de la réduction chimique du milieu de culture et qui n'est pas toxique pour les cellules, s'oxyde lorsque la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne. Ainsi, plus l'activité mitochondriale est élevée, plus la réduction de la résazurine sera importante. Une fois réduit, ce colorant bleu non fluorescent devient rose fluorescent et peut être quantifié par fluorimétrie.

Les MSCs ont donc été ensemencées à une densité de 25 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Quatre heures avant la fin de l'expérience, pour réaliser ce test, un volume équivalent à 10% du volume du puits de culture d'une solution de résazurine fraîchement préparée à 0,2 mg/mL dans du PBS 1X (Gibco) a été ajoutée, et les cellules ont été incubées à 37 °C. Après 4 heures d'incubation, le surnageant de culture a été récolté, et un nouveau milieu complet a été ajouté aux puits. Ensuite, 150 µL de surnageant ont été transférés dans des plaques 96 puits noires (Corning, New York, NY, USA) pour mesurer l'intensité de fluorescence à 544 nm à l'aide d'un fluorimètre (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtec, Offenburg, Allemagne). L'activité métabolique a ainsi été déterminée après 48 heures, 7 jours, 15 jours et 21 jours de culture.

### III.2.2.3. Marquage des cellules par immunofluorescence

Le cytosquelette d'une cellule est un assemblage de multiples protéines formant « l'ossature » de la cellule. Le cytosquelette donne notamment sa forme à la cellule, garantit le mouvement de la cellule sur son support et il est important pour le transfert des ARN messagers du noyau vers le cytoplasme et pour l'activité enzymatique et métabolique de la cellule. Parmi ces multiples protéines, une famille forme des filaments « d'actine ».

L'imagerie par immunofluorescence est une technique d'immunomarquage utilisée pour révéler des protéines cibles au sein de la cellule ainsi que leur localisation permettant ainsi une étude morphologique des cellules évaluées. Ce marquage peut se faire : i) par immunofluorescence indirecte, basée sur l'utilisation successive de 2 anticorps utilisant un deuxième anticorps marqué par un fluorochrome ou ii) par immunofluorescence directe, avec un anticorps couplé à un fluorochrome (Figure 65). Des marquages multiples sur un même échantillon de cellules sont possibles. Un marquage bleu au Hoechst, un marquage vert à la phalloïdine et un marquage rouge pourront respectivement mettre en évidence le noyau de la cellule, le cytosquelette de la cellule et le collagène de type 1 présent dans la cellule.

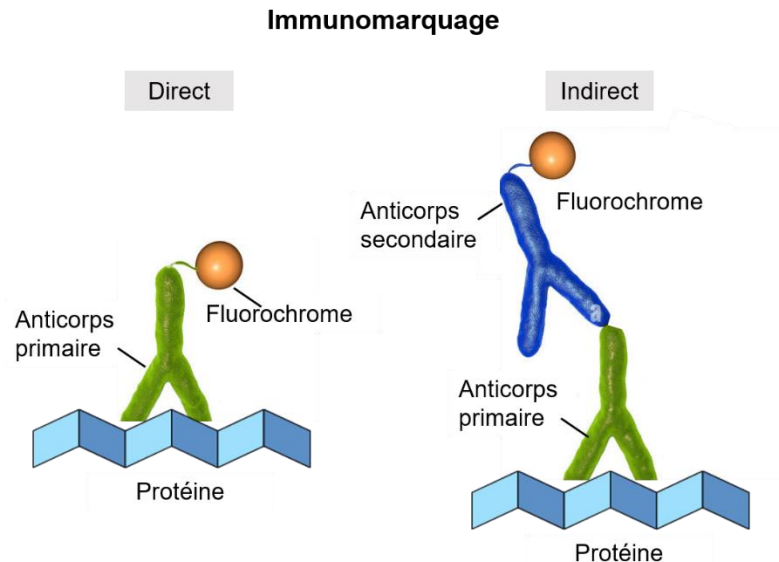


Figure 65 : Représentation schématique des mécanismes de test d'immunofluorescence

Ainsi, pour chaque temps de culture, les cellules ont été fixées avec 4% de paraformaldéhyde dans du tampon phosphate salin (PBS) 1X pendant 10 minutes. Puis elles ont été perméabilisées dans 0,05% de TritonX100 (v/v) dans du PBS 1X pendant 10 minutes, suivi d'une saturation des sites antigéniques aspécifiques dans du PBS 1X à 3% (p/v)

d'albumine de sérum de veau (BSA) pendant 30 minutes. Le collagène de type I (Coll) a été ciblé par hybridation pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire approprié (Figure 66). Les cellules ont ensuite été hybridées avec des anticorps secondaires de chèvre anti-lapin conjugués à AlexaFluor594 (ThermoFisher) pendant 1 heure à température ambiante. Le cytosquelette d'actine a été coloré par incubation pendant 30 minutes avec de la Phalloïdine-DyLight 488 (ThermoFisher).

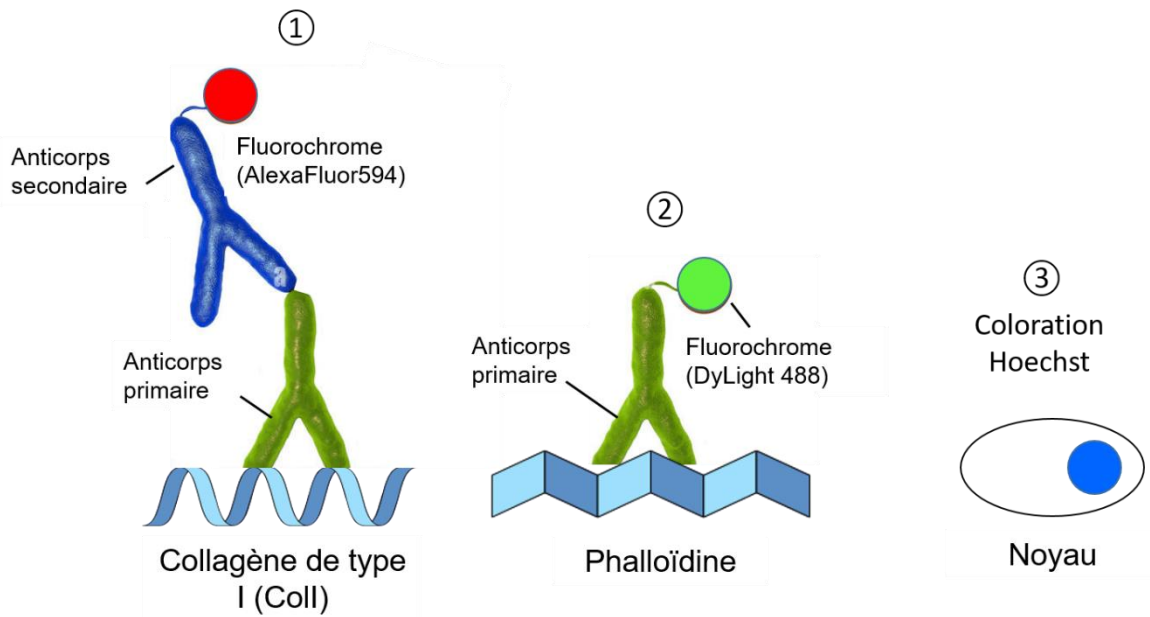


Figure 66 : Représentation schématique des marquages des cellules

Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope à épifluorescence AxioImager M2 (Zeiss) et d'un microscope à champ large confocal Nikon AZ100 couplé à une caméra Andor DU-897.

### III.2.2.4. Réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse (RT-qPCR)

La réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (RT-qPCR) est une méthode biochimique utilisée pour amplifier et quantifier l'ADN complémentaire (cDNA) issu de l'ARN messager (ARNm) à partir d'un échantillon biologique. Initialement, l'ARNm est inversé en ADN complémentaire (ADNc) par une enzyme appelée transcriptase inverse. Ensuite, l'ADNc est amplifié de manière exponentielle par la polymérase lors de cycles de chauffage et de refroidissement, chaque cycle doublant le nombre de copies d'ADN. La quantité d'ADNc initial dans l'échantillon est déterminée en temps réel par la fluorescence

émise lors de l'incorporation de sondes ou de colorants spécifiques à l'ADN. Cette méthode permet une détection sensible et précise de l'ARNm d'intérêt, offrant ainsi des informations quantitatives sur son expression dans l'échantillon biologique (Figure 67).

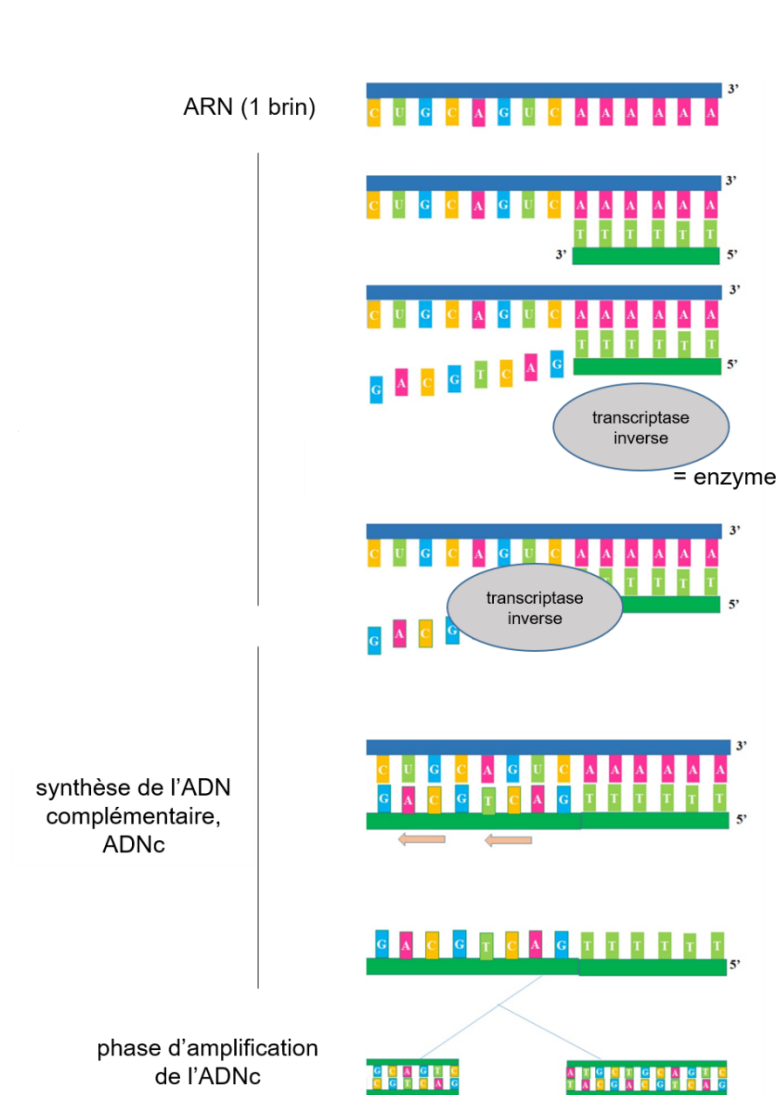


Figure 67 : Représentation schématique de la réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse

Pour cette évaluation, les amorces ont été sélectionnées en fonction des marqueurs de la différenciation ostéoblastique exprimés durant la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses humaines en ostéoblastes détaillés dans la Figure 63. Les gènes évalués dans cette étude sont au nombre de 8 : 3 gènes de ménage et 5 gènes d'intérêt. Un gène de ménage est un gène qui s'exprime dans tous les types cellulaires. Ces gènes sont utilisés comme contrôle afin de vérifier la fiabilité des mesures effectuées par PCR. En effet, chaque gène est quantifié en amplicons (gènes de ménage et gènes d'intérêt). Afin de pouvoir

comparer les valeurs de toutes les conditions et obtenir des valeurs relatives, la différence entre les valeurs d'amplicons des gènes de ménage et des gènes d'intérêt est ainsi effectuée. Ces gènes permettent donc de normaliser les résultats obtenus. Les 3 gènes de ménage pour ces études seront : la bêta actine (B-Actine), la glycéraldéhyde-3-phosphat déshydrogénase (GAPDH) et l'ARN ribosomal18S (18S).

Enfin, 5 gènes d'intérêt ont été sélectionnés en accord avec l'étude bibliographique menée dans la partie III.1.2 relative aux marqueurs ostéogéniques des cellules stromales mésenchymateuses. Ainsi les gènes Runx 2 ; ALPL ; Col1A1 ; BGLAP et SPP1 ont été sélectionnés (Figure 68).

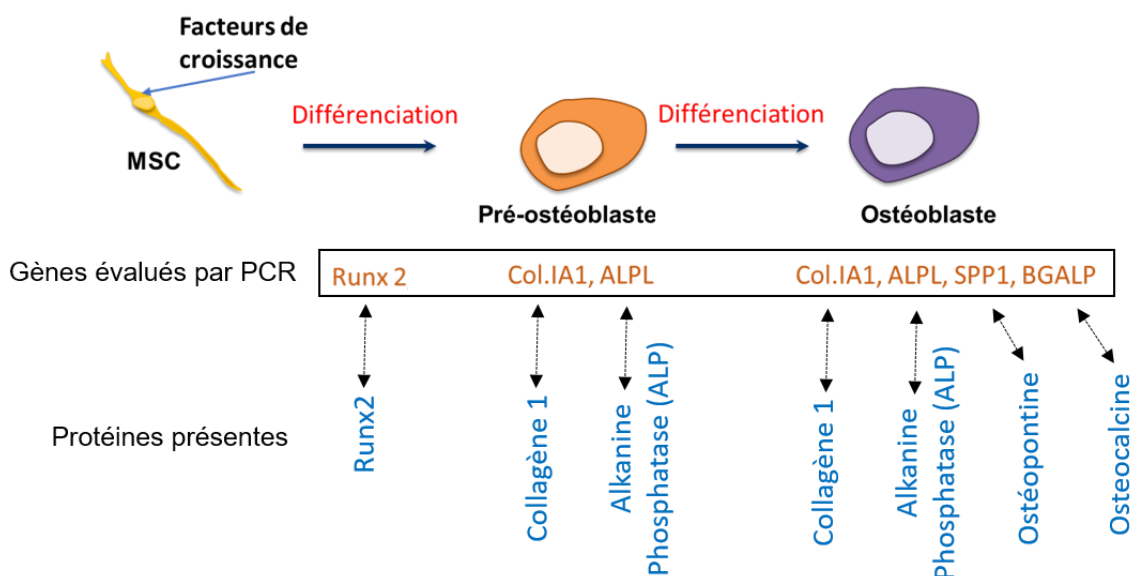


Figure 68 : Gènes évalués par la méthode de RT-qPCR et les protéines correspondantes.

Le protocole permettant la réalisation d'une RT-qPCR est décrit en suivant :

Les ARN sont extraits selon la méthode Phénol-Chloroforme. Les cellules sont lysées dans 800 µL de TRI-REAGENT (Euromedex) additionné de 200 µL de chloroforme. Après 15 minutes de centrifugation à 13 000 g à 4°C, 400 µL de la phase supérieure (contenant les ARN) sont prélevés. 400 µL d'une solution d'isopropanol/glycogène (volume à volume) sont alors ajoutés et les échantillons centrifugés pendant 10 minutes à 13 000 g à 4°C. Le culot est lavé trois fois à l'éthanol 70% et après un traitement à la DNase, les acides ribonucléiques (ARN) sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (QuickDrop, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). La transcription inverse est réalisée sur 200 ng d'ARN total. Les gènes utilisés sont présentés dans le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

### **III.2.2.5. Mise en évidence d'une matrice extracellulaire minéralisée**

Ce test au rouge Alizarine permet de rendre compte de la minéralisation des échantillons évalués puisque le colorant se fixe sur les dépôts de calcium. La coloration se sature en rouge proportionnellement à la minéralisation.

Les cellules sont ainsi fixées pendant 10 minutes au paraformaldéhyde (PFA) puis rincée trois fois à l'eau distillée. Les différentes conditions évaluées dans cette étude sont ensuite recouvertes avec une solution aqueuse de rouge Alizarine à 1%<sub>m/v</sub> à pH 4,2. Les différents matériaux sont ensuite incubés pendant 30 min sous agitation lente. Puis, une dernière étape de rinçage à l'eau distillée est nécessaire afin d'éliminer les ions bivalents résiduels et les pigments non fixés. Les différents matériaux sont ensuite évalués à l'aide d'un appareil photo (Pentax K10) équipé d'un objectif macroscopique 18-55 mm.

## **III.3. Caractérisation biologique**

Pour rappel, les résultats qui vont être présentés dans ce chapitre ont été obtenus avec des cellules provenant d'un unique donneur. Il sera donc nécessaire de réaliser ces mêmes essais avec des cellules provenant de deux autres donneurs afin de valider les résultats obtenus.

### **III.3.1. Activité métabolique des cellules**

La mesure de l'activité métabolique des cellules est un indicateur de la viabilité et de la prolifération. Cette caractérisation rend compte de l'interaction entre le support, le matériau et les cellules cultivées dessus. L'activité métabolique peut être impactée par deux phénomènes : le nombre de cellules présentes sur le matériau et le métabolisme des cellules. En effet, une forte activité métabolique peut se traduire par un grand nombre de cellules sur le matériau ou encore par un nombre moins important de cellules, mais ayant une activité métabolique plus importante. Durant cette expérimentation, toutes les conditions ont été évaluées en triplicat et sont représentées dans la Figure 69. Le contrôle positif pour cette étude est la condition pastille en milieu complet (MC) à 48h.

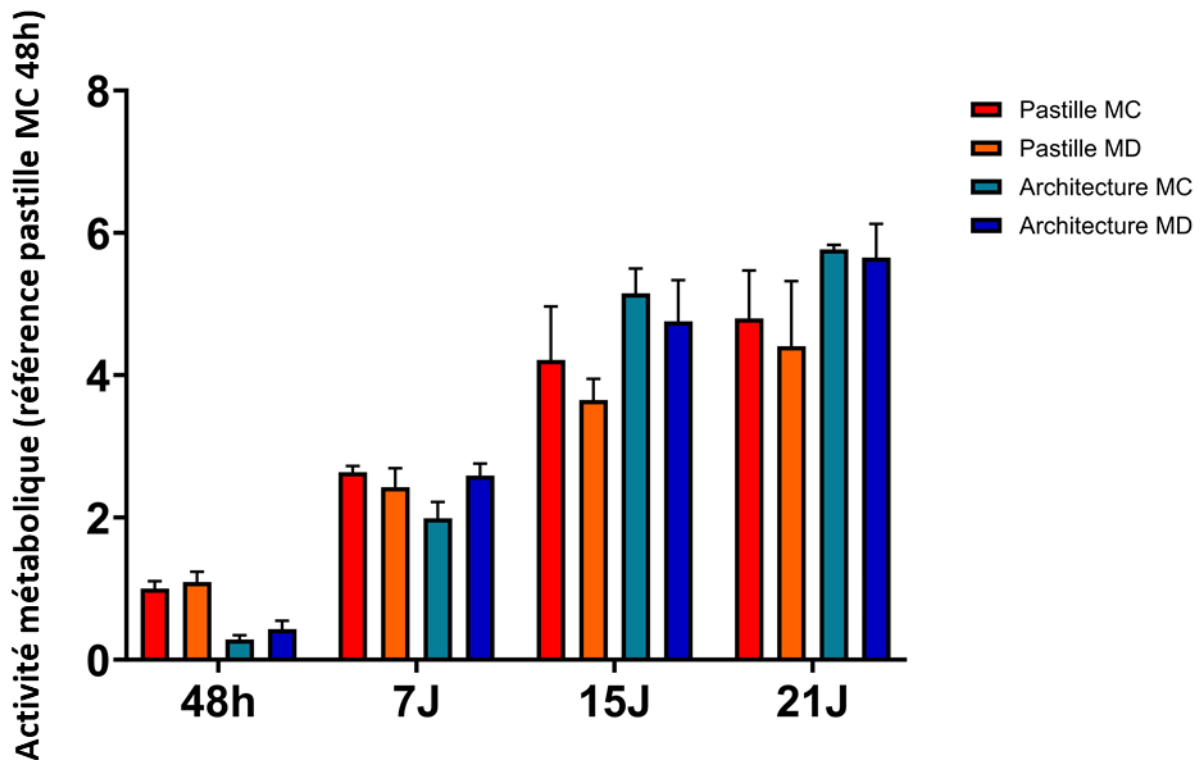


Figure 69 : Analyse de la viabilité cellulaire des MSCs par le taux d'activité métabolique à 48h, 7J, 15J et 21J sur pastille et architecture avec comme référence l'activité métabolique obtenue pour la condition pastille en MC à 48h.

À 48h, l'activité métabolique des cellules sur pastille en milieu complet (MC) et en milieu de différenciation (MD) est plus importante que l'activité métabolique mesurée pour les architectures bio-inspirées pour les deux milieux (MC et MD). La condition 48h va permettre dans ce cas d'estimer via l'activité cellulaire, la proportion de cellules ayant adhéré au matériau. Comme l'activité métabolique est plus importante sur les pastilles, les cellules auraient plus facilement adhéré à la surface des pastilles qu'à celle des architectures 3D. Ceci pourrait s'expliquer par l'ensemencement qui est réalisé en 2D ainsi que la forme du matériau évalué. En effet, l'architecture 3D présente des macropores importants du fait de sa géométrie trabéculaire contrairement à la surface de la pastille, plane et pleine. La proportion de cellules se déposant directement dans le fond du puit de culture serait alors plus importante pour l'architecture que pour la pastille.

Au terme de la première semaine de culture (7J), il existe peu de différence de l'activité métabolique entre les différents milieux de culture d'un même matériau, mais également entre



les différents matériaux eux-mêmes. Cependant, l'augmentation de l'activité métabolique en 7 jours est beaucoup plus importante pour les architectures bio-inspirées que pour les pastilles. Ces résultats confortent, dans un premier temps, la biocompatibilité des matériaux évalués, car les activités métaboliques augmentent puis, dans un second temps, peuvent laisser supposer un effet bénéfique de l'architecture trabéculaire sur la prolifération des cellules. Cette hypothèse devra être vérifiée par imagerie microscopique notamment.

Après 15 jours de culture (15J), une augmentation de l'activité métabolique est toujours observée. Les valeurs sont alors pour la première fois plus élevée pour les architectures trabéculaires que pour les pastilles. De plus, les activités métaboliques des cellules cultivées en MC sur pastille et sur l'architecture ont une meilleure activité biologique que celles cultivées en MD. Dans la continuité des observations réalisées à 7J, la prolifération de cellules sur l'architecture bio-inspirée est plus forte. La tendance observée à 7J est donc confirmée, l'architecture trabéculaire semble bénéfique à la prolifération cellulaire.

Les valeurs de l'activité métabolique des cellules présentes sur les architectures bio-inspirées à 21 jours (21J) sont légèrement plus hautes que celles obtenues pour 15 jours (15J). Un ralentissement de l'activité métabolique sur l'ensemble des conditions est visible. Ce changement est plus marquant pour l'activité métabolique des cellules sur les pastilles. Cette similitude des valeurs entre 15 jours et 21 jours et entre les différentes conditions (pastilles MC et MD) peut s'expliquer par la surface disponible pour les cellules sur les différents matériaux. En effet, la surface totale disponible pour les cellules sur les matériaux est de 153,9 mm<sup>2</sup> pour la pastille alors qu'elle est de 233,1 mm<sup>2</sup> pour l'architecture frittée. Lorsque les cellules arrivent à confluence lors de cultures cellulaires, c-à-d que le tapis cellulaire ne présente plus aucun interstice entre chaque cellule, les cellules ont tendance à arrêter leur mécanisme de prolifération cellulaire. Comme la surface disponible sur la pastille est plus petite que la surface disponible sur les architectures trabéculaires, cette hypothèse pourrait expliquer le fait que l'activité métabolique des cellules entre 15J et 21J sur pastilles soit équivalente. Si tel est le cas, le stade de confluence des cellules serait alors atteint à 15J sur pastille.

Ce test permet donc de prouver la biocompatibilité des matériaux évalués puisque es cellules adhérentes sur les pastilles et les architectures bio-inspirées présentent bien une augmentation de l'activité métabolique au cours du temps. Une meilleure adhésion des cellules, observée à 48h, sur les pastilles, pourrait être expliquée par la méthode d'ensemencement ainsi que par la planéité et l'absence de porosité des pastilles. Néanmoins au fil du temps la prolifération cellulaire devient plus importante sur les architectures que sur les pastilles témoignant de l'impact favorable du design trabéculaire sur l'activité métabolique des MSCs. Quant à l'impact de la nature du milieu, les valeurs d'activités métaboliques

demeurent équivalentes pour les deux milieux de culture qu'il soit de croissance (MC) ou d'ostéodifférenciation (MD) pour un même matériau.

### **III.3.2. Analyses par immunofluorescence**

L'imagerie par immunofluorescence permet de mettre en évidence des protéines cibles au sein de la cellule ainsi que leurs localisations. Dans notre cas, un marquage bleu, au Hoechst, met en évidence le noyau de la cellule, un marquage vert à la phalloïdine, met en évidence le cytosquelette de la cellule et un marquage rouge, met en évidence le collagène de type 1 présent dans la cellule. Ainsi ces différents marquages rendent compte des aspects morphologiques des cellules caractérisées, mais également de la présence ou non de collagène, élément constitutif de la matrice osseuse. Comme pour l'essai précédent, les imageries par immunofluorescence ont été réalisées à 48h, 7 jours (7J), 15 jours (15J) et 21 jours (21J) sur pastilles et architectures bio-inspirées en milieux MC et MD. Les images obtenues au microscope à épifluorescence et au microscope à champ large confocal sont présentées et discutées dans les paragraphes suivants.

Il est à noter que le microscope à épifluorescence utilisé pour cette étude ne permet pas de réaliser des micrographies selon l'axe Z et donc d'avoir une visualisation d'ensemble contrairement au microscope à champ large confocal qui permet de visualiser sur une profondeur d'échantillon afin d'observer les cellules sur l'ensemble de l'architecture et non seulement sur un seul plan. Cette contrainte d'utilisation du microscope à épifluorescence ne permet pas de réaliser des analyses quantitatives de ces images comme la comparaison des tailles de noyau, l'orientation des cellules par exemple.

#### Résultats :

La Figure 70, présente l'ensemble des marquages réalisés sur les matériaux à 48h. Les images montrent chaque marquage individuellement et une représentation de l'ensemble des marquages.

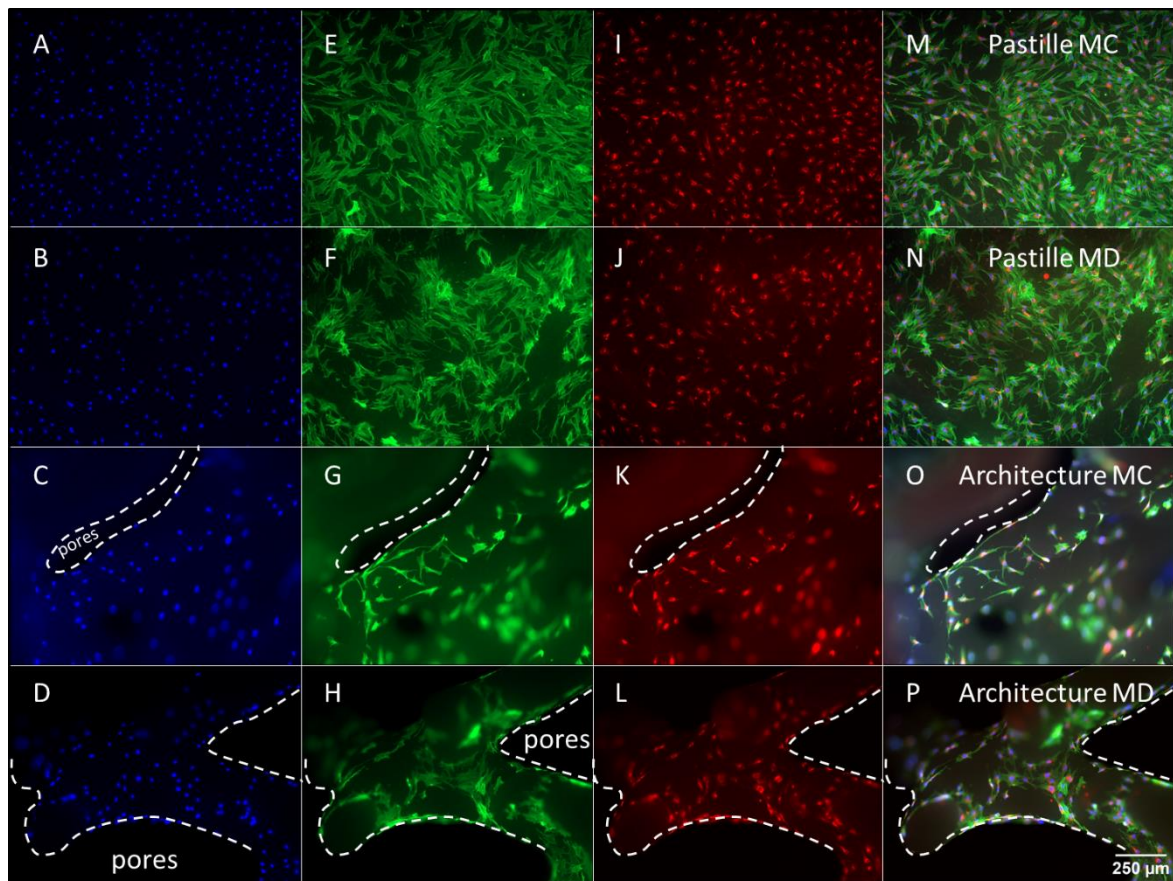


Figure 70 : Images en microscopie à épifluorescence des MSCs adhérant aux pastilles et architectures trabéculaires après 48h en milieu de culture MC et MD. Le marquage en bleu révèle les noyaux (A,B,C,D), le marquage vert révèle les fibres d'actine (E,F,G,H), le marquage rouge révèle le collagène de type I (I,J,K,L) et M,N,O,P représentent l'ensemble des trois marquages.

Les noyaux des cellules présents sur les pastilles en milieu MC et MD à 48h, de forme ronde, sont bien répartis sur l'ensemble de la surface (Figure 70, A et B). Les cytosquelettes des cellules représentés par les filaments d'actine sur ces pastilles sont, par leurs formes, bien étalés sur la surface du matériau (Figure 70, E et F). Cette forme de cytosquelette est attendue pour des cellules cultivées sur un matériau dur [219]. À 48h, du collagène est déjà présent autour du noyau des cellules (Figure 70, I et J).

Pour les architectures, des noyaux de forme ronde sont également observés en milieu MC, mais pas en MD. Le marquage bleu met en évidence des noyaux de formes différentes de ceux observés sur pastille en MC et en MD et sur architecture en MC. Certains noyaux des cellules cultivées dans du milieu d'ostéodifférenciation (MD) apparaissent plus allongés, en plus de la présence de noyaux ronds (Figure 70, D). Les cellules sont présentes sur tout le matériau et pas seulement sur la surface d'ensemencement. Les cytosquelettes des cellules

cultivées en MC et MD sur les architectures ont des formes plus fusiformes (Figure 70, G et H). Ce marquage permet également de rendre compte de la répartition non-homogène des cellules sur l'ensemble de l'architecture (Figure 72). En effet, des colonies cellulaires sont visibles aux abords des nœuds de connexions entre les trabécules et dans les zones concaves (Figure 71, B). Enfin, les cellules dans les zones convexes en MD et MC présentent de grands filopodes (Figure 71, A).

De plus, tout comme pour les pastilles, le collagène est bien présent autour du noyau des cellules présentes sur les architectures. Enfin, les micrographies des architectures trabéculaires témoignent d'un nombre moindre de cellules en comparaison avec les pastilles. Cette faible densité cellulaire conforte les résultats de l'activité métabolique plus faible pour les architectures que pour les pastilles obtenues à 48h (Figure 69).

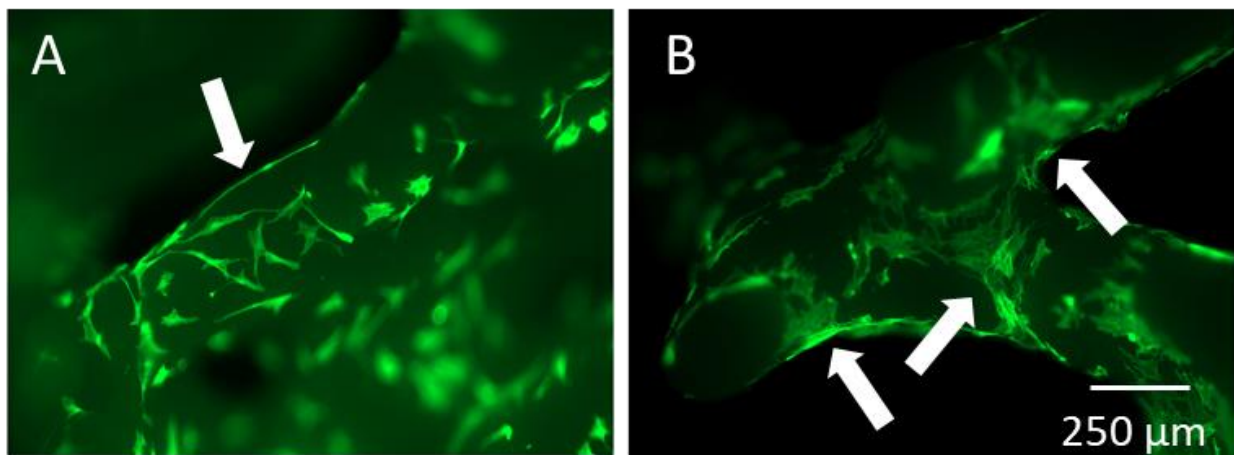


Figure 71 : Images en microscopie à épifluorescence des MSCs adhérant sur les architectures trabéculaires après 48h de culture en milieux MC (A) et MD (B). Le marquage vert marque les fibres d'actine. La flèche sur la micrographie A met en évidence un grand filopode, les flèches sur la micrographie B mettent en évidence une colonisation cellulaire dense dans les nœuds de l'architecture.

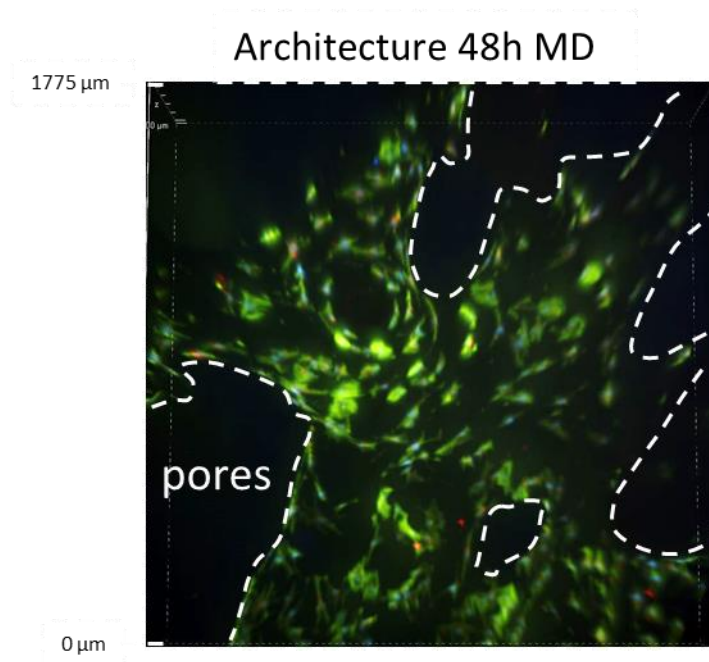


Figure 72 : Macrographie des cellules en culture sur l'architecture trabéculaire à 48h en MD. Le marquage en bleu révèle les noyaux, le marquage vert révèle les fibres d'actine et le marquage rouge révèle le collagène de type I

- À 7 jours

La Figure 73 présente les micrographies obtenues pour toutes les conditions à 7J. Le marquage bleu révèle la présence de nombreux noyaux. Dans la condition MC, ces noyaux sont principalement ronds avec l'apparition de quelques noyaux plus allongés (Figure 73, A). Dans la condition MD, un plus grand nombre de noyaux allongés est observable (Figure 73, B). On retrouve notamment dans cette condition un grand nombre de chevauchements. En comparaison avec les micrographies obtenues à 48h (Figure 70, A et B,) un plus grand nombre de noyau est dénombré suggérant une augmentation de la prolifération.



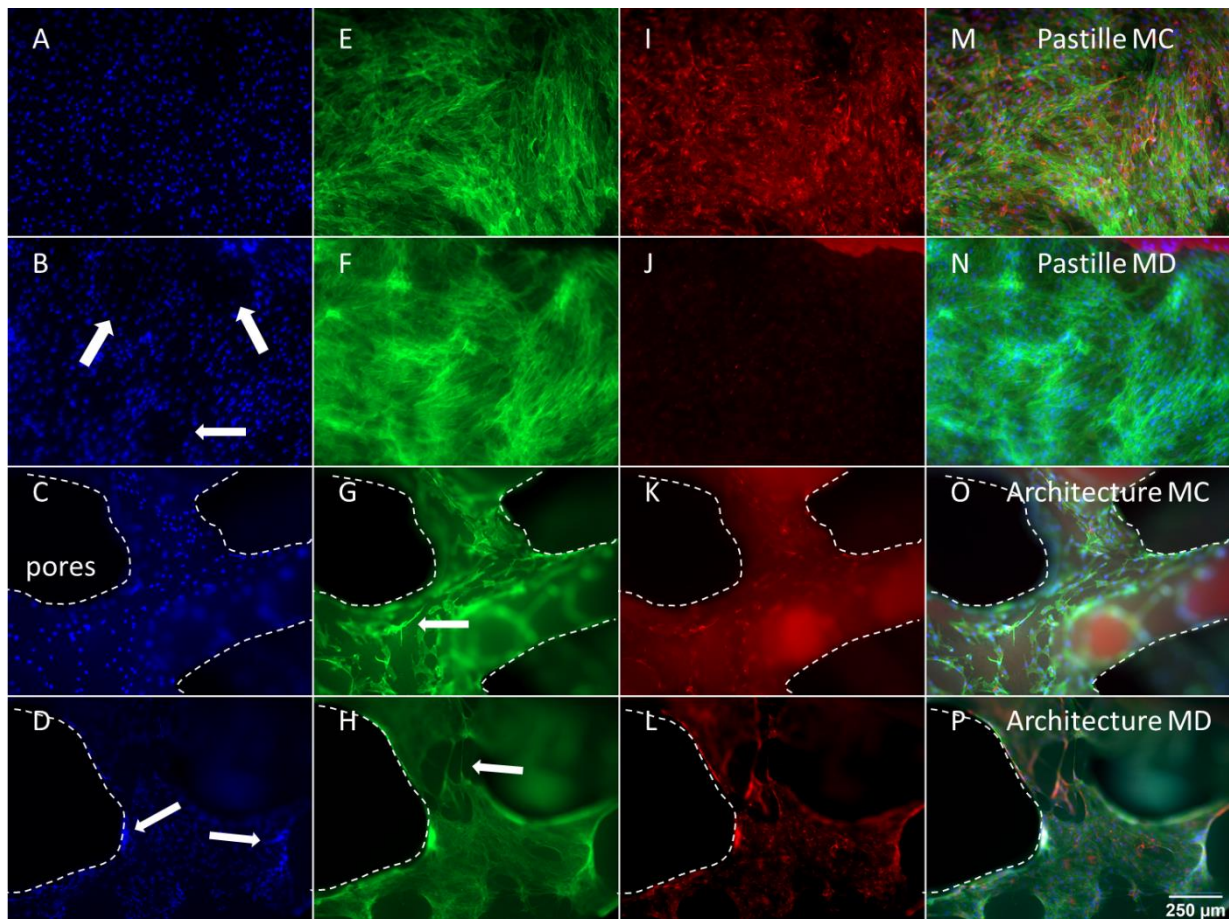


Figure 73 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant aux pastilles et architectures trabéculaires après 7J de culture en milieux MC et MD. Le marquage en bleu révèle les noyaux (A,B,C,D), le marquage vert révèle les fibres d'actine (E,F,G,H), le marquage rouge révèle le collagène de type I (I,J,K,L) et M,N,O,P représentent l'ensemble des trois marquages.

Le marquage vert met en évidence sur la condition pastille MC, une inhibition de contact des cellules ( Figure 73, E) qui n'est pas visible sur la condition pastille MD (Figure 73, F). L'inhibition de contact est visible lorsque les cellules sont à confluence. À ce stade, elles forment un seul tapis cellulaire et arrêtent leur prolifération. Ce phénomène est observable par la superposition des noyaux et des fibres d'actine. À l'inverse, une organisation des fibres d'actine est observée dans la condition pastille MD. Cependant, quelques zones de faible densité cellulaire subsistent encore (flèches sur la micrographie B Figure 73). La comparaison avec le collagène entre ces deux conditions MC et MD n'est ici pas possible, le marquage au collagène de type 1 n'ayant pas fonctionné pour la condition pastille MD. La condition pastille MC, quant à elle, présente une propagation du collagène à l'intérieur de la cellule Figure 74. Une plus forte présence du collagène est tout de même observée autour du noyau reprenant les observations à 48h (Figure 74, A).

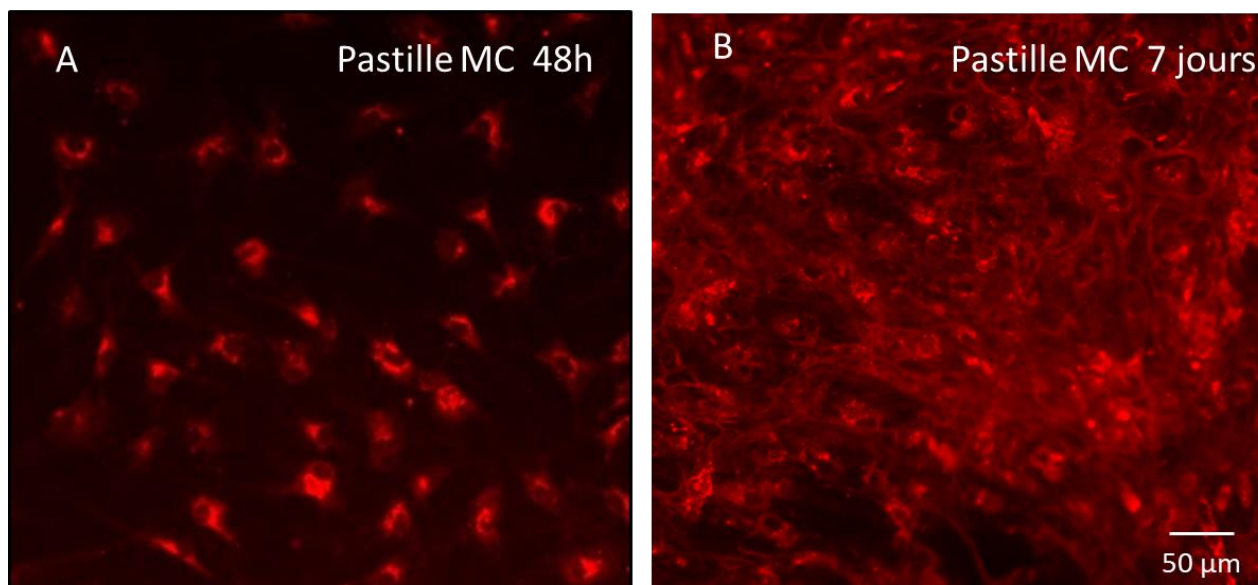


Figure 74 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant aux pastilles après 48h (A) et 7J (B) de culture en MC. Le marquage rouge marque le collagène de type I.

Des noyaux ronds sont aussi observés pour les architectures en milieux MC et MD bien qu'une proportion plus importante de noyaux allongés subsistent ( Figure 73, C et D et flèche blanche sur la micrographie B de la Figure 75). Des chevauchements de cellules sont également observés dans les zones présentant des courbures concaves, autour des pores ou au niveau des jonctions de trabécules (flèches blanches sur la micrographie D de la Figure 73 et sur la micrographie B de la Figure 75). Ces chevauchements marquent une densité cellulaire plus importante dans ces zones laissant ainsi des zones peu ou pas colonisées généralement sur des surfaces planes. Sur ces surfaces planes, de grands filopodes des cellules sont visibles (flèches blanches sur les micrographies G et H de la Figure 73). Les filopodes se forment sur le devant des cellules en mouvement, au front de migration, pour explorer l'espace à coloniser.

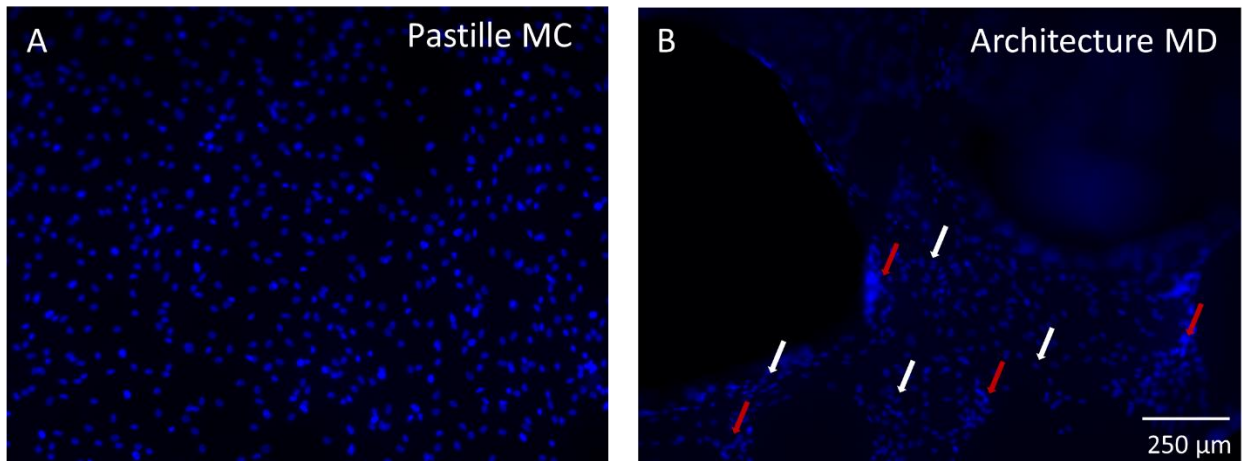


Figure 75 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant à la pastille en MC et à l'architecture trabéculaire en MD après 7J de culture. Le marquage en bleu marque les noyaux des cellules. Les flèches blanches mettent en évidence les noyaux de forme allongée, ovale et les flèches rouges, les chevauchements entre noyaux.

L'imagerie par immunofluorescence a également permis d'observer une organisation des cellules hors surface des matériaux (Figure 76 et Figure 77, B). Sur ces micrographies des « ponts » cellulaires entre deux trabécules avec deux points d'appuis de chaque côté sur le matériau sont observables (flèches blanches sur la Figure 76 et sur la Figure 77, B). La prolifération cellulaire s'effectue donc dans toutes les directions du matériau, mais également en dehors du matériau.

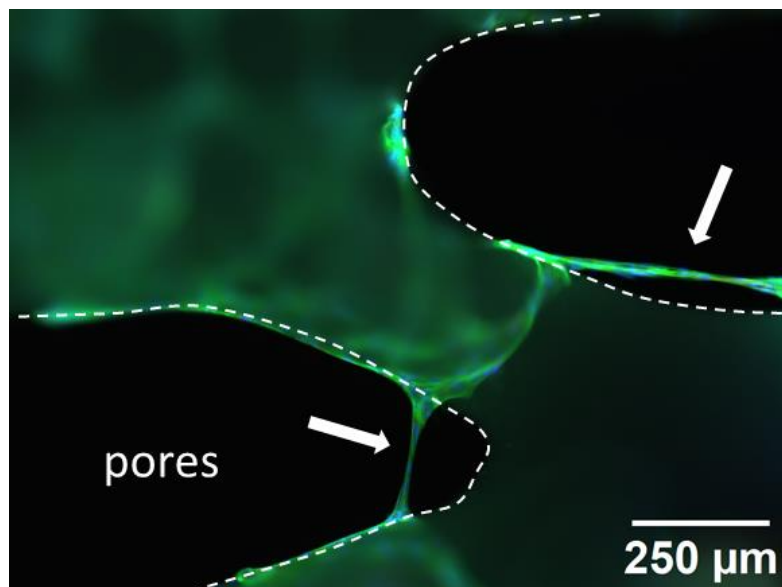


Figure 76 : Image en microscopie à épifluorescence des MSCs adhérant à l'architecture trabéculaire après 7J de culture en MD. Le marquage en bleu révèle les noyaux, le marquage vert révèle les fibres d'actine, le marquage rouge révèle le collagène de type I.



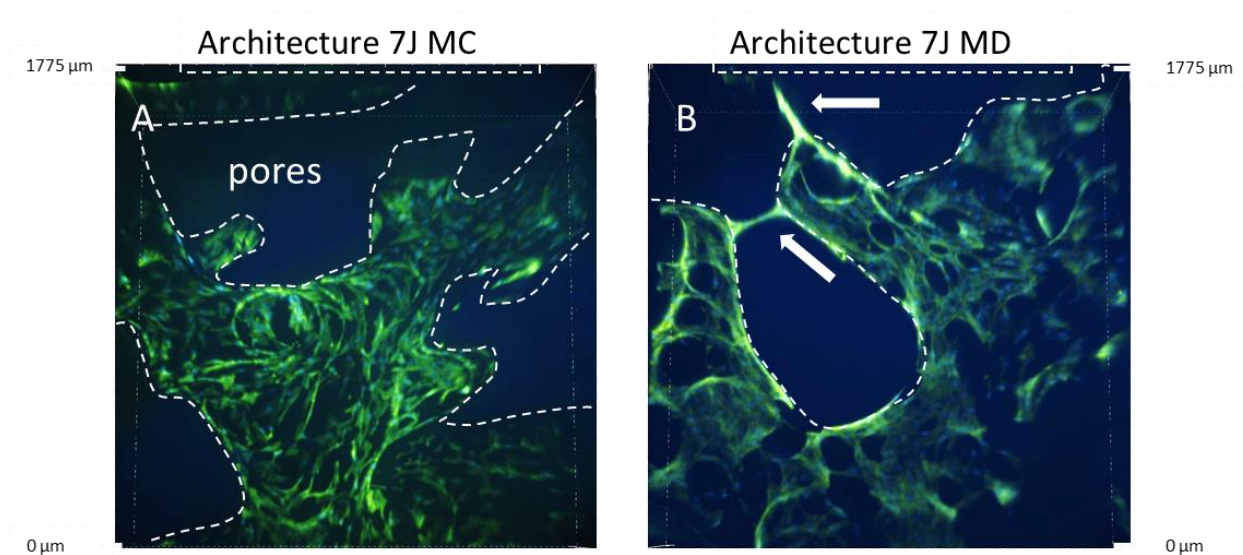


Figure 77 : Macrographies des cellules en culture sur l'architecture trabéculaire à 7J en milieu MD et MC. Le marquage en bleu révèle les noyaux, le marquage vert révèle les fibres d'actine et le marquage rouge révèle le collagène de type I.

Pour finir, le marquage rouge, met en évidence du collagène de type 1 dans l'ensemble de la cellule, mais, comme pour les conditions 7J sur pastilles en milieu MC, une grande proportion de ce collagène est toujours présente autour du noyau (Figure 73, K et L).

- À 15 jours

Les micrographies réalisées à 15J (Figure 78) mettent en évidence une forte prolifération cellulaire sur l'ensemble des conditions. Tout d'abord sur les pastilles, de nombreux noyaux sont présents (Figure 78, A et B). Visuellement, la densité cellulaire est plus importante sur les pastilles avec le milieu d'ostéodifférenciation (MD) que sur les pastilles avec le milieu de croissance complet (MC). Sur cette dernière condition, pastille MC, les noyaux sont pour la majorité ronds bien que la présence de noyaux allongés soit perceptible. Les cellules cultivées sur pastille en milieu MD présentent au contraire une majorité de noyaux allongés (Figure 78, B). De nombreux chevauchements sont également visibles sur cette condition.

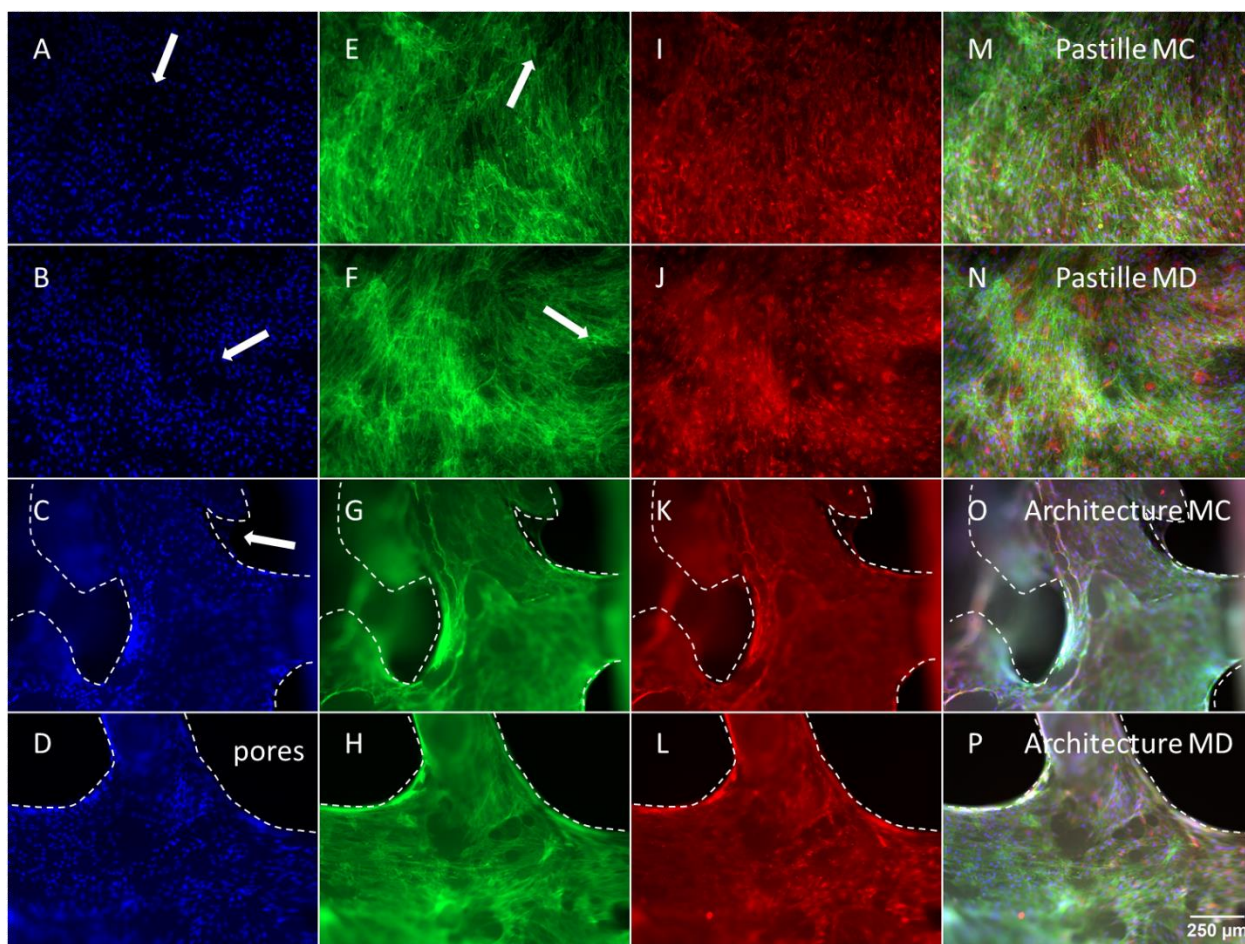


Figure 78 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant aux pastilles et architectures trabéculaires après 15J de culture. Le marquage en bleu révèle les noyaux (A,B,C,D), le marquage vert révèle les fibres d'actine (E,F,G,H), le marquage rouge révèle le collagène de type I (I,J,K,L) et M,N,O,P représentent l'ensemble des trois marquages.

Le marquage à la phalloïdine (vert) met en évidence une inhibition de contact pour les cellules cultivées en MC contrairement aux cellules cultivées en MD (Figure 78, E et F). Ce phénomène explique la plus faible densité cellulaire en MC. Les cytosquelettes en MD sur pastille présentent une organisation dans une direction, phénomène observable par les fibres d'actine orientées dans une direction. Cette organisation est moins perceptible en MC du fait de la faible proportion de chevauchements. Il est à noter dans les deux cas (MC et MD sur pastille) que certaines zones ne semblent pas encore bien colonisées comme en témoigne la faible proportion des cellules dans ces zones comparée à la densité cellulaire sur l'ensemble de l'échantillon (flèches blanches sur les micrographies A, B, E et F de la Figure 78). Cependant, ces zones plus dépourvues de cellules présentent plus de collagène de type 1, toujours présent dans la cellule. L'espace disponible permettrait ainsi une meilleure synthèse du collagène. Le collagène dans les deux conditions est disposé dans l'ensemble de la cellule et plus simplement autour du noyau comme c'était le cas lors des observations à 48h et 7J.

Sur les architectures, il est possible de faire le même constat que pour les pastilles. La densité cellulaire semble plus importante en milieu MD qu'en milieu MC (Figure 78, C et D). Les noyaux semblent similaires, de taille variable, mais pour la grande majorité d'entre eux, de forme allongée. Il est également possible de distinguer de plus grandes densités cellulaires, particulièrement dans les angles concaves avec de nombreux chevauchements. Il est même observé une prolifération cellulaire ne reposant pas sur le matériau, mais prenant appui sur le matériau pour venir coloniser les pores (flèches blanches sur la micrographie C de la Figure 78). De petites zones sont cependant toujours dépourvues de cellules (Figure 79). Un décrochement des cellules lors de la manipulation des architectures ou encore une prolifération incomplète pourraient expliquer cette observation. Le stade de confluence cellulaire n'est toujours pas atteint sur les architectures trabéculaires en MC et MD (Figure 78, G et H). Le marquage vert met en exergue une orientation des fibres d'actines en MD, mais pas en MC (Figure 78, G et H).

Le collagène (marquage rouge) est réparti de manière équivalente sur les architectures et sur les pastilles quel que soit le milieu (MC ou MD) (Figure 78).

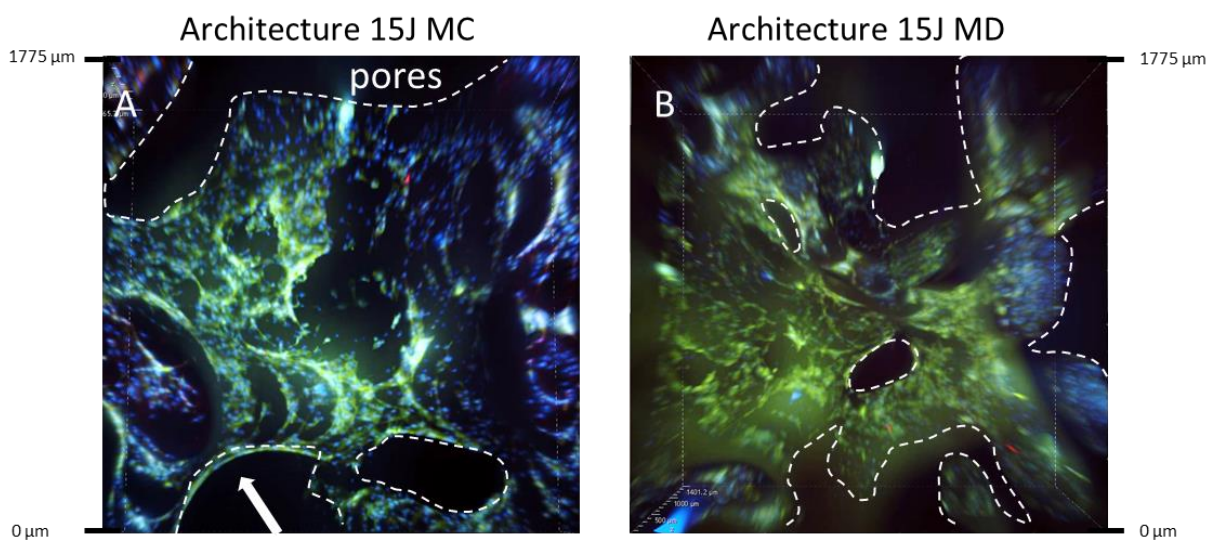


Figure 79 : Macrographie des cellules en culture sur les architectures trabéculaires à 15 J en MC (A) et MD (B) où le marquage en bleu révèle les noyaux, le marquage vert révèle les fibres d'actine et le marquage rouge révèle le collagène de type I.

- À 21 jours

La Figure 80 présente les résultats obtenus à 21J. Les cellules sur pastilles en MC et MD, présentent une grande majorité de noyaux allongés (Figure 80, A et B). Cependant, la densité cellulaire est beaucoup plus importante en MD qu'en MC. La prolifération cellulaire ne semble pas avoir augmenté sur la pastille en MC depuis l'observation à 15J (Figure 78, A et



Figure 80, A). De plus, dans la continuité des observations réalisées à 15J sur les mêmes conditions (pastille en MC et MD), la condition 21J en MD présente de nombreux chevauchements.

Le marquage vert met, quant à lui, en évidence, une inhibition de contact très marquée en MC et non visible en MD (flèches blanches sur la micrographie E de la Figure 80). Bien qu'une inhibition de contact subsiste, une orientation des cytosquelettes est visible en MC. Cette orientation est également perceptible pour les cytosquelettes en MD (Figure 80, F). Cependant, des cytosquelettes non-orientés sont également observés. Ces cytosquelettes non orientés semblent former un second tapis cellulaire positionné sur le premier tapis cellulaire. Le collagène de type 1 est, quant à lui, bien présent dans toute la cellule bien qu'il semble se réorganiser autour du noyau comme à 48h et 7J.

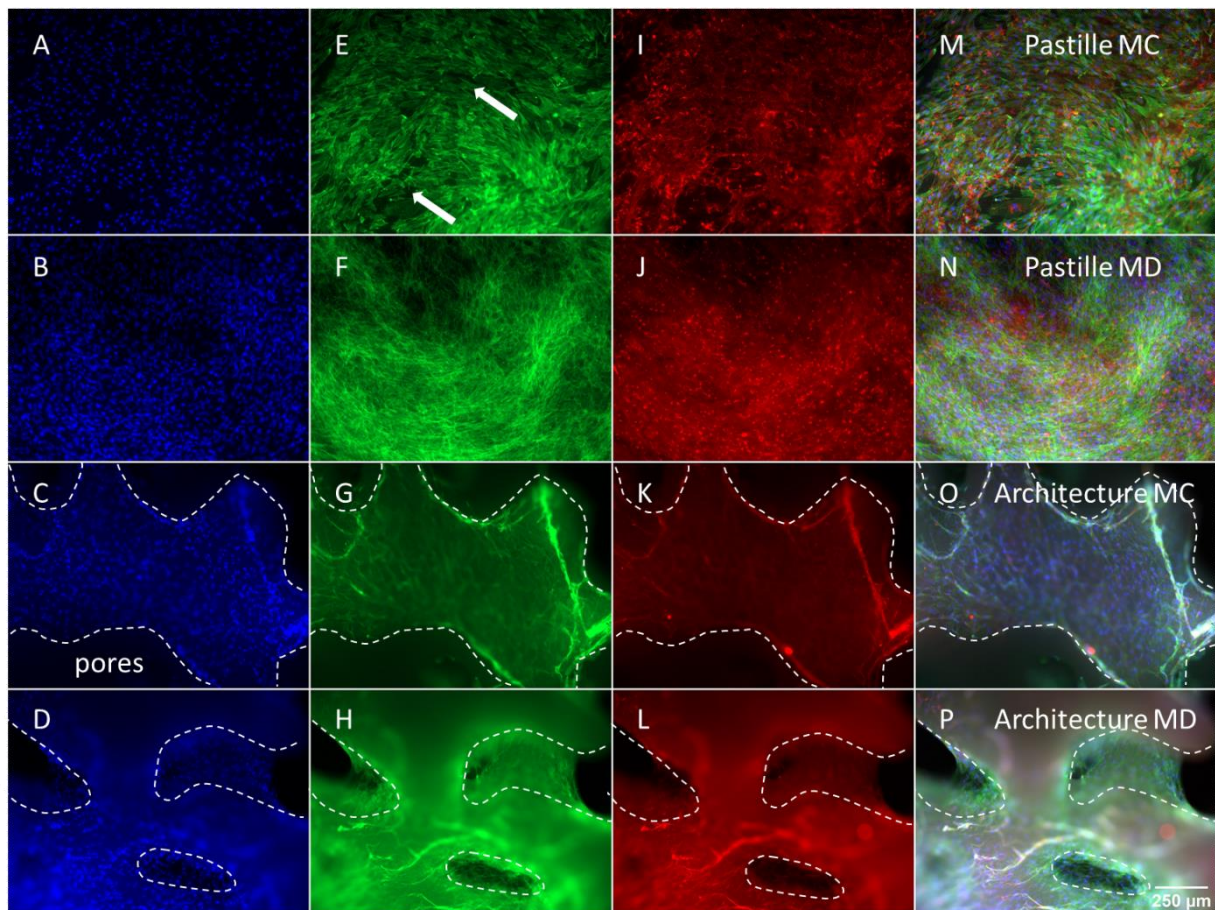


Figure 80 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant aux pastilles et architectures trabéculaires après 21J de culture. Le marquage en bleu révèle les noyaux (A,B,C,D), le marquage vert révèle les fibres d'actine (E,F,G,H), le marquage rouge révèle le collagène de type I (I,J,K,L) et MNOP représentent l'ensemble des trois marquages.

Les conditions à 21J sur architectures présentent une colonisation cellulaire à confluence avec un tapis cellulaire très dense. L'ensemble de l'architecture est colonisé par les cellules en MC et MD (Figure 80 et Figure 81). La densité cellulaire semble toutefois plus élevée en MD qu'en MC. L'ensemble des noyaux sur ces deux conditions est de forme allongée (Figure 80, C et D). De plus, les noyaux semblent avoir une surface plus petite dans les angles plutôt que sur des surfaces plus planes (flèches blanches sur la Figure 82 ). Ceci pourrait s'expliquer soit donc par une morphologie du noyau différente, soit par l'orientation du noyau. Sur une surface plane, l'ensemble du noyau est visible. À l'inverse les noyaux présents dans les angles sont dans la profondeur du champ du microscope. Ainsi, les noyaux pourraient ne pas être représentés entièrement sur la micrographie.

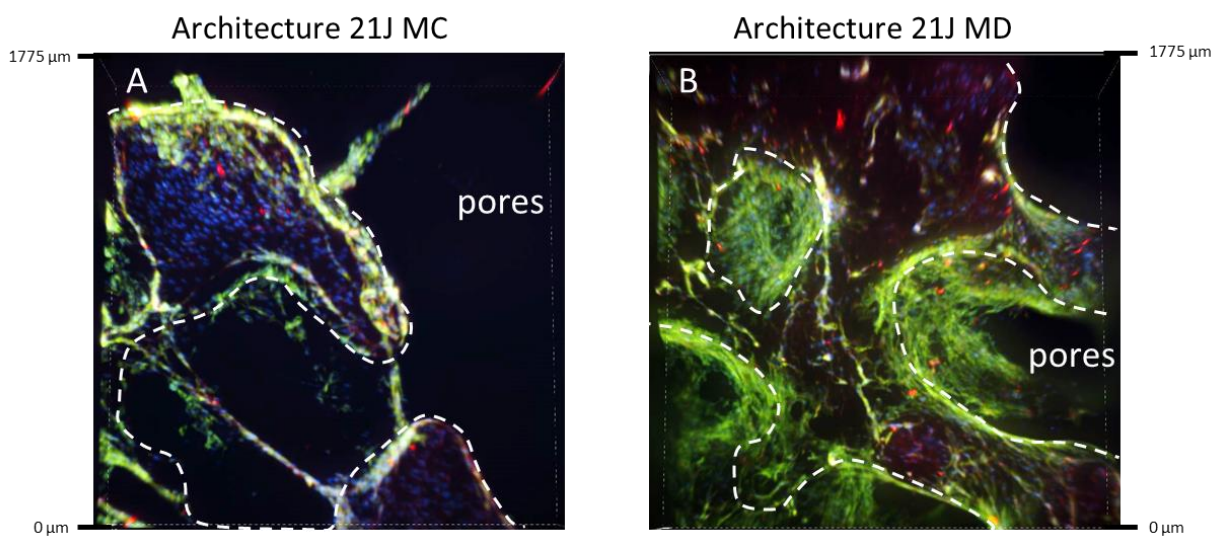


Figure 81 : Macrographie des cellules en culture sur les architectures trabéculaires à 21J en MC (A) et MD (B) où le marquage en bleu révèle les noyaux, le marquage vert révèle les fibres d'actine et le marquage rouge révèle le collagène de type I.

Le marquage vert sur ces deux conditions (Figure 80, G et H) ne montre pas d'inhibition de contact ni d'orientation préférentielle des fibres d'actine. Cependant, les cellules vont coloniser les pores (Figure 80, P et Figure 81, A et B) ou encore réaliser des connexions entre différentes trabécules (Figure 81, A). Pour finir, le collagène de type 1 est présent dans l'ensemble des cellules, y compris dans les cellules non proliférantes sur le matériau, c'est-à-dire les cellules visibles dans de fortes densités cellulaires. Cependant, contrairement au collagène présent dans les cellules sur les conditions pastilles, une organisation autour du noyau n'est pas observée ici.

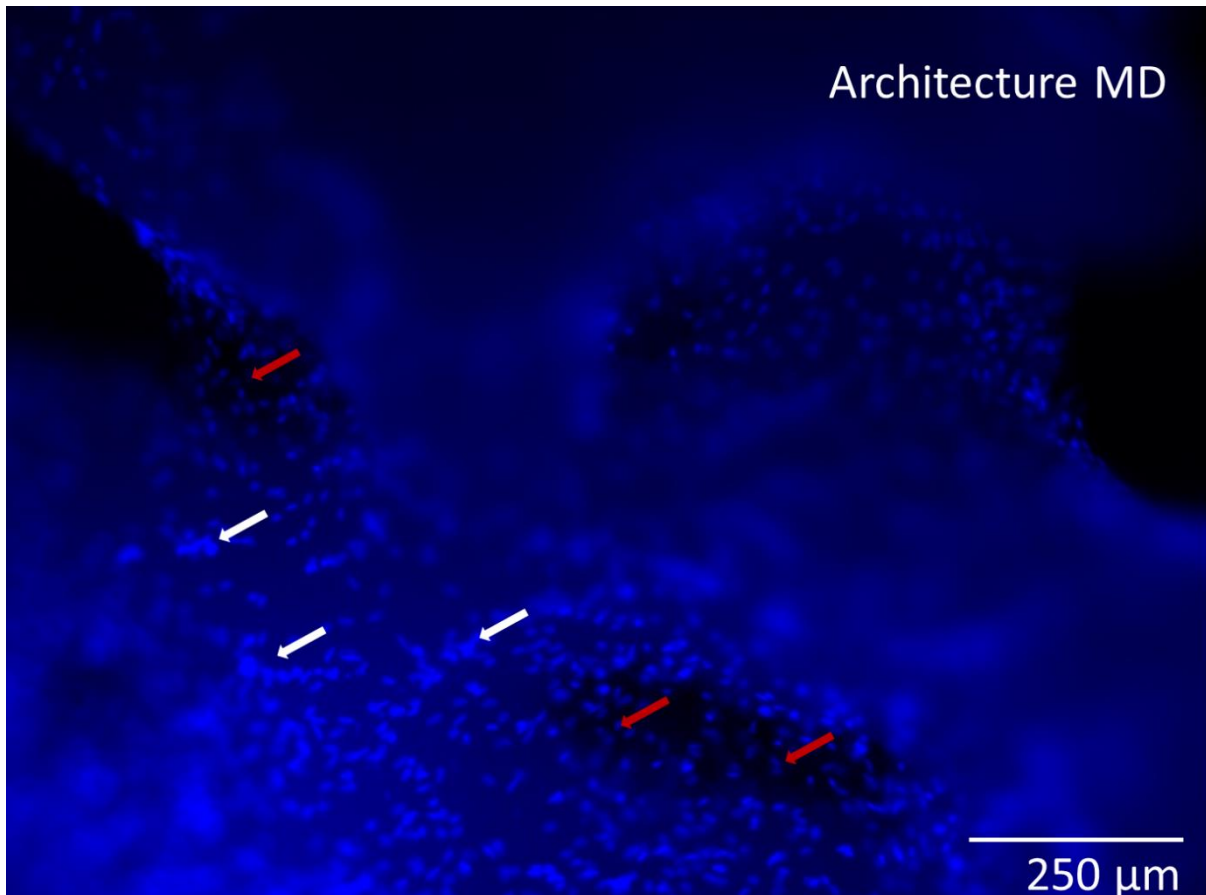


Figure 82 : Images en microscopie à épifluorescence des MSC adhérant à l'architecture trabéculaire en MD après 21J de culture. Le marquage en bleu marque les noyaux des cellules, les flèches rouges mettent en évidence des noyaux dans les angles, plus petits que les noyaux mis en évidence par les flèches blanches, noyaux sur des surfaces planes.

### Discussion :

Un récapitulatif de ces observations a été réalisé (Figure 83). Ce schéma met en avant les différentes modifications morphologiques des cellules pour chaque condition de matériaux, milieu de culture et temps de culture.

Au cours de cette évaluation biologique *in vitro*, les cellules vont donc subir des changements morphologiques et ce dans toutes les conditions évaluées. Cependant, la cinétique de ces évolutions morphologiques est différente selon chaque condition. La condition architecture MD présente les changements morphologiques cellulaires les plus rapides à l'inverse des cellules cultivées sur pastille en MC. L'autre caractéristique observée lors de cette évaluation a été les chevauchements, peu nombreux en condition pastille MC à l'inverse de la condition architecture MD. Dans toutes les conditions, la prolifération cellulaire est importante jusqu'au stade de confluence des cellules. La colonisation par les cellules s'est faite dans toutes les directions sur les architectures et ne s'est pas simplement étendue sur la

surface d'ensemencement. Les cellules migrent convenablement dans l'architecture 3D avec notamment une forte densité cellulaire dans les angles favorisant ces chevauchements. Plusieurs points sont donc à prendre en compte.

Le premier phénomène observable est la différence du nombre de cellules ayant adhéré à la surface de l'architecture trabéculaire comparée à la surface de la pastille. Bien que la technique d'ensemencement et la surface que couvre l'architecture trabéculaire soit inférieure à la surface de la pastille, Iwamoto *et al.* [220] ont mis en évidence l'impact délétère d'une morphologie de surface convexe-concave sur l'adhésion des cellules sur un matériau en HA. Ainsi, les résultats constatés dans cette étude sembleraient cohérents avec ces recherches, se traduisant par une activité métabolique inférieure et une densité cellulaire inférieure sur les architectures comparées aux pastilles.

La prolifération et la différenciation des cellules peuvent être entraînées par plusieurs propriétés pouvant varier en fonction de la rigidité des cellules [221], de la surface des cellules [222] et de la rigidité du substrat [223]. La rigidité du substrat est une caractéristique importante, car plusieurs études suggèrent la différenciation des MSCs par ce biais [224], [225]. Les cellules vont ainsi exercer des forces différentes sur le matériau afin d'y rester attachées. Les filaments d'actine ancrés aux adhérences focales (complexes protéiques permettant à la cellule de s'ancrer à son milieu) vont alors être organisés différemment selon la rigidité du matériau. Ainsi, cette différence d'organisation de la cellule fait, qu'une structure rigide favorise une augmentation de l'expansion cellulaire pouvant favoriser l'ostéogénèse [226], [227]. Bien que la rigidité des matériaux évalués dans ce manuscrit soit les mêmes, les cytosquelettes des cellules évaluées sur pastilles et sur architectures montrent eux des différences morphologiques. Les cytosquelettes sur pastilles sont étalés à 48h à l'inverse des cytosquelettes sur les architectures à 48h, présentant une forme fusiforme. Les adhérences focales des cellules seraient alors différentes du fait de la topographie des matériaux évalués. Cette topographie favoriserait ainsi la prolifération cellulaire pour les conditions sur architectures MC et MD comme l'a montré l'évaluation de l'activité métabolique (Figure 69). Il faudrait confirmer cette hypothèse en faisant des images par immunofluorescence avec un marquage permettant d'observer les points focaux des cellules.

Une différence d'organisation des fibres d'actine subsiste alors par la forme du cytosquelette entre les cellules sur pastille et sur architecture. Or, les fibres d'actine sont des facteurs essentiels dans le processus mécanique de remodelage nucléaire, c'est-à-dire la morphologie du noyau [228]. En effet, Versaev et son équipe ([228]) ont montré que l'allongement cellulaire induit une augmentation croissante de la tension des fibres d'actine appliquant des forces de compression latérale des deux côtés du noyau. Ainsi, ils ont observé un raidissement du noyau à mesure que la cellule s'allonge. Les observations de cette étude



pourraient expliquer pourquoi des noyaux allongés sont observés en plus grand nombre et à des temps plus courts pour les cellules sur architectures que pour les cellules sur pastilles. En effet, la forme fusiforme des cellules entraînerait donc une modification de la morphologie du noyau. Cette différence de morphologie subsisterait de par la topographie de l'architecture trabéculaire. La topographie du matériau, entraînerait donc une modification des points focaux de la cellule qui engendrerait donc une modification de la morphologie du noyau. Une étude a montré des résultats similaires sur une surface 2D, mais avec des motifs de différentes formes ([229]). Ainsi Li et son équipe [229] ont mis en avant par cette différence de morphologie une amélioration de la prolifération et de l'expression de gènes dans le cadre de cellules présentant une forme allongée.

Plusieurs études ont montré les changements physiologiques qui subsistent après une modification de la morphologie du noyau [230]–[232]. Guo *et al.* contrôlent notamment la différenciation des MSCs en modifiant le volume cellulaire. Le volume cellulaire est intrinsèquement lié à la rigidité cellulaire elle-même liée à l'organisation des fibres d'actine. Ainsi, Guo *et al.*, ont montré que la pression des fibres d'actine se traduit par une réduction du contenu de la cellule en eau entraînant inévitablement des variations significatives dans de nombreux processus physiologiques internes comme la manifestation des modèles d'expression des protéines [233], [234]. Le volume cellulaire est donc modifié, la morphologie du noyau également, diminuant à mesure que le volume cellulaire diminue. Ceci expliquerait pourquoi les noyaux sont également plus petits sur les observations des conditions architectures. L'encombrement moléculaire du noyau serait alors modifié, affectant les schémas de transcription et d'expression génétique [235], [236]. Cette modification pourrait ainsi favoriser dans le cadre de cette évaluation biologique une différenciation ostéogénique. Ainsi la rigidité cellulaire entraîne une modification de la morphologie du noyau obtenue plus rapidement pour les cellules sur les architectures du fait de la topographie de l'architecture trabéculaire.

Toutes les conditions évaluées permettent l'observation de noyaux allongés à 21 jours. Cependant, la cinétique d'obtention de cette morphologie n'est pas la même pour toutes les conditions évaluées. Les cellules sur conditions pastilles en MC sont les plus lentes à obtenir ce changement de morphologie du fait certainement de la surface plane et de l'inhibition de contact présente. Ces propriétés impactant l'organisation des fibres d'actine, la modification de la rigidité des cellules n'en sera que plus lente. Cependant, les cellules sur pastille mais en milieu d'ostéodifférenciation (MD), voient la morphologie de leurs noyaux évoluer vers une forme allongée plus rapidement. De plus, de nombreux chevauchements sont observables sur cette condition comparativement aux pastilles en milieu de croissance complet (MC). Le milieu MD permet de limiter l'inhibition de contact observable par ces nombreux chevauchements.



Ces chevauchements semblent par ailleurs bénéfiques à une rigidité de la cellule entraînant donc ce changement de morphologie du noyau au sein de la cellule plus rapidement.

Les cellules sur architecture en milieu MC présentent avec quasiment la même rapidité que les cellules sur pastilles en milieu MD, un changement de morphologie du noyau vers une forme allongée (Figure 83). De plus, de nombreux chevauchements sont observés tout comme une organisation du cytosquelette différente des cytosquelettes observés sur pastilles. Ce changement est dû à l'aspect trabéculaire du matériau présentant des angles convexes et concaves. L'architecture permet donc une modification de la morphologie du noyau. Enfin, le changement de morphologie du noyau est le plus rapide sur les cellules cultivées sur l'architecture trabéculaire en milieu MD, car cette condition présente les bénéfices de l'architecture trabéculaire et les bénéfices du milieu MD.

Enfin, une prolifération hors matériaux est visible sur les architectures trabéculaires, dès 7 jours et jusqu'à 21 jours. Deux types de prolifération observables : la prolifération dans les angles concaves et une prolifération d'une trabécule à une autre à l'image d'un pont cellulaire. La prolifération dans les angles concaves est un phénomène couramment étudié et connu [237]–[240]. Certaines études ont ainsi montré que ce phénomène pouvait être à l'origine d'une meilleure croissance cellulaire [241], améliorer la colonisation par les vaisseaux sanguins *in vivo* [242] ou encore présenterait une plus grande expression de la phosphatase alcaline (ALP) et du collagène de type 1 [243]. D'autres caractérisations sont alors nécessaires afin d'étudier avec plus de profondeur les caractéristiques résultant d'une prolifération hors matériaux dans les zones concaves pour cette étude biologique. Pour le second phénomène, je n'ai pas à ma connaissance trouvé d'articles faisant état de pont entre trabécules de cette manière. Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer ce phénomène comme le fait que ces cellules dépensent moins d'énergie dans la formation de ces jonctions ou encore que ces cellules aient un gain physiologique supérieur à l'énergie qu'il leur faut fournir pour former cette jonction hors matériaux.

Pour conclure, la géométrie de l'architecture trabéculaire semble bénéfique à la prolifération cellulaire. La densité cellulaire y est plus importante et les cellules présentent un tapis cellulaire dense avec un engagement des cellules dans les différents pores. De plus, les changements de morphologie cellulaire observés durant cette évaluation biologique impactent très certainement la prolifération et la différenciation comme il l'a été démontré dans la littérature.

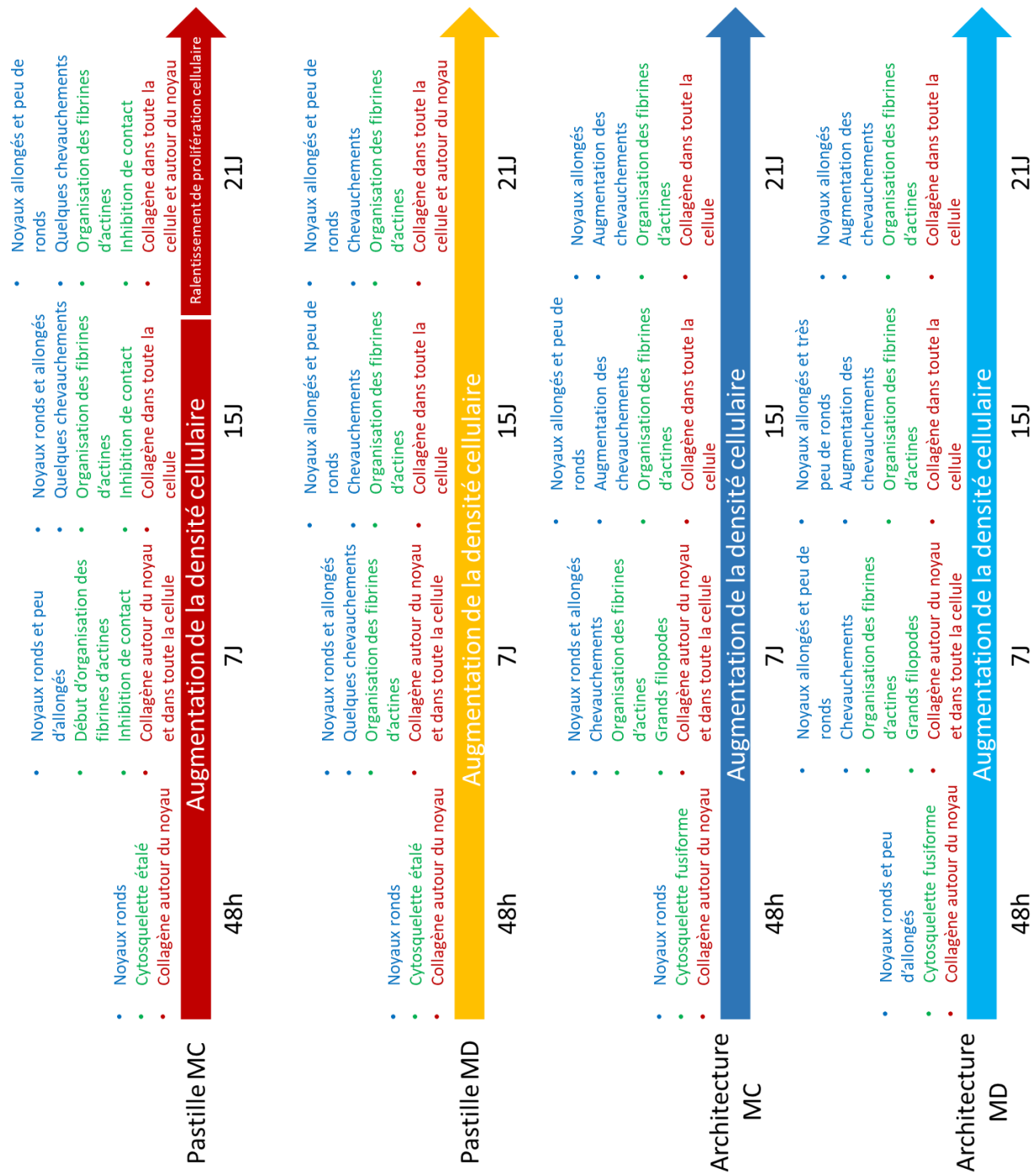


Figure 83 : Schéma récapitulatif des observations et analyses visuelles réalisées sur les micrographies d'immunofluorescences pour les conditions 48h, 7J, 15J et 21J des pastilles et architectures bio-inspirées en MC et MD.

### III.3.3. Résultats de la caractérisation par le rouge Alizarine

Le rouge Alizarine permet d'observer les dépôts de calcium voire, à un stade plus avancé, la matrice minéralisée. Les résultats de cette caractérisation sont présentés en Figure 84. Les résultats mettent en évidence, sur certaines conditions, une couleur violette et non rouge. Ce phénomène est dû à un changement de pH entre le matériau et la solution de rouge Alizarine et non à la présence de matrice minéralisée. Ce phénomène est visible sur les pastilles en milieu MC et MD à 7 jours et 15 jours (flèches noires sur la Figure 84). Cette coloration violette, préjudiciable à la visualisation du marquage rouge, ne représenterait donc pas des dépôts de calcium ni de matrice minéralisée.

Le marquage est visible sur l'ensemble de la surface de la pastille et sur l'ensemble de l'architecture. Sur l'architecture MC, quels que soient les temps de culture, aucune coloration n'est visible. Il semblerait que ce constat soit le même pour les conditions « pastille MC ». Pour les pastilles en milieu MD, un marquage rouge est observable sur les bords de la pastille, marquage non présent à 15 jours, mais présent à 21 jours. Pour les architectures en MD, le marquage n'est pas visible à 7 jours, perceptible à 15 jours et indéniablement observé à 21 jours où la matrice minéralisée est bien marquée. Ce test a donc mis en évidence des matrices minéralisées pour les deux supports (pastille et architecture) en milieu d'ostéodifférentiation (MD) à 21 jours.

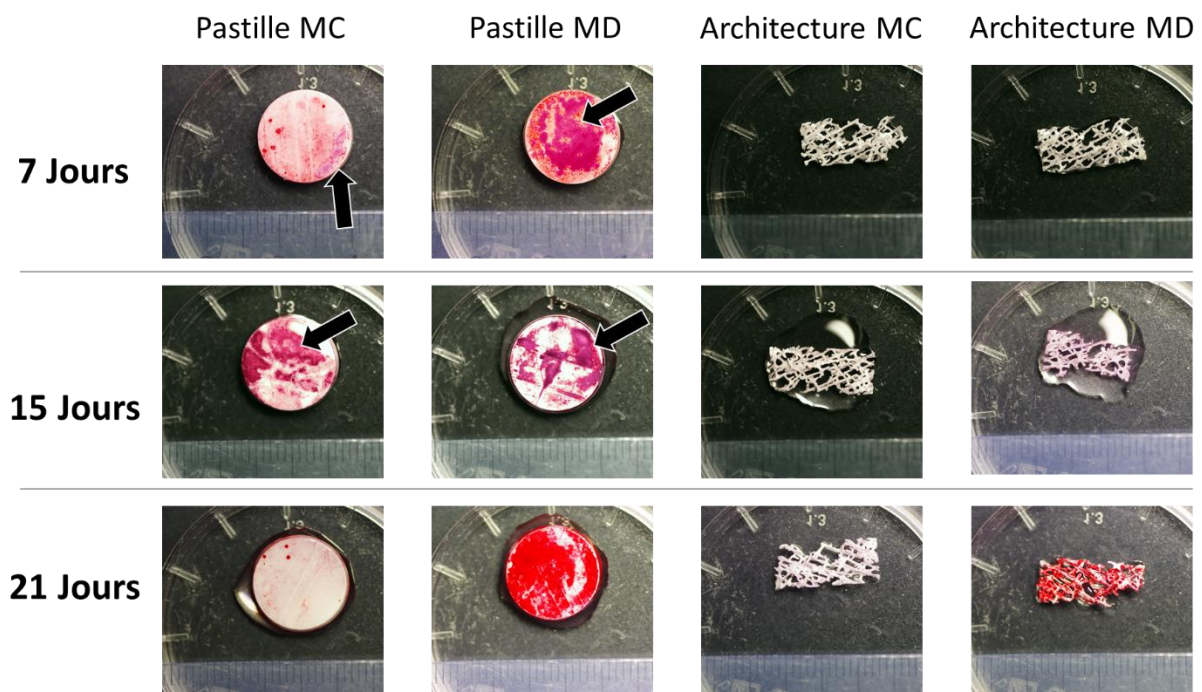


Figure 84 : Caractérisation de toutes les conditions à 7 jours, 15 jours et 21 jours au rouge Alizarine permettant d'observer les dépôts de calcium et à un stade plus avancé la matrice minéralisée.

Afin d'éliminer les doutes subsistant sur les conditions présentant une couleur violette et non rouge (pastilles MC et MD), des analyses au microscope électronique à balayage ont été réalisées. En effet, les cristaux d'hydroxyapatite sont visibles par cette technique de caractérisation permettant de confirmer le dépôt de calcium pour la condition pastille en MD à 7 jours et 15 jours.

Les résultats à 21 jours sont tout de même comparables entre eux. En se basant sur les conclusions des observations par immunofluorescence, la morphologie des noyaux est alors similaire entre les conditions pastilles en MD et architectures en milieux MC et MD. Or la minéralisation n'est pas observée sur la condition architecture en MC. Le changement de morphologie du noyau semble ne pas être suffisant à lui seul pour induire une différenciation. L'architecture trabéculaire bio-inspirée ne permettrait pas, à elle seule, une minéralisation de la matrice et donc une différenciation ostéoblastique des cellules stromales mésenchymateuses (MSCs).

#### III.3.4. Analyses par RT-qPCR

Cette technique de caractérisation permet de détecter et de quantifier des parties de l'ARN messagers (ARNm) des gènes. Caractériser les gènes d'une condition permet de définir la proportion de ce gène dans la cellule, soit l'expression d'un gène. Il est important de savoir que la forte expression d'un gène ne signifie pas que ce gène synthétise pour autant la protéine correspondante. Quantifier les gènes des conditions évaluées permet cependant de définir les différents stades de la différenciation des MSCs comme explicité dans la partie III.1.2.1 relative à la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses. Pour cette étude, 3 gènes de ménages et 5 gènes d'intérêts ont donc été utilisés (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Les résultats de cette caractérisation sont présentés en Figure 85. L'ensemble des résultats présenté est normé par rapport à la condition pastille MC.

Une RT-qPCR mesure donc une fluorescence à chaque cycle, et ce sur 40 cycles. Cependant, il est admis que lorsque la fluorescence n'est pas significative au-delà de 30 cycles, il convient de dire que le gène n'est pas exprimé dans ce cas. Or pour cette étude, un seul gène de ménage (GAPDH) et seulement 3 gènes d'intérêts (Runx2, ALPL et Col1A1) ont été exprimés, et sont détaillés ci-après.

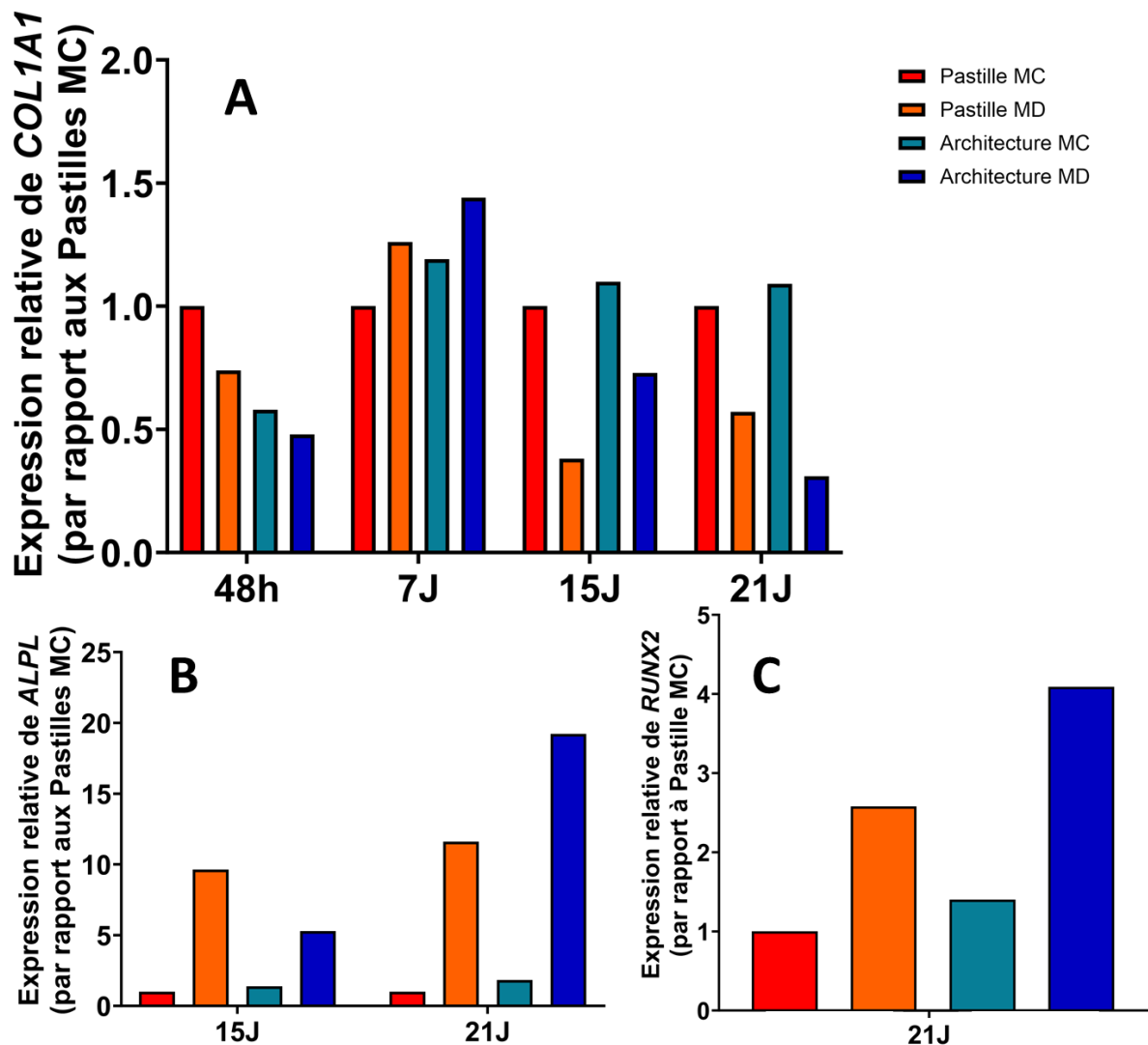


Figure 85 : Analyse par RTqPCR des conditions pastilles et architectures en MC et MD de l'expression (A) de *Collagène 1* sur les temps de 48h, 7J, 15J, 21J, de (B) *ALPL* sur les temps de 15J et 21J et de (C) *Runx2* sur 21J

Le *collagène 1* est exprimé dans la totalité des conditions évaluées sur pastille et sur architecture dès 48h et jusqu'à 21 jours (Figure 85, A). En proportion, à 48h, la condition pastille MC présente plus de collagène que les autres conditions. La condition architecture MD présente le moins de gènes exprimés à ce temps. Une augmentation de l'expression de ce gène d'intérêt est visible pour toutes les conditions évaluées avec les valeurs les plus élevées obtenues pour la condition architecture MD à 7J. À 15J, l'expression de ce gène est en augmentation pour les conditions en milieu complet (MC) et non pour les conditions en milieu d'ostéodifférentiation (MD) en baisse par rapport au contrôle. À 21J, les conditions en milieu complet (MC) continuent d'exprimer le gène *collagène 1*. Une augmentation plus importante est par ailleurs observée pour la condition architecture MC que la pastille MC. Une baisse de

l'expression de ce gène vis-à-vis du contrôle pour les conditions en milieu d'ostéodifférentiation (MD) est également observée. Cette diminution de l'expression de ce gène est plus significative pour la condition architecture MD que pour la pastille MD.

L'*ALPL* est, quant à lui, exprimé à partir de 15J de culture cellulaire (Figure 85, B). Sur 15J et 21J le gène est très faiblement exprimé dans les deux conditions en milieu complet (MC). L'expression de ce gène est bien plus forte pour les conditions en milieu d'ostéodifférentiation (MD). À 15J, l'expression est plus forte sur pastille à l'inverse, sur 21J l'expression est plus forte sur architecture toujours en milieu MD.

*Runx2* est exprimé seulement dans les conditions à 21J. En proportion, ce gène est peu exprimé dans les deux conditions en milieu complet (MC). Les conditions en milieu MD présentent, quant à elles, une meilleure expression de ce gène notamment pour le matériau architecture.

Durant la procédure expérimentale, une très faible quantité de matériel génétique a pu être extraite des conditions 48h et 7J du fait de la faible proportion de cellules ayant adhéré et proliféré à ce stade sur ces matériaux. Cette faible quantité de cellules suggère donc de faibles quantités d'ARN pour toutes les conditions. Or pour cette méthode de caractérisation, il est nécessaire de prélever la même quantité de matériel génétique. Ainsi dans le cadre de cette évaluation biologique, la plus faible quantité a été obtenue pour la condition architecture MC à 48 h. Les prélèvements se sont alors basés sur cette condition. La quantité d'ARNm n'était alors pas optimale pour cette méthode de caractérisation, car, un seul gène de ménage a pu être détecté, et ce de manière non homogène (car le nombre de cycles n'était pas équivalent en fonction de toutes les conditions). De plus, les gènes de ménage sont exprimés à des valeurs proches des gènes d'intérêts signifiant qu'une augmentation ou diminution d'expression de gènes n'est alors pas significative.

Les résultats montrent tout de même plusieurs tendances. Le *collagène 1*, (Figure 85, A), est détecté dans toutes les conditions, résultats confirmés par les images prises par immunofluorescence. Une deuxième tendance est visible notamment après 15J de culture. Le gène *ALPL* correspondant à la phosphatase alcaline, responsable de la minéralisation, est surexprimé dans les conditions MD après 15J. Enfin, le gène *runx2* est exprimé à 21J. Cependant, ce gène est exprimé au début de la différenciation et son expression postérieure à celle de l'*ALPL* est peu probable (Figure 68). Ce résultat conforte l'idée d'une quantité trop faible de matériel génétique pour ces analyses.

Afin d'améliorer la qualité et la précision de ces résultats, il est envisagé de réaliser à nouveau cette caractérisation en ne tenant pas compte de certaines conditions ou en utilisant un protocole alternatif. L'absence de prise en compte des conditions à 48h et à 7J permettrait

de tripler la quantité de matériel génétique pour cette étude et d'obtenir des valeurs plus précises. Cette solution ne prendrait alors en compte que les conditions 15J et 21J. Une autre solution serait de dupliquer le matériel génétique obtenu afin de travailler sur des quantités plus importantes et obtenir de meilleurs signaux lors de la caractérisation par RT-qPCR.

En complément de ces expériences, une caractérisation des protéines présentes dans les différentes conditions par Western Blot a été envisagée. Cependant pour la même raison que pour la caractérisation par RT-qPCR, le Western-Blot n'a pu donner de résultats probants du fait de la faible proportion de matériel génétique disponible. Afin de présenter des résultats de Western Blot, il est également envisagé de réaliser cette caractérisation sur les conditions à 15J et 21J seulement afin d'obtenir suffisamment de matériel génétique.

### III.4. Conclusion du chapitre 3

Le test de l'activité métabolique couplé aux observations par immunofluorescence des cellules a permis d'observer la présence de cellules sur l'ensemble des matériaux évalués. Une forte prolifération des cellules sur les architectures est observée notamment de 48h à 7 jours. À 21 jours, les architectures ayant une plus grande surface disponible, présentent une plus forte activité métabolique. De plus, une différence morphologique entre les différentes conditions est observée. La condition architecture en MD présente alors les changements morphologiques de la cellule les plus rapides. Ces résultats sont certainement dus à la topographie de l'architecture, mais également au milieu de différenciation utilisé. Ces changements morphologiques observés ont été comparés avec les données et études issues de la littérature. L'ensemble de ces études bibliographiques observe ce changement de morphologie du noyau et conclut sur une prolifération accrue des cellules ou à une différenciation accélérée. Dans le cadre de cette étude, une prolifération accrue des MSCs a bien été observée sur les architectures.

Dans la continuité de ces observations, un marquage au rouge Alizarine a été réalisé. Bien que les résultats ne soient pas efficaces sur toutes les conditions, de la matrice minéralisée est observée sur les deux supports (architectures et pastilles) à 21 jours en milieu MD. L'architecture trabéculaire bio-inspirée ne serait pas, à elle seule, motrice d'une différenciation des cellules stromales mésenchymateuses (MSCs).

Enfin, des analyses quantitatives ont été réalisées afin de déterminer l'expression des gènes par RT-qPCR et l'expression des protéines par Western Blot. L'ensemble de ces résultats a été altéré par la faible quantité de matériel génétique disponible pour ces caractérisations ne rendant pas possible l'exploitation formelle de ces résultats.

L'ensemble des résultats de cette étude conduisent à envisager un rôle de l'architecture trabéculaire dans la prolifération cellulaire. L'impact de la topographie de l'architecture trabéculaire est observable sur la morphologie cellulaire. Cependant, aucun lien évident entre la différenciation cellulaire et la morphologie cellulaire n'a pu être établi dans le cadre de cette étude. Pour pallier à ce manque, des micrographies au microscope électronique seront réalisées sur l'ensemble des conditions afin de déterminer la présence d'une matrice minéralisée. Les analyses quantitatives seront également réalisées en ne prenant en compte que les conditions à 15 jours et 21 jours, conditions présentant plus de matériels génétiques nécessaires à la bonne réalisation de ces caractérisations. Lorsque les démarches expérimentales seront satisfaisantes et concluantes, cette évaluation sera étendue à des cellules provenant de deux autres donneurs afin d'établir un modèle complet. L'objectif sera



de démontrer et de conclure sur le rôle de l'architecture trabéculaire bio-inspirée dans la prolifération et la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses.



## Conclusion générale et perspectives

---

La génération de défauts osseux de taille critique ne permet pas le processus naturel de remodelage osseux. L'élaboration d'implants synthétiques est un enjeu important dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse. L'architecture trabéculaire de l'os ressort comme une architecture bénéfique à la reconstruction osseuse. De plus, les technologies de fabrications additives permettent la réalisation de pièces à géométrie complexe. C'est dans ce contexte que des architectures denses trabéculaires bio-inspirées de l'os humain en hydroxyapatite ont été élaborées par stéréolithographie. L'obtention d'un modèle imprimable par microtomographie RX a rendu possible l'élaboration d'une architecture bio-inspirée.

L'obtention de ces architectures résulte de la maîtrise des paramètres d'impression qui a nécessité la réalisation d'un plan d'expériences sur trente architectures. Ainsi, une étude en 2D sur des paramètres machine (nombre de passage laser, puissance laser et épaisseur de couche) a pu être menée grâce aux mesures de nombres d'aires et de la surface polymérisée par couche. Ces paramètres ont été évalués à l'aide de modèle mathématique afin de définir leur influence durant la mise en forme et de proposer un modèle prédictif. Cette étude 2D a permis de définir une combinaison de paramètres permettant l'obtention d'une désirabilité de 88% sur une combinaison de paramètres.

Suite aux données recueillies lors de cette étude 2D, une étude en volume (3D) a pu être menée. Cette seconde étude a étudié de nouveaux paramètres quantitatifs (superficie totale, volume de l'architecture, connectivité, degrés d'anisotropie, l'épaisseur des trabécules) tout en les comparant avec le fichier source. Les résultats de cette étude ont conforté les résultats obtenus en 2D, c'est-à-dire la validation d'une combinaison de paramètres permettant l'obtention d'une architecture proche du fichier source. L'ensemble de ces études ont également montré l'impact de la surpolymérisation par l'augmentation de la surface polymérisée et la diminution du nombre d'aire entraînant une baisse de la résolution des architectures vis-à-vis du modèle source.

Enfin, les architectures ont été traitées thermiquement afin d'obtenir des céramiques denses favorables à la culture cellulaire *in vitro*. Un cycle de déliantage et de frittage (1 270°C pendant 2h) a ainsi pu être déterminé permettant l'obtention d'une architecture trabéculaire dense. Le retrait dimensionnel a été caractérisé par dilatométrie et mesures comparatives. Permettant d'obtenir la même superficie totale que le fichier source. L'ensemble des résultats a permis la réalisation d'une architecture trabéculaire de grand volume ( $> 1\text{cm}^3$ ). Les diverses méthodes de caractérisation (analyses par microtomographie RX, caractérisations du modèle

sur ImageJ, étude en 2D, création d'un modèle mathématique prédictif) utilisées dans ce manuscrit permettront l'étude de la topographie de cette architecture.

En perspectives, d'autres paramètres d'impression tels que la vitesse du laser ou encore l'écart des hachures pourraient faire l'objet d'un plan d'expérience plus étendu afin d'affiner la combinaison de paramètres optimale.

L'étude *in vitro* menée sur les architectures bio-inspirées de l'os trabéculaire a montré l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules stromales mésenchymateuse sur l'architecture. Des différences morphologiques ont été observées entre les cellules cultivées sur pastilles, servant de contrôle positif et sur les architectures. Ainsi, l'architecture, de par sa topographie, impacterait le comportement cellulaire. Cependant, le manque de matériel génétique n'a pas permis la réalisation correcte des caractérisations quantitatives. De plus, la topographie en 3D rend difficile la caractérisation quantitative par imagerie. Il résulte tout de même le caractère biocompatible de l'architecture.

Enfin concernant l'évaluation biologique l'étude présentée a permis la détermination des caractérisations à réaliser sur ces architectures. Il est nécessaire de les réaliser à nouveau avec des cellules provenant de deux autres donneurs afin de valider les résultats obtenus. Les caractérisations quantitatives, RT-qPCR et Western Blot, seront optimisées afin de déterminer avec plus de précision l'impact de l'architecture trabéculaire sur la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses. Une fois cette évaluation complétée, une nouvelle évaluation en conditions dynamiques à l'aide d'un bioréacteur à flux pourrait être envisagée sur des architectures de grand volume afin de valider les résultats observés *in vitro* en statique.

Pour finir, la mise en forme par stéréolithographie a permis l'élaboration d'architectures céramiques denses à base d'HA bio-inspirée de l'os trabéculaire. La pertinence de ce procédé à des fins de mise en forme de substituts osseux en céramique sur mesure comportant une porosité multi échelle contrôlée mimant l'os a donc été prouvée dans ce travail.



## Références bibliographiques

---

- [1] J. W. MD, “The classic: On the significance of the architecture of the spongy substance for the question of bone growth: A preliminary publication,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 469, no. 11, pp. 3077–3078, 2011, doi: 10.1007/s11999-011-2041-5.
- [2] A. Benninghoff, “Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion - Zweiter Teil: Der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion,” *Zeitschrift für Zellforsch. und Mikroskopische Anat.*, vol. 2, no. 5, pp. 783–862, Jan. 1925, doi: 10.1007/BF00583443/METRICS.
- [3] R. A. von. KÖLLIKER, *Éléments d’histologie humaine*. 1856.
- [4] V. v. Ebner, “Sind die Fibrillen des Knochengewebes verkalkt oder nicht?,” *Arch. für mikroskopische Anat.*, vol. 29, no. 1, pp. 213–236, 1887, doi: 10.1007/BF02955499/METRICS.
- [5] R. Zapanta LeGeros, “Apatites in biological systems,” *Prog. Cryst. Growth Charact.*, vol. 4, no. 1–2, pp. 1–45, 1981, doi: 10.1016/0146-3535(81)90046-0.
- [6] R. Z. LeGeros, “Calcium phosphate-based osteoinductive materials,” *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 11, pp. 4742–4753, Nov. 2008, doi: 10.1021/CR800427G/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2008-00427G\_0010.GIF.
- [7] O. M. Pearson and D. E. Lieberman, “The aging of Wolff’s ‘law’: Ontogeny and responses to mechanical loading in cortical bone,” *Yearb. Phys. Anthropol.*, vol. 47, pp. 63–99, 2004, doi: 10.1002/ajpa.20155.
- [8] Von Meyer, “Die Archit Der Spongiosa,” *Meyer, G.H. Von Arch. Fur Den Anat. Und Physiol. Wissenschaften Im Medizin*, vol. 34, pp. 615–628, 1867.
- [9] Karl Culmann, “Graphische Statik,” 1866.
- [10] A. Wiskott, “Aspects biologiques de la réponse osseuse aux contraintes mécaniques,” pp. 76–88, 2011.
- [11] J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, no. 2, pp. 92–102, 1998, doi: 10.1016/S1350-4533(98)00007-1.
- [12] R. W. McCalden, J. A. McGeough, and C. M. Court-Brown, “Age-related changes in the compressive strength of cancellous bone. The relative importance of changes in density and trabecular architecture,” *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 79, no. 3, pp. 421–427, 1997, doi: 10.2106/00004623-199703000-00016.
- [13] L. Mosekilde, L. Mosekilde, and C. C. Danielsen, “Biomechanical competence of vertebral trabecular bone in relation to ash density and age in normal individuals,” *Bone*, vol. 8, no. 2, pp. 79–85, 1987, doi: 10.1016/8756-3282(87)90074-3.
- [14] L. Mosekilde and L. Mosekilde, “Normal vertebral body size and compressive strength: Relations to age and to vertebral and iliac trabecular bone compressive strength,” *Bone*, vol. 7, no. 3, pp. 207–212, Jan. 1986, doi: 10.1016/8756-3282(86)90019-0.
- [15] R. Hodgskinson and J. D. Currey, “The effect of variation in structure on the Young’s modulus of cancellous bone: a comparison of human and non-human material,” *Proc.*

- Inst. Mech. Eng. H.*, vol. 204, no. 2, pp. 115–121, 1990, doi: 10.1243/PIME\_PROC\_1990\_204\_240\_02.
- [16] M. J. Ciarelli, S. A. Goldstein, J. L. Kuhn, D. D. Cody, and M. B. Brown, “Evaluation of orthogonal mechanical properties and density of human trabecular bone from the major metaphyseal regions with materials testing and computed tomography,” *J. Orthop. Res.*, vol. 9, no. 5, pp. 674–682, 1991, doi: 10.1002/JOR.1100090507.
- [17] J. L. Williams and J. L. Lewis, “Properties and an anisotropic model of cancellous bone from the proximal tibial epiphysis,” *J. Biomech. Eng.*, vol. 104, no. 1, pp. 50–56, 1982, doi: 10.1115/1.3138303.
- [18] H. M. Frost, “Wolff law and bone structural adaptation to mechanical usage.pdf.” pp. 175–189, 1994.
- [19] H. M. Frost, “Some ABCs of skeletal pathophysiology. III: Bone balance and the delta B.BMU,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 45, no. 3, pp. 131–133, May 1989, doi: 10.1007/BF02556053.
- [20] H. M. Frost, “Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff’s law: The bone modeling problem,” *Anat. Rec.*, vol. 226, no. 4, pp. 403–413, 1990, doi: 10.1002/ar.1092260403.
- [21] H. M. Frost, “Bone ‘mass’ and the ‘mechanostat’: a proposal,” *Anat. Rec.*, vol. 219, no. 1, pp. 1–9, 1987, doi: 10.1002/AR.1092190104.
- [22] L. Maïmoun and C. Sultan, “Effects of physical activity on bone remodeling,” *Metabolism.*, vol. 60, no. 3, pp. 373–388, 2011, doi: 10.1016/J.METABOL.2010.03.001.
- [23] K. T. Borer, “Physical Activity in the Prevention and Amelioration of Osteoporosis in Women,” *Sport. Med. 2005* 359, vol. 35, no. 9, pp. 779–830, Sep. 2012, doi: 10.2165/00007256-200535090-00004.
- [24] J. E. Zerwekh, L. A. Ruml, F. Gottschalk, and C. Y. C. Pak, “The effects of twelve weeks of bed rest on bone histology, biochemical markers of bone turnover, and calcium homeostasis in eleven normal subjects,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 13, no. 10, pp. 1594–1601, Oct. 1998, doi: 10.1359/JBMR.1998.13.10.1594.
- [25] L. Vico, D. Chappard, S. Palle, A. V. Bakulin, V. E. Novikov, and C. Alexandre, “Trabecular bone remodeling after seven days of weightlessness exposure (BIOCOSMOS 1667),” *Am. J. Physiol.*, vol. 255, no. 2 Pt 2, 1988, doi: 10.1152/AJPREGU.1988.255.2.R243.
- [26] G. Campoli, H. Weinans, and A. A. Zadpoor, “Computational load estimation of the femur,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 10, pp. 108–119, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.JMBBM.2012.02.011.
- [27] J. Kim, B. J. Chun, and J. J. Kim, “Quantitative Load Dependency Analysis of Local Trabecular Bone Microstructure to Understand the Spatial Characteristics in the Synthetic Proximal Femur,” *Biology (Basel).*, vol. 12, no. 2, 2023, doi: 10.3390/biology12020170.
- [28] J. P. Schmitz and J. O. Hollinger, “The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions.,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 205, no. 205, pp. 299–308, Apr. 1986, doi: 10.1097/00003086-198604000-00036.

- [29] J. F. Keating, A. H. R. W. Simpson, and C. M. Robinson, "The management of fractures with bone loss," *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B*, vol. 87, no. 2, pp. 142–150, Feb. 2005, doi: 10.1302/0301-620X.87B2.15874.
- [30] R. Annamalai, "Injectable osteogenic microtissues containing mesenchymal stromal cells conformally fill and repair critical-size defects," *Biomaterials*, vol. 208, pp. 32–44, 2019.
- [31] Y. L. Y. C. J. C. P. M. XJ Zhang, "Cell-free 3D scaffold with two-stage delivery of miRNA-26a to regenerate critical-sized bone defects," *Nat. Commun.*, vol. 7, 2016.
- [32] E. Schemitsch, "Size matters: defining critical in bone defect size!," *J. Orthop. Trauma*, vol. 31, pp. S20–S22, 2017.
- [33] M. Bez *et al.*, "In situ bone tissue engineering via ultrasound-mediated gene delivery to endogenous progenitor cells in mini-pigs," *Sci. Transl. Med.*, vol. 9, no. 390, May 2017, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.AAL3128.
- [34] C. P. Joshi, N. H. Dani, and S. U. Khedkar, "Alveolar ridge preservation using autogenous tooth graft versus beta-tricalcium phosphate alloplast: A randomized, controlled, prospective, clinical pilot study," *J. Indian Soc. Periodontol.*, vol. 20, no. 4, pp. 429–434, Jul. 2016, doi: 10.4103/0972-124X.188335.
- [35] T. Okada, T. Kanai, N. Tachikawa, M. Munakata, and S. Kasugai, "Long-term radiographic assessment of maxillary sinus floor augmentation using beta-tricalcium phosphate: analysis by cone-beam computed tomography," *Int. J. Implant Dent.*, vol. 2, no. 1, Dec. 2016, doi: 10.1186/S40729-016-0042-6.
- [36] A. Aziz Baiomy Abdullah, M. Fouad Edrees, and A. Mohamed Bakry, "Clinical, Radiographic, and Histological Assessment of Socket Preservation Using Melatonin with Beta-Tri-Calcium Phosphate for Receiving Dental Implant," <http://www.sciencepublishinggroup.com>, vol. 7, no. 1, p. 10, 2021, doi: 10.11648/J.BS.20210701.12.
- [37] Y. Klein, N. Kunthawong, O. Fleissig, N. Casap, D. Polak, and S. Chaushu, "The impact of alloplast and allograft on bone homeostasis: Orthodontic tooth movement into regenerated bone," *J. Periodontol.*, vol. 91, no. 8, pp. 1067–1075, Aug. 2020, doi: 10.1002/JPER.19-0145.
- [38] V. Campana *et al.*, "Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, no. 10, pp. 2445–2461, Sep. 2014, doi: 10.1007/S10856-014-5240-2.
- [39] C. Knabe *et al.*, "Effect of silicon-doped calcium phosphate bone grafting materials on bone regeneration and osteogenic marker expression after implantation in the ovine scapula," *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 107, no. 3, pp. 594–614, Apr. 2019, doi: 10.1002/JBM.B.34153.
- [40] I. Damlar, Ö. Erdoğan, U. Tatli, O. F. Arpaç, U. Görmez, and Y. Üstün, "Comparison of osteoconductive properties of three different  $\beta$ -tricalcium phosphate graft materials: A pilot histomorphometric study in a pig model," *J. Cranio-Maxillofacial Surg.*, vol. 43, no. 1, pp. 175–180, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.JCMS.2014.11.006.
- [41] M. J. Stoddart, M. Alini, and D. Platz, "Handbook of Bioceramics and Biocomposites," *Handb. Bioceram. Biocomposites*, pp. 1–27, 2014, doi: 10.1007/978-3-319-09230-0.



- [42] A. R. Amini, C. T. Laurencin, and S. P. Nukavarapu, "Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges," *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 40, no. 5, p. 363, 2012, doi: 10.1615/CRITREVBIOEMEDENG.V40.I5.10.
- [43] X. Ren *et al.*, "Osteoprotegerin reduces osteoclast resorption activity without affecting osteogenesis on nanoparticulate mineralized collagen scaffolds," *Sci. Adv.*, vol. 5, no. 6, pp. 4991–5003, Jun. 2019, doi: 10.1126/SCIADV.AAW4991/SUPPL\_FILE/AAW4991\_SM.PDF.
- [44] A. J. Lausch, L. C. Chong, H. Uludag, and E. D. Sone, "Multiphasic Collagen Scaffolds for Engineered Tissue Interfaces," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 28, no. 48, p. 1804730, Nov. 2018, doi: 10.1002/ADFM.201804730.
- [45] Y. Liu *et al.*, "Hierarchically Staggered Nanostructure of Mineralized Collagen as a Bone-Grafting Scaffold," *Adv. Mater.*, vol. 28, no. 39, pp. 8740–8748, Oct. 2016, doi: 10.1002/ADMA.201602628.
- [46] Y. Lai *et al.*, "Osteogenic magnesium incorporated into PLGA/TCP porous scaffold by 3D printing for repairing challenging bone defect," *Biomaterials*, vol. 197, pp. 207–219, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.01.013.
- [47] D. Moreau, C. Chauvet, F. Etienne, F. P. Rannou, and L. Corté, "Hydrogel films and coatings by swelling-induced gelation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 47, pp. 13295–13300, Nov. 2016, doi: 10.1073/PNAS.1609603113.
- [48] M. Lei *et al.*, "Programmable Electrofabrication of Porous Janus Films with Tunable Janus Balance for Anisotropic Cell Guidance and Tissue Regeneration," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 29, no. 18, p. 1900065, May 2019, doi: 10.1002/ADFM.201900065.
- [49] M. Diba *et al.*, "Composite Colloidal Gels Made of Bisphosphonate-Functionalized Gelatin and Bioactive Glass Particles for Regeneration of Osteoporotic Bone Defects," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 27, no. 45, p. 1703438, Dec. 2017, doi: 10.1002/ADFM.201703438.
- [50] A. Nasajpour *et al.*, "A Multifunctional Polymeric Periodontal Membrane with Osteogenic and Antibacterial Characteristics," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 28, no. 3, p. 1703437, Jan. 2018, doi: 10.1002/ADFM.201703437.
- [51] G. L. Koons, M. Diba, and A. G. Mikos, "Materials design for bone-tissue engineering," *Nat. Rev. Mater.*, vol. 5, no. 8, pp. 584–603, 2020, doi: 10.1038/s41578-020-0204-2.
- [52] M. Vallet-Regí and E. Ruiz-Hernández, "Bioceramics: from bone regeneration to cancer nanomedicine," *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 44, pp. 5177–5218, Nov. 2011, doi: 10.1002/ADMA.201101586.
- [53] G. Dubois, K. Michielsen, and M. Zandbergen, "Biomechanical Properties of Materialise PorsuTi Implants."
- [54] B. Wysocki, J. Idaszek, and K. Sził, "Post Processing and Biological Evaluation of the Titanium Scaffolds for Bone Tissue Engineering," 2016, doi: 10.3390/ma9030197.
- [55] P. Kumar and U. Ramamurty, "Microstructural optimization through heat treatment for enhancing the fracture toughness and fatigue crack growth resistance of selective laser melted Ti6Al4V alloy," *Acta Mater.*, vol. 169, pp. 45–59, May 2019, doi: 10.1016/J.ACTAMAT.2019.03.003.

- [56] P. Renner, S. Jha, Y. Chen, A. Raut, S. G. Mehta, and H. Liang, "A review on corrosion and wear of additively manufactured alloys," *J. Tribol.*, vol. 143, no. 5, May 2021, doi: 10.1115/1.4050503/1103641.
- [57] W. Zhao *et al.*, "Rapid evaluation of bioactive Ti-based surfaces using an in vitro titration method," *Nat. Commun.* 2019 101, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, May 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09673-1.
- [58] Y. K. Jo, B. H. Choi, C. S. Kim, and H. J. Cha, "Diatom-Inspired Silica Nanostructure Coatings with Controllable Microroughness Using an Engineered Mussel Protein Glue to Accelerate Bone Growth on Titanium-Based Implants," *Adv. Mater.*, vol. 29, no. 46, p. 1704906, Dec. 2017, doi: 10.1002/ADMA.201704906.
- [59] J. Li *et al.*, "Valence State Manipulation of Cerium Oxide Nanoparticles on a Titanium Surface for Modulating Cell Fate and Bone Formation," *Adv. Sci. (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Ger.)*, vol. 5, no. 2, Feb. 2017, doi: 10.1002/ADVS.201700678.
- [60] Q. L. Ma *et al.*, "Improved implant osseointegration of a nanostructured titanium surface via mediation of macrophage polarization," *Biomaterials*, vol. 35, no. 37, pp. 9853–9867, Dec. 2014, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.08.025.
- [61] C. Wang *et al.*, "Effect of Pore Size on the Physicochemical Properties and Osteogenesis of Ti6Al4V Porous Scaffolds with Bionic Structure," *ACS Omega*, vol. 5, no. 44, pp. 28684–28692, Nov. 2020, doi: 10.1021/ACSOMEGA.0C03824/ASSET/IMAGES/LARGE/AO0C03824\_0012.JPEG.
- [62] T. Takizawa *et al.*, "Titanium Fiber Plates for Bone Tissue Repair," *Adv. Mater.*, vol. 30, no. 4, Jan. 2018, doi: 10.1002/ADMA.201703608.
- [63] J. W. Lee *et al.*, "Long-term clinical study and multiscale analysis of in vivo biodegradation mechanism of Mg alloy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 3, pp. 716–721, Jan. 2016, doi: 10.1073/PNAS.1518238113/SUPPL\_FILE/PNAS.1518238113.SAPP.PDF.
- [64] Y. Kohno *et al.*, "Treating Titanium Particle-Induced Inflammation with Genetically Modified NF- $\kappa$ B Sensing IL-4 Secreting or Preconditioned Mesenchymal Stem Cells in Vitro," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, no. 6, pp. 3032–3038, Jun. 2019, doi: 10.1021/ACSBIMATERIALS.9B00560/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AB-2019-00560X\_0007.GIF.
- [65] J. F. Bergmann Verlag, K. Zweymüller, and M. Semlitsch, "Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery Concept and Material Properties of a Cementless Hip Prosthesis System with A 1 2 0 3 Ceramic Ball Heads and Wrought Ti-6 Al-4 V Stems\*," *Arch Orthop Trauma Surg*, vol. 100, pp. 229–236, 1982.
- [66] L. Zetterqvist, G. Anneroth, and A. Nordenram, "Tissue integration of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ceramic dental implants: an experimental study in monkeys," *Int J Oral Maxillofac Implant.*, vol. 6, no. 3, pp. 285–293, 1991, Accessed: Jun. 01, 2023. [Online]. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1813397](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1813397).
- [67] J. Brie *et al.*, "A new custom made bioceramic implant for the repair of large and complex craniofacial bone defects," *J. Cranio-Maxillofacial Surg.*, vol. 41, no. 5, pp. 403–407, 2013, doi: 10.1016/j.jcms.2012.11.005.

- [68] S. Yanyan, W. Guangxin, S. Guoqing, W. Yaming, L. Wuhui, and A. Osaka, "Effects of amino acids on conversion of calcium carbonate to hydroxyapatite," *RSC Adv.*, vol. 10, no. 61, pp. 37005–37013, Oct. 2020, doi: 10.1039/D0RA07636H.
- [69] M. Prakasam, J. Locs, K. Salma-Ancane, D. Loca, A. Largeteau, and L. Berzina-Cimdina, "Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review," *J. Funct. Biomater.*, vol. 6, no. 4, pp. 1099–1140, Dec. 2015, doi: 10.3390/JFB6041099.
- [70] K. Pajor, L. Pajchel, and J. Kolmas, "Hydroxyapatite and fluorapatite in conservative dentistry and oral implantology-a review," *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 7, 2019, doi: 10.3390/MA12172683.
- [71] W. Götz *et al.*, "A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig," *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 589–596, 2010, doi: 10.2478/V10042-010-0096-X.
- [72] J. L. O. Oh, Sunho, Namsik Oh, Mark Appleford, "Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review Sunho," vol. 2, no. 2, pp. 1–23, 2016.
- [73] H. Qin *et al.*, "3D printed bioceramic scaffolds: Adjusting pore dimension is beneficial for mandibular bone defects repair," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 16, no. 4, pp. 409–421, Apr. 2022, doi: 10.1002/TERM.3287.
- [74] S. Bose and S. Tarafder, "Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 4, pp. 1401–1421, 2012, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2011.11.017.
- [75] M. Bohner *et al.*, "Characterization and distribution of mechanically competent mineralized tissue in micropores of  $\beta$ -tricalcium phosphate bone substitutes," *Mater. Today*, vol. 20, no. 3, pp. 106–115, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.MATTOD.2017.02.002.
- [76] Y. Zhu *et al.*, "Bone regeneration with micro/nano hybrid-structured biphasic calcium phosphate bioceramics at segmental bone defect and the induced immunoregulation of MSCs," *Biomaterials*, vol. 147, pp. 133–144, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2017.09.018.
- [77] U. Rüdrieh *et al.*, "Pre-osteoblast cell colonization of porous silicon substituted hydroxyapatite bioceramics: Influence of microporosity and macropore design," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 97, no. February 2018, pp. 510–528, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.12.046.
- [78] A. L. Dallabrida *et al.*, "Bioceramic characterization of calcium phosphates microstructured in different composition in sheep," *Pesqui. Vet. Bras.*, vol. 38, no. 7, pp. 1327–1336, Jul. 2018, doi: 10.1590/1678-5150-PVB-4930.
- [79] H. Ma, C. Feng, J. Chang, and C. Wu, "3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy," *Acta Biomater.*, vol. 79, pp. 37–59, 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.08.026.
- [80] Y. Zhu *et al.*, "3D printing biomimetic materials and structures for biomedical applications," *Bio-Design Manuf.*, vol. 4, no. 2, pp. 405–428, Jun. 2021, doi: 10.1007/S42242-020-00117-0.
- [81] G. Liu *et al.*, "Additive manufacturing of structural materials," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 145, p. 100596, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.MSER.2020.100596.

- [82] J. Li, C. Wu, P. K. Chu, and M. Gelinsky, "3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 140, p. 100543, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.MSER.2020.100543.
- [83] M. Javaid and A. Haleem, "Additive manufacturing applications in medical cases: A literature based review," *Alexandria J. Med.*, vol. 54, no. 4, pp. 411–422, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.AJME.2017.09.003.
- [84] A. Al Rashid, S. A. Khan, S. G. Al-Ghamdi, and M. Koç, "Additive manufacturing: Technology, applications, markets, and opportunities for the built environment," *Autom. Constr.*, vol. 118, p. 103268, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.AUTCON.2020.103268.
- [85] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, and K. W. Leong, "Biomedical applications of polymer-composite materials: a review," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 61, no. 9, pp. 1189–1224, Jul. 2001, doi: 10.1016/S0266-3538(00)00241-4.
- [86] E. Rezvani Ghomi, S. Khalili, S. Nouri Khorasani, R. Esmaeely Neisiany, and S. Ramakrishna, "Wound dressings: Current advances and future directions," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 136, no. 27, p. 47738, Jul. 2019, doi: 10.1002/APP.47738.
- [87] O. Faour, R. Dimitriou, C. A. Cousins, and P. V. Giannoudis, "The use of bone graft substitutes in large cancellous voids: any specific needs?," *Injury*, vol. 42 Suppl 2, no. SUPPL. 2, Sep. 2011, doi: 10.1016/J.INJURY.2011.06.020.
- [88] "Bone Grafts And Substitutes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Material Type (Allograft, Synthetic), By Application (Craniofacial, Dental, Foot & Ankle, Joint Reconstruction), By Region, And Segment Forecasts, 2023 - 2030." <https://www.marketresearch.com/Grand-View-Research-v4060/Bone-Grafts-Substitutes-Size-Share-34336431/> (accessed Jun. 12, 2023).
- [89] S. Lim, R. A. Buswell, T. T. Le, S. A. Austin, A. G. F. Gibb, and T. Thorpe, "Developments in construction-scale additive manufacturing processes," *Autom. Constr.*, vol. 21, no. 1, pp. 262–268, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.AUTCON.2011.06.010.
- [90] C. Zhang *et al.*, "Design Strategies and Biomimetic Approaches for Calcium Phosphate Scaffolds in Bone Tissue Regeneration," *Biomimetics*, vol. 7, 2022, doi: 10.3390/biomimetics7030112.
- [91] J. Saggio-Woyansky, C. Scott, and W. P. Minnear, "Processing of porous ceramics," *Am. Ceram. Soc. Bull.*, 1992.
- [92] R. de Andrade *et al.*, "Hierarchically porous bioceramics based on geopolymers-hydroxyapatite composite as a novel biomaterial: Structure, mechanical properties and biocompatibility evaluation," *Appl. Mater. Today*, vol. 33, p. 101875, Aug. 2023, doi: 10.1016/J.APMT.2023.101875.
- [93] A. Pardini, "Développement de bioverre poreux ostéoinducteur pour application à l'orthopédie et à l'ingénierie tissulaire par," 2007.
- [94] S. Deville, E. Saiz, and A. P. Tomsia, "Ice-templated porous alumina structures," *Acta Mater.*, vol. 55, no. 6, pp. 1965–1974, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.actamat.2006.11.003.
- [95] D. Jeyachandran and M. Cerruti, "Glass, Ceramic, Polymeric, and Composite Scaffolds with Multiscale Porosity for Bone Tissue Engineering," *Adv. Eng. Mater.*, vol. 25, no. 17, p. 2201743, Sep. 2023, doi: 10.1002/ADEM.202201743.

- [96] C. K. Chua, K. F. Leong, and C. S. Lim, "Rapid prototyping: Principles and applications, third edition," *Rapid Prototyp. Princ. Appl. Third Ed.*, pp. 1–512, Jan. 2010, doi: 10.1142/6665.
- [97] T. Chartier, V. Pateloup, and C. Chaput, "Élaboration de Pièces Céramiques par Fabrication Additive," *Tech. l'ingénieur*, vol. 33, no. 0, 2018, [Online]. Available: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/ceramiques-42578210/elaboration-de-pieces-ceramiques-par-fabrication-additive-n4807/>.
- [98] Z. U. Arif *et al.*, "Additive manufacturing of sustainable biomaterials for biomedical applications," *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 18, no. 3, p. 100812, May 2023, doi: 10.1016/J.AJPS.2023.100812.
- [99] A. Nouri, A. Rohani Shirvan, Y. Li, and C. Wen, "Additive manufacturing of metallic and polymeric load-bearing biomaterials using laser powder bed fusion: A review," *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 94, pp. 196–215, 2021, doi: 10.1016/j.jmst.2021.03.058.
- [100] X. P. Tan, Y. J. Tan, C. S. L. Chow, S. B. Tor, and W. Y. Yeong, "Metallic powder-bed based 3D printing of cellular scaffolds for orthopaedic implants: A state-of-the-art review on manufacturing, topological design, mechanical properties and biocompatibility," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 1328–1343, Jul. 2017, doi: 10.1016/J.MSEC.2017.02.094.
- [101] M. Lindner *et al.*, "Manufacturing of individual biodegradable bone substitute implants using selective laser melting technique," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 97A, no. 4, pp. 466–471, Jun. 2011, doi: 10.1002/JBM.A.33058.
- [102] J. N. Dinoro *et al.*, "Laser Sintering Approaches for Bone Tissue Engineering," *Polym. 2022, Vol. 14, Page 2336*, vol. 14, no. 12, p. 2336, Jun. 2022, doi: 10.3390/POLYM14122336.
- [103] H. Schappo *et al.*, "Laser powder bed fusion of ultra-high-molecular-weight polyethylene/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering," *Powder Technol.*, vol. 412, p. 117966, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.POWTEC.2022.117966.
- [104] H. Schappo, K. Giry, G. Salmoria, C. Damia, and D. Hotza, "Polymer/calcium phosphate biocomposites manufactured by selective laser sintering: an overview," *Prog. Addit. Manuf.* 2022 82, vol. 8, no. 2, pp. 285–301, Aug. 2022, doi: 10.1007/S40964-022-00332-4.
- [105] P. Feng *et al.*, "A Multimaterial Scaffold With Tunable Properties: Toward Bone Tissue Repair," *Adv. Sci.*, vol. 5, no. 6, p. 1700817, Jun. 2018, doi: 10.1002/ADVS.201700817.
- [106] Y. Du *et al.*, "Selective laser sintering scaffold with hierarchical architecture and gradient composition for osteochondral repair in rabbits," *Biomaterials*, vol. 137, pp. 37–48, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2017.05.021.
- [107] D. Hong *et al.*, "Binder-jetting 3D printing and alloy development of new biodegradable Fe-Mn-Ca/Mg alloys," *Acta Biomater.*, vol. 45, pp. 375–386, 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2016.08.032.
- [108] H. Miyajima, S. Zhang, A. Lassell, A. Zandinejad, and L. Yang, "Process Development of Porcelain Ceramic Material with Binder Jetting Process for Dental Applications," *JOM*, vol. 68, no. 3, pp. 831–841, Mar. 2016, doi: 10.1007/S11837-015-1771-3.

- [109] E. Sheydaei, O. O. Ibadode, E. Hu, R. Pilliar, R. Kandel, and E. Toyserkani, "Additive manufacture of porous ceramic proximal interphalangeal (PIP) joint implant: design and process optimization," *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, vol. 115, no. 9–10, pp. 2825–2837, Aug. 2021, doi: 10.1007/S00170-021-07283-0/FIGURES/12.
- [110] M. Hassan, K. Dave, R. Chandrawati, F. Dehghani, and V. G. Gomes, "3D printing of biopolymer nanocomposites for tissue engineering: Nanomaterials, processing and structure-function relation," *Eur. Polym. J.*, vol. 121, no. October 2019, p. 109340, 2019, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109340.
- [111] B. Bisht, A. Hope, A. Mukherjee, and M. K. Paul, "Advances in the Fabrication of Scaffold and 3D Printing of Biomimetic Bone Graft," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 49, no. 4, pp. 1128–1150, Apr. 2021, doi: 10.1007/S10439-021-02752-9/FIGURES/6.
- [112] J. Park *et al.*, "Cell-laden 3D bioprinting hydrogel matrix depending on different compositions for soft tissue engineering: Characterization and evaluation," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 71, pp. 678–684, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.MSEC.2016.10.069.
- [113] J. Gopinathan and I. Noh, "Recent trends in bioinks for 3D printing," *Biomater. Res.* 2018 221, vol. 22, no. 1, pp. 1–15, Apr. 2018, doi: 10.1186/S40824-018-0122-1.
- [114] C. Liang, J. Huang, J. Wang, H. Gong, W. Guo, and R. Cao, "Journal of the European Ceramic Society Three-dimensional inkjet printing and low temperature sintering of silica-based ceramics," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 43, no. 5, pp. 2289–2294, 2023, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2023.01.003.
- [115] K. A. G. Katsogiannis, G. T. Vladislavljević, and S. Georgiadou, "Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation," *Eur. Polym. J.*, vol. 69, pp. 284–295, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2015.01.028.
- [116] M. Türk and A. M. Deliormanli, "Graphene-containing PCL- coated Porous 13-93B3 Bioactive Glass Scaffolds for Bone Regeneration," *Mater. Res. Express*, vol. 5, no. 4, p. 045406, Apr. 2018, doi: 10.1088/2053-1591/AAB87B.
- [117] M. Shahrezaee, M. Salehi, S. Keshtkari, A. Oryan, A. Kamali, and B. Shekarchi, "In vitro and in vivo investigation of PLA/PCL scaffold coated with metformin-loaded gelatin nanocarriers in regeneration of critical-sized bone defects," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 14, no. 7, pp. 2061–2073, Oct. 2018, doi: 10.1016/J.NANO.2018.06.007.
- [118] Y. P. Singh, A. Bandyopadhyay, and B. B. Mandal, "3D Bioprinting Using Cross-Linker-Free Silk-Gelatin Bioink for Cartilage Tissue Engineering," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 11, no. 37, pp. 33684–33696, Sep. 2019, doi: 10.1021/ACSAMI.9B11644/SUPPL\_FILE/AM9B11644\_SI\_001.PDF.
- [119] X. Zhai *et al.*, "3D-Printed High Strength Bioactive Supramolecular Polymer/Clay Nanocomposite Hydrogel Scaffold for Bone Regeneration," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 3, no. 6, pp. 1109–1118, Jun. 2017, doi: 10.1021/ACSBBIOMATERIALS.7B00224/ASSET/IMAGES/LARGE/AB-2017-00224X\_0006.JPEG.
- [120] J. G. Dellinger, J. Cesarano, and R. D. Jamison, "Robotic deposition of model hydroxyapatite scaffolds with multiple architectures and multiscale porosity for bone tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 82, no. 2, pp. 383–394, Aug. 2007, doi: 10.1002/JBM.A.31072.

- [121] L. Sandanamsamy *et al.*, “A comprehensive review on fused deposition modelling of polylactic acid,” *Prog. Addit. Manuf.* 2022, pp. 1–25, Oct. 2022, doi: 10.1007/S40964-022-00356-W.
- [122] B. Charbonnier, C. Laurent, and D. Marchat, “Porous hydroxyapatite bioceramics produced by impregnation of 3D-printed wax mold: Slurry feature optimization,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 36, no. 16, pp. 4269–4279, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.JEURCERAMSOC.2016.06.005.
- [123] T.-M. G. Chu, J. W. Halloran, S. J. Hollister, and S. E. Feinberg, “ALSiNMEICINE 12 (200 Hydroxyapatite implants with designed internal architecture,” pp. 7–8.
- [124] F. P. W. Melchels, J. Feijen, and D. W. Grijpma, “A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 24, pp. 6121–6130, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.050.
- [125] C. Arakawa, R. Ng, S. Tan, S. Kim, B. Wu, and M. Lee, “Photopolymerizable chitosan–collagen hydrogels for bone tissue engineering,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 11, no. 1, pp. 164–174, Jan. 2017, doi: 10.1002/TERM.1896.
- [126] Y. Zheng *et al.*, “Tissue transformation mold design and stereolithography fabrication,” *Rapid Prototyp. J.*, vol. 23, no. 1, pp. 162–168, 2017, doi: 10.1108/RPJ-10-2015-0133/FULL/XML.
- [127] C. Schmidleithner, S. Malferrari, R. Palgrave, D. Bomze, M. Schwentenwein, and D. M. Kalaskar, “Application of high resolution DLP stereolithography for fabrication of tricalcium phosphate scaffolds for bone regeneration,” *Biomed. Mater.*, vol. 14, no. 4, Jun. 2019, doi: 10.1088/1748-605X/AB279D.
- [128] Z. Wang, C. Huang, J. Wang, B. Zou, C. A. Abbas, and X. Wang, “Design and Characterization of Hydroxyapatite Scaffolds Fabricated by Stereolithography for Bone Tissue Engineering Application,” *Procedia CIRP*, vol. 89, no. March, pp. 170–175, 2020, doi: 10.1016/j.procir.2020.05.138.
- [129] T. Chartier *et al.*, “Additive manufacturing to produce complex 3D ceramic parts,” *J. Ceram. Sci. Technol.*, vol. 6, no. 2, pp. 95–104, 2014, doi: 10.4416/JCST2014-00040.
- [130] M. De Lisi, C. Shu, U. M. Attia, and K. Essa, “DLP of Translucent Alumina: In-Depth Investigation on Slurry Development and Debinding Regimes,” *Machines*, vol. 11, no. 3, 2023, doi: 10.3390/machines11030321.
- [131] J. Rauchenecker, J. Rabitsch, M. Schwentenwein, and T. Konegger, “Additive manufacturing of aluminum nitride ceramics with high thermal conductivity via digital light processing,” *Open Ceram.*, vol. 9, p. 100215, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.OCERAM.2021.100215.
- [132] P. E. Bourguine *et al.*, “Engineered Extracellular Matrices as Biomaterials of Tunable Composition and Function,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 27, no. 7, p. 1605486, Feb. 2017, doi: 10.1002/ADFM.201605486.
- [133] A. M. Tatara *et al.*, “Biomaterials-aided mandibular reconstruction using in vivo bioreactors,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 14, pp. 6954–6963, Apr. 2019, doi: 10.1073/PNAS.1819246116/SUPPL\_FILE/PNAS.1819246116.SAPP.PDF.
- [134] S. Bhumiratana *et al.*, “Tissue-engineered autologous grafts for facial bone reconstruction,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 343, Jun. 2016, doi:

10.1126/SCITRANSLMED.AAD5904.

- [135] S. Heinemann, C. Heinemann, S. Wenisch, V. Alt, H. Worch, and T. Hanke, "Calcium phosphate phases integrated in silica/collagen nanocomposite xerogels enhance the bioactivity and ultimately manipulate the osteoblast/osteoclast ratio in a human co-culture model," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4878–4888, 2013, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2012.10.010.
- [136] D. J. Hadjidakis and I. I. Androulakis, "Bone Remodeling," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1092, no. 1, pp. 385–396, Dec. 2006, doi: 10.1196/ANNALS.1365.035.
- [137] N. A. Sims and T. J. Martin, "Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit," *Bonekey Rep.*, vol. 3, Jan. 2014, doi: 10.1038/BONEKEY.2013.215.
- [138] A. E. Jakus *et al.*, "Hyperelastic 'bone': A highly versatile, growth factor-free, osteoregenerative, scalable, and surgically friendly biomaterial," *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 358, Sep. 2016, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.AAF7704.
- [139] Y. Du *et al.*, "Selective laser sintering scaffold with hierarchical architecture and gradient composition for osteochondral repair in rabbits," *Biomaterials*, vol. 137, pp. 37–48, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2017.05.021.
- [140] F. Gao *et al.*, "Direct 3D Printing of High Strength Biohybrid Gradient Hydrogel Scaffolds for Efficient Repair of Osteochondral Defect," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 28, no. 13, p. 1706644, Mar. 2018, doi: 10.1002/ADFM.201706644.
- [141] Z. Lin *et al.*, "Precisely controlled delivery of magnesium ions thru sponge-like monodisperse PLGA/nano-MgO-alginate core-shell microsphere device to enable in-situ bone regeneration," *Biomaterials*, vol. 174, pp. 1–16, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2018.05.011.
- [142] M. Diba *et al.*, "Composite Colloidal Gels Made of Bisphosphonate-Functionalized Gelatin and Bioactive Glass Particles for Regeneration of Osteoporotic Bone Defects," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 27, no. 45, p. 1703438, Dec. 2017, doi: 10.1002/ADFM.201703438.
- [143] J. A. Kim *et al.*, "Magnesium phosphate ceramics incorporating a novel indene compound promote osteoblast differentiation in vitro and bone regeneration in vivo," *Biomaterials*, vol. 157, pp. 51–61, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2017.11.032.
- [144] G. S. A. Boersema, N. Grotenhuis, Y. Bayon, J. F. Lange, and Y. M. Bastiaansen-Jenniskens, "The Effect of Biomaterials Used for Tissue Regeneration Purposes on Polarization of Macrophages," *Biores. Open Access*, vol. 5, no. 1, pp. 6–14, Jan. 2016, doi: 10.1089/BIORES.2015.0041.
- [145] J. S. Jeon *et al.*, "Generation of 3D functional microvascular networks with human mesenchymal stem cells in microfluidic systems," *Integr. Biol. (Camb).*, vol. 6, no. 5, pp. 555–563, 2014, doi: 10.1039/C3IB40267C.
- [146] H. M. Zhou *et al.*, "In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material," *J. Endod.*, vol. 39, no. 4, pp. 478–483, Apr. 2013, doi: 10.1016/J.JOEN.2012.11.026.
- [147] S. Horváth, "Cytotoxicity of drugs and diverse chemical agents to cell cultures," *Toxicology*, vol. 16, no. 1, pp. 59–66, 1980, doi: 10.1016/0300-483X(80)90110-9.



- [148] W. L. Grayson, T. P. Martens, G. M. Eng, M. Radisic, and G. Vunjak-Novakovic, "Biomimetic approach to tissue engineering," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, no. 6, pp. 665–673, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2008.12.008.
- [149] G. Bouet, M. Cruel, C. Laurent, L. Vico, L. Malaval, and D. Marchat, "Validation of an in vitro 3D bone culture model with perfused and mechanically stressed ceramic scaffold," *Eur. Cells Mater.*, vol. 29, pp. 250–267, 2015, doi: 10.22203/eCM.v029a19.
- [150] S. Coecke *et al.*, "Metabolism: a bottleneck in in vitro toxicological test development. The report and recommendations of ECVAM workshop 54," *Altern. Lab. Anim.*, vol. 34, no. 1, pp. 49–84, 2006, doi: 10.1177/026119290603400113.
- [151] T. Hartung and G. Daston, "Are in vitro tests suitable for regulatory use?," *Toxicol. Sci.*, vol. 111, no. 2, pp. 233–237, 2009, doi: 10.1093/TOXSCI/KFP149.
- [152] Paola Palmero ; Francis Cambier et Eamonn De Barra, *Advances in ceramic biomaterials*. 2016.
- [153] S. Zwingenberger *et al.*, "Establishment of a femoral critical-size bone defect model in immunodeficient mice," *J. Surg. Res.*, vol. 181, no. 1, p. e7, May 2013, doi: 10.1016/J.JSS.2012.06.039.
- [154] X. Zhang *et al.*, "Osteoconductive effectiveness of bone graft derived from antler cancellous bone: an experimental study in the rabbit mandible defect model," *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 41, no. 11, pp. 1330–1337, Nov. 2012, doi: 10.1016/J.IJOM.2012.05.014.
- [155] H. L. Yang *et al.*, "Bone healing response to a synthetic calcium sulfate/ $\beta$ -tricalcium phosphate graft material in a sheep vertebral body defect model," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 100B, no. 7, pp. 1911–1921, Oct. 2012, doi: 10.1002/JBM.B.32758.
- [156] F. Wehrhan, K. Amann, A. Molenberg, R. Lutz, F. W. Neukam, and K. A. Schlegel, "PEG matrix enables cell-mediated local BMP-2 gene delivery and increased bone formation in a porcine critical size defect model of craniofacial bone regeneration," *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 23, no. 7, pp. 805–813, Jul. 2012, doi: 10.1111/J.1600-0501.2011.02223.X.
- [157] K. Yano *et al.*, "Regenerative repair of bone defects with osteoinductive hydroxyapatite fabricated to match the defect and implanted with combined use of computer-aided design, computer-aided manufacturing, and computer-assisted surgery systems: a feasibility study in a canine model," *J. Orthop. Sci.*, vol. 17, no. 4, pp. 484–489, Jul. 2012, doi: 10.1007/S00776-012-0235-7.
- [158] E. Lippens *et al.*, "Evaluation of Bone Regeneration with an Injectable, In Situ Polymerizable Pluronic® F127 Hydrogel Derivative Combined with Autologous Mesenchymal Stem Cells in a Goat Tibia Defect Model," <https://home.liebertpub.com/tea>, vol. 16, no. 2, pp. 617–627, Oct. 2009, doi: 10.1089/TEN.TEA.2009.0418.
- [159] C. V. Rahman *et al.*, "Controlled release of BMP-2 from a sintered polymer scaffold enhances bone repair in a mouse calvarial defect model," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 8, no. 1, pp. 59–66, Jan. 2014, doi: 10.1002/TERM.1497.
- [160] R. Li, A. Nauth, C. Li, E. Qamirani, K. Atesok, and E. H. Schemitsch, "Expression of

- VEGF gene isoforms in a rat segmental bone defect model treated with EPCs," *J. Orthop. Trauma*, vol. 26, no. 12, pp. 689–692, Dec. 2012, doi: 10.1097/BOT.0B013E318266EB7E.
- [161] B. G. Mohan, S. J. Shenoy, S. S. Babu, H. K. Varma, and A. John, "Strontium calcium phosphate for the repair of leporine (*Oryctolagus cuniculus*) ulna segmental defect," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 101A, no. 1, pp. 261–271, Jan. 2013, doi: 10.1002/JBM.A.34324.
- [162] Y. Li, S. K. Chen, L. Li, L. Qin, X. L. Wang, and Y. X. Lai, "Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials," *J. Orthop. Transl.*, vol. 3, no. 3, pp. 95–104, 2015, doi: 10.1016/j.jot.2015.05.002.
- [163] M. Bohner, Y. Loosli, G. Baroud, and D. Lacroix, "Deciphering the link between architecture and biological response of a bone graft substitute," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 2, pp. 478–484, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.08.008.
- [164] V. Karageorgiou and D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis," *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5474–5491, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
- [165] R. Halouani, D. Bernache-Assolant, E. Champion, and A. Ababou, "Microstructure and related mechanical properties of hot pressed hydroxyapatite ceramics," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 5, no. 8, pp. 563–568, 1994, doi: 10.1007/BF00124890.
- [166] K. A. Hing, B. Annaz, S. Saeed, P. A. Revell, and T. Buckland, "Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 16, no. 5, pp. 467–475, May 2005, doi: 10.1007/S10856-005-6988-1.
- [167] J. Will *et al.*, "Porous ceramic bone scaffolds for vascularized bone tissue regeneration," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 8, pp. 2781–2790, Aug. 2008, doi: 10.1007/S10856-007-3346-5.
- [168] T. M. Koushik, C. M. Miller, and E. Antunes, "REVIEW www.advhealthmat.de Bone Tissue Engineering Scaffolds: Function of Multi-Material Hierarchically Structured Scaffolds," 2023, doi: 10.1002/adhm.202202766.
- [169] S. Kanwar and S. Vijayavenkataraman, "Design of 3D printed scaffolds for bone tissue engineering: A review," *Bioprinting*, vol. 24, p. e00167, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.BPRINT.2021.E00167.
- [170] B. D. Bovan, T. W. Hummert, D. D. Dean, and Z. Schwartz, "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response," vol. 17, no. 2, pp. 137–146, 1996.
- [171] D. W. Hutmacher, "Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 12, no. 1, pp. 107–124, 2001, doi: 10.1163/156856201744489.
- [172] A. Cheng *et al.*, "Advances in Porous Scaffold Design for Bone and Cartilage Tissue Engineering and Regeneration," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 25, no. 1, pp. 14–29, Feb. 2019, doi: 10.1089/TEN.TEB.2018.0119.
- [173] N. Abbasi, S. Hamlet, R. M. Love, and N. T. Nguyen, "Porous scaffolds for bone regeneration," *J. Sci. Adv. Mater. Devices*, vol. 5, no. 1, pp. 1–9, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.JSAMD.2020.01.007.

- [174] B. Otsuki, M. Takemoto, S. Fujibayashi, M. Neo, T. Kokubo, and T. Nakamura, "Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: Three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants," *Biomaterials*, vol. 27, no. 35, pp. 5892–5900, Dec. 2006, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.08.013.
- [175] F. R. Rose, L. A. Cyster, D. M. Grant, C. A. Scotchford, S. M. Howdle, and K. M. Shakesheff, "In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel," *Biomaterials*, vol. 25, no. 24, pp. 5507–5514, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.012.
- [176] M. Xu, D. Zhai, J. Chang, and C. Wu, "In vitro assessment of three-dimensionally plotted nagelschmidite bioceramic scaffolds with varied macropore morphologies," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 1, pp. 463–476, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2013.09.011.
- [177] J. Wang *et al.*, "Fabrication and biological evaluation of 3D-printed calcium phosphate ceramic scaffolds with distinct macroporous geometries through digital light processing technology," *Regen. Biomater.*, vol. 9, Apr. 2022, doi: 10.1093/RB/RBAC005.
- [178] A. Woesz *et al.*, "Towards bone replacement materials from calcium phosphates via rapid prototyping and ceramic gelcasting," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 25, no. 2, pp. 181–186, Apr. 2005, doi: 10.1016/J.MSEC.2005.01.014.
- [179] S. Panseri *et al.*, "Bone-like ceramic scaffolds designed with bioinspired porosity induce a different stem cell response," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 32, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1007/S10856-020-06486-3.
- [180] Z. Liu *et al.*, "Additive manufacturing of hydroxyapatite bone scaffolds via digital light processing and in vitro compatibility," *Ceram. Int.*, vol. 45, no. 8, pp. 11079–11086, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.CERAMINT.2019.02.195.
- [181] L. Meesuk *et al.*, "Osteogenic differentiation and proliferation potentials of human bone marrow and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on the 3D-printed hydroxyapatite scaffolds," *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–19, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-24160-2.
- [182] P. Habibovic, T. M. Sees, M. A. Van Den Doel, C. A. Van Blitterswijk, and K. De Groot, "Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 77, no. 4, pp. 747–762, Jun. 2006, doi: 10.1002/JBM.A.30712.
- [183] B. S. Chang *et al.*, "Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations," *Biomaterials*, vol. 21, no. 12, pp. 1291–1298, Jun. 2000, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00030-2.
- [184] B. Flautre, M. Descamps, C. Delecourt, M. C. Blary, and P. Hardouin, "Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections - experimental study in the rabbit," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 12, no. 8, pp. 679–682, 2001, doi: 10.1023/A:1011256107282.
- [185] K. A. Hing, S. M. Best, K. E. Tanner, W. Bonfield, and P. A. Revell, "Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 68, no. 1, pp. 187–200, Jan. 2004, doi: 10.1002/JBM.A.10050.

- [186] M. C. von Doernberg *et al.*, “In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 30, pp. 5186–5198, Oct. 2006, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.05.051.
- [187] Y.-M. Lee, “Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices.” *Journal of Bioceramics*, pp. 212–221, 2000.
- [188] W. Zhang *et al.*, “3D-printed scaffolds with synergistic effect of hollow-pipe structure and bioactive ions for vascularized bone regeneration,” *Biomaterials*, vol. 135, pp. 85–95, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2017.05.005.
- [189] C. Feng *et al.*, “3D Printing of Lotus Root-Like Biomimetic Materials for Cell Delivery and Tissue Regeneration,” *Adv. Sci. (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Ger.)*, vol. 4, no. 12, Dec. 2017, doi: 10.1002/ADVS.201700401.
- [190] H. Shao *et al.*, “Bone regeneration in 3D printing bioactive ceramic scaffolds with improved tissue/material interface pore architecture in thin-wall bone defect,” *Biofabrication*, vol. 9, no. 2, 2017, doi: 10.1088/1758-5090/aa663c.
- [191] N. Kohli *et al.*, “Bone remodelling in vitro: Where are we headed?: -A review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials in vitro,” *Bone*, vol. 110, pp. 38–46, 2018, doi: 10.1016/j.bone.2018.01.015.
- [192] C. Zhang *et al.*, “Mechanical behavior of a titanium alloy scaffold mimicking trabecular structure,” *J. Orthop. Surg. Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–11, Feb. 2020, doi: 10.1186/S13018-019-1489-Y/TABLES/5.
- [193] F. Baino *et al.*, “Digital light processing stereolithography of hydroxyapatite scaffolds with bone-like architecture, permeability, and mechanical properties,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 105, no. 3, pp. 1648–1657, Mar. 2022, doi: 10.1111/JACE.17843.
- [194] S. M. Kak, A.C., “Principles of Tomographic Imaging,” *Book*.
- [195] P. F. Jacobs, “Fundamentals of Stereolithography,” *Soc. Manuf. Eng.*, no. July, pp. 196–211, 1992.
- [196] M. Lasgorceix, E. Champion, and T. Chartier, “Shaping by microstereolithography and sintering of macro–micro-porous silicon substituted hydroxyapatite,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 36, no. 4, pp. 1091–1101, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.JEURCERAMSOC.2015.11.020.
- [197] T. Chartier *et al.*, “Influence of irradiation parameters on the polymerization of ceramic reactive suspensions for stereolithography,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 37, no. 15, pp. 4431–4436, 2017, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2017.05.050.
- [198] M. Mukhtarkhanov, A. Perveen, and D. Talamona, “micromachines Application of Stereolithography Based 3D Printing Technology in Investment Casting,” doi: 10.3390/mi11100946.
- [199] S. Zakeri, M. Vippola, and E. Levänen, “A comprehensive review of the photopolymerization of ceramic resins used in stereolithography,” *Addit. Manuf.*, vol. 35, p. 101177, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.ADDMA.2020.101177.
- [200] V. E. Beal, C. H. Ahrens, and P. A. Wendhausen, “The use of stereolithography rapid tools in the manufacturing of metal powder injection molding parts,” *J. Brazilian Soc.*

- Mech. Sci. Eng.*, vol. 26, no. 1, pp. 40–46, 2004, doi: 10.1590/S1678-58782004000100007.
- [201] R. Domander, A. A. Felder, M. Doube, and D. Schmidt, “BoneJ2 - refactoring established research software [ version 2 ; peer review : 3 approved ],” *Wellcome Open Res.*, pp. 1–21, 2021.
- [202] D. BERNACHE-ASSOLLANT and J.-P. BONNET, “Frittage : aspects physico-chimiques - Partie 1 : frittage en phase solide,” *Tech. l'ingénieur*, 2005, doi: 10.51257/a-v1-af6620.
- [203] M. Lasgorceix, “Mise en forme par microstéréolithographie et frittage de céramiques macro-micro-poreuses en hydroxyapatite silicatée et évaluation biologique,” p. 1 vol. (254 p.), 2014, [Online]. Available: <http://www.theses.fr/2014LIMO4016>.
- [204] “ISO 13175-3:2012(fr), Implants chirurgicaux — Phosphates de calcium — Partie 3: Substituts osseux à base d’hydroxyapatite et de phosphate tricalcique bêta.” <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:13175:-3:ed-1:v1:fr> (accessed Oct. 19, 2023).
- [205] I. Matic *et al.*, “Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood,” *Stem Cells*, vol. 34, no. 12, pp. 2930–2942, Dec. 2016, doi: 10.1002/STEM.2474.
- [206] GUERRERO Julien, “Devenir des cellules souches mésenchymateuses humaines dans un environnement tridimensionnel : application à l’ingénierie du tissu osseux Julien Guerrero To cite this version : HAL Id : tel-01247887 MESENCHYMATEUSES HUMAINES DANS UN ENVIRONNEMENT TRIDIM,” 2016.
- [207] J. Magalon *et al.*, “Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018,” *Rev. Francoph. des Lab.*, vol. 2018, no. 507, pp. 34–43, Dec. 2018, doi: 10.1016/S1773-035X(18)30355-1.
- [208] S. Development, “Roles of Runx2 in Skeletal Development,” 2017, doi: 10.1007/978-981-10-3233-2.
- [209] Ronan Barré, “ÉTUDE DU RÔLE DES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G LORS DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE DES OSTÉOBLASTES : INTÉRÊT DE LA VOIE Gi.,” 2012.
- [210] R. Civitelli, “Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 473, no. 2, pp. 188–192, May 2008, doi: 10.1016/J.ABB.2008.04.005.
- [211] C. Spingarn *et al.*, “Contribution à la biomécanique de la régénération osseuse : modélisation , simulation et applications To cite this version : Doctorat Université de Strasbourg THÈSE I ’ Université de Strasbourg osseuse : modélisation , simulation et applications,” 2019.
- [212] A. Tovar, N. M. Patel, G. L. Niebur, M. Sen, and J. E. Renaud, “Topology Optimization Using a Hybrid Cellular Automaton Method With Local Control Rules,” *J. Mech. Des.*, vol. 128, no. 6, pp. 1205–1216, 2006, Accessed: Oct. 15, 2023. [Online]. Available: [https://www.academia.edu/3280750/Topology\\_optimization\\_using\\_a\\_hybrid\\_cellular\\_automaton\\_method\\_with\\_local\\_control\\_rules](https://www.academia.edu/3280750/Topology_optimization_using_a_hybrid_cellular_automaton_method_with_local_control_rules).
- [213] J. D. Gardinier, C. W. Townsend, K. P. Jen, Q. Wu, R. L. Duncan, and L. Wang, “In situ permeability measurement of the mammalian lacunar-canalicular system,” *Bone*, vol.

46, no. 4, pp. 1075–1081, Apr. 2010, doi: 10.1016/J.BONE.2010.01.371.

- [214] P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, and P. G. Robey, “Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications,” *Stem Cells*, vol. 19, no. 3, pp. 180–192, May 2001, doi: 10.1634/STEMCELLS.19-3-180.
- [215] J. R. Mauney, V. Volloch, and D. L. Kaplan, “Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects,” *Tissue Eng.*, vol. 11, no. 5–6, pp. 787–802, May 2005, doi: 10.1089/TEN.2005.11.787.
- [216] Y. Gan, K. Dai, P. Zhang, T. Tang, Z. Zhu, and J. Lu, “The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 29, pp. 3973–3982, Oct. 2008, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.06.026.
- [217] R. Quarto *et al.*, “Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 344, no. 5, pp. 385–386, Feb. 2001, doi: 10.1056/NEJM200102013440516.
- [218] T. Morishita, K. Honoki, H. Ohgushi, N. Kotobuki, A. Matsushima, and Y. Takakura, “Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients’ mesenchymal stem cells,” *Artif. Organs*, vol. 30, no. 2, pp. 115–118, 2006, doi: 10.1111/J.1525-1594.2006.00190.X.
- [219] A. K. Gaharwar, I. Singh, and A. Khademhosseini, “Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration,” *Nat. Rev. Mater.*, vol. 5, no. 9, pp. 686–705, 2020, doi: 10.1038/s41578-020-0209-x.
- [220] T. Iwamoto, Y. Hieda, and Y. Kogai, “Effect of hydroxyapatite surface morphology on cell adhesion,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 69, pp. 1263–1267, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.07.056.
- [221] F. Chowdhury *et al.*, “Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells,” *Nat. Mater.* 2009 91, vol. 9, no. 1, pp. 82–88, Oct. 2009, doi: 10.1038/nmat2563.
- [222] R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, and C. S. Chen, “Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment,” *Dev. Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 483–495, Apr. 2004, doi: 10.1016/S1534-5807(04)00075-9.
- [223] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, “Matrix elasticity directs stem cell lineage specification,” *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 677–689, Aug. 2006, doi: 10.1016/J.CELL.2006.06.044.
- [224] S. Khetan, M. Guvendiren, W. R. Legant, D. M. Cohen, C. S. Chen, and J. A. Burdick, “Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels,” *Nat. Mater.*, vol. 12, no. 5, pp. 458–465, 2013, doi: 10.1038/NMAT3586.
- [225] L. A. Flanagan, Y. El Ju, B. Marg, M. Osterfield, and P. A. Janmey, “Neurite branching on deformable substrates,” *Neuroreport*, vol. 13, no. 18, pp. 2411–2415, Dec. 2002, doi: 10.1097/00001756-200212200-00007.
- [226] J. Lee, A. A. Abdeen, T. H. Huang, and K. A. Kilian, “Controlling cell geometry on substrates of variable stiffness can tune the degree of osteogenesis in human mesenchymal stem cells,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 38, pp. 209–218,

- 2014, doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.01.009.
- [227] V. D. Tran and S. Kumar, "ScienceDirect Transduction of cell and matrix geometric cues by the actin cytoskeleton," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 68, pp. 64–71, 2021, doi: 10.1016/j.ceb.2020.08.016.
- [228] M. Versaevel, T. Grevesse, and S. Gabriele, "Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells," *Nat. Commun.*, vol. 2, no. January, pp. 1–11, 2013, doi: 10.1038/ncomms1668.
- [229] Z. Li *et al.*, "Biomaterials Differential regulation of stiffness , topography , and dimension of substrates in rat mesenchymal stem cells," vol. 34, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.06.059.
- [230] B. Chen, C. Co, and C. Ho, "Biomaterials Cell shape dependent regulation of nuclear morphology," vol. 67, pp. 129–136, 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.07.017.
- [231] M. Guo, A. F. Pegoraro, A. Mao, E. H. Zhou, P. R. Arany, and Y. Han, "Cell volume change through water efflux impacts cell stiffness and stem cell fate," vol. c, no. October, 2017, doi: 10.1073/pnas.1705179114.
- [232] E. K. F. Yim, E. M. Darling, K. Kulangara, F. Guilak, and K. W. Leong, "Biomaterials Nanotopography-induced changes in focal adhesions , cytoskeletal organization , and mechanical properties of human mesenchymal stem cells," *Biomaterials*, vol. 31, no. 6, pp. 1299–1306, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.037.
- [233] R. J. Ellis, "Macromolecular crowding: obvious but underappreciated," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 26, no. 10, pp. 597–604, Oct. 2001, doi: 10.1016/S0968-0004(01)01938-7.
- [234] F. Lang *et al.*, "Functional significance of cell volume regulatory mechanisms," *Physiol. Rev.*, vol. 78, no. 1, pp. 247–306, 1998, doi: 10.1152/PHYSREV.1998.78.1.247.
- [235] J. Swift *et al.*, "Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation," *Science*, vol. 341, no. 6149, 2013, doi: 10.1126/SCIENCE.1240104.
- [236] J. Irianto *et al.*, "Osmotic Challenge Drives Rapid and Reversible Chromatin Condensation in Chondrocytes," *Biophys. J.*, vol. 104, no. 4, p. 759, Feb. 2013, doi: 10.1016/J.BPJ.2013.01.006.
- [237] C. M. Bidan, K. P. Kommareddy, M. Rumpler, P. Kollmannsberger, P. Fratzl, and J. W. C. Dunlop, "Geometry as a Factor for Tissue Growth : Towards Shape Optimization of Tissue Engineering Scaffolds," pp. 186–194, 2013, doi: 10.1002/adhm.201200159.
- [238] M. Rumpler, A. Woesz, J. W. C. Dunlop, J. T. Van Dongen, and P. Fratzl, "The effect of geometry on three-dimensional tissue growth," no. March, pp. 1173–1180, 2008, doi: 10.1098/rsif.2008.0064.
- [239] J. K. Nychala, N. B. Oupoulos, C. J. C. Att, O. L. K. Atsamenis, C. P. P. Lease, and B. G. S. Engers, "Pore Geometry Regulates Early Stage Human Bone Marrow Cell Tissue Formation and Organisation," vol. 41, no. 5, pp. 917–930, 2013, doi: 10.1007/s10439-013-0748-z.
- [240] L. Juignet *et al.*, "Acta Biomaterialia Macrotopographic closure promotes tissue growth and osteogenesis in vitro," *Acta Biomater.*, vol. 53, pp. 536–548, 2017, doi:

10.1016/j.actbio.2017.02.037.

- [241] E. R. Urquia Edreira *et al.*, “Effect of calcium phosphate ceramic substrate geometry on mesenchymal stromal cell organization and osteogenic differentiation,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 2, May 2016, doi: 10.1088/1758-5090/8/2/025006.
- [242] A. Magnaudeix *et al.*, “Quantitative analysis of vascular colonisation and angi-conduction in porous silicon-substituted hydroxyapatite with various pore shapes in a chick chorioallantoic membrane (CAM) model,” *Acta Biomater.*, vol. 38, pp. 179–189, Jul. 2016, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2016.04.039.
- [243] A. B. Faia-Torres *et al.*, “Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the absence of osteogenic supplements: A surface-roughness gradient study,” *Acta Biomater.*, vol. 28, pp. 64–75, Dec. 2015, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2015.09.028.



## Annexes

---

Annexe 1. Fiche de sécurité de la suspension céramique fournie par l'entreprise 3DCeram .....	189
Annexe 2. Analyses thermiques.....	191
Annexe 2.1. Analyses thermogravimétriques.....	191
Annexe 2.2. Dilatométrie .....	191
Annexe 3. Microscopie à balayage .....	192
Annexe 4. Diffraction des rayons X.....	193

## Annexe 1. Fiche de sécurité de la suspension céramique fournie par l'entreprise 3DCeram



### Fiche de données de sécurité selon 1907/2006/CE, Article 31

Page : 1/10

EQG 6427-E

Date d'édition : 03.02.2021

Numéro de version 1

Révision: 03.02.2021

#### RUBRIQUE 1: Identification de la substance/du mélange et de la société/ l'entreprise

##### 1.1 Identificateur de produit

Nom du produit: **HYDROXYAPATITE - 3DMIX - HAP-F02**

1.2 Utilisations identifiées pertinentes de la substance ou du mélange et utilisations déconseillées  
Pas d'autres informations importantes disponibles.

Emploi de la substance / de la préparation: Mélange

##### 1.3 Renseignements concernant le fournisseur de la fiche de données de sécurité :

Producteur/fournisseur:

3DCERAM Sinto  
4 rue Maison Rouge  
Parc d'activités Maison Rouge  
87 270 BONNAC LA COTE  
Tél : 05 55 04 10 90  
Fax : 05 55 38 11 45  
info@3dceram.com

##### 1.4 Numéro d'appel d'urgence:

France : numéro ORFILA (INRS) : +33 (0)1 45 42 59 59  
Belgique – Bruxelles : 070/245 245  
Luxembourg : Centre anti poison : (+352) 8002 5500  
Suisse : 145  
Swiss Toxicological Information Centre (Zürich) : +41 44 251 51 51 / www.toxi.ch.

#### RUBRIQUE 2: Identification des dangers

##### 2.1 Classification de la substance ou du mélange

Classification selon le règlement (CE) n° 1272/2008 :



GHS08

Repr. 2 H361 Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus.



GHS07

Skin Irrit. 2 H315 Provoque une irritation cutanée.

Eye Irrit. 2 H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

STOT SE 3 H335 Peut irriter les voies respiratoires.

Aquatic Chronic 3 H412 Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

##### 2.2 Éléments d'étiquetage

Étiquetage selon le règlement (CE) n° 1272/2008 :

Le produit est classifié et étiqueté selon le règlement CLP.

(suite page 2)

EQG 6427-E

Date d'édition : 03.02.2021

Numéro de version 1

Révision: 03.02.2021

---

**Nom du produit: HYDROXYAPATITE - 3DMIX - HAP-F02**

---

(suite de la page 1)

**· Pictogrammes de danger :**

GHS07 GHS08

**· Mention d'avertissement :** Attention**· Composants dangereux déterminants pour l'étiquetage :**

-

**· Mentions de danger :**

H315 Provoque une irritation cutanée.

H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

H361 Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus.

H335 Peut irriter les voies respiratoires.

H412 Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

**· Conseils de prudence :**

P264 Se laver soigneusement après manipulation.

P273 Éviter le rejet dans l'environnement.

P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage/une protection auditive.

P302+P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment à l'eau.

P304+P340 EN CAS D'INHALATION: transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.

P305+P351+P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

P308+P313 EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.

P332+P313 En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.

P337+P313 Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

P405 Garder sous clef.

P501 Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

**· 2.3 Autres dangers :****· Résultats des évaluations PBT et vPvB :**· **PBT:** Non applicable.· **vPvB:** Non applicable.

## **Annexe 2. Analyses thermiques**

### **Annexe 2.1. Analyses thermogravimétriques**

Les courbes d'analyse thermogravimétrique (ATG) et d'analyse thermique différentielle (ATD) ont été acquises à l'aide de l'équipement NETZSCH 449F3 STA449F3A. Les analyses sont effectuées sous air à l'aide d'un creuset en alumine sur une pastille en HA fabriquée par SLA (E70-P100-N1) d'une masse de 68,16 mg, une montée en température de 25°C à 1270°C sans palier avec une rampe de 1°C/min. Le pas d'acquisition est de 4 points/°C.

### **Annexe 2.2. Dilatométrie**

Le cycle thermique utilisé pour le déliantage et le frittage des architectures obtenues par stéréolithographie a été déterminé à l'aide d'un dilatomètre horizontal le NETZSCH DIL 402C sur une pastille en HA fabriquée par SLA (E70-P100-N1). La variation de l'épaisseur est mesurée par le déplacement d'un palpeur en alumine d'une charge de 30 cN, sous air pendant la totalité de l'expérience. La montée en température comporte deux étapes : une première étape de 25°C à 400°C à 1°C/min, avec un palier de 6 min à 400°C, puis une montée en température à 1270°C avec une rampe de 20°C/min et un palier de 4h suivie d'une descente en température de 20°C/min jusqu'à température ambiante. Un facteur correctif est appliqué afin de prendre en compte la dilatation des cales en alumines utilisées.

### **Annexe 3. Microscopie à balayage**

La caractérisation de la microstructure des échantillons est réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage environnemental (FEI Quanta 450 FEG). La spécificité de ce type de microscope réside dans l'observation d'échantillons sous des conditions environnementales variables (température, pression, hygrométrie contrôlée). Cette technique permet d'étudier des échantillons non conducteurs généralement sans préparation préalable directement à leur état naturel. Les échantillons massifs sont déposés sur la platine de caractérisation et analysés.

#### Annexe 4. Diffraction des rayons X

Les phases cristallines présentes au sein des poudres sont analysées par diffraction des rayons X. Les diffractogrammes sont acquis sur le diffractomètre  $\theta/2\theta$  D8 DAVINCI avec un pas de  $0,02^\circ$  et un temps de comptage par pas de 4s. Les données ICDD (International Center for diffraction Data) recensent les fiches PDF (Powder diffraction File) nécessaires à l'analyse des phases. Les fiches PDF des principaux composés testés lors de cette analyse sont référencées dans le Tableau 11. Pour réaliser ces analyses, des pastilles en HA fabriquée par SLA (E70-P100-N1) ont été broyées après frittage à  $1\ 270^\circ\text{C}$ . La poudre obtenue a ensuite été caractérisée.

Composés	Formules chimiques	Fiches PDF
HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9 – 432
$\alpha$ -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9 – 348
$\beta$ -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9 – 169
Chaux vive	CaO	37 – 1497
Phosphate tétracalcique	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	25 – 1137

Tableau 11 : Fiches PDF de références utilisées pour indexer les différents composés pouvant être détectés par DRX



## Mise en forme par fabrication additive de céramique phosphocalcique mimant l'os humain

---

L'hydroxyapatite (HA) est largement utilisée pour l'élaboration de substituts osseux. En effet, lorsque le défaut osseux est trop important, la réparation naturelle ne peut avoir lieu. L'HA, est alors un excellent candidat pour le comblement osseux grâce à sa composition chimique proche de celle de l'os. De plus, ses propriétés d'ostéoconduction permettent une colonisation efficace des cellules sur le substitut favorisant la formation d'os nouveau. Ce processus est accentué par la structure poreuse et interconnectée du substitut. La mise en forme des substituts architecturés est donc un challenge pour améliorer les propriétés de résistance mécanique et d'ostéointégration. Les technologies d'impressions 3D et plus particulièrement la stéréolithographie (SLA) permettent de répondre aux besoins de l'élaboration d'architecture osseuse complexe. Le principal objectif de cette étude est d'élaborer un substitut en biocéramique mimant l'os trabéculaire humain par cette technologie de fabrication additive. Pour répondre à cette problématique, plusieurs échantillons de tibia humain ( $1\text{ cm}^3$ ) ont été collectés durant une intervention chirurgicale, puis scannés par microtomographie RX. Ces scans, d'une résolution de l'ordre du micromètre, vont constituer la base de données 3D de l'os trabéculaire. Le substitut céramique 3D est alors imprimé par fabrication additive (SLA) à partir de ces données. La pièce crue est ensuite frittée afin d'obtenir une architecture trabéculaire en céramique à porosité multi-échelle contrôlée. Pour s'assurer une reproduction à l'échelle du réseau poreux un comparatif est réalisé entre la pièce imprimée et le fichier STL original. Les résultats permettront d'ajuster les paramètres d'impression et ainsi d'optimiser le mimétisme. Enfin, des cellules osseuses humaines ont étéensemencées sur les architectures pour étudier l'adhésion, la fixation et la prolifération de celles-ci à leurs surfaces. L'ensemble des résultats montrent l'efficacité de la SLA pour produire des architectures en céramique phosphocalcique, imitant l'os trabéculaire avec un comportement biologique prometteur.

---

Mots-clés : Stéréolithographie, Hydroxyapatite, céramiques

### Additive Manufacturing of Bio-Inspired Phosphocalcic Ceramic

---

Hydroxyapatite (HA) is a widely used material for developing bone substitutes. In cases of significant bone defects where natural healing is not feasible, HA presents an excellent option for bone augmentation due to its chemical similarity to natural bone. Furthermore, its osteoconductive properties facilitate effective cell colonization, promoting new bone formation. The porous and interconnected structure of these engineered substitutes enhances this process. Designing these structured substitutes is a challenge aimed at improving mechanical strength and bone integration. Leveraging 3D printing technologies, especially Stereolithography (SLA), addresses the need for creating complex bone architectures. The primary objective of this study is to create a bioceramic substitute that mimics human trabecular bone using additive manufacturing. Human tibia samples, obtained during surgical procedures, were collected and subjected to microtomography to generate a high-resolution 3D database of trabecular bone. Using this data, a 3D ceramic substitute was fabricated through additive manufacturing (SLA) and then sintered to achieve controlled multi-scale porosity. A comparative analysis between the printed piece and the original STL file was performed to ensure accurate reproduction of the porous network. The results will inform adjustments to printing parameters for improved mimicry. Finally, human bone cells were seeded onto the engineered structures to investigate cell adhesion, attachment, and proliferation on their surfaces. The comprehensive results demonstrate the efficiency of SLA in producing phosphocalcic ceramic architectures that closely resemble natural trabecular bone, with promising biological performance.

---

Keywords : Stereolithography, Hydroxyapatite, ceramic

