



HAL
open science

Biocéramiques fonctionnalisées pour une ostéoimmunomodulation et une libération locale de molécules actives

Antoine Recorda

► **To cite this version:**

Antoine Recorda. Biocéramiques fonctionnalisées pour une ostéoimmunomodulation et une libération locale de molécules actives. Chimie. Université de Limoges, 2024. Français. NNT : 2024LIMO0038 . tel-04874765

HAL Id: tel-04874765

<https://theses.hal.science/tel-04874765v1>

Submitted on 8 Jan 2025

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
Antoine Recorda

Le 24 juin 2024

**Biocéramiques fonctionnalisées pour une ostéoimmunomodulation et
une libération locale de molécules actives**

Thèse dirigée par Chantal Damia, Betty Laverdet

JURY :

Rapporteurs

Mme. Sophie CAZALBOU, Maîtresse de conférences HDR, Université de Toulouse, CIRIMAT, UMR 5085

M. Pierre WEISS, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Nantes, UMRS 1229

Examineurs

Mme. Chantal DAMIA, Maîtresse de conférences HDR, Université de Limoges, IRCER, UMR 7315

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

Mme. Betty LAVERDET, Maîtresse de conférences, Université de Limoges, IRCER, UMR 7315

M. Pierre-Sylvain MARCHEIX, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Limoges, IRCER, UMR 7315

Invité

M. Arnaud BEAUMONT, Ingénieur de Recherche, Université de Limoges, Xlim, UMR 7252



A ma mère, mon père et mon frère

Si vous souhaitez représenter quelque chose exactement tel qu'il est, cela prend énormément de temps. Si vous ne soignez pas les détails, les imprécisions s'accumuleront quelque part.

Akira Toriyama

Remerciements

Ce manuscrit est l'aboutissement de plus de trois ans de travail. Alors que celui-ci touche à sa fin, il est temps de rédiger la conclusion de cette gigantesque expérience qu'est le doctorat. C'est en me remémorant ces trois dernières années que je prends conscience de la chance que j'ai eue et que j'ai encore d'être si bien entouré, tant sur le plan personnel que professionnel. Au travers des paragraphes qui vont suivre, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers l'ensemble des personnes ayant permis de mener ce projet à son terme et qui ont contribué de près ou de loin au contenu de ce manuscrit.

Tout d'abord, je tiens à remercier Sophie Cazalbou et Pierre Weiss, qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit. Merci d'avoir pris le temps de lire et d'évaluer mon travail. De la même façon, je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury de thèse : Sophie Cazalbou, Pierre Weiss, Laurent Gremillard, Pierre-Sylvain Marcheix et Arnaud Beaumont. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux et pour les discussions pertinentes que nous avons eues lors de ma soutenance.

La suite de mes remerciements est naturellement adressée à mes directrices de thèse, Chantal Damia et Betty Laverdet, qui ont toujours été présentes et disponibles quand j'en avais besoin. Merci pour vos remarques et conseils judicieux qui, j'en suis persuadé, m'accompagneront pour le reste de ma carrière professionnelle. Au-delà de votre pertinence scientifique, j'ai particulièrement apprécié l'humanité dont vous avez fait preuve tout au long de ces travaux. En dépit des difficultés, des problèmes rencontrés et de nos avis divergents, il a toujours été facile de discuter et ça a été un véritable plaisir de travailler avec vous. Alors encore une fois, merci pour tout.

Je souhaite également remercier Sylvie Delebassée pour m'avoir accompagné et encadré au cours de l'ensemble des expériences de microbiologie présentées dans la suite du manuscrit. Merci de m'avoir fait profiter de ton expérience et de ton expertise dans ce domaine.

Merci également à Arnaud Beaumont pour avoir développé le script python nécessaire à l'appréciation des données issues du bioréacteur. Merci pour l'intérêt que tu as porté au sujet, pour ton implication, ta réactivité et aussi pour la patience dont tu as fait preuve lorsqu'il s'agissait d'expliquer le fonctionnement de ton script et son utilisation.

Mes remerciements vont ensuite à l'ensemble de l'équipe biocéramique : Eric, Amandine, Karine, Isabelle, Patricia, Julie et Betty, merci de m'avoir accueilli dans votre équipe, pour votre aide, vos conseils et remarques sur l'ensemble de mon travail. Je souhaite remercier plus spécialement Emeline Renaudie, sans toi, il n'y a pas de synthèse ! On peut toujours compter sur toi, merci pour ton implication, ta dévotion et ta bonne humeur.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à l'ensemble des personnes de l'Institut de Recherche sur les Céramiques qui ont contribué à l'obtention des résultats présentés dans ces travaux : Richard Mayet pour la DRX, Julie Cornette pour la FTIR (malgré ton enthousiasme, tu n'auras pas réussi à me faire aimer cette manip), Marina Soustre et Séverine Barcina pour les caractérisations des poudres, Sandra Blanchet pour l'ICP. Merci à Marion Vandenhende qui m'a gentiment expliqué qu'un four pouvait chauffer au-delà de 200 °C (quand on n'oublie pas de le mettre en marche), à Yann Launay pour les superbes images MEB. Merci à Vincent Pateloup pour tes explications concernant l'utilisation de la micro-extrudeuse et l'utilisation du G-Code associé, Julie Bourret et Marguerite Bienia pour avoir pris le temps de m'expliquer les bases de la rhéologie des pâtes céramiques. Merci à tous pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre patience lorsqu'il a fallu me former sur l'utilisation des différents équipements couramment utilisés dans le domaine des matériaux (qui m'étaient jusque-là totalement inconnus).

Je me dois d'adresser un immense merci à l'équipe doctorante ! Doctorants, collègues, compagnons de fortunes et d'infortunes, mais surtout AMIS. Merci à Paul, Dylan, Florian, Tom, Alice, Mehdi, Emma, Dorian, Louis, Dylan Chatelain, Arthur Coiral, Souad, Khoi, Enrique et tous ceux que j'aurais pu oublier. Merci pour ces trois ans, pour ces précieux moments passés ensemble, pour votre énergie, votre soutien, vos conseils. Si aujourd'hui je garde un si bon souvenir de ce doctorat et du temps passé à Limoges, je sais que je vous le dois en grande partie. Comme disait un grand homme : « ne changez rien, vous êtes super ! ».

Je n'oublie pas non plus mes amis de toujours, la Team (vous savez laquelle) : Simon, Elise, Manon G, Adam, Romain, Aurore. Beaucoup de temps s'est écoulé depuis la L1 de biologie, mais vous êtes là. Alors merci d'être vous et de toujours être présents en dépit des années et de la distance. Je vous suis profondément reconnaissant d'avoir fait le déplacement pour assister à ma soutenance.

Mention spéciale à Manon Reverdy, tu ne liras probablement jamais ces mots, mais je n'ai pas oublié ta gentillesse et l'aide que tu m'as apportée en Licence.

Je tiens également à remercier mes amis de lycée : Vincent, Inès (bien avant le lycée même), Elsa, Loïc, Hélène et Romain. Merci d'avoir été présents dans les moments difficiles. J'ai toujours pu compter sur vous et sur votre joie de vivre.

Je ne pouvais pas rédiger cette partie sans consacrer un paragraphe à ma famille. Avec les années, j'ai pu mesurer la chance que j'avais d'avoir un entourage si présent et investi. Ne souhaitant pas écrire une seconde thèse, il n'y aura pas de liste exhaustive de raisons pour lesquelles je vous suis reconnaissant. Alors cher oncle, tante, cousin, cousine, merci pour ces précieux moments et pour les valeurs que vous m'avez transmises. Un grand merci à Isabelle,

Frédéric, Vincent, Marcelle, Emma et Constant pour votre accueil, votre confiance et pour tout ce que vous avez fait pour moi ces trois dernières années. Un immense merci à mes parents et mon frère sans qui je n'aurais rien pu faire. Merci pour votre soutien indéfectible, pour m'avoir conseillé et épaulé durant toutes ces années. Vous m'avez offert le luxe de pouvoir être moi-même en toutes circonstances et d'expérimenter pour trouver ma voie et pour cela je vous en suis infiniment reconnaissant.

Bien évidemment, mes derniers remerciements sont adressés à Charlotte Jemfer. Merci pour ces trois années passées à tes côtés. Cela n'a pas été facile tous les jours, mais tu m'as toujours aidé du mieux que tu pouvais. Merci d'avoir dessiné les plus beaux schémas de ce manuscrit. Tu es la personne la plus forte, la plus investie et persévérante que je connaisse. Tu as su tenir bon quand je perdais pied, gérer ma fatigue et mon stress pendant la rédaction et tout cela en plus de tes travaux de thèse. En plus de susciter le respect, tu es une source d'inspiration au quotidien et j'espère pouvoir être autant présent pour la fin de tes travaux. Une chose est sûre, sans toi, cette thèse aurait été sensiblement plus difficile. Merci encore de faire partie de ma vie ! Je vous souhaite à tous d'avoir une Charlotte dans la vôtre.

Mes remerciements touchent à leur fin. Si vous avez trouvé cette partie longue, je suis au regret de vous annoncer que vous n'êtes pas au bout de vos peines. Merci à vous, cher lecteur, du temps et de l'intérêt que vous accorderez à ce manuscrit. En vous souhaitant bonne lecture.

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.....	21
Chapitre I. Étude bibliographique	27
I.1. Physiologie des os longs.....	27
I.1.1. Structure des os longs.....	27
I.1.2. Composition et organisation de la matrice osseuse	30
I.1.3. Les cellules de la niche osseuse	32
I.1.4. Le processus de remodelage de l'os	37
I.1.4.1. Phase d'activation	38
I.1.4.2. Phase de résorption	38
I.1.4.3. Phase d'inversion.....	39
I.1.4.4. Phase de formation	39
I.1.4.5. Phase de quiescence.....	39
I.1.5. La régénération osseuse	40
I.1.5.1. L'hématome	42
I.1.5.2. La phase inflammatoire.....	42
I.1.5.3. Le tissu de granulation	42
I.1.5.4. Formation du cal cartilagineux	43
I.1.5.5. Formation du cal osseux	43
I.1.5.6. Remodelage osseux	43
I.1.6. Défauts critiques et greffes osseuses	44
I.2. Les substituts osseux synthétiques et fonctionnalisation.....	45
I.2.1. Caractéristiques des substituts osseux synthétiques.....	46
I.2.2. Fonctionnalisation des substituts osseux.....	47
I.2.2.1. <i>Drug delivery system</i>	48
I.2.2.2. Les antibiotiques	49
I.2.2.2.1. Mode d'action des antibiotiques.....	49
I.2.2.2.2. Applications thérapeutiques et mésusage médical	51
I.2.2.2.3. La vancomycine.....	52
I.2.2.2.4. Délivrance locale de vancomycine.....	54
I.2.2.3. Les Cytokines	56
I.2.2.3.1. Les <i>tumor necrosis factors</i>	58
I.2.2.3.2. Les Interleukines	59
I.2.2.3.3. Les chimiokines	60
I.2.2.3.4. Délivrance locale de cytokines.....	61
I.2.2.4. Etudes des cinétiques de libération des DDS.....	62
I.2.2.4.1. Intérêt de la culture dynamique.....	63
I.2.2.4.2. Bioréacteur à perfusion.....	66
I.3. Substituts osseux en hydroxyapatite et procédés de fabrication	67
I.3.1. Les céramiques phosphocalciques.....	67
I.3.2. Influence de la porosité du substitut osseux sur son ostéointégration.....	68
I.3.3. Procédés de mise en forme d'architectures céramiques poreuses	70
I.3.3.1. La projection de liant	71
I.3.3.2. Frittage sélectif par laser	73
I.3.3.3. La stéréolithographie.....	74
I.3.3.4. L'extrusion 3D	75

I.3.3.5. Bilan des procédés de fabrication additive de substituts osseux en céramique	76
I.4. Positionnement des travaux	78
I.4.1. Choix du support et du procédé de mise en forme.....	78
I.4.2. Choix des méthodes de fonctionnalisation et d'étude des cinétiques de libération.....	79
I.4.3. Choix des techniques de dosage et d'identification des principes actifs.....	79
I.4.4. Conclusion et Interactions à évaluer	82
Chapitre II. Matériels et Méthodes	84
II.1. Synthèse et caractérisations des poudres d'hydroxyapatite	84
II.1.1. Protocole de synthèse	84
II.1.2. Vérification de la pureté de la poudre	86
II.1.2.1. Test à la phénolphtaléine	86
II.1.2.2. Diffraction des rayons X	87
II.1.2.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	87
II.2. Techniques de caractérisation physico-chimique	88
II.2.1. Diffraction des rayons X.....	88
II.2.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	89
II.2.3. Microscopie électronique à balayage.....	90
II.2.4. Analyses élémentaires et dosages chimiques	91
II.2.4.1. Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif	91
II.2.4.2. Chromatographie liquide haute performance.....	91
II.2.5. Caractérisations physiques.....	91
II.2.5.1. Mesures des surfaces spécifiques par la méthode BET	91
II.2.5.2. Détermination de la distribution granulométrique	92
II.2.6. Analyses thermiques	92
II.2.6.1. Analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse	92
II.2.6.2. Dilatométrie.....	93
II.2.7. Mesures rhéologiques	93
II.2.7.1. Rhéologie des pâtes céramiques	93
II.2.7.2. Rhéologie de l'hydrogel de chitosan.....	94
II.3. Évaluation des cinétiques de libération en bioréacteur à perfusion	94
II.3.1. Description du bioréacteur à perfusion	94
II.3.2. Protocole de mise en route.....	95
II.3.3. Protocole de nettoyage du bioréacteur	96
II.4. Biologie cellulaire <i>in vitro</i>	97
II.4.1. Protocole d'isolement des précurseurs ostéoblastiques humains	97
II.4.2. Protocoles de culture cellulaire	98
II.4.3. Congélation des lignées cellulaires.....	98
II.4.4. Évaluation de l'activité métabolique des cellules	99
II.4.5. Différenciation des précurseurs ostéoblastiques.....	99
II.4.6. Évaluation de la calcification par coloration au rouge Alizarine	99
II.4.7. Dosage des cytokines par kit ELISA.....	100
II.5. Microbiologique.....	100
II.5.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	100
II.5.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide	101
II.5.3. Évaluation de l'efficacité de la vancomycine par antibiogramme.....	101
Chapitre III. Élaboration et caractérisation des substituts osseux	103

III.1. Élaboration des architectures.....	104
III.1.1. Préparation de la poudre céramique.....	104
III.1.1.1. Calcination des poudres.....	104
III.1.1.2. Détermination du temps d'attrition optimal.....	104
III.1.1.3. Constitution du lot de poudre	106
III.1.2. Formulation de la pâte céramique	108
III.1.2.1. Formulation du M-hydrogel	108
III.1.2.2. Formulation de la pâte	109
III.1.2.3. Détermination du taux de chargement.....	110
III.1.2.4. Rhéologies de la pâte céramique	111
III.1.2.5. Conclusion sur la formulation des pâtes.....	113
III.1.3. Mise en forme par robocasting	114
III.1.3.1. Conception des pièces par CAO	116
III.1.3.2. Caractéristiques des micro-extrudeuses	116
III.1.3.3. Ajustement du protocole d'impression.....	118
III.1.3.3.1. Modification du G-code initial.....	119
III.1.3.3.2. Détermination des paramètres d'extrusion.....	119
III.1.3.3.3. Impact de la vitesse d'extrusion.....	121
III.1.3.3.4. Impact du taux humidité.....	122
III.1.3.3.5. Impact de la température de la chambre et de la platine Peltier.....	123
III.1.3.4. Conclusion sur la mise en forme	124
III.1.4. Séchage des architectures	126
III.1.5. Frittage des architectures	128
III.1.5.1. Détermination des conditions de déliantage.....	128
III.1.5.2. Etude du comportement thermique des pâtes	130
III.1.5.3. Cycles de traitement thermique des architectures.....	132
III.2. Caractérisation des architectures frittées	132
III.2.1. Diffraction des rayons X et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	133
III.2.2. Dimensions, structure, macro- et microporosité des architectures	134
III.2.2.1. Dimensions et structures des pièces.....	134
III.2.2.2. Mesure de la macroporosité des pièces après frittage	137
III.2.2.3. Étude de la microporosité des pièces.....	142
III.3. Conclusion.....	145
Chapitre IV. Libération de la vancomycine par les architectures.....	147
IV.1. Détection et quantification de la vancomycine par chromatographie liquide haute performance	148
IV.1.1. Généralité	148
IV.1.2. Mise en place du protocole de dosage de la vancomycine en solution.....	151
IV.1.2.1. Détection de la vancomycine en solution	152
IV.1.2.2. Détection de la vancomycine dégradée en solution	154
IV.1.2.3. Choix de l'étalon interne	158
IV.1.2.3.1. La téïcoplanine.....	159
IV.1.2.3.2. La caféine	164
IV.1.3. Conclusion	169
IV.2. Fonctionnalisation des substituts osseux.....	170
IV.2.1. Formulation des hydrogels de vancomycine.....	171
IV.2.1.1. Choix de l'agent gélifiant et de l'agent réticulant	171
IV.2.1.2. Formulation et propriétés des hydrogels	173

IV.2.2. Fonctionnalisation des substituts osseux par la vancomycine	177
IV.2.2.1. Protocoles de fonctionnalisation	177
IV.2.2.2. Paramètres influençant le chargement des architectures.....	179
IV.2.3. Conclusion	182
IV.3. Libération en conditions dynamiques avec un bioréacteur à perfusion	183
IV.3.1. Présentation générale	183
IV.3.2. Gestion du prélèvement des échantillons issus du bioréacteur	184
IV.3.3. Traitement des données.....	185
IV.4. Cinétique de libération	188
IV.4.1. Étude de l'impact du taux de chitosan sur la cinétique de libération	189
IV.4.2. Étude de l'impact de la concentration en vancomycine dans l'hydrogel sur la cinétique de libération	191
IV.4.3. Étude de l'impact de la température de frittage des architectures sur la cinétique de libération.....	194
IV.4.4. Étude morphologique des architectures après passage dans le bioréacteur	197
IV.4.5. Discussion et conclusion sur les cinétiques de libération.....	202
IV.5. Évaluation de l'efficacité de la vancomycine	204
IV.5.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice	204
IV.5.2. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide.....	205
IV.5.3. Antibiogramme	206
IV.5.4. Conclusion sur l'efficacité de la vancomycine libérée	210
IV.6. Impact de la vancomycine sur les cellules	210
IV.7. Conclusion générale	213
Chapitre V. Choix des cytokines et études de leur libération par les architectures.....	217
V.1. Présentation des cytokines retenues	218
V.1.1. L'interféron gamma	218
V.1.2. Les interleukines 17	219
V.2. Évaluation biologique de l'effet des cytokines sur des cellules pré-ostéoblastiques humaines	220
V.2.1. Protocole d'évaluation de la différenciation des précurseurs ostéoblastiques	221
V.2.2. Impact des cytokines sur l'activité métabolique	223
V.2.3. Évaluation de la différenciation précoce des précurseurs ostéoblastiques	224
V.2.4. Évaluation de la minéralisation de la matrice : coloration au rouge alizarine	227
V.2.5. Effet des cytokines sur la morphologie des cellules.....	229
V.2.6. Conclusion de l'évaluation biologique.....	231
V.3. Fonctionnalisation et évaluation des cinétiques de libération	231
V.3.3. Cinétique de libération de l'IFN- γ	235
V.4. Conclusion et perspective.....	237
Conclusion	240
Références bibliographiques	246
Annexes	266

Table des illustrations

Figure 1 Concept du diamant proposé en 2007 par Giannoudis <i>et al.</i> [9].....	23
Figure 2 Schéma illustrant la structure d'un os long [11].....	28
Figure 3 Schéma illustrant l'organisation macroscopique de l'os cortical [15]	29
Figure 4 Schéma illustrant l'organisation multiéchelle de l'os [16].....	30
Figure 5 Schéma illustrant l'organisation structurale des fibres de collagène [25].....	31
Figure 6 Schéma illustrant l'environnement cellulaire osseux [30]	32
Figure 7 Schéma illustrant les différents acteurs intervenant dans la différenciation des ostéoclastes [48]	34
Figure 8 Schéma présentant les différentes étapes du remodelage osseux [63]	38
Figure 9 Modèle descriptif des différentes étapes de la régénération osseuse d'après Pountos <i>et al.</i> [71]	41
Figure 10 Évolutions de la régénération osseuse au cours du temps [71]	41
Figure 11 Challenges et futures applications des DDS, d'après Gao <i>et al.</i> [93]	49
Figure 12 Présentation générale des antibiotiques et modes d'action associés [96].....	50
Figure 13 Structure moléculaire de la vancomycine [102].....	53
Figure 14 Impacts de différentes cytokines sur les ostéoblastes et les ostéoclastes [49].....	58
Figure 15 Modèles alternatifs à l'expérimentation animale en fonction des différents niveaux d'organisations tissulaires	63
Figure 16 Impacts de la présence d'un flux sur la culture cellulaire [169].....	64
Figure 17 Sens de déplacement d'un fluide au sein d'un tissu épithélial sous-muqueux [169].	65
Figure 18 Schéma simplifié d'un bioréacteur à perfusion utilisé pour évaluer les propriétés d'un substitut osseux [171]	66
Figure 19 Schéma illustrant de la position du substitut osseux dans la chambre interne d'un bioréacteur.	67
Figure 20 Evolution du taux de microporosité ouverte de substituts osseux en hydroxyapatite silicatée mis en forme par microstéréolithographie, en fonction des paramètres de frittage (température et temps de palier). Issu des travaux de Marie Lagorceix [184]	69
Figure 21 Illustration de pièces céramiques à géométries complexes élaborées par fabrication additive [198].....	71
Figure 22 Schéma du procédé et exemple de mise en forme par projection de liant	72
Figure 23 Schéma du procédé et exemple de mise en forme par fusion sur lit de poudre	73
Figure 24 Schéma du procédé et exemple de mise en forme par stéréolithographie	74
Figure 25 Schéma du procédé et exemple de mise en forme par extrusion 3D	75
Figure 26 Principe de fonctionnement de l'HPLC	80

Figure 27 Schéma des différentes méthodes ELISA	81
Figure 28 Illustration des interactions positives souhaitées et des non souhaitées entre les différents acteurs influençant l'intégration du substitut osseux.....	82
Figure 29 Schéma du montage de synthèse d'hydroxyapatite par précipitation en voie aqueuse [219]	85
Figure 30 Diffractogramme caractéristique d'une poudre d'hydroxyapatite synthétisée au laboratoire et calcinée à 1000 °C-15h.....	87
Figure 31 Spectre infrarouge caractéristique d'une poudre d'hydroxyapatite calcinée à 1000 °C durant 15 h	88
Figure 32 Etude du comportement rhéologique de la pâte lors de l'extrusion par rhéologie en oscillation d'après Delphine Gourdonnaux [223].....	94
Figure 33 Schéma du bioréacteur à perfusion InFlow (SKE research equipment)	95
Figure 34 Schéma de la mise en place d'une architecture céramique dans une chambre du bioréacteur à perfusion.....	96
Figure 35 Spectres infrarouge caractéristiques d'une poudre d'HA avant et après calcination à 1000 °C – 1 h	104
Figure 36 Évolution du diamètre des particules de la poudre d'hydroxyapatite calcinée en fonction du temps d'attrition.....	105
Figure 37 Organigramme du protocole d'attrition des poudres d'HA	106
Figure 38 Caractéristiques du lot d'hydroxyapatite utilisé.	107
Figure 39 Organigramme des différentes étapes de formulation du M-hydrogel.....	109
Figure 40 Organigramme des différentes étapes de formulation de la pâte céramique.....	109
Figure 41 Représentation schématique des limites d'Atterberg et de l'indice de plasticité ..	110
Figure 42 Photographies illustrant l'incidence du taux de chargement en poudre d'HA sur la tenue des architectures crues (vue de dessus).....	111
Figure 43 Rhéologies en oscillation avec balayage en amplitude des pâtes d'hydroxyapatite. Les modules élastique G' (en Pa, courbe bleue), et visqueux G'' (en Pa, courbe verte) et la contrainte τ (en Pa, courbe rouge) sont donnés en fonction de la déformation en oscillation (en %).	112
Figure 44 Rhéologies en oscillation avec balayage en fréquence à 1500 Pa des pâtes d'hydroxyapatite. Les modules élastique G' (en Pa, courbe bleue), et visqueux G'' (en Pa, courbe verte) sont donnés en fonction de la fréquence (en Hz).....	113
Figure 45 Organigramme des différentes étapes de préparation des poudres d'hydroxyapatite, de formulation et de travail des pâtes céramiques jusqu'à leur mise en forme par micro-extrusion.....	114
Figure 46 Schéma des différentes étapes du processus d'impression des pièces de la conception du modèle 3D à la réalisation de l'architecture.	115
Figure 47 Modèle CAO généré pour obtenir une structure 3D de type « cage » avec une buse de 600 μm (unités en mm)	116

Figure 48 Photographie de la micro-extrudeuse ID-conception utilisée durant ces travaux	118
Figure 49 Illustration d'une pièce imprimée avec une vitesse d'extrusion de 12 mm/s (vue de dessous).....	122
Figure 50 Évolution du point de rosée en fonction de l'humidité relative dans l'air. Issu des travaux de L. Changyong <i>et al</i> [235].....	124
Figure 51 Schéma des différentes étapes de séchage d'un matériau poreux [236]	126
Figure 52 Cycle de séchage des pièces imprimées par robocasting.....	127
Figure 53 Analyse thermogravimétrique de filaments de pâte séchée et spectre de masse associé.....	129
Figure 54 Etude de comportement thermique de la pâte céramique.....	131
Figure 55 Cycles de frittage retenus pour les pièces en hydroxyapatite imprimées par micro-extrusion.....	132
Figure 56 Diffractogrammes et spectres FTIR des pièces frittées en fonction de la température de frittage.	133
Figure 57 Photos des pièces illustrant le processus de mise en forme.	134
Figure 58 Schéma illustrant les points de mesure des architectures séchées avant et après frittage selon les axes x et y. Les flèches rouges indiquent les trois mesures effectuées pour l'axe x.	135
Figure 59 Micrographies MEB de la macrostructure des architectures en fonction des conditions de frittage (vue de dessus, dans le plan xy).....	138
Figure 60 Images MEB de coupe transversale d'architectures en fonction de la température de frittage.	141
Figure 61 Images MEB de la microstructure des architectures en fonction des conditions de frittage (vue de dessus).	143
Figure 62 Triangle d'optimisation des compromis en chromatographie [246].....	149
Figure 63 Schéma type d'un chromatogramme d'un mélange à deux composés séparés par HPLC	150
Figure 64 Illustration de la nomenclature utilisée lors de ces travaux pour décrire les protocoles HPLC.	152
Figure 65 Variation des concentrations en acétonitrile dans les protocoles d'analyses mis en place pour détecter la vancomycine en solution	153
Figure 66 Chromatogrammes de la vancomycine en fonction du protocole d'analyse	154
Figure 67 Chromatogrammes issus des travaux de Cao <i>et al.</i> présentant la dégradation de la vancomycine au cours du temps en fonction de la composition du milieu aqueux utilisé [248].	155
Figure 68 Structure chimique des différents produits de dégradation de la vancomycine issus des travaux de M. Cao <i>et al.</i> [248].	156
Figure 69 Chromatogramme caractéristique d'une solution aqueuse de vancomycine incubée pendant 7 jours à 37 °C.....	157

Figure 70 Dégradation de la vancomycine dans du PBS 1X au cours du temps, d'après les travaux de M. Cao <i>et al.</i> [248].....	158
Figure 71 Structure chimique du glycopeptide A2-2 de la téicolplanine (A) et de la caféine (B). Issus respectivement des travaux de Marrubini <i>et al.</i> [251] et de P.N. Patil [252].....	159
Figure 72 Chromatogrammes de la téicolplanine.	160
Figure 73 Résultats des deux premières campagnes de libération.	162
Figure 74 Chromatogramme et protocole de séparation de la caféine et de la vancomycine en solution.....	166
Figure 75 Chromatogrammes de la vancomycine dégradée et de la caféine obtenus en utilisant un protocole isocratique avec une phase mobile contenant 10% d'acétonitrile.	168
Figure 76 Structure chimique de la chitine et du chitosan [257].....	171
Figure 77 Structure chimique du triphosphate pentasodique (TPPS) [265].....	172
Figure 78 Organigramme de la formulation des hydrogels (C-hydrogel) de vancomycine ..	173
Figure 79 Rhéogrammes et courbes d'écoulement des hydrogels avec et sans vancomycine à température ambiante et à 37 °C.....	175
Figure 80 Schéma de chargement des architectures à l'aide d'une seringue.....	178
Figure 81 Schéma du dispositif de chargement des pièces sous vide à T_{amb}	179
Figure 82 Profil de libération idéal de la vancomycine par les architectures	183
Figure 83 Schéma du devenir des prélèvements issus du bioréacteur.	184
Figure 84 Étude de taux de chitosan dans l'hydrogel sur la quantité de vancomycine libérée et circulante dans le bioréacteur.	190
Figure 85 Étude de l'impact de la concentration en vancomycine dans l'hydrogel sur la quantité de vancomycine libérée et circulante dans le bioréacteur.	192
Figure 86 Étude de l'impact de la température de frittage des architectures sur la quantité de vancomycine libérée et circulante dans le bioréacteur.....	195
Figure 87 Comparaison de la macrostructure des architectures avant fonctionnalisation et après fonctionnalisation et passage dans le bioréacteur (vue de dessus, dans le plan xy). ..	198
Figure 88 Comparaison de la microstructure des architectures avant fonctionnalisation et après fonctionnalisation et passage dans le bioréacteur (vue de dessus, dans le plan xy). ..	200
Figure 89 Schéma du passage d'un flux préférentiel au travers de la chambre du bioréacteur.	203
Figure 90 Illustration des résultats du test de CMI. Les valeurs correspondent aux concentrations en vancomycine dans chacun des tubes. Ces résultats sont obtenus après une incubation de 24h à 37 °C.	205
Figure 91 Illustration des résultats du test de CMB.....	206
Figure 92 Illustration des résultats des différents antibiogrammes réalisés.....	207

Figure 93 Évolution des diamètres d'inhibition des prélèvements issus de la campagne 2 et 3 du bioréacteur, dans lesquelles la concentration de vancomycine dans l'hydrogel et les températures de frittages ont été modulée.	208
Figure 94 Évolution du diamètre d'inhibition en fonction de la concentration et de la nature de la vancomycine.....	210
Figure 95 Evaluation de l'activité métabolique des cellules en fonction de la concentration en vancomycine.	212
Figure 96 Profil de libération idéal de cytokines pro-inflammatoires.....	217
Figure 97 Rôles physiologiques des différentes IL-17 [276].....	219
Figure 98 Schéma du protocole d'évaluation de l'impact des cytokines sur les précurseurs ostéoblastiques.	221
Figure 99 Impact des cytokines sur l'activité métabolique des précurseurs ostéoblastiques	223
Figure 100 Illustration des résultats du marquage de la phosphatase alcaline des précurseurs ostéoblastiques en fonction de la concentration en cytokines.	225
Figure 101 Illustration des résultats du marquage au rouge alizarine des précurseurs ostéoblastiques en fonction de la concentration en cytokines à 21 jours.	228
Figure 102 Observation au microscope optique de la morphologie des cellules ostéoblastiques après marquage successif à la phosphatase alcaline (bleu) et au rouge alizarine (rouge).	230
Figure 103 Microstructures des surfaces des architectures en fonction des températures de frittage.	232
Figure 104 Schéma du protocole de fonctionnalisation des architectures par l'IFN- γ	233
Figure 105 Schéma de la gestion des échantillons issus du bioréacteur lors de l'étude des cinétiques de libération des cytokines.	234
Figure 106 Quantité d'IFN- γ circulant dans le bioréacteur au cours du temps.	235

Table des tableaux

Tableau 1 Bilan des caractéristiques des différents procédés de fabrication additive	77
Tableau 2 Bilan des paramètres utilisés lors de la synthèse des poudres d'hydroxyapatite ..	84
Tableau 3 Fiches PDF de référence pour l'indexation des diffractogrammes	89
Tableau 4 Bandes de vibrations et de déformations angulaires caractéristiques des groupements d'intérêt pour l'étude des phosphates de calcium d'après Elliott [221].....	90
Tableau 5 Évolution du D10, D50 et D90 et de la surface spécifique des poudres d'HA calcinées en fonction du temps d'attrition	105
Tableau 6 D10, D50, D90 et surface spécifique du lot de poudres utilisé lors de ces travaux	107
Tableau 7 Récapitulatif des caractéristiques des deux micro-extrudeuses utilisées	118
Tableau 8 Plan d'expérience permettant de définir les paramètres optimaux pour l'impression de pièces en hydroxyapatite. n.c. : paramètres non contrôlés durant l'impression.....	121
Tableau 9 Bilan des paramètres d'impression en fonction de la micro-extrudeuse utilisée .	125
Tableau 10 Évolution des dimensions des pièces séchées avant et après frittage. Le retrait géométrique est calculé d'après les dimensions des pièces séchées.....	135
Tableau 11 Diamètre interne des macropores et des filaments en fonction des températures de frittage. Les mesures ont été effectuées sur deux micrographies par condition. Pour les macropores, au moins 16 pores ont été mesurés par condition soient 32 mesures (d_x et d_y). Pour les diamètres des filaments, les mesures ont été effectuées à intervalle régulier sur tout le long du filament. Plus de 70 mesures ont été effectuées par micrographie.....	140
Tableau 12 Évolution de la microporosité de surface en fonction de la température de frittage	144
Tableau 13 Évolution de la taille des grains en fonction de la température de frittage	144
Tableau 14 Résumés des paramètres testés pour séparer la vancomycine et la caféine en solution.....	165
Tableau 15 Définition des paramètres de séparation optimaux des pics de vancomycine et de la caféine.....	167
Tableau 16 Formulations des hydrogels à base de chitosan étudiées	174
Tableau 17 Indices de consistance (K) et d'écoulement (n) en fonction de la concentration en vancomycine dans les hydrogels et de la température de mesure, d'après la loi d'Ostwald*	176
Tableau 18 Masses d'hydrogel dans les architectures en fonction du protocole de chargement et du type d'hydrogel.....	179
Tableau 19 Bilan des campagnes réalisées en bioréacteur précisant les variables, les modes de chargement, l'étalon interne et le protocole de dosage par HPCL	188
Tableau 20 Proportions moyennes d'hydrogel et de vancomycine chargées dans les pièces en fonction de la quantité de chitosan dans l'hydrogel. Les résultats présentent la moyenne des valeurs obtenues pour 4 pièces différentes.....	189

Tableau 21 Proportions moyennes d'hydrogel et de vancomycine chargés dans les pièces en fonction de la quantité de vancomycine dans l'hydrogel. Les résultats présentent la moyenne des valeurs obtenues pour 4 pièces différentes.....	192
Tableau 22 Évolution de la microporosité de surface en fonction de la température de frittage	194
Tableau 23 Proportions moyennes d'hydrogel et de vancomycine chargées dans les pièces en fonction de la température de frittage. Les résultats présentent la moyenne des valeurs obtenues pour 3 pièces différentes.....	195
Tableau 24 Diamètres des macropores et des filaments avant et après passage dans le bioréacteur.	199
Tableau 25 Résumé des conditions expérimentales de l'évaluation biologique des cytokines	222
Tableau 26 Bilan de l'expression de la phosphatase alcaline par les précurseurs ostéoblastiques	227
Tableau 27 Caractéristiques et nomenclatures de pièces placées dans le bioréacteur à perfusion. CH : hydrogel à 1,85 %m/v de chitosan (cf paragraphe IV.2.1.2).	232

Table des abréviations

ACN :	Acétonitrile
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ALP :	Phosphatase alcaline
ANR :	Agence nationale de la recherche
ARN :	Acide ribonucléique
ATCC :	American Type Culture Collection
ATG :	Analyse thermogravimétrique
BCIP :	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate
BET :	Brunauer-Emmett-Teller
BMP :	Bone morphogenetic protein
b-TCP :	Beta tricalcium phosphate
CAO :	Conception assistée par ordinateur
CH :	Chitosan
CHU :	Centre Hospitalier Universitaire
CLHP :	Chromatographie liquide haute performance
CMB :	Concentration minimale bactéricide
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CRP :	Constant Rate Period
CSH :	Cellules souches hématopoïétiques
CSM :	Cellules souches mésenchymateuse
CTRL :	Contrôle
DDS :	Drug Delivery System
DI :	Diamètre d'inhibition
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DRX :	Diffraction des rayons X
ELISA :	Enzyme linked immunosorbent assay
FA :	Fabrication additive
FAO :	Fabrication assistée par ordinateur
FGF :	Fibroblast Growth Factor
FRP :	Falling Rate Period
HA :	Hydroxyapatite
HAS :	Haute autorité de santé
HPLC :	High performance liquid chromatography
HUVEC :	Human umbilical vein endothelial cells
ICDD :	International Center for Diffraction Data
ICL3 :	Cellules lymphoïdes innées de type 3
ICP-AES :	Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
IFN :	Inteféron
IGIF :	interferon-gamma-inducing factor
IL :	Interleukine
I _p :	Indice de plasticité
IRCER :	Institut de Recherche sur les Céramiques
IRTF :	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
IV :	Intraveineuse
IGF-1 :	Insulin-like growth factor-1
LABCIS :	Laboratoire des Agroressources, Biomolécules et Chimie pour l'Innovation en Santé

LB :	Lymphocyte B
LT :	Lymphocyte T
LTh :	Lymphocyte T helper
LVER :	Linear Viscoelastic Region
MC :	Milieu de croissance
MCN :	Machine à commande numérique
M-CSF :	Macrophage colony stimulating factor
MD :	Milieu de différenciation
MEB :	Microscopie électronique à balayage
MEM :	Minimum Essential Medium
MeOH :	Méthanol
MMPs :	Métalloprotéinases matricielles
MS :	Mass spectrometry
NBT :	Chlorure de tétrazolium
NK :	Natural killer
OB :	Ostéoblaste
OC :	Ostéoclaste
OCN :	Ostéocalcine
OMS :	Organisation mondiale de la santé
OPG :	Ostéoprotégérine
PAL :	Phosphatase alcaline
PBS :	Phosphate-buffered saline
PDF :	Powder Diffraction File
PDGF :	platelet-derived growth factor
PEI :	Polyéthylèneimine
PFA :	Paraformaldéhyde
pH :	Potentiel hydrogène
PO :	Précurseurs ostéoblastiques
PTH :	Hormone parathyroïdienne ou parathormone
RANKL :	Receptor activating NF- κ B ligand
RUNX1 :	Runt-related transcription factor 1
SARM :	Staphylococcus aureus résistant à la m \acute{e} ticilline
SM :	Spectromètre de masse
SSA :	Specific surface area
TGF- β :	transforming growth factor β
THP1 :	Tumor Human Peripheral blood 1
t_m :	Temps mort
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor α
TPPS :	Triphosphate pentasodique
t_r :	Temps de rétention
TSA :	tryptone soja agar
UV :	Ultraviolet
VCAM-1 :	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
V_m :	Volume mort
V_p :	Volume de prélèvement
V_r :	Volume de rétention

Introduction générale

Le système squelettique est un des systèmes du corps humain. Il a un rôle structural, permet de se déplacer, protège les organes internes et assure le maintien de l'homéostasie phosphocalcique. Les os renferment également la moelle osseuse rouge qui est le réservoir des facteurs de croissance et des cellules souches hématopoïétiques (CSH) [1].

Comme tous les autres systèmes, les os sont capables d'auto-régénération. Cependant, des pertes de substances osseuses (défauts osseux) peuvent survenir lors de traumatismes, de cancers, d'infections ou du vieillissement. Lorsque ces défauts sont de tailles trop importantes, l'os n'est plus capable de s'auto-régénérer. Emil H. Schemitsch *et al.* définissent un défaut osseux de taille critique comme étant un défaut de taille suffisante pour empêcher une reconstruction autonome de l'os [2]. Même si la taille de ces défauts critiques peut varier en fonction de la structure ou de la fonction de l'os concerné et des antécédents médicaux du patient, ils nécessitent tous l'utilisation de matériaux de comblement pour assurer une régénération du tissu. De nos jours, entre 5 % et 10 % des fractures ne peuvent pas se régénérer seules et nécessitent l'utilisation d'un matériau de comblement [3].

Pour combler un défaut osseux, la technique chirurgicale de référence reste l'autogreffe. Elle consiste à prélever un fragment d'os issu de la crête iliaque (hanche) du patient pour remplacer la partie d'os manquante. Cette méthode limite le risque de rejet mais présente de nombreux désavantages tels que la comorbidité liée aux deux sites chirurgicaux, et peut être la cause de douleurs chroniques. De plus, la taille du fragment d'os pouvant être utilisé reste limitée à quelques centimètres cubes [4]. Pour pallier ces problèmes, d'autres méthodes sont fréquemment utilisées comme l'allogreffe et la xélogreffe qui utilisent, respectivement, des os provenant de donneurs et d'animaux. Pour limiter les risques de rejets, ces os doivent subir différents traitements afin de décellulariser et stériliser les greffons. Pour pouvoir être implantés, ces matériaux doivent répondre à certains critères. Ils doivent être biocompatibles pour pouvoir être implantés sans induire d'effets indésirables et être stériles ou stérilisables pour limiter le risque d'infection lors de l'implantation. En effet, malgré ces précautions, les risques de développement d'infections dues à la présence de bactéries après chirurgie sont de 2 à 5 % [5].

Aujourd'hui, de nombreux matériaux sont développés pour être implantés dans l'organisme, ils sont regroupés sous le terme de biomatériaux. Parmi eux, les biocéramiques à base de phosphate de calcium et plus particulièrement l'hydroxyapatite sont intéressantes pour le comblement des défauts osseux en raison de leur composition proche de la partie minérale de l'os. De par leur composition, ces matériaux sont dits « bioactifs », c'est-à-dire qu'ils facilitent l'intégration de l'implant en interagissant positivement avec les tissus environnants.

De plus, la porosité des biocéramiques leur confère des propriétés ostéoconductive, qui favorise l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules osseuses à la surface du matériau.

Depuis une vingtaine d'années, le développement des techniques de fabrication additive et l'ingénierie tissulaire osseuse ont permis la conception de substituts osseux synthétiques sur mesure [3]. Ces biomatériaux ont donc pu être utilisés pour combler des défauts osseux, notamment des défauts de grandes tailles au niveau des os plats [6]. Cependant, lorsque le substitut est supérieur à 1 cm³, les cellules n'arrivent pas à coloniser entièrement le biomatériau. De fait, les vaisseaux sanguins ne se développent pas au-delà d'1 cm des bords de l'implant, ce qui conduit à une zone acellularisée au centre de l'implant [7]. Même si cette colonisation cellulaire est suffisante pour assurer l'ancrage et l'intégration des os plats tels que le crâne ou les côtes car ils ont un rôle principalement structural, cela représente un véritable enjeu pour la reconstruction de larges défauts osseux au niveau des os longs. En effet, le rôle des os longs est de fournir un support mécanique et de servir de levier pour permettre les mouvements du corps, ces fonctions sont donc perturbées lors d'une fracture ou d'une perte de substance osseuse. Malheureusement, l'implantation d'une biocéramique n'est pas suffisante, car leurs faibles propriétés mécaniques ne permettent pas de supporter les contraintes liées à la sollicitation de ces os. Ces faibles propriétés mécaniques sont exacerbées par la présence des porosités inhérentes à l'ostéoconduction. Ainsi pour assurer la récupération complète des fonctions, les substituts osseux doivent être colonisés par les cellules ostéoprogénitrices qui synthétiseront la matrice organique de l'os, conférant à l'implant des propriétés mécaniques suffisantes pour résister aux contraintes. La reconstruction de larges défauts osseux au niveau des os longs nécessite donc la colonisation complète du substitut osseux par les cellules ostéogéniques (formation de la matrice osseuse) et angiogéniques (développement de la vascularisation) et ce quel que soit la taille du défaut. La connaissance et la maîtrise de processus de régénération osseuse et d'intégration sont donc primordiales pour assurer la récupération complète des fonctions de l'os et de la niche osseuse.

Dès 2007, Giannoudis *et al.* présentent le concept du diamant (« *Diamond concept* », Figure 1) qui met en évidence les facteurs jouant un rôle majeur dans le processus de régénération osseuse [8]. Les auteurs proposent une vision globale mettant au cœur du processus de régénération osseuse l'environnement cellulaire au niveau de l'os qui est alors qualifié de « bioréacteur ». Douze ans plus tard, cette vision se voit concrétisée par des données cliniques mettant en avant l'intérêt de la prise en compte du concept du diamant dans la gestion des non-unions, c'est-à-dire l'absence de consolidation entre deux fragments d'os [9].

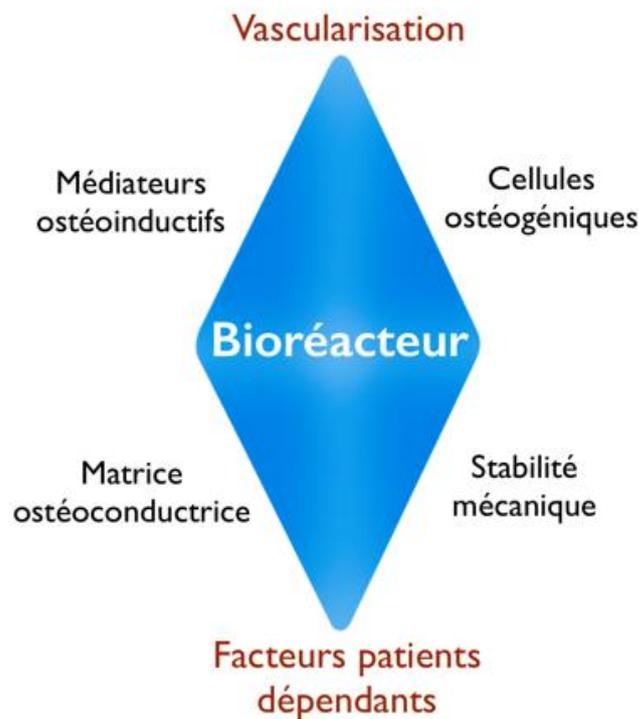


Figure 1 Concept du diamant proposé en 2007 par Giannoudis *et al.* [9]

Les auteurs soulignent que pour permettre une régénération osseuse complète d'une fracture, la présence de médiateurs ostéoinductifs est primordiale. Sécrétés juste après la fracture, ils contribuent à la prolifération et à la différenciation des cellules ostéogéniques et angiogéniques présentes au niveau du site osseux. Les médiateurs ostéoinductifs regroupent des facteurs de croissance tels que le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) responsable de l'angiogenèse, le FGF (*fibroblast growth factor*) stimulant la prolifération des fibroblastes ou encore le PDGF (*platelet-derived growth factor*) qui permet la formation de l'hématome stabilisant la fracture. Ils incluent également des cytokines et autres interleukines pro-inflammatoires dont les rôles ostéoimmunomodulateurs participent au recrutement, à la prolifération et à la différenciation des cellules ostéogéniques et angiogéniques. La présence de cellules multipotentes (CSM) au niveau de la fracture est une des conditions *sine qua non* pour que l'ensemble du processus de régénération osseuse décrit précédemment puisse avoir lieu, car elles vont coloniser le substitut osseux et se différencier en ostéoblastes et en ostéoclastes (cellules ostéogéniques).

P. Andrzejowski et P. Giannoudis soulignent également dans leur concept du diamant, l'importance de la vascularisation dans la régénération osseuse [9]. En effet, sans vascularisation, les facteurs de différenciations, de proliférations, mais également les cellules

et les nutriments ne peuvent atteindre le site lésé, empêchant la mise en place du processus de régénération du tissu. Par ailleurs, il existe de nombreux facteurs, tels que l'âge, le diabète, la consommation d'alcool ou de tabac, qui prédisposent aux risques de non-union (facteurs patients dépendants - Figure 1). Les auteurs qualifient donc l'environnement osseux de « chambre biologique » ou de « bioréacteur », c'est-à-dire un système complexe dans lequel de nombreux types cellulaires coexistent et contribuent au maintien de son intégrité. Dans le cadre d'un défaut osseux, ce système est perturbé, ce qui peut impacter le processus de régénération osseuse.

Les points abordés par P. Andrzejowski et P. Giannoudis peuvent être étendus à l'implantation et à l'intégration de substituts osseux synthétiques. Or, d'après le concept du diamant (Figure 1), seuls deux des critères nécessaires à la régénération osseuse complète peuvent être modulés en jouant sur les propriétés physico-chimiques du matériau, la matrice ostéoconductrice et la stabilité mécanique. Même s'il est possible de modifier la composition chimique ainsi que la microporosité et la macroporosité du matériau pour augmenter ses propriétés ostéoconductives, l'impact sur l'ostéointégration reste limité voire inexistante. Dans leurs travaux, les auteurs démontrent qu'il est possible d'ajouter ou d'améliorer les fonctions biologiques d'un substitut osseux par l'addition de molécules telles que les BMP (*Bone morphogenetic protein*), mais pour maximiser leur apport il faut qu'elles soient libérées localement [9]. Le but d'une fonctionnalisation de l'implant par des molécules est donc de stimuler ou d'attirer les cellules (chimiotactisme) pour restaurer au plus vite « l'écosystème osseux » et optimiser le processus de régénération osseuse.

Pour qu'un substitut osseux synthétique puisse remplir l'ensemble des critères exposés précédemment, il va être nécessaire de le fonctionnaliser, c'est-à-dire d'ajouter des molécules à la surface ou au sein de sa porosité pour améliorer ses propriétés. L'implant va alors devenir un système d'administration de molécules actives (*Drug Delivery System* ou DDS). Ces molécules doivent être choisies pour répondre aux limitations intrinsèques du substitut osseux. Dans le cadre du comblement de larges défauts osseux au niveau des os longs, les principales limitations sont sa faible colonisation par les cellules, limitant ses propriétés mécaniques et le développement d'infections liées à l'implantation du matériau lors de l'intervention chirurgicale, permettant aux bactéries de rentrer dans l'organisme. Les molécules chargées sur le biomatériau doivent donc répondre à ces problématiques.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet ANR *Funmodular* qui vise à développer une céramique de 3^e génération favorisant l'intégration de l'implant et la régénération osseuse. Cette thèse détaille les procédés de mise en forme et de fonctionnalisation d'un substitut osseux en hydroxyapatite par des cytokines (IL-17 et IFN- γ) et un antibiotique (vancomycine). Afin d'étudier les cinétiques de libération de ces principes

actifs dans un système mimant les conditions physiologiques, un modèle basé sur l'utilisation d'un bioréacteur à perfusion a été développé. Ce bioréacteur est adapté à la culture cellulaire, ce qui permettra à terme d'étudier les interactions entre le matériau, les molécules et les cellules présentes au niveau du site osseux (cellules endothéliales, cellules ostéoprogénitrices et cellules immunes).

Concernant la vascularisation et la colonisation du matériau, l'utilisation de cytokines semble parfaitement appropriée. Il s'agit de protéines intervenant dans le processus inflammatoire. Elles sont responsables entre autres du recrutement de cellules spécifiques par chimiotactisme ainsi que de leur différenciation. En ajoutant des cytokines à la surface du matériau, il doit être possible de répondre au problème de vascularisation en recrutant des cellules endothéliales, mais aussi de recruter des cellules ostéogéniques et d'induire leur différenciation pour initier le processus de régénération osseuse. D'après le schéma issu des travaux de Giannoudis *et al.*, l'utilisation d'une ou plusieurs cytokines permettrait donc de répondre aux besoins de la « chambre biologique » concernant la présence de vascularisation, de médiateurs ostéoinductifs et de cellules ostéogéniques (Figure 1).

Pour éviter les risques d'infections liés à la présence et au développement de pathogènes extérieurs à la surface de l'implant, il est possible d'ajouter un antibiotique au sein du matériau. La libération progressive et locale permet de réduire l'impact systémique du principe actif (PA) tout en empêchant le développement d'infection durant le processus de régénération osseuse.

Pour assurer l'intégration du substitut osseux, la présence des cytokines et de l'antibiotique sur le matériau est donc pertinente, cependant le mode d'action de ces molécules est très différent, elles doivent donc être chargées sur le matériau de façon indépendante. De plus la méthode de chargement doit être adaptée au profil de libération souhaité. L'efficacité et la toxicité de ces principes actifs doivent également être évaluées *in vitro* pour s'assurer que les cinétiques observées permettent la pleine efficacité des principes actifs sans être toxiques pour les cellules de la niche osseuse.

L'ensemble des travaux présenté dans ce manuscrit s'articule en cinq chapitres. Le premier est consacré à une étude bibliographique dont le but est de définir le positionnement du projet et de justifier les points développés dans la partie expérimentale. Sa première partie est focalisée sur la description de l'environnement osseux et des mécaniques physiologiques de remodelage et de régénération de ce tissu. Sa deuxième décrit les défauts de taille critique et l'intérêt d'utiliser un substitut osseux fonctionnalisé en tant que matériau de comblement pour permettre une délivrance locale de molécules actives. La troisième partie de ce chapitre est dédiée à la caractérisation de la structure micro-macroporeuse des architectures dans le but

de faciliter l'ostéointégration. Enfin, sa dernière partie résume le positionnement des travaux en précisant le choix du procédé de mise en forme retenu (microextrusion ou *robocasting*) et des techniques de dosage des molécules actives.

Le deuxième chapitre présente les protocoles expérimentaux généraux utilisés lors de ces travaux. Il regroupe la synthèse des poudres d'hydroxyapatite, les méthodes de caractérisations physico-chimiques des poudres et des architectures, mais aussi les protocoles de culture cellulaire, d'évaluations biologiques et microbiologiques utilisés lors de ces travaux.

Le troisième chapitre détaille la mise en forme des substituts osseux en hydroxyapatite. Ce chapitre couvre l'ensemble du processus de fabrication par micro-extrusion, de la formulation de la pâte nécessaire à l'impression des architectures jusqu'à la caractérisation de l'état de surface des pièces micro-macroporeuses post frittage, par microscopie électronique à balayage.

Le chapitre quatre est dédié à la fonctionnalisation des architectures par la vancomycine. Dans ce chapitre sont développés les protocoles de formulation des hydrogels de vancomycine, les méthodes utilisées permettant la fonctionnalisation et l'étude de la libération de la vancomycine par les architectures en conditions dynamiques. Le chapitre quatre présente également l'impact de la vancomycine sur les cellules présentes au niveau du site osseux (cellules endothéliales, cellules ostéoprogénitrices et cellules immunes). La quantité de vancomycine minimale pour inhiber la croissance de staphylocoque doré a également été déterminée.

Le dernier chapitre décrit l'impact de l'IL-17 et de l'IFN- γ , les deux cytokines retenues, sur la différenciation des précurseurs ostéoblastiques. La fonctionnalisation des architectures par les cytokines et l'étude de leur cinétique de libération en utilisant un bioréacteur à perfusion est aussi développée.

Enfin, ce manuscrit s'achève sur une conclusion générale reprenant les principaux résultats et proposant des perspectives d'améliorations.

Chapitre I. Étude bibliographique

I.1. Physiologie des os longs

Le rôle des os longs est de fournir un support mécanique et de servir de levier pour permettre les mouvements. Ces fonctions sont rendues possibles par une organisation complexe et multiéchelle (allant du nanomètre au centimètre) de la matrice osseuse. Cette matrice est synthétisée par les cellules de la niche osseuse et doit ses propriétés à sa composition à la fois organique et minérale. Une bonne compréhension de l'organisation multiéchelle des os longs est indispensable pour comprendre les mécanismes intervenant dans les processus de régénération osseuse.

L'organisation de la matrice ainsi que les cellules de la niche osseuse sont présentées dans les parties suivantes.

I.1.1. Structure des os longs

Comme le montre la Figure 2, l'os présente une structure complexe qui est directement liée à sa fonction. Chaque os est constitué de deux parties, une première partie compacte appelée os cortical et une seconde partie, l'os spongieux ou trabéculaire. La proportion de ces deux parties dépend du type et de la fonction de l'os [10]. Par exemple, pour les os plats (crâne et côtes) dont le rôle est de protéger les organes, la proportion d'os cortical est plus importante que celle de l'os trabéculaire. D'un point de vue général, la surface externe de l'os est recouverte par une membrane, le périoste, et la surface interne, par l'endoste [11]. Plus spécifiquement pour les os longs, les extrémités ou épiphyses sont constituées de tissu trabéculaire recouvert d'une fine couche de tissu cortical. La surface externe des épiphyses est également recouverte de cartilage afin de protéger l'os des frottements au niveau des articulations. Le corps de l'os constitue la diaphyse et se compose d'os cortical de forme tubulaire entourant la moelle osseuse. L'organisation macroscopique des os longs est développée ci-dessous.

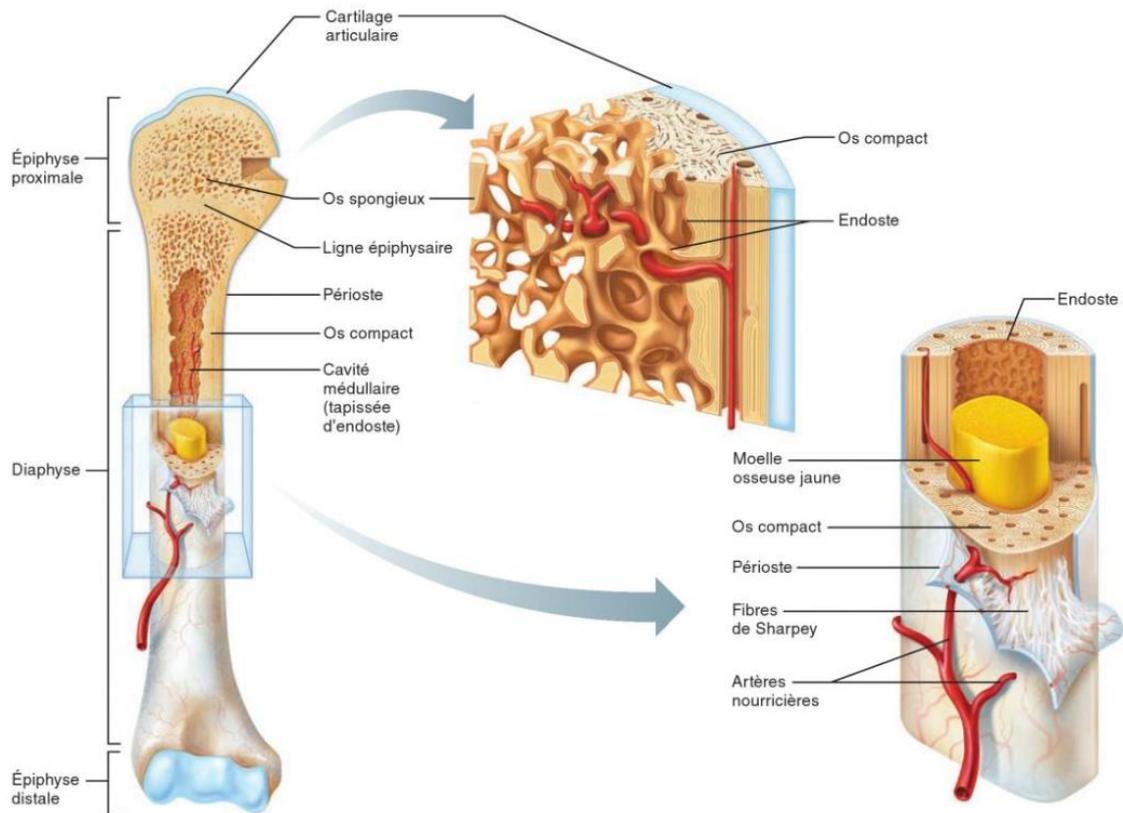


Figure 2 Schéma illustrant la structure d'un os long [11]

L'os cortical

La structure de l'os cortical est présentée en Figure 3. De par sa structure compacte, l'os cortical confère à l'os ses propriétés mécaniques. Sa résistance n'est pas seulement liée à sa densité, mais également à sa microstructure composée d'une matrice osseuse organisée en unités concentriques lamellaires, appelées ostéons. Chaque ostéon mesure entre 10 μm et 500 μm de diamètre et est orienté parallèlement à l'axe de l'os [12], [13]. Même si l'os cortical est métaboliquement moins actif que l'os trabéculaire, ses cellules ont besoin d'un apport constant en nutriments pour assurer le renouvellement cellulaire et le remodelage osseux. Pour cela, l'os cortical est vascularisé par les canaux de Havers, présents au centre des ostéons, reliés entre eux par les canaux de Volkmann [14].

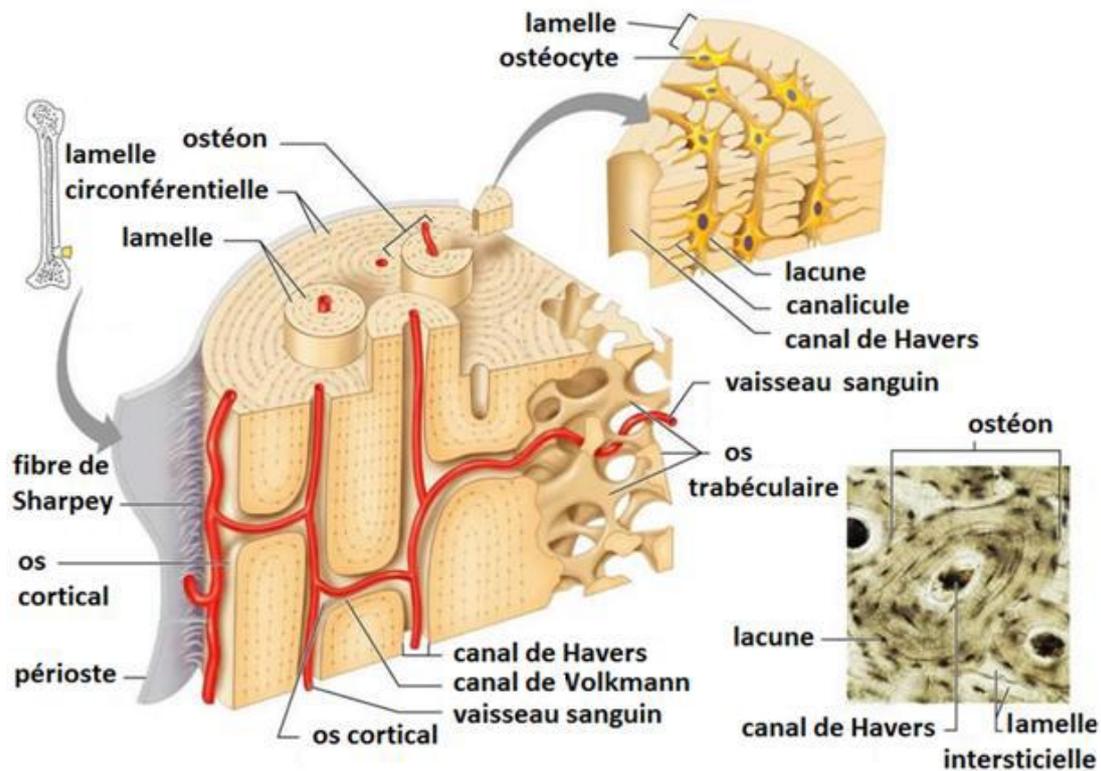


Figure 3 Schéma illustrant l'organisation macroscopique de l'os cortical [15]

L'os trabéculaire

Moins dense que l'os cortical, le rôle de l'os trabéculaire est de rediriger les contraintes subies par les articulations, lors d'un mouvement ou d'un stress, vers l'os cortical [16]. Il est formé de trabécules osseuses lui conférant une structure spongieuse. Chacune des cavités renferme des vaisseaux sanguins et de la moelle osseuse rouge contenant les précurseurs des éléments figurés du sang. L'os trabéculaire possède donc une activité métabolique élevée permettant notamment le maintien de l'homéostasie [16], [17].

Le périoste

Le périoste est un tissu conjonctif recouvrant la surface externe des os (hors surfaces articulaires). Il est fermement attaché à la surface externe de l'os cortical par des fibres de collagène appelées fibres de Sharpey. Son rôle est d'assurer une protection physique et mécanique à l'os, mais il sert également de réservoir de cellules et de molécules (collagène, *Bone Morphogenetic Proteins...*). Sa couche externe est composée majoritairement de collagène, de fibroblastes, de nerfs et de vaisseaux sanguins, sa couche interne se compose, elle, d'une matrice lâche de collagène et constitue une véritable niche cellulaire. Elle contient des cellules souches mésenchymateuses, mais également des précurseurs ostéogéniques nécessaires à la formation et au remodelage osseux [18], [19].

L'endoste

L'endoste est un tissu conjonctif constitué d'une seule membrane. Il recouvre la surface interne de l'os, qu'il soit cortical ou trabéculaire, mais tapisse également les canaux de Havers et de Volkmann. Il se compose de vaisseaux sanguins, de cellules bordantes et de collagène de type III. Il contribue à la vascularisation et au remodelage de la surface interne des os [14], [20].

I.1.2. Composition et organisation de la matrice osseuse

Comme précisé en introduction, l'os doit ses propriétés mécaniques et sa résistance aux fractures à sa composition, mais aussi à son organisation multiéchelle. Il est constitué de cellules qui synthétisent une matrice extracellulaire composite, à la fois minérale et organique (Figure 4). La phase minérale, principalement de l'hydroxyapatite, représente 65% de la masse totale de l'os. La phase organique représente, elle, 25% et est constituée principalement de collagène de type I. Enfin, les 10% restant correspondent à de l'eau et à des lipides. Ces proportions peuvent varier en fonction du site osseux, du genre, de l'âge, du type d'os et peuvent être affectées par des pathologies (ex. maladie des os de verre) ou des traitements (ex. chimiothérapie) [16], [21], [22], [23].

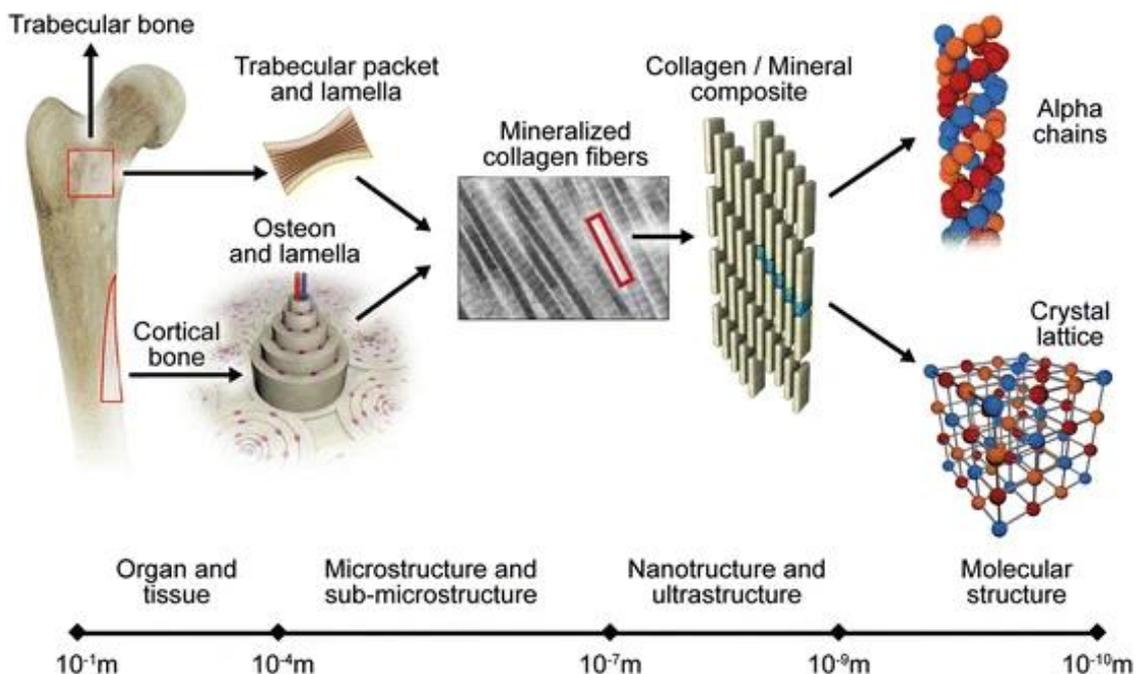


Figure 4 Schéma illustrant l'organisation multiéchelle de l'os [16]

L'ensemble des protéines de la matrice organique est réparti en deux groupes selon leurs fonctions. Les protéines dites structurales, telles que le collagène et la fibronectine, servent de support et les protéines spécialisées, quant à elles, coordonnent l'organisation de la matrice, le processus de minéralisation ainsi que les interactions cellules-matrice [14], [24]. La matrice organique contribue à l'élasticité et à la flexibilité du tissu osseux. Pour cela, elle est composée à 90% de collagène de type I, molécule constituée de trois chaînes polypeptidiques enroulées en triple hélice pour former le tropocollagène. Cinq fibres de tropocollagène vont s'assembler pour former des microfibrilles qui forment spontanément des fibres pouvant mesurer jusqu'à 1 cm de long et 1 mm de diamètre (Figure 5). Entre chaque microfibrille il existe un espace d'environ 67 nm (Figure 5). Ces pores sont particulièrement importants puisqu'ils permettent d'initier et de favoriser le processus de minéralisation [16], [25], [26].

La phase minérale représente la majeure partie de l'os (65 %m), elle se compose de nanocristaux de phosphate de calcium (CaP) dont la forme prédominante ($\approx 70\%$) correspond à un analogue de l'hydroxyapatite de formule $\text{Ca}_{8,3}\square_{1,7}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3, \text{HPO}_4)_{1,7}(\text{OH})_{0,3}\square_{1,7}$ (\square lacunes) faiblement cristallisé et fortement substitué [27], [28], [29]. Ces nanocristaux sont produits durant la phase de minéralisation et peuvent atteindre 40 nm de long. De morphologie plane, ils s'agencent parallèlement les uns avec les autres le long des fibrilles et fibres de collagène [16].

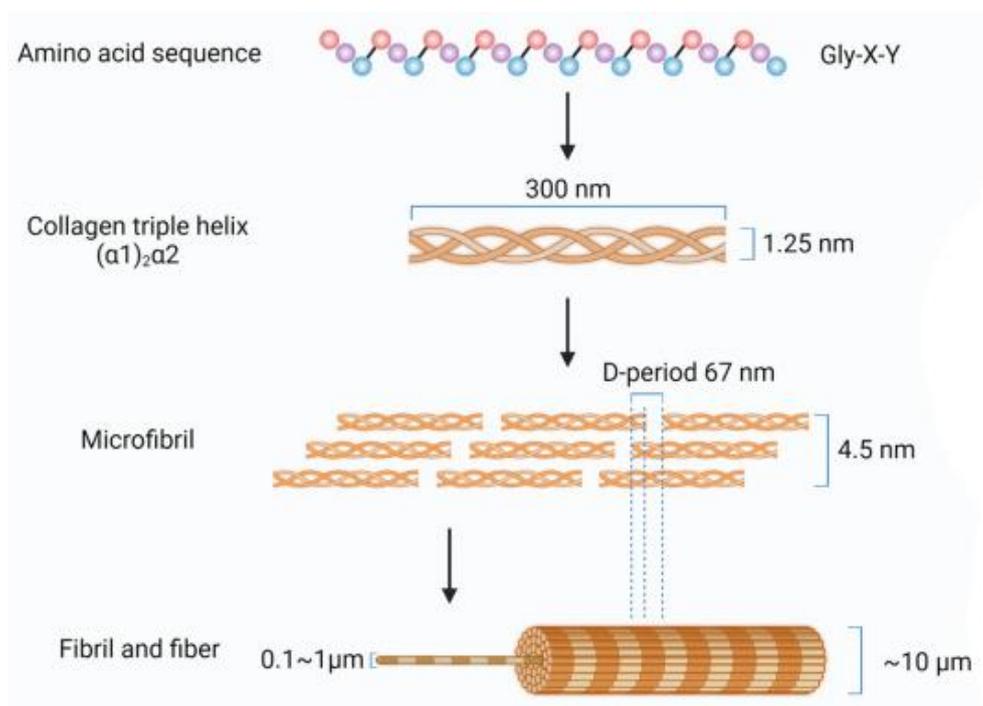


Figure 5 Schéma illustrant l'organisation structurale des fibres de collagène [25]

I.1.3. Les cellules de la niche osseuse

La moelle osseuse, et plus particulièrement la moelle osseuse rouge, est un véritable écosystème cellulaire à l'intérieur des os (Figure 6). Deux grands groupes de cellules multipotentes s'y trouvent : les cellules souches hématopoïétiques (CSH), qui sont les précurseurs des différentes cellules circulantes du sang et du système immunitaire, et les cellules souches mésenchymateuses qui sont, quant à elles, les précurseurs des ostéoblastes, chondroblastes, myocytes, cellules endothéliales et adipocytes. L'ensemble de ces cellules confère à l'os une activité cellulaire et métabolique très importante.

Les cellules présentées sur la Figure 6 ainsi que leurs rôles respectifs sont détaillés ci-dessous.

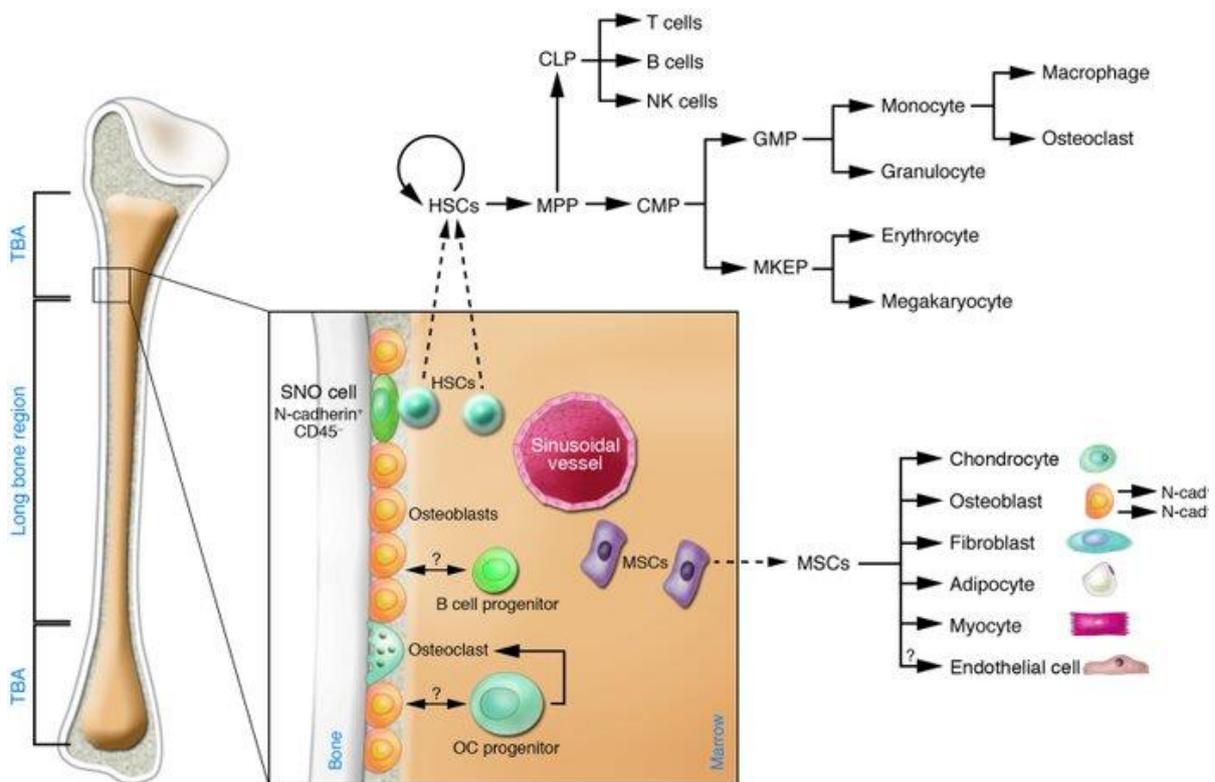


Figure 6 Schéma illustrant l'environnement cellulaire osseux [30]

Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules multipotentes pouvant se différencier en cellules spécialisées et ayant des fonctions très spécifiques telles que le transport d'oxygène et le maintien des défenses immunitaires [31]. Bien que peu nombreuses elles sont à l'origine de l'ensemble des éléments figurés du sang et se localisent uniquement

dans la moelle osseuse (Figure 6). On constate deux populations de CSH. La première qui représente environ 70 % des CSH, est constituée de CSH en cours d'activation et se situe dans la partie centrale de la moelle osseuse. La seconde population se compose de CSH en dormance et est localisée au niveau de l'endoste [32], [33], [34], [35]. Les CSH s'autorenouvellent et se différencient tout au long de la vie d'un individu. Il est estimé qu'un adulte produit approximativement 4.10^{11} cellules hématopoïétiques par jour. Ce chiffre peut encore augmenter en cas de diminution du nombre de ces cellules en circulation (saignements, inflammations, traitement par irradiation ou encore chimiothérapie) [36], [37].

Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont, comme les CSH, des cellules multipotentes capables d'autorenouvellement, mais contrairement aux CSH, elles ne sont pas uniquement localisées dans le tissu osseux et sont également présentes dans les tissus adipeux et la peau [38], [39], [40]. Elles ont la particularité de se différencier en de nombreux types de cellules stromales matures : ostéoblastes, ostéocytes, chondrocytes, adipocytes, myocytes ou cellules endothéliales [41]. Elles participent également à la régulation de l'hématopoïèse et possèdent une activité immunomodulatrice. En réponse à un signal, elles quittent leurs niches, rejoignent la circulation périphérique et passent à travers la paroi des vaisseaux sanguins pour atteindre leurs cibles [42], [43]. Pour toutes ces raisons, les CSM jouent un rôle important dans le renouvellement cellulaire, mais aussi dans le développement et la régénération de différents tissus et organes (os, foie, muscles...) [40], [44].

Les ostéoblastes

Issus de la différenciation de CSM, les ostéoblastes (OB) sont des cellules polarisées qui ont pour rôle d'assurer le maintien de la structure de l'os. Pour cela, ils sont situés sur les surfaces internes et externes de l'os et synthétisent la matrice extracellulaire osseuse sur laquelle ils reposent. Dans un premier temps, ils vont produire la matrice inorganique de l'os, l'ostéoïde (un tissu osseux jeune), qui leur servira de support pour l'étape suivante de minéralisation. Lors de la synthèse de la nouvelle matrice, certains ostéoblastes restent piégés dans celle-ci et se différencient en ostéocytes. Les ostéoblastes restants à la surface de la matrice minérale de l'os vont eux entrer en quiescence formant ainsi les cellules bordantes [45].

Les cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes différenciés avec une activité métabolique diminuée. Ces cellules aplaties forment une couche cellulaire couvrant la surface de la matrice minérale des os sans remodelage actif. Leurs rôles consistent à protéger la surface de la matrice minérale de l'os et à faciliter la résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes. Tant qu'elles sont présentes, les ostéoclastes ne peuvent pas adhérer à la surface de l'os.

Elles délimitent la zone de remodelage et synthétisent des collagénases qui vont dissoudre la fine couche d'ostéoïde, facilitant l'adhésion et l'action des ostéoclastes. Les cellules bordantes seraient également capables d'inverser leur processus de différenciation pour redevenir des ostéoblastes matures [46].

Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes différenciés piégés dans la matrice osseuse qu'ils ont synthétisée. Ce sont des cellules dendritiques dont la fonction est de synthétiser la sclérostine, une protéine qui inhibe la synthèse de la matrice osseuse par les ostéoblastes. Elles servent également de mécanosenseurs et participent au maintien de l'équilibre homéostatique du calcium sanguin. Certaines recherches tendent à prouver que l'apoptose¹ des ostéocytes libère des molécules (protéines) participant au recrutement et à la différenciation de précurseurs ostéoclastiques [47].

Les ostéoclastes

Issus de la différenciation de CSH, les ostéoclastes (OC) sont des cellules polarisées dont le pôle basal est en contact avec l'os. Ils sont responsables de la résorption de la matrice osseuse. Dans un premier temps, l'ostéoclaste adhère à la surface de l'os et forme un compartiment appelé zone de scellement. Il va ensuite libérer à l'intérieur de celui-ci des ions H^+ et Cl^- ainsi que des protéases permettant de dissoudre respectivement la partie minérale et organique de la matrice osseuse [46]. La différenciation des ostéoclastes est un processus complexe qui intervient notamment dans le cadre de la régénération osseuse. Ce processus ainsi que les différents acteurs sont présentés dans la Figure 7.

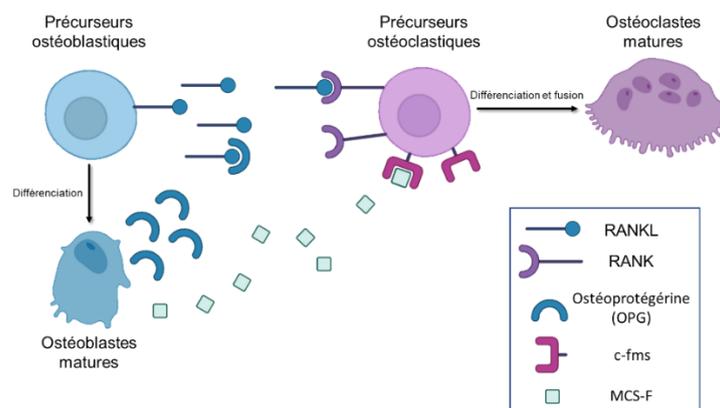


Figure 7 Schéma illustrant les différents acteurs intervenant dans la différenciation des ostéoclastes [48]

¹ Mort cellulaire programmée induite en réponse à un signal

Le processus de différenciation des ostéoclastes a lieu sous l'influence de différents facteurs de croissance et de transcriptions. Le *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) est produit par les ostéoblastes matures et se fixe sur les récepteurs c-fms exprimés à la surface des précurseurs ostéogéniques, ce qui permet d'engager les cellules dans la lignée ostéoclastique (Figure 7). La différenciation et la fusion des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures dépendent de la fixation du *receptor activating NF- κ B ligand* (RANKL), produit par les précurseurs ostéoblastiques, sur son récepteur RANK exprimé à la surface des précurseurs ostéoclastiques (Figure 7). Ce processus de différenciation est régulé par la production d'ostéoprotégérine (OPG) par les ostéoblastes matures. En effet, l'OPG se fixe sur RANKL l'empêchant ainsi de se fixer sur RANK, ce qui inhibe la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures (Figure 7) [48], [49].

Les chondrocytes

Chez l'adulte, les chondrocytes sont principalement localisés au niveau des articulations. Plus particulièrement localisés au niveau de l'épiphyse des os longs, leurs rôles sont de synthétiser et de maintenir l'intégrité du tissu cartilagineux. La présence de cartilage permet d'apporter un soutien mécanique et de protéger l'os tout en facilitant le mouvement de l'articulation. Les chondrocytes disposent de mécanorécepteurs sensibles à la pression stimulant la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire cartilagineuse lors des mouvements ou des chocs. Les chondrocytes sont l'unique type cellulaire du cartilage qui n'est ni vascularisé ni innervé. L'apport en nutriment est assuré par le liquide synovial et les vaisseaux sous-chondraux, cependant les chondrocytes vivent en hypoxie et privilégient un métabolisme anaérobie [50], [51].

Les myocytes

Issus de la différenciation de CSM, les myocytes, plus communément appelés fibres musculaires, sont des cellules ayant de fortes capacités contractiles. Les myocytes se classent en trois grands types: les cellules du muscle strié squelettique, les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses [52]. Les premières se fixent à l'os ou au cartilage permettant le déplacement de celui-ci lors de la contraction de la fibre musculaire. Leur rôle est de fournir une énergie mécanique pouvant initier un mouvement ou maintenir la posture. Ils possèdent également une forte activité métabolique, servant de stockage d'acides aminés et produisant de la chaleur nécessaire à la régulation de la température corporelle [53]. Les cardiomyocytes sont de courtes cellules musculaires assurant la contraction du cœur. Pour cela elles réagissent à un signal électrique (potentiel d'action) qui induit une dépolarisation de la membrane des cardiomyocytes, entraînant ainsi leurs contractions de façon autonomes et simultanées [54]. Les cellules musculaires lisses s'organisent en feuillets formant les parois

des structures tubulaires telles que les vaisseaux sanguins ou le tube digestif. Sous le contrôle du système nerveux viscéral, leur fonction contractile permet d'ajuster le diamètre des structures tubulaires (vasodilatation, vasoconstriction, péristaltisme) [55].

Les adipocytes

Les adipocytes sont des cellules spécialisées dans le stockage des lipides (graisse) sous forme de triglycérides. Ils représentent une partie des réserves d'énergie du corps. Il existe deux types d'adipocytes différents, les blancs et les bruns. Les adipocytes blancs sont des glandes endocrines dont le rôle est de sécréter des hormones permettant la synthèse, le stockage et la mobilisation des lipides. Ils produisent également des hormones régulant l'appétit et la satiété. Les adipocytes bruns possèdent également une activité métabolique importante puisqu'ils participent à la thermorégulation du corps. Pour cela, ils peuvent produire de la chaleur par phosphorylation d'acide gras [56].

Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales s'associent entre elles pour former l'endothélium qui est la monocouche de cellules tapissant la surface interne de la paroi des vaisseaux sanguins. Il s'agit d'une barrière sélective directement en contact avec le sang. Les cellules endothéliales sont couplées aux cellules musculaires lisses *via* des « *gap junctions* » et participent activement au contrôle du tonus vasculaire en sécrétant diverses hormones ayant des effets vasoconstricteur ou vasodilatateur. L'endothélium sain possède des propriétés anticoagulantes et antithrombotiques facilitant le passage du sang, cependant lorsque le vaisseau sanguin est endommagé, certains stimulus pro-inflammatoires peuvent changer le phénotype des cellules endothéliales leur conférant des propriétés coagulantes et thrombotiques [57], [58], [59].

Les cellules immunes

Issues de la différenciation des CSH, les cellules immunes regroupent de nombreux types cellulaires ayant des fonctions très variées. Elles sont regroupées en 3 catégories, les granulocytes, les phagocytes, et les lymphocytes. Leur rôle est d'assurer la protection de l'organisme contre les différents pathogènes extérieurs. Elles participent à deux types de réponses immunitaires, l'immunité innée qui est la première à se mettre en place et l'immunité adaptative, plus tardive, mais plus spécifique. Lorsqu'un agent pathogène pénètre dans l'organisme, les granulocytes sont les premières cellules immunes mobilisées. Ils sont recrutés au niveau du site cible par chimiotactisme, cela signifie que la libération de cytokines pro-inflammatoires va permettre le recrutement des granulocytes au niveau du site cible.

Le chimiotactisme est basé sur la mise en place d'un gradient de concentration en molécules permettant aux cellules de se déplacer selon le sens du gradient. Le terme de chimiotactisme

positif est utilisé lorsque les cellules se déplacent vers la zone dans laquelle la molécule est la plus concentrée, dans le cas contraire, il s'agit de chimiotactisme négatif [60].

Le but des granulocytes est de phagocyter les agents pathogènes. Les phagocytes interviennent ensuite. Ils font la transition entre l'immunité innée et adaptative en exprimant à leur surface les motifs moléculaires spécifiques des pathogènes qu'ils adressent directement aux lymphocytes, lesquels produiront des anticorps spécifiques pouvant se fixer sur les récepteurs des pathogènes [61].

Bien que présentées séparément, l'ensemble des cellules présentées ci-dessus interagissent et communiquent entre elles en produisant différentes protéines permettant de réguler leurs activités métaboliques. Plus spécifiquement, elles interviennent dans les processus de développement et de modelage du tissu osseux.

I.1.4. Le processus de remodelage de l'os

Comme expliqué précédemment, l'os a de nombreuses fonctions telles qu'assurer l'intégrité du squelette, protéger les organes, mais également maintenir l'homéostasie phosphocalcique. En effet, le calcium et le phosphore sont des éléments indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. L'élément calcium est non seulement impliqué dans les processus de minéralisation osseuse, mais contribue également à la contraction musculaire, la coagulation sanguine, la différenciation cellulaire, la conduction de l'influx nerveux et la transduction du signal de nombreuses hormones. L'élément phosphore, quant à lui, joue un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire puisqu'il est impliqué dans la synthèse de l'ADN (acide désoxyribonucléique) et dans de nombreuses activités enzymatiques (phosphorylations...). Pour faire face aux contraintes mécaniques (chocs, frictions liées au mouvement...) et aux besoins métaboliques de l'organisme, l'os est en remodelage constant, alternant entre résorption et formation de la matrice osseuse. Ces remodelages sont coordonnés par de nombreux facteurs systémiques principalement hormonaux, mais également locaux, permettant de moduler le remodelage en fonction des besoins (croissance, fracture...). Quels que soient les stimulus responsables du remodelage osseux, ce dernier se décompose toujours en cinq phases : activation, résorption, inversion, formation et quiescence [62]. Ces différentes phases sont présentées en Figure 8 et sont détaillées ci-dessous.

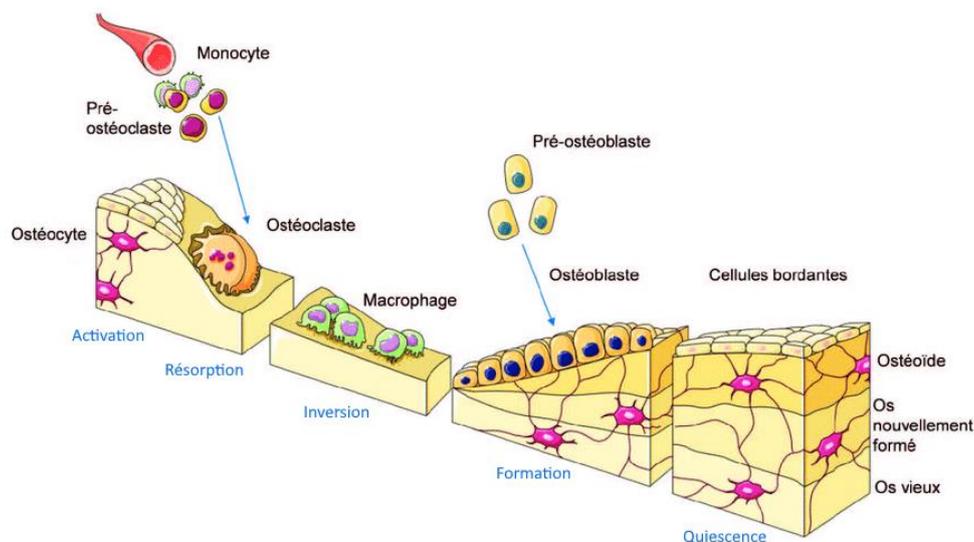


Figure 8 Schéma présentant les différentes étapes du remodelage osseux [63]

I.1.4.1. Phase d'activation

La phase d'activation est la première phase du remodelage osseux, elle comprend le recrutement des pré-ostéoclastes et leur différenciation en OC matures. Cette phase peut être initiée de deux façons différentes. La première est initiée en réponse à une fluctuation de l'homéostasie phosphocalcique. Dans ce cas précis, l'hormone parathyroïdienne ou parathormone (PTH) va être sécrétée et adressée au niveau du site osseux. Elle va recruter des précurseurs ostéoclastiques et leur permettre d'adhérer à l'os en rétractant les cellules bordantes (processus de dédifférenciation). La seconde est induite en réponse à un stress mécanique lié aux activités quotidiennes ou à une fracture. En conditions physiologiques, les ostéocytes synthétisent puis sécrètent du TGF- β (*transforming growth factor β*) qui inhibe l'ostéoclastogénèse. Lors d'un stress mécanique, les cellules bordantes et les ostéocytes peuvent entrer en apoptose. D'une part cela va entraîner le recrutement et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques *via* l'absence locale de TGF- β , et d'autre part cela va faciliter l'adhésion des ostéoclastes sur l'os qui ne sera plus recouvert de cellules bordantes [64].

I.1.4.2. Phase de résorption

Durant cette phase, les ostéoclastes matures se fixent à la surface de l'os et vont dégrader la matrice osseuse. Le bon déroulement de cette phase est assuré par une expression séquentielle et organisée de différentes protéines. Dans un premier temps la PTH induit l'expression de cytokines osteoclastogéniques par les ostéoblastes qui vont attirer les précurseurs ostéoclastiques par chimiotactisme. La stimulation et l'inhibition de la production

de différentes protéines telles que RANKL ou l'ostéoprotégérine (OPG) vont permettre la prolifération et la fusion des précurseurs ostéoclastiques pour produire des ostéoclastes matures multinucléés. Afin de faciliter l'adhésion et la résorption des ostéoclastes, les ostéoblastes vont également synthétiser des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui vont dégrader la matrice non minéralisée à la surface de l'os. Les ostéoclastes vont alors pouvoir adhérer à la surface de l'os par fixation aux intégrines qui forment un joint étanche, appelé zone de scellement, entre le pôle basal des cellules et l'os. La matrice osseuse va ensuite être dégradée par attaque acide et enzymatique ce qui va donner naissance aux lacunes de Howship [65], [66].

I.1.4.3. Phase d'inversion

Cette phase marque la transition entre la résorption de la matrice osseuse et sa néoformation. Une fois la matrice résorbée, les ostéoclastes migrent ou meurent par apoptose, ce qui attire des cellules mononucléées d'origine ostéoblastique. Leur rôle est, d'une part, d'éliminer les débris de matrice déminéralisée laissés par les ostéoclastes, et d'autre part, de synthétiser une matrice non collagénique au niveau des lacunes de Howship afin de faciliter l'adhésion des ostéoblastes [67]. À la fin de cette phase, les précurseurs ostéoblastiques sont recrutés par différents facteurs locaux et systémiques tels que le TGF- β et l'IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) [68].

I.1.4.4. Phase de formation

C'est lors de cette étape que la nouvelle matrice osseuse va être produite par les ostéoblastes. Dans un premier temps, les ostéoblastes vont adhérer à la surface de l'os au niveau des lacunes de résorption et synthétiser la matrice ostéoïde constituée principalement de fibres de collagène I sous forme lamellaire. La seconde étape est la minéralisation de la matrice par les ostéoblastes. Elle est parfaitement contrôlée et régulée par la phosphatase alcaline, mais également par la présence sur site de vésicules matricielles contenant des ions calcium et des groupements phosphates qui sont les précurseurs des cristaux d'HA [69].

I.1.4.5. Phase de quiescence

Lorsque la totalité de l'os résorbé a été remplacée, le cycle de remodelage osseux se termine. Les ostéoblastes présents au niveau du site osseux se différencient en ostéocytes s'ils sont piégés dans la matrice osseuse, en cellules bordantes s'ils sont à la surface de l'os ou meurent par apoptose. Les ostéocytes vont alors synthétiser la sclérostine, protéine inhibant l'ostéogénèse. L'environnement osseux va alors rester inchangé jusqu'au prochain cycle de remodelage [64], [67].

I.1.5. La régénération osseuse

Le remodelage osseux s'effectue en permanence dans l'organisme. Cependant, lors d'une perturbation de l'intégrité structurale de l'os à la suite d'un traumatisme (acte chirurgical ou fracture), les mécanismes de réparation et la cascade d'activation mis en place diffèrent de ceux du remodelage osseux. On parle alors de régénération osseuse.

La régénération osseuse est un processus de réparation de la structure de l'os. Il s'agit d'un phénomène naturel et spontané qui est initié par l'apparition d'un défaut dans la continuité du tissu osseux. Son but est de restaurer l'intégralité des propriétés physiques et mécaniques de l'os. Pour cela, de nombreux types cellulaires interviennent, leurs actions étant coordonnées par divers cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. La régénération osseuse complète est un processus long pouvant s'étendre sur plusieurs années.

Initialement, ce processus était décrit comme trois phases indépendantes pouvant se chevaucher dans le temps : la phase inflammatoire, la réparation et le remodelage osseux. En raison de sa nature complexe et de la superposition des différentes phases, ce processus n'était que partiellement compris. En 2010, Andreas Vetter *et al.* se sont intéressés à l'évolution topologique de la structure de l'os lors de la régénération osseuse [70]. Leurs recherches ont abouti à la proposition d'un nouveau modèle descriptif (présenté en Figure 9) constitué de six phases distinctes : l'hématome (*haematoma*), la phase inflammatoire (*inflammation*), la formation du tissu de granulation (*granulation tissue*), le cal cartilagineux, le cal osseux (*callus formation*) et enfin le remodelage osseux (*remodeling*). Ce modèle sera utilisé par la suite dans divers travaux de recherche [71], [72], [73].

L'ensemble du processus de régénération osseuse peut également être présenté de façon temporelle. La Figure 10 présente la mise place chronologique des différents acteurs de la régénération osseuse. Les six phases de la régénération osseuse sont également représentées : l'hématome (*clot*), la phase inflammatoire (*inflammation*), la formation du tissu de granulation comprend la prolifération des CSM et le développement de l'angiogénèse (MSC prolifération et *Angiogenesis*). Le cal cartilagineux et le cal osseux sont représentés par la différenciation des CSM (*MSC differentiation*) et le remodelage osseux correspond à la dernière phase (*Bone formation and remodeling*).

L'ensemble des étapes de la régénération osseuse présentées dans la Figure 9 et la Figure 10 sont détaillées ci-dessous.

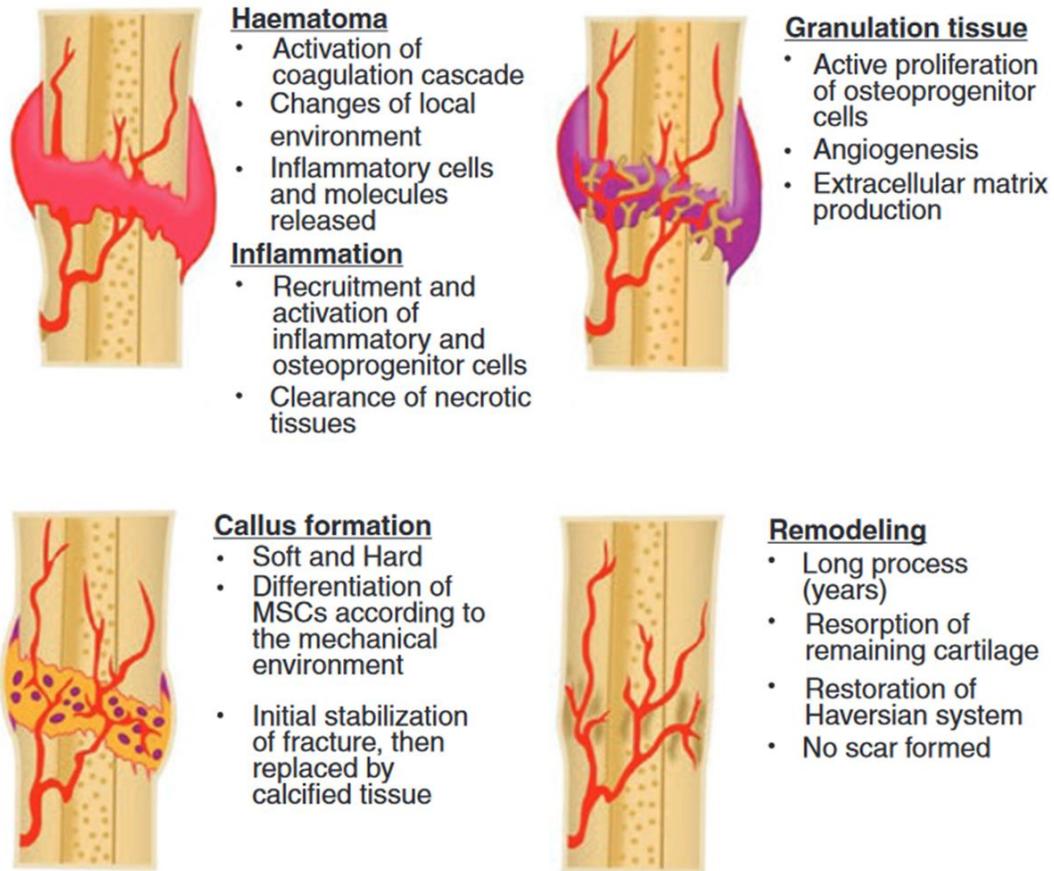


Figure 9 Modèle descriptif des différentes étapes de la régénération osseuse d'après Pountos *et al.* [71]

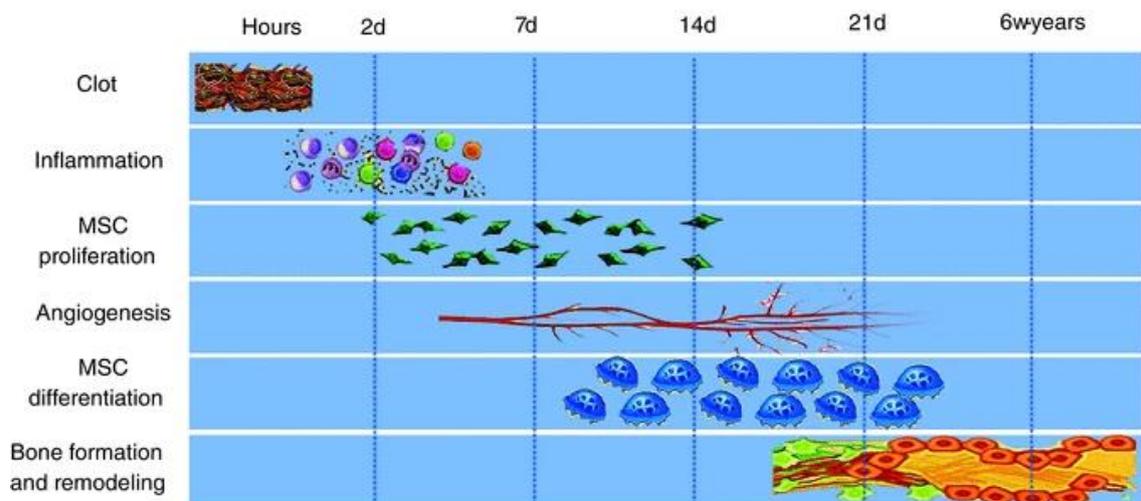


Figure 10 Évolutions de la régénération osseuse au cours du temps [71]

I.1.5.1. L'hématome

La rupture de la continuité du tissu osseux entraîne la formation d'un hématome (*haematoma* ou *clot*) périfractural formé par les extrémités osseuses et les tissus mous environnants, initiant ainsi une cascade de réactions métaboliques. La formation de l'hématome est une réponse très rapide de l'organisme qui a lieu dans les premières heures suivant la fracture (Figure 9 et Figure 10).

La destruction des vaisseaux sanguins a pour conséquence une diminution de l'oxygène disponible au niveau de la fracture. Cette hypoxie va entraîner une variation de l'expression génétique des cellules ostéoprogénitrices induisant leur prolifération, la production de matrice extracellulaire et initiant la différenciation de la lignée chondrocytaire. La destruction des cellules présentes au niveau de l'os lors de la fracture va libérer du CO₂ et l'hypoxie va entraîner une production massive d'acide lactique et donc une acidification du milieu favorisant ainsi l'action des ostéoclastes. Cet environnement va également induire la libération de cytokines pro-inflammatoires qui vont promouvoir le recrutement de cellules préostéoclastiques et induire la néo-angiogenèse [71], [74].

I.1.5.2. La phase inflammatoire

La phase inflammatoire (*inflammation*) débute immédiatement après la formation de l'hématome et peut durer jusqu'à une semaine (Figure 9 et Figure 10). Son rôle est double, nettoyer et préparer la zone endommagée pour le processus de régénération et induire des signaux douloureux pour forcer l'immobilisation du membre touché. Lors de cette phase, les cytokines pro-inflammatoires vont recruter par chimiotactisme de nombreux types cellulaires différents : des leucocytes, des lymphocytes, des monocytes et des macrophages. Ces cellules vont contribuer non seulement à l'élimination des débris (organiques et inorganiques), mais vont également produire des cytokines inflammatoires impliquées dans le recrutement et la différenciation de CSM et de CSH. Par exemple, RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*) et TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*) retardent la réparation du tissu osseux pour permettre aux cellules précitées de nettoyer convenablement le site lésé. L'interleukine 17 (IL-17), quant à elle, favorise la synthèse de la matrice osseuse par les ostéoblastes [75].

I.1.5.3. Le tissu de granulation

La régénération du tissu osseux est conditionnée par l'apport en oxygène et en nutriments jusqu'au site de fracture. Dès le 5^e jour, des capillaires fonctionnels sont observables dans le caillot. La présence des nombreux capillaires donne au tissu un aspect granulaire, dont il tire son nom, le tissu de granulation (*granulation tissue*) (Figure 9 et Figure 10). Il s'agit d'un tissu lâche principalement composé de cellules mésenchymateuses, de cellules endothéliales et de

cellules immunes. Même si à ce stade la fracture est encore mobile, la présence de fibroblastes va permettre de transformer l'hématome en un tissu conjonctif. Cette nouvelle matrice sert de support au développement d'un nouveau réseau vasculaire nécessaire au recrutement et à la différenciation des cellules pré-ostéoblastiques et pré-ostéoclastiques [76].

I.1.5.4. Formation du cal cartilagineux

Le rôle du cal cartilagineux (*soft callus*) est de relier les deux extrémités de la fracture et d'assurer une stabilité mécanique provisoire afin de faciliter le processus de régénération. La mise en place de ce tissu est effective vers le 7^e jour et peut durer une semaine. Dans un premier temps, les CSM se différencient (*MSC differentiation*) en chondrocytes qui vont synthétiser du cartilage (Figure 9 et Figure 10). Cette différenciation est régulée par les BMP qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire et plus particulièrement dans la chondrogenèse. Le cartilage ainsi produit est organisé différemment de celui des articulations, car son rôle est de fournir un support continu pour la future minéralisation [77].

I.1.5.5. Formation du cal osseux

Cette étape est caractérisée par la formation d'os lamellaire. Pour cela, les pré-ostéoblastes se différencient en ostéoblastes, lesquels vont remplacer la matrice cartilagineuse par de la matrice osseuse (*hard callus*) (Figure 9). Dans un premier temps, ils vont produire des enzymes qui vont dégrader la matrice de protéoglycanes, puis le processus de formation osseuse est mis en place tel que décrit dans le paragraphe I.1.4.4. Les chondrocytes vont également s'hypertrophier et minéraliser le cartilage formant ainsi des ostéons orientés qui vont restaurer progressivement la rigidité mécanique de l'os (*bone formation*). Cette étape est particulièrement longue et peut durer plus de 2 mois (Figure 10) [78].

I.1.5.6. Remodelage osseux

Le remodelage osseux est la dernière étape de la régénération osseuse (*bone remodeling*), c'est également l'étape la plus longue puisqu'elle peut s'étendre sur plusieurs années (Figure 9 et Figure 10). Son rôle est de restaurer intégralement l'architecture de l'os et son organisation complexe (ostéon, canaux de Havers...). Les processus mis en place sont identiques à ceux du remodelage osseux décrit précédent (paragraphe I.1.4). Hors cas pathologique, le remodelage se termine lorsque l'os a retrouvé une structure et une organisation identique à celle avant fracture [71].

I.1.6. Défauts critiques et greffes osseuses

Le remodelage et la régénération osseuse sont des mécanismes permettant de maintenir et de réparer efficacement la structure de l'os. Cependant, lors d'une perte de substance osseuse, l'efficacité de ces processus dépend directement de la taille du défaut osseux. Lorsque celui est de taille trop importante, l'os et plus largement l'organisme ne peuvent combler seuls cette perte de substance, le défaut est alors caractérisé de défaut de taille critique.

Les défauts osseux de taille critiques sont définis dans la littérature comme étant « *un défaut osseux ne pouvant se régénérer seul après stabilisation et qui nécessite une intervention chirurgicale supplémentaire* ». Bien que la définition soit acceptée et admise par l'ensemble de la communauté scientifique, les avis divergent concernant les caractéristiques spécifiques des défauts osseux de taille critique [79]. Dans ses travaux, Emil H. Schemitsch conclut que la « taille critique » du défaut dépend du type d'os, de la localisation anatomique du défaut, de l'âge du patient, mais également de la présence de maladies chroniques [2]. Le défaut osseux de taille critique est le résultat d'une incapacité des cellules à coloniser le défaut et donc à reproduire une matrice osseuse, ceci est principalement dû à une faible vascularisation qui empêche les facteurs de croissance, les facteurs de différenciations ainsi que les nutriments d'arriver jusqu'au centre du défaut [79]. Il est également possible qu'une compétition naturelle se mette en place entre le besoin d'une restauration rapide de la fonction mécanique et le processus de régénération osseuse qui lui est très lent. Cela conduit à la formation d'un tissu hybride à la fois fibreux et osseux ne favorisant pas la restauration complète et fonctionnelle de la continuité osseuse [80]. Une greffe osseuse est alors nécessaire afin de combler le défaut et permettre à l'os de retrouver son intégrité.

Les greffons sont classés en trois catégories selon l'origine de prélèvement du tissu. Lorsqu'il provient du patient lui-même, on parle d'autogreffe, si le transplant provient d'un individu de la même espèce, il s'agit d'allogreffe et s'il provient d'une espèce différente (ovin, bovin, coraux...) c'est une xélogreffe.

L'ostéointégration de l'implant, définie comme sa capacité à former une connexion structurelle, fonctionnelle et homogène avec l'os, dépend de plusieurs facteurs. Tout d'abord, l'espacement entre l'implant et les segments d'os doit être inférieur à 6 mm [9]. De plus, pour assurer une intégration optimale, le greffon doit posséder des propriétés bien spécifiques. Il doit être :

- sain : l'implant doit être exempt de toutes substances pathogènes qui pourraient entraîner des complications post-greffe ;

- exempt de facteurs antigéniques : le greffon ne doit pas contenir de facteurs antigéniques afin de limiter au maximum la réaction inflammatoire de la part du patient, ce qui pourrait conduire au rejet de l'implant,
- stable d'un point de vue biomécanique : le greffon doit posséder des propriétés mécaniques similaires à l'os pour maintenir l'ensemble de ses fonctions ;
- ostéoconducteur : l'implant doit pouvoir fournir un support permettant le développement de la matrice osseuse à sa surface [81] ;
- ostéoinducteur : être capable de stimuler les cellules pluripotentes pour qu'elles se différencient et se multiplient induisant l'ostéogenèse.

Actuellement, l'autogreffe reste la référence en matière de greffe, car elle est la seule à présenter l'ensemble des caractéristiques ci-dessus. Cependant, elle requiert une seconde chirurgie sur le patient pour prélever le greffon entraînant une morbidité du site donneur et augmentant les risques de complications. La taille du greffon prélevable étant limitée, cette technique est principalement utilisée en chirurgie maxillo-faciale. Pour les défauts plus importants ou dans le cadre de greffes multiples, l'allogreffe et la xenogreffe sont des solutions de choix car la quantité de greffons disponibles est plus importante [82], [83]. Bien que possédant de bonnes propriétés ostéoconductrices, l'allogreffe n'est pas ostéoinductive. De plus, les risques de transmissions d'infections et les risques de rejet sont plus importants que pour l'autogreffe. La xenogreffe, quant à elle, présente des propriétés biomécaniques et une résorption variable en fonction de l'origine du greffon. Les xenogreffes sont également fortement immunogènes ce qui implique l'utilisation d'immunosuppresseurs pouvant impacter le processus de régénération osseuse [74].

I.2. Les substituts osseux synthétiques et fonctionnalisation

La greffe osseuse est parfaitement maîtrisée avec plus de 2,2 millions de greffes osseuses par an dans le monde. Cependant, le manque de disponibilité des greffons, les problèmes de compatibilités ou encore les risques d'infections et de rejets sont des problèmes persistants [82], [84]. Aujourd'hui avec le développement des techniques de fabrication additive, il est possible de développer des matériaux de synthèses pour la médecine personnalisée et de les mettre en forme sur mesure pour combler parfaitement le défaut osseux du patient. Ces implants sont donc considérés comme des substituts osseux, la Haute Autorité de Santé (HAS) française définissant les substituts osseux comme étant :

« Tout biomatériau d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique, destiné à l'implantation chez l'homme, dans la perspective d'une reconstitution du stock osseux, par le renforcement d'une structure osseuse ou le comblement d'une perte de substance osseuse d'origine traumatique ou orthopédique » [85].

Par conséquent les substituts osseux regroupent l'autogreffe, l'allogreffe et la xéno greffe présentées précédemment, mais comprennent également les substituts synthétiques.

I.2.1. Caractéristiques des substituts osseux synthétiques

Comme pour les substituts osseux naturels, leur but est de combler le défaut osseux, d'assurer un soutien mécanique et de fournir un support pour la colonisation cellulaire et l'ostéogenèse. La composition chimique et les propriétés de ceux-ci sont primordiales et doivent être adaptées au défaut (type d'os, taille, localisation). Ils peuvent être classés en fonction de leur composition chimique parmi lesquels on distingue : les substituts d'origine métallique, ceux à base de polymères et ceux composés de bioverres ou de biocéramiques. Quel que soit le matériau utilisé, un substitut osseux synthétique doit idéalement être :

- biocompatible pour être toléré par l'organisme et ne pas entraîner d'effets indésirables ;
- manipulable et modulable par le chirurgien pour s'adapter à la forme du défaut osseux tout en facilitant l'implantation ;
- présenter de bonnes propriétés mécaniques pour maintenir une structure 3D stable pour faciliter le processus de régénération ;
- être stérile ou stérilisable pour éviter tout risque d'infections liées à la présence de bactérie à la surface du matériau [86], [87].

Pour la régénération des os longs, le matériau implanté doit également présenter une porosité interconnectée tout le long de l'implant pour permettre le développement de la nouvelle matrice osseuse tout en conservant son rôle structural durant l'intégralité du processus de remodelage [88]. Cependant même si le substitut possède l'ensemble de ces caractéristiques, cela ne suffit pas à garantir son intégration. Lors d'une fracture, il est possible que les deux segments d'os ne puissent s'unir lors du processus de régénération osseuse. Ce phénomène, appelée non-union se caractérise, pour les os longs, par l'absence de signe de guérison sur les radiographies après une période de 6 mois [89]. Les principales causes de rejets sont la faible colonisation de l'implant par les cellules, une faible vascularisation et le développement d'infections liées à l'intervention chirurgicale [9].

I.2.2. Fonctionnalisation des substituts osseux

Indépendamment du choix du substitut osseux, son ostéointégration reste limitée. En effet, les cellules ne colonisent pas l'implant à une distance supérieure à 1 cm du bord du segment osseux sain [7], [90]. Par conséquent, si la distance entre les deux segments du défaut osseux est supérieure à 2 cm, l'implant ne sera pas colonisé en son centre. Si dans certains cas cela ne limite pas l'intégration de l'implant (défaut osseux crânien [6]), dans le cadre des os longs, l'absence de cellules au centre de l'implant empêche l'os de récupérer l'ensemble de ces propriétés mécaniques inhérentes à ces fonctions de support et de motricité. La faible colonisation de l'implant est principalement due à une faible vascularisation qui ne permet pas aux nutriments d'être acheminés jusqu'au centre de l'implant, empêchant les cellules de proliférer.

D'après les travaux de *P. Andrzejowski et P. Giannoudis*, l'implant en lui-même n'est pas suffisant pour garantir son intégration au sein de l'organisme [9]. Dans le cadre des implants osseux, le développement d'infections et le manque d'intégration du substitut osseux synthétique sont les principales causes de rejets. D'après la littérature, les risques de développement d'infections après chirurgie sont de 2 à 5 % [5]. Concernant les problèmes d'intégrations, les risques seraient de l'ordre de 5 à 10 % [8]. Ces derniers chiffres sont à prendre avec précautions, car comme expliqué précédemment, les problèmes d'intégrations dépendent grandement de facteurs de prédispositions propres à chaque individu. Même si les données de la littérature peuvent fluctuer en fonction de la taille et de la composition de la cohorte de patients, les risques d'infections restent important et il est primordiale de les prévenir [9].

Ainsi, pour limiter les risques de rejets et d'infections et faciliter la colonisation de l'implant par les cellules, il est judicieux de le fonctionnaliser, c'est-à-dire d'ajouter des fonctions au substitut pour qu'il ne soit plus seulement un support passif mais contribue activement à son intégration. Pour cela, il est possible d'ajouter des principes actifs au sein de l'implant pour qu'ils puissent être libérés après l'implantation chirurgicale pour stimuler le processus d'ostéointégration. Par L'implant, et de façon plus spécifique le substitut osseux synthétique, pourrait être fonctionnalisé par des antibiotiques pour diminuer le risque d'infection et par des cytokines pour faciliter l'intégration de celui-ci. Ces molécules diffuseraient alors dans l'organisme une fois le matériau implanté pour devenir un système d'administration de molécules actives (ou *drug delivery system* (DDS)). Cependant, en raison de leur mode d'action et de leurs cibles différentes, antibiotique et cytokines requièrent une méthode de fonctionnalisation propre adaptée à la cinétique de libération souhaitée.

1.2.2.1. Drug delivery system

Les systèmes d'administration de médicaments (DDS pour *drug delivery system*) regroupent l'ensemble des technologies permettant de transporter un principe actif dans ou à travers le corps. Cela prend en compte le vecteur du médicament, en d'autres termes, la façon dont celui-ci est conditionné pour qu'il puisse atteindre sa cible sans être dégradé. Les DDS existent depuis plus de 60 ans et les moyens d'administrations ont considérablement évolué. Depuis les années 1960, les médicaments administrés par voie orale sont formulés de façon à avoir une libération continue du principe actif tout en restant à des concentrations suffisantes pour assurer son effet. Ces formulations ont pour but d'améliorer la pharmacocinétique du principe actif, et donc d'augmenter le temps entre son absorption et son excrétion par l'organisme, pour maximiser la durée des effets. Cela passe par une amélioration de la biodistribution, à savoir, la vitesse et la concentration à laquelle le principe actif rejoint la circulation sanguine puis sa cible. Cette libération progressive a pour avantage de réduire les risques de toxicité et les effets secondaires du médicament, mais aussi d'espacer le temps entre chaque dose, ce qui facilite les prescriptions. Cependant, la libération du principe actif est relativement rapide (un jour maximum) et non contrôlée, et il peut être dégradé par son environnement (pH, température) ce qui peut induire des effets indésirables ou diminuer son efficacité [91].

Aujourd'hui, le développement de matériaux biocompatibles et biodégradables ont considérablement amélioré et diversifié les DDS, révolutionnant la prise en charge des patients et de leurs pathologies. En effet, l'emploi de vecteurs pour encapsuler les principes actifs a rendu possible l'utilisation des agents thérapeutiques à faible demi-vie tels que les protéines, les peptides et les acides nucléiques en les protégeant de la dégradation. Cela permet également de contrôler la libération du principe actif que ce soit en termes de cinétiques ou de cibles en modulant la composition du vecteur pour modifier sa dégradation. Il est alors possible de réaliser du ciblage thérapeutique en concevant un transporteur de telle sorte qu'il se fixe sur un récepteur spécifique de l'organisme (organes ou récepteurs cellulaires) [92].

Pour toutes ces raisons, le domaine d'application des DDS en médecine est très vaste (cancer, diabète...). Gao *et al.* présentent en 2023 un schéma bilan présentant les futures applications possibles des DDS (Figure 11) [93]. L'efficacité d'un DDS est directement liée à la biodistribution et à la pharmacocinétique du principe actif et doit être prise en compte lors de sa conception [94].

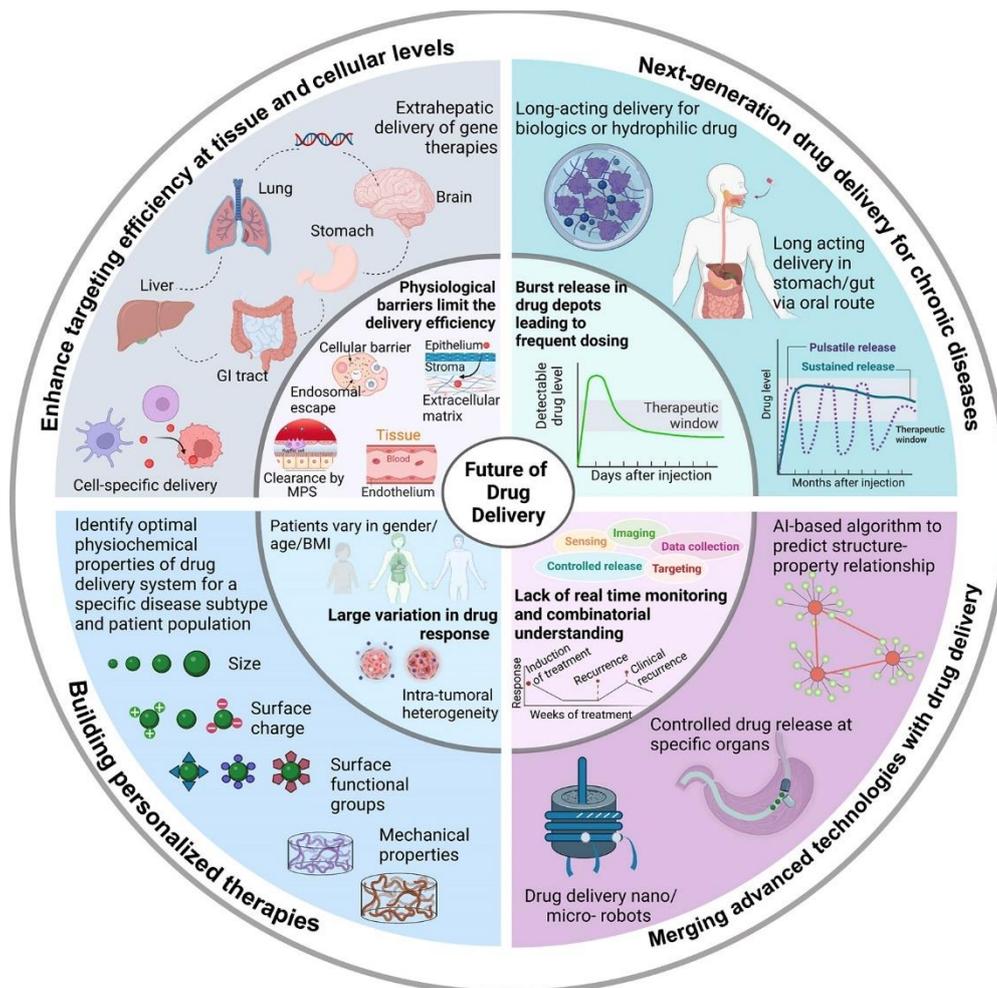


Figure 11 Challenges et futures applications des DDS, d'après Gao *et al.* [93]

I.2.2.2. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules produites par des microorganismes (bactéries et champignons) ou par synthèses chimiques et dont la fonction est d'inhiber la croissance bactérienne (effet bactériostatique) ou même d'éliminer une population bactérienne (effet bactéricide) [95]. Les antibiotiques agissent de façon spécifique, ils ne sont donc efficaces que sur certains types de bactéries. Il convient donc de choisir l'antibiotique adapté aux risques potentiels d'infections.

I.2.2.2.1. Mode d'action des antibiotiques

Il existe de nombreuses familles d'antibiotiques, qui peuvent être classées en fonction de leur mode d'action comme l'illustre la Figure 12.

Certains antibiotiques inhibent la synthèse de la paroi bactérienne (*cell wall synthesis*) en se fixant sur les enzymes responsables de l'assemblage des peptides constitutifs (peptidoglycane) de la paroi de la bactérie. Ce mode d'action bactéricide est courant pour les bêta-lactamines, telles que les pénicillines, les céphalosporines et la vancomycine (Figure 12). Il est particulièrement efficace sur les bactéries à Gram positif dont la paroi bactérienne est uniquement composée de peptidoglycanes. Sans paroi, ces bactéries ne peuvent plus maintenir la pression osmotique au sein de la membrane plasmique ni résister aux agressions extérieures ce qui conduit à la lyse des bactéries. À l'inverse, les bactéries à Gram négatif possèdent une paroi bactérienne constituée d'une bicouche lipidique (en plus de leur membrane plasmique) qui n'est pas dégradée par l'action des antibiotiques décrits précédemment.

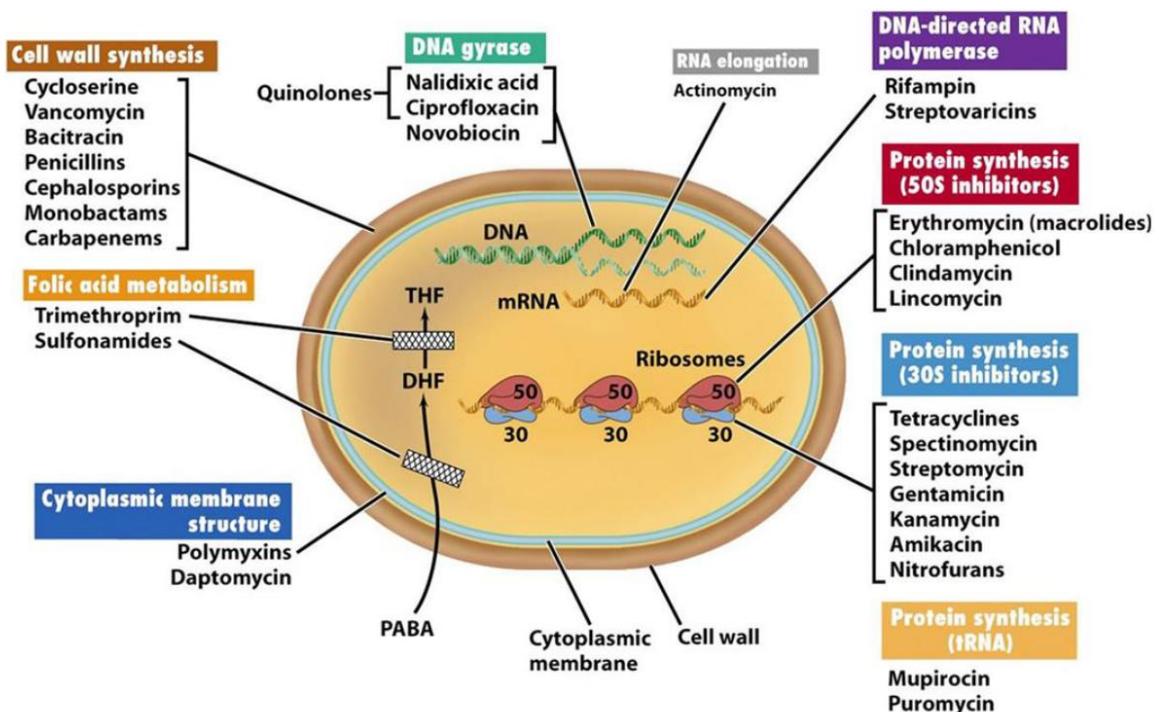


Figure 12 Présentation générale des antibiotiques et modes d'action associés [96]

Quelques classes d'antibiotiques agissent sur l'intégrité de la membrane plasmique de la bactérie. Elle n'est alors plus capable de maintenir son équilibre osmotique et déverse le contenu de son cytoplasme vers le milieu extérieur. Les dommages dépendent du type de bactéries, mais également de l'antibiotique utilisé. En effet, certains perturbent l'organisation des lipopolysaccharides membranaires tandis que d'autres forment des canaux au travers de

la membrane. On retrouve ce mode d'action chez les polymyxines et la daptomycine (Figure 12).

D'autres antibiotiques peuvent bloquer la réplication ou la transcription de l'ADN (acide désoxyribonucléique) bactérien. Certains antibiotiques de ce groupe interfèrent avec l'hélicase qui ne peut plus dérouler l'ADN empêchant ainsi sa réplication alors que d'autres inhibent la synthèse d'acides nucléiques et donc la synthèse d'ARN. Ce mode d'action concerne principalement les quinolones (ex. ciprofloxacine) (Figure 12).

Il existe également des classes d'antibiotiques qui inhibent la synthèse de protéines en se fixant sur l'une des deux sous unités du ribosome (50S ou 30S - Figure 12). Une fois l'antibiotique fixé, les deux sous-unités ne peuvent plus s'associer ce qui stoppe la production de l'ensemble des protéines nécessaire à la survie de la bactérie.

Pour finir, des antibiotiques tels que les sulfonamides miment des substrats intervenant dans le métabolisme bactérien. Les enzymes bactériennes se fixent alors sur les antibiotiques inhibant la synthèse de l'acide folique. Ces acides jouent un rôle prépondérant dans la formation de constituants essentiels à la survie cellulaire tels que les acides aminés ou les nucléotides [96], [97].

1.2.2.2. Applications thérapeutiques et mésusage médical

Depuis les années 1950, l'utilisation abusive et le mésusage des antibiotiques ont favorisé le développement de souches résistantes aux antibiotiques, phénomène appelé antibiorésistance [98]. En 2014, l'OMS (Organisation mondiale de la santé) alerte sur la menace que représente l'antibiorésistance [99]. N. Sabtu *et al.* définissent l'antibiorésistance comme étant :

« La capacité d'un microorganisme à survivre ou se multiplier en présence d'une concentration en antibiotique qui devrait normalement inhiber ou tuer les organismes de la même espèce. » [100]

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle. Dans ce cas elle est identique pour l'ensemble des souches bactériennes de la même espèce et concerne une ou plusieurs classes spécifiques d'antibiotiques. Cela permet de définir le spectre d'activité d'un antibiotique pour en optimiser l'utilisation. Par exemple, et comme expliqué précédemment, les bactéries à Gram négatif sont moins sensibles aux bêta-lactamines (pénicilline, vancomycine...) en raison de la composition de leur paroi bactérienne qui contient peu de peptidoglycanes (dont la production est inhibée par les bêta-lactamines).

La résistance aux antibiotiques peut aussi être acquise par une des souches bactériennes de l'espèce. Dans ce cas, ces souches deviennent spécifiquement résistantes à une ou plusieurs classes d'antibiotiques [100]. Une souche bactérienne peut acquérir une antibiorésistance par mutations ou par transfert de matériel génétique. Les mutations du génome bactérien peuvent être spontanées et impacter directement la séquence nucléotidique permettant à la souche bactérienne de développer des mécanismes de défense, ou induites, auquel cas, la bactérie va s'adapter pour survivre dans des conditions qui sont défavorables à sa croissance. L'antibiorésistance peut également survenir par l'acquisition de gène de résistance provenant d'une autre souche bactérienne. Le gène peut être transféré par conjugaison (*via* un échange de plasmide entre bactéries), par traduction (il est transféré d'une bactérie à une autre par un bactériophage) ou par transformation (transfert direct d'ADN entre deux bactéries). L'antibiorésistance peut également se développer par sélection. Lors de l'administration d'un antibiotique, les différences souches bactériennes vont alors subir une pression de sélection, les bactéries sensibles vont être éliminées au profit des souches résistantes qui vont pouvoir survivre et se multiplier. Ces processus peuvent se répéter de nombreuses fois jusqu'à obtenir des souches bactériennes multirésistantes [101].

I.2.2.2.3. La vancomycine

Dans les années 1950, le Dr. E.C Kornfield isole la vancomycine à partir d'une souche bactérienne de *Streptomyces orientalis* retrouvée dans un échantillon de sol provenant de Bornéo et en constate l'efficacité contre les staphylocoques [102]. Il s'agit d'un glycopeptide d'environ 1450 Da dont la structure moléculaire est présentée en Figure 13. La vancomycine fait partie de la famille des glycopeptides, qui comme les bêta-lactamines, inhibe la synthèse de la paroi des bactéries et est efficace contre les bactéries à Gram positif. De ce fait, la vancomycine est un antibiotique à large spectre, qui est par conséquent efficace sur un grand nombre de bactéries. En raison de son efficacité, la vancomycine est aujourd'hui utilisée pour lutter contre les infections nosocomiales et plus particulièrement pour traiter ou prévenir des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) [5], [103].

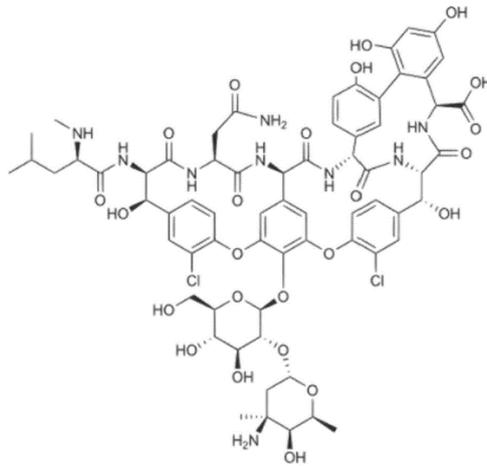


Figure 13 Structure moléculaire de la vancomycine [102]

En raison d'une faible biodisponibilité par voie orale, la vancomycine est principalement administrée par voie intraveineuse (notée IV). Cela nécessite l'administration d'une dose importante d'antibiotique pour s'assurer que la concentration en vancomycine au niveau du site infectieux soit suffisante pour garantir son effet. Cependant, à forte dose (> 4 g/jour) ou en cas de traitement prolongé (> 6 jours), la vancomycine engendre des effets secondaires délétères tels que la néphrotoxicité ou le syndrome de l'homme rouge [104], [105].

Pour les patients de plus de 12 ans, la dose de vancomycine recommandée en intraveineuse est de 15 à 20 mg/kg de patient toutes les 8 à 12 h. Pour un traitement probabiliste préopératoire, la dose de charge de vancomycine est de 1000 mg en IV. Dans le cas d'infections avérées, il est possible d'administrer une dose de charge de 25 à 30 mg/kg de patient. Dans ces deux cas, il est important de réaliser un dosage du taux résiduel de vancomycine dans le sang à 72 h pour adapter la dose avant de poursuivre le traitement. Le taux de vancomycine plasmatique ne doit pas dépasser 40 µg/mL de plasma sanguin pendant toute la durée du traitement (hors dose de charge) [106], [107], [108]. En effet, cet antibiotique est faiblement métabolisé et plus de 75 % de la vancomycine administrée est excrétée par voie rénale, sous forme de substances microbiologiquement actives, dans les 24 h. Hors cas pathologique (ex. insuffisance rénale), la demi-vie de la vancomycine est de 4 à 6 h avec une clairance plasmatique de 0,058 L/kg/h (litre de plasma par kg de patient et par heure) et une clairance rénale de 0,048 L/kg/h. Cela signifie que chaque heure, la quantité de vancomycine éliminée correspond à celle contenue dans un litre de plasma. La clairance dépend donc de la quantité administrée par kilogramme de patient. De plus la clairance rénale est de 0,048 L/kg/h ce qui confirme que la majorité de la vancomycine est éliminée par voie rénale [103], [106].

Dans le cadre de la greffe d'un substitut osseux, les chirurgiens peuvent administrer de la poudre de vancomycine directement sur l'implant afin de réduire l'impact systémique de l'antibiotique tout en administrant une dose de charge. Avec cette méthode, la quantité et la cinétique de libération de la vancomycine sont difficilement contrôlables, mais après 72 h la concentration en antibiotique sur le site lésé n'est plus suffisante pour être efficace [109], [110].

Or, en générale, la durée complète d'un traitement antibiotique peut s'étendre jusqu'à 6 semaines, ce qui correspond à la durée nécessaire à l'intégration complète du substitut osseux. Même s'il n'existe aucun consensus concernant la durée d'un traitement antibiotique par IV, il est généralement de 15 jours. Passé cette durée, un relais par voie orale est proposé au patient si la biodisponibilité de l'antibiotique le permet. Concernant la vancomycine, le relais par voie orale est impossible, poursuivre l'antibiothérapie parentérale (par injection) en milieu hospitalier ou en ambulatoire est donc nécessaire ce qui est contraignant pour le patient.

I.2.2.2.4. Délivrance locale de vancomycine

Pour limiter les contraintes liées à l'antibiothérapie parentérale, la délivrance locale d'antibiotique semble être une solution pertinente. L'implant deviendrait alors un DDS permettant de combler le défaut osseux tout en prévenant des risques de développement d'infections.

Lors d'une infection, les bactéries adhèrent au tissu et forment un biofilm à sa surface qui les protège des effets des antibiotiques. La concentration en antibiotique nécessaire pour éliminer ce biofilm devient alors nettement supérieure à la concentration minimale permettant d'inhiber la croissance d'une souche bactérienne (CMI pour concentration minimale inhibitrice) [111], [112]. V. Badha *et al.* expliquent que pour une souche de *Staphylococcus aureus* sensible à la vancomycine et dont la CMI est de de 2 µg/mL (déterminée pour la forme planctonique, soit, sous forme de bactéries isolées), la concentration minimale permettant d'éradiquer le biofilm est de 1000 µg/mL [113], ce qui revient à administrer 1000 mg/L de vancomycine par litre de sang soit 5 g de vancomycine par jour. Il est donc impossible d'atteindre ces concentrations en mettant en place une antibiothérapie systémique, sans présenter de risques pour le patient [104], [105].

La mise en place d'une délivrance locale d'antibiotique permettrait de résoudre ces problèmes. Idéalement, le profil de libération doit commencer par une libération importante d'antibiotique correspondant à la dose de charge. Cette étape va permettre à l'antibiotique d'être directement efficace après l'intervention chirurgicale. Ensuite la libération de l'antibiotique doit être plus progressive mais être supérieure à la CMI afin d'éviter le développement de bactéries et de biofilms tout en limitant l'impact systémique. De plus, la libération de l'antibiotique doit être complète afin d'éviter une libération sous-thérapeutique prolongée [111], [114]. Ainsi la

quantité d'antibiotique libérée doit être suffisante pour inhiber le développement des bactéries tout en étant en dessous du seuil toxique pour les cellules environnantes. Ces critères sont à prendre en compte pour que la méthode de fonctionnalisation du matériau permette l'obtention du profil de libération souhaitée [114].

D'après la littérature, il existe différents procédés permettant de fonctionnaliser un matériau. Il existe des moyens d'administration locale qui consistent à utiliser des billes ou des ciments imprégnés de vancomycine. Avec ces méthodes, la cinétique de libération de l'antibiotique se fait en deux phases. La première, la phase immédiate, dure 7 jours et correspond à une libération importante du principe actif. La seconde phase (phase secondaire) peut durer des années et les doses d'antibiotiques sont beaucoup plus faibles, généralement en dessous des doses permettant d'inhiber la croissance bactérienne. Ce traitement local est aujourd'hui utilisé en complément de l'antibiothérapie présentée précédemment (orale et parentérale) mais possède de nombreux désavantages dont la libération de l'antibiotique pendant une longue durée ce qui risque de favoriser l'émergence d'antibiorésistance [108]. Néanmoins, la mise en place d'une antibiothérapie locale présente de nombreux avantages. Elle permet de maximiser la concentration et donc les effets d'un antibiotique au niveau du site à traiter tout en limitant l'impact systémique et les effets secondaires associés.

Par exemple, il est possible d'adsorber l'antibiotique à la surface de celui-ci. Dans le cas des ciments osseux, l'antibiotique peut être directement mélangé au matériau, car sa mise en forme ne nécessite pas de traitement thermique. Ces procédés, bien qu'efficaces, ne peuvent être utilisés que dans des cas bien spécifiques en raison de la nature du vecteur utilisé et de la cinétique de libération difficilement modulable.

Le besoin de développer des systèmes de délivrance plus polyvalents a poussé les chercheurs à développer différentes méthodes de chargement de principes actifs. En effet, pour les substituts osseux de grande taille, la résistance mécanique est importante, ce qui nécessite l'emploi de céramiques et donc le traitement thermique de l'implant. Le principe actif est nécessairement ajouté après traitement thermique. Parmi ces méthodes, l'utilisation d'hydrogels semble particulièrement prometteuse. En effet, les hydrogels sont des réseaux de polymères composés généralement à plus de 75 % d'eau dont le principal avantage réside dans la versatilité de leurs compositions et ils peuvent être réticulés chimiquement ou physiquement. Comme il existe de nombreux polymères permettant de former des hydrogels, il est possible de sélectionner leur nature et leur composition en fonction des fonctionnalités visées. Ils peuvent alors fournir un support mécanique, servir de comblement ou apporter des propriétés rhéologiques spécifiques. Ils permettent l'encapsulation de molécules hydrophiles ou hydrophobes pour les protéger de la dégradation ou au contraire être complètement

biodégradables et induire leur libération. Pour l'ensemble de ces raisons, ils sont de plus en plus utilisés pour le développement de systèmes de délivrance de médicaments.

En fonction de l'hydrogel utilisé, le principe actif peut être libéré par diffusion ou par dégradation du réseau de polymère (dégradation de l'hydrogel) [111], [112], [115]. Dans le cadre de la délivrance de principe actif, il est courant d'utiliser des hydrogels thermosensibles. L'hydrogel est alors solide et intègre à température ambiante et devient liquide à température physiologique (37 °C). Cela permet de piéger l'antibiotique dans le réseau 3D de l'hydrogel et de contrôler la cinétique de libération en jouant sur la vitesse de dégradation de l'hydrogel. Dans ces cas précis, il faut s'assurer que ni l'hydrogel ni ses produits de dégradations ne présentent des risques de toxicité pour l'organisme ou le tissu environnant [116].

I.2.2.3. Les Cytokines

Les cytokines sont des protéines de faible poids moléculaire produites par des cellules lymphoïdes et non lymphoïdes. Ces protéines sont responsables de la communication cellules-cellules et contribuent à l'immunomodulation, qui caractérise le maintien et le retour aux conditions homéostatiques systémiques par les cellules immunitaires. En effet, les cytokines permettent de réguler la différenciation et la prolifération cellulaire, mais également les processus inflammatoires, immunitaires et de régénérations tissulaires [117].

La majorité des cytokines possèdent des effets autocrines ou paracrines, en d'autres termes, elles agissent directement sur la cellule qui les a sécrétées ou sur les cellules proches. Certaines cytokines, telles que le TNF α ou l'interleukine-1 (IL-1), sont capables, tout comme les hormones, de passer dans le sang et d'avoir des effets systémiques [117]. Elles sont également efficaces à de très faibles concentrations, de l'ordre du picogramme ou du nanogramme et ont une très courte demi-vie une fois libérée (quelques dizaines de minutes). Cependant, contrairement aux hormones, les cytokines ne sont pas sécrétées en continu, mais en réponse à un stimulus inflammatoire (infection, lésion...). De plus, une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires [117], [118], [119].

Les effets des cytokines sont conditionnés par leur fixation sur des récepteurs spécifiques à haute affinité à la surface des cellules dont l'expression (présence et nombre) peut varier en fonction des processus d'activation ou de différenciation cellulaire [117]. Leur rôle est non seulement d'initier une cascade d'activation, mais également de coordonner les différents types cellulaires présents. Pour cela, les cytokines sont libérées très rapidement, au maximum 12 heures après l'évènement inflammatoire et restent présentes localement pendant 7 jours [120]. Elles ont, d'une part, une activité pléiotrope, c'est-à-dire qu'une cytokine peut avoir des effets différents en fonction de la cellule sur laquelle elle se fixe et, d'autre part, une activité redondante qui permet à différentes cytokines d'induire la même réponse biologique sur un

même type cellulaire. De plus, leurs effets peuvent être synergiques ou antagonistes dans le but de contrôler le bon déroulement de chaque étape de la cascade d'activation permettant le retour aux conditions physiologiques initiales [121].

Les cytokines jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire et la médiation de l'inflammation. En effet, leurs actions antagonistes permettent d'avoir des effets pro- ou anti-inflammatoires impliquant les mécanismes de l'immunité innée et adaptative. Cela permet de mettre en place localement un système de défense contre les pathogènes, mais également et le cas échéant, d'initier la régénération tissulaire. Le déroulement de ces processus complexes est coordonné par la production et la sécrétion de divers facteurs d'activations et d'inhibitions exerçant des rétrocontrôles. De par leur mode d'action complexe et leur courte demi-vie, les cytokines assurent la mise en place d'une réponse immunitaire rapide, locale et adaptée empêchant (sauf cas pathologiques) la propagation de l'inflammation et son intensité (hyperinflammation) [122], [123].

Dès 1985, Dewhirst *et al.* soulignent l'implication du système immunitaire dans la physiologie du tissu osseux en étudiant l'impact de l'IL-1 β sur la différenciation des ostéoblastes [124]. Depuis, il a été prouvé que de nombreuses molécules produites par des cellules immunitaires contribuent au remodelage vasculaire, à la néo-angiogenèse et à l'ostéoimmunomodulation. Ce dernier terme souligne la capacité des cellules immunitaires à induire le recrutement, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et des ostéoclastes [122], [125]. De plus, il a été prouvé que les cytokines et les cellules immunes avaient un rôle indispensable dans l'ostéogenèse et de façon plus spécifique dans l'ostéointégration, qui définit la connexion fonctionnelle entre le tissu osseux et l'implant [120], [126], [127].

La famille des cytokines regroupe plusieurs protéines de signalisation telles que les interférons, les *tumor necrosis factor* (TNF), les interleukines, des chimiokines et de nombreux facteurs de croissance tels que les *transforming growth factor* (TGF) et les *fibroblast growth factor* (FGF) [121]. L'ensemble de ces cytokines ainsi que leurs rôles dans l'ostéoimmunomodulation sont présentés sur la Figure 14. Elles seront décrites plus en détail dans la suite de cette partie.

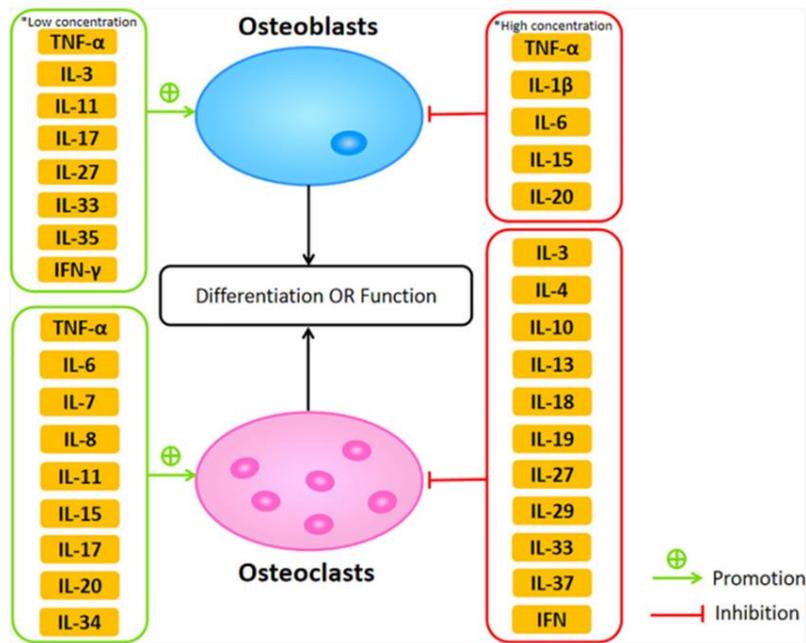


Figure 14 Impacts de différentes cytokines sur les ostéoblastes et les ostéoclastes [49]

1.2.2.3.1. Les *tumor necrosis factors*

Les *tumor necrosis factors* (TNF) sont principalement produits par les macrophages, mais également par de nombreux autres types cellulaires tels que les cellules lymphoïdes, les mastocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes [128]. Ils existent sous deux formes, les TNF- α et les TNF- β , et participent entre autres à la résorption osseuse en favorisant la différenciation des ostéoclastes et en inhibant les fonctions des ostéoblastes [129]. Le TNF- α stimule les cellules stromales, les ostéoclastes et active les lymphocytes T qui exprimeront RANKL et les gènes *M-CSF* (*macrophage colony-stimulating factor*) responsables de la différenciation des CSH (cellules souches hématopoïétiques) en macrophages [130]. Cela a pour conséquence de stimuler indirectement l'expression de RANK par les précurseurs ostéoclastiques ce qui va entraîner l'expression de *M-CSF* induisant ainsi l'ostéoclastogénèse. TNF- α possède également une fonction autocrine, entraînant la production d'IL-1 β qui, une fois sécrétée, induit la différenciation des ostéoclastes [131].

Les TNF ont des effets antagonistes et concentrations dépendants sur les ostéoblastes et la formation osseuse. En effet, à faibles concentrations, le TNF- α stimule la différenciation des CSM en ostéoblastes, au contraire, à fortes concentrations, il inhibe l'expression de facteurs de transcriptions responsables de la différenciation des ostéoblastes (RUNX2) (Figure 14) [132], [133].

I.2.2.3.2. Les Interleukines

Le terme « interleukine » (IL) a été introduit en 1979 pour décrire un ensemble de molécules sécrétées par les leucocytes. Cependant, la production d'IL a également été mise en avant par les lymphocytes [134]. En prenant en compte leurs différentes formes, la famille des interleukines comprend plus de 50 protéines différentes [49].

Les IL-1 sont des médiateurs de l'inflammation responsables de la perte de substance osseuse. Elles participent à l'activation, la différenciation, la multinucléation et la survie des ostéoclastes. Elles stimulent l'expression de M-CSF et diminuent l'expression d'OPG (Ostéoprotégérine) par les ostéoblastes. Cela permet respectivement d'induire l'engagement des cellules ostéogéniques dans la lignée ostéoclastique et de faciliter la fusion des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures (Figure 7) [135], [136].

Les IL-2 participent à la régulation et la différenciation des lymphocytes T. Elles sont également impliquées dans l'activation des cellules NK (*Natural killer*), des lymphocytes B et des macrophages [129], [137].

L'IL-7 appartient à la même famille de cytokines que les IL-2 et est sécrétée par les ostéoblastes en réponse à la présence de TNF- α ou d'IL-1. Sa fonction est de stimuler la prolifération des lymphocytes T et de stimuler leurs productions de RANKL et de TNF- α , stimulant ainsi de façon indirecte l'ostéoclastogénèse [138].

L'interleukine 3 (IL-3) est une cytokine principalement sécrétée par les lymphocytes T et les ostéoblastes. Elle est impliquée dans la prolifération de nombreux précurseurs hématopoïétiques tels que les cellules dendritiques, les érythrocytes, les macrophages et les granulocytes. D'un point de vue ostéogénique, IL-3 agit sur les CSM en accélérant la différenciation en ostéoblastes, mais en augmentant également la minéralisation de la matrice de collagène. En effet, elle augmente considérablement l'expression de gènes spécifiques aux ostéoblastes, tels que ceux régulant l'activité de la phosphatase alcaline ou la production de collagène de type I, d'ostéocalcine et d'ostéopontine [129], [139].

IL-4 est impliquée dans la réaction allergique en induisant l'expression de VCAM-1 qui facilite l'adhésion des lymphocytes T, des éosinophiles, des basophiles et des monocytes à la surface de l'endothélium. Elle est aussi connue pour être un puissant inhibiteur de l'ostéoclastogénèse en diminuant la production de facteurs pré-ostéoclastiques dont TNF- α , IL-1 et IL-6 [140], [141]. IL-4 utilise le même récepteur cellulaire qu'IL-13, ce qui explique les fonctions similaires de ces deux interleukines [129].

Le terme IL-6 regroupe toute une famille d'interleukines utilisant le même récepteur membranaire, IL-6R. Cette famille de cytokines est produite par les ostéoblastes, les ostéoclastes, les CSM, les macrophages et les lymphocytes T. Dans le processus de

remodelage osseux, cette famille de cytokines est connue pour avoir un effet sur l'activité des ostéoclastes [142].

L'IL-8, quant à elle, est produite par les ostéoblastes et permet d'induire l'ostéoclastogénèse de façon autocrine *via* la production de RANKL [143].

L'IL-10 est une cytokine produite par les lymphocytes B et T activés. Elle a pour fonction d'inhiber la production d'ostéoblastes et d'ostéoclastes. En effet, IL-10 inhibe la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en augmentant la production d'OPG, inhibant l'expression de RANKL. Elle inhibe également la synthèse de la phosphatase alcaline (PAL), du collagène de type I et de l'ostéocalcine (OCN) [144], [145].

L'interleukine-17 (IL-17) est produite uniquement par les lymphocytes T helper 17, d'où elle tire son nom. Cette famille est composée de 6 protéines d'IL-17A jusqu'à IL-17F qui ne présentent aucune similarité avec les autres cytokines [146]. Dans la littérature, le terme IL-17 fait souvent référence à l'IL-17A qui peut induire la prolifération, la migration et la différenciation des MSC humaines en ostéoblastes [147]. Cependant, en dépit d'un effet positif sur la différenciation des ostéoblastes, certaines études suggèrent un effet inhibiteur de l'IL-17 sur la minéralisation [148].

IL-18, plus connue sous le nom de *interferon-gamma-inducing factor* (IGIF), est une cytokine pro-inflammatoire analogue de l'IL-12 contribuant à l'inhibition de l'ostéoclastogénèse. Cependant, contrairement à l'IL-12, l'IL-18 induit la production d'interféron gamma (IFN- γ) par les lymphocytes T, inhibant ainsi de façon indirecte la formation d'ostéoclastes [149].

Enfin, l'IL-29 plus généralement appelée IFN- γ (pour interféron gamma) stimule l'expression des gènes de différenciation des précurseurs ostéoblastiques tels que RUNX2, osterix, ALP et l'ostéocalcine. L'IFN- γ peut également impacter l'ostéoclastogénèse en stimulant la production de RANKL par les macrophages et la sécrétion de TNF- α par les lymphocytes T [150], [151], [152].

I.2.2.3.3. Les chimiokines

Les chimiokines regroupent un ensemble de petites protéines (8-12 kDa) responsables de la migration ou du chimiotactisme de nombreux types cellulaires, dont les monocytes, les lymphocytes et les fibroblastes. Initialement, les chimiokines ont été identifiées comme étant des médiateurs de l'inflammation, sécrétées en réponse à un stimulus pro-inflammatoire, mais leur fonction est plus complexe. Elles permettent également de réguler l'hématopoïèse, la surveillance immunitaire et le développement des organes. Les chimiokines peuvent être classées en deux catégories, les homéostatiques qui sont exprimées dans certains tissus ou

organes spécifiques, et les chimiokines inflammatoires qui peuvent être produites par différents types cellulaires indépendamment de la localisation [153], [154].

Dans le cadre de la stimulation de la régénération osseuse, les cytokines d'intérêt sont celles initiant la cascade d'activation permettant le recrutement et la différenciation des cellules angiogéniques et ostéoprogénitrices. L'objectif est d'attirer les précurseurs ostéoblastiques et angiogéniques et de stimuler leur prolifération et leur différenciation de façon à accélérer l'ostéointégration du substitut osseux. D'après l'impact des différentes cytokines sur les ostéoblastes et les ostéoclastes présenté sur la Figure 14, les cytokines correspondantes à ces critères sont IL-3, IL-11, IL-17, IL-33, IL-35 et IFN- γ . Il est également possible de fonctionnaliser le matériau avec des cytokines pro-angiogéniques telles que le TGF- β , l'IL-17 et l'IL-33. En effet, ces deux dernières interleukines sont particulièrement intéressantes, car elles permettent de stimuler à la fois les précurseurs ostéoblastiques et angiogéniques [155].

I.2.2.3.4. Délivrance locale de cytokines

Sachant que de nombreuses cytokines permettent de stimuler le recrutement, la prolifération et la différenciation des cellules angiogéniques et ostéoprogénitrices, leur utilisation semble pertinente pour la fonctionnalisation de substituts osseux. Cependant, pour que les cytokines soient efficaces, elles doivent être libérées rapidement par le matériau, plus précisément, dans les 12 premières heures après l'implantation. La méthode de fonctionnalisation du matériau par des cytokines doit donc être adaptée à cette exigence.

D'après la littérature, il existe différentes méthodes pour fonctionnaliser un matériau par des cytokines. Elles peuvent être incluses dans un hydrogel ou dans des nanoparticules ou simplement adsorbées à la surface du matériau. L'adsorption est couramment utilisée pour la fonctionnalisation d'une surface par des protéines, en particulier lorsque la cinétique visée est une délivrance rapide et importante. Pour que cette méthode soit utilisable, il faut tenir compte des propriétés des protéines (tailles, formes, charges) ainsi que de celles du matériau (charge, hydrophobicité). Le solvant utilisé doit solubiliser la protéine tout en conservant sa structure tridimensionnelle (structure tertiaire ou quaternaire) et doit avoir une mouillabilité suffisante pour recouvrir le matériau. L'état de surface du matériau doit également faciliter l'adsorption des cytokines (charges de surface et/ou surface spécifique du matériau). En effet, plus la rugosité et la microporosité de surface sont importantes, plus il est possible de charger de cytokines. Dans certains cas, la surface du matériau doit être modifiée pour faciliter la fonctionnalisation et pouvoir charger les cytokines en quantité suffisante pour être efficace [156], [157], [158], [159].

I.2.2.4. Etudes des cinétiques de libération des DDS

Pour s'assurer que les principes actifs contenus dans un DDS puissent être libérés en concentrations suffisantes et avec un profil de libération adapté à leur mode d'action, il est nécessaire d'en étudier les cinétiques de libération. Pour cela, il est impératif de choisir un modèle fiable et le plus proche possible des conditions physiologiques humaines.

Les modèles *in vitro* actuellement disponibles sont souvent considérés comme simplifiés ce qui limite l'extrapolation des résultats, notamment lorsqu'il s'agit d'étudier l'impact systémique d'un principe actif [160]. Pour limiter les biais des modèles *in vitro*, le développement des modèles *in vivo* et l'expérimentation animale ont permis d'obtenir des modèles biologiques plus complets. En effet, l'expérimentation *in vitro* est souvent considérée comme une étape préliminaire qui nécessite d'être validée par l'utilisation d'organisme vivant [161]. Cependant, dès les années 1959, William Russell et Rex Burch publient « *The Principles of Humane Experimental Technique* », dans lequel ils définissent la règle des 3R en expérimentation animale. Ils expliquent que l'utilisation d'animaux pour la recherche doit être Réduite au minimum, Remplacée lors que cela est possible, et de la Raffiner, dans le but d'améliorer les conditions de traitement des animaux [162]. Ces règles ont alors rapidement été acceptées par la communauté scientifique et sont aujourd'hui toujours en vigueur [163]. Afin de minimiser l'expérimentation animale, de nouveaux modèles *in vitro* plus complexes ont donc été développés pour mimer le système physiologique. Parmi eux, on retrouve l'utilisation de lignées cellulaires primaires, de culture cellulaire 3D, de co-culture et d'« *organ on chip* » [164]. Les différents modèles existants sont présentés en Figure 15, chacun est adapté à la représentation d'une organisation structurale cellulaire et tissulaire spécifique.

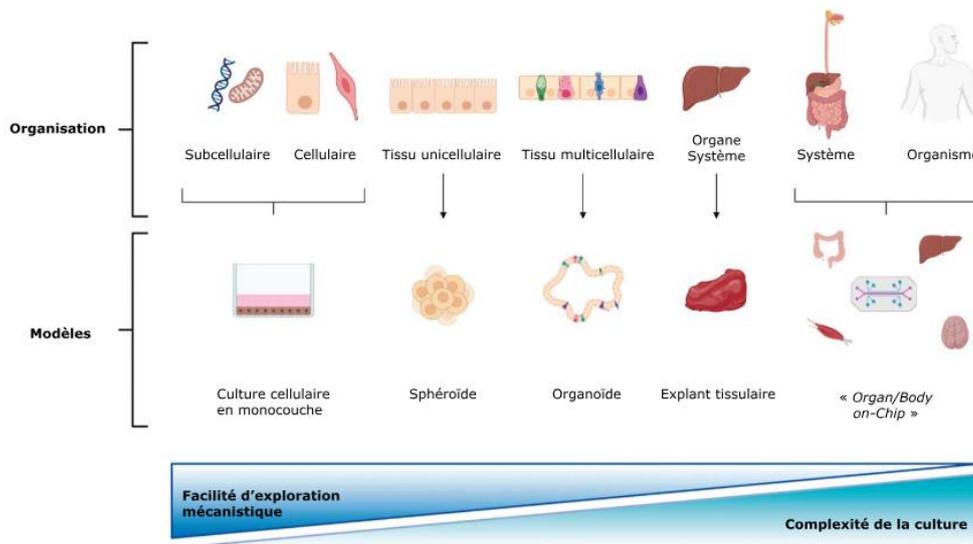


Figure 15 Modèles alternatifs à l'expérimentation animale en fonction des différents niveaux d'organisations tissulaires

Les modèles 3D sont fréquemment utilisés pour étudier la délivrance de principes actifs. Même s'ils améliorent la réponse prédictive par rapport à une culture cellulaire 2D, ils restent imparfaits et possèdent des biais. Il est donc impératif de choisir un modèle adapté aux paramètres voulant être étudiés [165], [166], [167].

Comme précisé précédemment, le microenvironnement osseux est particulièrement complexe, en termes d'organisation et de structure, ce qui impact directement l'activité cellulaire du site. Dans le cadre de l'étude d'une libération de principe actif, le modèle choisi doit pouvoir permettre d'évaluer le rôle du support et de sa forme pour le chargement et la libération, établir les cinétiques de libération, mais également l'impact du ou des PA sur les cellules. Bien que les différents modèles cités précédemment soient tous capables de mimer le microenvironnement cellulaire et permettent d'améliorer la réponse prédictive comparée à un modèle de culture cellulaire 2D, ils ne prennent pas en compte la présence et le mouvement des fluides tels que le sang ou le liquide interstitiel [168].

I.2.2.4.1. Intérêt de la culture dynamique

Dans l'organisme, le sang et le liquide interstitiel sont en perpétuel mouvement. H.W. Hoyle *et al.* ont publié une revue en 2022 décrivant l'intérêt de la culture cellulaire en conditions dynamiques. Dans leurs travaux, les auteurs soulignent l'importance de la présence de flux dans l'organisme, la Figure 16 représente les différents impacts sur les cellules. Les fluides tels que le sang ou le liquide interstitiel permettent d'acheminer les nutriments et l'oxygène

jusqu'aux cellules, facilitent l'élimination des déchets métaboliques et homogénéisent le milieu. Le flux induit également des contraintes de cisaillement qui peuvent impacter la viabilité cellulaire [169], [170].

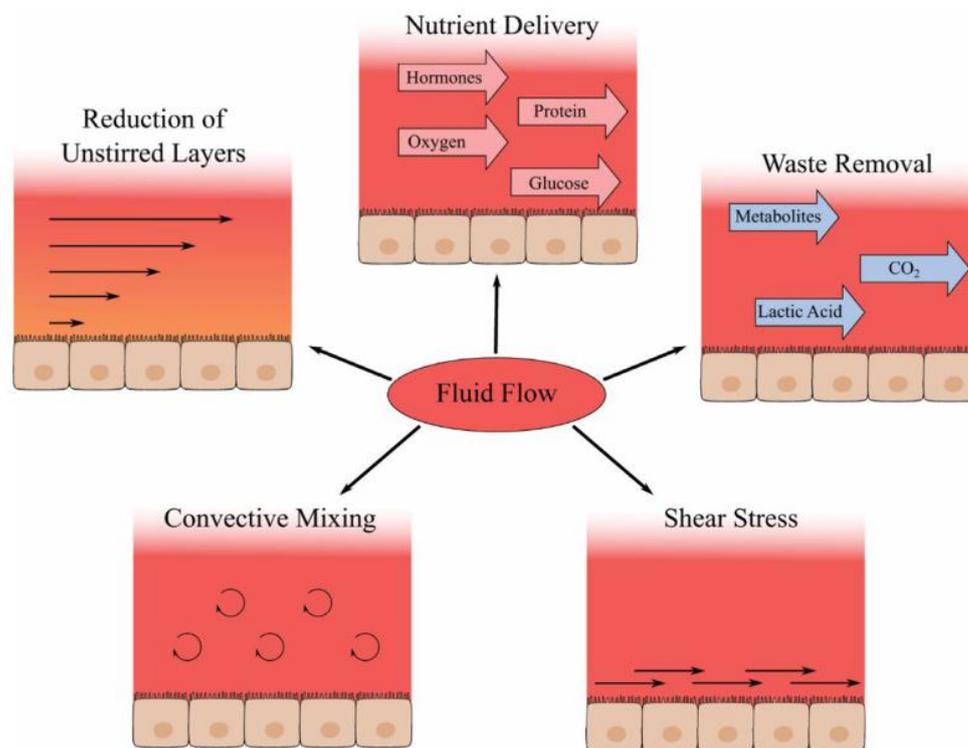


Figure 16 Impacts de la présence d'un flux sur la culture cellulaire [169]

Toujours d'après Hoyle *et al.*, dans le cadre d'une culture cellulaire en conditions statiques, le milieu est mélangé uniquement par diffusion, ce qui entraîne la formation d'un gradient de nutriment dans les puits de culture, ainsi qu'une accumulation des déchets métaboliques. Pour limiter ce phénomène, il faut effectuer un remplacement total du milieu de culture tous les trois jours. Cependant le remplacement total du milieu de culture entraîne une perturbation de l'équilibre du système ce qui peut poser problème dans le cadre de l'évaluation de cinétiques de libération de principes actifs sur le long terme. La mise en place d'une culture cellulaire dynamique est rendue possible par l'utilisation de bioréacteur à flux. Il existe de nombreux modèles disponibles sur le marché qui se distinguent par le sens de déplacement du flux.

D'un point de vue physiologique, le flux de sang ou de liquide interstitiel peut être différent selon l'organe ou le système. Le sens de déplacement du flux doit donc être sélectionné en

fonction du tissu à modéliser. L'ensemble des flux pouvant être reproduits par des bioréacteurs sont illustrés en Figure 17.

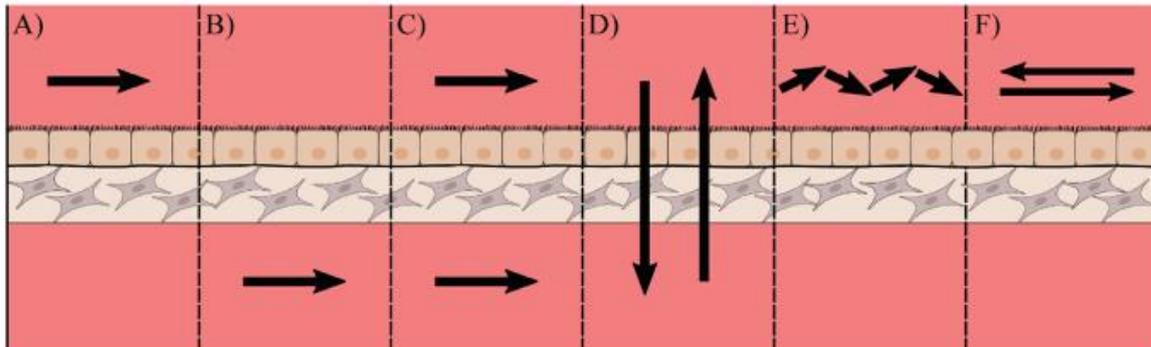


Figure 17 Sens de déplacement d'un fluide au sein d'un tissu épithélial sous-muqueux [169].

A : flux parallèle à la surface de l'épithélium, B : flux parallèle à la surface stromale, C : flux parallèles aux surfaces épithéliales et stromales, D : flux perfusant au travers du tissu, E : flux pulsé, F : flux dont le sens de circulation change au cours du temps.

Un flux parallèle à la surface de l'épithélium peut être utilisé pour mimer celui de la lumière intestinale (Figure 17. **A**) et celui parallèle à la surface stromale mime le flux sanguin au niveau du tissu (Figure 17. **B**). Le flux de la Figure 17. **C**, est une association des modèles **A** et **B**. Le flux perfusant au travers du tissu est un modèle utilisé pour étudier la diffusion de nutriment au travers d'un tissu épais (Figure 17. **D**). Produit par une pompe péristaltique, le flux pulsé permet de mimer les mouvements pulsatiles comme ceux du cœur (Figure 17. **E**). Le dernier modèle (Figure 17. **F**) repose sur l'utilisation d'une bascule mécanique pour induire un mélange convectif [169].

D'après l'ensemble des modèles présentés dans les travaux de Hoyle *et al.*, seuls deux types de flux semblent être adaptés à l'étude de cinétiques de libération de principe actif par un substitut osseux. Il s'agit du modèle **B**, mimant le flux sanguin au sein d'un tissu, et du modèle **D**, simulant la diffusion de nutriments au travers d'un tissu épais. Cependant, compte tenu de l'épaisseur et de la rigidité du tissu osseux, l'utilisation d'un bioréacteur à perfusion semble plus pertinente. En effet, pour étudier la cinétique de libération d'un principe actif, le flux doit passer au travers du substitut osseux.

I.2.2.4.2. Bioréacteur à perfusion

Comme illustré sur la Figure 18, le principe du bioréacteur à perfusion repose sur la circulation d'un milieu de culture au travers d'un circuit pouvant être ouvert ou fermé. Pour cela, le milieu contenu dans le réservoir est entraîné par une pompe et perfuse le substitut osseux contenu dans une chambre, avant de retourner dans le réservoir [171], [172].

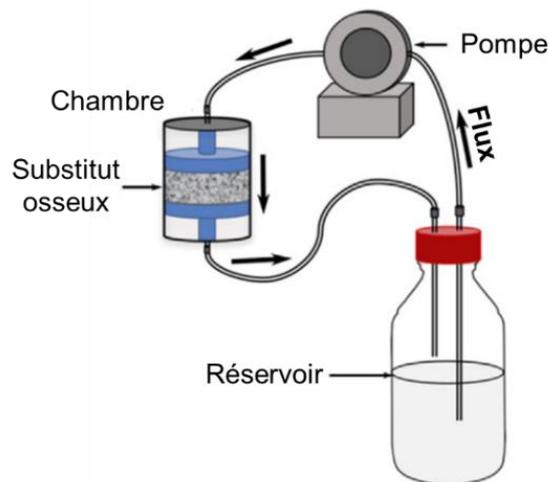


Figure 18 Schéma simplifié d'un bioréacteur à perfusion utilisé pour évaluer les propriétés d'un substitut osseux [171]

L'utilisation d'un bioréacteur à perfusion est particulièrement adaptée à la culture cellulaire sur substitut osseux, car il assure une distribution complète et uniforme des nutriments et de l'oxygène au travers de l'architecture [173]. Par conséquent, un bioréacteur à perfusion est parfaitement adapté pour l'étude des cinétiques de libération de principes actifs par un substitut en présence de cellules.

Bancroft *et al.* soulignent cependant que les dimensions de la pièce peuvent impacter le passage du flux. D'après leurs travaux, et comme illustré dans sur la Figure 19, il est préférable d'avoir un substitut osseux dont les dimensions sont identiques à celles de la chambre de perfusion (Figure 19. A). Si la pièce est plus petite que la chambre, le flux peut contourner la pièce ce qui peut perturber la distribution du milieu et donc des nutriments et de l'oxygène, à l'intérieure de la pièce [172].

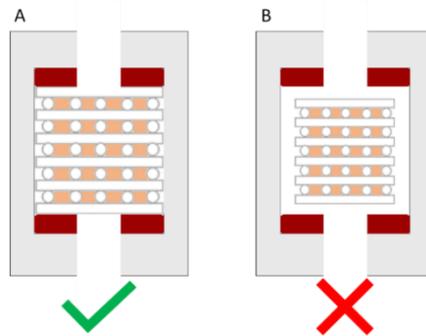


Figure 19 Schéma illustrant de la position du substitut osseux dans la chambre interne d'un bioréacteur.

A : les dimensions du substitut osseux sont parfaitement adaptées à celles de la chambre, B : le substitut osseux est sensiblement plus petit que la chambre du bioréacteur.

Par conséquent, pour étudier la cinétique de libération d'un principe actif, la forme du support est essentielle. Le procédé de mise en forme du matériau doit permettre d'obtenir une architecture facilitant le chargement en principe actif mais aussi adaptée à l'étude des cinétiques de libération au moyen d'un bioréacteur à perfusion [174].

I.3. Substituts osseux en hydroxyapatite et procédés de fabrication

Pour qu'un matériau puisse être utilisé en tant que substitut osseux synthétique, il doit répondre à de nombreux critères qui ont été détaillés précédemment (Partie I.2.1). Pour que le substitut osseux puisse être utilisé en tant que DDS et que les cinétiques de libérations puissent être évaluées, d'autres critères viennent s'ajouter. En effet, la composition, la forme, la macrostructure et la microstructure du matériau doivent être au service du DDS tout en favorisant l'ostéointégration. Les choix du matériau et du procédé de fabrication sont donc corrélés aux besoins du DDS et du défaut osseux.

I.3.1. Les céramiques phosphocalciques

L'ingénierie tissulaire repose sur la stimulation et l'optimisation des processus physiologiques de régénération. Pour cela, le choix des matériaux est particulièrement important. Dans le cadre de la régénération osseuse, le choix du support doit répondre à des exigences très précises. Il doit fournir un support mécanique, faciliter la migration et l'adhésion des cellules à sa surface, présenter une architecture poreuse pour faciliter la vascularisation, être stérilisable (sans entrainer de perte de structure ou de fonction) et ne doit pas amplifier la réponse inflammatoire [175]. Aujourd'hui il existe de nombreux matériaux synthétiques qui sont utilisés

en médecine régénérative tels que les métaux, les verres bioactifs, les céramiques dont celles à bases de phosphates de calcium et les polymères. Leur composition et leurs propriétés mécaniques sont fonction du domaine d'application et du besoin [176].

Dans le cadre du comblement de défaut osseux, les céramiques à base de phosphate de calcium sont particulièrement intéressantes. Les céramiques phosphocalciques sont des matériaux synthétiques composés de groupements phosphates et d'ions calcium et comptent parmi elles l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - HA) et le phosphate tricalcique bêta ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – β -TCP pour *beta tricalcium phosphate*). En raison de leur composition proche de la partie minérale de l'os, elles sont biocompatibles, bioactives (elles interagissent positivement, *via* des réactions spécifiques, avec leur environnement biologique) et ostéoconductrices. Elles ont donc rapidement été utilisées en tant que substituts osseux [177].

Les céramiques poreuses en β -TCP ont pour spécificité de se dégrader *in situ* dans un délai de 4 à 8 semaines suivant l'implantation, le β -TCP étant biorésorbable. Par conséquent, ces céramiques en β -TCP possèdent de faibles propriétés mécaniques et ne peut être utilisées que dans des zones à faibles sollicitations mécaniques [178].

L'hydroxyapatite stœchiométrique est une céramique bioactive qui, comme le β -TCP, présente une bonne ostéoconductivité. Contrairement au β -TCP, l'HA n'est que peu biodégradable, mais, à porosité équivalente, possède une résistance à la compression nettement supérieure. Pour l'ensemble de ces raisons, elle est utilisée depuis plus de 40 ans pour le comblement de défauts osseux en chirurgie orthopédique et crâniofaciale [6], [174], [178].

Même si les céramiques poreuses en hydroxyapatite sont des matériaux pertinents pour le comblement des défauts osseux, leurs propriétés mécaniques restent faibles. Par conséquent, pour pouvoir être utilisées dans le cadre du comblement de larges défauts osseux au niveau des os longs, elles doivent être renforcées par la matrice organique synthétisée par les cellules. Dans ce cas, l'ostéointégration de la pièce dépendra directement de la capacité des cellules à coloniser l'implant. L'implant doit donc posséder des caractéristiques permettant l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules à sa surface, cela passe par la fonctionnalisation du matériau et par sa texturation de surface.

1.3.2. Influence de la porosité du substitut osseux sur son ostéointégration

Bien que la composition soit un paramètre primordial à prendre en compte lors du développement d'un substitut osseux, elle n'est pas suffisante pour assurer l'intégration de celui-ci. Il a été démontré que la mise en forme et notamment la porosité du matériau impactaient de façon significative l'ostéointégration et l'ostéoconduction [179], [180], [181]. D'après ces différentes études, la réponse cellulaire et tissulaire dépend de la taille des pores.

Il a donc fallu classer les pores en fonction de leur taille et de leur impact. Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire et le développement de substitut osseux, il est communément admis d'appeler micropores ceux dont le diamètre est inférieur à 10 μm , et macropores ceux dont le diamètre est supérieur à 100 μm [179], [181], [182]. Les pores dont les diamètres seront compris entre 10 et 100 μm seront appelés mésopores [183].

Les micropores sont localisés entre les grains de céramiques lorsque le matériau est fritté à des températures inférieures à sa température de densification maximale. Leur présence et leur nombre dépendent donc directement des conditions de traitement thermique [179]. La microporosité ouverte augmente lorsque la température de frittage diminue ou lorsque le temps de palier est réduit comme l'illustre la Figure 20 issue des travaux de thèse de doctorat de Marie Lagorceix [184].

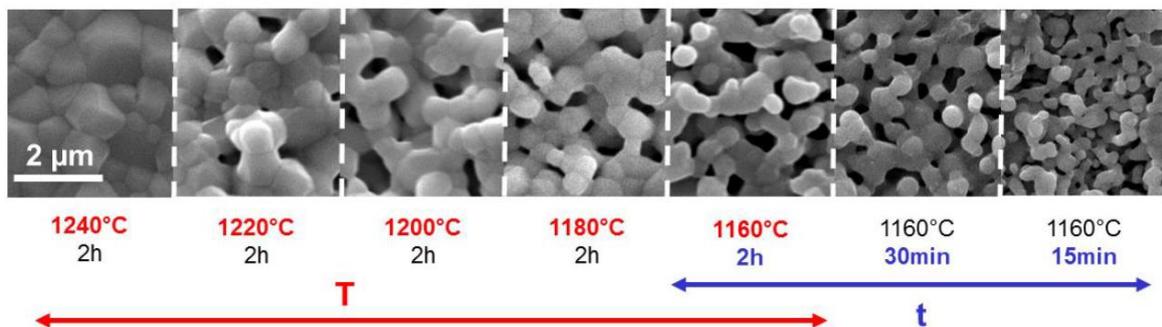


Figure 20 Evolution du taux de microporosité ouverte de substituts osseux en hydroxyapatite silicatée mis en forme par microstéréolithographie, en fonction des paramètres de frittage (température et temps de palier). Issu des travaux de Marie Lagorceix [184]

Les micropores permettent donc de moduler la rugosité de surface influençant l'adhésion des précurseurs ostéoblastiques [185]. De plus lorsque le taux de microporité augmente, la surface spécifique du matériau augmente, ce qui favorise l'adsorption des protéines ostéogéniques et les échanges ioniques. A la surface d'un substitut osseux, les micropores ont donc un rôle d'ostéoinduction indirecte en augmentant localement la quantité de protéines ostéogéniques, en favorisant la formation d'apatite par dissolution et re-précipitation, mais également en facilitant l'adhésion, et donc la prolifération et la différenciation, des cellules ostéogéniques [181], [186], [187]. Si la présence de micropores a un impact positif, une augmentation excessive du taux de microporosité est susceptible d'impacter négativement l'activité métabolique des cellules. En effet, en 2003, Rosa *et al.* ont constaté qu'un taux de microporosité inférieur ou égal à 15% favorise la synthèse des protéines et la différenciation

ostéoblastique après 14 jours ainsi que la formation de nodules de minéralisation après 21 jours. A l'inverse, une microporosité de 30 % entraîne une diminution significative de la prolifération et de la différenciation des cellules ostéoprogénitrices [188]. D'un point de vue physiologique, un taux de microporosité inférieur à 15% est équivalent à celui de l'os cortical, qui varie entre 3% et 12% [189].

Pour les implants osseux, la forme et les dimensions des macropores dépendent directement du procédé de fabrication [190]. Il est communément admis par la communauté scientifique que les macropores impactent l'ostéoconduction du substitut osseux [180], [185], [191]. Ces pores facilitent la colonisation, la prolifération et la migration des cellules à la surface de l'implant. Différentes études ont été menées afin de déterminer la taille optimale de ces derniers. Pour les substituts osseux en hydroxyapatite, des macropores dont le diamètre moyen est compris entre 300 μm et 600 μm permettraient non seulement de promouvoir l'adhésion, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, mais également la colonisation de l'implant par les vaisseaux sanguins [190], [192], [193], [194]. La présence d'interconnexions ($\phi > 100 \mu\text{m}$) entre les macropores est également primordiale, car elle permet la diffusion, la migration des cellules osseuses et favorise le développement des vaisseaux sanguins au travers de l'architecture facilitant ainsi les apports en nutriments et l'élimination des déchets métaboliques [195], [196]. Les angles des macropores ont également un impact sur l'adhésion et la prolifération des cellules à la surface du matériau. Des recherches ont démontré que les angles aigus favorisaient la colonisation du matériau par les cellules, contrairement aux angles obtus. Par conséquent, pour faciliter la colonisation du matériau par les cellules, les angles des macropores doivent être au maximum de 90 °C [185].

I.3.3. Procédés de mise en forme d'architectures céramiques poreuses

Dans le cadre de l'utilisation de substituts osseux synthétiques pour le comblement des défauts osseux de taille critique au niveau des os longs, il est nécessaire d'utiliser de grandes pièces ($> 1 \text{ cm}^3$) réalisées sur mesure pour s'adapter aux besoins du patient. De ce fait, les techniques de mise en fabrication conventionnelles telles que la réplique ne sont pas adaptées car elles ne permettent pas d'obtenir des architectures sur mesure.

Développées dans les années 1980, les techniques de fabrication additive (FA) proposent de nouveaux procédés de fabrication permettant de produire des structures 3D de façon rapide, reproductible et sur mesure. La fabrication additive repose sur l'utilisation d'une chaîne numérique découpée en 3 étapes : la conception assistée par ordinateur (CAO) qui permet de moduler la forme de la pièce à imprimer, la fabrication assistée par ordinateur (FAO) qui va découper numériquement la pièce afin d'optimiser le processus de mise en forme et une machine à commande numérique (MCN) qui va réaliser l'étape de mise en forme de la pièce

à proprement parlé. Développée à partir du début des années 2000, la fabrication additive de matériau céramique a permis l'émergence de nombreuses recherches en ingénierie tissulaire et osseuse [197]. Ces techniques de fabrication additive permettent l'obtention de pièces de grandes tailles et de formes complexes contenant des cavités (Figure 21. **A**) et/ou des macropores (Figure 21. **B**), sans étapes d'usinages. Ces caractéristiques sont particulièrement intéressantes pour le développement de substituts osseux sur mesure.

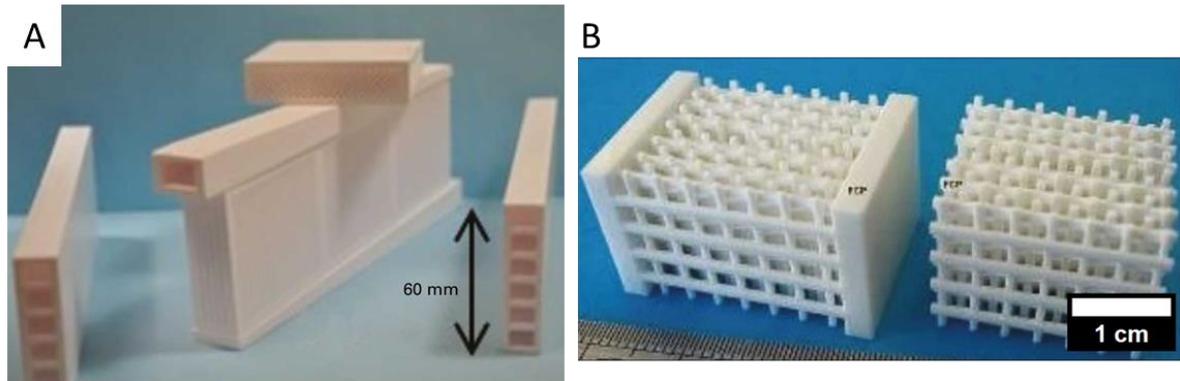


Figure 21 Illustration de pièces céramiques à géométries complexes élaborées par fabrication additive [198]

De ce fait, elles sont parfaitement appropriées au développement de substituts osseux et sont de plus en plus utilisées [199], [200]. En effet, elles permettent l'utilisation d'une grande diversité de matériaux céramiques et la modulation de la microporosité et de la macroporosité de l'architecture. Par conséquent, l'utilisation des techniques de fabrication additive permet d'élaborer des pièces ayant d'excellentes propriétés ostéoconductrices et possédant des dimensions adaptées aux défauts osseux pour répondre au besoin du patient. Il est également possible d'utiliser ces techniques pour réaliser des implants synthétiques biomimétiques, ayant une composition et une structure similaire à celle de la partie minérale de l'os [171].

Aujourd'hui, dans le cadre du développement de substituts osseux à base de céramique phosphocalcique, de nombreuses techniques de fabrication additive sont utilisées, telles que la projection de liant, la fusion sur lit de poudre, la stéréolithographie et le robocasting. Chacune de ces techniques possède leurs avantages et inconvénients.

I.3.3.1. La projection de liant

Comme illustré sur la Figure 22. **A**, ce procédé repose sur la projection d'un liant adhésif à base aqueuse sur un lit de poudre. Dans un premier temps, la poudre céramique est déposée

sur un plateau de fabrication par un rouleau. La tête d'impression projette alors le liant qui va ponter localement les grains de poudre entre eux. Dans un second temps, le plateau de fabrication s'abaisse et une nouvelle couche de poudre est étalée par le rouleau au-dessus de la précédente. L'opération est ensuite répétée afin d'imprimer la pièce couche par couche. Les pièces sont alors nettoyées pour éliminer les grains de poudre non collés entre eux par le liant, avant d'être déliantées et frittées. L'utilisation d'un lit de poudre permet un maintien de la pièce lors du procédé de fabrication laquelle n'a pas à reposer sur un support.

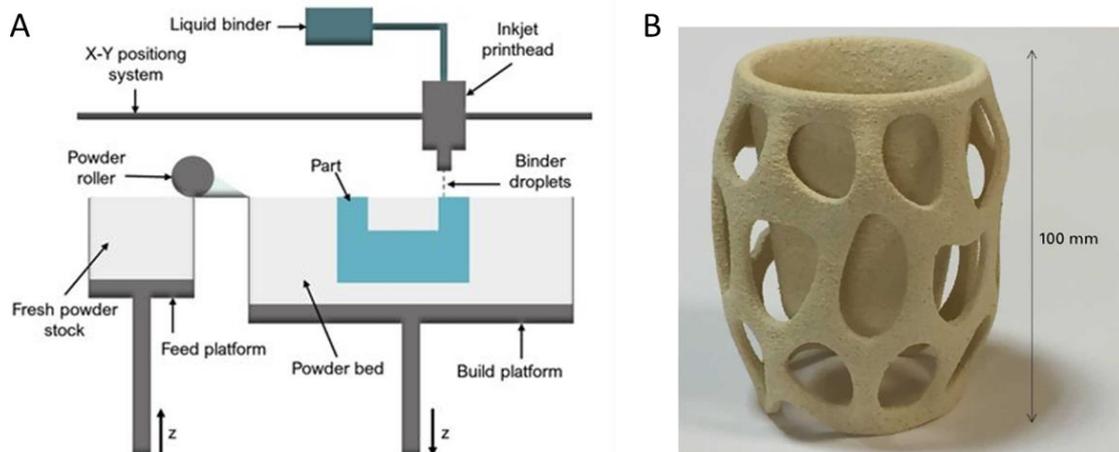


Figure 22 Schéma du procédé et exemple de mise en forme par projection de liant

A : Schéma du procédé de mise en forme par projection de liant, B : Exemple d'architecture réalisée par projection de liant [198], [201]

Cette technique est adaptée pour la fabrication de pièces de grandes tailles (10 cm) ayant des géométries complexes, ce qui permet de réaliser des pièces macroporeuses (Figure 22. **B**). Néanmoins, ce procédé comporte des inconvénients : fragilité des pièces crues, difficulté de dépôt d'un lit de poudre homogène, obtention d'un état de surface rugueux. En effet, pour obtenir une couche homogène il faut que les grains soient de taille importante ($\approx 10 \mu\text{m}$) ce qui limite la réactivité des poudres lors du frittage et conduit à l'obtention de pièces poreuses. L'état de surface dépend également de la taille des gouttes de liant et de leur migration entre les grains du lit de poudre et de la taille des grains. L'ensemble de ces limitations, inhérentes au procédé de fabrication, impacte directement la résolution dimensionnelle finale des pièces qui est de l'ordre de $50 \mu\text{m}$ à $100 \mu\text{m}$, ce qui est suffisant pour obtenir des macropores entre 300 et $600 \mu\text{m}$ [198].

I.3.3.2. Frittage sélectif par laser

Le frittage sélectif par laser (ou SLS pour *selective laser sintering*) repose sur un procédé semblable à la projection de liant à la différence que la pièce est consolidée en utilisant un faisceau laser infrarouge permettant le pré-frittage des grains de poudre (Figure 23. **A**).

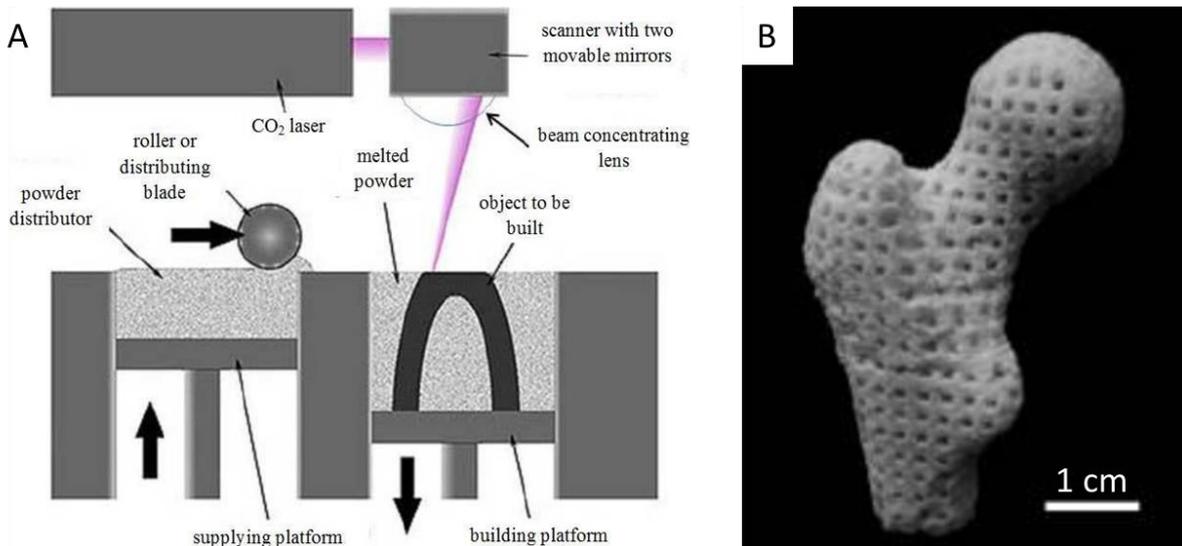


Figure 23 Schéma du procédé et exemple de mise en forme par fusion sur lit de poudre

A : Schéma du procédé de mise en forme par fusion sur lit de poudre [202], B : Exemple d'architecture obtenue par fusion sur lit de poudre [203]

Il existe deux techniques : le frittage direct et la consolidation par fusion d'une phase secondaire. Lors du frittage direct, le laser provoque la fusion des grains de poudre ce qui va permettre de consolider la zone. Cette technique est peu adaptée aux céramiques en raison de leur température de frittage et de leur point de fusion élevés, voire de l'absence de point de fusion. De ce fait pour ces matériaux, la consolidation par fusion d'une phase secondaire sera privilégiée. Un liant organique ou inorganique ayant un faible point de fusion est ajouté à la poudre, le laser va donc consolider la pièce par fusion du liant.

Quelle que soit la méthode de consolidation utilisée, la résolution dimensionnelle finale des pièces est comprise entre 50 μm et 500 μm et dépend de l'épaisseur des couches déposées, de l'interaction du matériau utilisé avec la source laser, mais également des phénomènes thermiques responsables de la consolidation (Figure 23. **B**). Ce procédé, relativement rapide, à l'avantage, dans le cadre du frittage direct, de consolider et de mettre en forme la poudre en une seule étape, supprimant l'étape de déliantage. En revanche, pour la consolidation indirecte, la poudre est piégée dans un liant. Si celui-ci est organique, il est éliminé lors de

l'étape de déliantage ce qui risque d'impacter la densité finale de la pièce, s'il est d'origine inorganique cela peut conduire à l'apparition de phases secondaires lors du frittage. Par ailleurs, les chocs thermiques cycliques liés au passage du laser et les retraits différentiels entre les couches peuvent déformer la pièce [198].

I.3.3.3. La stéréolithographie

Le procédé de stéréolithographie repose sur l'utilisation d'une pâte photosensible polymérisable sous laser UV. Le schéma du procédé est présenté en Figure 24. **A**. Ce procédé de fabrication regroupe la stéréolithographie qui permet d'imprimer des pièces de grandes tailles (25 cm²) au détriment de la résolution (100 μm), et la microstéréolithographie qui permet d'imprimer des pièces de tailles réduites mais avec une résolution plus importante (10 μm) [6], [184], [199].

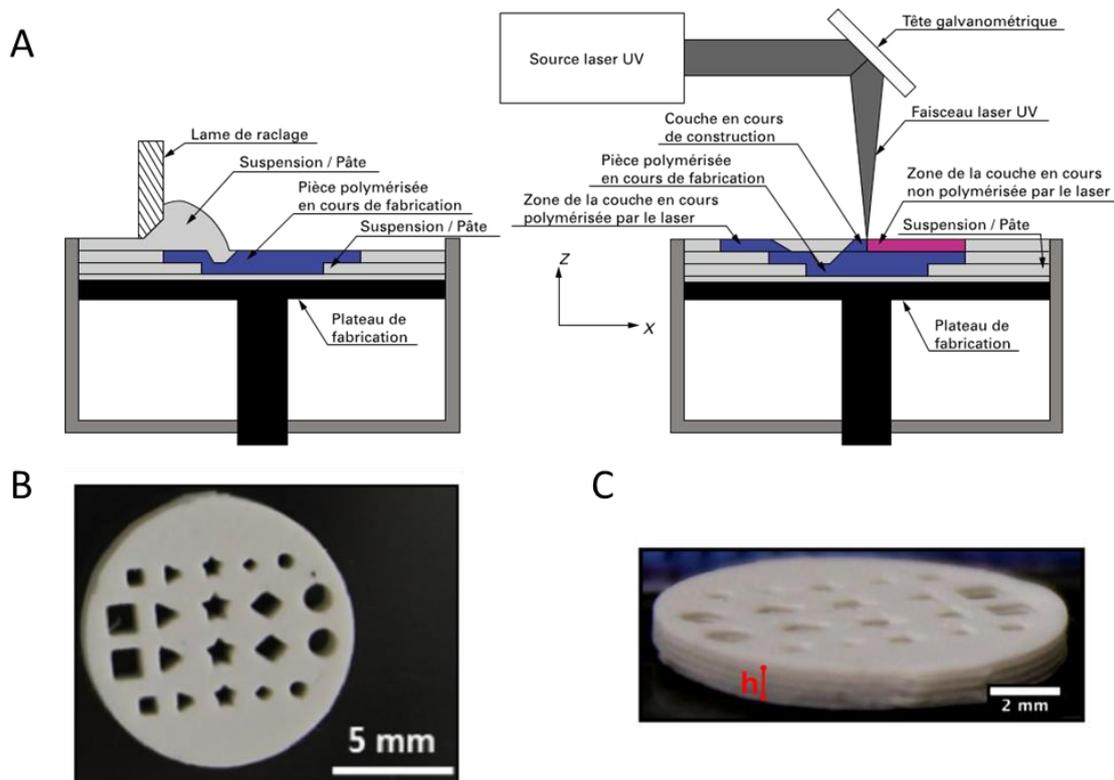


Figure 24 Schéma du procédé et exemple de mise en forme par stéréolithographie

A : Schéma du procédé de mise en forme par stéréolithographie [184]. Exemple d'architecture obtenue par micro-stéréolithographie (B et C), B : pièce vue de dessus, C : pièce vue de côté

La matière première utilisée se présente sous la forme d'une suspension ou d'une pâte composée de la poudre céramique dispersée dans une résine photopolymérisable contenant

des photo-initiateurs. Comme pour les deux procédés précédents, la pâte est étalée sur le plateau de fabrication. Le passage du laser va alors permettre la polymérisation de la pâte et la pièce va pouvoir être imprimée couche par couche (Figure 24. **A**). L'utilisation d'une pâte permet d'utiliser des poudres ayant des tailles de grains plus faibles que pour la projection de liant, ce qui facilite le dépôt d'une couche mince augmentant ainsi la résolution des dimensions finales de la pièce (entre 10 μm pour la micro-stéréolithographie et 100 μm pour la stéréolithographie). Ces techniques permettent donc de fabriquer des pièces denses ayant des motifs complexes avec une résolution permettant de limiter la rugosité de surface des pièces imprimées. Même si le procédé de mise en forme est relativement rapide, il nécessite des étapes de post-traitement pouvant être longues, telles que le nettoyage des pièces et le déliantage. De plus, les suspensions réactives sont relativement onéreuses [198].

La limitation majeure de la stéréolithographie pour l'impression d'un grand nombre de pièce, réside dans l'étape de nettoyage, qui est particulièrement longue. Cette étape nécessite de manipuler les pièces avant frittage ce qui peut les endommager. Concernant la microstéréolithographie, ce procédé est particulièrement adapté à la réalisation de pièces de faibles épaisseurs, telles qu'illustrées sur la Figure 24. **B** et **C**. De ce fait, la stéréolithographie, n'est pas le procédé le plus adapté à la mise en forme de nombreux substitut osseux

I.3.3.4. L'extrusion 3D

L'extrusion 3D, aussi appelée *robocasting* ou micro-extrusion, repose sur le dépôt de filaments de matière sur le support de fabrication. Le schéma du procédé de mise en forme est présenté en Figure 25. **A**.

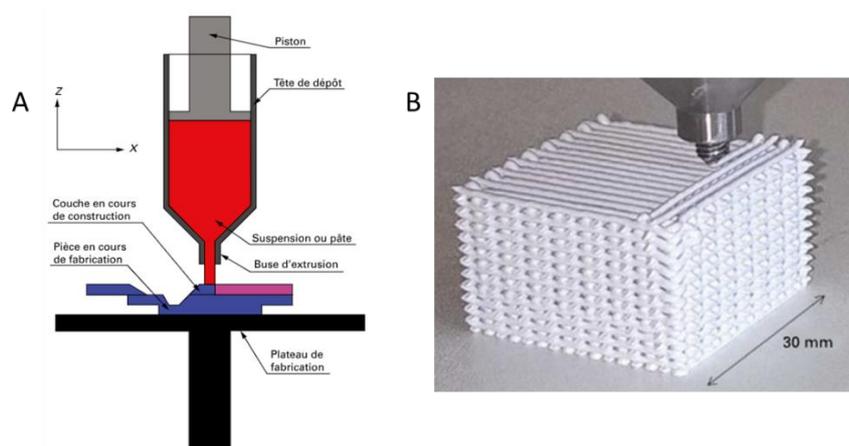


Figure 25 Schéma du procédé et exemple de mise en forme par extrusion 3D

A : Schéma du procédé de mise en forme par extrusion 3D, B : Exemple d'architecture obtenue par extrusion 3D [198]

La matière première se présente sous forme de pâte ou de suspension contenant la charge céramique. Elle est ensuite placée dans un réservoir et un piston va permettre l'extrusion de la matière première sous forme de filament. La pièce est alors formée couche après couche par empilement de filaments. La résolution des dimensions finales de la pièce dépend directement du diamètre de la buse sélectionnée (de 100 μm à 1 cm de diamètre), de la forme du filament, du retrait lors du séchage, mais aussi de la tenue mécanique de la pièce pendant et après sa mise en forme. En effet, la principale difficulté de ce procédé de fabrication réside dans le développement d'une pâte ayant des propriétés rhéologiques spécifiques. La pâte doit être fortement rhéofluidifiante pour permettre l'extrusion de matière au travers de la buse, mais également thixotrope pour assurer le maintien de sa forme une fois extrudée. Pour obtenir ces propriétés, il est nécessaire d'ajouter, à la phase aqueuse, des agents organiques lors de la formulation des pâtes, ce qui impose une étape de déliantage après impression. De plus, la distribution granulométrique des grains de la charge céramique doit être 50 fois inférieure au diamètre de buse utilisée pour permettre la bonne extrusion des filaments et éviter tout risque d'obstruction de la buse. La charge céramique doit également être maximisée afin de limiter le retrait de la pièce au maximum. Pour finir, la pâte ne doit pas contenir de bulle pour éviter la rupture du filament en cours d'impression, pouvant causer la formation de défaut notamment pour les pièces de grandes tailles [198].

Ce procédé, à la fois rapide et peu coûteux, a pour avantage de permettre d'imprimer des pièces de grandes tailles (Figure 25. **B**). En effet, la hauteur des pièces imprimées dépend des limites de déplacement de la buse d'impression et de la tenue mécanique de la pièce imprimée (affaissement lié au poids de la structure sur elle-même). De plus, une fois imprimées, les pièces n'ont pas besoin d'être nettoyées [198].

1.3.3.5. Bilan des procédés de fabrication additive de substituts osseux en céramique

En conclusion, l'ensemble des procédés de fabrication additive présentés précédemment peuvent être utilisés pour la mise en forme de substituts osseux en céramique. Ils permettent tous d'obtenir des architectures ayant des macroporosités interconnectées comprises entre 300 et 600 μm , et ils nécessitent tous un traitement thermique comprenant une étape de déliantage pour éliminer les éléments organiques nécessaires à la mise en forme, et une étape de frittage pour densifier la pièce. Il est alors possible de moduler les températures et les durées de frittage pour en moduler la microporosité et obtenir des pièces micro-macroporeuses.

Dans le cadre du développement d'un substitut osseux de forme complexe présentant une rugosité de surface importante, la méthode de fusion sur lit de poudre semble intéressante. Pour l'impression de pièces de grande taille, il est possible d'utiliser la projection de liant. Si

l'implant risque d'être soumis à des contraintes mécaniques, il faudra alors choisir d'utiliser des procédés tels que l'extrusion 3D ou la stéréolithographie. Si l'objectif est de développer des architectures biomimétiques, alors la résolution devient le critère le plus important au détriment du temps de fabrication, ce qui impose l'utilisation de la stéréolithographie [171]. A l'inverse, si le but est d'obtenir de nombreuses pièces présentant une architecture relativement simple et rapidement, alors la méthode d'extrusion 3D semble la plus appropriée.

L'ensemble des caractéristiques des différents procédés de fabrication additive est résumé dans le Tableau 1. Chacun de ces procédés présente des avantages et des inconvénients dont il faut tenir compte dans le but de choisir celui adapté aux besoins.

Tableau 1 Bilan des caractéristiques des différents procédés de fabrication additive

Procédés de mise en forme	Résolution	Traitement thermique	Avantages	Inconvénients
Projection de liant	50 – 100 µm	Déliantage et frittage	Faible coût Simple Rapide Pas besoin de support Fabrication de grandes pièces	Rugosité de surface importante Faible résistance mécanique Faible densité
Frittage sélectif par laser	100 – 500 µm	Déliantage et frittage*	Faible coût Pas besoin de support	Rugosité de surface Faible résistance mécanique Faible densité
Stéréolithographie	10 – 100 µm	Déliantage et frittage	Haute résolution Haute densité Bonnes propriétés mécaniques Architectures complexes	Coût important Etape de nettoyage post fabrication
Extrusion 3D	Dépend du diamètre de la buse	Déliantage et frittage	Faible cout Rapide Pas de gaspillage de matière Bonnes propriétés mécaniques Pas de nettoyage post fabrication Possibilité de travailler en phase aqueuse	Résolution dépend du diamètre de buse Besoin d'un support pour les formes en surplombs et flottantes

*Le déliantage n'est nécessaire que lors de la consolidation par fusion d'une phase secondaire

I.4. Positionnement des travaux

Le but de ces travaux est de fonctionnaliser un substitut osseux synthétique ostéoconducteur par des molécules d'intérêt et d'étudier ce DDS dans un bioréacteur à perfusion. L'objectif à plus long terme est de contribuer au développement de substituts osseux ostéoinducteurs pouvant être utilisés pour le comblement de défauts de taille critique au niveau des os longs. Le modèle d'étude doit donc prendre en compte le choix du support et de sa mise en forme, les conditions de libération, mais également les techniques d'identification et de dosage de ces principes actifs.

I.4.1. Choix du support et du procédé de mise en forme

Pour pouvoir étudier ces interactions et les cinétiques de libération, le substitut osseux doit être de forme relativement simple, être biocompatible et de préférence non biodégradable pour ne pas influencer les cinétiques. Une céramique en hydroxyapatite stœchiométrique est donc parfaitement appropriée. En effet, il s'agit d'un matériau bioactif en raison de sa composition proche de la partie minérale de l'os.

Le support osseux est mis en forme puis fonctionnalisé par différents principes actifs ayant des cinétiques de libération propres. Concernant le choix de la mise en forme, il faut prendre en compte les besoins de l'étude. Ici, l'architecture utilisée doit pouvoir rentrer dans la chambre interne du bioréacteur pour pouvoir étudier les cinétiques de libération. Plus l'architecture est simple, moins elle n'aura d'effet sur la cinétique de libération et plus il sera facile d'identifier l'impact des interactions entre les différents éléments du système [204]. De plus, les évaluations biologiques et microbiologiques nécessitent de réaliser les expériences en triplicat, ce qui requiert l'utilisation d'un grand nombre de substituts osseux [205].

Pour pouvoir être utilisé en tant que matériau de comblement de large défaut osseux au niveau des os longs, le substitut doit être de grande taille et posséder de bonnes propriétés mécaniques. Les techniques de projections de liant et de frittage sélectif par laser ne sont pas appropriées. Tel que décrit précédemment, le matériau doit également être fonctionnalisé pour favoriser son ostéointégration. La forme du substitut doit donc permettre de charger les principes actifs en quantité suffisante et la cinétique de libération doit pouvoir être évaluée. La microstéréolithographie n'est donc pas adaptée dans ce cadre en raison de la faible hauteur de ses pièces et du temps d'impression et de nettoyage relativement long. Par conséquent, la méthode d'extrusion 3D reste la plus appropriée. En effet, ce procédé de mise en forme permet d'imprimer un grand nombre de pièces en hydroxyapatite de forme relativement simple mais dont les dimensions favorisent l'ostéoconduction et la fonctionnalisation du substitut osseux. De plus, les pièces ne nécessitent pas de nettoyage après impression, ce qui réduit le temps de production des pièces [198].

I.4.2. Choix des méthodes de fonctionnalisation et d'étude des cinétiques de libération

Le support doit, au-delà des propriétés ostéoconductrices décrites précédemment, permettre à terme, le chargement de cytokines et d'antibiotiques de façon simultanée et indépendante. Si le réseau de micro-macropores du substitut osseux améliore significativement ses propriétés ostéoconductrices et angiogéniques, dans le cadre du développement de biomatériaux fonctionnalisés, le rôle de ce réseau est double. Il peut également être utilisé en tant que réservoir de principes actifs qui se libéreront une fois le substitut implanté. La cinétique de libération des PA dépendra alors de la méthode de chargement (adsorption, encapsulation...), de leurs localisations au sein des micropores ou des macropores, mais également de la forme du substitut osseux [206].

Les cytokines doivent être libérées en faible quantité et dans un délai très court après l'implantation du substitut [120]. Compte tenu de ces besoins, utiliser les micropores en adsorbant les cytokines à la surface du matériau semble être l'approche la plus appropriée [207]. Pour la vancomycine, elle doit être libérée en quantité importante après implantation du substitut pour délivrer une dose de charge, puis doit être libérée de façon progressive au cours du temps pour éviter le développement des bactéries à la surface du substitut [114]. Pour cela, la méthode de fonctionnalisation la plus intéressante semble être d'ajouter un hydrogel contenant de la vancomycine à l'intérieur des macropores du substitut [208].

Concernant l'évaluation des cinétiques de libération, le modèle choisi doit être au plus proche des conditions physiologiques humaines afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du substitut *in vivo*. L'utilisation d'un bioréacteur à perfusion semble pertinente car il permet de faire passer un flux de milieu au travers du substitut osseux. Il permet donc d'évaluer dans un premier temps la cinétique de libération de principe actif en conditions dynamiques. De plus ce dispositif est adapté à la culture cellulaire, ce qui permettra de complexifier le modèle d'étude, une fois les cinétiques de libération établies, en ajoutant des cellules de la niche osseuse.

Enfin les techniques de détection et de dosage doivent être suffisamment précises et robustes pour détecter et quantifier les principes actifs libérés par le substitut au cours du temps, même s'ils sont présents sous forme de trace.

I.4.3. Choix des techniques de dosage et d'identification des principes actifs

Pour étudier les cinétiques de libération des principes actifs, il faut pouvoir séparer, identifier et doser les composés d'intérêt en solution. La technique de dosage doit être choisie conformément à la concentration en principe actif libéré et à ses propriétés physico-chimiques et doit être sensible et hautement spécifique. La vancomycine et les cytokines étant des molécules très différentes tant en termes de taille, de structure et de mode d'action, elles

doivent être dosées par deux méthodes distinctes. D'après la littérature, une des techniques les plus sensibles pour détecter les antibiotiques en solution est la chromatographie liquide haute performance (CLHP) ou HPLC en anglais (*high performance liquid chromatography*) couplé à un spectromètre de masse [209]. Concernant la quantification de cytokines, la technique la plus utilisée est la méthode ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) [210], [211], [212].

HPLC-MS

Le principe de la chromatographie liquide haute performance est illustré en Figure 26.

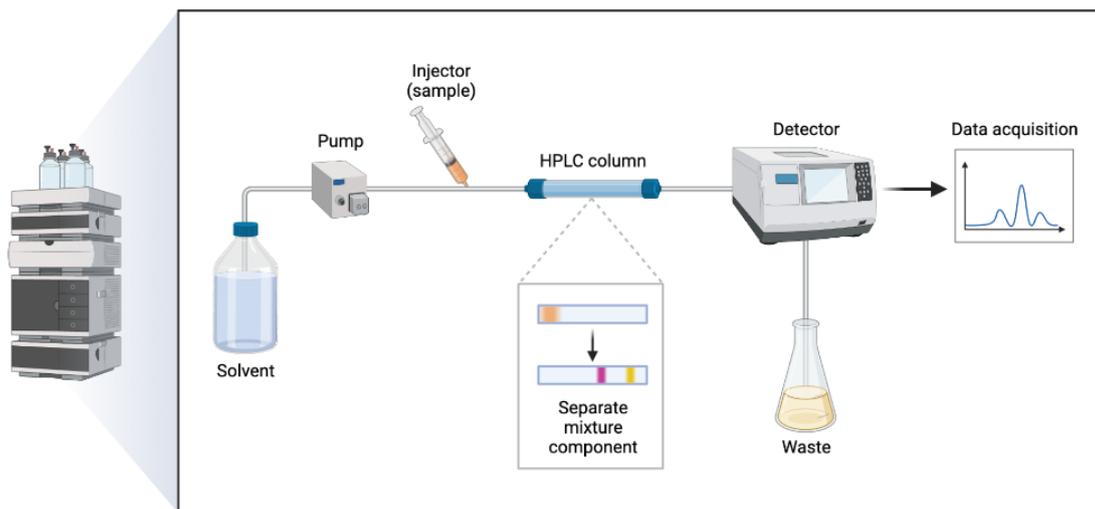


Figure 26 Principe de fonctionnement de l'HPLC

Il s'agit d'une technique de séparation dans laquelle l'échantillon à analyser est entraîné par une phase mobile (ou éluant) au travers d'une colonne (phase stationnaire). Les molécules contenues dans l'échantillon seront ensuite séparées en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire. Plus le composé présente d'affinité pour la phase stationnaire et plus il sera retenu. Les composés ainsi séparés seront alors analysés en passant devant un détecteur (UV). Pour garantir la séparation des composés, la phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire pour cela, l'une est polaire et l'autre est apolaire. Pour la détection de principe actif, il est courant d'avoir recourt à une chromatographie dite en phase inverse. La phase mobile est alors fortement polaire et est généralement composée d'eau, de méthanol ou d'acétonitrile. La phase stationnaire est alors apolaire, les billes de silice contenues dans la colonne sont alors greffées par des chaînes linéaires de carbones. Afin d'identifier les composés en solution, il est également possible de coupler l'HPLC à un spectromètre de

masse. Dans ce cas, une fois que les molécules sont passées au travers du détecteur UV, elles sont ionisées pour pouvoir être analysées par un spectromètre de masse [213], [214].

Méthode ELISA

La méthode ELISA repose sur la fixation spécifique entre un anticorps et un antigène. Cette technique hautement spécifique permet de détecter la présence de molécules d'intérêt présentes en très faible quantité en solution. Il existe différentes méthodes ELISA qui sont illustrées en Figure 27. L'ensemble de ces techniques de dosage repose sur l'utilisation d'une enzyme entraînant le changement de couleur d'un substrat chromogène proportionnellement à la quantité d'antigène d'intérêt dans le puits. Durant ces travaux, seul la technique ELISA sandwich a été utilisé car il s'agit de la méthode de dosage la plus sensible et la plus spécifique [215], [216], [217].

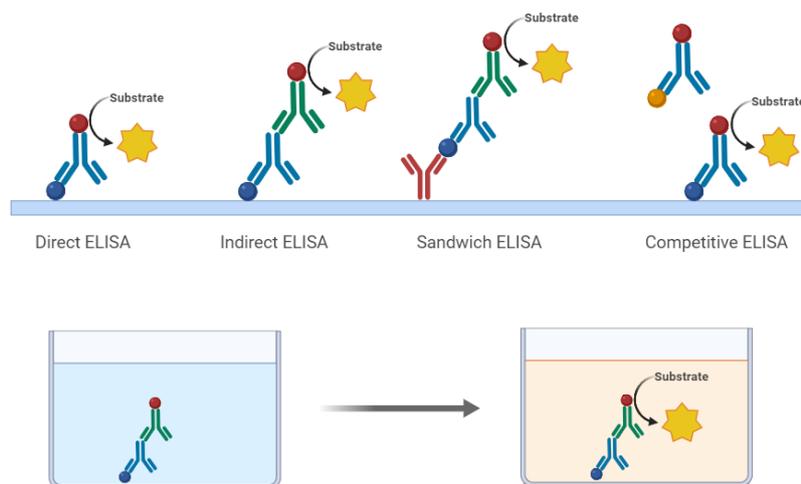


Figure 27 Schéma des différentes méthodes ELISA

La méthode sandwich (*Sandwich ELISA*) un anticorps spécifique à l'antigène d'intérêt est fixé au fond du puits. La solution contenant l'antigène à doser est alors ajoutée. En raison de la spécificité de l'anticorps primaire, seul l'antigène d'intérêt (ici une cytokine) reste fixé sur l'anticorps après lavage du puits. Un second anticorps spécifique à l'antigène et couplé à une enzyme est ajouté pour permettre le dosage de l'antigène lors de l'ajout du substrat chromogène. Cette technique est beaucoup plus sensible que les autres méthodes en raison de l'utilisation d'un anticorps primaire, qui ne permet que la fixation de l'antigène (Figure 27) [215], [216], [217].

I.4.4. Conclusion et Interactions à évaluer

D'après Campoccia *et al.*, pour développer un système de délivrance locale optimal, il faut prendre en compte l'ensemble des interactions pouvant avoir lieu entre les différents éléments du système. La localisation anatomique de l'implantation, le choix du matériau servant de vecteur, la connaissance des souches bactériennes présentes ainsi que le choix des principes actifs conditionnent directement l'efficacité du système de délivrance locale [114]. L'ensemble des points évoqués au cours de ce chapitre amène à proposer un schéma des interactions entre les différents éléments du substitut osseux étudié (Figure 28) :

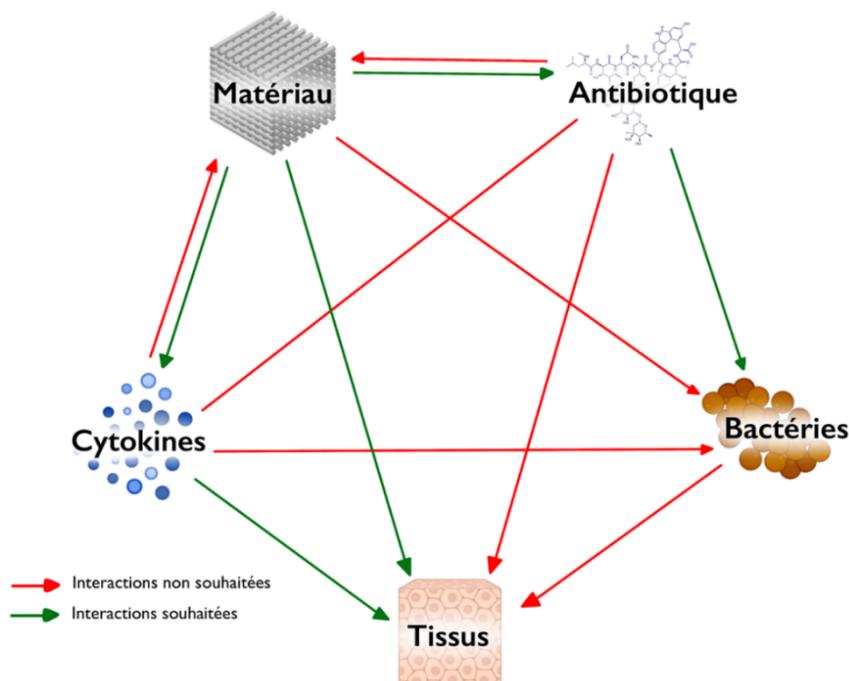


Figure 28 Illustration des interactions positives souhaitées et des non souhaitées entre les différents acteurs influençant l'intégration du substitut osseux

D'après ce schéma, le matériau doit pouvoir être colonisé par les cellules sans fournir de support propice au développement des bactéries. Il doit permettre le chargement de cytokines et de vancomycine ainsi que leurs libérations complètes dans l'organisme. Ces molécules ne doivent pas avoir d'impact sur les propriétés physico-chimiques du matériau pour qu'il conserve ses propriétés bioactives. L'antibiotique doit être libéré en concentration suffisante pour pouvoir éliminer ou a minima, empêcher le développement des bactéries pouvant être présentes au niveau du site osseux, mais doit toujours rester en dessous du seuil toxique pour les cellules. De la même façon, les cytokines doivent promouvoir la prolifération et la

différenciation des cellules sans favoriser celle des bactéries. Enfin, les interactions entre la vancomycine et les cytokines ne doivent pas avoir d'impact négatif sur leur profil de libération ou leur efficacité [114].

La suite de ces travaux s'articule donc autour du schéma présenté Figure 28, dans le but de développer un modèle d'étude pertinent, représentatif des conditions physiologiques et permettant d'étudier le plus d'interactions possibles.

Chapitre II. Matériels et Méthodes

Ce chapitre présente l'ensemble des techniques expérimentales utilisées durant ces travaux. La synthèse des poudres d'hydroxyapatite stœchiométrique ainsi que leurs caractérisations suivant la norme ISO 13779-3 y sont, dans un premier temps, décrites. Dans un deuxième temps sont exposées les différentes techniques mises en œuvre pour la caractérisation des poudres, pâtes et architectures céramiques. Enfin sont exposés les protocoles d'utilisation du bioréacteur à perfusion et l'ensemble des techniques d'expérimentation de biologie cellulaire et de microbiologie ayant servi à la validation des architectures fonctionnalisées.

II.1. Synthèse et caractérisations des poudres d'hydroxyapatite

II.1.1. Protocole de synthèse

Les poudres d'hydroxyapatite stœchiométrique de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ et de rapport molaire Ca/P égal à 10/6 ont été synthétisées par précipitation en voie aqueuse selon un protocole développé par Sylvie Raynaud en 2002. [218]

L'ensemble des paramètres monitorés lors de la synthèse d'HA sont résumés dans le Tableau 2 et le schéma de montage du réacteur de synthèse est présenté en Figure 29.

Tableau 2 Bilan des paramètres utilisés lors de la synthèse des poudres d'hydroxyapatite

Paramètres de synthèse	Valeurs
Quantité de matière de calcium (mol)	1,280
Quantité de matière de phosphate (mol)	0,768
Volume de solution de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ dans le réacteur principal (L)	2,0
Volume de solution de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ dans le réacteur secondaire (L)	1,2
Température du réacteur principal contenant la solution de calcium (°C)	90 ± 5
Température du réacteur secondaire contenant la solution de phosphate (°C)	60 ± 2
Vitesse d'agitation au sein du réacteur principal (tr/min ou rpm)	120
Débit d'introduction de la solution de phosphate au sein du réacteur principal ($\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)	0,05
pH du milieu réactionnel	$9,0 \pm 0,7$
Temps de maturation (min)	15
Débit de l'argon ($\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)	0,5

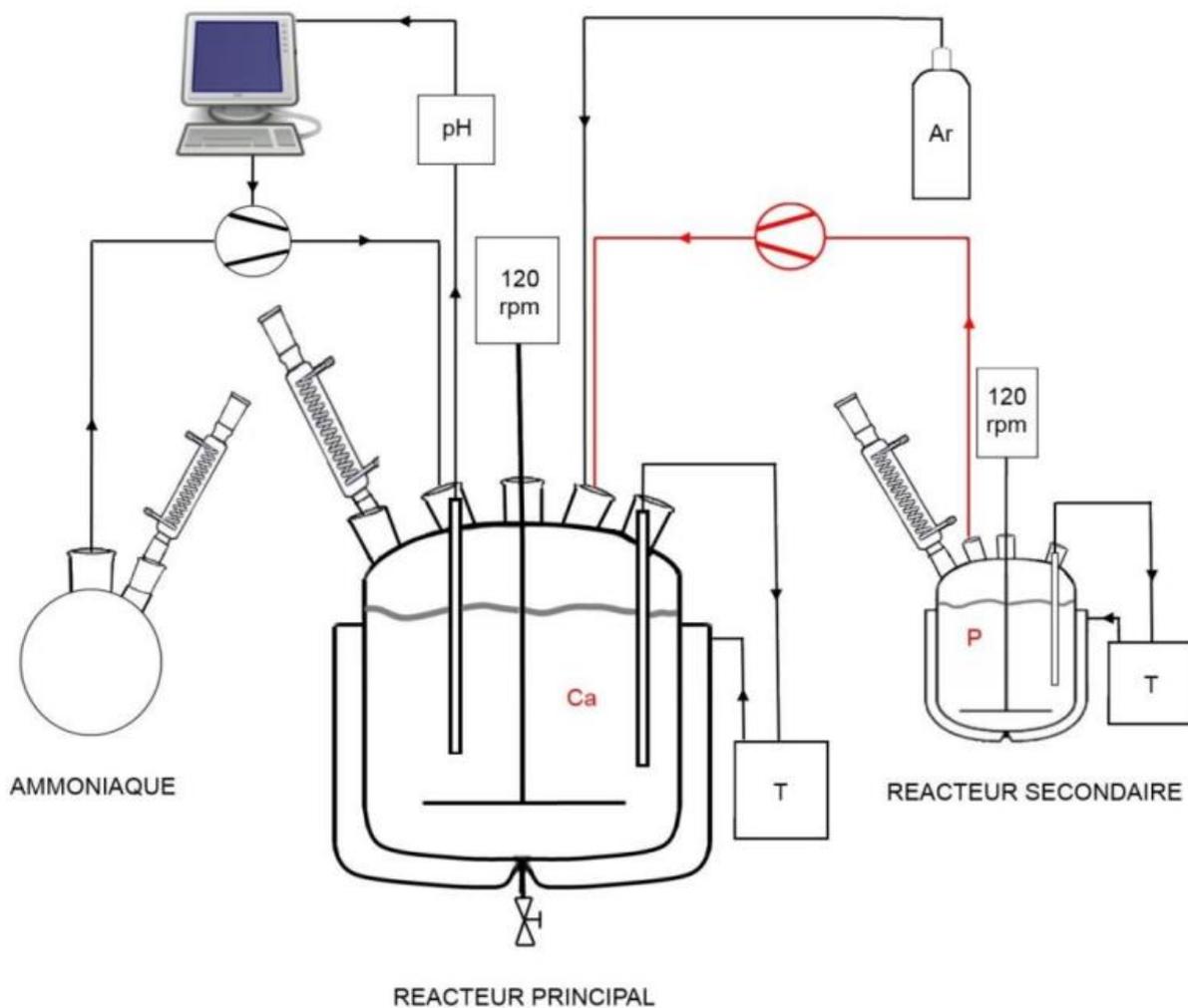


Figure 29 Schéma du montage de synthèse d'hydroxyapatite par précipitation en voie aqueuse [219]

Le nitrate de calcium tétrahydraté $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, 237124, pureté : 99 %) est dissous dans 2,0 L d'eau osmosée puis introduit dans le réacteur principal. Le précurseur phosphate, l'hydrogénophosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Fisher, A/5360/53, pureté : 99 %), est dissous dans 1,2 L d'eau osmosée puis introduit dans le réacteur secondaire. Les réacteurs sont ensuite chauffés, à $90\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ pour le réacteur principal et à $60\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ pour le réacteur secondaire. Pour cela, le réacteur principal possède une double paroi dans laquelle circule une huile chauffée par un bain thermostaté (Phoenix II, Thermo Scientific) et le réacteur secondaire est placé sur une plaque chauffante couplée à un thermomètre sonde. Ces températures seront maintenues constantes pendant toute la durée de la synthèse. Les solutions contenues dans chacun des réacteurs sont soumises à une agitation constante de 120 rpm. Une fois la température de consigne atteinte dans chacun des réacteurs, la solution de précurseur phosphate est progressivement ajoutée à la solution de précurseur calcium au

moyen d'une pompe péristaltique (Pumpdrive 5206) dont le débit est fixé à 50 mL/min. Après l'ajout complet de la solution de phosphate dans le réacteur principal, le mélange réactionnel est mûri durant 15 min sous agitation mécanique à 120 rpm. Durant toute la synthèse (ajout de la solution de phosphate et maturation), le pH est maintenu à $9,0 \pm 0,2$ par ajout d'une solution d'ammoniaque NH_4OH (Merck) par une pompe doseuse (Pompe gamma/L, ProMinent). Dans le but d'éviter une carbonatation de la poudre d'hydroxyapatite, le réacteur principal est placé sous balayage d'argon à un débit de 0,5 L/min. L'ensemble des paramètres réactionnels, tels que la température, le pH et le débit d'argon sont monitorés par un programme développé sous LabVIEW (National Instruments).

Après un temps de maturation de 15 min, la suspension d'hydroxyapatite obtenue est centrifugée (IEC CL40 Centrifuge, Thermo Scientific) trois fois à 1500 rpm pendant 5 min afin d'extraire le surnageant puis de rincer le précipité à l'eau osmosée. Ce précipité est ensuite séché dans une étuve ventilée à 100 °C pendant 24 h. Les agglomérats obtenus sont ensuite broyés manuellement dans un mortier en agate.

Ce protocole permet d'obtenir environ 120 g d'hydroxyapatite par synthèse. Afin de subvenir au besoin en matière première nécessaire à la conduite des travaux, sept synthèses d'hydroxyapatite ont été réalisées.

II.1.2. Vérification de la pureté de la poudre

Pour une application biomédicale, la poudre d'hydroxyapatite obtenue doit répondre aux spécifications de la norme ISO 13779-3 [220]. Afin de valider la conformité de la poudre, un échantillon est calciné sous air à 1000 °C pendant 15 h avec une rampe de montée en température de 20 °C/min dans un four MOSB 1800 (Protherm). L'absence de phase secondaire est alors contrôlée par un test acido-basique (test à la phénolphtaléine), diffraction des rayons X (DRX) et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).

II.1.2.1. Test à la phénolphtaléine

La phénolphtaléine ou 3,3-bis(4-hydroxyphényl)-1-(3H)-monobenzofuranone est un indicateur coloré incolore en solution acide et neutre, mais qui devient rose en milieu basique. En effet, sa zone de virage est comprise entre pH 8 et 10. Le test à la phénolphtaléine est utilisé pour détecter la présence de chaux vive CaO dans les produits de synthèse. Afin de limiter leur hydratation, quelques grains de poudre sont déposés, dès leur sortie du four (400 °C), dans un bécher contenant de l'eau osmosée. Si la poudre contient de la chaux vive, une réaction acido-basique a alors lieu, le pH de la solution devient basique conduisant au changement de couleur de la solution qui vire au rose.

Les tests à la phénolphthaléine de l'ensemble des poudres synthétisées et utilisées lors de ces travaux se sont avérés négatifs ce qui traduit l'absence de chaux dans les poudres après calcination.

II.1.2.2. Diffraction des rayons X

L'analyse par diffraction des rayons X (DRX) est réalisée lors du refroidissement sur une poudre à 400 °C. Les conditions d'acquisition ainsi que les fiches PDF de référence sont présentées paragraphe II.2.1. La Figure 30 présente le diffractogramme caractéristique d'une poudre d'hydroxyapatite calcinée à 1000 °C durant 15 h. D'après la fiche PDF-ICDD (Powder Diffraction File™ of the International Center for Diffraction Data®), l'ensemble des pics indexés correspondent à la phase cristalline de l'hydroxyapatite (PDF 00-009-0432). La poudre ne présente donc pas de phase cristalline secondaire.

Pour l'ensemble des synthèses réalisées, les diffractogrammes obtenus étaient identiques à celui présenté en Figure 30, confirmant la pureté des poudres utilisées lors de ces travaux.

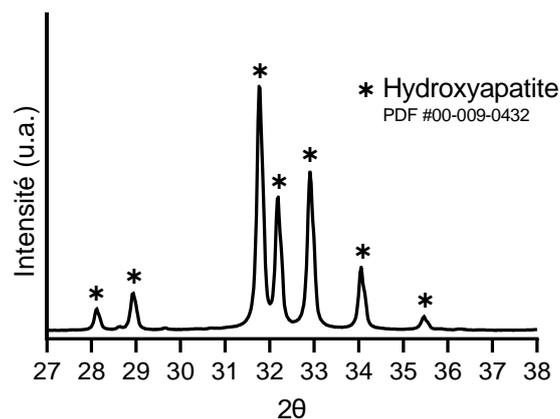


Figure 30 Diffractogramme caractéristique d'une poudre d'hydroxyapatite synthétisée au laboratoire et calcinée à 1000 °C-15h

II.1.2.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTf) ont été réalisées sur poudres calcinées et froides. Les conditions d'acquisition, le traitement des spectres infrarouges ainsi que les bandes d'absorption caractéristiques des poudres d'hydroxyapatites sont précisés dans le paragraphe II.2.2. Pour l'ensemble des synthèses réalisées, les spectres obtenus étaient tous identiques à celui présenté en Figure 31.

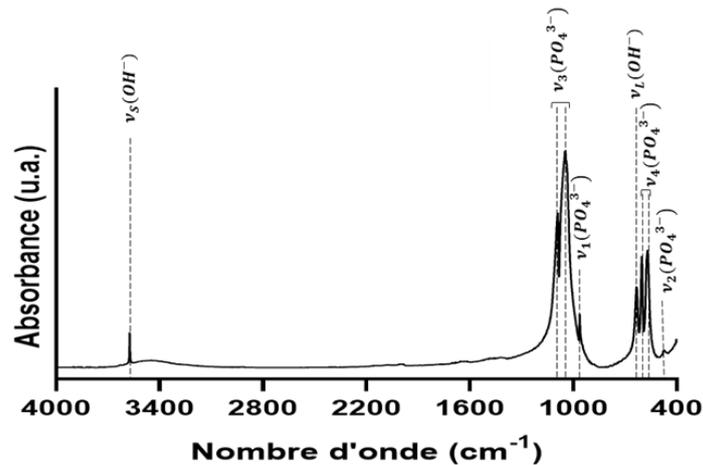


Figure 31 Spectre infrarouge caractéristique d'une poudre d'hydroxyapatite calcinée à 1000 °C durant 15 h

L'ensemble des bandes observées sur le spectre de la poudre correspondent aux bandes de vibrations caractéristiques des groupements hydroxyles et phosphates de l'hydroxyapatite. . Les bandes de vibrations d'élongation antisymétriques et symétrique sont présentes à 1081 et 1030 cm^{-1} ($\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$) et 954 cm^{-1} ($\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$). Les bandes de déformation angulaire antisymétriques $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ sont présentes à 601 et 570 cm^{-1} et les symétriques $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$ à 474 cm^{-1} . Les bandes liées à la présence des groupements hydroxydes sont visibles à 631 cm^{-1} ($\nu_L(\text{OH}^-)$) et 3562 cm^{-1} ($\nu_S(\text{OH}^-)$).

II.2. Techniques de caractérisation physico-chimique

II.2.1. Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X (DRX) permet d'identifier les phases cristallines présentes au sein d'une poudre ou d'un massif. Les diffractogrammes ont été obtenus sur un diffractomètre D8 Advance de Bruker avec les radiations $\text{K}\alpha_1$ et $\text{K}\alpha_2$ du cuivre, sur un intervalle en 2θ de 27° à 38°, avec un pas de 0,02° et un temps de comptage par pas de 4 s. Les phases sont identifiées en utilisant le logiciel DIFFRAC.EVA (Bruker AXS) par comparaison avec les fiches PDF (*Powder Diffraction File*) de la base de données ICDD (*International Center for Diffraction Data*). Les fiches PDF de référence pour l'indexation des différents composés susceptibles d'être présents dans les poudres et architectures étudiées sont données dans le Tableau 3.

Tableau 3 Fiches PDF de référence pour l'indexation des diffractogrammes

Composés	Formule chimique	Fiche PDF
Hydroxyapatite stœchiométrique (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	09-0432
Phosphate tricalcique β (β -TCP)	$\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	09-0169
Phosphate tricalcique α (α -TCP)	$\alpha\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	09-0348
Chaux vive ou oxyde de calcium	CaO	37-1497
Chaux éteinte ou dihydroxyde de calcium	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	04-0733

II.2.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les spectres infrarouges des poudres d'hydroxyapatite ont été obtenus en utilisant un spectromètre Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) Spectrum™ One de PerkinElmer sur un intervalle en nombres d'onde allant de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} et avec une résolution de 2 cm^{-1} . La transmittance a été mesurée au travers de pastilles de bromure de potassium (KBr) sur 20 cycles, les spectres sont ensuite présentés en absorbance. Les échantillons étant pulvérulents, les pastilles ont été mises en forme en ajoutant 1 % massique de poudre d'hydroxyapatite au KBr. Elles ont été mises en forme par pressage uniaxial avec une matrice de pressage en acier inoxydable de 13 mm de diamètre. Avant chaque série de mesures sur les échantillons, un blanc a été réalisé avec une pastille contenant uniquement du KBr. Les bandes d'absorption infrarouge d'intérêt pour l'étude des phosphates de calcium de structure apatite sont répertoriées dans le Tableau 4 (d'après Elliott, 1994 - [221]).

Tableau 4 Bandes de vibrations et de déformations angulaires caractéristiques des groupements d'intérêt pour l'étude des phosphates de calcium d'après Elliott [221]

Composé	Mode de vibration	Bande d'absorption IR (cm ⁻¹)
Hydroxyapatite (HA)	$\nu_S(OH^-)$ Élongation	3562
	$\nu_L(OH^-)$ Libration	631
	$\nu_3(PO_4^{3-})$ Élongation antisymétrique	1081 et 1030
	$\nu_1(PO_4^{3-})$ Élongation symétrique	954
	$\nu_4(PO_4^{3-})$ Déformation antisymétrique	601 et 570
	$\nu_2(PO_4^{3-})$ Déformation symétrique	474
Phosphate tricalcique α (α-TCP)	$\nu_3(PO_4^{3-})$ Élongation antisymétrique	1063 – 1020
	$\nu_1(PO_4^{3-})$ Élongation symétrique	989 et 962
	$\nu_4(PO_4^{3-})$ Déformation antisymétrique	595 et 554
Phosphate tricalcique β (β-TCP)	$\nu_3(PO_4^{3-})$ Élongation antisymétrique	1112 – 1000
	$\nu_1(PO_4^{3-})$ Élongation symétrique	956 et 930
	$\nu_4(PO_4^{3-})$ Déformation antisymétrique	604/590 et 544/503
Chaux éteinte $Ca(OH)_2$	$\nu(OH^-)$ Élongation	3640 – 3650
Eau adsorbée	$\nu(H_2O)$ Élongation	3700 – 3000
	$\delta(H_2O)$ Déformation angulaire	1630
Dioxyde de carbone	$\nu(CO_2)$ Élongation	2360 et 2340
	$\delta(CO_2)$ Déformation angulaire	667

II.2.3. Microscopie électronique à balayage

La morphologie des poudres et les microstructures des architectures frittées ont été observées par microscopie électronique à balayage (MEB), sans métallisation, avec un microscope FEI Quanta 450 FEG. Au cours des observations, la tension d'accélération des électrons était fixée entre 1 kV et 10 kV.

Les micrographies ont permis d'évaluer la morphologie et la taille des grains, mais également la macro et microporosité des architectures ainsi que leur état de surface. L'affaissement des pièces a été évalué en coupant, selon l'axe Z d'impression, des architectures préalablement incluses dans de la résine. Ces acquisitions ont également permis d'évaluer la taille des filaments extrudés et la porosité après frittage par traitement d'images avec le logiciel ImageJ [222]. La taille des macropores a été évaluée en observant les architectures en vue de dessus, c'est-à-dire dans le plan XY et selon l'axe Z d'impression des pièces. La microporosité a été évaluée d'après des clichés obtenus pour différentes faces des architectures.

II.2.4. Analyses élémentaires et dosages chimiques

II.2.4.1. Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif

L'ICP-AES (*Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*) permet de réaliser une analyse élémentaire en solution par vaporisation au moyen d'un plasma d'argon. Afin d'estimer la dégradation des architectures d'hydroxyapatite en conditions dynamiques, la présence d'ion calcium dans le milieu d'étude a été recherchée. Pour cela, des substituts ont été placés dans le bioréacteur pendant 14 jours, puis les pièces ont été retirées et le milieu circulant au contact des architectures a été analysé par ICP-AES (8300DV, Perkin Elmer). Les résultats sont donnés en milligramme de calcium par litre de PBS 1X (mg/L).

II.2.4.2. Chromatographie liquide haute performance

Au cours de ces travaux, la quantité de vancomycine libérée par les architectures a été évaluée par chromatographie liquide haute performance (HPLC). L'appareil utilisé se compose d'un passeur d'échantillon Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific), d'une pompe quaternaire C (Thermo Fisher Scientific), d'un détecteur UV à barrette d'iode FG Vanquish (Thermo Fisher Scientific) et d'un compartiment de colonne C Vanquish (Thermo Fisher Scientific). De plus, cette HPLC est couplée à un spectromètre de masse simple quadripôle ISQ™ EC (Thermo Fisher Scientific). Une colonne en phase inverse Accucore™ C18 (taille de particules 2,6 µm, longueur :150 mm, diamètre interne 2,1 mm - Thermo Fisher Scientific) est utilisée pour permettre la séparation des différents composés présents dans l'échantillon à analyser.

Les prélèvements, issus du bioréacteur et effectués au cours du temps, ont tout d'abord été filtrés avec un filtre seringue de 0,40 µm pour éliminer toute trace de débris d'hydrogel de chitosan, lesquels pourraient endommager la colonne. Un millilitre de chaque prélèvement a été introduit dans un flacon Vial ambré avant d'être placé dans le passeur d'échantillon. L'analyse est alors entièrement automatisée et suit les protocoles qui seront décrits dans le chapitre IV (paragraphe IV.1.2). L'ensemble des protocoles d'acquisition ainsi que la méthode de traitement des résultats ont été définis en utilisant le logiciel Chromeleon™ (Thermo Fisher Scientific).

II.2.5. Caractérisations physiques

II.2.5.1. Mesures des surfaces spécifiques par la méthode BET

Les surfaces spécifiques des poudres d'hydroxyapatite ont été mesurées par la méthode BET (Brunauer-Emmett-Teller) 8 points en utilisant un analyseur d'adsorption ASAP 2020. Cette

technique de mesure est basée sur l'adsorption de diazote à la surface de l'échantillon. Pour cela, environ 1,5 g de poudre sont placés dans un tube en verre et dégazés à 90 °C pendant 30 minutes suivi d'un palier de 12 heures à 105 °C. La surface spécifique ainsi obtenue est notée SSA (*Specific surface area*) et est exprimée en m²/g.

II.2.5.2. Détermination de la distribution granulométrique

Les distributions granulométriques des poudres ont été évaluées par granulométrie laser avec un appareil Partica LA-950V2 de Horiba. Les mesures ont été effectuées en voie liquide. Pour cela, les poudres ont été mises en suspension dans de l'eau et placées dans un bain à ultrasons pendant 5 min pour en optimiser la dispersion, puis un prélèvement de la suspension est introduit dans la cuve du granulomètre laser qui est maintenue sous agitation pendant toute la durée de la mesure. Le diamètre des particules est calculé en utilisant la théorie de la diffusion de Mie avec un indice de réfraction pour l'HA de 1,63 et pour l'eau de 1,33. Les résultats obtenus correspondent à la distribution en nombre ou en volume du diamètre des particules, avec respectivement D₁₀, D₅₀, D₉₀, la distribution au seuil de 10%, de 50% (diamètre médian) et 90%.

II.2.6. Analyses thermiques

II.2.6.1. Analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse

Pour déterminer la température nécessaire au déliantage des architectures mises en forme par robocasting, une analyse thermogravimétrique (ATG) a été réalisée avec un analyseur thermique STA 449 F3 Jupiter® de NETZSCH sur des pièces séchées qui ont été broyées et placées dans un creuset en platine. Les mesures ont été effectuées sous air avec une montée en température de 30 °C à 1000 °C à une vitesse de 10 °C/min avec un pas d'acquisition de 1 pt/ °C.

L'analyse des produits émis lors du déliantage a été faite au moyen d'un spectromètre de masse (SM) ThermoStar GSD 301 T2 (Pfeiffer Vacuum) couplé à l'ATG. Pour cela, les mesures ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, mais sous argon. Les gaz émis lors du traitement thermique sont acheminés vers le spectromètre de masse par un capillaire situé dans un tuyau thermostaté, puis ionisés avant de pénétrer dans l'analyseur équipé d'un filtre de masse quadripolaire. Dans le cas présent, seuls les rapports masse sur charge m/e compris entre 1 et 60 sont détectés.

Pour les ATG comme pour les ATG-SM, les valeurs de références ont été acquises en utilisant un creuset en platine vide et les acquisitions ont été faites avec environ 70 mg de poudre de pièces (séchées et broyées).

II.2.6.2. Dilatométrie

L'impact des températures de frittage sur le retrait des pièces a été étudié à l'aide d'un dilatomètre vertical TMA (Thermomechanical Analysis) 16/18 setsys Evo « easy fit » de la société SETARAM. Des pastilles de pâte ont été mises en forme par pressage manuel dans une matrice en acier inoxydable avec un diamètre intérieur de 8 mm. Les variations dimensionnelles des échantillons au cours du traitement thermique ont été suivies par le biais du déplacement d'un palpeur en alumine appliquant une charge de 5 g sur l'échantillon. Un balayage d'air de 100 mL/min a été imposé au cours de l'expérience. Le signal obtenu est corrigé par soustraction de la contribution relative à la dilatation de l'alumine.

II.2.7. Mesures rhéologiques

II.2.7.1. Rhéologie des pâtes céramiques

Les mesures rhéologiques des pâtes céramiques d'hydroxyapatite ont été réalisées en mode oscillation avec un rhéomètre DHR2 (TA Instruments). Sachant que la pâte contient des grains d'HA, une géométrie plan-plan avec un mobile plan en acier inoxydable d'un diamètre de 4 mm a été choisie, la taille de l'entrefer a été fixée à 1000 μm et la température de mesure fixée à 20 °C. Un balayage en amplitude à une fréquence constante de 1 Hz a été effectué afin d'obtenir l'évolution du module élastique G' (ou module de conservation - en Pa) et du module visqueux G'' (ou module de perte - en Pa) en fonction de la déformation en oscillation γ_o (en Pa) et de la contrainte en oscillation τ_o (en Pa). Le balayage en amplitude permet de déterminer le domaine viscoélastique linéaire (LVER : *Linear Viscoelastic Region*) et d'en déduire le comportement du matériau au repos (sans application de contraintes).

Dans le cadre de ces travaux, ces mesures permettent d'identifier le comportement (fluide ou solide) de la pâte d'hydroxyapatite dans le domaine viscoélastique linéaire (LVER : *Linear Viscoelastic Region*) et de déterminer la contrainte seuil d'écoulement quand G' , initialement supérieur à G'' , devient égal à G'' (Figure 32). En effet, la pâte doit avoir un comportement solide dans le réservoir ($G' > G''$) jusqu'à ce que la pression soit suffisante pour qu'elle puisse s'écouler ($G' < G''$). L'acquisition des données a été réalisée pour une amplitude de la contrainte τ_o comprise entre 10^2 et 10^5 Pa.

Le comportement des pâtes au repos et sur des temps longs a été étudié par une analyse oscillatoire avec un balayage en fréquence. Les mesures ont été effectuées à 20 °C sur une plage de fréquences allant de 10^{-3} Hz à 10 Hz, avec une contrainte d'oscillation imposée à 1500 Pa, appartenant au LVER.

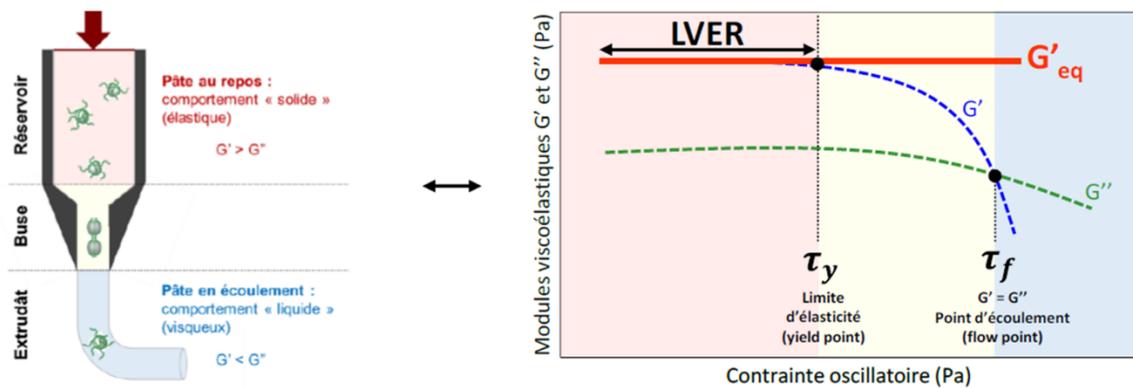


Figure 32 Etude du comportement rhéologique de la pâte lors de l'extrusion par rhéologie en oscillation d'après Delphine Gourdonnaux [223]

II.2.7.2. Rhéologie de l'hydrogel de chitosan

La rhéologie des hydrogels de chitosan avec ou sans vancomycine a été étudiée en utilisant un rhéomètre à cylindres coaxiaux rheomat RM200 (Lamy Rheology) équipé d'un cylindre de 30 mm. Les mesures ont été réalisées en mode écoulement à température ambiante et à 37 °C. Les rhéogrammes ont été obtenus en traçant l'évolution de la contrainte (τ) exprimée en mPa en fonction du taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$) exprimé en s^{-1} .

II.3. Évaluation des cinétiques de libération en bioréacteur à perfusion

II.3.1. Description du bioréacteur à perfusion

L'appareil utilisé pour l'évaluation des cinétiques de libération des molécules actives est un bioréacteur à perfusion InFlow (SKE research equipment) dont le dispositif est présenté sur la Figure 33. Conçu pour la culture cellulaire 3D, il se compose de 9 lignes indépendantes pouvant être montées en parallèle et connectées simultanément à la même pompe péristaltique. Chaque ligne est composée d'un support en aluminium sur lequel sont fixés deux oxygénateurs également en aluminium, un réservoir en verre et polypropylène, des tubulures en silicone durcies au platine, une tubulure *two-stop* en polypropylène, un circuit *by-pass* et une chambre de perfusion. Les tubulures en silicone sont perméables pour permettre les échanges gazeux (O_2 et CO_2) et enroulées autour des oxygénateurs augmentant ainsi la surface d'échange tout en minimisant le volume occupé. Le circuit *by-pass* permet au milieu de contourner la chambre, ce qui peut être utile pour éviter d'endommager les cellules lorsque le débit est important. La tubulure *two-stop* permet de relier les lignes à la pompe péristaltique,

de ce fait elles sont plus flexibles et résistantes que les tubulures en silicone durcies et possèdent des crans pour faciliter la fixation des cassettes (système permettant aux tubulures d'être fixées sur la pompe péristaltique). La chambre quant à elle permet de contenir le support contenant les cellules. Elle est composée de trois parties différentes : deux chambres externes en polycarbonate, un support interne en polycarbonate et deux chambres internes en téflon (Figure 34). Dans les travaux présentés ici, c'est cette chambre qui contiendra les architectures céramiques en hydroxyapatite.

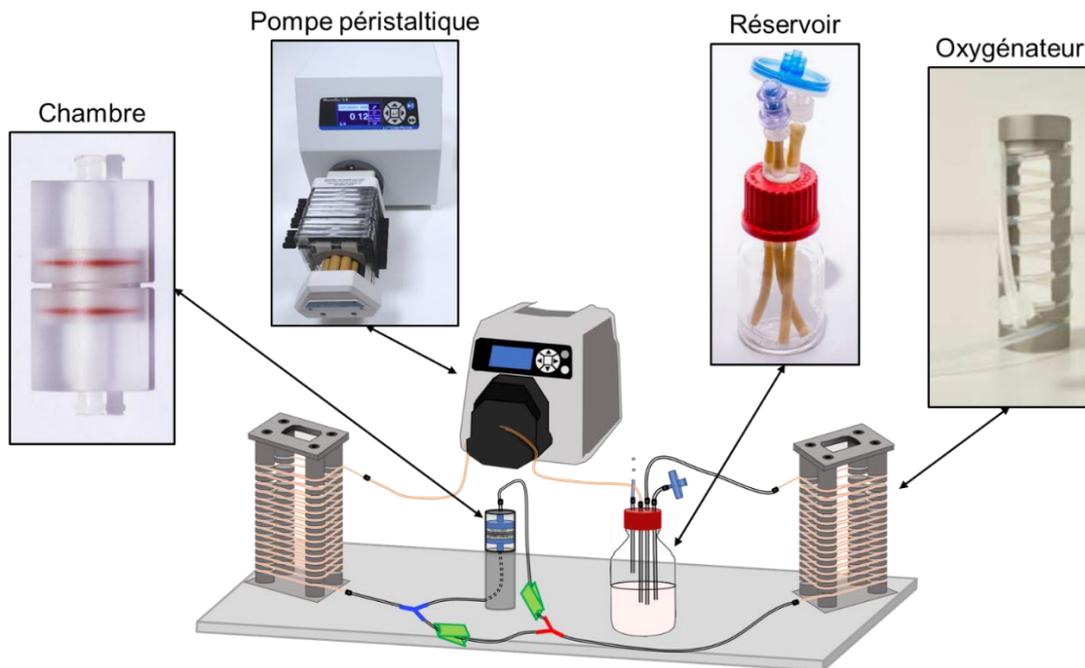


Figure 33 Schéma du bioréacteur à perfusion InFlow (SKE research equipment)

II.3.2. Protocole de mise en route

Dans un premier temps, les lignes, les chambres et les supports internes sont autoclavés à 121 °C pendant 15 min en utilisant un autoclave Advantage-Lab™ AL02-01-100, de façon indépendante et dans des sachets hermétiques. Les architectures ont été fonctionnalisées suivant un protocole décrit dans le paragraphe IV.2.2, puis placées sous UV pendant 30 min. La pompe péristaltique est nettoyée avec de l'éthanol à 70 %vol. et placée dans un incubateur pour culture cellulaire (Incubateurs à CO₂ trigaz Heracell™ VIOS 160i – Thermofisher) dont la température est maintenue à 37 °C et le taux de CO₂ à 5%.

La mise en place des pièces et la connexion des tubulures sont effectuées sous une hotte PSM II pour en assurer la stérilité. Chaque architecture fonctionnalisée est placée entre les deux parties d'une chambre interne dont les dimensions sont de 10 mm x 10 mm x 8 mm selon

les axes x, y et z (Figure 34. Étapes 1 et 2). La chambre interne permet de limiter l'espace entre la pièce et la chambre et ainsi guider la circulation du flux au travers de la pièce. La chambre interne est ensuite positionnée dans le support interne (Figure 34. Étape 3). Les joints de ce support (en rouge sur la Figure 34) vont permettre d'assurer l'étanchéité du dispositif une fois que les deux parties de la chambre externe seront placées autour (Figure 34. Étape 4). La chambre fermée est ensuite connectée à la ligne du bioréacteur selon de schéma présenté Figure 33. Le réservoir est ensuite rempli avec 25 ml de PBS 1X stérile. Un filtre seringue (en bleu sur la Figure 33) est ajouté sur un des tubes du réservoir pour assurer l'oxygénation du milieu. Chacune des lignes ainsi montées est alors placée dans l'incubateur et reliée à la même pompe péristaltique dont le débit est fixé à 1 mL/min.

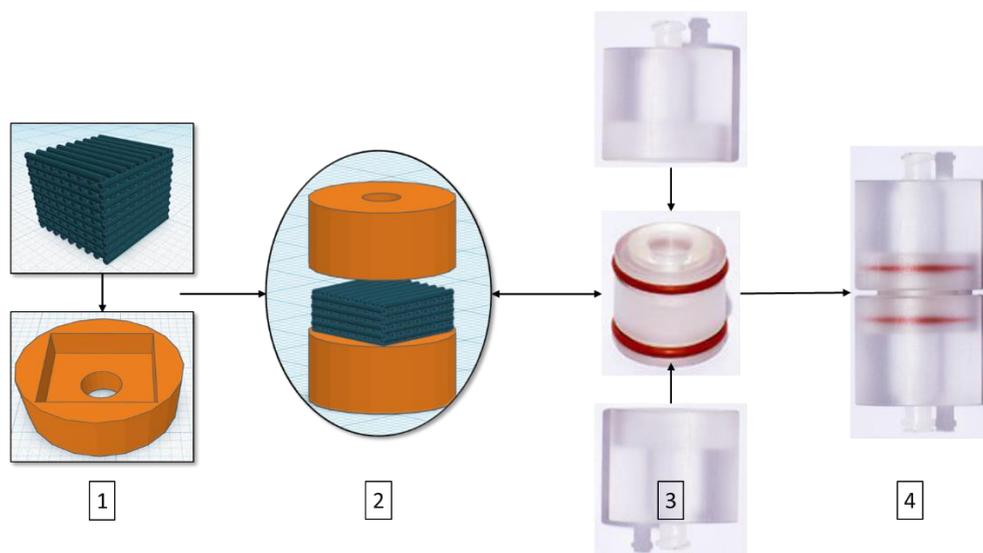


Figure 34 Schéma de la mise en place d'une architecture céramique dans une chambre du bioréacteur à perfusion

II.3.3. Protocole de nettoyage du bioréacteur

Après chaque campagne, le bioréacteur a été soigneusement nettoyé. Une fois la ligne sortie de l'incubateur, la chambre est déconnectée de la ligne et l'ensemble des éléments qui la composent sont séparés, nettoyés à l'eau savonneuse, rincés à l'eau puis à l'éthanol à 70%vol. Les tubulures sont nettoyées en faisant circuler différentes solutions de rinçages. Les tubulures sont tout d'abord rincées à l'eau, puis à l'eau de javel, laquelle est laissée dans les tubulures pendant minimum 30 min. L'eau de javel est ensuite remplacée par de l'éthanol à 70 %vol puis par de l'eau osmosée. Enfin l'intérieur des tubulures est séché à l'air comprimé. La ligne est au final remontée pour être stérilisée avant sa prochaine utilisation. Les

architectures sont quant à elles conservées dans des plaques 24 puits pour des analyses ultérieures.

II.4. Biologie cellulaire *in vitro*

Durant ces travaux, trois différents types cellulaires ont été utilisés : des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) achetées chez Promocell (PCS-100-010 TM), des monocytes THP1 achetés chez l'ATCC (TIB-202 TM) et des précurseurs ostéoblastiques humains obtenus par isolement de cellules primaires.

II.4.1. Protocole d'isolement des précurseurs ostéoblastiques humains

Les précurseurs ostéoblastiques humains (PO) ont été isolés à partir de fragments de périoste collectés lors d'interventions chirurgicales maxillo-faciales au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Dupuytren à Limoges, et ce avec le consentement éclairé du patient².

Les fragments ont été découpés avec un scalpel puis incubés 15 min dans une solution de PBS 1X contenant 0,2 %m de collagénase de type I (Gibco). La solution obtenue a ensuite été passée successivement au travers de tamis cellulaires de 100 µm et de 40 µm afin d'éliminer les débris tissulaires et ne garder que les cellules. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée à 300 g pendant 5 min et le culot a été repris avec du milieu MEM-α (Minimum Essential Medium – Gibco) dit « complet ». Ce milieu de culture est constitué de MEM-α sans acide ascorbique, complété avec 10 %vol. de sérum de veau foetal (Gibco), de la pénicilline (100 units/mL - Gibco) et de la streptomycine (100 µg/ml - Gibco). Afin d'éliminer les éléments figurés du sang, la suspension cellulaire a été déposée sur une solution de Ficoll (solution de polysaccharide) d'une densité de 1,073 g/mL (GE Healthcare). Le tube a ensuite été centrifugé pendant 25 min à 500 g sans accélération ni freinage. Les cellules situées à l'interface entre le milieu de culture et le Ficoll ont été collectées et centrifugées pendant 5 min à 300 g pour éliminer les traces de Ficoll. Le culot a été resuspendu avec du MEM-α complet. Enfin, les cellules ont été déposées dans une flasque de 25 cm² contenant du MEM-α complet puis placées dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂. Le milieu a été remplacé le lendemain par du MEM-α complet auquel a été ajouté 1 %vol. de FGF2 (*Fibroblast Growth Factor* – Miltenyibiotec).

² Autorisation du comité d'éthique du CHU de Limoges (autorisation n° 312-2019-78 en date du 12/09/2019) et les cellules sont enregistrées au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges dirigé par le Dr Françoise Esclaire dans le respect des exigences réglementaires, déclaration CODECOH n°DC-2008-604.

II.4.2. Protocoles de culture cellulaire

Chacune des lignées a été cultivée avec un milieu de culture approprié, détaillé ci-dessous, et renouvelé tous les trois jours :

- milieu de culture des précurseurs ostéoblastiques : MEM- α (Gibco), sans acide ascorbique et complétement avec 10 %vol. de sérum de veau fœtal (Gibco), 1 %vol. de FGF2 (Miltenybiotec), de la pénicilline (100 units/mL, Gibco) et de la streptomycine (100 μ g/mL, Gibco) ;
- milieu de culture des HUVEC : *endothelial cell basal medium 2* (Promocell) complétement avec 10 %vol. de sérum de veau fœtal (Gibco), de la pénicilline (100 units/mL, Gibco) et de la streptomycine (100 μ g/mL, Gibco) ;
- milieu de culture des THP1 : RPMI 1640 (Gibco) complétement avec 10 %vol. de sérum de veau fœtal (Gibco), 0,1 %vol. de β -mercaptoetanol 50nM (Gibco), de la pénicilline (100 units/mL, Gibco) et de la streptomycine (100 μ g/mL, Gibco).

Toutes les lignées ont été cultivées dans un incubateur sous atmosphère contrôlée (37 °C et 5 % de CO₂). Les cellules THP1 et les précurseurs ostéoblastiques ont été cultivés dans des flasques de 75 cm² et les HUVEC dans des flasques de 25 cm². Les cellules sont passées lorsqu'elles arrivaient à subconfluence. Le temps entre deux passages variait en fonction de la lignée cellulaire. Les THP1 ont un taux de doublement rapide qui nécessite deux passages par semaine alors que les précurseurs ostéoblastiques nécessitent un passage par semaine et les HUVEC un toutes les deux semaines. Pour les précurseurs ostéoblastiques et les HUVEC, les passages ont été réalisés par trypsinisation du tapis cellulaire en utilisant du tryPLE (Gibco). Après 10 min d'incubation, le tryPLE a été inhibé par l'ajout de milieu de culture. La suspension cellulaire a alors été collectée et centrifugée à 300 g pendant 5 min. Les cellules ont ensuite été comptées sur cellule de Malassez pour êtreensemencées ou congelées.

Les THP1 étant des cellules non adhérentes, les flaques ont été placées à la verticale dans l'incubateur. Les passages sont effectués par dilution au 1/2 ou 1/3 de la suspension cellulaire et ajout de milieu neuf.

II.4.3. Congélation des lignées cellulaires

Quelle que soit la lignée cellulaire, les cryotubes contiennent un million de cellules dans 1 mL du milieu de culture approprié avec 10 %vol. de diméthylsulfoxyde (DMSO – Sigma Aldrich). Les tubes ont été conservés à -80 °C jusqu'à utilisation.

II.4.4. Évaluation de l'activité métabolique des cellules

L'AlamarBlue est le nom commercial de la résazurine qui est un indicateur coloré bleu. Il est réduit de façon irréversible en résorufine, composé de couleur rose, par l'activité métabolique des cellules. Il est donc couramment utilisé pour évaluer l'activité métabolique des cellules [224]. Quelle que soit la lignée cellulaire, les cellules ont été incubées avec une solution composée de 0,02 mg/mL d'AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific) dans du milieu de culture pendant 4 h à 37 °C. La densité optique a ensuite été mesurée avec une excitation à 570 nm et une émission à 590 nm avec un spectrophotomètre FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech). La valeur du blanc de référence (solution d'AlamarBlue sans contact avec les cellules) a ensuite été soustraite à celle des résultats obtenus.

II.4.5. Différenciation des précurseurs ostéoblastiques

Pour induire la différenciation des précurseurs ostéoblastiques en ostéoblastes, un milieu de différenciation a été utilisé. Celui-ci était composé de MEM- α complet sans FGF2, auquel avait été ajouté 100 nM de dexaméthasone (AppliChem), 10 mM de bêta-glycérophosphate (AppliChem) et 50 μ M de L-ascorbic acid (Sigma Aldrich). Les cellules ont étéensemencées à 25 000 cellules/cm² et cultivées dans des plaques 24 puits avec le milieu de différenciation (MD) renouvelé tous les trois jours pendant 21 jours. Pour le contrôle négatif, des précurseurs ostéoblastiques ont également été mis en culture avec du MEM- α complet et du FGF2. La différenciation des précurseurs ostéoblastiques a été évaluée à J7, J14 et J21 par coloration au rouge alizarine qui permet de mettre en évidence la matrice minéralisée caractéristique de la présence d'ostéoblastes matures.

II.4.6. Évaluation de la calcification par coloration au rouge Alizarine

Le rouge Alizarine est un colorant rouge couramment utilisé pour mettre en évidence les dépôts calciques par les ostéoblastes. La présence d'une matrice minéralisée traduit la différenciation complète des précurseurs en ostéoblastes mature [225]

Les cellules ont été fixées en les recouvrant pendant 10 min d'une solution de PBS 1X contenant 4 %vol. de paraformaldéhyde (PFA – Fisher bioreagent). Après trois lavages au PBS 1X, les cellules ont été mises en contact avec une solution aqueuse à 1 %m de rouge Alizarine à pH 4,2, pendant 30 min sous agitation constante. Les cellules ont ensuite été lavées cinq fois au PBS 1X dans le but d'éliminer les ions bivalents résiduels et les pigments non fixés. Les tapis cellulaires contenus dans les puits ont alors été observés en utilisant un microscope optique inversé Primovert (Zeiss). Les images ont été obtenues en utilisant un objectif x10 Achromat 10x/0,25 Ph1.

II.4.7. Dosage des cytokines par kit ELISA

Les quantités de cytokines libérées par les architectures ont été mesurées par kit ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Invitrogen) sandwich. Cette technique permet de doser une cytokine spécifique en solution. Le protocole complet du kit permettant de doser l'IFN- γ humain est présenté en Annexe 1. Cette technique de dosage repose sur l'utilisation de la loi de Beer-Lambert. Le kit utilisé comporte donc 6 solutions de calibrations dont les concentrations et les valeurs de densité optique sont connues. Ces concentrations vont de 0 à 30 pg/mL et permettent de tracer une droite d'étalonnage. Pour pouvoir déterminer de façon fiable la concentration en IFN- γ , il faut être dans le domaine linéaire de la gamme et donc que la concentration en IFN- γ dans les échantillons soit comprise entre 0 et 30 pg/mL. Pour s'assurer de cela, la quantité d'IFN- γ contenue dans les échantillons extraits du bioréacteur est évaluée au nanodrop. Il s'agit d'un spectromètre UV-visible capable de déterminer la quantité d'ADN, ARN ou de protéine contenue dans une goutte d'un échantillon. Cette approche permet de déterminer le facteur de dilution nécessaire pour que la quantité de cytokine contenue dans l'échantillon testé soit dans la gamme de détection du kit ELISA. Après incubation, la densité optique à 450 nm est lue dans chacun des puits avec un spectrophotomètre FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech).

II.5. Microbiologique

L'ensemble des expériences de microbiologie ont été réalisées en utilisant une souche bactérienne de collection de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Cette souche ne présente pas de résistance particulière à la pénicilline. La fiche produit complète est présentée en Annexe 1.

II.5.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

L'expérimentation visant à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) en vancomycine (Mylan) sur la souche bactérienne de collection de *Staphylococcus aureus* a été effectuée en milieu liquide. Elle permet de déterminer la concentration minimale en vancomycine permettant d'inhiber la croissance d'une souche bactérienne spécifique. Dans un premier temps, les bactéries ont été repiquées sur un milieu solide non sélectif (Difco I) pendant 24 h. L'inoculum bactérien a été préparé en resuspendant des colonies morphologiquement identiques dans un milieu de culture liquide (Difco III) pour obtenir une densité de $5 \cdot 10^5$ UFC³/mL. Cette densité a été contrôlée par mesure de la transmittance à

³ UFC : unité formant colonie. Il s'agit d'une unité utilisée en microbiologie pour quantifier le nombre de bactéries vivantes.

620 nm. Neuf millilitres de cette suspension ont alors été introduits dans des tubes en verre auxquels a été ajouté 1 mL d'une solution de vancomycine dissoute dans du PBS 1X. Les solutions de vancomycine ont été élaborées de façon à obtenir dans les tubes les concentrations finales suivantes : 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 et 6 µg/mL de vancomycine. Pour le contrôle positif, 1 mL de PBS 1X a remplacé la solution de vancomycine et pour le contrôle négatif, l'inoculum bactérien a été remplacé par du milieu de culture auquel a été ajouté 1 mL de PBS 1X. Les tubes ont ensuite été incubés pendant 24 h au bain-marie, sous agitation et à 37 °C. Le lendemain, les tubes sont examinés pour déceler la présence éventuelle d'un trouble, caractéristique du développement bactérien.

II.5.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide

Si la CMI permet d'évaluer l'effet bactériostatique de l'antibiotique, la concentration minimale bactéricide (CMB) sert à définir la quantité minimale en antibiotique permettant d'éliminer 99,99 % d'une population bactérienne. Par convention, les conditions testées sont celles au-dessus de la CMI. Pour cette expérience, un prélèvement avec une anse calibrée de 2 µL a été réalisé dans les tubes pour lesquels aucun développement bactérien n'a été observé lors du test de CMI. Les prélèvements ont alors été déposés en ligne sur une gélose tryptone soja agar (TSA) puis incubés pendant 24 h à 37 °C. L'effet bactéricide est avéré lorsqu'une diminution de 4 log du nombre de colonies est constatée. Une boîte de pétri de gélose TSA a donc été ensemencée comme témoin. Ce témoin est constitué de l'ensemencement en ligne de 4 dilutions en cascade (dilution au 1/10^e) de la suspension bactérienne de la CMI mimant ainsi une diminution de 1 log à 4 log du nombre de colonies. La dernière ligne de la boîte contrôle correspond à la dilution de 10⁻⁴ de la population bactérienne ce qui simule une diminution de 99,99% de la population bactérienne. Les résultats seront donc comparés à cette ligne pour déterminer la CMB.

II.5.3. Évaluation de l'efficacité de la vancomycine par antibiogramme

Pour évaluer l'efficacité de la vancomycine libérée par l'architecture placée dans le bioréacteur, un antibiogramme a été réalisé. Il s'agit d'une méthode semi-quantitative permettant de déterminer l'efficacité d'un antibiotique après sa diffusion en milieu gélosé contenant des bactéries. Après 24 h d'incubation, les boîtes présentent deux aspects : un aspect opaque synonyme du développement des bactéries et des cercles clairs et transparents autour de la zone de dépôt de l'antibiotique. Ces zones, aussi appelés cercles (ou zones) d'inhibition traduisent l'efficacité de l'antibiotique sur la souche bactérienne. Plus le cercle d'inhibition est grand, plus l'antibiotique est efficace sur la souche étudiée.

Dans le cadre de ces travaux, une suspension de *Staphylococcus aureus* à 40 % de transmittance à 620 nm est réalisée. 420 µL de cette suspension ont été ajoutés à 21 mL de milieu Difco III chaud (50 °C) contenant de l'agar-agar. Cette solution a été versée dans des boîtes de pétri pour obtenir une gélose solidifiée contenant les bactéries. Une fois la gélose solidifiée, des trous de 10 mm de diamètre y ont été effectués en utilisant un emporte-pièce dans lesquels 100 µL de chacun des échantillons extraits du bioréacteur ont été ajoutés. Le témoin positif était une solution à 10 µg/mL de vancomycine (100 µL) et le témoin négatif du PBS 1X (100 µL). Les boîtes de pétri ont été laissées 20 minutes à température ambiante pour permettre aux différentes solutions de diffuser dans la gélose évitant ainsi les risques de débordement des puits lors du déplacement des boîtes. Les boîtes ont ensuite été incubées pendant 24 h à 37 °C et les diamètres d'inhibition ont été mesurés le lendemain avec un Haloes Caliper (IUL caliper). Cet appareil se compose d'un pied à coulisse et d'une loupe, ce qui permet de mesurer précisément les diamètres d'inhibitions.

Chapitre III. Élaboration et caractérisation des substituts osseux

Au-delà de la composition, les substituts osseux utilisés doivent présenter une porosité spécifique. En effet, une microporosité de surface et une macroporosité comprise entre 300 μm et 600 μm permettent l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules à la surface du matériau [185]. Cette porosité multiéchelle servira également à la fonctionnalisation du matériau. La macroporosité permettra de charger l'hydrogel de vancomycine, la microporosité, quant à elle, servira à l'adsorption des cytokines.

Afin d'évaluer les cinétiques de libération de ces molécules actives en conditions dynamiques, les architectures doivent pouvoir être insérées dans la chambre interne du bioréacteur. Pour cela, leur taille ne doit pas dépasser 10 mm x 10 mm x 8 mm selon x, y et z. C'est pour respecter ce cahier des charges que la mise en forme des architectures par robocasting a été sélectionnée. Pour pouvoir imprimer des architectures par ce procédé, les poudres contenues dans les pâtes doivent, elles aussi, respecter un cahier des charges précis. En effet, Yang *et al.* ont démontré que pour assurer l'extrudabilité des filaments et éviter tout risque d'obstruction, le diamètre des particules de la charge céramique doit rester 50 fois inférieur au diamètre de la buse [226]. De plus, il est préférable que la distribution granulométrique des particules soit bimodale et large afin de faciliter le réarrangement des particules et donc l'écoulement de la pâte lors de l'extrusion [227].

Pour évaluer avec fiabilité l'impact de la porosité multi-échelle des architectures céramiques et méthode de fonctionnalisation sur les cinétiques de libération, les expériences doivent être répétées (triplicat) ce qui nécessite l'utilisation d'une grande quantité de substituts osseux. Sur le long terme, l'objectif est d'ajouter des cellules à la surface de ces substituts augmentant encore le nombre de pièces nécessaires (triplicat technique et biologique). Par ailleurs il est primordial que les architectures utilisées soient toutes identiques, tant en termes de composition que de forme (à l'exception de la microporosité dont l'impact a été étudié au cours de ces travaux), pour s'assurer que les variabilités de réponses observées ne soient pas liées au support.

Ce chapitre détaille les différentes étapes qui ont conduit à la mise en forme par micro-extrusion (ou *robocasting*) des architectures céramiques micro-macroporeuses qui ont été fonctionnalisées lors de ces travaux. La seconde partie est consacrée à la caractérisation de ces substituts osseux afin d'avoir une vue complète de leurs propriétés. La conclusion de ce chapitre reprend les principaux éléments qui permettront de mettre en regard leurs propriétés et les résultats concernant le chargement et la libération des molécules actives qui seront présentés dans les chapitres IV et V.

III.1. Élaboration des architectures

III.1.1. Préparation de la poudre céramique

III.1.1.1. Calcination des poudres

Les poudres brutes ont tout d'abord été calcinées pendant une heure à 1000 °C avec une rampe de montée en température de 5 °C/min sous air (four LH30-13, Nabertherm). Comme le montre les spectres FTIR avant et après calcination de la Figure 35, cette étape permet d'éliminer les résidus de synthèse tels que les groupements nitrates, dont la bande caractéristique est présente vers 1380 cm^{-1} et l'eau adsorbée (bande large à 3400 cm^{-1}).

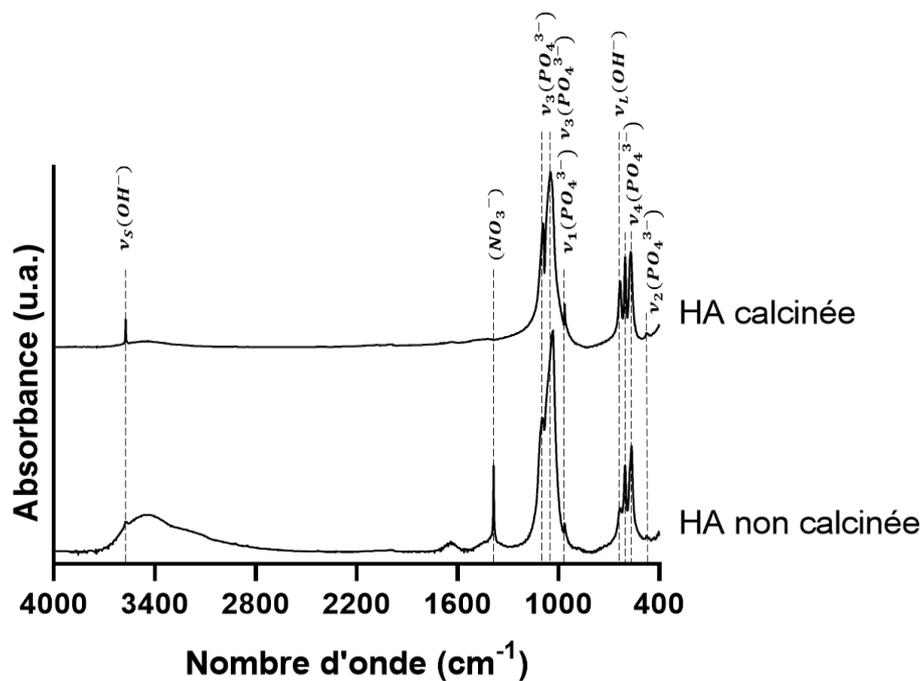


Figure 35 Spectres infrarouge caractéristiques d'une poudre d'HA avant et après calcination à 1000 °C – 1 h

III.1.1.2. Détermination du temps d'attrition optimal

Le diamètre de la buse de robocasting utilisée est de 600 μm , le diamètre maximum des particules ne doit donc pas excéder 12 μm . Après calcination, le D50 des particules est de 229,3 μm , la distribution n'est pas bimodale et la surface spécifique faible (Tableau 5 et Figure 36). La calcination de la poudre a entraîné une coalescence des particules d'HA ce qui sera contreproductif lors du frittage des architectures, la réactivité de la poudre étant alors limitée.

Tableau 5 Évolution du D10, D50 et D90 et de la surface spécifique des poudres d'HA calcinées en fonction du temps d'attrition

Temps	D 10 (µm)	D 50 (µm)	D 90 (µm)	Surface spécifique (m ² /g)
T0	17,3	229,3	805,3	5
1h	0,1	0,4	2,4	/
1h30	0,2	1,3	4,5	14
2h	0,2	1,8	4,8	/
3h	0,2	2,6	4,7	15

Un broyage de la poudre calcinée est alors nécessaire pour répondre au cahier des charges. Un suivi de la cinétique de broyage de la poudre calcinée a été réalisé afin de déterminer le temps d'attrition optimal pour diminuer suffisamment la taille des grains et ainsi augmenter la surface spécifique de la poudre afin d'en faciliter le frittage.

La poudre calcinée a été attritée à 1000 tr/min (attriteur NETZSCH R41-25/4) jusqu'à 3 h. Le broyage a été réalisé en condition aqueuse dans une jarre en téflon contenant 60 g de poudre d'HA calcinée, des billes de zircone de 1 mm de diamètre et 1 %m d'une solution aqueuse de polymétacrylate d'ammonium (Darvan® C-N, R.T. Vanderbilt, Norwalk, CT). Utilisé comme dispersant, le Darvan® améliore l'homogénéité de la poudre et limite la formation d'agglomérats. Des prélèvements ont été effectués à 1 h, 1 h 30, 2 h et 3 h. Les suspensions obtenues ont alors été séchées et tamisées à 80 µm avant de mesurer leur granulométrie ainsi que leur surface spécifique suivant les protocoles décrits dans le paragraphe II.2.5. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 36 et dans le Tableau 5.

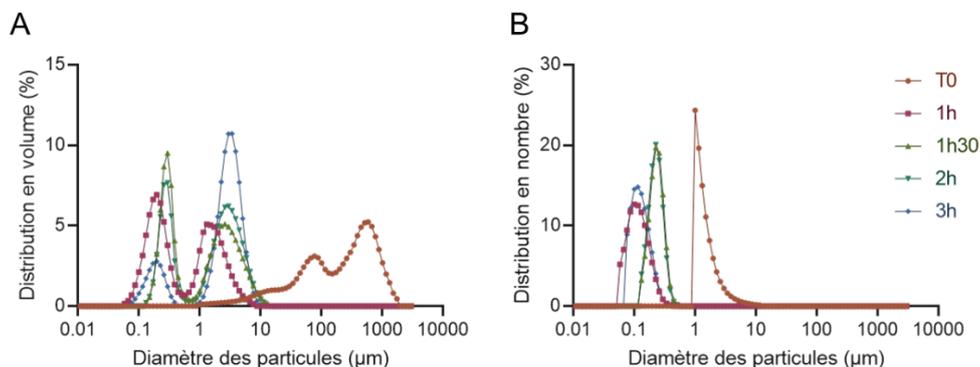


Figure 36 Évolution du diamètre des particules de la poudre d'hydroxyapatite calcinée en fonction du temps d'attrition.

A : distribution des particules en volume, B : distribution des particules en nombre.

D'après les résultats, 1 h d'attrition est suffisant pour obtenir une diminution significative de la taille des grains ($D_{90} < 3 \mu\text{m}$) et une distribution bimodale des particules d'HA (Figure 36. A). La présence des particules de grandes tailles (entre 1 et 10 μm) peut s'expliquer par la présence d'agglomérats, la distribution en nombre (Figure 36. B) témoignant principalement de la contribution de particules fines ($D < 1 \mu\text{m}$). Après 1 h 30 d'attrition, le diamètre médian des grains ne diminue plus. Au contraire, une légère hausse de celui-ci est observée : il augmente à 1,3 μm après 1 h 30 d'attrition et à 2,6 μm après 3 h. Cette variation reste faible et peut-être potentiellement due à une hétérogénéité de la suspension lors des prélèvements. Comme attendu, une augmentation de la surface spécifique est également observée, elle évolue de 5 m^2/g après calcination, à 15 m^2/g après 3 h d'attrition, mais la valeur de 14 m^2/g est atteinte dès 1 h 30 d'attrition. D'après l'ensemble de ces résultats, 1 h 30 d'attrition est le temps d'attrition optimal pour obtenir une poudre d'HA conforme au cahier des charges en termes de granulométrie et de réactivité.

III.1.1.3. Constitution du lot de poudre

Toutes les poudres d'HA utilisées pour conduire ces travaux ont été préparées selon le protocole présenté en Figure 37. Après calcination à 1000 °C durant 1 h, les poudres ont été attritées durant 1 h 30 à 1000 rpm avec des billes de zircone de 1 mm de diamètre et 1 %m d'une solution aqueuse de polymétacrylate d'ammonium (Darvan® C-N, R.T. Vanderbilt, Norwalk, CT). Les suspensions obtenues ont été tamisées à 600 μm , afin de récupérer les billes de zircone, puis ont été séchées à l'étuve à 100 °C pendant 24 h. Après séchage, les poudres ont été tamisées à 80 μm puis stockées dans un flacon hermétique jusqu'à utilisation.

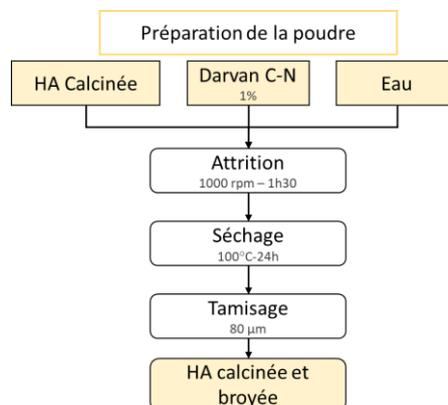


Figure 37 Organigramme du protocole d'attrition des poudres d'HA

Afin de limiter l'impact de la poudre sur la mise en forme des pièces, les poudres d'hydroxyapatite calcinées et broyées issues de 5 synthèses indépendantes ont été regroupées après leur caractérisation complète⁴. Le lot ainsi obtenu a été caractérisé une dernière fois pour s'assurer de sa pureté et connaître la granulométrie et la surface spécifique du lot de poudre. Les résultats sont présentés sur la Figure 38 et dans le Tableau 6. Ce lot (appelée « HA lot ») sera utilisé pour élaborer l'ensemble des pièces présentées lors de ces travaux.

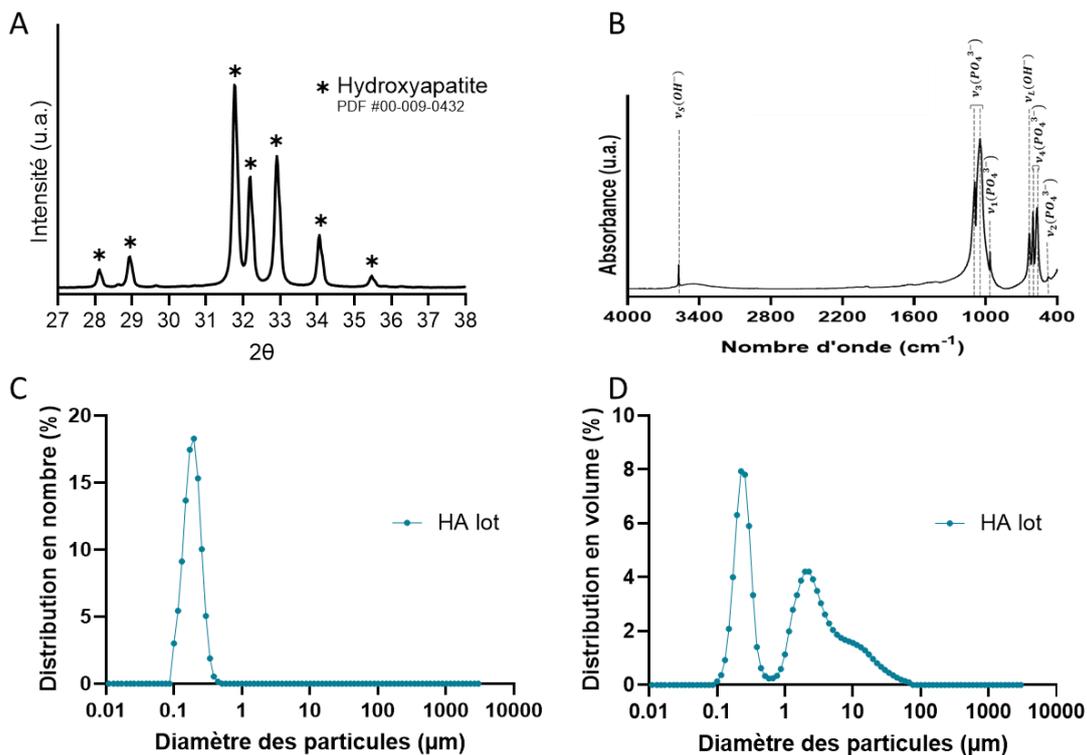


Figure 38 Caractéristiques du lot d'hydroxyapatite utilisé.

A : DRX du lot de poudre, B : FTIR du lot de poudre, C : Granulométrie en nombre du lot de poudre, D : Granulométrie en volume du lot de poudre.

Tableau 6 D10, D50, D90 et surface spécifique du lot de poudres utilisé lors de ces travaux

D 10 (μm)	D 50 (μm)	D 90 (μm)	Surface spécifique (m²/g)
0,2	1,4	10,0	13,7

⁴ Deux des 7 synthèses réalisées lors de ces travaux ont été utilisées en amont pour réaliser des expériences préliminaires de formulation des pâtes et de mise en forme des architectures.

III.1.2. Formulation de la pâte céramique

La mise en forme par micro-extrusion nécessite l'utilisation d'une pâte contenant la charge céramique. Dans ces travaux, la poudre calcinée et attritée a été mélangée à un hydrogel à base de méthylcellulose (noté M-hydrogel) pour former une pâte ayant des propriétés spécifiques. Pour pouvoir être extrudée correctement, cette pâte céramique doit être fortement rhéofluidifiante, c'est-à-dire avoir une viscosité faible lors de l'application d'une contrainte. Une fois le filament extrudé, l'absence de contrainte entraîne une augmentation de la viscosité de la pâte ce qui facilite le maintien de la structure ainsi imprimée. La pâte doit également présenter des propriétés plastiques pour assurer la cohésion et la flexibilité des filaments afin éviter qu'ils ne cassent lors de l'impression. Par conséquent, la maîtrise de la formulation de la pâte d'hydroxyapatite est une condition *sine qua non* au bon déroulement de l'impression des architectures [198], [228].

III.1.2.1. Formulation du M-hydrogel

La formulation de l'hydrogel permettant d'élaborer la pâte d'HA a fait l'objet d'une étude préliminaire au sein du laboratoire. La formulation utilisée lors de ces présents travaux était de 4 %m d'agent gélifiant (méthylcellulose - Methocel™ E4M, Colorcon) pour 96 %m d'eau. Du Darvan® C-N (Vanderbilt Minerals) était également ajouté en fonction de la surface spécifique de la poudre d'HA de façon à obtenir une quantité finale, dans la pâte, de 1,3 milligrammes de Darvan® C-N (Vanderbilt Minerals) par m² de poudre (1,3 mg/m²).

Le schéma du protocole de formulation de l'hydrogel de méthylcellulose (M-hydrogel) est présenté sur la Figure 39. D'un point de vue pratique, le Darvan® C-N est ajouté à l'eau puis la solution est placée sous agitation à 100 rpm sur une plaque chauffante. Une fois que la température de la solution a atteint 60 °C, la vitesse d'agitation est augmentée à 250 rpm et le Methocel™ E4M est ajouté progressivement. Lorsque la totalité du Methocel™ a été ajoutée, l'agitation est diminuée à 100 rpm, mais la température est maintenue à 60 °C. Au bout de 30 min, le chauffage est coupé et l'agitation est maintenue à 100 rpm jusqu'à ce que la température du M-hydrogel soit inférieure à 30 °C. Le M-hydrogel est ensuite recouvert de Parafilm M avant d'être placé à 4 °C pendant 24h pour dégazer.

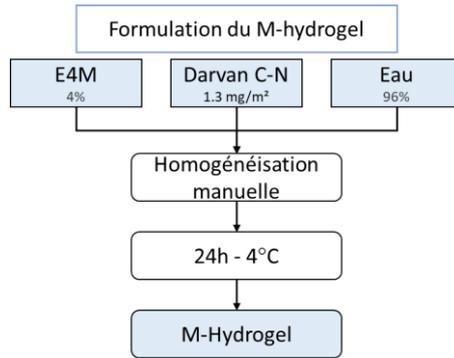


Figure 39 Organigramme des différentes étapes de formulation du M-hydrogel

III.1.2.2. Formulation de la pâte

La pâte a été formulée à partir du M-hydrogel auquel est ajouté la poudre issue du lot présenté dans le paragraphe III.1.1.3 (« HA lot »). Pour cela, le M-hydrogel est placé dans un bécher, l'HA ($m = 9,6 \text{ g}$) est alors ajoutée progressivement et le mélange est homogénéisé manuellement à l'aide d'une spatule (Figure 39). Une fois la totalité de la poudre incorporée, un agent flocculant, le polyéthylèneimine (PEI - Sigma Aldrich), est ajouté à la pâte à hauteur de 3% de la masse de poudre (soit 0,3 g). Il est communément utilisé dans les pâtes à base de phosphate de calcium destinées à la mise en forme par *robocasting* afin d'ajuster le comportement viscoélastique de la pâte [229]. En effet, l'ajout de PEI augmente la contrainte seuil associée à la limite d'élasticité de la pâte. La pâte obtenue est ensuite passée trois fois au broyeur tricylindre (EXAKT 50, Teningen-Köndringen, Allemagne) afin de casser les agglomérats et éliminer les bulles d'air sans assécher la pâte. Enfin, la pâte d'HA est enveloppée dans du Parafilm M pour éviter qu'elle ne sèche, et est placée à 4 °C pendant 24 h.

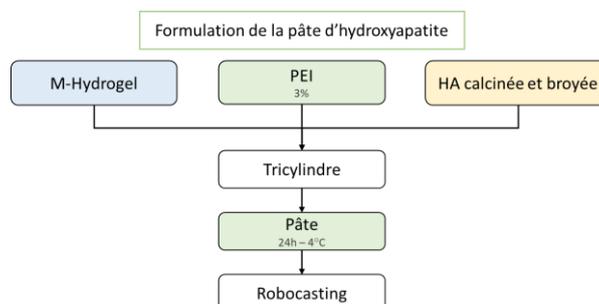
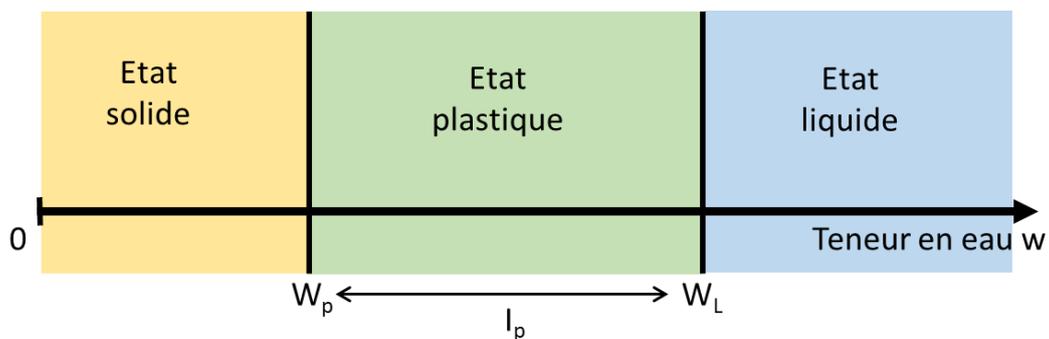


Figure 40 Organigramme des différentes étapes de formulation de la pâte céramique

III.1.2.3. Détermination du taux de chargement

Pour limiter le retrait des pièces et favoriser la densification des pièces au frittage, le taux de chargement en HA doit être maximisé [198]. Lors de précédents travaux, le taux de chargement avait été fixé à 50 %v pour un diamètre de buse de 400 μm . Cependant, les contraintes associées au chargement des architectures avec l'hydrogel de vancomycine ont nécessité l'utilisation d'une buse de 600 μm (la fonctionnalisation des architectures par de la vancomycine sera décrite dans le chapitre suivant). Le taux de chargement en poudre a donc été revu afin de pouvoir imprimer des pièces convenables sans revoir entièrement la formulation du M-hydrogel.

Pour pouvoir être extrudée, la pâte doit présenter des propriétés plastiques, ce qui implique une forte teneur en eau dans les pâtes [230]. Initialement développées pour évaluer la consistance des sols, les limites d'Atterberg peuvent être appliquées au comportement des pâtes pour la micro-extrusion (Figure 41). Elles permettent de déterminer les valeurs limites de plasticité (W_P) et de liquidité (W_L) de l'indice de plasticité I_p d'un matériau donné [231]. Dans le cadre de la formulation de pâtes, elles permettent de déterminer le seuil pour lequel la pâte est trop sèche et ne peut s'écouler, mais également le seuil pour lequel la pâte est trop liquide pour pouvoir être mise en forme. Pour que les pâtes d'HA soient imprimables par microextrusion, elles doivent donc être dans le domaine plastique I_p qui est la différence entre les domaines de liquidité et de plasticité ($I_p = W_L - W_P$).



La détermination des valeurs limites de plasticité (W_P) et de liquidité (W_L) nécessite l'utilisation d'une grande quantité de pâte et donc de poudre d'HA. Dans le but de réduire la consommation de poudre, l'imprimabilité des pièces en fonction du taux de chargement a été déterminée empiriquement avec les taux de chargements en HA suivants : 52 %v, 50 %v, 47 %v, 46 %v,

44 %v et 42 %v. L'incidence du taux de chargement sur l'imprimabilité des pièces est illustrée en Figure 42.

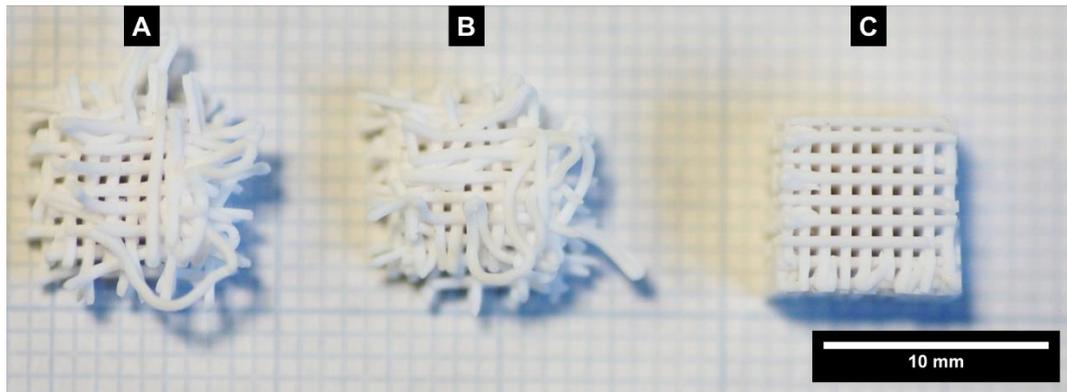


Figure 42 Photographies illustrant l'incidence du taux de chargement en poudre d'HA sur la tenue des architectures crues (vue de dessus).

A : taux de chargement de 52 %v, pâte trop sèche, B : taux de chargement de 44 %v, pâte trop humide, C : taux de chargement de 47 %v, correspond à une impression correcte de la pièce après avoir retiré les filaments excédentaires par polissage.

Pour les taux de chargement supérieurs ou égaux à 50 %v, la pâte est trop sèche : les filaments sont cassants et les couches n'adhèrent pas entre elles (Figure 42. **A**). Par ailleurs, de nombreuses pièces ne peuvent pas être achevées en raison d'une obstruction de la buse. En dessous de 46 %v, la pâte est trop liquide. Les filaments ont un comportement élastique et ne se rompent pas en fin de ligne, ils sont donc entraînés par la buse tout au long de l'extrusion ce qui conduit à la formation d'une « pelote » (Figure 42. **B**). Seuls les taux de chargement de 46 %v et 47 %v permettent l'obtention de pièces conformes, c'est-à-dire présentant une structure cubique en treillis (Figure 42. **C**). Cependant, la mise en forme des pièces semble davantage reproductible avec un taux de chargement en HA de 47 %v. En effet, avec un taux de chargement de 46 %v, les filaments ne sont pas toujours coupés en fin de course de la buse, ce qui entraîne un dépôt de matière supplémentaire notamment lors du déplacement de la buse entre deux couches ce qui obstrue certains pores. Par conséquent, un taux de chargement de 47 %v a été retenu et utilisé pour mettre en forme l'ensemble des architectures utilisées lors de ces travaux.

III.1.2.4. Rhéologies de la pâte céramique

Une fois la formulation des pâtes définie, des mesures rhéologiques en oscillation ont été réalisées en utilisant les protocoles décrits dans le paragraphe II.2.7.1. L'analyse avec

balayage en amplitude est présentée en Figure 43. La région linéaire de viscoélasticité (ou LVER pour *Linear Viscoelastic Region*.) se situe dans un intervalle de contrainte oscillatoire allant de 10^2 à 10^4 Pa environ (courbe en rouge sur la Figure 43). Dans ce domaine, les modules de conservation G' et de perte G'' valent respectivement $2 \cdot 10^7$ Pa et 10^8 Pa. G'' étant supérieur à G' dans la LVER, cela signifie qu'en dessous d'une contrainte de 10^4 Pa la pâte se comporte comme un solide. Pour que la pâte puisse être extrudée, il faut que la pression d'extrusion soit supérieure à 10^4 .

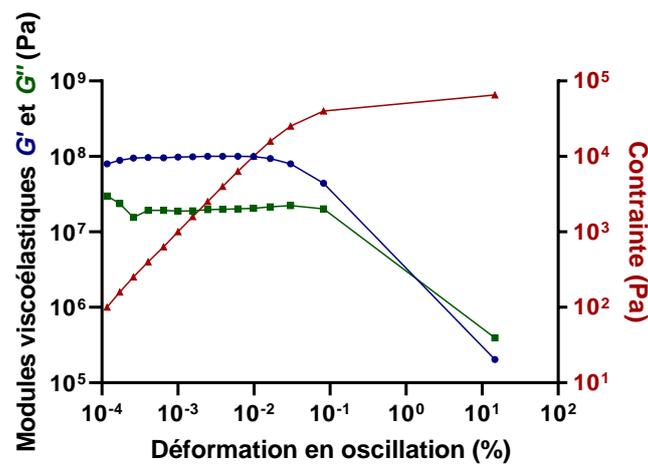


Figure 43 Rhéologies en oscillation avec balayage en amplitude des pâtes d'hydroxyapatite. Les modules élastique G' (en Pa, courbe bleue), et visqueux G'' (en Pa, courbe verte) et la contrainte τ (en Pa, courbe rouge) sont donnés en fonction de la déformation en oscillation (en %).

Dans un second temps, une analyse oscillatoire avec balayage en fréquence a été réalisée. Le protocole est décrit dans le paragraphe II.2.7.1. Pour cette analyse, la contrainte d'oscillation a été fixée à 1500 Pa, soit dans le LVER afin de pouvoir évaluer la rhéologie de la pâte au repos. Les résultats sont présentés en Figure 44.

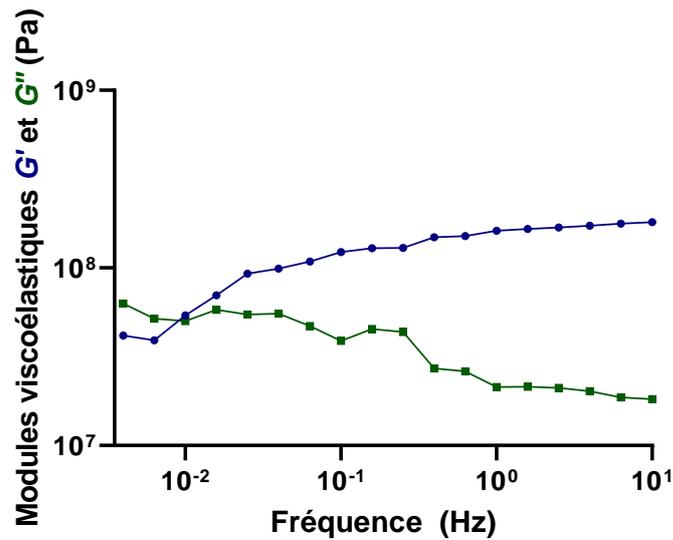


Figure 44 Rhéologies en oscillation avec balayage en fréquence à 1500 Pa des pâtes d'hydroxyapatite. Les modules élastique G' (en Pa, courbe bleue), et visqueux G'' (en Pa, courbe vert) sont donnés en fonction de la fréquence (en Hz).

À une fréquence d'oscillation de 10 Hz, les valeurs des modules viscoélastiques G' et G'' sont du même ordre de grandeur que ceux mesurés lors de la précédente expérience. Cependant, le module de conservation G' diminue progressivement avec la diminution de la fréquence. À l'inverse, le module de perte G'' augmente avec la diminution de la fréquence. À partir de 10^{-2} Hz, les valeurs de G' sont inférieures à celles de G'' . Cela signifie que lorsque la pâte est au repos au-delà de 100 secondes, le comportement liquide prédomine, ce qui peut entraîner une perte de structure de celle-ci. Ce comportement peut être problématique, car il est possible que les pièces imprimées perdent leur structure ou s'affaissent si elles ne sont pas séchées rapidement après impression.

III.1.2.5. Conclusion sur la formulation des pâtes

L'utilisation d'une pâte contenant 47 %v d'HA permet d'imprimer de façon reproductible des substituts osseux ayant une structure cubique, le M-hydrogel à 4 %m de méthocel permettant d'obtenir les propriétés rhéologiques nécessaires à l'extrusion des pâtes (comportement rhéofluidifiant). Par conséquent, l'ensemble des architectures utilisées lors de ces travaux ont été obtenues conformément au schéma présenté en Figure 45 qui résume l'ensemble du protocole mis en place et utilisé.

Pour un taux de chargement de 47 %v d'HA, chaque pâton est obtenu en mélangeant 3,74 g de M-hydrogel, 0,3 g de PEI et 9,6 g de poudre d'HA calcinée et broyée. Le nombre de pâtons utilisés lors d'une campagne d'impression varie en fonction du nombre de pièces souhaitées.

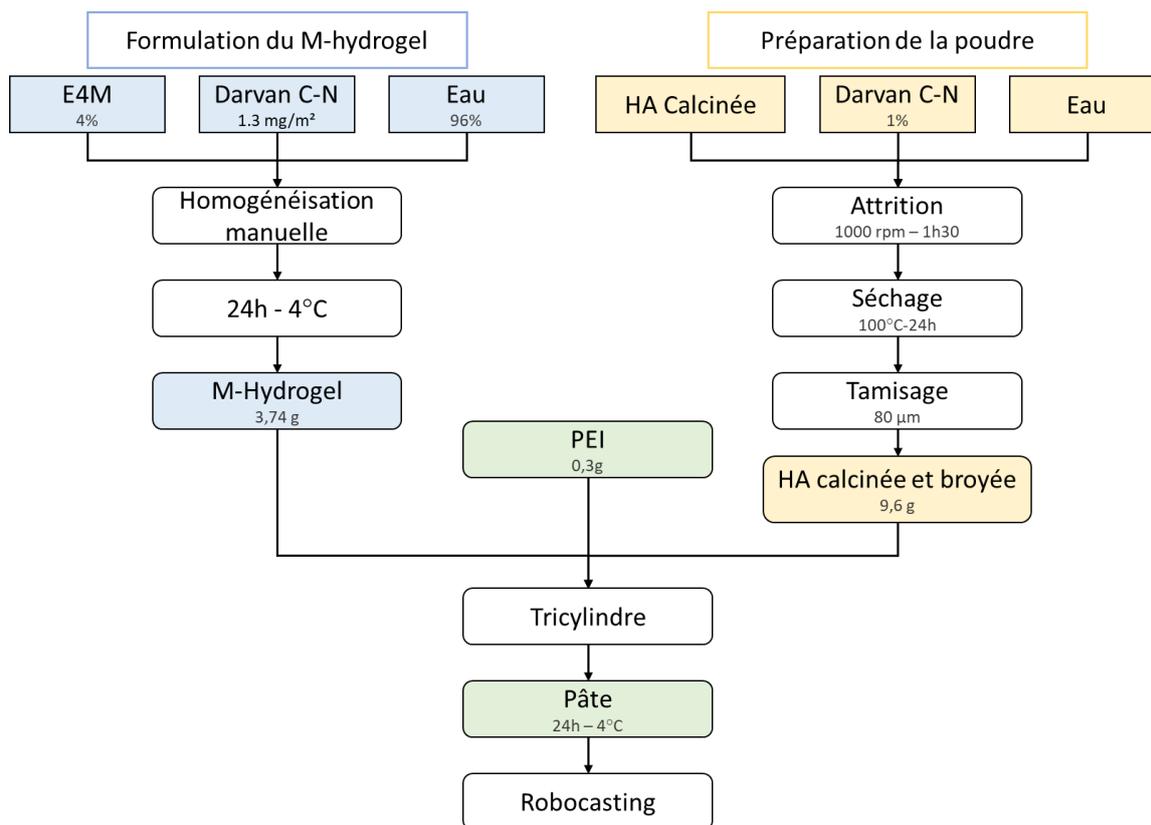


Figure 45 Organigramme des différentes étapes de préparation des poudres d'hydroxyapatite, de formulation et de travail des pâtes céramiques jusqu'à leur mise en forme par micro-extrusion.

III.1.3. Mise en forme par robocasting

Le schéma illustrant les différentes étapes permettant d'imprimer des pièces par micro-extrusion est présenté en Figure 46. Dans un premier temps, une modélisation de l'objet 3D (c'est-à-dire la pièce à extruder) a été réalisée en utilisant un logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO) (Figure 46. Étape 1). Il permet de définir la forme cubique de la pièce et sa structure en treillis. Ce modèle 3D a ensuite été découpé par un script développé en langage Python par Vincent Pateloup (Enseignant-chercheur à l'IRCER) (Figure 46. Étape 2). Comme les autres logiciels « *slicers* » couramment utilisés, ce script permettra de générer un G-code. L'intérêt de l'utilisation d'un script Python repose sur sa grande versatilité. La modification des paramètres d'initialisation permet d'adapter les conditions de dépôt en fonction du besoin (changement du diamètre de la buse, de la taille du réservoir, du diamètre du piston, des dimensions de la pièce...). Dans le cadre de ces travaux, ce script a été utilisé pour définir le nombre, la longueur et l'espacement des filaments au sein d'une même couche, mais aussi le nombre et l'épaisseur de chacune de ces couches. Le trajet optimal de

déplacement de la buse a donc été calculé par le script python. Ces déplacements vont ensuite être exprimés sous forme d'un G-code éditable qui contrôlera directement les mouvements de la buse et donc l'impression de la pièce (Figure 46. Étape 3 et 4).

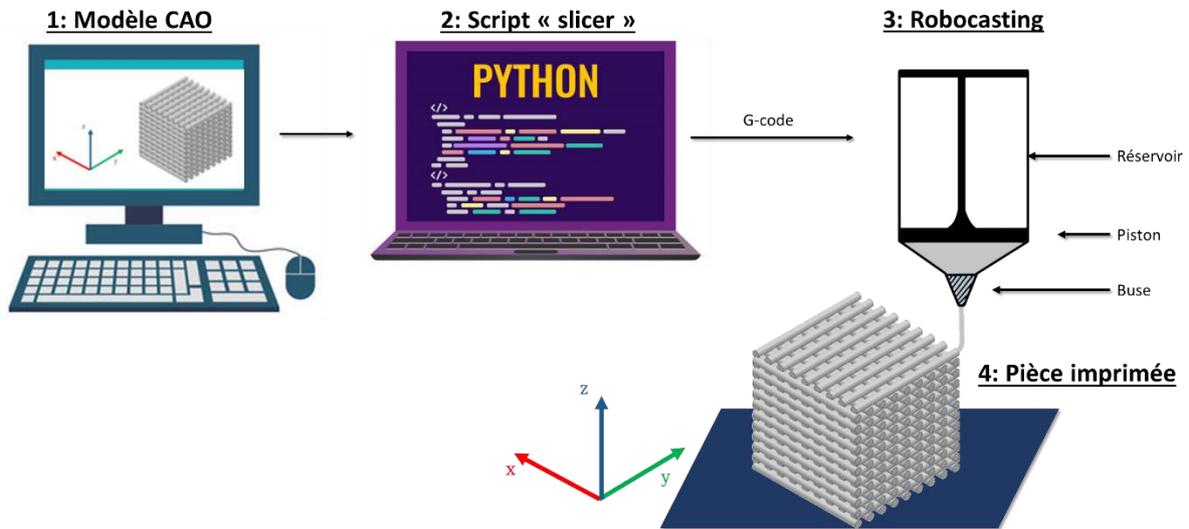


Figure 46 Schéma des différentes étapes du processus d'impression des pièces de la conception du modèle 3D à la réalisation de l'architecture.

Dans le but d'obtenir des substituts osseux micro-macroporeux en hydroxyapatite pouvant être fonctionnalisés tout en permettant l'adhésion et la prolifération des cellules à leurs surfaces, le choix s'est porté sur la mise en forme de structure cubique d' 1 cm^3 (dimension de la chambre interne du bioréacteur) présentant un maillage macroporeux. Pour cela, une buse conique en acier inoxydable et ayant un diamètre interne de $600\text{ }\mu\text{m}$ a été sélectionnée. En plus de conditionner la taille des filaments, la forme et la composition de la buse permettent respectivement de réduire la pression d'extrusion et de limiter l'abrasion de la buse par les particules céramiques [232].

Pour répondre aux besoins importants en termes de nombre de pièces, une micro-extrudeuse avec un réservoir plus important a été acquise dans le cadre de ces travaux. La transition entre ces deux micro-extrudeuse a nécessité de modifier les paramètres d'impression. Cela a également permis de déterminer les paramètres optimaux permettant l'impression de substituts osseux reproductibles. Pour simplifier la transition, la modification des paramètres d'impression a été effectué à formulation de pâte constante (paragraphe III.1.2).

III.1.3.1. Conception des pièces par CAO

Le modèle CAO utilisé pour ces travaux est illustré en Figure 47. Chaque couche est constituée de filaments parallèles entre eux et perpendiculaires à ceux de la couche précédente afin d'obtenir une structure 3D en treillis, possédant la macroporosité nécessaire à l'adhésion et à la prolifération des cellules de la niche osseuse et à la fonctionnalisation des pièces. La distance entre les centres de deux filaments consécutifs est égale à 2 fois le diamètre de la buse (1,2 mm) et la distance séparant deux filaments est égale au diamètre de la buse, soit 600 μm (0,6 mm). Afin d'assurer la cohésion de la pièce et de permettre aux différentes couches d'adhérer les unes aux autres ainsi qu'au support, il est nécessaire de définir une hauteur d'écrasement intercouche. Celle-ci a été fixée à 75 % du diamètre de la buse soit 0,45 mm. Cet écrasement a pour conséquence de tasser légèrement la pièce et donc de réduire sa hauteur de 25 %. D'après le modèle CAO utilisé, les dimensions des architectures imprimées seront de 10 mm x 10 mm x 7,5 mm (soit 750 mm³), ce qui correspond aux dimensions de la chambre interne du bioréacteur (10 mm x 10 mm x 8 mm, soit 800 mm³).

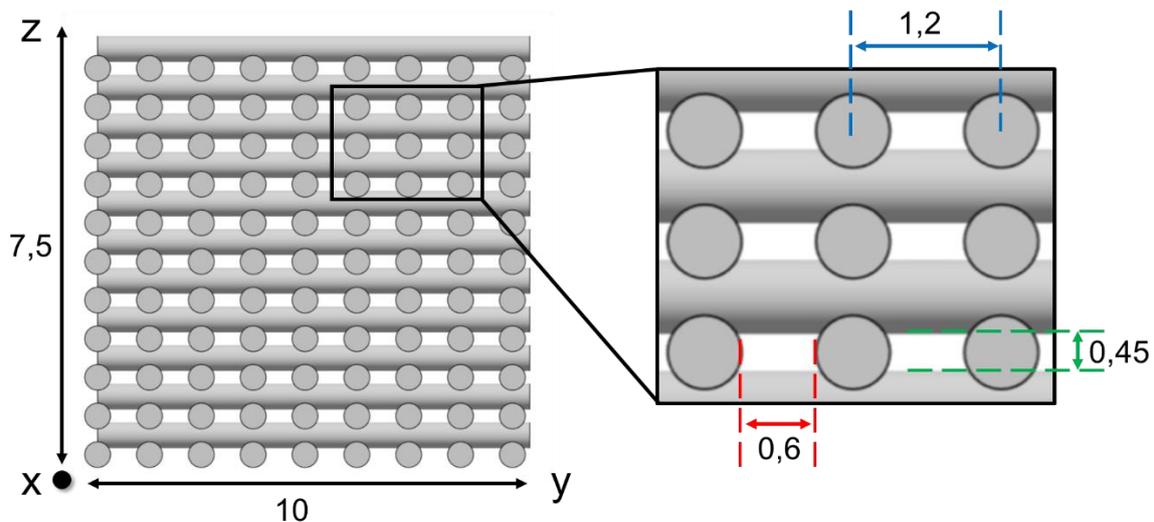


Figure 47 Modèle CAO généré pour obtenir une structure 3D de type « cage » avec une buse de 600 μm (unités en mm)

III.1.3.2. Caractéristiques des micro-extrudeuses

L'optimisation de la formulation de la pâte ainsi que les premiers essais d'extrusion décrits précédemment (III.1.2) ont été faits en utilisant une micro-extrudeuse STEPCRAFT (STEPCRAFT GmbH & Co. KG, Menden, Germany), constituée d'une tête d'extrusion conçue

au laboratoire IRCER, se déplaçant selon les axes x, y et z. Cette dernière est pilotée par un programme G-code (développé par Vincent Pateloup puis adapté par l'équipe biocéramique) exécuté par le logiciel WINPC-NC (STEPCRAFT GmbH & Co. KG, Menden, Germany). Bien que placé dans une chambre en Plexiglas, l'ensemble du système ne permet pas un contrôle précis et satisfaisant des paramètres atmosphériques tels que l'humidité relative de l'enceinte et la température dans la chambre d'impression, ce qui impacte la reproductibilité de mise en forme des pièces. De plus, cette machine dispose d'un réservoir de faible contenance, avec un diamètre interne de 6 mm et une longueur de 60 mm. Le volume du réservoir est donc de 1695 mm^3 ($1,695 \text{ cm}^3$), ce qui permet de placer 1/3 d'un pâton dans le réservoir, et d'imprimer 3 pièces. L'utilisation de cette micro-extrudeuse implique donc un démontage et un nettoyage fréquent de la tête d'extrusion (3 cycles de remplissage du réservoir pour l'impression d'un pâton).

Afin de pallier ces inconvénients, l'équipe Biocéramiques a acquis dans le cadre du projet ANR Funmodular une nouvelle micro-extrudeuse (ID-conception, France) disposant d'un réservoir de plus grande capacité permettant l'impression d'un grand nombre de pièces en une seule campagne. De plus, celle-ci est placée à l'intérieur d'une chambre fermée et dispose d'un système permettant la régulation en température et en humidité relative à l'intérieur de l'enceinte. La maîtrise du taux d'humidité relative lors de l'impression permet de s'assurer que la teneur en eau dans la pâte est suffisante pour conserver son comportement plastique. Enfin, elle est équipée d'une platine Peltier au niveau de la zone d'extrusion et de deux buses ayant deux réservoirs distincts de capacité plus importante, permettant à terme, l'impression de bi-matériaux. Avec un diamètre interne de 20 mm et une longueur de 120 mm, les réservoirs présentent un volume total de $37\,680 \text{ mm}^3$ ($37,68 \text{ cm}^3$). L'ensemble du dispositif est présenté en Figure 48 et le Tableau 7 compare les caractéristiques des deux micro-extrudeuses utilisées lors de ces travaux.



Figure 48 Photographie de la micro-extrudeuse ID-conception utilisée durant ces travaux

Tableau 7 Récapitulatif des caractéristiques des deux micro-extrudeuses utilisées

Paramètres	Ancienne micro-extrudeuse (STEP-CRAFT)	Nouvelle micro-extrudeuse (ID-conception)
Taille de la buse (μm)	600	600
Diamètre interne du réservoir (mm)	6	20
Longueur du réservoir (mm)	60	120
Volume du réservoir (cm^3)	1,7	37,7
Contrôle de la température de la chambre d'impression ($^{\circ}\text{C}$)	Non	Oui
Contrôle de l'humidité relative dans la chambre d'impression (%)	Non	Oui
Contrôle de la température du support d'impression ($^{\circ}\text{C}$)	Non	Oui

III.1.3.3. Ajustement du protocole d'impression

Le passage d'une micro-extrudeuse à l'autre a nécessité d'ajuster le protocole d'impression. Cela comprend la modification du G-code et la modulation des paramètres d'impressions tels

que la vitesse d'extrusion et de déplacement de la buse. Il a également fallu fixer la température de la platine Peltier ainsi que la température et l'humidité relative dans l'enceinte d'impression. Cette mise au point a pour objectif de déterminer les paramètres optimaux permettant l'impression de pièces reproductibles conformes au cahier des charges fixé.

Pour chacun des essais, la capacité à obtenir une pièce « conforme » a été évaluée. Une pièce est considérée comme conforme s'il ne manque aucun filament, s'ils sont bien parallèles les uns avec les autres au sein d'une même couche et si les couches s'empilent selon une rotation de 90 °C sans présenter de translation selon les axes x, y ou z. De plus, l'absence de filaments excédentaires liés aux déplacements de la buse entre deux couches ou l'affaissement de l'architecture ont également été surveillés pour être sûr qu'aucun des macropores n'était obstrué.

III.1.3.3.1. Modification du G-code initial

Dans un premier temps il a fallu modifier le G-code, car le langage de programmation est légèrement différent entre les deux équipements. De plus, les fonctions d'initialisation (fonction de préparation et fonction d'appels) ainsi que les fonctions de terminaisons sont propres à chaque machine.

Les fonctions d'initialisation permettent de définir les coordonnées de départ de l'impression, mais également de paramétrer la température de la platine Peltier et la température à l'intérieur de la chambre. Concernant l'humidité relative dans l'enceinte d'impression, celle-ci est contrôlée par un capteur d'humidité relative connecté à un humidificateur placé dans l'enceinte. L'humidité relative n'est donc pas contrôlée par le G-code. L'initialisation sert également à l'amorçage de la pâte, c'est-à-dire à l'extrusion d'une petite quantité de pâte pour s'assurer que celle-ci est bien à l'affleurement de la buse, ce qui limite la présence de défaut sur la première couche d'impression des architectures.

Les fonctions de terminaisons quant à elles, servent à programmer les actions de la buse une fois l'impression de la pièce terminée. Il est ainsi possible de programmer plusieurs impressions à la suite les unes des autres ou d'initier l'arrêt de la micro-extrudeuse en déplaçant la buse jusqu'à sa position d'origine générale (position d'origine machine). Il est également possible de remonter le piston servant à extruder la pâte et d'éteindre le système de chauffe au sein de l'enceinte (radiateur) et la platine Peltier (Figure 48).

III.1.3.3.2. Détermination des paramètres d'extrusion

Une fois le G-code établi et fonctionnel, les paramètres d'impression permettant d'obtenir des pièces reproductibles ont pu être déterminés. La vitesse d'extrusion, la température de la

platine Peltier ainsi que la température et l'humidité relative dans la chambre d'impression ont été modulées. En effet, la vitesse d'extrusion permet de faire varier la quantité de matière déposée et les variations de température et d'humidité relative facilitent l'impression des pièces en limitant le séchage de la pâte durant la session d'impression.

Avant l'impression, la pâte d'HA est compactée manuellement dans le réservoir pour évacuer les bulles d'air, lequel est ensuite fixé sur la tête d'extrusion. Pour que les pièces puissent être imprimées convenablement, il faut que la première couche adhère au support. Le choix du support est donc particulièrement important, car il doit posséder une surface la plus plane possible sans augmenter la vitesse de séchage. Il doit par ailleurs pouvoir être retiré facilement une fois la pièce sèche pour ne pas risquer de l'endommager. D'après la littérature, les feuilles d'acétate présentent les caractéristiques requises pour servir de support à l'impression des architectures [233].

Les premiers essais d'impressions ont été réalisés en conservant les mêmes conditions que ceux utilisés sur la précédente micro-extrudeuse (STEP-CRAFT), c'est-à-dire une vitesse d'impression de 4 mm/s et sans contrôle de l'humidité relative et de la température (Tableau 8 – expérience n°1). Cette expérience a permis de définir les paramètres de référence à modifier dans le but d'obtenir des pièces reproductibles. Avec ces paramètres, il est impossible d'obtenir des architectures, car la pression exercée par le piston de la nouvelle machine n'est pas suffisante pour extruder la pâte.

D'après le script Python utilisé, la vitesse de déplacement de la buse est calculée pour être proportionnelle à la vitesse de déplacement du piston, qui elle-même dépend du diamètre du piston. Cela permet de garantir l'impression de filaments homogènes et uniformes. Pour augmenter la force exercée par le piston sur la pâte, il suffit donc d'augmenter la vitesse d'impression, ce qui évite d'avoir à modifier le G-code.

Les paramètres à déterminer sont donc la vitesse d'impression, les températures (Peltier et enceinte) et le taux d'humidité relative permettant d'imprimer des pièces conformes. L'ensemble des expériences conduites et les paramètres utilisés pour chacune d'elles sont récapitulés dans le Tableau 8.

Tableau 8 Plan d'expérience permettant de définir les paramètres optimaux pour l'impression de pièces en hydroxyapatite. n.c. : paramètres non contrôlés durant l'impression

Expériences n°	Vitesse d'extrusion (mm/s)	Température (°C)		Humidité relative dans la chambre (%)	Machine utilisée
		Peltier	Chambre		
1	4	n.c.	n.c.	n.c	1
2	5	n.c.	n.c.	50	2
3	5	n.c.	n.c.	60	2
4	6	n.c.	n.c.	60	2
5	7	n.c.	n.c.	60	2
6	9 – 7*	n.c.	n.c.	60	2
7	10 – 7*	n.c.	n.c.	60	2
8	12	n.c.	n.c.	60	2
9	7	n.c.	n.c.	80	2
10	7	15	20	60	2
11	7	15	20	70	2
12	7	15	15	70	2

L'humidité relative dans la chambre est le seul paramètre qui n'est pas contrôlé par le G-code, mais par un contrôleur d'humidité paramétré de façon indépendante.

* : Les deux premières couches ont été imprimées respectivement à 9 mm/s et 10 mm/s, les autres couches à 7 mm/s

III.1.3.3.3. Impact de la vitesse d'extrusion

Les vitesses d'extrusion inférieures ou égales à 6 mm/s ne permettent pas d'obtenir des pièces utilisables, quel que soit le pourcentage d'humidité relative dans la chambre (Tableau 8 – expériences n°2 à 4). Néanmoins, l'augmentation du taux d'humidité dans la chambre, à vitesse constante, semble faciliter l'extrudabilité de la pâte (Tableau 8 – expériences n°2 et 3).

À taux d'humidité constant, une augmentation de la vitesse d'extrusion favorise l'extrusion des filaments et facilite l'adhésion de la première couche sur la feuille d'acétate (Tableau 8 – expériences n°4 et 5).

Plusieurs essais ont été réalisés en augmentant de façon significative la vitesse d'impression que ce soit pour les premières couches (Tableau 8 – expériences n°6 et 7) ou pour l'ensemble de la pièce (Tableau 8 – expérience 8) dans le but de définir la vitesse optimale permettant

l'adhésion de la première couche et l'obtention d'une pièce conforme. Même si l'extrusion et l'adhésion des filaments sont améliorées de façon significative, l'augmentation de la vitesse d'extrusion (passage de 7 mm/s à 12 mm/s) entraîne une augmentation de la quantité de matière déposée ce qui déforme les filaments comme l'illustre la Figure 49 présentant une pièce obtenue avec une vitesse d'extrusion de 12 mm/s. De plus, les filaments de cette pièce sont étalés obstruant ainsi partiellement ou complètement les macropores. L'influence de la vitesse d'extrusion sur la déformation des filaments est un aspect qui a déjà été observé et qui est décrit dans la littérature [234]. Pour obtenir des pièces utilisables, il faut donc trouver un compromis : la vitesse d'extrusion doit être suffisante pour permettre l'adhésion de la première couche, sans être trop importante pour ne pas déformer les filaments. Par ailleurs, la déformation du filament le rend plus difficile à couper, ce qui entraîne un dépôt supplémentaire de matière lors du déplacement de la buse entre deux couches.

Une vitesse d'extrusion de 7 mm/s a donc été retenue pour imprimer une pièce convenablement sans déformer les filaments et ne pas obstruer les macropores.

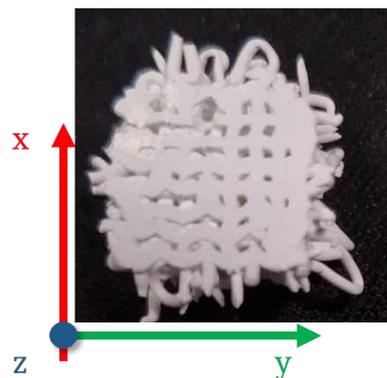


Figure 49 Illustration d'une pièce imprimée avec une vitesse d'extrusion de 12 mm/s (vue de dessous).

III.1.3.3.4. Impact du taux humidité

Pour définir le taux d'humidité relative optimal, différents taux d'humidité ont été évalués : 50 %, 60 %, 70 % et 80 %. Comme mentionné précédemment, l'humidité à l'intérieur de la chambre est le seul paramètre qui n'est pas contrôlé directement par le G-code, mais par un contrôleur d'humidité (Inkbird IHC-200 - Figure 48) connecté à un humidificateur (Inkbird Plus), sur lequel est fixé le pourcentage d'humidité à maintenir dans l'enceinte.

À 50 % d'humidité relative, la pâte sèche très rapidement dans le réservoir, par conséquent il est presque impossible d'extruder des filaments de pâte. C'est seulement à partir de 60 %

d'humidité relative qu'il est possible d'imprimer des pièces convenables et de façon répétées (Tableau 8 – expériences n°2 à 8).

Le volume du réservoir de la nouvelle micro-extrudeuse permet de charger simultanément jusqu'à 7 pâtons entiers, soit l'équivalent de 50 pièces environ, mais cela augmente considérablement le temps d'impression et laisse donc le temps à la pâte dans le réservoir, ainsi qu'aux pièces imprimées, de sécher. Pour pallier ce dessèchement, l'humidité relative au sein de la chambre d'impression a été augmentée (Tableau 8 – expériences n°5, 9, 10 et 11).

D'après les résultats présentés précédemment, l'augmentation de l'humidité relative dans l'enceinte améliore l'impression des pièces tout en diminuant l'assèchement de la pâte dans le réservoir. Les valeurs d'humidités minimales et maximales permettant d'obtenir des pièces conformes sont respectivement de 60 % et de 80 %. Même s'il est possible d'imprimer des pièces reproductibles à partir de 60 % d'humidité relative dans la chambre, la pâte dans le réservoir sèche rapidement et il est impossible d'extruder plus d'un pâton à la fois. À 80 % d'humidité relative, la pâte devient trop élastique ce qui étire les filaments, les empêche de se couper en fin de course et entraîne un dépôt supplémentaire de matière ainsi qu'une perturbation de l'intégrité du maillage. Des structures en « pelote » semblables à celle présentée en Figure 42. **B** sont alors obtenues.

Une humidité relative de 70 % est donc le meilleur compromis afin d'imprimer des pièces convenables de façon reproductible tout en limitant le séchage de la pâte et des architectures imprimées. Cependant, ce taux d'humidité relative dans l'enceinte ne permet de charger que 3 pâtons en même temps dans le réservoir, ce qui correspond à l'impression d'une vingtaine de pièces.

III.1.3.3.5. Impact de la température de la chambre et de la platine Peltier

Pour finir, les impacts de la température de la chambre et de la platine Peltier sur l'impression des pièces ont été étudiés (Tableau 8 – expériences n°11 et 12). L'objectif était de diminuer au maximum la température pour limiter le séchage, sans modifier les propriétés rhéologiques de la pâte. La température de la platine Peltier était plus facilement modulable que celle de la chambre qui ne dispose pas de système de refroidissement.

Le choix de la température est un paramètre important, elle doit être suffisamment faible pour limiter le séchage de la pâte et des pièces lors de la session d'impression, mais elle doit rester au-dessus du point de rosée (*Dew point* en anglais) pour éviter la condensation. Le point de rosée correspond à la température en dessous de laquelle la vapeur d'eau contenue dans l'air se condense spontanément sur les surfaces. Cette valeur dépend non seulement de la

température, mais aussi du taux d'humidité relatif dans l'air, tel que présenté sur la Figure 50 [235].

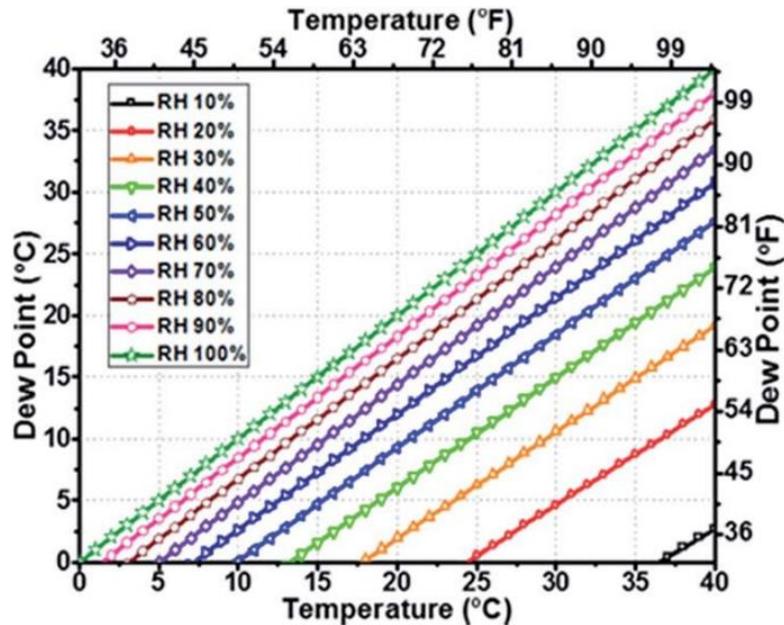


Figure 50 Évolution du point de rosée en fonction de l'humidité relative dans l'air. Issu des travaux de L. Changyong *et al* [235]

D'après ce graphique et sachant que l'humidité relative dans la chambre a été fixée à 70 %, la température de la platine Peltier et dans la chambre d'impression ne doit pas descendre en dessous de 5 °C. En effet, lors de l'impression, cette condensation risque de dégrader les pièces imprimées et de former un film aqueux sur la feuille d'acétate, ce qui empêcherait les filaments d'adhérer au support.

Pour éviter ce phénomène tout en limitant le séchage des pièces, la température de la platine Peltier a été fixée à 15 °C et la température dans la chambre à 20 °C. Ces paramètres permettent l'obtention de pièces conformes et reproductibles tout en limitant les phénomènes de séchage et de condensation.

III.1.3.4. Conclusion sur la mise en forme

En conclusion, les paramètres d'impression optimaux pour l'obtention de pièces reproductibles et conformes au cahier des charges fixé en utilisant la pâte céramique d'HA à 47 %v (décrite dans le paragraphe III.1.2, mise en forme par la micro-extrudeuse ID-conception, sont : une vitesse d'extrusion de 7 mm/s, un taux d'humidité relative de 70 % dans la chambre d'impression, une température du support de 15 °C et une température dans la chambre d'impression de 20 °C. Le Tableau 9 récapitule l'ensemble des paramètres d'impression

utilisés pour obtenir les pièces présentées par la suite et les compare avec ceux de la première micro-extrudeuse.

Tableau 9 Bilan des paramètres d'impression en fonction de la micro-extrudeuse utilisée

Paramètres	Ancienne micro-extrudeuse (IRCER)	Nouvelle micro-extrudeuse (ID-conception)
Taille de la buse (μm)	600	600
Diamètre interne du réservoir (mm)	6	20
Longueur du réservoir (mm)	60	120
Volume du réservoir (mm^3)	1695	37680
Vitesse d'impression (mm/s)	4	7
Temps d'impression d'une pièce (min)	10	6
Nombre de pièces imprimées par demi-journée	9	20
Température dans la chambre d'impression (°C)	n.a.	20
Humidité relative dans la chambre d'impression (%)	n.a.	70%
Température du support d'impression (°C)	n.a.	15

L'utilisation d'un réservoir de plus grande capacité a permis de charger plus de pâte et a nécessité d'augmenter la vitesse d'extrusion pour que les filaments soient convenablement extrudés. Le contrôle des paramètres environnementaux (température de la platine Peltier et de la chambre d'impression et l'humidité relative) a permis une amélioration de la reproductibilité des pièces. De plus, l'utilisation de la nouvelle micro-extrudeuse (ID-conception) permet un gain de temps considérable, car les pièces sont obtenues plus rapidement (réduction du temps d'impression de 40 %) et il n'est plus nécessaire de démonter la tête d'impression toutes les trois pièces imprimées.

Les travaux présentés ici requièrent de nombreuses pièces pour réaliser les études de libération en molécules actives (jusqu'à 9 pièces par campagne). L'utilisation de la micro-extrudeuse ID-conception permet de charger trois pâtons en même temps pour imprimer plus

d'une vingtaine de pièces conformes et reproductibles en une demi-journée au lieu d'une journée entière avec la micro-extrudeuse STEPCRAFT.

III.1.4. Séchage des architectures

La pâte céramique utilisée est principalement composée d'un hydrogel de méthycellulose et de poudre d'hydroxyapatite. Les grains d'HA sont donc dispersés dans une matrice aqueuse, eau qui doit être éliminée progressivement une fois le matériau imprimé. En effet, une évaporation brutale de l'eau contenue dans la pièce (lors du déliantage par exemple) risquerait de déformer la pièce et d'entraîner l'apparition de craquelures. Le séchage est donc une étape préliminaire au traitement thermique qui doit être contrôlé pour limiter l'apparition de fissures et de craquelures. D'après la littérature, celui-ci se décompose en 3 phases décrites en Figure 51.

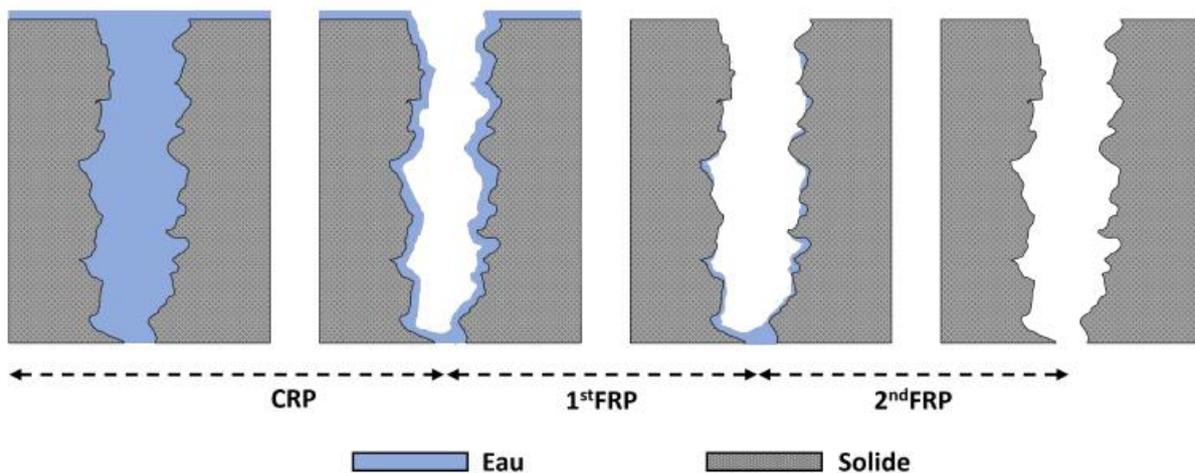


Figure 51 Schéma des différentes étapes de séchage d'un matériau poreux [236]

Lors de la première étape appelée *Constant Rate Period* (CRP), la vitesse d'évaporation de l'eau contenue dans la pièce est équivalente à la vitesse d'évaporation de l'eau libre présente à la surface du matériau. Cette étape est caractérisée par la contraction de la matrice aqueuse entraînant un rapprochement des grains de matière. C'est lors de la CRP que le retrait est le plus important. La deuxième étape, 1st FRP (*Falling Rate Period*) est caractérisée par une diminution de la vitesse de séchage proportionnellement à la quantité d'eau restante à la surface du matériau. Pour finir, la dernière phase (2nd FRP) débute lorsqu'il ne reste plus d'eau à la surface du matériau. Lors de la 2nd FRP seule l'eau restante dans les pores de la pièce est éliminée [236], [237].

Pour éviter tout risque de craquelures lors du séchage, chacune des étapes doit donc être contrôlée. Un séchage en conditions ambiantes ne permet pas de contrôler les vitesses d'évaporation de l'eau ce qui entraîne un séchage trop rapide et donc un retrait inhomogène de la pièce conduisant à la formation de microfissures [238].

De ce fait, une fois imprimées, les pièces sont conservées dans la chambre d'impression où l'humidité relative est maintenue à 70 % avant d'être séchées en atmosphère contrôlée dans une enceinte climatique ClimeEvent (Weissttechnik) suivant un programme de séchage précédemment développé au sein de l'équipe Biocéramiques et présenté en Figure 52. Celui-ci respecte la séquence des étapes de séchage préconisées dans le domaine des procédés céramiques, à savoir une augmentation de l'humidité ambiante, suivie d'une augmentation de la température puis d'une diminution de l'humidité et enfin une diminution de la température [239].

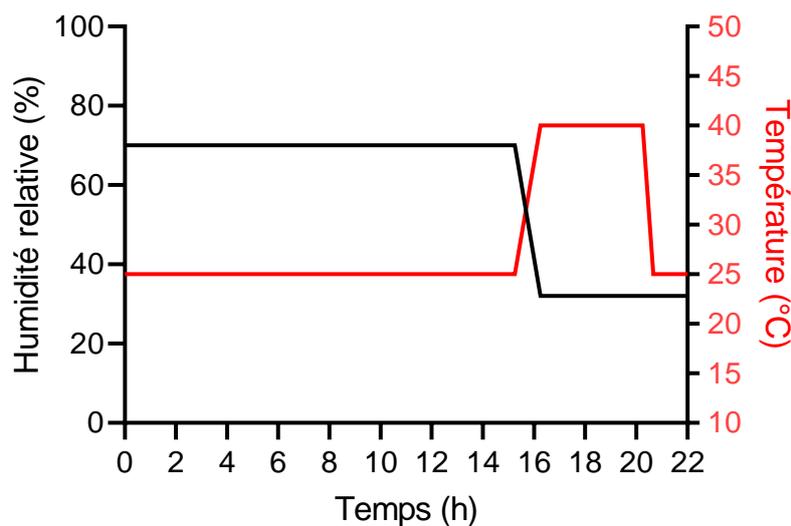


Figure 52 Cycle de séchage des pièces imprimées par robocasting

La première étape du cycle de séchage dure 15 h pendant lesquelles la température et l'humidité relative dans l'enceinte sont respectivement fixées à 25 °C et 75 %. L'humidité relative dans l'enceinte (75 %) est délibérément supérieure à celle de l'impression des architectures (70 %) afin d'uniformiser l'hygrométrie des pièces, d'être en pression de vapeur saturante et d'assurer un séchage uniforme des architectures indépendamment de l'ordre d'impression. L'étape suivante consiste à augmenter la température et à diminuer l'humidité relative pour permettre le séchage à proprement parler des pièces. Même si l'augmentation de la température favorise l'élimination de l'eau, celle-ci ne doit pas dépasser 45 °C pour éviter

de dégrader le méthocel et donc de déstructurer le réseau de l'hydrogel. Pour cela, la température a été fixée à 40 °C et l'humidité relative est réduite progressivement jusqu'à atteindre 32 %. Une fois établies, ces conditions seront maintenues pendant 4 h. La dernière étape du cycle de séchage consiste à diminuer la température jusqu'à 25 °C tout en conservant une humidité relative de 32 %. Ces conditions seront maintenues pendant 1 h avant que les pièces puissent être sorties de l'enceinte climatique.

III.1.5. Frittage des architectures

Le frittage permet la consolidation des pièces en vue de leurs utilisations en tant que substituts osseux. Cette étape est responsable de la densification du matériau. Par conséquent, la variation des paramètres de frittage tels que la température ou le temps de palier permet de moduler la microporosité des pièces.

Avant d'être densifiées, les architectures séchées doivent subir un déliantage qui doit être réalisé dans des conditions spécifiques fonction de la composition de la pâte céramique. L'objectif est d'évacuer l'eau et d'éliminer les composés organiques (dispersant, liant et floculant) introduits lors de la formulation de la pâte, tout en limitant la formation de craquelures et de porosités non contrôlées liées à la combustion des composés organiques. Pour cela, la température doit être augmentée très lentement jusqu'à l'élimination complète des composés organiques. Pour déterminer la température nécessaire à l'élimination de l'ensemble des additifs organiques, une analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse a été réalisée.

Par ailleurs, le comportement thermique des pâtes a été étudié afin de déterminer les conditions de frittage permettant d'obtenir des microporosités variables en vue de la modulation des cinétiques de libération des molécules d'intérêt (antibiotique et cytokines).

III.1.5.1. Détermination des conditions de déliantage

Afin de déterminer les conditions de déliantage, une analyse thermogravimétrique (ATG) couplée à la spectrométrie de masse a été réalisée conformément au protocole décrit dans le paragraphe II.2.6.1. Les résultats sont présentés Figure 53.

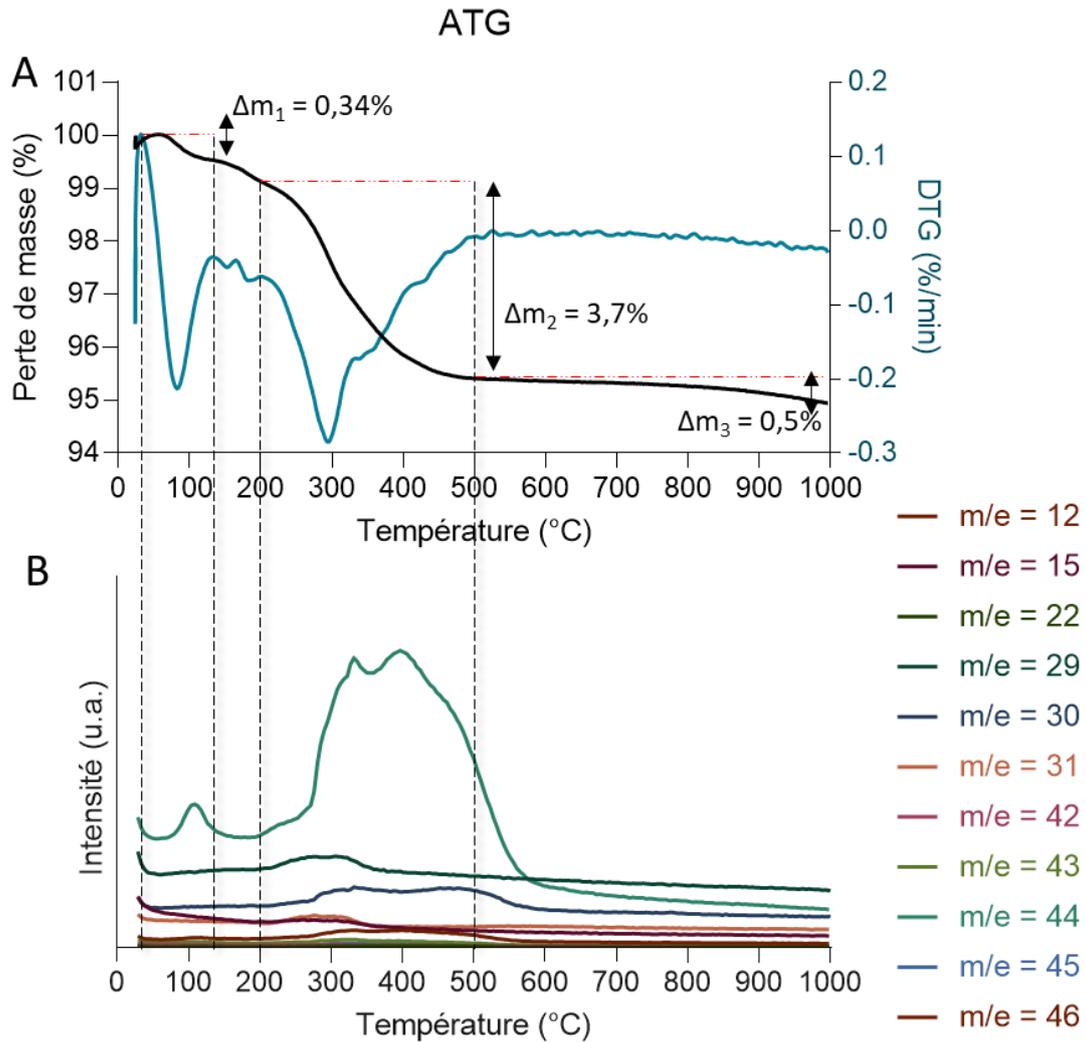


Figure 53 Analyse thermogravimétrique de filaments de pâte séchée et spectre de masse associé.

A : évolution de la perte de masse en % et de la courbe dérivée du signal TG par rapport au temps (DTG) (traitement thermique sous air), B : spectre de masse associé en fonction de la température (traitement thermique sous argon). Les analyses ont été effectuées sur des filaments de pâte d'HA séchés sous air puis broyés avec un traitement thermique de 20 °C/min de 20 °C à 1000 °C.

Une première perte de masse de 0,34 % est observée entre 30 °C et 130 °C. D'après le spectre de masse, elle est associée au rapport m/e 44 pouvant correspondre à un dégagement de carbonate (Figure 53 **A** et **B**). Une seconde perte de masse, plus importante (3,7 %), est observée entre 130 °C et 500 °C (Figure 53 **A**). Celle-ci correspond au départ des additifs organiques dont le pourcentage massique dans la pâte est de l'ordre de 6 %m. Cette perte de masse importante se décompose en plusieurs étapes toutes associées aux émissions de masses m/e 29, 30 et 44. Ces émissions sont attribuées aux produits issus de la décomposition des additifs organiques avec par exemple le fragment m/e 29 (C_2H_7N) lié à la décomposition du polyéthylèneimine, le fragment m/e 31 (CH_3O) à celle de

l'hydroxypropylméthylcellulose et plus globalement le fragment m/e 44 attribuable à plusieurs résidus de chaîne carbonée (C_2H_6N , C_2H_4O) et au dégagement de CO_2 (Figure 53 **B**). De plus, au cours de l'analyse, aucun fragment m/e 18 (H_2O) n'a été détecté, car la pâte a été séchée avant l'ATG.

Au-delà de 500 °C, l'évolution de la perte de masse devient négligeable (0,5 %) et peu d'éléments sont détectés au spectromètre de masse (Figure 53). Bien que l'émission de masse m/e 44 ne soit pas notée, cette perte peut être due à une légère décarbonation de l'hydroxyapatite lors du chauffage sous atmosphère neutre [240]. Cela signifie qu'une température de 500 °C est suffisante pour éliminer l'ensemble des composés organiques contenus dans la pâte d'hydroxyapatite.

Par ailleurs, la rampe de montée en température doit rester inférieure à 2 °C/min pour assurer une évaporation de l'eau et une élimination des composés organiques suffisamment lentes de sorte à éviter la formation de fissures et leur persistance après frittage [239], [241].

Par conséquent, pour pouvoir éliminer l'ensemble des composés organiques présents dans la pâte tout en préservant l'intégrité des architectures, le cycle de traitement thermique doit comprendre une étape de déliantage jusqu'à 500 °C avec une rampe de montée en température inférieure à 2 °C/min.

III.1.5.2. Etude du comportement thermique des pâtes

Afin de déterminer le cycle thermique nécessaire pour obtenir des architectures microporeuses, des analyses dilatométriques ont été réalisées sur des pastilles de pâte séchées à température ambiante pendant 24 h. Les pastilles de pâte ont été mises en forme par pressage uniaxial manuel dans une matrice présentant un diamètre intérieur équivalent à 8 mm.

Quatre analyses ont été réalisées comprenant chacune une étape de déliantage à 1 °C/min jusqu'à 500 °C. La première analyse a permis d'avoir une vue d'ensemble du comportement thermique de la pâte. Pour cela, le cycle thermique utilisé comprend l'étape de déliantage, puis la température est augmentée de 10 °C/min jusqu'à 1400 °C sans palier. Les trois autres études (isothermes) ont permis de déterminer le temps de palier nécessaire à la densification des pièces. D'après les résultats de l'expérience précédente, les isothermes permettant de déterminer l'impact du temps de palier sur la densification des pièces ont donc été sélectionnés entre 1000 °C et 1200 °C. Les cycles thermiques se composent de l'étape de déliantage suivie d'une rampe de montée en température de 10 °C/min. Une fois la température de palier atteinte, celle-ci a été maintenue pendant 8 h. Les résultats sont présentés sur la Figure 54.

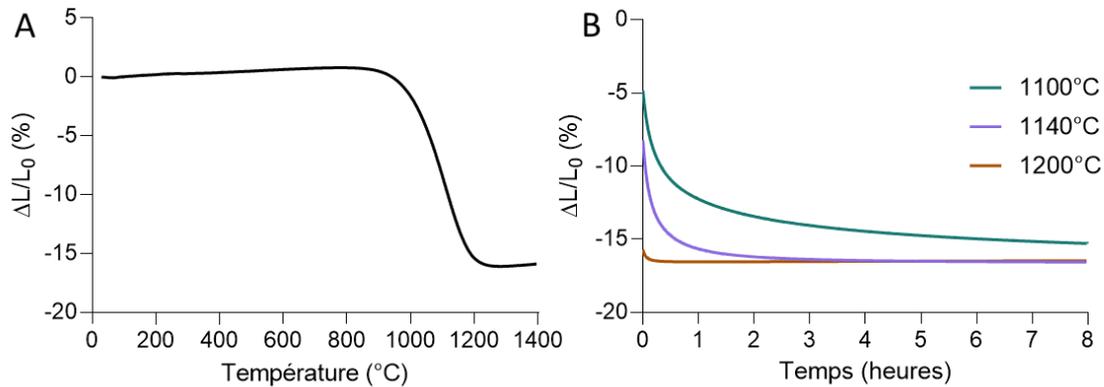


Figure 54 Etude de comportement thermique de la pâte céramique.

A : évolution du retrait linéaire ($\Delta L/L_0$ en %) en fonction de la température, B : évolution du retrait linéaire ($\Delta L/L_0$ en %) en fonction du temps de palier.

La Figure 54. **A** montre que l'échantillon de pâte gonfle légèrement durant le traitement thermique et ce jusqu'à 900 °C, température à laquelle le frittage commence. La densification maximale est atteinte lorsque la température atteint 1200 °C avec un retrait d'environ 16 %. La température de calcination de la poudre étant de 1000 °C, la température de frittage des architectures doit donc être supérieure à 1000 °C pour obtenir des pièces dont la résistance mécanique sera suffisante pour être manipulée. La température de frittage doit donc être comprise entre 1000 °C et 1200 °C.

Pour les isothermes, trois températures de palier ont été sélectionnées 1100 °C, 1140 °C et 1200 °C. Pour l'isotherme à 1100 °C, le retrait n'évolue plus après 5 h, avec une valeur maximale d'environ 15 %. Pour l'isotherme à 1140 °C, le retrait n'évolue plus après 2 h, avec une valeur maximale d'environ 16 %. Pour l'isotherme à 1200 °C, le retrait est constant dès 30 min de palier avec une valeur maximale d'environ 16 % (Figure 54. **B**). Au-delà de 2 heures, le retrait et donc le taux de densification entre les pièces frittées à 1140 °C et 1200 °C sont identiques (Figure 54. **B**). Il est donc possible de moduler la densification et donc la microporosité des architectures en effectuant des traitements thermiques à 1100 °C, 1140 °C et 1200 °C tant que la durée de palier est inférieure à 2 h. Des traitements thermiques d'une heure ont donc été retenus, car ils correspondent à des retraits linéaires de 12,3 % à 1100 °C, 15,7 % à 1140 °C et 16,5 % à 1200 °C.

III.1.5.3. Cycles de traitement thermique des architectures

En conclusion, trois cycles thermiques ont été sélectionnés dans le but de moduler la microporosité des architectures. Ils comprennent une étape de déliantage avec une montée en température de 1 °C/min jusqu'à 500 °C suivie d'un traitement thermique d'une heure à 1100 °C, 1140 °C ou 1200 °C (Figure 55).

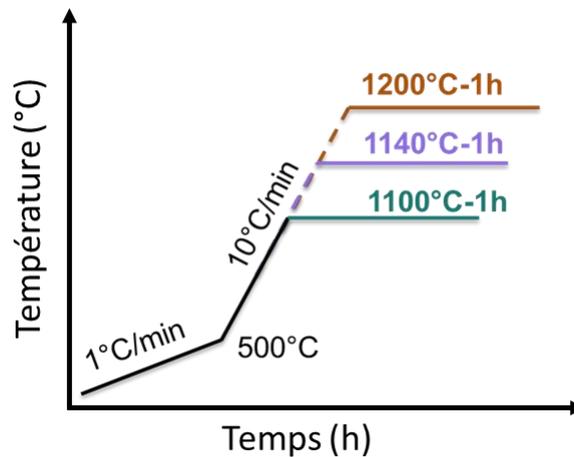


Figure 55 Cycles de frittage retenus pour les pièces en hydroxyapatite imprimées par micro-extrusion.

III.2. Caractérisation des architectures frittées

Une fois les pièces frittées, elles ont été finement analysées, tant en termes de composition qu'en termes de forme et de dimensions. Cette étape est nécessaire pour caractériser complètement les substituts obtenus.

Les architectures doivent avoir une forme cubique dont la taille doit être inférieure à 10 mm x 10 mm x 8 mm (selon les axes x, y et z) afin de pouvoir être placées dans la chambre interne du bioréacteur. Les filaments au sein d'une même couche doivent être parallèles et les couches doivent s'empiler selon une rotation de 90 °C de sorte à obtenir une structure en treillis. Le diamètre interne des macropores doit être supérieur à 300 µm pour faciliter l'adhésion et la prolifération des cellules à la surface du matériau et permettre le passage de l'aiguille à insuline (diamètre externe 300 µm) utilisée lors de la fonctionnalisation des architectures avec l'hydrogel de vancomycine. Pour finir, les pièces doivent également présenter une microporosité de surface pour faciliter l'adhésion et la prolifération des cellules à la surface du matériau et permettre l'adsorption des cytokines.

La composition des pièces a été analysée par DRX et FTIR et les dimensions des pièces avant et après frittage ont été mesurées. Ce paragraphe s'attache également à présenter les différentes microporosités obtenues après frittage ainsi que les tailles des macropores. La porosité des pièces a été mesurée par analyses d'image MEB *via* le logiciel Image J. L'ensemble des protocoles permettant l'obtention des micrographies sont présentés dans le paragraphe II.2.3.

III.2.1. Diffraction des rayons X et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les diffractogrammes et spectres FTIR de poudres d'HA issues de pièces frittées puis broyées (dans un mortier en agate) sont présentés en Figure 56.

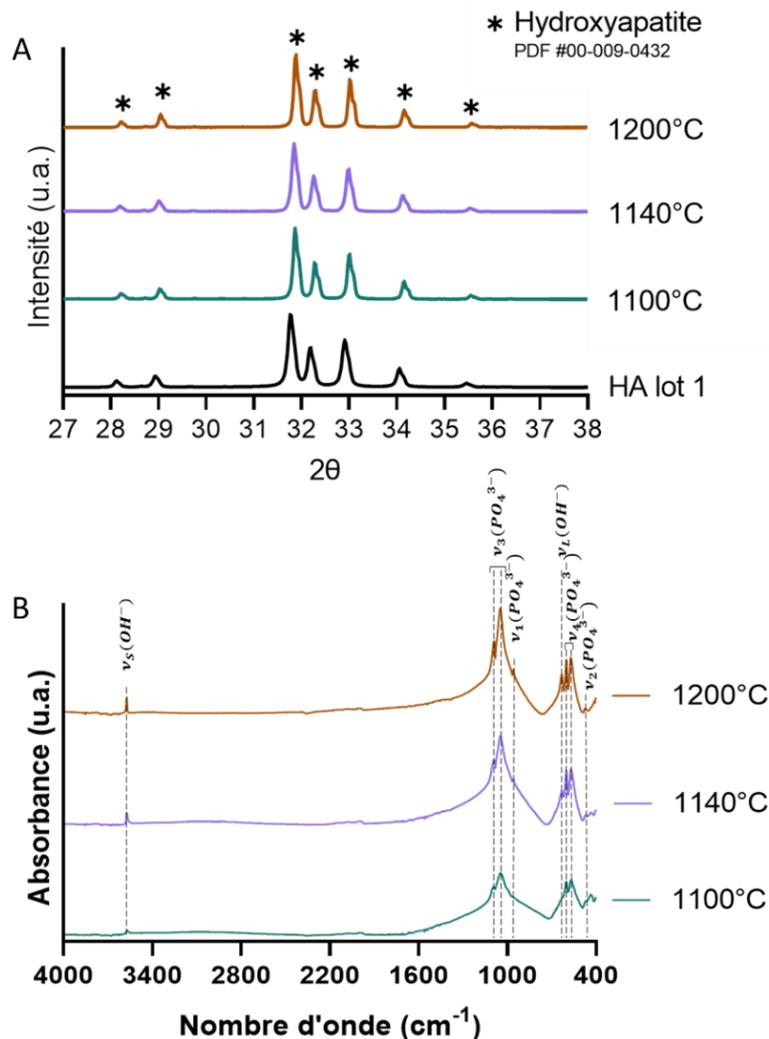


Figure 56 Diffractogrammes et spectres FTIR des pièces frittées en fonction de la température de frittage.

A : diffractogrammes des pièces frittées et de la poudre ayant servie à leur élaboration (HA lot), B : Spectre infrarouge des pièces frittées.

Aucune différence n'est observée entre les diffractogrammes (Figure 56. **A**) quel que soit le traitement thermique utilisé. L'ensemble des pics correspondent à ceux de la structure apatite de référence (PDF-ICDD 9-0432). Les bandes observées sur les spectres FTIR (Figure 56. **B**) correspondent aux bandes de vibrations caractéristiques des groupements hydroxyles et phosphates de l'hydroxyapatite (paragraphe II.2.2). L'absence d'autres bandes signifie que l'hydroxyapatite qui constitue les architectures n'est pas substituée par des groupements ioniques identifiables en FTIR. Après frittage, les architectures sont donc des céramiques monophasées d'hydroxyapatite stœchiométrique.

III.2.2. Dimensions, structure, macro- et microporosité des architectures

III.2.2.1. Dimensions et structures des pièces

L'objectif de cette partie est d'estimer les différences en termes de dimension entre le fichier numérique, la pièce imprimée et séchée et la pièce frittée. Cela permet de déterminer l'impact de chacune des étapes de mise en forme sur les dimensions des architectures. La Figure 57 illustre l'évolution des dimensions des pièces au cours du processus de mise en forme. D'après les premières observations, les architectures présentent une structure en treillis conforme au cahier des charges.

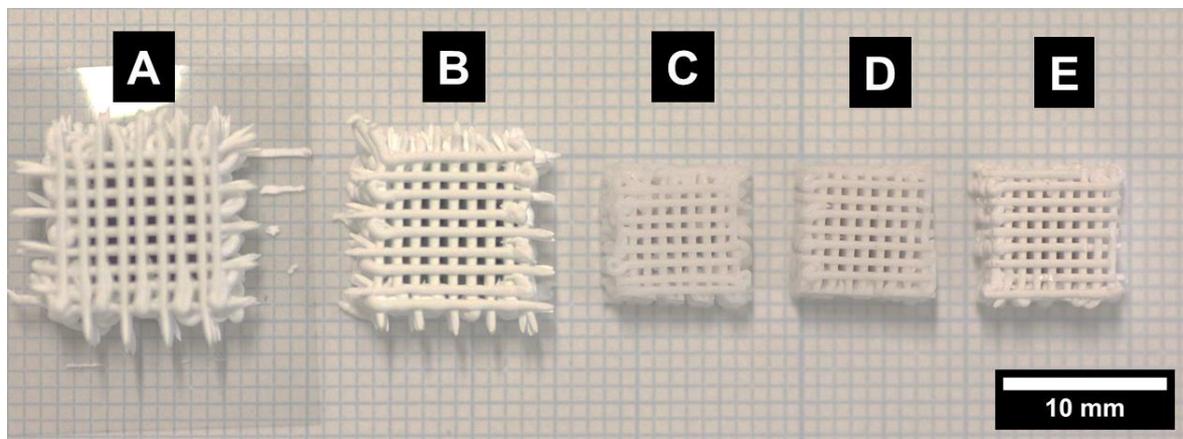


Figure 57 Photos des pièces illustrant le processus de mise en forme.

A : pièce crue, B : pièce séchée en enceinte climatique, C : pièce frittée à 1200 °C, D : pièce frittée à 1140 °C, E : pièce frittée à 1100 °C.

Les pièces séchées ou frittées ont été mesurées suivant les axes x,y et z avec un pied à coulisse. Avant chaque mesure, les filaments dépassant des architectures sont coupés délicatement pour ne pas endommager la structure des pièces. Les dimensions des pièces crues n'ont pas pu être mesurées en raison de la souplesse de la pâte qui ne permet pas d'utiliser le pied à coulisse sans les déformer. Les dimensions des pièces ont été suivies pièce

par pièce. Pour cela 21 pièces séchées ont été identifiées, numérotées et mesurées puis séparées en trois lots de 7 pièces pour être frittées suivant les trois cycles de frittage retenus. Après frittage, elles ont été mesurées à nouveau pour comparer les dimensions avant et après frittage. Pour chacune des dimensions mesurées, trois mesures ont été effectuées par pièce suivant le schéma de mesure présenté en Figure 58. Les résultats sont donnés dans le Tableau 10.

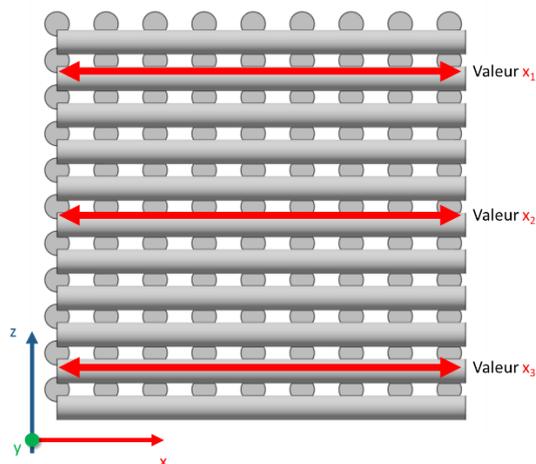
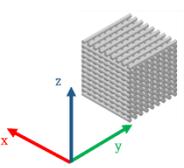


Figure 58 Schéma illustrant les points de mesure des architectures séchées avant et après frittage selon les axes x et y. Les flèches rouges indiquent les trois mesures effectuées pour l'axe x.

Tableau 10 Évolution des dimensions des pièces séchées avant et après frittage. Le retrait géométrique est calculé d'après les dimensions des pièces séchées.

	Dimensions					
	x (mm)	Retrait (%)	y (mm)	Retrait (%)	z (mm)	Retrait (%)
Pièce numérique	10	/	10	/	7,5	/
Pièces séchées en enceinte climatique	$10,7 \pm 0,3$	/	$10,8 \pm 0,4$	/	$6,5 \pm 0,2$	/
Pièces frittées à 1100 °C	$8,7 \pm 0,2$	20	$8,7 \pm 0,2$	19	$5,3 \pm 0,1$	18
Pièces frittées à 1140 °C	$8,9 \pm 0,3$	18	$8,7 \pm 0,3$	20	$5,3 \pm 0,3$	18
Pièces frittées à 1200 °C	$8,8 \pm 0,4$	19	$8,8 \pm 0,3$	19	$5,2 \pm 0,2$	21

D'après les résultats présentés dans le tableau ci-dessus, les écarts-types correspondent à des incertitudes relatives comprises entre 3 % et 5 %. Cela est dû aux imprécisions de mesure

liées à l'utilisation d'un pied à coulisse, mais aussi à la fragilité des architectures. Ces incertitudes sont à prendre en compte lors de l'analyse des résultats.

Dans un premier temps, les dimensions des pièces séchées sont comparées avec celles de la pièce numérique, c'est-à-dire les dimensions théoriques des architectures définies par le modèle CAO. Pour la dimension z, la hauteur mesurée est de $6,5 \pm 0,2$ mm, ce qui représente une diminution d'environ 13 % par rapport au format numérique. Cela signifie que les pièces ont tendance à s'effondrer lors du processus d'impression en raison de l'empilement des couches et du facteur d'écrasement des filaments permettant l'adhésion des couches les unes sur les autres.

En revanche, les dimensions suivant x et y des pièces après séchage sont supérieures à celle du fichier numérique. En effet, les dimensions des pièces séchées sont respectivement de $10,7 \pm 0,3$ mm et $10,8 \pm 0,4$ mm selon les axes x et y ce qui représente une augmentation respective d'environ 9 % et 8 % par rapport au format numérique. Cette augmentation pourrait être due à un affaissement de la pièce au moment de l'impression. En effet, les travaux de M'Barki *et al.* suggèrent qu'un affaissement en z entraîne un étalement de matière ce qui conduit à l'augmentation des autres dimensions [242]. Cette hypothèse semble peu probable, car les pièces devraient alors présenter une structure pyramidale due au déplacement de matière et à l'étalement de la pâte, ce qui n'est pas le cas. Une autre hypothèse, plus vraisemblable, serait que cette hausse soit liée aux imprécisions de mesure. En effet, après séchage, les pièces restent particulièrement fragiles et doivent être manipulées avec précaution. Une pression importante avec le pied à coulisse sur la pièce pourrait l'endommager. Ainsi à ce stade du processus de mise en forme, les pièces séchées ne peuvent pas rentrer dans le bioréacteur.

Dans un second temps, les dimensions des pièces séchées sont comparées avec celles des pièces frittées pour déterminer le retrait géométrique. Les pièces frittées présentent des dimensions similaires, quel que soit le cycle de frittage utilisé (Tableau 10). En effet, pour les trois températures de frittage, les dimensions moyennes selon les axes x, y et z sont respectivement de $8,8 \pm 0,1$ mm x $8,7 \pm 0,1$ mm x $5,3 \pm 0,1$ mm. Le pourcentage de retrait oscille entre 18 % et 21 % pour chacune des dimensions, et ce quel que soit le cycle de frittage utilisé. L'observation d'un retrait du même ordre de grandeur pour toutes les dimensions d'une architecture n'est pas un phénomène courant, mais il a déjà été observé dans la littérature. En effet, en 2023 J.Zhang *et al.* ont montré par leurs travaux que la formulation des pâtes et plus particulièrement le choix des poudres et le taux de chargement impactent le retrait des pièces après frittage et peut conduire à l'obtention d'un retrait uniforme. Ils concluent qu'une augmentation du taux de chargement diminue le retrait des pièces au frittage, et donc le comportement anisotrope du matériau [243].

Le protocole de mise en forme utilisé conduit à des architectures dont les dimensions finales moyennes sont de 8,8 mm x 8,7 mm x 5,3 mm (soit 401 mm³). Par comparaison au format numérique, cela représente une diminution de 12 % selon les axes x et y et une diminution de 29 % selon l'axe z. Malgré l'affaissement selon l'axe z, les architectures conservent une forme de parallélépipède rectangle droit et présentent un maillage de filaments empilés perpendiculairement (Figure 57). Par ailleurs, les dimensions finales des pièces sont inférieures à celles de la chambre interne du bioréacteur (10 mm x 10 mm x 8 mm, soit 800 mm³), elles pourront donc être placées dans le bioréacteur. Cependant d'après les dimensions moyennes des pièces, cela représente une différence pièce/chambre du bioréacteur de 1,3 mm suivant x et y et de 2,7 mm suivant z. Cette différence, notamment pour les dimensions x et y risquent de permettre au flux du bioréacteur de contourner la pièce [172]. Pour éviter, ou à défaut limiter ce phénomène, il serait judicieux, à terme, de tenir compte du retrait des pièces en surdimensionner les modèles 3D (c'est-à-dire le fichier CAO) de sorte que les pièces puissent rentrer parfaitement dans la chambre interne du bioréacteur. D'après les résultats décrits précédemment, les dimensions du fichier numérique doivent donc être augmentées d'un facteur 1,12 suivant les axes x, y et 1,29 suivant z. Les dimensions du fichier CAO devraient donc être de 11,36 mm x 11,36 mm x 11,27 mm.

III.2.2.2. Mesure de la macroporosité des pièces après frittage

Les images MEB de la macrostructure des architectures en fonction des températures de frittage sont présentées en Figure 59.

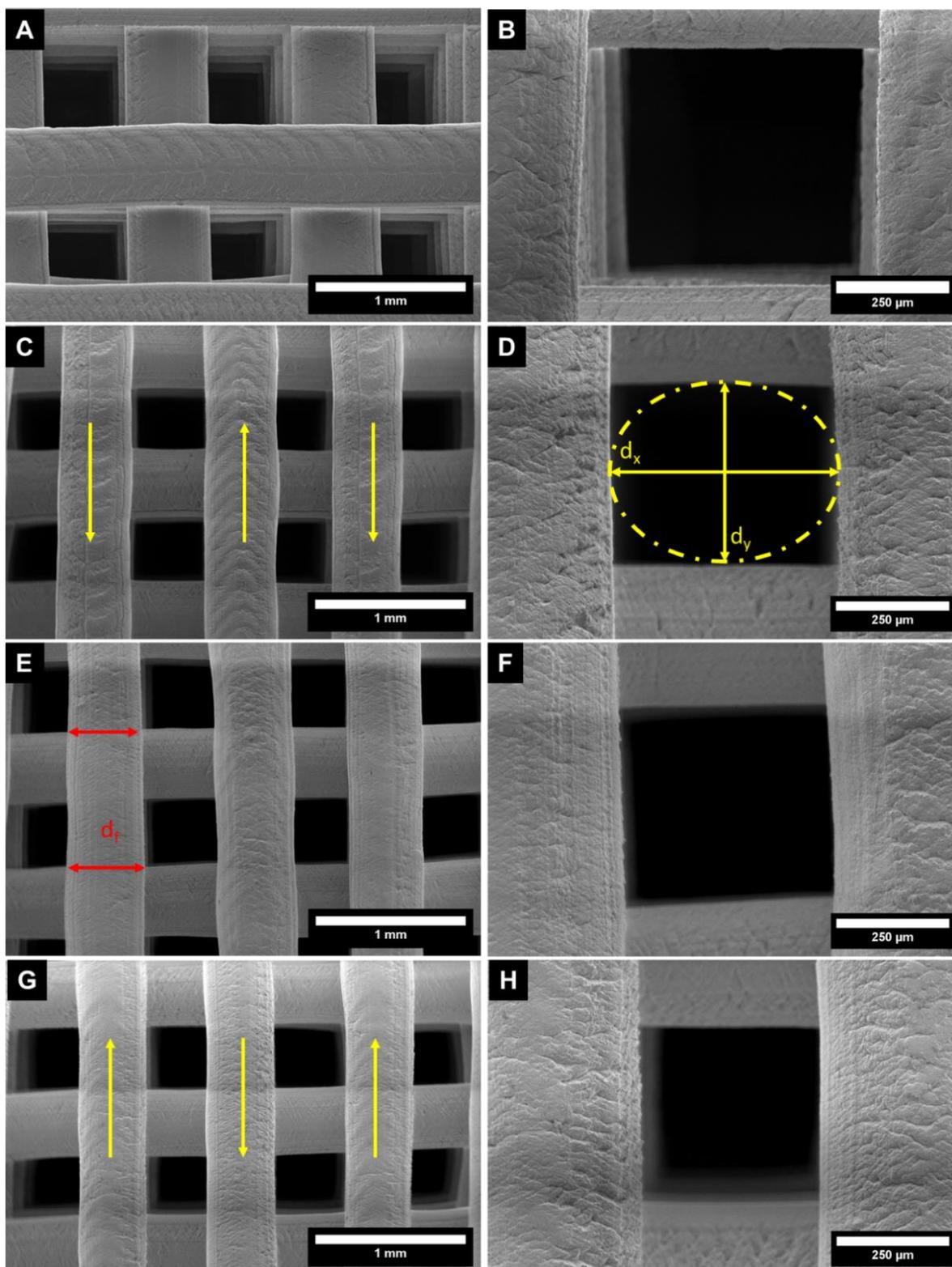


Figure 59 Micrographies MEB de la macrostructure des architectures en fonction des conditions de frittage (vue de dessus, dans le plan xy).

A et B : pièces séchées - C et D : pièces frittées à 1100 °C - E et F : pièces frittées à 1140 °C - G et H : pièces frittées à 1200 °C. Les flèches jaunes correspondent au sens du passage de la buse, le cercle jaune permet d'évaluer le diamètre interne des macropores selon leur dimension x (d_x) et y (d_y). Les flèches rouges correspondent à l'évaluation du diamètre des filaments (d_f).

À l'échelle de plusieurs pores et pour une pièce séchée (Figure 59. **A**), les filaments sont parallèles les uns avec les autres au sein d'une même couche et sont perpendiculaires à ceux de la couche inférieure. Par ailleurs les macropores présentent tous une forme rectangulaire et sont parfaitement alignés, car aucun filament des couches inférieures n'est observable par la lumière du trou qu'ils dessinent. De plus, l'absence d'ajout de matière ou de filaments supplémentaires liés aux déplacements de la buse durant l'impression est à noter. Ces observations sont également valables pour les pièces frittées (Figure 59. **C**, **E** et **G**), ce qui signifie que les architectures conservent leurs structures lors du traitement thermique.

Ces images ont également permis de mettre en évidence la présence de stries à la surface des filaments qui sont causées par le déplacement de la buse. Le sens des stries correspond au sens de déplacement de la buse au moment de l'extrusion du filament et est particulièrement observable sur les pièces frittées (Figure 59, flèches jaunes). Pour optimiser les déplacements de la buse, les filaments sont imprimés alternativement dans le sens des valeurs positives puis dans le sens des valeurs négatives de l'axe x ou y (en fonction de la couche imprimée). Ces déformations de surface, caractérisés de « peau de requin » sont relativement courantes lors de l'extrusion de filament. Elles sont principalement dues à un assèchement de la surface au moment de l'extrusion ce qui a pour conséquence de limiter le comportement élastique et entraîne une rupture de la continuité du filament [244].

Pour s'assurer du passage de l'aiguille à insuline nécessaire à la fonctionnalisation des architectures avec l'hydrogel de vancomycine, le diamètre interne des macropores doit être supérieur à $300\ \mu\text{m}$. Leur diamètre des pores a été mesuré d'après les micrographies de la Figure 59 (image **D**, **F** et **H**). Les macropores ont une forme rectangulaire, leur diamètre interne a pu être mesuré en mesurant le diamètre du cercle inscrit dans celui-ci, tel qu'illustré en Figure 59. **H**. Les pores n'étant pas parfaitement carrés, deux diamètres ont été mesurés par macropores d_x et d_y selon les axes x et y . L'ensemble des résultats sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 Diamètre interne des macropores et des filaments en fonction des températures de frittage. Les mesures ont été effectuées sur deux micrographies par condition. Pour les macropores, au moins 16 pores ont été mesurés par condition soient 32 mesures (d_x et d_y). Pour les diamètres des filaments, les mesures ont été effectuées à intervalle régulier sur tout le long du filament. Plus de 70 mesures ont été effectuées par micrographie.

Conditions de frittage	Diamètre interne des macropores (μm)		Diamètre des filaments (μm)
	Selon l'axe x	Selon l'axe y	
Pièces crues	558 ± 71	555 ± 19	563 ± 26
1100 °C	430 ± 60	414 ± 18	463 ± 29
1140 °C	431 ± 63	436 ± 20	455 ± 40
1200 °C	426 ± 43	417 ± 16	451 ± 13

Le diamètre interne des macropores a une valeur moyenne de $558 \pm 71 \mu\text{m}$ selon l'axe x et de $555 \pm 19 \mu\text{m}$ selon l'axe y avant frittage. Même après séchage et en dépit de l'écrasement des filaments nécessaire à l'adhésion des couches les unes sur les autres, le diamètre interne des macropores reste très proche de ceux du modèle CAO ($600 \mu\text{m}$). Après frittage, les diamètres internes oscillent entre $414 \pm 18 \mu\text{m}$ et $436 \pm 20 \mu\text{m}$ indépendamment de l'axe ou de la température de frittage. Cette diminution est liée au retrait qui survient lors du frittage et une augmentation de la température de frittage ne semblent pas induire une diminution de la taille des macropores.

Malgré cette réduction, le diamètre interne est toujours supérieur à $300 \mu\text{m}$ selon les deux axes et pour l'ensemble des températures de frittage, ce qui permettra le passage de l'aiguille à insuline (diamètre externe de $300 \mu\text{m}$) et donc la fonctionnalisation des pièces avec un hydrogel de vancomycine, mais facilitera également la colonisation du matériau par les cellules [185]. La fonctionnalisation des pièces est décrite dans le paragraphe IV.2.2.

De la même façon, le diamètre moyen des filaments avant frittage est plus important ($563 \pm 26 \mu\text{m}$) qu'après frittage, indépendamment de la température de frittage. Le diamètre moyen des filaments est respectivement de $463 \pm 29 \mu\text{m}$, $455 \pm 40 \mu\text{m}$ et $451 \pm 13 \mu\text{m}$ pour une température de frittage de 1100 °C , 1140 °C et 1200 °C . Le diamètre moyen des filaments est similaire entre les différents traitements thermiques.

Pour pouvoir évaluer l'affaissement des architectures selon l'axe z, mis en évidence précédemment, des coupes transversales des architectures ont été réalisées. Afin d'obtenir le résultat le plus net possible, les pièces sont placées selon l'axe x ou y (sur la tranche) sur un

disque de polisseuse. Les pièces sont ainsi polies jusqu'à atteindre le centre de celles-ci. Elles sont ensuite imagées par microscopie électronique à balayage. Dans le but d'obtenir des images complètes de coupes transversales au MEB, celles-ci ont été obtenues par reconstruction d'image. Pour cela, 6 micrographies ont été réalisées à la suite avant d'être assemblées. Les résultats sont présentés en Figure 60.

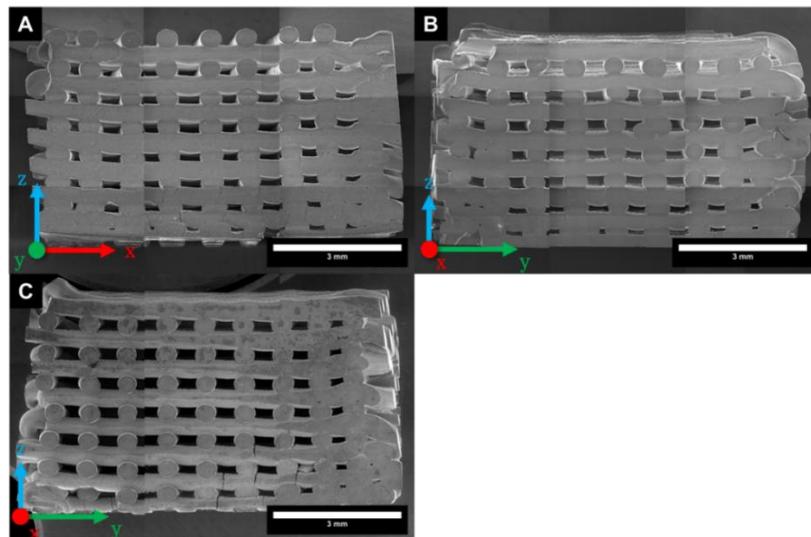


Figure 60 Images MEB de coupe transversale d'architectures en fonction de la température de frittage.

A : pièce frittée à 1100 °C, B : pièce frittée à 1140 °C, C : pièce frittée à 1200 °C

Quel que soit le cycle de frittage subit, l'affaissement selon l'axe z est observé. En effet, plus les pores sont proches de la base de la pièce (première couche imprimée), plus le taille est faible et plus ils semblent obstrués (Figure 60 **A**, **B** et **C**). Celui-ci peut être dû à la pression de la buse lors de son passage, au poids lié à l'addition de couches superposées, mais également au comportement rhéologique de la pâte qui a tendance à s'écouler au-delà de 100 secondes, soit 1 min 40 après l'impression de la pièce (paragraphe 0).

La première hypothèse associée à l'impact de la pression de la buse, permet d'expliquer la déformation des filaments, qui perdent leur circularité lorsqu'un filament d'une couche supérieure est en contact avec eux et le diamètre interne des macropores qui après séchage reste proche de celui du modèle CAO. Ce phénomène est observé sur la Figure 60 **A** et **B**. Sur la micrographie **A**, la pièce est observée entre deux filaments transversaux et les filaments perpendiculaires à l'axe d'observation sont parfaitement circulaires. À l'inverse, sur la micrographie **B**, la pièce est observée au milieu des filaments transversaux et l'ensemble des

filaments perpendiculaires à l'axe d'observation sont déformés. Cela est dû à l'écrasement de 25 % nécessaire à l'adhésion des couches les unes sur les autres (III.1.3.1).

Les deux autres hypothèses suggèrent que les pièces commencent à s'effondrer une fois imprimées, ce qui conduirait à une grande variabilité de la dimension z des pièces. Les premières pièces imprimées devraient être plus affaissées que les dernières. Or, d'après les écarts-types présentés dans le Tableau 10, les variations de dimensions suivant l'axe z sont relativement faibles (entre 0,1 et 0,3 mm). Il est également possible que le temps d'impression entre deux pièces soit négligeable (entre 2 h et 3 h à 20 °C et 70 % d'humidité relative) comparé au temps à humidité importante dans l'enceinte climatique (15 h à 25 °C et 75 % d'humidité relative). Dans ce cas, l'affaissement des pièces serait bien dépendant du temps, mais elles subiraient toutes le même traitement. Même si cette hypothèse n'est pas à exclure, la pression exercée par la buse semble induire un écrasement des architectures selon l'axe z.

Concernant l'aspect des architectures, des fissures sont observées sur les pièces (Figure 60. C). Sachant qu'une seule pièce est observée par température de frittage, mais que les fissures ne sont pas présentes sur les autres pièces, il est probable que celles-ci soient liées à l'étape de polissage. En effet, ces architectures sont particulièrement fragiles, l'étape de polissage peut donc dégrader les pièces. Pour les mêmes raisons, il a été impossible de conclure sur la présence de microporosités fermées, car durant l'étape de polissage des grains sont arrachés ce qui ne permet pas de faire la différence entre les grains arrachés et la porosité fermée.

III.2.2.3. Étude de la microporosité des pièces

Le pourcentage de microporosité ouverte des pièces et le diamètre moyen des grains ont été évalués par analyses d'images MEB avec le logiciel ImageJ sur deux images par condition de frittage. Les clichés présentant la microporosité de surface des architectures en fonction de la température de frittage sont présentés en Figure 61.

Pour chacun des clichés MEB, la somme des aires des micropores est comparée à la surface totale de l'image pour obtenir le taux de porosité ouverte. Les valeurs sont résumées dans le Tableau 12.

Les images MEB de l'état de surface des architectures ont également permis de mesurer la taille des grains. Les résultats sont résumés dans le Tableau 13. En raison des faibles dimensions des grains des architectures avant frittage, l'aire mesurée a dû être réduite. Que ce soit avant ou après frittage, les écarts-types des diamètres moyens des grains sont importants traduisant une hétérogénéité de la distribution de la taille des grains, ce qui est en accord avec les résultats de granulométrie décrits précédemment.

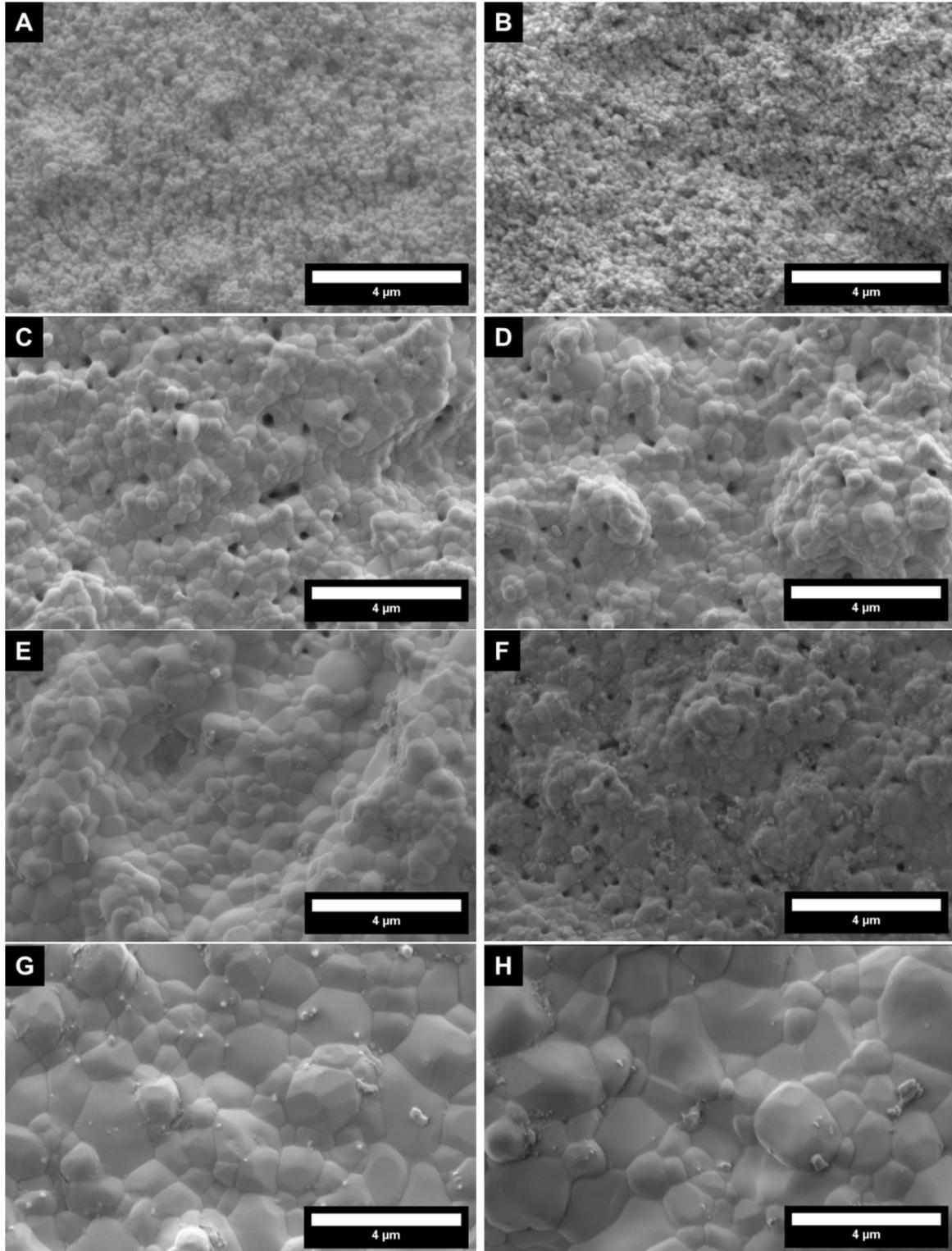


Figure 61 Images MEB de la microstructure des architectures en fonction des conditions de frittage (vue de dessus).

A et B : pièces séchées - C et D : pièces frittées à 1100 °C - E et F : pièces frittées à 1140 °C - G et H : pièces frittées à 1200 °C

Tableau 12 Évolution de la microporosité de surface en fonction de la température de frittage

Conditions de frittage	Aire totale mesurée (μm^2)	Aire totale des micropores (μm^2)	Taux de microporosité ouverte (%)
1100 °C	213	1,5	0,7
1140 °C	213	0,9	0,4
1200 °C	213	0,0	0,0

Tableau 13 Évolution de la taille des grains en fonction de la température de frittage

Conditions des pièces	Aire totale mesurée (μm^2)	Diamètre moyen des grains (nm)
Séchées	6,5	127 \pm 41
1100 °C	210	334 \pm 140
1140 °C	210	399 \pm 184
1200 °C	210	1027 \pm 475

Les deux premières micrographies (Figure 61. **A** et **B**) présentent l'aspect de surface des architectures séchées. Pour pouvoir être frittées par la suite, ces pièces séchées n'ont pas été métallisées rendant difficile l'analyse d'images. Néanmoins, les tailles des grains (127 \pm 41 nm - Tableau 13) sont en accord avec celle mesurée par granulométrie laser (Figure 36). De plus, les grains observés sont juste accolés les uns aux autres ce qui est caractéristique d'une microstructure non frittée.

De façon attendue, plus la température de frittage augmente, plus les micropores se ferment, le taux de microporosité diminue, plus les grains grossissent et plus les joints de grains sont définis. Des micropores sont observés uniquement pour les deux températures de frittage les plus faibles (Figure 61. **C**, **D**, **E** et **F**) avec un le taux moyen de microporosité ouverte pour les pièces frittées à 1140 °C est de 0,4 % contre 0,7 % pour les pièces frittées à 1100 °C, soit une augmentation de plus de 40 %. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui démontrent que à temps équivalent, plus la température de frittage augmente, plus la microporosité diminue [219], [245]. De plus, les tailles des grains à la surface des architectures frittées à 1100 °C et 1140 °C sont significativement moins importantes que celles des pièces frittées à 1200 °C (Figure 61. **C**, **D**, **E**, **F**, **G**). Leurs tailles moyennes sont respectivement de 334 \pm 140 nm, 399 \pm 184 nm et 1027 \pm 475 nm pour les températures de frittage de 1100 °C, 1140 °C et 1200 °C (Tableau 13). Si aucune différence significative n'est observée entre la taille moyenne des grains des pièces frittées à 1100 °C et 1140 °C, les pièces frittées à

1100 °C présentent une répartition plus homogène des micropores que celles à 1400 °C (Figure 61. **C** et **D**). Les pièces frittées à 1140 °C semblent présenter une hétérogénéité quant à la répartition des micropores. En effet, les micrographies **E** et **F** présentées sur la Figure 61 ont été réalisées sur la même architecture ce qui confirme l'hétérogénéité de surface. Les micrographies des pièces frittées à 1200 °C présentent des joints de grains parfaitement définis et aucune microporosité de surface n'est observée (Figure 61. **G** et **H**).

Pour conclure, les trois températures de frittage utilisées ont permis de moduler la microporosité de surface des architectures imprimées. Après traitement thermique à 1100 °C, les architectures présentent une taille de grains moyenne de 334 ± 140 nm et une microporosité de surface de l'ordre de 0,7 % répartie de façon homogène à la surface du matériau. L'augmentation de la température de frittage à 1140 °C a permis une légère, mais non significative, augmentation de la taille des grains (399 ± 184 µm) et diminue le taux de microporosité (0,4 %) de surface par rapport à 1100 °C. Cependant, à cette température, la taille des grains ainsi que la microporosité sont moins homogènes que pour 1100 °C. Pour finir, un traitement thermique à 1200 °C pendant 1 h est suffisant pour obtenir des pièces denses.

III.3. Conclusion

Des pièces ont été imprimées par micro-extrusion, des architectures en hydroxyapatite présentant, suite à leur frittage, une porosité multiéchelle.

Même si le changement de micro-extrudeuse a nécessité une diminution du taux de chargement des pâtes et des paramètres d'impression, l'utilisation de la nouvelle machine (ID-conception) permet d'imprimer rapidement des pièces conformes au cahier des charges et de façon reproductible. Cela a notamment été rendu possible par l'augmentation de la vitesse d'extrusion de 4 mm/s à 7 mm/s et à un meilleur contrôle de l'humidité relative ainsi qu'un meilleur contrôle de la température dans l'enceinte d'extrusion. Par ailleurs, l'utilisation d'une tête d'impression de volume plus important permet d'imprimer un grand nombre de pièce dont la qualité reste constante, tout au long de l'impression. Néanmoins il est impossible de remplir le réservoir au maximum, car la pâte sèche trop rapidement à l'intérieur. De plus, le volume mort est important ce qui entraîne une perte conséquente de pâte (11 %). Il serait donc pertinent d'utiliser un réservoir de taille réduite pour optimiser le chargement de la pâte et réduire le volume mort.

D'après les résultats des mesures rhéologiques en oscillation, l'affaissement selon l'axe z peut être lié aux propriétés rhéologiques de la pâte. Dans une optique d'optimisation, il pourrait être intéressant de revoir légèrement la formulation de la pâte d'hydroxyapatite pour éviter l'affaissement des pièces lors de leurs impressions. Pour cela, il faudrait modifier la

composition de l'hydrogel pour améliorer les propriétés thixotropes de la pâte. Qui qu'il en soit et même si la formulation de la pâte d'HA n'est pas totalement optimisée, les paramètres d'impression ont été améliorés et le nombre de pièces imprimables par session a été doublé afin d'avoir suffisamment de pièces conformes pour conduire les études en bioréacteur.

Pour la conception des architectures, une différence entre les dimensions du fichier CAO et celle des pièces finales a été mise en évidence. Elle est de l'ordre de 12 % suivant les axes x, y et de 29 % suivant l'axe z. En prenant en compte ces résultats, il serait pertinent de surdimensionner le fichier CAO pour que la pièce finale rentre parfaitement dans la chambre interne du bioréacteur, permettant de s'assurer que le milieu perfusé passe au travers de la pièce. Pour ce faire, les dimensions du fichier CAO devraient être de 11,36 mm x 11,36 mm x 11,27 mm.

Concernant le frittage des architectures, le retrait est quasiment identique (de 18% à 20 %) dans toutes les dimensions de la pièce, et ce, quelle que soit la température de frittage utilisée. Les dimensions finales des pièces sont davantage influencées par la taille de la buse et les paramètres du fichier numérique (espacement entre les filaments, taux d'écrasement entre les couches...) que par les conditions de séchage et de frittage [31], [32]. Néanmoins, les températures de frittage utilisées lors de ces travaux (1100 °C, 1140 °C et 1200 °C) ont permis de moduler la taille des grains ainsi que la microporosité ouverte à la surface des filaments constituant les architectures. Enfin, quelle que soit la température de frittage, les dimensions des architectures restent équivalentes avec un diamètre moyen des macropores de 426 µm (dans le plan xOy) et une taille moyenne de 8,7 mm x 8,7 mm x 5,3 mm et elles sont composées uniquement d'hydroxyapatite. Avec ces dimensions, les pièces ainsi obtenues permettent non seulement leur fonctionnalisation, mais facilitent également l'adhésion et la prolifération des cellules à la surface du matériau et peuvent facilement être insérées dans le bioréacteur une fois fonctionnalisées [10].

En conclusion, la seule différence entre les pièces imprimées et frittées réside dans leur microporosité de surface, ce qui confirme l'intérêt des différents cycles de frittage utilisés. La prochaine étape est donc de fonctionnaliser ces pièces pour savoir s'il est possible de libérer un principe actif au cours du temps et si la microporosité a un impact sur le chargement et/ou la libération de celui-ci.

Chapitre IV. Libération de la vancomycine par les architectures

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la cinétique de libération de la vancomycine par les architectures pour savoir si le profil de libération obtenu est adapté aux besoins physiologiques et thérapeutiques. En effet, les concentrations de vancomycine libérées par les architectures doivent être suffisantes pour empêcher le développement de bactéries à la surface du matériau, mais doivent restées inférieures au seuil toxique pour les différentes cellules présentes de la niche osseuse.

Pour étudier la cinétique de libération de la vancomycine et être au plus proche des conditions physiologiques, les architectures fonctionnalisées sont placées dans un bioréacteur à perfusion et du milieu de perfusion est collecté à intervalle régulier pour être analysé. Un protocole de prélèvement a été choisi de sorte à prélever suffisamment de milieu pour réaliser l'ensemble des analyses, sans perturber l'équilibre du système au sein du bioréacteur.

Ce chapitre décrit donc le développement d'un protocole de dosage de la vancomycine en solution, la formulation de l'hydrogel de vancomycine, l'évaluation de ses propriétés et la fonctionnalisation des architectures. Il y est également développé le protocole de prélèvement de milieu du bioréacteur, l'étude de ses limites et les cinétiques de libération de la vancomycine en conditions dynamiques. Bien que pertinent, les contraintes liées au choix du modèle ont nécessité une mise en équation des données afin d'obtenir les cinétiques de libération. Enfin, l'efficacité de la vancomycine a été évaluée sur une souche bactérienne de *Staphylococcus aureus* et sur des cellules de la niche osseuse : précurseurs ostéoblastiques, cellules endothéliales et monocytes.

Dans le but d'étudier les cinétiques de libération de la vancomycine par les architectures, trois étapes ont été nécessaires.

La première étape a donc été de choisir une méthode d'analyse qui permet de détecter et de quantifier précisément la vancomycine en solution à des concentrations relativement faibles (entre le ng/mL et le µg/mL). La chromatographie liquide haute performance (HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography* en anglais) a été sélectionnée en raison de sa grande sensibilité et de la reproductibilité de ses analyses. Le développement du protocole d'analyse a été une étape importante, car cette analyse doit être suffisamment courte pour permettre de traiter 18 échantillons par jour (jusqu'à 2 échantillons par ligne par jour) et permettre de détecter des concentrations de vancomycine comprises entre 1 µg/mL et 1 mg/mL. De plus, la vancomycine se dégrade au cours du temps dans le bioréacteur. Le protocole d'analyse doit donc être suffisamment sensible pour détecter et séparer la vancomycine dégradée et non dégradée.

La deuxième étape s'est concentrée sur la fonctionnalisation des architectures par la vancomycine. Pour avoir une libération au court du temps, la vancomycine est solubilisée dans un hydrogel biocompatible dont la rhéologie doit permettre à la fois le chargement et la libération de la vancomycine. Il doit donc être thermosensible pour pouvoir se dégrader et libérer le principe actif à 37 °C (conditions physiologiques), rhéofluidifiant pour pouvoir être manipulé et inséré dans les architectures, mais également suffisamment visqueux pour ne pas sortir de la pièce avant d'être placé en conditions physiologiques.

La dernière étape a été de développer un protocole de chargement des architectures par l'hydrogel de vancomycine, qui soit à la fois rapide et reproductible et qui ne dégrade ni l'hydrogel ni la vancomycine. L'objectif était de développer un protocole de chargement pouvant être réalisé en conditions stériles pour éviter tout risque de contaminations lors de l'utilisation de l'hydrogel.

IV.1. Détection et quantification de la vancomycine par chromatographie liquide haute performance

Sachant que l'équipement HPLC a été acquis par le laboratoire dans le cadre de ces travaux, il a dans un premier temps fallu définir un protocole d'analyse permettant de détecter la vancomycine en solution. Le but est donc de développer un protocole simple pour obtenir un pic de vancomycine bien défini. Cependant, détecter la vancomycine en solution ne suffit pas, il faut également pouvoir la quantifier, pour cela un étalon interne doit être ajouté dans chacun des échantillons analysés en HPLC. Il est ajouté en concentration connue et constante dans l'ensemble des échantillons à analyser et sert de référence pour assurer la reproductibilité de l'analyse et la fiabilité des concentrations mesurées.

IV.1.1. Généralité

La chromatographie liquide haute performance (HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography* en anglais) est une technique analytique permettant la séparation de composés en solution. L'échantillon à analyser est injecté dans le système et est entraîné par un solvant appelé phase mobile (ou éluant). Le rôle de la phase mobile est d'entraîner (éluer) l'échantillon au travers d'une colonne contenant des billes poreuses (phase stationnaire). La séparation des composés en solution s'effectue en fonction de l'affinité des constituants pour cette phase stationnaire. Plus l'affinité du composé est importante, plus il sera retenu par la colonne. Une fois les composés séparés par la colonne, ils passent au travers de détecteurs pour être identifiés et quantifiés. Ainsi dans le cas du développement d'une méthode de séparation optimale, il faut que les composés en solution présentent une affinité suffisante avec la phase stationnaire pour pouvoir être retenus par la colonne, que les pics du

chromatogramme soient correctement définis et séparés pour pouvoir identifier et quantifier les composés, et ce le plus rapidement possible.

Il est communément admis que le développement d'une méthode d'analyse chromatographique est un compromis entre trois paramètres cruciaux qui sont la rapidité, la sensibilité et la résolution de l'analyse (Figure 62). De façon évidente, la rapidité définit le temps de l'analyse. La sensibilité traduit la capacité du protocole à détecter de faibles quantités, plus la sensibilité augmente, plus la quantité détectable en analyte est faible. La résolution quant-à-elle, caractérise le temps entre l'élution de deux composés, plus la résolution est importante plus les composés seront séparés efficacement.

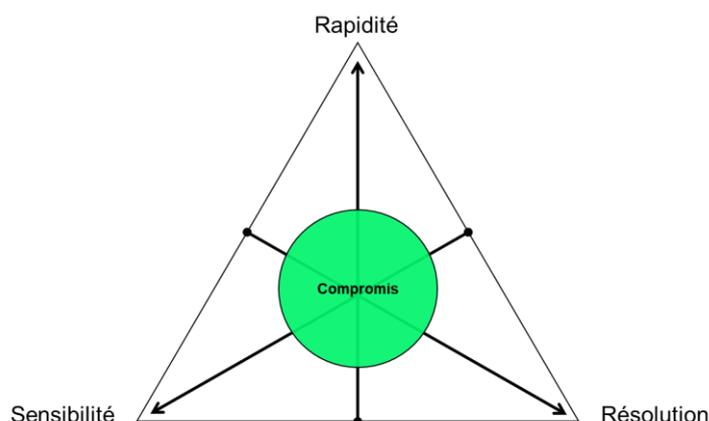


Figure 62 Triangle d'optimisation des compromis en chromatographie [246]

L'optimisation de ces trois paramètres est contradictoire, il est impossible d'en favoriser un sans qu'il n'y ait d'impact sur les autres. En effet, pour augmenter la sensibilité, il faut généralement augmenter la quantité de solution à injecter ce qui entraîne une saturation de la colonne. Cette saturation est due au fait que la quantité d'analytes présents dans la phase mobile est supérieure à la capacité de la colonne. Les billes de la phase mobile vont alors être saturées d'analytes qui ne seront pas ou peu retenus. Les pics seront alors plus larges (diminution de la résolution), et il faudra augmenter le temps d'analyse pour éviter le phénomène de saturation. À l'inverse, si le but est d'augmenter la résolution, les pics doivent être les plus fins possibles. Pour cela, il est possible de diminuer la quantité de solution injectée dans la colonne, afin d'éviter la saturation. Les produits restent donc plus longtemps dans la colonne, augmentant ainsi le temps d'analyse et faisant diminuer la sensibilité [246].

Par ailleurs et afin de caractériser les protocoles d'analyses et l'efficacité d'une séparation, différentes grandeurs sont à prendre en compte. Ces grandeurs peuvent être extraites directement du chromatogramme (Figure 63) ou indirectement par le calcul. Les valeurs obtenues dépendent du composé, du type de colonne et du protocole d'analyse mis en place.

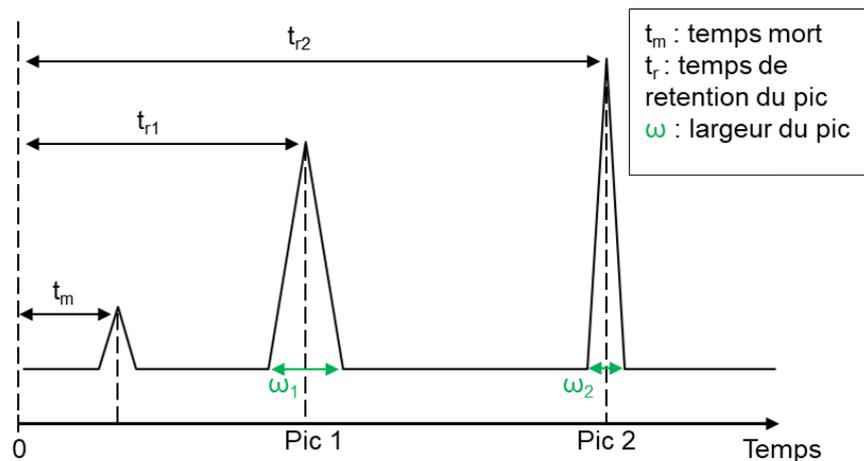


Figure 63 Schéma type d'un chromatogramme d'un mélange à deux composés séparés par HPLC

Le temps mort (t_m ou t_0) est le temps (en min) que met un composé non retenu pour traverser la colonne. En HPLC, t_m correspond au temps mis par la phase mobile pour passer de l'injecteur au détecteur, en passant par la colonne.

Le temps de rétention, noté t_r , est le temps (en min) que met un composé pour passer de l'injecteur au détecteur. Par convention, t_r est mesuré au sommet du pic. Il traduit l'affinité d'un soluté pour la phase stationnaire. S'agissant du temps écoulé entre l'injection et la détection du composé, plus le temps de rétention est important, plus le composé est retenu longtemps par la colonne et a d'affinité pour elle. Pour pouvoir séparer deux solutés, il faut que leur temps de rétention ne soit pas trop proche afin d'éviter que les pics ne se chevauchent.

Utilisée pour calculer la résolution, ω est une grandeur en minutes qui définit la largeur à la base du pic. Le temps mort (t_m) et le temps de rétention (t_r) permettent de calculer le volume mort (V_m), mais également le volume de rétention (V_r) pour chaque composé i (Équation 1). Ils correspondent respectivement au volume de phase mobile dans le système entre l'injecteur et le détecteur et au volume de phase mobile nécessaire pour élué un composé. Ces volumes peuvent être déterminés à l'aide de l'équation suivante :

Équation 1 Formule permettant de déterminer le volume de rétention

$$V_{ri} = t_{ri} \times D$$

Avec V_{ri} : le volume de rétention du composé i (en mL), t_{ri} : le temps de rétention du composé i (en min), D : le débit de phase mobile (en mL/min).

Lorsqu'au moins deux composés sont présents dans l'analysat, les grandeurs définies précédemment servent à calculer la résolution (R_s). Cette grandeur sans unité permet d'évaluer l'efficacité d'un protocole pour séparer les analytes (Équation 2) :

Équation 2 Formule permettant de déterminer la résolution

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{r2} - t_{r1}}{\omega_2 + \omega_1} \right)$$

Avec t_{r1} : le temps de rétention du composé 1 (en min), t_{r2} : le temps de rétention du composé 2, ω_1 : la largeur du pic à la base du composé 1 (en min), ω_2 : la largeur du pic à la base du composé 2 (en min).

D'après la formule ci-dessus, la résolution ne peut être utilisée que pour évaluer la séparation de deux pics consécutifs. Si $R_s \leq 1$ alors les pics ne sont pas correctement séparés, ils se chevauchent. Si $1 < R_s < 2$ la séparation est correcte, les pics ne se chevauchent pas. Lorsque $R_s \geq 2$, la séparation est correcte, mais elle est considérée comme trop importante, la distance entre les pics des deux composés à séparer peut alors être réduite dans le but de diminuer le temps d'analyse [247]. Cette séparation est nécessaire pour pouvoir quantifier la concentration d'un composé en solution. En effet, l'aire du pic est proportionnelle à sa concentration. Si deux composés ne sont pas correctement séparés, alors leurs aires seront confondues et il sera impossible de déterminer précisément leur concentration respective en solution.

IV.1.2. Mise en place du protocole de dosage de la vancomycine en solution

Dans le cadre de ces travaux, le protocole HPLC doit permettre de détecter et de quantifier la vancomycine en solution. Pour étudier précisément le profil de libération de la vancomycine en conditions dynamiques, des échantillons sont directement prélevés au sein du bioréacteur à perfusion avant d'être analysés par HPLC. Pour s'assurer de la fiabilité de la mesure et de la reproductibilité de l'analyse, un étalon interne doit être ajouté dans chacun des échantillons.

D'après le triangle d'optimisation présenté dans le paragraphe IV.1.1, le protocole d'analyse optimal doit être suffisamment rapide pour analyser plusieurs échantillons par jour (jusqu'à deux par jour et par ligne). La sensibilité doit être suffisante pour détecter la vancomycine libérée par les architectures. Enfin, la résolution doit permettre d'identifier et de quantifier la vancomycine et l'étalon interne de façon indépendante.

La versatilité de l'HPLC permet de modifier de nombreux paramètres du protocole d'analyse, tels que le choix de la colonne, le choix de la composition et du débit de la phase mobile, la température de la colonne, et le choix de l'étalon interne. Hormis la colonne qui a été acquise

pour séparer spécifiquement la vancomycine, l'ensemble des paramètres précédents ont été étudiés dans le but de développer un protocole d'analyse optimal.

Pour l'ensemble des essais présentés dans la suite de ces travaux, l'eau a été utilisé comme solvant et la proportion de phase mobile est donnée en pourcentage volumique. Les protocoles d'analyses respectent la nomenclature suivante présentée en Figure 64.

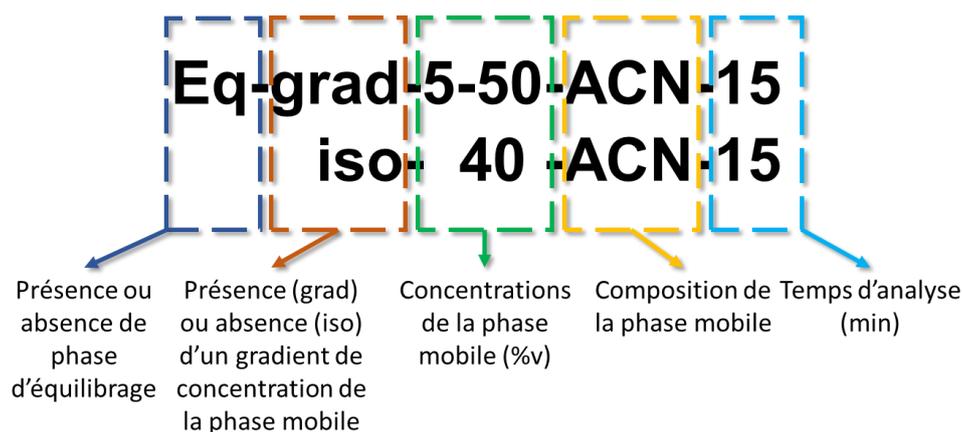


Figure 64 Illustration de la nomenclature utilisée lors de ces travaux pour décrire les protocoles HPLC.

Le premier terme (Eq) souligne la présence ou l'absence d'une phase d'équilibrage de la colonne avec la phase mobile en début et en fin d'analyse. Le deuxième terme (grad ou iso) décrit l'évolution de la composition de la phase mobile au cours de l'analyse : Grad signifie qu'un gradient de concentration est mis en place alors que le terme iso signifie que la concentration de la phase mobile reste inchangée durant toute l'analyse. Le terme en vert traduit la concentration en pourcentage volumique de la phase mobile. Dans le cadre d'un gradient de concentration, seules les valeurs minimales et maximales sont exprimées. Le terme en jaune décrit la composition de la phase mobile : ACN signifie que de l'acétonitrile est ajouté alors que Met signifie que la phase mobile est composée de méthanol. Pour finir, le dernier terme (en bleu) correspond au temps d'analyse en minute. Ainsi le protocole Eq-grad-5-50-ACN-15, cité en exemple sur la Figure 64, comprend une phase d'équilibrage de la colonne, un gradient de 5 %v à 50 %v d'acétonitrile et dure 15 min.

IV.1.2.1. Détection de la vancomycine en solution

Lors du développement d'une méthode d'analyse par HPLC, la première étape est de s'assurer que le protocole utilisé permette la détection de l'analyte d'intérêt. L'objectif ici est de développer un protocole permettant d'obtenir un pic bien défini de vancomycine pour faciliter l'intégration et en déterminer sa concentration dans l'échantillon.

Pour cela, des essais préliminaires ont été réalisés en faisant uniquement varier la composition de la phase mobile. Une solution de vancomycine a été réalisée à 20 µg/mL dans de l'eau osmosée. Le débit et la température ont été fixés respectivement à 0,3 mL/min et 30 °C. La phase mobile est composée d'eau osmosée contenant 0,1 %v d'acide formique et d'acétonitrile contenant également 0,1 %v d'acide formique. Le protocole a été mis au point par itération en faisant varier la quantité d'acétonitrile au sein de la phase mobile. Trois essais ont été réalisés, les protocoles d'analyses sont résumés en Figure 65.

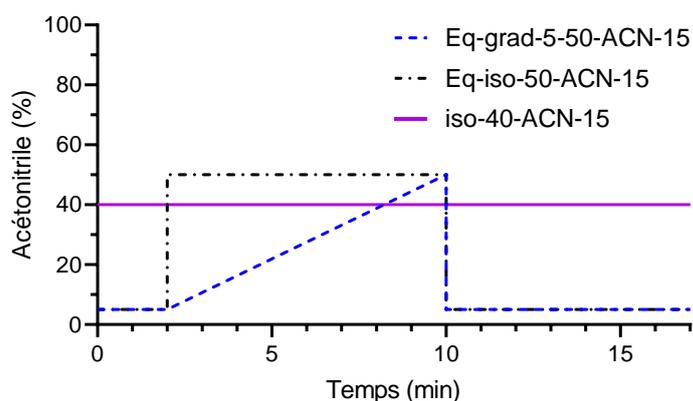


Figure 65 Variation des concentrations en acétonitrile dans les protocoles d'analyses mis en place pour détecter la vancomycine en solution

Le premier essai (**Eq-grad-5-50-ACN-15**), consiste en un gradient de 5 % à 50 % d'acétonitrile de 8 min. Il est encadré par deux phases à 5 % d'acétonitrile. Ces phases permettent l'équilibrage de la colonne, ce qui est censé améliorer la qualité des analyses dans le cas où de nombreux échantillons sont analysés consécutivement. Le deuxième essai (**Eq-iso-50-ACN-15**) est une analyse isocratique (c'est-à-dire à concentration constante) à 50 % d'acétonitrile. Il est également encadré par des phases d'équilibrages de la colonne. Le dernier essai (**iso-40-ACN-15**) est une analyse isocratique à 40 % d'acétonitrile, sans phase d'équilibrage.

Les chromatogrammes correspondants aux différents protocoles d'analyse décrits ci-dessus sont présentés en Figure 66. Même si l'ensemble des protocoles permettent de détecter la vancomycine en solution, les deux derniers essais (**Eq-iso-50-ACN-15** et **iso-40-ACN-15**) présentent une ligne de base asymétrique, ce qui peut poser problème pour quantifier la vancomycine en solution. Le protocole du premier essai (**Eq-grad-5-50-ACN-15**) semble donc être le plus intéressant pour ces travaux, malgré un temps de rétention de la vancomycine dans la colonne plus élevée ($t_r = 7,2$ min).

Le protocole Eq-grad-5-50-ACN-15 est donc retenu et servira de base pour les protocoles développés dans la suite de ces travaux.

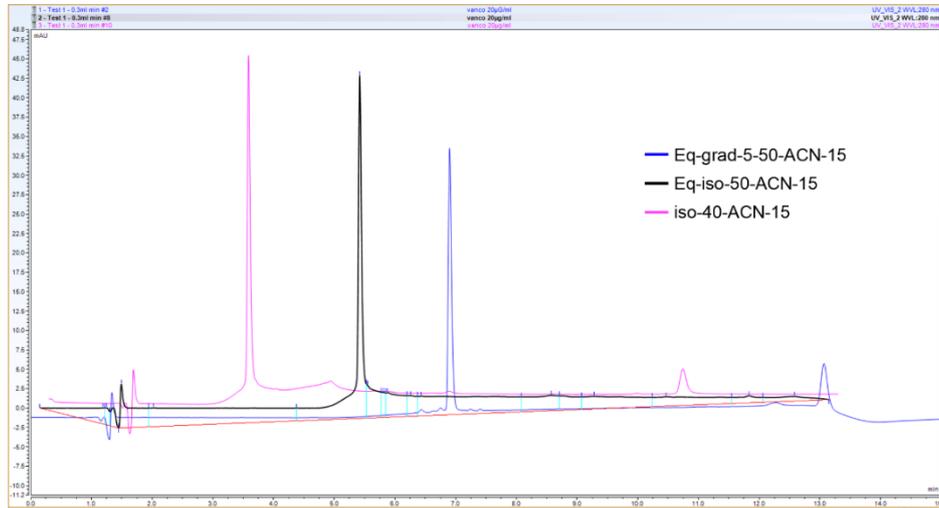


Figure 66 Chromatogrammes de la vancomycine en fonction du protocole d'analyse

IV.1.2.2. Détection de la vancomycine dégradée en solution

Lors des études de libération, la vancomycine va être placée pendant plusieurs jours dans un bioréacteur à perfusion à 37 °C, or la vancomycine n'est pas stable à cette température et elle se dégrade au cours du temps. En 2018, M. Cao *et al.* Se sont intéressés à la formation et à la composition des produits de dégradation de la vancomycine. Pour cela, ils ont dissous de la vancomycine dans différents milieux aqueux. Après 5 jours à 37 °C, les chromatogrammes présentaient entre 3 et 5 pics en fonction du milieu aqueux utilisés. Les résultats de cette étude sont présentés en Figure 67 [248].

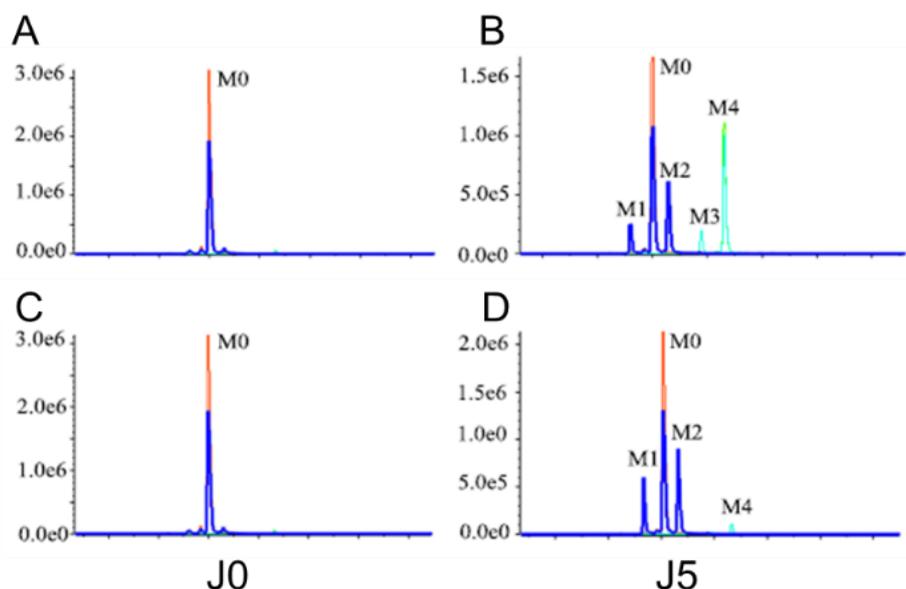


Figure 67 Chromatogrammes issus des travaux de Cao *et al.* présentant la dégradation de la vancomycine au cours du temps en fonction de la composition du milieu aqueux utilisé [248].

A : chromatogramme de la vancomycine solubilisée dans une solution de PBS et de $MgCl_2$ à J0, B : chromatogramme de la vancomycine solubilisée dans une solution de PBS et de $MgCl_2$ à J5, C : chromatogramme de la vancomycine solubilisée dans du PBS 1X à J0, D : chromatogramme de la vancomycine solubilisée du PBS 1X à J5.

Après 5 jours à 37 °C, 5 pics sont observables sur le chromatogramme de la vancomycine dissoute dans une solution contenant du PBS 1X et du $MgCl_2$, contre seulement 3 pour la vancomycine dissoute dans une solution ne contenant que du PBS 1X. Par conséquent, la formation des résidus issus de la dégradation de la vancomycine dépend non seulement de la température et du temps, mais également de la solution dans laquelle la vancomycine est dissoute. Cao *et al.* ont ensuite cherché à déterminer la structure moléculaire des différents résidus par spectrométrie de masse en utilisant un triple quadripôle. En comparant les fragments obtenus à l'aide du logiciel MetabolitePilot 2.0 software (AB Sciex, USA), ils ont pu déterminer les structures moléculaires les plus probables des différents résidus. Ceux-ci sont présentés en Figure 68 [248].

Dans le cadre de cette étude, et en se basant sur les résultats des travaux de M. Cao *et al.*, il est attendu d'observer les produits de dégradation de la vancomycine sur les chromatogrammes des échantillons issus du bioréacteur. Le protocole d'analyse doit alors permettre d'identifier, de quantifier et de séparer la vancomycine dégradée de la vancomycine non dégradée (dite « vancomycine native »).

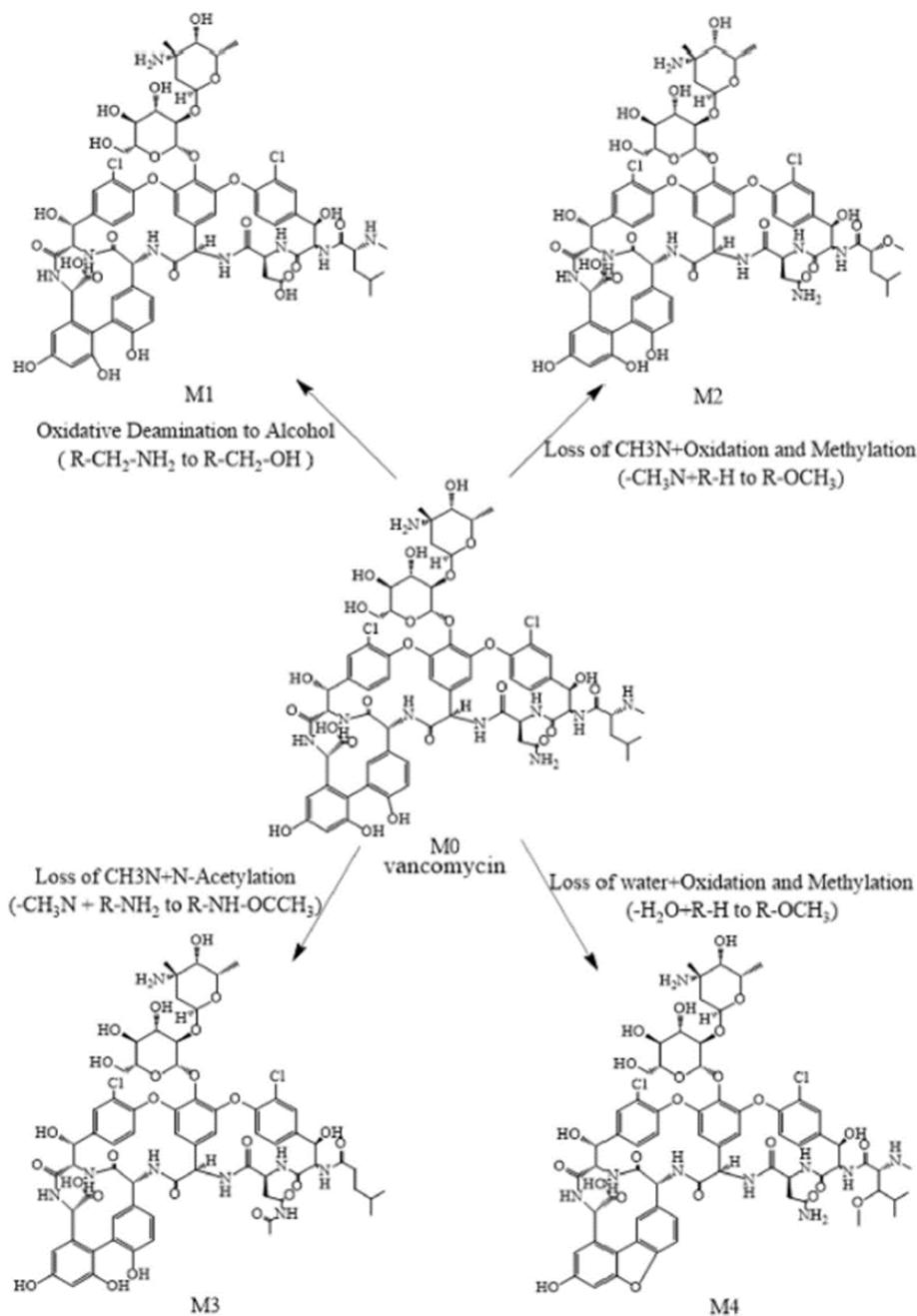


Figure 68 Structure chimique des différents produits de dégradation de la vancomycine issus des travaux de M. Cao *et al.* [248].

Pour simuler l'impact des conditions expérimentales sur la dégradation de l'antibiotique, une solution de vancomycine à 20 µg/mL dans de l'eau osmosée a été préparée avant d'être placée dans un incubateur à 37 °C pendant 7 jours. La solution a ensuite été analysée en utilisant le protocole Eq-grad-5-50-ACN-15 utilisé précédemment. Avec ce protocole, 5 pics ont été observés, correspondant à ceux décrits par M. Cao *et al.* (Figure 67. D). Cependant ils n'étaient pas suffisamment séparés, ce qui ne permettait pas de les identifier par spectrométrie

de masse. Afin d'améliorer la séparation, le protocole Eq-grad-5-50-ACN-15 a été légèrement modifié en augmentant le temps de gradient de 2 minutes. Le nouveau chromatogramme ainsi que le protocole d'analyse sont illustrés en Figure 69. Sur ce chromatogramme, 5 pics sont observables, les spectres de masse associés à chacun des pics sont présentés en Annexe 2. Le protocole Eq-grad-5-50-ACN-17 permet donc de séparer les différents résidus issus de la dégradation de la vancomycine en solution, mais il diminue la rapidité de l'analyse.

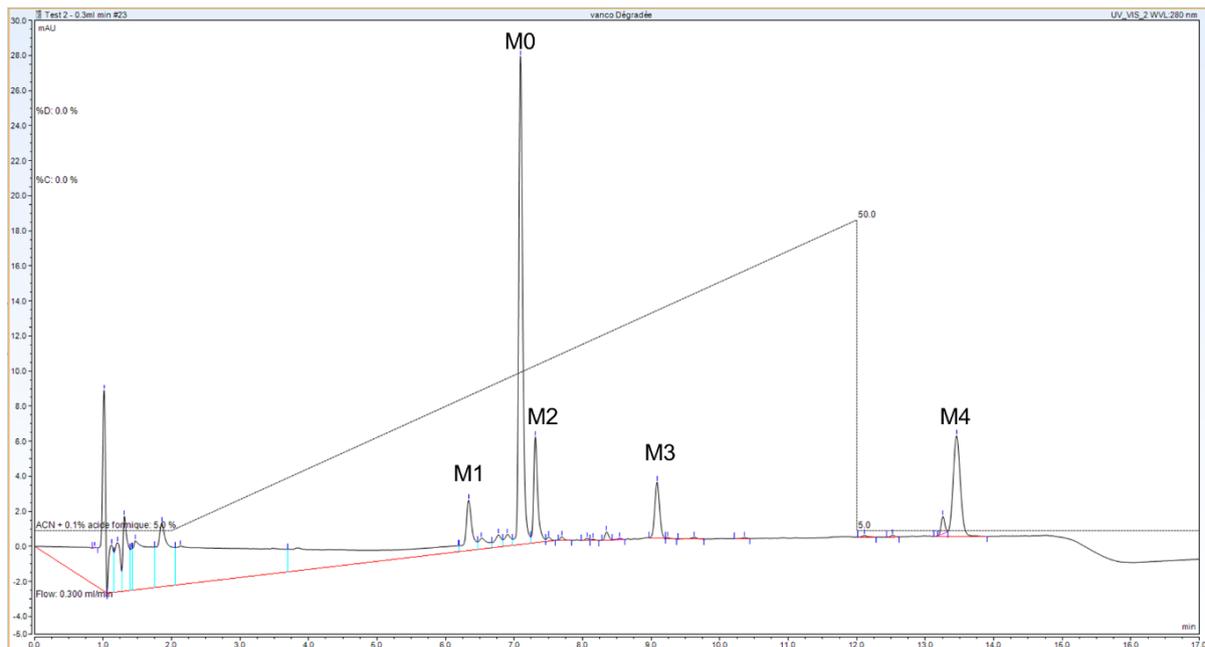


Figure 69 Chromatogramme caractéristique d'une solution aqueuse de vancomycine incubée pendant 7 jours à 37 °C.

Dans le cadre de ces travaux, au maximum 9 échantillons peuvent être prélevés en même temps (9 lignes de bioréacteur). Chaque échantillon est analysé trois fois consécutives par l'HPLC. Un temps d'analyse de 17 min permet d'analyser l'ensemble des échantillons en 7 h 40. Avec ce protocole, le dernier échantillon sera donc resté plus de 7 h en dehors du bioréacteur avant d'être analysé. Ce temps de latence entre prélèvement et analyse est d'autant plus important la première semaine d'analyse lorsque deux échantillons sont prélevés par ligne et par jour. Le temps d'analyse total est alors de plus de 15 h. La question est donc de savoir si, avec un temps d'analyse aussi long, les proportions en vancomycine native et dégradée mesurée dans l'échantillon correspondent à celles présentes dans le bioréacteur au moment du prélèvement.

En plus d'avoir caractérisé les différents produits de dégradation, M. Cao *et al.* ont étudié la dégradation de la vancomycine au cours du temps en fonction du milieu dans laquelle elle est

solubilisée. Dans le cadre de cette thèse, une condition est particulièrement intéressante, celle de la dégradation de la vancomycine dans du PBS 1X à 37 °C. En effet, dans le bioréacteur, les architectures fonctionnalisées sont perfusées avec du PBS 1X. D'après les résultats de M. Cao *et al.*, présentés en Figure 70, deux produits de dégradation de la vancomycine sont majoritairement formés (M1 et M2). Dans ces conditions, la vancomycine se dégrade progressivement au cours du temps. A J2, il reste 80% de vancomycine sous forme native contre 40 % à J10. Ainsi à J10, il y a presque autant de vancomycine native ($\approx 40\%$) que de résidus M2 ($\approx 35\%$) [248].

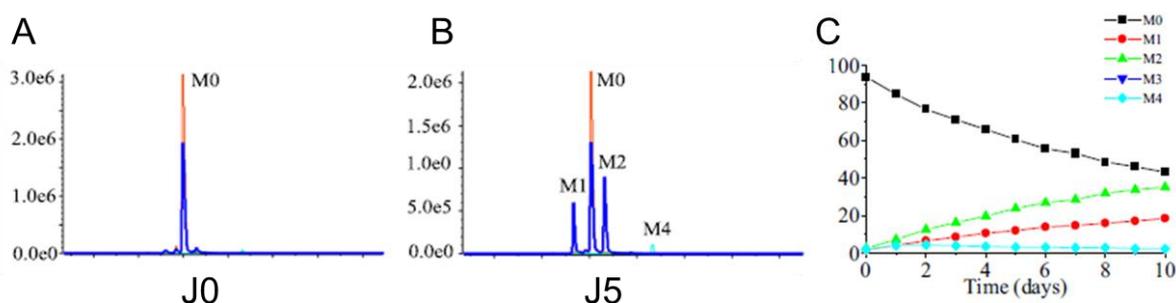


Figure 70 Dégradation de la vancomycine dans du PBS 1X au cours du temps, d'après les travaux de M. Cao *et al.* [248].

A : chromatogramme de la vancomycine solubilisée du PBS 1X à J0, B : chromatogramme de la vancomycine solubilisée du PBS 1X à J10, C : évolution de la proportion des différents produits de dégradation de la vancomycine du PBS 1X, au cours du temps.

La formation de ces résidus est à prendre en compte pour le développement des protocoles d'analyse utilisés lors de ces travaux. Par ailleurs, même si M. Cao *et al.* ont étudié et caractérisé les produits de dégradation de la vancomycine, aucune information n'est donnée concernant l'efficacité de ces résidus sur les bactéries.

IV.1.2.3. Choix de l'étalon interne

Comme expliqué précédemment, l'étalon interne est une molécule introduite en concentration connue et fixe dans l'échantillon à analyser. L'utilisation d'un étalon interne permet non seulement de s'assurer de la fiabilité de la mesure, mais également de s'assurer du bon fonctionnement de l'appareil [249].

Le rôle de l'étalon interne est de s'assurer que les concentrations mesurées en analytes correspondent à la concentration réelle dans l'échantillon et qu'il n'y a pas eu de problèmes lors de l'analyse (variation du volume d'injection, défaut de fonctionnement du détecteur...). Pour cela, l'étalon interne est ajouté en quantité égale et connue à l'ensemble des échantillons.

Sachant que sur un chromatogramme l'aire du pic d'un composé est proportionnelle à sa concentration, la taille, la forme et la position du pic de l'étalon interne doivent être identiques sur l'ensemble des chromatogrammes. Une variation lors de la quantification de l'étalon interne sera donc synonyme d'un problème lors de l'analyse.

Un composé utilisé en tant qu'étalon interne doit présenter des caractéristiques physico-chimiques similaires à celle du composé à analyser pour pouvoir être retenu par la colonne, mais suffisamment différentes pour pouvoir différencier les deux composés. L'étalon interne ne doit pas avoir d'impact sur la rétention du composé d'intérêt par la colonne [250].

Au cours de ces travaux, deux étalons internes ont été utilisés, la téïcoplanine pour sa composition chimique similaire à celle de la vancomycine et la caféine pour sa facilité d'utilisation. Les formules chimiques de ces deux molécules sont présentées sur la Figure 71.

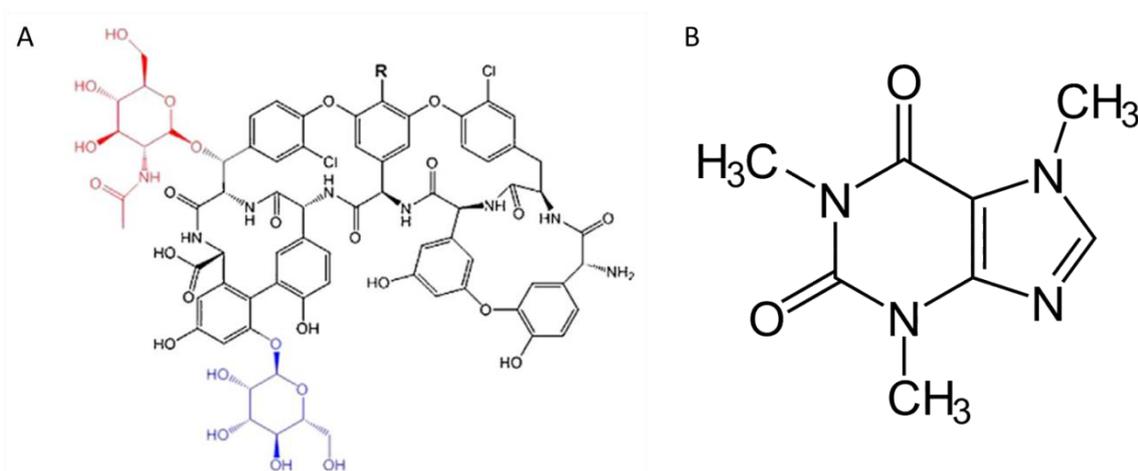


Figure 71 Structure chimique du glycopeptide A2-2 de la téïcoplanine (A) et de la caféine (B). Issus respectivement des travaux de *Marrubini et al.* [251] et de P.N. Patil [252].

IV.1.2.3.1. La téïcoplanine

Le premier étalon interne sélectionné a été la téïcoplanine en raison de sa structure chimique proche de celle de la vancomycine. Tout comme la vancomycine, la téïcoplanine, antibiotique glycopeptidique, est efficace sur les *Staphylocoques* [253].

Pour savoir si le protocole défini précédemment (Eq-grad-5-50-ACN-17) permet de détecter la téïcoplanine, une solution à 20 µg/mL de téïcoplanine a été préparée et analysée. Le chromatogramme est présenté en Figure 72. **A** et présente 6 pics.

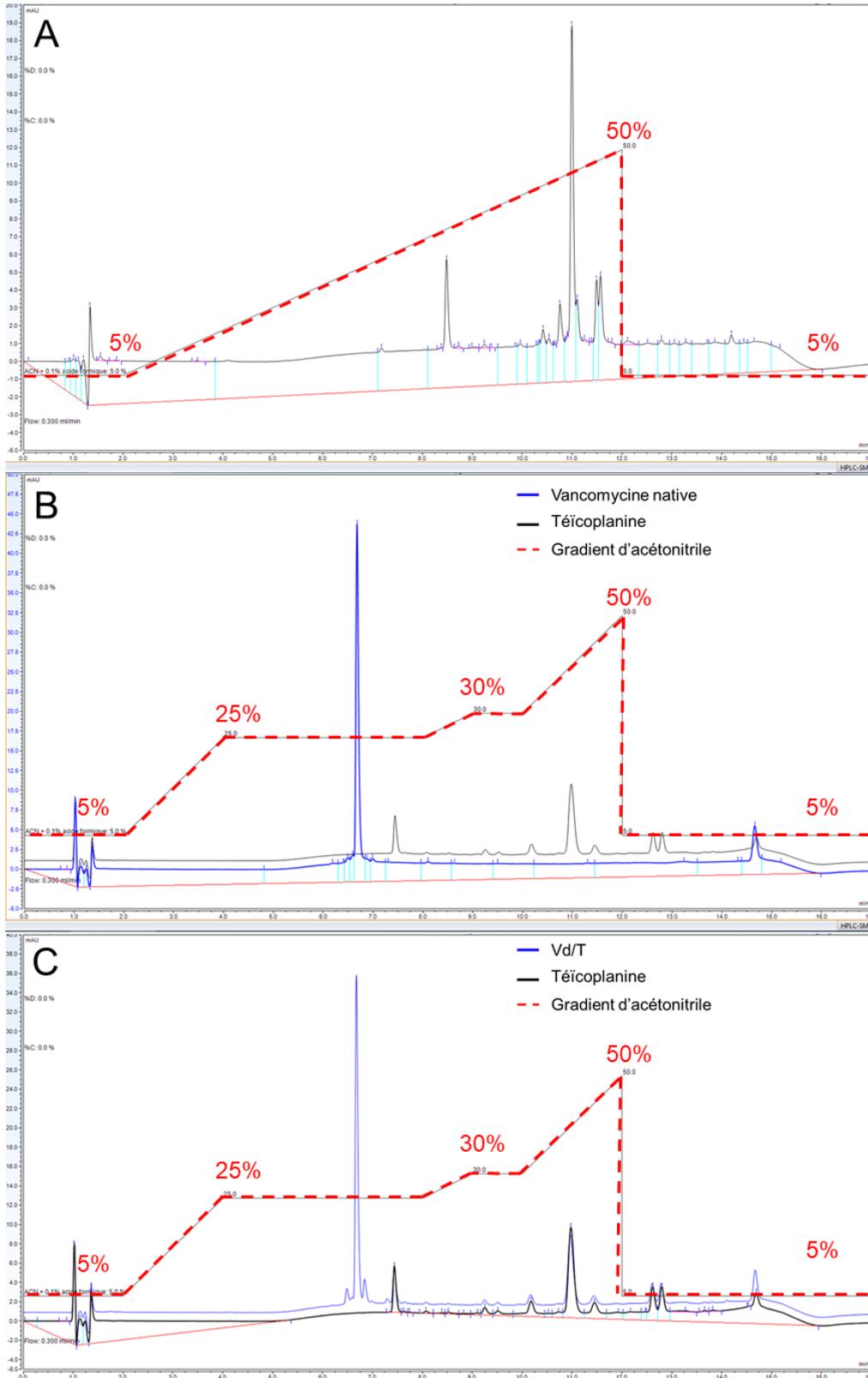


Figure 72 Chromatogrammes de la téicoplanine.

A : chromatogramme obtenu avec le protocole Eqgrad-5-50-ACN-17. B : chromatogramme de la vancomycine native et de la téicoplanine obtenu avec le protocole Eq-grad-25-50-ACN-17-10°C, C : chromatogramme de la vancomycine dégradée et de la téicoplanine (Vd/T) et de la téicoplanine obtenu avec le protocole Eq-grad-25-50-ACN-17-10°C

Les résultats observés correspondent aux différents glycopeptides qui composent la molécule [251], mais les pics ne sont pas parfaitement séparés, le gradient d'acétonitrile a donc été modifié de façon empirique jusqu'à obtenir une séparation satisfaisante.

Le protocole retenu est schématisé en Figure 72. **B** et **C**. Il reprend une partie du protocole Eq-grad-5-50-ACN-17 à savoir les phases d'équilibrage de la colonne et le temps d'analyse. Le gradient d'acétonitrile a été modifié pour améliorer la séparation des pics. Au-delà de la modification du gradient, la température de la colonne a également été baissée de 30 °C à 10 °C. En effet, baisser la température permet de diminuer la pression à l'intérieur de la colonne et donc d'augmenter le temps de rétention des composés. La nomenclature du protocole permettant d'analyser la téïcoplanine en solution est donc : Eq-grad-25-50-ACN-17-10°C. Dans le but de valider l'utilisation d'un protocole d'analyse, plusieurs points ont dû être considérés. La première étape est de s'assurer que le protocole permette la détection et la séparation de la vancomycine et de l'étalon interne. La seconde étape consiste à vérifier la pertinence du protocole en conditions expérimentales en étudiant une cinétique de libération.

Validation du protocole Eq-grad-25-50-ACN-17-10°C

Pour vérifier que le protocole Eq-grad-25-50-ACN-17-10°C permet la séparation et l'identification des pics de vancomycine native et de la téïcoplanine, deux solutions ont été préparées dans du PBS 1X contenant respectivement 20 µg/mL de vancomycine et 20 µg/mL de téïcoplanine. Les chromatogrammes associés sont présentés en Figure 72. **B**. D'après ces résultats, le protocole d'analyse Eq-grad-25-50-ACN-17-10°C permet une définition suffisante des pics de la téïcoplanine. De plus lorsque l'on compare les deux chromatogrammes (vancomycine native et téïcoplanine), il ne semble pas y avoir de superposition entre les pics de la téïcoplanine et celui de la vancomycine native (Figure 72. **B**).

Pour vérifier la résolution du protocole Eq-grad-25-50-ACN-17-10°C et s'assurer que les pics de vancomycine et de téïcoplanine ne se superposent pas, une solution contenant 20 µg/mL de vancomycine dégradée (7 jours à 37 °C) et 20 µg/mL de téïcoplanine a été analysée. Les chromatogrammes correspondants sont présentés en Figure 72. **C**. D'après les résultats obtenus, aucun décalage de pics n'est observé entre la vancomycine et téïcoplanine. Cela signifie que la téïcoplanine n'interagit ni avec la forme native de la vancomycine ni avec ses produits de dégradation. De plus, les pics de vancomycine et de téïcoplanine sont suffisamment séparés pour pouvoir être intégrés de façon indépendante.

D'après le cahier des charges établi précédemment (paragraphe IV.1.1), la résolution du protocole Eq-grad-25-50-ACN-17-10°C est suffisante pour séparer, identifier et quantifier les pics de téïcoplanine et de vancomycine (native et dégradée). De plus, le temps d'analyse

permet d'analyser l'ensemble des échantillons en moins de 24 h, ce qui peut limiter l'altération de la vancomycine en dehors du bioréacteur.

La téicoplanine peut donc être utilisée en tant qu'étalon interne même si la présence des différents pics sur son chromatogramme risque de rendre l'intégration plus difficile.

Premiers essais sur une cinétique de libération

Pour évaluer la sensibilité du protocole Eq-grad-5-50-ACN-17-10°C, les premiers essais de cinétique de libération en conditions dynamiques ont pu être effectués. Pour cela, des architectures ont été fonctionnalisées, placées dans le bioréacteur et du milieu circulant a été collecté selon le protocole décrit dans le paragraphe II.3.2. Les résultats sont présentés sur la Figure 73.

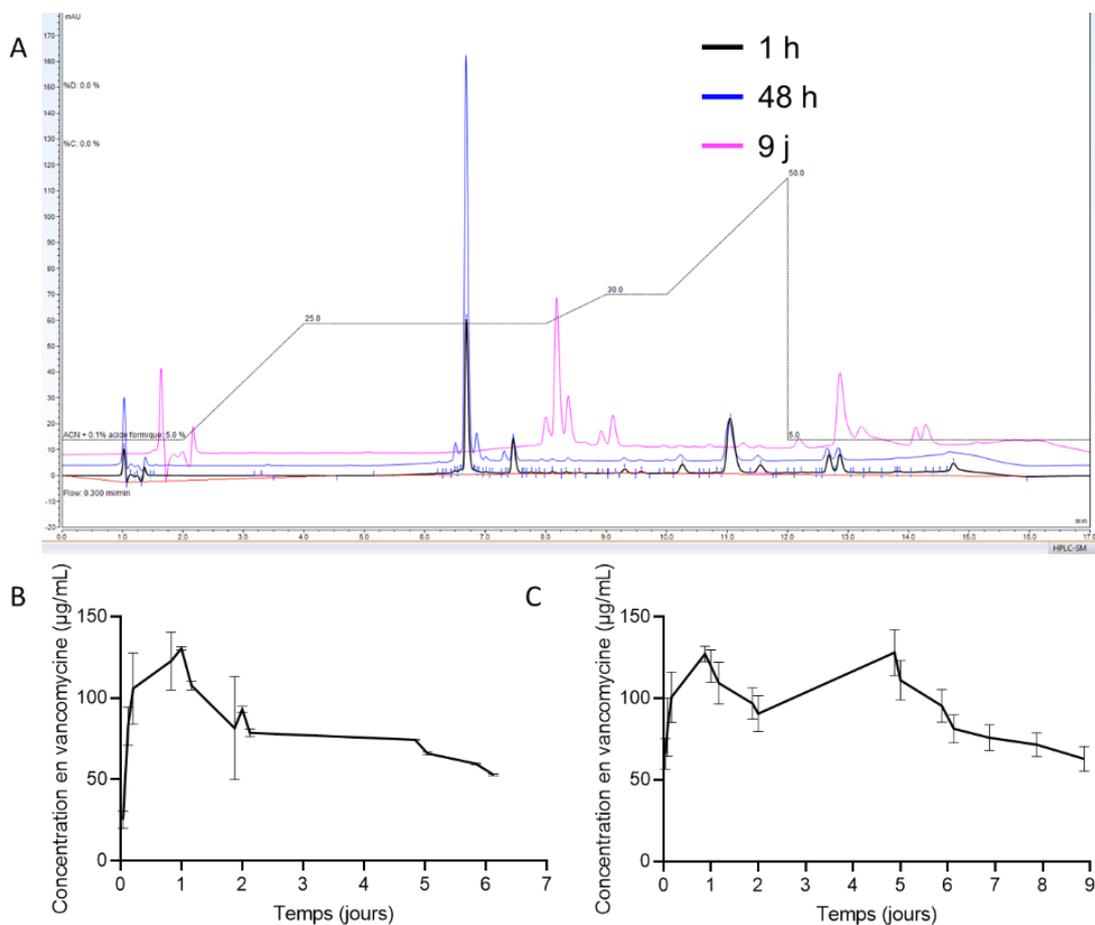


Figure 73 Résultats des deux premières campagnes de libération.

A : Chromatogrammes caractéristiques de la vancomycine en fonction du temps dans le bioréacteur, B : Profil de la cinétique de libération de la première campagne de libération, C : Profil de la cinétique de libération de la deuxième campagne de libération. Pour la première campagne 3 pièces et lignes indépendantes ont été utilisées. Pour la deuxième campagne 4 pièces et lignes indépendantes ont été utilisées.

L'ensemble des chromatogrammes obtenus sont identiques à ceux illustrés en Figure 73. **A**. Cela signifie que la résolution du protocole d'analyse HPLC est suffisante, car elle permet de détecter la vancomycine en solution libérée par l'architecture et cela durant l'intégralité de l'expérience. Les courbes représentant l'évolution des concentrations en vancomycine au cours du temps, dans les prélèvements ont donc pu être tracées (Figure 73. **B** et **C**).

Comme décrit par M. Cao *et al.*, la vancomycine se dégrade au court du temps dans le bioréacteur et les premiers résidus de dégradation sont observables à partir du prélèvement effectué à 48h (Figure 73. **A**-courbes bleu et rose) [248]. Durant la deuxième campagne de libération, un décalage de pic est observé entre les premiers et les derniers prélèvements. La première hypothèse avancée est que la vancomycine se dégrade en solution ce qui impacte son affinité pour la phase stationnaire de la colonne. Cependant, le chromatogramme de l'échantillon après 9 jours dans l'incubateur présente un décalage du pic de vancomycine, mais également de celui de la téïcoplanine et du volume mort. Il est donc plus probable que le passage de nombreux échantillons (33 pour une campagne de 7 jours⁵) entraîne une saturation ou une obstruction partielle de la colonne, ce qui impacte le passage de la phase mobile. De plus, la diminution de la température dans la colonne à 10 °C entraîne une cristallisation partielle du PBS dans la colonne, ce qui peut l'obstruer et dégrader progressivement la qualité de l'analyse. Compte tenu du nombre important d'échantillons à analyser (jusqu'à 60 par jour⁶), un protocole de nettoyage de la colonne doit être mis en place pour éviter les phénomènes de saturation et d'obstruction. Cette étape bien que nécessaire augmente considérablement le temps d'analyse.

En conclusion, la téïcoplanine est un analogue de la vancomycine qui peut être utilisé en tant qu'étalon interne. Le protocole Eq-grad-5-50-ACN-17-10°C présente une résolution suffisante pour séparer les pics de vancomycine (native et dégradée) et de téïcoplanine. Cependant, l'utilisation de cet étalon interne nécessite l'intégration de 6 pics sur le chromatogramme auquel s'ajoutent les 3 pics correspondants à la vancomycine native et dégradée. Au-delà de compliquer le dosage de la vancomycine libérée par l'architecture, la séparation de l'ensemble de ces pics requière de diminuer la température de la colonne, entraînant une cristallisation partielle du PBS 1X, ce qui peut endommager l'équipement sur le long terme. Dans le cadre de ces travaux, la téïcoplanine n'est donc pas un étalon pertinent.

⁵ Calculé pour 2 échantillons par ligne par jour sur une période de 5 jours avec 3 lignes et 3 mesures de blancs ($2 \times 3 \times 5 + 3 = 33$)

⁶ Calculé pour 9 lignes avec 2 échantillons par ligne par jour et chacun des échantillons est analysés 3 fois. Auxquels sont ajoutés 3 mesures de blanc et 3 mesures de blanc + étalon interne ($9 \times 2 \times 3 + 6 = 60$)

IV.1.2.3.2. La caféine

Le second étalon interne utilisé a été la caféine qui est une petite molécule couramment utilisée en HPLC-SM, car elle est stable au cours du temps, qu'elle peut être utilisée avec différentes phases mobiles, qu'elle est détectable à différentes longueurs d'onde UV et qu'elle est facilement identifiable par spectrométrie de masse [252].

Détection de l'étalon interne

Différents protocoles ont été mis en place pour identifier celui permettant de séparer au mieux la caféine et la vancomycine en solution. L'objectif étant d'avoir la méthode d'analyse la plus simple possible, l'impact de la composition de la phase mobile a dans un premier temps été testé. L'ensemble des essais réalisés sont présentés dans le Tableau 14. Pour l'ensemble de ces essais, la température de la colonne a été fixée à 30 °C, afin d'éviter la cristallisation du PBS 1X.

Deux phases mobiles ont été testées : l'acétonitrile (ACN) et le méthanol (MetOH), à différentes concentrations dans de l'eau. Les protocoles des essais 1 à 27 ont permis de prouver qu'il était possible de détecter la caféine en solution. Ces protocoles n'ont pas permis de séparer convenablement la caféine et la vancomycine, mais ont servi à déterminer les paramètres optimaux pour la séparation des deux composés. Quelle que soit la phase mobile utilisée (acétonitrile ou méthanol), la diminution de la proportion de ces solvants semble améliorer la séparation entre les deux molécules. De plus, à concentration équivalente, l'acétonitrile semble mieux séparer les composés que le méthanol. L'acétonitrile sera donc utilisé pour le reste du développement du protocole d'analyse. La concentration en acétonitrile a progressivement été diminuée jusqu'à ce que la séparation entre la caféine et la vancomycine n'évolue plus. La concentration optimale en acétonitrile dans la phase mobile a donc été déterminée à 31 %v (Eq-iso-31-ACN-0,3-17), par ailleurs il est possible d'améliorer la séparation entre les différents composés en diminuant le débit de la phase mobile. Pour cela, la concentration en acétonitrile a été maintenue constante et le débit a été progressivement diminué. Plus le débit diminue, meilleure est la séparation entre les deux composés. Cependant, cette séparation n'évolue plus au-delà de 0,22 mL/min.

Tableau 14 Résumés des paramètres testés pour séparer la vancomycine et la caféine en solution

N° essais	Nomenclature	Phase mobile	Débit de la phase mobile (mL/min)	Temps d'analyse	Équilibrage colonne
1	Eq-iso-90-ACN-0,3-17	ACN-90%	0,3	17 min	Oui : 5% ACN
2	Eq-iso-80-ACN-0,3-17	ACN-80%	0,3	17 min	Oui : 5% ACN
3	Eq-iso-70-ACN-0,3-17	ACN-70%	0,3	17 min	Oui : 5% ACN
4	Eq-iso-60-ACN-0,3-17	ACN-60%	0,3	17 min	Oui : 5% ACN
5	Eq-iso-50-ACN-0,3-17	ACN-50%	0,3	17 min	Oui : 5% ACN
6	Eq-iso-40-ACN-0,3-17	ACN-40%	0,3	17 min	Oui : 5% ACN
7	Eq-iso-100-MET-0,3-17	MetOH-100%	0,3	17 min	Oui : 5% MetOH
8	Eq-iso-90-MET-0,3-17	MetOH-90%	0,3	17 min	Oui : 5% MetOH
9	Eq-iso-80-MET-0,3-17	MetOH-80%	0,3	17 min	Oui : 5% MetOH
10	Eq-iso-70-MET-0,3-17	MetOH-70%	0,3	17 min	Oui : 5% MetOH
11	Eq-iso-60-MET-0,3-17	MetOH-60%	0,3	17 min	Oui : 5% MetOH
12	Eq-iso-50-MET-0,3-17	MetOH-50%	0,3	17 min	Oui : 5% MetOH
13	Eq-iso-40-MET-0,3-17	MetOH-40%	0,3	17 min	Oui : 5% MetOH
14	Eq-iso-30-MET-0,3-17	MetOH-30%	0,3	17 min	Oui : 5% MetOH
15	Eq-iso-35-ACN-0,3-17	ACN-35%	0,3	17 min	Oui : 5% ACN
16	Eq-iso-34-ACN-0,3-17	ACN-34%	0,3	17 min	Oui : 5% ACN
17	Eq-iso-33-ACN-0,3-17	ACN-33%	0,3	17 min	Oui : 5% ACN
18	Eq-iso-32-ACN-0,3-17	ACN-32%	0,3	17 min	Oui : 5% ACN
19	Eq-iso-31-ACN-0,3-17	ACN-31%	0,3	17 min	Oui : 5% ACN
20	Eq-iso-35-ACN-0,29-17	ACN-35%	0,29	17 min	Oui : 5% ACN
21	Eq-iso-35-ACN-0,28-17	ACN-35%	0,28	17 min	Oui : 5% ACN
22	Eq-iso-35-ACN-0,27-17	ACN-35%	0,27	17 min	Oui : 5% ACN
23	Eq-iso-35-ACN-0,26-17	ACN-35%	0,26	17 min	Oui : 5% ACN
24	Eq-iso-35-ACN-0,25-17	ACN-35%	0,25	17 min	Oui : 5% ACN
25	Eq-iso-35-ACN-0,24-17	ACN-35%	0,24	17 min	Oui : 5% ACN
26	Eq-iso-35-ACN-0,23-17	ACN-35%	0,23	17 min	Oui : 5% ACN
27	Eq-iso-35-ACN-0,22-17	ACN-35%	0,22	17 min	Oui : 5% ACN
28	Eq-iso-31-ACN-0,21-17	ACN-31%	0,21	17 min	Oui : 5% ACN
29	Iso-31-ACN-0,22-10	ACN-31%	0,22	10 min	Non

ACN : Acétonitrile MeOH : Méthanol

En conclusion, d'après l'ensemble des essais réalisés, le protocole optimal pour pouvoir séparer la caféine et la vancomycine sans modifier la colonne et la température (30 °C) correspond à l'essai n°28 (Eq-iso-31-ACN-0,21-17) qui est présenté en Figure 74.

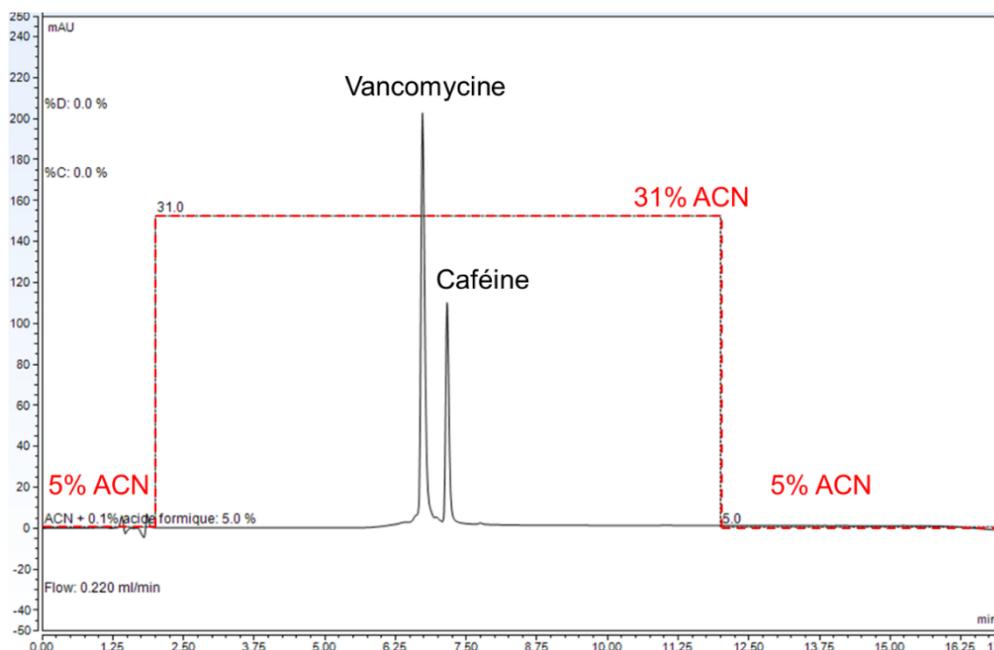


Figure 74 Chromatogramme et protocole de séparation de la caféine et de la vancomycine en solution

Optimisation du protocole Eq-iso-31-ACN-0,21-17

Le protocole Eq-iso-31-ACN-0,21-17 permet de séparer la vancomycine native de la caféine. Un seul pic correspondant à la caféine est observé sur le chromatogramme (Figure 74), ce qui permet de simplifier le protocole d'analyse, mais également l'intégration de l'étalon interne. Cependant, le temps d'analyse reste inchangé. Sachant que les deux composés sont élués en moins de 8 minutes, la durée du protocole d'analyse devrait donc pouvoir être réduite.

Pour évaluer la sensibilité du protocole Eq-iso-31-ACN-0,21-17, une campagne de libération de la vancomycine a été effectuée en utilisant ce protocole, elle sera décrite plus en détails dans le paragraphe IV.4.1. Afin de protéger la colonne, un protocole de nettoyage a également été mis en place consistant à rincer la colonne avec du méthanol pur pendant 20 min à un débit de 0,3 mL/min suivi d'acétonitrile pur pendant 20 min à un débit de 0,3 mL/min. Le nettoyage est effectué tous les jours, après chaque série de prélèvement et aucun décalage de pics n'a été observé depuis qu'il a été mis en place.

À partir de 48h les pics correspondants à la vancomycine dégradée sont observables sur le chromatogramme, cependant, la proximité des pics des résidus de vancomycine et de celui de la caféine compliquent l'intégration des pics et donc la quantification précise de la vancomycine libérée par l'architecture.

Bien que le protocole Eq-iso-31-ACN-0,21-17 soit suffisamment sensible pour détecter la vancomycine libérée par les architectures dans le bioréacteur, la rapidité ainsi que la résolution du protocole d'analyse est à optimiser afin d'améliorer la séparation entre la vancomycine dégradée et la caféine, tout en réduisant le temps d'analyse. Pour cela, une solution de vancomycine à 100 µg/mL a été préparée puis placée à 37 °C pendant 7 jours. Ensuite de la caféine a été ajoutée pour obtenir une concentration finale de 5 µg/mL. La solution a alors été analysée par HPLC en faisant varier les paramètres d'analyses selon le Tableau 15. L'ensemble de ces essais ont été réalisés en condition isocratique sans équilibrage de la colonne et la température de la colonne a été fixée à 30 °C.

Tableau 15 Définition des paramètres de séparation optimaux des pics de vancomycine et de la caféine

N° Essais	Nomenclature	Phase mobile	Débit (mL/min)	Temps d'analyse
1	Iso-100-ACN-0,3-17	ACN-100%	0,3	17 min
2	Iso-90-ACN-0,3-17	ACN-90%	0,3	17 min
3	Iso-80-ACN-0,3-17	ACN-80%	0,3	17 min
4	Iso-70-ACN-0,3-17	ACN-70%	0,3	17 min
5	Iso-60-ACN-0,3-17	ACN-60%	0,3	17 min
6	Iso-50-ACN-0,3-17	ACN-50%	0,3	17 min
7	Iso-40-ACN-0,3-17	ACN-40%	0,3	17 min
8	Iso-30-ACN-0,3-17	ACN-30%	0,3	17 min
9	Iso-20-ACN-0,3-17	ACN-20%	0,3	17 min
10	Iso-10-ACN-0,3-17	ACN-10%	0,3	17 min
11	Iso-10-ACN-0,2-10	ACN-10%	0,2	10 min
12	Iso-10-ACN-0,18-10	ACN-10%	0,18	10 min
13	Iso-10-ACN-0,16-10	ACN-10%	0,16	10 min
14	Iso-10-ACN-0,14-10	ACN-10%	0,14	10 min
15	Iso-10-ACN-0,12-10	ACN-10%	0,12	10 min
16	Iso-10-ACN-0,10-10	ACN-10%	0,10	10 min

ACN : acétonitrile

Comme pour les essais précédents, la diminution de la concentration en acétonitrile favorise la séparation entre la vancomycine et la caféine, 10 % d'acétonitrile semble donc être la concentration optimale pour pouvoir séparer les deux composés. Les chromatogrammes obtenus en appliquant les paramètres du Tableau 15 sont présentés en Figure 75.

Le premier chromatogramme (Figure 75. **A**) correspond au protocole Iso-10-ACN-0,3-17 (Essai n°10) du Tableau 15. Les trois premiers pics correspondent à ceux de la vancomycine dégradée et le dernier à la caféine. Les pics sont donc correctement séparés. De plus le temps de rétention du dernier pic est d'environ 5 minutes, ce qui signifie que la caféine et la

vancomycine sortent de la colonne en moins de 5 minutes. Compte tenu de ces résultats, le temps d'analyse a été réduit à 10 minutes.

Pour le protocole Iso-10-ACN-0,2-10 (essai n°11), le débit et le temps d'analyse ont été respectivement réduits à 0,2 mL/min et 10 min. Le chromatogramme obtenu est illustré en Figure 75. **B**. Les pics sont toujours correctement définis et séparés. Dans ces conditions, 10 minutes d'analyse sont suffisantes pour identifier et quantifier la vancomycine présente en solution.

D'autres essais ont été réalisés en faisant varier le débit de la phase mobile. Comme constaté sur le chromatogramme de la Figure 75. **C** (Essai n°13 : Iso-10-ACN-0,16-10), même si la diminution du débit n'améliore pas la séparation puisqu'elle décale les temps de rétention proportionnellement à celui du temps mort, elle limite le risque de saturation de la colonne, et à temps d'analyse constant, réduit la consommation de la phase mobile.

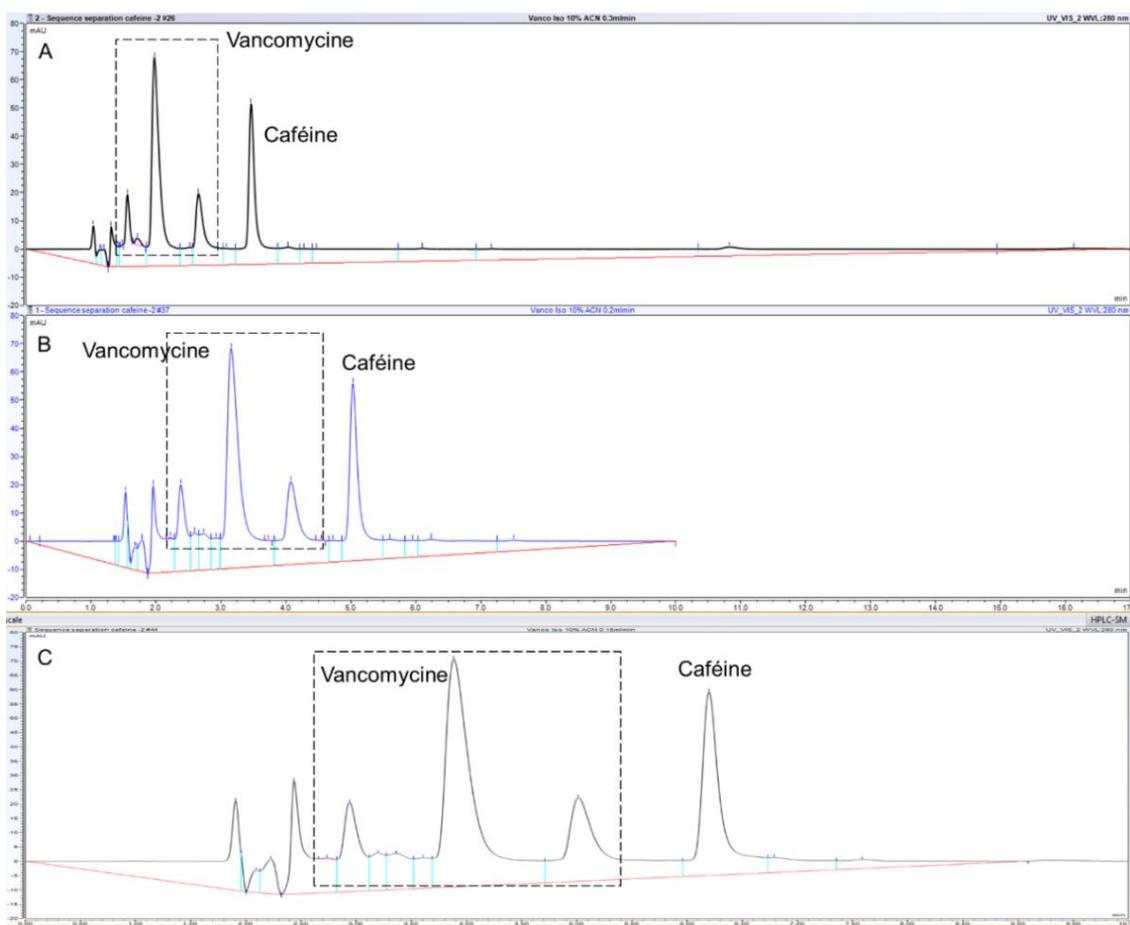


Figure 75 Chromatogrammes de la vancomycine dégradée et de la caféine obtenus en utilisant un protocole isocratique avec une phase mobile contenant 10% d'acétonitrile.

A : chromatogramme de l'essai n°10 : Iso-10-ACN-0,3-17, B : chromatogramme de l'essai n°11 : Iso-10-ACN-0,2-10, C : chromatogramme de l'essai n°13 : Iso-10-ACN-0,16-10.

Le protocole retenu est donc celui de l'essai n°13 : Iso-10-ACN-0,16-10. Le débit est de 0,16 mL/min, la phase mobile est composée d'eau, de 10 %v d'acétonitrile et de 0,1 %v d'acide formique et la température de la colonne est fixée à 30 °C. Ce dernier protocole est le meilleur compromis afin de ne pas changer de colonne, de phase mobile ou d'étalon interne. Les pics sont suffisamment séparés pour pouvoir être identifiés et quantifiés individuellement. Par ailleurs, un temps d'analyse de 10 minutes facilite également le traitement quotidien des échantillons. En effet, dans le cadre de ces travaux, un maximum de 9 échantillons peuvent être prélevés en même temps (9 lignes de bioréacteur). Chaque échantillon est analysé trois fois consécutives par l'HPLC. Un temps d'analyse de 10 min permet d'analyser l'ensemble des échantillons en 4 h 30, ce qui limite la potentielle dégradation de la vancomycine en dehors du bioréacteur. Le temps d'analyse est d'autant plus crucial la première semaine d'analyse lorsque deux échantillons sont prélevés par ligne et par jour. Le temps d'analyse totale est alors à 9 h.

IV.1.3. Conclusion

En conclusion, la méthode HPLC permet d'identifier et de quantifier la vancomycine en solution. La qualité de l'analyse dépend directement du protocole mis en place. L'ensemble des paramètres du protocole sont à prendre en compte pour développer une méthode d'analyse adaptée. Le protocole doit donc être un compromis entre résolution, rapidité et sensibilité d'analyse et doit être adapté en fonction des besoins liés aux conditions expérimentales.

Il a été confirmé que la vancomycine libérée par les architectures se dégrade au cours du temps. Le protocole d'analyse doit donc permettre de détecter, de quantifier et de séparer la vancomycine native, la vancomycine dégradée et l'étalon interne.

Concernant le choix de l'étalon interne, bien que la téïcoplanine soit un analogue de la vancomycine, les différents glycopeptides qui composent la molécule sont observables sur le chromatogramme. Cela nécessite le développement d'un protocole d'analyse complexe et long, et complique l'intégration des pics. L'utilisation de la téïcoplanine en tant qu'étalon interne n'est donc pas adaptée pour ces travaux. *A contrario*, la caféine présente de nombreux avantages, il s'agit d'une petite molécule pouvant être analysée au moyen de protocoles relativement simples. L'utilisation de la caféine a permis de simplifier et de réduire la durée du protocole d'analyse de 17 à 10 minutes par échantillon. Sachant qu'au maximum 54 analyses sont effectuées par jour, elles peuvent être effectuées en 10 heures, contre plus de 15 heures avec les autres protocoles. Différentes phases mobiles ont été utilisées et à concentration égale, l'acétonitrile permet une meilleure séparation des composés en solution que le méthanol. La vancomycine et la caféine étant des molécules particulièrement solubles dans

l'eau, une concentration d'acétonitrile de 10 %v est suffisante pour avoir une séparation optimale des différents composés.

La diminution de la température de la colonne permet de diminuer la pression à l'intérieur de la colonne et donc d'augmenter le temps de rétention des composés. Cependant, l'emploi de PBS 1X (milieu tamponné salin) dans le bioréacteur contraint le protocole HPLC. La limite de solubilité des sels diminue avec la température entraînant leurs précipitations ce qui peut obstruer progressivement la colonne pouvant dégrader la fiabilité de l'analyse voire même endommager la colonne.

La modification du débit est également un paramètre intéressant à prendre en compte, car même s'il ne modifie pas directement la séparation des analytes, il permet de réduire les risques de saturation de la colonne et de limiter la consommation de la phase mobile.

L'ensemble des éléments mis en avant ci-dessus, et en tenant compte du triangle d'optimisation présenté dans le paragraphe IV.1.1, le protocole d'analyse le plus pertinent pour évaluer la cinétique de libération de la vancomycine contenue dans les architectures est le protocole **Iso-10-ACN-0,16-10** en utilisant la caféine comme étalon interne. La phase mobile est constituée d'eau, de 10%v d'acétonitrile et d'1%v d'acide formique. Le débit est de 0,16 mL/min, la température de la colonne est fixée à 30 °C et le temps d'analyse est de 10 minutes.

IV.2. Fonctionnalisation des substituts osseux

Dans le but de conférer une propriété antibactérienne aux substituts osseux, ceux-ci ont été fonctionnalisés avec de la vancomycine. Pour que l'antibiotique soit efficace, il doit être libéré de façon spécifique. Dans un premier temps, la concentration en antibiotique libérée doit être importante pour correspondre à l'administration d'une dose de charge. Dans un second temps la libération doit être progressive et s'étendre sur plusieurs semaines pour éviter le développement de bactéries à la surface du substitut. La méthode de chargement et de vectorisation du principe actif doit permettre l'obtention du profil de libération souhaité.

Pour cela, l'utilisation d'hydrogels est intéressante car son hydrolyse permet de relâcher les nœuds de réticulation et donc libérer les principes actifs qu'ils contiennent. Compte tenu de l'application visée, l'hydrogel utilisé doit être biocompatible, biodégradable et thermosensible pour permettre une libération de l'antibiotique en conditions physiologiques. L'agent gélifiant, l'agent réticulant, la concentration en antibiotique ainsi que la méthode de chargement doivent être choisis en adéquation avec le profil de libération souhaité. En effet, le choix de la formulation de l'hydrogel conditionne son comportement. Au-delà de sa biocompatibilité, l'hydrogel doit également être suffisamment fluide pour pouvoir être chargé dans les

architectures (rhéofluidifiant) et suffisamment visqueux pour rester dans la pièce jusqu'à sa mise en place dans le bioréacteur.

IV.2.1. Formulation des hydrogels de vancomycine

IV.2.1.1. Choix de l'agent gélifiant et de l'agent réticulant

Les hydrogels sont composés en majorité d'eau, de ce fait ils sont d'excellents candidats pour la vectorisation de principes actifs hydrophiles. Cependant pour pouvoir être utilisé en tant que vecteur de médicaments et être implanté *in vivo*, un hydrogel doit être biocompatible pour ne pas avoir d'impact négatif sur les cellules environnantes et biodégradable pour que le principe actif puisse être libéré au cours du temps. De plus, il faut que sa cinétique de dégradation coïncide avec la cinétique de libération souhaitée pour le principe actif. Pour cela, les choix de l'agent gélifiant et de l'agent réticulant sont particulièrement importants.

Dans le cadre de ces travaux, l'agent gélifiant retenu est le chitosan, en raison de ses propriétés intrinsèques particulièrement intéressantes pour des applications médicales [254]. En plus d'être biocompatible et biodégradable, ses produits de dégradation sont non immunogéniques. De plus il est bioadhésif, hémostatique, possède un effet bactériostatique et agit également en tant qu'agent chélatant et antioxydant. De ce fait, le chitosan est couramment utilisé dans l'industrie agroalimentaire, cosmétique, chimique, pharmaceutique et plus généralement en médecine [255].

Le chitosan est un polysaccharide linéaire et le deuxième polymère naturel le plus abondant après la cellulose [256]. Il est obtenu par désacétylation de la chitine, qui est un composé structural de l'exosquelette des crustacés et des insectes. Il est composé d'une répétition d'unités N-acetyl-D-glucosamine maintenues ensemble par des liaisons β -(1-4) (Figure 76).

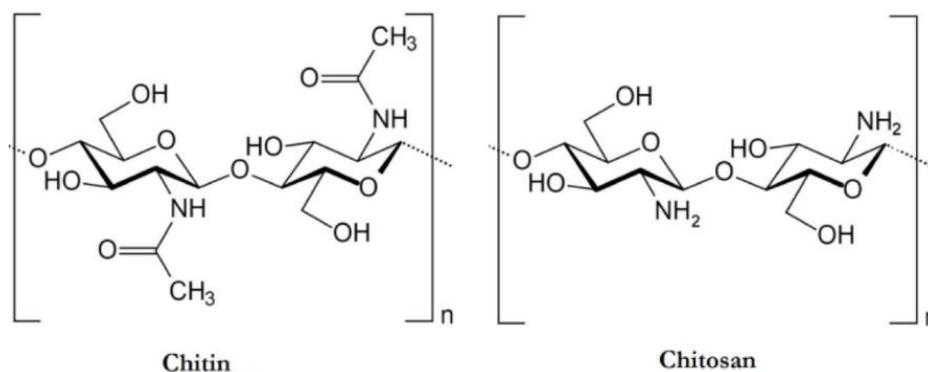


Figure 76 Structure chimique de la chitine et du chitosan [257]

Pour former le réseau de l'hydrogel, les chaînes du chitosan doivent être réticulées. La réticulation est une étape cruciale, car elle permet d'améliorer significativement la stabilité et la durabilité de l'hydrogel permettant ainsi la délivrance de principes actifs au cours du temps. Cette réticulation peut s'effectuer par le biais de liaisons fortes (formation de liaisons covalentes) ou de liaisons faibles (formation de liaisons ioniques). Le type de liaison dépend directement de l'agent réticulant utilisé.

La réticulation par formation de liaisons covalentes n'est pas adaptée car les agents réticulants couramment utilisés, comme le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, sont toxiques [258], [259]. De plus, ces liaisons sont irréversibles ce qui n'est pas compatible avec la libération de principe actif au cours du temps. En raison de la présence de groupes amines ionisables en condition acide, il est possible de réticuler ioniquement le chitosan. D'après la littérature, le chitosan peut être dissout dans une solution légèrement acide, 0,1 mol/L d'acide acétique suffit pour pouvoir dissoudre le chitosan dans de l'eau [260]. En utilisant des agents qui possèdent des charges négatives dans ces milieux, il est possible de réticuler de façon ionique le chitosan. C'est le cas du citrate de sodium, de l'acide oxalique et du triphosphate pentasodique. Ce dernier est couramment utilisé pour le chargement de principes actifs [255], [261], [262], [263].

C'est le triphosphate pentasodique $\text{Na}_5\text{O}_{10}\text{P}_3$ (TPPS, Figure 77) qui a été retenu car au-delà de sa faible toxicité, il a montré des résultats intéressants pour la libération de principes actifs. En effet, en 2006, Anal *et al.* démontrent que l'ajout de 0,125 %m/v (masse par rapport au volume de liquide) de TPPS dans des microsphères de chitosan permet de temporiser la libération d'ampicilline de 39 % après immersion dans du PBS 1X pendant 8 h à 37 °C et sous agitation constante [264], [265]. Par conséquent, l'utilisation de TPPS pour réticuler le chitosan semble donc parfaitement adaptée à la libération prolongée de principes actifs.

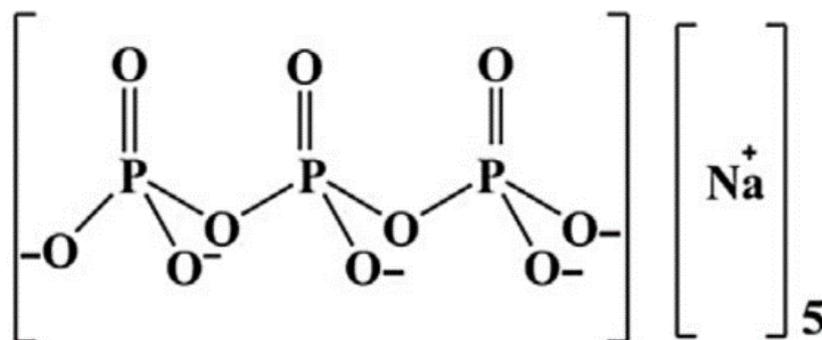


Figure 77 Structure chimique du triphosphate pentasodique (TPPS) [265]

IV.2.1.2. Formulation et propriétés des hydrogels

Les hydrogels de chitosan (notés C-hydrogel) sont composés de chitosan, triphosphate pentasodique (TPPS) et de vancomycine. Leur protocole de formulation est présenté en Figure 78.

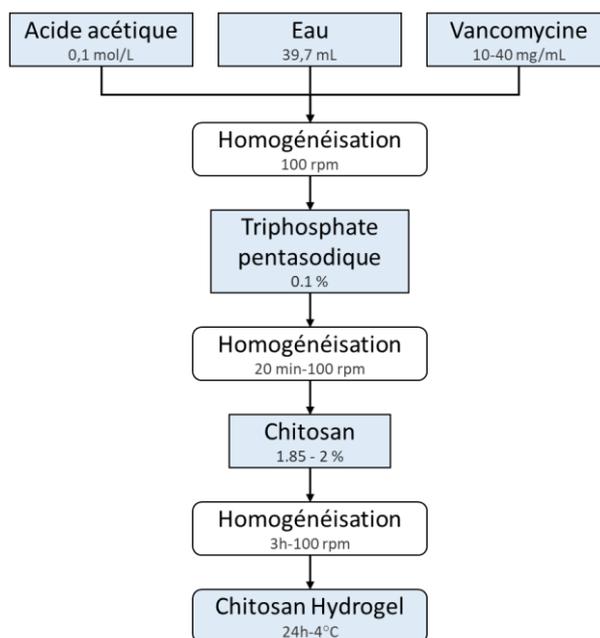


Figure 78 Organigramme de la formulation des hydrogels (C-hydrogel) de vancomycine

La vancomycine sous forme de chlorhydrate de vancomycine (Mylan) a été dissoute dans une solution aqueuse contenant 0,1 mol/L d'acide acétique. La masse de vancomycine introduite dans la solution varie en fonction de la concentration finale souhaitée dans l'hydrogel. Le mélange a été placé sous un agitateur à pale à 100 rpm jusqu'à la dissolution complète de la vancomycine. Ensuite, 0,1 mol/L de TPPS (98 % - Sigma Aldrich) a été ajoutée à la solution et l'agitation a été maintenue à 100 rpm pendant 20 min. Une fois la solution homogène, le chitosan de haut poids moléculaire (31 kDa – 37,5 kDa - Sigma Aldrich) a été ajouté progressivement à celle-ci. Lorsque l'hydrogel est homogène, celui-ci est placé à 4 °C pendant au minimum 24 h. La faible température permet d'éviter la dégradation de la vancomycine contenue dans l'hydrogel et le temps de repos favorise l'élimination des bulles d'air et l'hydratation complète de l'hydrogel. Ce protocole de formulation a été appliqué à l'ensemble des hydrogels de chitosan. Différentes formulations des hydrogels à base de chitosan ont été développées lors de ces travaux en faisant varier la quantité de chitosan ou de vancomycine. L'ensemble des formulations étudiées est présenté dans le Tableau 16.

Les différentes formulations ont permis de mettre en évidence la valeur limite de vancomycine permettant une solubilisation complète du chitosan en solution. En effet, au-delà de 40 mg/mL de vancomycine, le chitosan s'hydrate et s'homogénéise difficilement ce qui entraîne la formation d'agrégats. L'obtention d'hydrogel inhomogène limite le chargement des architectures et la libération de la vancomycine, ne permettant pas le contrôle des cinétiques de libération.

Tableau 16 Formulations des hydrogels à base de chitosan étudiées

Abréviation	Pourcentage de chitosan (%m/v*)	Concentration en vancomycine (mg/mL)
CH	1,85	0
CH10	1,85	10
CH20	1,85	20
CH30	1,85	30
CH40	1,85	40
CH30-2%	2	30

* %m/v : pourcentage massique de chitosan par rapport au volume de solution

Afin de s'assurer que les C-hydrogels formulés soient rhéofluidifiants et thermosensibles, des mesures rhéologiques en mode écoulement ont été effectuées. Le protocole de mesure est décrit dans le paragraphe II.2.7.2. S'il est évident que l'augmentation de la quantité de chitosan au sein de l'hydrogel augmente la viscosité de celui-ci, il est important de connaître l'impact de la concentration en vancomycine sur les propriétés rhéologiques. Pour cela, les mesures rhéologiques ont été effectuées sur les hydrogels CH, CH10, CH20, CH30 et CH40 à température ambiante ($\approx 20 \pm 2$ °C) et à 37 °C. Les rhéogrammes associés ainsi que les courbes d'écoulement sont présentés en Figure 79. Les rhéogrammes expriment l'évolution de la contrainte de cisaillement τ (en mPa) en fonction du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ (en s^{-1}). Les courbes d'écoulement représentent l'évolution de la viscosité (mPa.s) en fonction du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ (en s^{-1}). Pour les formulations CH, CH30 et CH40, trois hydrogels par composition ont été élaborés et analysés. Les rhéogrammes présentent donc les moyennes de trois mesures indépendantes par composition. Pour les formulations CH10 et CH20 une seule mesure par composition a pu être effectuée.

Les hydrogels avec et sans vancomycine présentent tous un comportement similaire : la contrainte de cisaillement augmente avec le taux de cisaillement (Figure 79. **A** et **B**) et la viscosité des hydrogels diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement (Figure 79. **C** et **D**). Ces résultats sont typiques d'un comportement rhéofluidifiant [266].

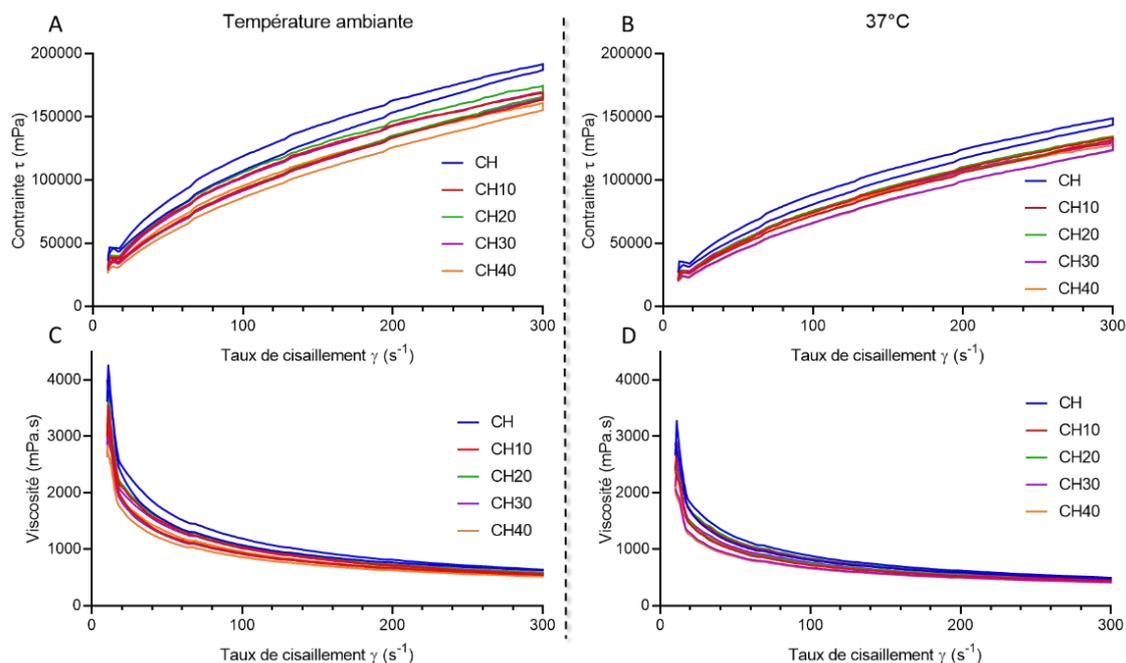


Figure 79 Rhéogrammes et courbes d'écoulement des hydrogels avec et sans vancomycine à température ambiante et à 37 °C.

A : rhéogrammes des hydrogels à température ambiante, B : rhéogrammes des hydrogels à 37 °C, C : courbes d'écoulement des hydrogels à température ambiante, D : courbes d'écoulement des hydrogels à 37 °C.

Pour étudier l'influence de la présence de la vancomycine et de la température sur le comportement rhéologique des hydrogels, les rhéogrammes obtenus ont été comparés à différents modèles mathématiques. Ces courbes suivent la loi d'Ostwald-de Waele (ou loi en puissance), qui est un modèle permettant de modéliser simplement le comportement d'un fluide non newtonien sans seuil [267]. Ce modèle mathématique est décrit par la formule suivante :

Équation 3 Loi d'Ostwald-de Waele

$$\tau = K\gamma^n$$

Avec τ la contrainte de cisaillement (en mPa), K l'indice de consistance ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), γ le taux de cisaillement (en s^{-1}) et n l'indice d'écoulement (sans unité).

Pour chacun des rhéogrammes présentés ci-dessus (Figure 79. **A** et **B**), il est possible d'afficher la courbe de tendance en puissance et d'obtenir l'équation associée. Cette mise en équation permet d'obtenir les indices de consistance (K) et d'écoulement (n) pour chacune des conditions. Les résultats sont résumés dans le Tableau 17.

Tableau 17 Indices de consistance (K) et d'écoulement (n) en fonction de la concentration en vancomycine dans les hydrogels et de la température de mesure, d'après la loi d'Ostwald*

Hydrogels	T _{amb}		37 °C	
	K (Pa.s ⁿ)	n	K (Pa.s ⁿ)	n
CH	10870 ± 1506	0,499 ± 0,014	7397 ± 1923	0,525 ± 0,028
CH10	8370	0,521	4847	0,546
CH20	8144	0,528	5841	0,553
CH30	7703 ± 1130	0,538 ± 0,009	4863 ± 276	0,570 ± 0,007
CH40	6947 ± 397	0,545 ± 0,007	4649 ± 139	0,576 ± 0,004

*R² entre 0,9946 et 0,9978

L'indice d'écoulement n est compris entre 0 et 1 (Tableau 17) pour l'ensemble des hydrogels, ce qui, d'après la loi d'Ostwald-de Waele, confirme leurs comportements rhéofluidifiants [267], [268]. Si on s'intéresse à l'indice de consistance K, plus celui-ci est élevé, plus le fluide est visqueux [267]. A composition constante, la valeur de K est plus faible à 37 °C qu'à température ambiante ce qui confirme le comportement thermosensible de l'ensemble des hydrogels. Avec un indice de consistance K de 10870 ± 1506 (Pa.sⁿ) à température ambiante, l'hydrogel CH (formulation sans vancomycine) est plus visqueux que les hydrogels contenant de la vancomycine. Bien que plus faible, cette différence de viscosité est également observée à 37 °C. Pour les hydrogels chargés en vancomycine, les indices de consistances à température ambiante sont équivalents pour CH10, CH20 et CH30 avec des valeurs respectives de 8370 Pa.sⁿ, 8144 Pa.sⁿ, et 7703 ± 1130 Pa.sⁿ. CH40 est moins visqueux que les autres hydrogels chargés en vancomycine, avec un indice de consistance de 6947 ± 397 Pa.sⁿ à température ambiante. Aucune différence significative de viscosité n'est observée à 37 °C entre CH10, CH30 et CH40 avec un indice de consistance K respectif de 4847 Pa.sⁿ, 4863 ± 276 Pa.sⁿ, 4649 ± 139 Pa.sⁿ. CH20 semble plus visqueux que les autres hydrogels à 37 °C, cependant l'expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il est difficile d'affirmer que la valeur mesurée est représentative du comportement rhéologique de cette formulation. À température ambiante, plus la quantité de vancomycine dans l'hydrogel augmente plus la viscosité de celui-ci diminue. Cette influence est moins marquée à 37 °C, lorsque la fluidité intrinsèque de l'hydrogel augmente. Cela signifie que même si la vancomycine fluidifie l'hydrogel, ce dernier conserve ses propriétés rhéofluidifiantes.

En conclusion, le chitosan permet de formuler des hydrogels rhéofluidifiants et thermosensibles à température physiologique. En utilisant le protocole de formulation décrit précédemment, il est possible de charger les C-hydrogels en vancomycine jusqu'à 40 mg/mL. L'étude des propriétés rhéologiques de ces hydrogels montrent qu'ils peuvent être utilisés pour fonctionnaliser les architectures précédemment mises en forme. Cependant même si la vancomycine ne modifie pas le comportement rhéofluidifiant et thermosensible des hydrogels,

elle les rend moins visqueux, ce qui peut avoir un impact sur la fonctionnalisation des substituts osseux et la libération du principe actif.

IV.2.2. Fonctionnalisation des substituts osseux par la vancomycine

Le choix de la méthode de fonctionnalisation est également important, car elle doit permettre d'ajouter suffisamment de principes actifs dans la pièce pour permettre une libération au cours du temps.

Le bioréacteur à perfusion permet d'utiliser jusqu'à 9 lignes simultanément pour réaliser une étude de la cinétique de libération sur 14 jours. Le protocole de chargement doit donc être suffisamment rapide pour permettre de fonctionnaliser 9 pièces, mais doit aussi faciliter l'incorporation de l'hydrogel dans les macropores des architectures. Enfin, il est essentiel qu'il soit réalisé en conditions stériles pour éviter toutes contaminations durant les 14 jours d'incubation à 37 °C dans le bioréacteur à perfusion.

IV.2.2.1. Protocoles de fonctionnalisation

Deux méthodes de chargement ont été étudiées, la première consiste à injecter l'hydrogel manuellement à l'aide d'une seringue à insuline dans les macropores des architectures et la seconde à utiliser une cloche à vide pour faire rentrer l'hydrogel à l'intérieur des pièces en créant une dépression.

Chargement en utilisant une seringue à insuline

Les architectures ont été chargées avec une seringue à insuline dont le diamètre de l'aiguille était de 300 µm. Les macropores ont été remplis un par un en insérant l'aiguille par le dessus de la pièce (plan xOy) en suivant le schéma présenté en Figure 80. Pour s'assurer que l'hydrogel soit réparti de façon homogène dans la pièce, il a été dans un premier temps introduit en partant du haut gauche de la face du dessus de la pièce (flèche rouge - Figure 80). Dans un second temps, la seringue a été placée dans la partie inférieure droite, les macropores étant chargés en suivant le sens de la flèche violette sur la Figure 80.

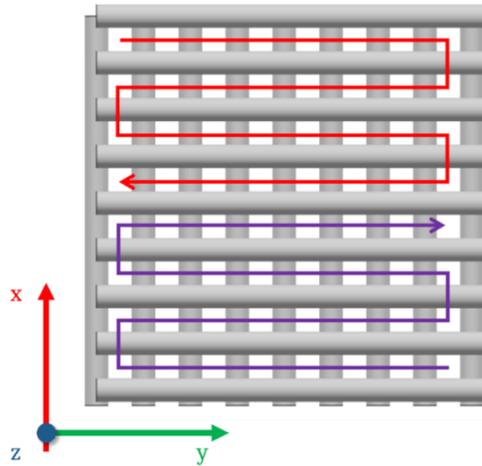


Figure 80 Schéma de chargement des architectures à l'aide d'une seringue

Avec ce protocole de chargement, il est nécessaire de chauffer l'hydrogel pour pouvoir fonctionnaliser les architectures. En effet, à température ambiante, les hydrogels sont trop visqueux et obstruent l'aiguille (paragraphe IV.2.1.2). L'hydrogel doit donc être chauffé suffisamment pour qu'il soit assez fluide pour sortir de la seringue, mais il ne doit pas être trop chaud pour ne pas dégrader le réseau de chitosan et la vancomycine. L'hydrogel a donc été chauffé à 37 °C, ce qui permet la fonctionnalisation des architectures (Figure 79). Cependant, les conditions expérimentales, température de la salle (environ 20 °C) et faible quantité de matière, entraînent un refroidissement rapide de l'échantillon lequel finit par obstruer la seringue, la viscosité de l'hydrogel augmentant avec la baisse de température. Plusieurs seringues sont donc nécessaires pour charger une architecture. De plus, avec cette méthode, le chargement n'est pas contrôlable car la variation de viscosité implique une variation de pression sur la seringue.

Chargement en utilisant une pompe à vide

La seconde méthode de chargement utilisée consiste à placer les architectures dans de l'hydrogel dans une enceinte sous vide afin d'engendrer une dépression permettant à l'hydrogel de pénétrer dans l'ensemble des pores (saturation en hydrogel). Le schéma du dispositif est présenté en Figure 81. Les pièces ont été placées dans des plaques 24 puits avant d'être recouvertes par l'hydrogel d'intérêt. La plaque a ensuite été déposée dans une cloche en verre raccordée à une pompe à vide. Le vide a été maintenu à 0,75 bar en dessous de la pression atmosphérique pendant 30 min pour permettre à l'hydrogel de rentrer dans les macropores. Ce protocole présente plusieurs avantages, il permet de fonctionnaliser plusieurs pièces en même temps et fonctionne à température ambiante. Ce protocole permet donc de

fonctionnaliser les 9 pièces à placer dans le bioréacteur en 30 minutes et évite que le chitosan ou la vancomycine ne soient dégradés par la température.

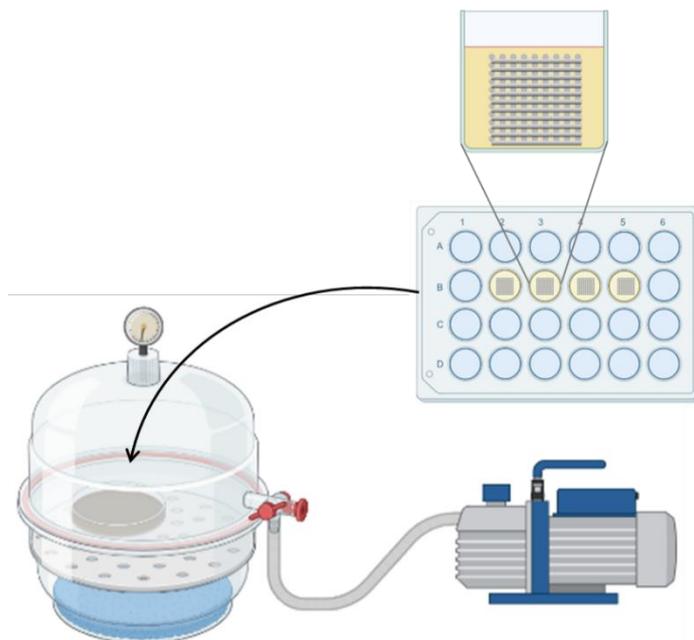


Figure 81 Schéma du dispositif de chargement des pièces sous vide à T_{amb}

IV.2.2.2. Paramètres influençant le chargement des architectures

Pour évaluer l'impact du protocole de chargement et de la composition de l'hydrogel sur la fonctionnalisation des architectures, ont été pesées avant et après leur fonctionnalisation (*i.e.* leur chargement en hydrogel). Trois paramètres ont été évalués, la composition de l'hydrogel, la température de frittage et la méthode de chargement. Ces conditions et les résultats associés sont présentés dans le Tableau 18. CH correspond au chitosan seul, CH30 et CH40 correspondent respectivement à des hydrogels de chitosan, contenant 30 mg/mL de vancomycine 40 mg/mL de vancomycine. Pour l'ensemble des conditions au minimum trois pièces différentes ont été fonctionnalisées et pesées, hormis dans le cas de l'hydrogel de chitosan seul (CH) pour lequel une seule mesure a été effectuée.

Tableau 18 Masses d'hydrogel dans les architectures en fonction du protocole de chargement et du type d'hydrogel

Hydrogels	Température de frittage	Méthode de chargement	Masse d'hydrogel par pièce (mg)
CH	1200 °C	Seringue	70
CH30	1200 °C	Seringue	138 ± 13
CH40	1200 °C	Seringue	113 ± 3
CH30	1100 °C	Vide	180 ± 8
CH30	1140 °C	Vide	136 ± 6
CH30	1200 °C	Vide	124 ± 3

Impact de la composition de l'hydrogel sur le chargement des architectures

Pour les chargements à la seringue, 70 mg d'hydrogel de chitosan seul a pu être introduit dans les architectures. Davantage d'hydrogel est introduit dans les pièces fonctionnalisées avec un hydrogel contenant 30 mg/mL de vancomycine. En effet 138 ± 2 mg d'hydrogel est ajouté par pièce pour CH30 et 113 ± 3 mg pour CH40.

D'après ces valeurs et les résultats des mesures rhéologiques obtenus précédemment, il semblerait qu'une diminution de la viscosité faciliterait la fonctionnalisation des architectures. En effet, le chitosan seul a l'indice de consistance le plus élevé (7397 ± 1923 Pa.s). Concernant les hydrogels contenant de la vancomycine, CH30 a un indice de consistance K supérieur à CH40 à 37 °C (4863 ± 276 Pa.s pour CH30 contre 4649 ± 139 Pa.s pour CH40) (Tableau 17). Cependant bien que CH40 soit moins visqueux que CH30, les architectures fonctionnalisées avec CH40 contiennent moins d'hydrogel que celles fonctionnalisées avec CH30 (Tableau 17 et Tableau 18). Cela signifie donc que la diminution de la viscosité facilite la fonctionnalisation des architectures, jusqu'à un certain seuil au-delà duquel, l'hydrogel est moins retenu par l'architecture. Il s'écoule alors et davantage d'hydrogel est retiré lorsque l'excédent présent autour de l'architecture est éliminé.

Étude de l'impact de la méthode de chargement des architectures

Concernant l'impact de la méthode de chargement, des architectures ont été fonctionnalisées avec un hydrogel contenant 30 mg/mL de vancomycine (CH30) à l'aide d'une seringue et sous vide (Tableau 18). Aucune différence significative n'est observée entre la quantité d'hydrogel pouvant être chargée par pièce en fonction du protocole de chargement. En effet, 138 ± 13 mg d'hydrogel ont été chargés à la seringue en moyenne par pièce contre 124 ± 3 mg en utilisant la cloche à vide. Cependant, le protocole de fonctionnalisation avec la cloche à vide semble plus reproductible, car à composition d'hydrogel et température de frittage équivalentes, l'écart-type est plus faible pour les architectures chargées sous vide (138 ± 13 pour les pièces chargées à la seringue contre 124 ± 3 sous vide (Tableau 18).

D'après ces résultats et le cahier des charges établi précédemment, la méthode de la cloche à vide semble donc plus adaptée, car elle permet de fonctionnaliser plus de pièces en même temps et ne nécessite pas de chauffer l'hydrogel.

Étude de l'impact de la microporosité sur le chargement des architectures

Les architectures fabriquées sont également microporeuses pour permettre l'adsorption de cytokines à leur surface et améliorer leur propriétés ostéoconductrices. Il est donc important d'évaluer l'impact de la microporosité sur le chargement en hydrogel.

Pour cela, des architectures frittées à 1200 °C, 1140 °C et 1100 °C ont été pesées avant et après leur fonctionnalisation sous cloche à vide par un hydrogel CH30 (Tableau 18).

La masse moyenne d'hydrogel par pièce augmente lorsque la température de frittage diminue. Les pièces frittées à 1200 °C contiennent 124 ± 3 mg d'hydrogel, contre 136 ± 6 mg pour les pièces à 1140 °C et 180 ± 8 mg pour celles à 1100 °C. La température de frittage influence la microporosité et l'état de surface des architectures, ce qui influence le chargement. En effet, plus la température de frittage est faible, plus il est possible de charger d'hydrogel.

D'après les analyses d'images de la surface des architectures, présentées dans le chapitre III (paragraphe III.2.2.3), les architectures frittées à 1100 °C, 1140 °C et 1200 °C ont un pourcentage de porosité ouverte respective de 0,7 %, 0,4 % et 0 %. Cela signifie que l'augmentation de la température de frittage de 40 °C (différence entre 1100 °C et 1140 °C) entraîne une diminution de la porosité ouverte de l'ordre de 43 %. Cependant la différence de quantité d'hydrogel pouvant être chargée dans les architectures frittées à 1100 °C et 1140 °C est de l'ordre de 25 %m. De la même façon, les pièces frittées à 1200 °C ne possèdent plus de porosité ouverte, et la quantité d'hydrogel pouvant être chargée dans ces architectures diminue de l'ordre de 31 %m par rapport aux pièces frittées à 1100 °C. Cette différence de microporosité n'est pas suffisante pour expliquer les variations de chargement observées précédemment (Tableau 18).

Deux hypothèses sont alors possibles, la première est que les microporosités évaluées lors de l'analyse de la surface des architectures ne soient pas représentatives de l'état de surface général de la pièce et qu'il existe un réseau de micropores au sein de l'architecture. Les images MEB obtenues ne donnent alors qu'une vision partielle de la microporosité des architectures. La seconde est que la microporosité n'est donc pas le seul facteur impactant la quantité d'hydrogel pouvant être chargée dans les architectures. Pour pouvoir discriminer l'une ou l'autre de ces hypothèses, il faudrait observer l'état de surface générale des pièces après chargement, mesurer la surface spécifique des architectures et réaliser une étude de porosimétrie au mercure.

IV.2.3. Conclusion

Pour conclure, l'utilisation de chitosan et de TPPS permet d'obtenir un hydrogel rhéofluidifiant thermosensible idéal pour la libération de principe actif en conditions physiologiques. La présence de vancomycine au sein de cet hydrogel le rend moins visqueux mais ne modifie par ses propriétés rhéofluidifiantes et thermosensibles. Cette diminution de la viscosité est à prendre en compte, car elle a un impact sur la fonctionnalisation des substituts osseux et la libération du principe actif.

Concernant la fonctionnalisation des substituts osseux, deux méthodes de chargement ont été utilisées durant ces travaux. La première consiste à charger les architectures une par une à l'aide d'une seringue à insuline et la seconde à les immerger dans de l'hydrogel et à les placer sous une cloche à vide pour aspirer l'hydrogel à l'intérieur de la pièce. Même si les deux protocoles permettent de charger la même quantité d'hydrogel dans les architectures, la seconde méthode est plus avantageuse car elle est plus reproductible, elle permet de fonctionnaliser plusieurs architectures en même temps et peut être réalisée à température ambiante. De plus, il est plus facile de mettre en place ce deuxième protocole de chargement en conditions stériles.

Les résultats suggèrent également que moins l'hydrogel est visqueux, plus la quantité pouvant être insérée dans l'architecture est importante. Par ailleurs, plus l'hydrogel est visqueux et plus il est difficile de l'extruder à la seringue et donc de charger les pièces. L'utilisation de la cloche à vide permet également de s'affranchir de ce problème. Avec cette méthode, la quantité d'hydrogel pouvant être chargée augmente avec la diminution de la température de frittage.

En effet, lorsque la température de frittage diminue de 100 °C la quantité d'hydrogel pouvant être chargée par pièce augmente de plus de 30%. Cette variation est due à la différence d'état de surface générale des architectures en fonction des traitements thermiques. Même si images MEB de la surface des architectures ont permis de mettre en évidence ces différences elles ne sont pas suffisantes pour caractériser la structure microporeuse des pièces.

Pour identifier le phénomène responsable de l'augmentation de la quantité d'hydrogel pouvant être chargée, il faudrait observer l'état de surface et au cœur des architectures après leur fonctionnalisation. Cette observation est également pertinente pour comparer les deux méthodes de chargement, car même si elles permettent de charger une quantité équivalente, rien ne prouve à l'heure actuelle que la répartition de l'hydrogel au sein des pièces est similaire.

IV.3. Libération en conditions dynamiques avec un bioréacteur à perfusion

IV.3.1. Présentation générale

L'utilisation d'un bioréacteur à perfusion a permis, dans le cadre de ces travaux, d'étudier la libération de principe actif en conditions dynamiques proches des conditions physiologiques du site osseux. De plus, ce système est adapté à la culture cellulaire ce qui permettra d'évaluer l'impact direct de la présence et de la cinétique de libération de l'antibiotique sur des cellules de la niche osseuse, une fois le protocole de libération souhaité, établi et optimisé.

La libération de la vancomycine par les architectures ne doit pas être linéaire. Le profil de libération idéal, présenté en Figure 82, comprend une première libération importante de vancomycine, correspondant à l'administration d'une dose de charge. Cette étape permet d'éliminer les bactéries pouvant être introduites lors de l'incident traumatique ou de l'intervention chirurgicale. La seconde étape est une libération faible et prolongée durant le processus de régénération osseuse, pour éviter le développement des bactéries (seuil bactériostatique) qui auraient pu survivre en dépit de la dose de charge. Enfin, la concentration en vancomycine libérée dans le système doit toujours rester inférieure au seuil toxique pour les cellules pour ne pas avoir d'impact négatif sur leurs proliférations et leurs différenciations.

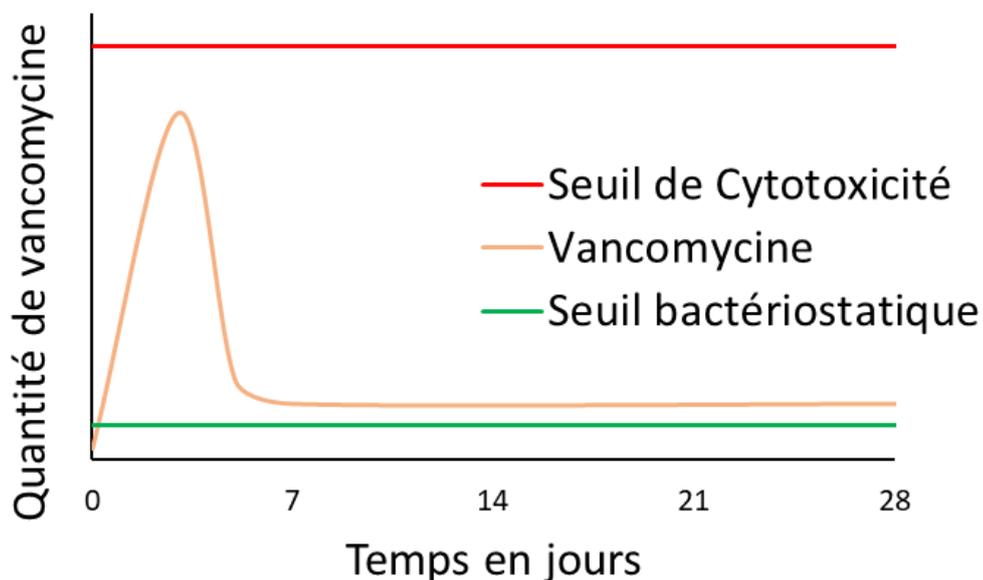


Figure 82 Profil de libération idéal de la vancomycine par les architectures

Dans le but d'obtenir ce profil de libération, les pièces fonctionnalisées ont été placées dans le bioréacteur à perfusion selon le protocole décrit dans le chapitre II (paragraphe II.3.2). Les

architectures ont été perfusées avec un milieu aqueux salin (PBS 1X) contenant 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 1,8 mM KH₂PO₄ et tamponné à pH 7,4 [269]. S'agissant d'une étude préliminaire, la libération de la vancomycine a été étudiée sur 14 jours.

D'après la méthode de fonctionnalisation et du profil de libération souhaité, il est attendu que la libération de la vancomycine soit plus importante aux premiers jours de l'expérience. Ainsi la première semaine, deux prélèvements sont réalisés par ligne et par jour avec un intervalle de 4 heures minimum puis un seul prélèvement par jour a été effectué la deuxième semaine.

IV.3.2. Gestion du prélèvement des échantillons issus du bioréacteur

Pour s'assurer que les échantillons soient prélevés dans les mêmes conditions, les lignes du bioréacteur sont mises en route et sont déconnectées en même temps de la pompe péristaltique. Les lignes sont ensuite placées sous PSM II (Poste de sécurité microbiologique de type 2) pour pouvoir prélever un échantillon de milieu en conditions stériles, limitant ainsi le risque de contamination et de développement bactérien dans les réservoirs. Pour chacune des lignes, 2 mL de milieu est prélevé en utilisant une pipette sérologique de 2 mL et 2 mL de PBS 1X sont ajoutés dans le réservoir du bioréacteur pour compenser le volume prélevé. Le schéma du protocole de prélèvement est présenté en Figure 83.

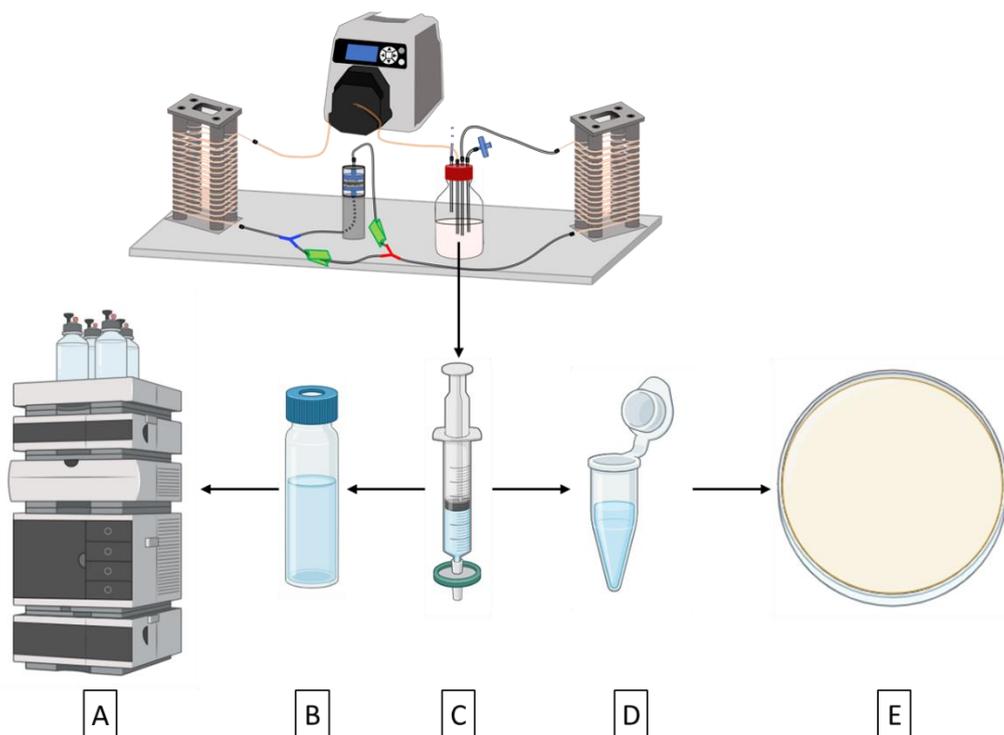


Figure 83 Schéma du devenir des prélèvements issus du bioréacteur.

A : HPLC, B : tube ambré, C : seringue avec filtre de 0,40 µm, D : tube Eppendorf, E : boîte de pétri utilisée pour l'antibiogramme.

Une fois l'échantillon prélevé, celui est filtré avec un filtre seringue de 0,40 µm pour éliminer les potentiels débris d'hydrogel présents en solution (Figure 23. **C**). Le filtrat est ensuite divisé en deux, 1 mL servira au dosage de la vancomycine en solution par HPLC (Figure 83. **A** et **B**), et 1 mL servira à évaluer l'efficacité de la vancomycine en solution sur une population bactérienne de *Staphylococcus aureus* (Figure 23. **D** et **E**).

Pour le dosage de la vancomycine en solution par HPLC, l'échantillon filtré est déposé dans un tube ambré dans lequel est ajouté l'étalon interne (Figure 23. **B**). La filtration des échantillons après prélèvement est particulièrement importante, car la présence de débris de gels de chitosan pourrait obstruer les capillaires de l'HPLC entraînant des erreurs de mesure voire un endommagement de l'équipement. Pour la téïcoplanine, la concentration finale est de 20 µg/mL dans les tubes ambrés, contre 5 µg/mL pour la caféine. Le tube ambré est alors immédiatement placé dans le passeur d'échantillons automatique de l'HPLC pour être analysé le plus rapidement possible. La température au sein de ce passeur est maintenue à 4 °C pour limiter la dégradation de la vancomycine en dehors du bioréacteur et ainsi être représentative de l'état de la molécule au moment du prélèvement. (Figure 23. **A**).

Concernant l'évaluation de l'efficacité de la vancomycine, l'échantillon filtré est placé dans un tube Eppendorf avant d'être conservé à -80 °C jusqu'à utilisation (Figure 23. **C**). En effet, pour pouvoir comparer les effets, il faut que les conditions expérimentales soient identiques pour tous les prélèvements. Ainsi il est judicieux de réaliser un antibiogramme avec l'ensemble des prélèvements issus d'une campagne de bioréacteur (Figure 23. **D**). Conserver les prélèvements à -80 °C limite considérablement la dégradation de la vancomycine [248].

IV.3.3. Traitement des données

L'utilisation d'un bioréacteur à perfusion permet une modélisation en conditions dynamiques physiologiques *in vitro*. Cependant la quantité de vancomycine mesurée par l'HPLC correspond à la vancomycine circulante dans le système au moment du prélèvement. Pour obtenir les cinétiques de libération à partir de ces données, il faut développer un modèle mathématique permettant de mettre en équation les conditions expérimentales.

Le bioréacteur est un système fermé, ce qui signifie que la vancomycine libérée s'accumule progressivement dans le système. De plus, lors de chaque prélèvement, 2 mL de milieu sont prélevés et 2 mL de milieu neuf (PBS 1X) sont alors ajoutés dans le but de maintenir le volume de milieu constant dans le système. Enfin, le bioréacteur choisi est conçu pour la culture cellulaire, il doit donc permettre et faciliter les échanges gazeux entre le contenu du bioréacteur et l'extérieur pour oxygéner les cellules. De ce fait, une évaporation importante du milieu est inévitable. Dans le cadre de la culture cellulaire en bioréacteur à perfusion, l'impact de l'évaporation est relativement faible, car le milieu de culture est remplacé tous les trois jours

conformément aux protocoles de culture cellulaire habituels. Pour étudier la cinétique de libération de la vancomycine, un changement de milieu complet tous les trois jours n'est pas envisageable car le système ne serait plus représentatif des conditions physiologiques et cela compliquerait la mise en équation des conditions expérimentales.

Pour résumer, il existe au sein du bioréacteur, une balance entre la vancomycine qui s'accumule dans le système (libération du principe actif et évaporation du milieu) et les prélèvements qui retirent une partie de la vancomycine et diluent la quantité restante dans le système (ajout de milieu neuf).

Afin de prendre en compte l'ensemble de ces points, une équation a été établie permettant une représentation graphique des cinétiques de libération de la vancomycine.

Dans un premier temps, il a fallu définir l'état initial du système, c'est-à-dire lorsque le bioréacteur est mis en route. A t_0 , le volume dans le bioréacteur V_0 est égal à 25 mL. La masse totale de vancomycine (en μg) contenue dans la pièce au moment de la mise en route du bioréacteur est définie par la variable m_0 . Le volume de prélèvement V_p est égal à 2 mL et le taux d'évaporation moyen, τ_{evap} , a été établi de façon expérimentale à 0,027 mL/h (5 mL par semaine). Chacun des prélèvements est effectué à un instant t , t_i correspond donc au temps i auquel a été effectué le prélèvement. Le volume de milieu à l'instant t_i dans le bioréacteur est défini par la formule suivante :

Équation 4

$$V_i = V_{i-1} - \tau_{evap} \times (t_i - t_{(i-1)})$$

Avec $\tau_{evap} = 0,027$ mL/h, V_{i-1} le volume de milieu en mL dans le bioréacteur lors du précédent prélèvement et $(t_i - t_{(i-1)})$ le temps écoulé entre le prélèvement précédent ($t_{(i-1)}$) et l'instant t_i .

La masse (m_i en mg) de vancomycine dans le système à l'instant t_i est donnée par la relation suivante :

Équation 5

$$m_i = C_i \times V_i$$

Avec C_i la concentration de vancomycine (en $\mu\text{g/mL}$) mesurée par HPLC dans le prélèvement V_p effectué à l'instant t_i et V_i , le volume de milieu contenu dans le bioréacteur à l'instant t_i .

La masse restante de vancomycine (m_i en μg) dans le système après un prélèvement réalisé à t_{i-1} et juste avant le suivant qui aura lieu à t_i d'un échantillon de volume V_p est donnée par la relation suivante :

Équation 6

$$m_{i'} = C_{i-1} \times V_{i-1} - C_{i-1} \times V_p$$

Par conséquent, la masse de vancomycine libérée ($m_{lib.i}$ en μg) par l'architecture dans le système entre deux prélèvements correspond à la différence entre m_i et $m_{i'}$:

Équation 7

$$m_{lib.i} = m_i - m_{i'}$$

Avec m_i la masse de vancomycine circulante dans le système à l'instant t_i et $m_{i'}$, la masse de vancomycine restante dans le système après le prélèvement de l'échantillon précédent.

La concentration massique de vancomycine libérée ($C_{lib.i}$) dans le circuit du bioréacteur entre deux prélèvements (t_{i-1} et t_i) est donc donnée par la formule suivante où V_i , le volume de milieu contenu dans le bioréacteur au temps t_i :

Équation 8

$$C_{Lib.i} = \frac{(m_i - m_{i'})}{V_i}$$

L'équation permettant d'obtenir la masse cumulée de la vancomycine dans le système est donnée par la formule suivante :

Équation 9

$$m_{lib.i.Cum} = \sum_{i=0}^i (m_i - m_{i'})$$

Le pourcentage massique de vancomycine libérée dans le circuit du bioréacteur entre deux prélèvements (t_{i-1} et t_i) est donné par la formule suivante :

Équation 10

$$\%m_{lib.i} = (m_i - m_{i'}) \times \frac{100}{m_0}$$

Sachant que la masse cumulée de vancomycine dans le circuit est définie par l'Équation 9 et que le pourcentage massique de vancomycine libérée dans le circuit du bioréacteur entre deux prélèvements (t_{i-1} et t_i) est donné par l'Équation 10, le pourcentage massique cumulé de vancomycine libérée peut donc être calculer par l'équation suivante :

Équation 11

$$\%m_{lib.i.Cum} = \sum_{i=1}^i \frac{m_{lib.i} \times 100}{m_0} = \sum_{i=1}^i (m_i - m_{i'}) \times \frac{100}{m_0}$$

En injectant les équations de 7 à 10 les unes dans les autres, on obtient pour le pourcentage cumulé de vancomycine libérée dans le système (Équation 12) :

Équation 12

$$\%m_{lib.i.Cum} = \sum_{i=1}^i \{ [C_i \times (V_{i-1} - \tau_{evap} \times (t_i - t_{(i-1)}))] - (C_{i-1} \times V_{i-1} - C_{i-1} \times V_p) \} \times \frac{100}{m_0}$$

Une fois la formule établie, un programme a été développé en langage python pour réaliser des boucles de calculs et pouvoir tracer les courbes de pourcentage cumulé croissant de la vancomycine. Le script est présenté en Annexe 3.

IV.4. Cinétique de libération

Pour étudier l'impact de la composition de l'hydrogel et des architectures sur la libération de la vancomycine, trois campagnes en bioréacteur ont été réalisées. L'ensemble des campagnes ainsi que les paramètres d'études sont résumés dans le Tableau 6 ci-dessous.

Tableau 19 Bilan des campagnes réalisées en bioréacteur précisant les variables, les modes de chargement, l'étalon interne et le protocole de dosage par HPLC

Camp a-gne	T° de frittage (°C)	%m/v Chitosan	Concentration en vancomycine dans l'hydrogel (mg/ml)	Chargement	Durée (jours)	Étalon interne	Protocole HPLC
1	1200	1,85	30	Seringue	7	Téico-planine	Eq-grad-25-50-ACN-17-10°C
	1200	2	30	Seringue	7		
2	1200	1,85	30	Seringue	14	Caféine	Eq-iso-31-ACN-0,21-17
	1200	1,85	40	Seringue	14		
3	1100	1,85	30	Vide	14	Caféine	Iso-10-ACN-0,16-10
	1140	1,85	30	Vide	14		
	1200	1,85	30	Vide	14		

La première campagne vise à étudier l'impact de la réticulation du gel sur la cinétique de libération de la vancomycine. Pour cela, deux hydrogels ont été formulés en faisant varier la quantité de chitosan.

La deuxième campagne a pour objectif d'évaluer l'impact de la concentration en principe actif dans l'hydrogel sur la cinétique de libération de la vancomycine. Pour cela, deux hydrogels ont été formulés en faisant varier la concentration de vancomycine contenue dans ceux-ci.

Pour finir, la troisième campagne tend à déterminer l'impact de la température de frittage et de la microporosité sur la libération du principe actif. Pour cela, des architectures frittées à différentes températures ont été fonctionnalisées avec le même hydrogel de chitosan.

IV.4.1. Étude de l'impact du taux de chitosan sur la cinétique de libération

L'objectif de cette campagne est de déterminer l'impact de la réticulation de l'hydrogel sur la cinétique de libération de la vancomycine et donc sur la quantité d'antibiotique circulant dans le bioréacteur.

Pour évaluer cet impact, 8 pièces ont été frittées à 1200 °C pendant 1h avant d'être chargées à l'aide d'une seringue à insuline. Quatre d'entre elles ont été fonctionnalisées avec un hydrogel contenant 1,85% de chitosan (CH30). Les quatre autres ont été fonctionnalisées avec un hydrogel contenant 2% de chitosan (CH30-2%). La concentration en vancomycine dans l'hydrogel est identique pour les deux hydrogels soit 30 mg/mL. Les proportions d'hydrogel et de vancomycine par pièce sont présentées dans le Tableau 20. La quantité de vancomycine contenue dans les pièces est équivalente entre les pièces fonctionnalisées par CH30 et CH30-2%.

Tableau 20 Proportions moyennes d'hydrogel et de vancomycine chargées dans les pièces en fonction de la quantité de chitosan dans l'hydrogel. Les résultats présentent la moyenne des valeurs obtenues pour 4 pièces différentes.

Hydrogels	Masse de la pièce vide (mg)	Masse d'hydrogel (mg)	Quantité de Vancomycine par pièce (mg)	%m d'hydrogel par pièce*	%m de vancomycine par pièce*
CH30	519 ± 8	149 ± 7	4,5 ± 0,2	29 ± 1	0,9 ± 0,04
CH30-2%	521 ± 4	156 ± 9	4,7 ± 0,3	30 ± 1	0,9 ± 0,05

*%m : pourcentage massique d'hydrogel ou de vancomycine par rapport à la masse totale de la pièce

Les pièces ont ensuite été placées dans le bioréacteur à perfusion pendant 7 jours et les prélèvements réalisés deux fois par jour (aucun prélèvement n'a été effectué pendant le weekend). Chacun des prélèvements a ensuite été analysé par HPLC en utilisant la téicoplanine comme étalon interne. Pour cette campagne, le protocole HPLC utilisé est le

suivant : Eq-grad-25-50-ACN-17-10°C (voir paragraphe IV.1.2.3). Les profils de libération sont présentés en Figure 84. La Figure 84. **A** correspond aux données brutes issues de l'analyse HPLC, elle représente l'évolution de la quantité de vancomycine (en µg/mL) circulant dans le bioréacteur au cours du temps. La Figure 84. **B** correspond à la cinétique de libération de la vancomycine déterminée en utilisant l'Équation 12.

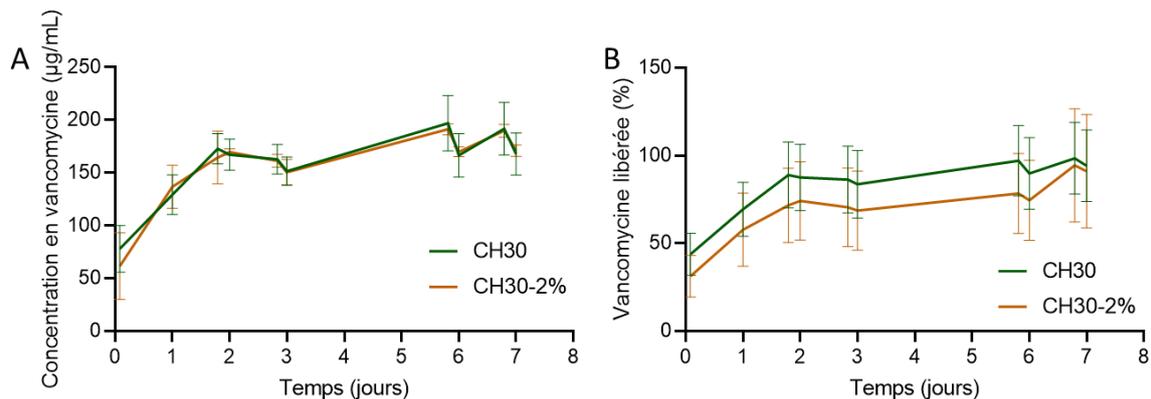


Figure 84 Étude de taux de chitosan dans l'hydrogel sur la quantité de vancomycine libérée et circulante dans le bioréacteur.

A : quantité de vancomycine circulante dans le bioréacteur au cours du temps (µg/mL), B : pourcentage cumulé croissant de la vancomycine libérée au cours du temps.

D'après la Figure 84. **A**, la quantité de vancomycine circulante dans le bioréacteur est identique pour les deux hydrogels et oscille entre 56 ± 22 µg/mL et 197 ± 26 µg/mL pendant la durée totale de l'expérience. La concentration en chitosan ne semble donc pas avoir d'impact sur la quantité de vancomycine circulante dans le bioréacteur. Il est possible que le comportement rhéofluidifiant de l'hydrogel dicte la dégradation de l'hydrogel dans le bioréacteur. Par conséquent, à 37 °C, le réseau de l'hydrogel est dégradé de façon équivalente, indépendamment de sa concentration en chitosan. Une autre hypothèse est que la différence de concentration en chitosan entre les deux hydrogels soit trop faible pour influencer le comportement de l'hydrogel dans ces conditions d'études.

Concernant la Figure 84. **B**, les courbes présentent des profils identiques entre les deux hydrogels tant en termes de concentrations que de durées. Environ 50 % de la quantité de vancomycine est libérée dans le système au moment du premier prélèvement, soit après 2 h passé dans le bioréacteur. Après 48 h, $71\% \pm 21\%$ de la vancomycine totale est libérée pour les architectures fonctionnalisées avec CH30-2% contre $89\% \pm 19\%$ pour les pièces fonctionnalisées avec CH30. Au bout de 7 jours, l'intégralité de la vancomycine contenue dans les architectures a été libérée dans le système pour les deux hydrogels. Une quantité

importante de vancomycine est donc libérée dans les premières heures après la mise en place de l'architecture dans le bioréacteur. La libération est ensuite plus lente avec environ 20 % de la vancomycine libérée en 5 jours. Ce profil de libération semble prometteur car il permet d'administrer la dose de charge décrite dans le paragraphe IV.3.1. Cependant, la libération de la vancomycine dans le système est trop rapide avec une libération complète en 7 jours.

Malgré les incertitudes de mesures liées au protocole de prélèvement des échantillons, le profil de libération de la vancomycine contenue dans l'hydrogel CH30-2% est inférieur à celui contenant 1,85% de chitosan. Il semblerait donc que l'augmentation de la quantité de chitosan dans l'hydrogel permette une libération plus progressive de la vancomycine. Il serait intéressant d'augmenter la quantité de chitosan dans l'hydrogel. Pour cela, il faudrait modifier le protocole de formulation utilisé car celui-ci ne permet pas à l'heure actuelle d'obtenir un mélange homogène lorsque la concentration en chitosan dépasse 2 %m/v dans la solution. Par ailleurs, la cinétique de libération n'a pas pu être étudiée sur 14 jours en raison d'une dégradation irréversible de la colonne de séparation (HPLC) lié à un protocole d'analyse inapproprié (précipitation des sels contenus dans le PBS 1X en raison à la faible température dans la colonne).

IV.4.2. Étude de l'impact de la concentration en vancomycine dans l'hydrogel sur la cinétique de libération

L'objectif de cette campagne est de déterminer si l'augmentation de la quantité de vancomycine au sein de l'hydrogel de chitosan a un impact sur la cinétique de libération et sur la quantité de vancomycine circulante dans le bioréacteur.

Pour évaluer cette étude, 8 pièces ont été frittées à 1200 °C pendant 1h avant d'être chargées à l'aide d'une seringue à insuline. Quatre d'entre elles ont été fonctionnalisées avec un hydrogel contenant 1,85 %m/v de chitosan et 30 mg/mL de vancomycine (CH30). Les quatre autres ont été fonctionnalisées avec un hydrogel contenant 1,85 %m/v de chitosan et 40 mg/mL de vancomycine (CH40). Les quantités d'hydrogel et de vancomycine par pièce sont présentées dans le Tableau 21. D'après ces résultats, davantage d'hydrogel a été chargé dans les architectures fonctionnalisées avec CH30. Cette différence est due à la viscosité de l'hydrogel qui diminue avec l'augmentation de la concentration de vancomycine (voir paragraphe IV.2.2.).

Tableau 21 Proportions moyennes d'hydrogel et de vancomycine chargés dans les pièces en fonction de la quantité de vancomycine dans l'hydrogel. Les résultats présentent la moyenne des valeurs obtenues pour 4 pièces différentes.

Hydrogels	Masse de la pièce vide (mg)	Masse d'hydrogel (mg)	Vancomycine par pièce (mg)	%m d'hydrogel par pièce*	%m de vancomycine par pièce*
CH30	565 ± 57	125 ± 9	3,8 ± 0,3	22 ± 4	0,7 ± 0,1
CH40	563 ± 44	113 ± 3	4,5 ± 0,1	20 ± 2	0,8 ± 0,1

*%m : pourcentage massique d'hydrogel ou de vancomycine par rapport à la masse totale de la pièce

Les pièces ont ensuite été placées dans le bioréacteur à perfusion pendant 14 jours. Des prélèvements ont été réalisés deux fois par jours les 5 premiers jours puis seulement un prélèvement par jour a été effectué la deuxième semaine de l'expérience (aucun prélèvement n'a été effectué pendant le weekend). Chacun des prélèvements a ensuite été analysé par HPLC en utilisant la caféine comme étalon interne. Pour cette campagne, le protocole HPLC utilisé est le suivant : Eq-iso-31-ACN-0,21-17 (voir paragraphe IV.1.2.3). Les profils de libération sont présentés en Figure 85. La Figure 85. **A** correspond aux données brutes issues de l'analyse HPLC, elle représente l'évolution de la quantité de vancomycine (en µg/mL) circulant dans le bioréacteur au cours du temps. La Figure 85. **B**, correspond à la cinétique de libération de la vancomycine, déterminée en utilisant l'Équation 12.

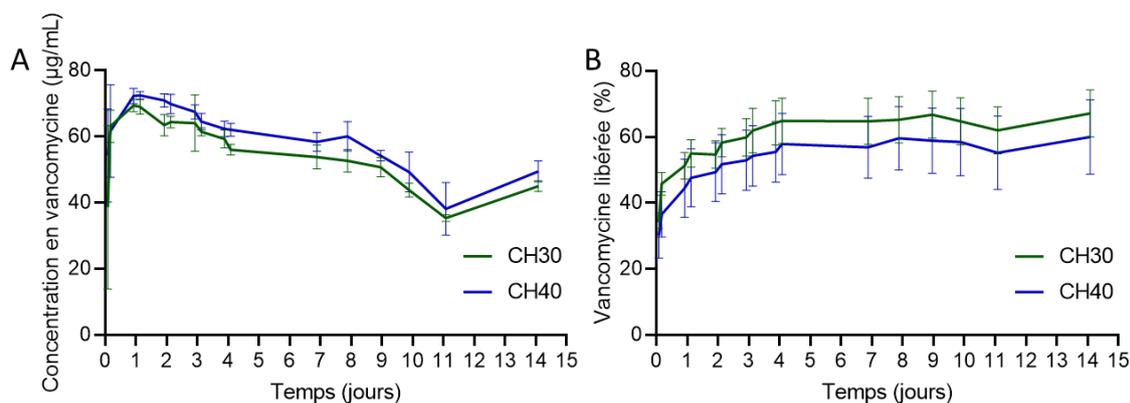


Figure 85 Étude de l'impact de la concentration en vancomycine dans l'hydrogel sur la quantité de vancomycine libérée et circulant dans le bioréacteur.

A : quantité de vancomycine circulant dans le bioréacteur au cours du temps (µg/mL), B : pourcentage cumulé croissant de la vancomycine libérée au cours du temps.

D'après la Figure 85. **A**, la quantité de vancomycine circulant dans le bioréacteur évolue de façon identique entre les deux conditions expérimentales. Cependant, la quantité de

vancomycine dans le bioréacteur semble légèrement plus importante pour les pièces contenant davantage de vancomycine (CH40).

Concernant la Figure 85. **B**, les profils de libération sont similaires entre les deux hydrogels. Environ 40 % de la quantité de vancomycine est libérée dans le système au moment du premier prélèvement, soit après 2 h passé dans le bioréacteur. Après 48 h, entre 50 % et 60 % de la vancomycine contenue dans l'architecture a été libérée. Au bout de 14 jours, un plateau est observé et à peine plus de 60 % de la vancomycine contenue dans l'architecture a été libérée dans le système.

Comme observé avec la campagne précédente, une quantité importante de vancomycine est libérée dans les premières heures après la mise en place de l'architecture dans le bioréacteur. Cependant il est surprenant que seulement 60 % de la vancomycine soit libérée en 14 jours, d'autant plus que lors de la campagne précédente 100 % de la vancomycine avait été libérée par les architectures fonctionnalisées avec CH30 en 7 jours. Sachant que les pièces ont été fonctionnalisées de la même façon et que la méthode de prélèvement entre les deux campagnes n'a pas été modifiée, la différence de résultat peut s'expliquer par l'utilisation d'une méthode d'analyse HPLC peu appropriée. Comme expliqué précédemment (paragraphe IV.1.2.3.2), le protocole d'analyse utilisé (Eq-iso-31-ACN-0,21-17) entraîne une mauvaise séparation entre les pics de vancomycine dégradée et la caféine. Cela impacte la fiabilité de l'intégration et conduit à une sous-estimation de la quantité de vancomycine libérée.

En dépit des incertitudes liées au protocole de prélèvement et d'analyse des échantillons, il semblerait que l'augmentation de la quantité de vancomycine dans l'hydrogel n'ait pas d'impact sur le profil de libération du principe actif. D'après la Figure 85, les profils des courbes obtenues pour CH30 et CH40 sont superposables. D'après la Figure 85. **A**, la quantité absolue de vancomycine dans les prélèvements issu des lignes contenant l'hydrogel CH40 est plus importante que pour CH30 (courbe CH40 au-dessus CH30). Cependant, pour la Figure 85. **B**, la courbe CH30 est au-dessus de celle de CH40. Par conséquent la quantité de vancomycine relative libérée par l'hydrogel contenant 40 mg/mL de vancomycine est inférieure à celle libérée par CH30. Cela signifie que c'est le chitosan contenu dans l'hydrogel qui conditionne le profil de libération. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de la campagne décrite précédemment.

Il est également possible que la différence de concentration en vancomycine entre les deux hydrogels soit trop faible pour avoir un impact significatif sur les profils de libération. En effet, même si les quantités de vancomycine et d'hydrogel varient entre les deux conditions (CH30 et CH40), le pourcentage massique de vancomycine par architecture reste équivalent avec $0,7 \pm 0,1$ % pour CH30 et $0,8 \pm 0,1$ % pour CH40. Cependant, avec le protocole de formulation

de ces hydrogels, il est impossible d'augmenter davantage la concentration en vancomycine tout en conservant un mélange homogène. Cela signifie que si la concentration de vancomycine circulante dans le bioréacteur n'est pas suffisante pour induire un effet bactériostatique, il faudra revoir le protocole de formulation de l'hydrogel.

IV.4.3. Étude de l'impact de la température de frittage des architectures sur la cinétique de libération

L'objectif de cette campagne est de déterminer l'impact de la température de frittage et plus particulièrement de la microporosité ouverte des architectures sur le profil de libération de la vancomycine. Pour cela, les pièces ont toutes été fonctionnalisées avec le même hydrogel CH30 (1,85 %m/v de chitosan et 30 mg/mL de vancomycine). Avant d'être fonctionnalisées, les pièces ont subi des traitements thermiques différents dans le but de moduler leur microporosité. Trois pièces ont été frittées à 1200 °C pendant 1 h, trois pièces à 1140 °C pendant 1 h et 3 autres à 1100 °C pendant 1 h. L'évolution de la microporosité ouverte à la surface des architectures est décrite dans le chapitre III. Les résultats obtenus sont rappelés dans le Tableau 22.

Tableau 22 Évolution de la microporosité de surface en fonction de la température de frittage

Conditions de frittage	Aire totale des micropores (µm²)	Taux de microporosité ouverte (%)
1100 °C	1,5	0,7
1140 °C	0,9	0,4
1200 °C	0,0	0,0

Pour chacune des conditions étudiées, les quantités d'hydrogel et de vancomycine par pièce sont présentées dans le Tableau 23. Comme décrit précédemment (paragraphe IV.2.2), la quantité d'hydrogel et donc de vancomycine pouvant être chargée dans la pièce augmente avec la microporosité. Ainsi les pièces les plus poreuses (frittées à 1100 °C) contiennent plus de vancomycine que les pièces frittées à 1140 °C qui contiennent plus de vancomycine que celles frittées à 1200 °C.

Tableau 23 Proportions moyennes d'hydrogel et de vancomycine chargées dans les pièces en fonction de la température de frittage. Les résultats présentent la moyenne des valeurs obtenues pour 3 pièces différentes.

Hydrogels	Masse de la pièce vide (mg)	Masse d'hydrogel (mg)	Vancomycine par pièce (mg)	%m d'hydrogel par pièce*	%m de vancomycine par pièce*
1100 °C	545 ± 7	180 ± 8	5,4 ± 0,2	33,1 ± 1,8	1,0 ± 0,1
1140 °C	572 ± 12	136 ± 6	4,1 ± 0,2	23,7 ± 1,1	0,7 ± 0,1
1200 °C	556 ± 39	124 ± 3	3,7 ± 0,1	22,4 ± 1,1	0,7 ± 0,1

*%m : pourcentage massique d'hydrogel ou de vancomycine par rapport à la masse totale de la pièce

Les pièces ont ensuite été placées dans le bioréacteur à perfusion pendant 14 jours. Des prélèvements ont été réalisés deux fois par jour les 5 premiers jours puis seulement un prélèvement par jour a été effectué la deuxième semaine de l'expérience (aucun prélèvement n'a été effectué pendant le weekend). Chacun des prélèvements a ensuite été analysé par HPLC en utilisant la caféine comme étalon interne. Pour cette campagne, le protocole HPLC utilisé était le suivant : Iso-10-ACN-0,16-10 (IV.1.2.3). Les profils de libération sont présentés en Figure 86. La Figure 86. **A** correspond aux données brutes issues de l'analyse HPLC, elle représente l'évolution de la quantité de vancomycine (en µg/mL) circulant dans le bioréacteur au cours du temps. La Figure 86. **B** correspond à la cinétique de libération de la vancomycine, déterminée en utilisant l'Équation 12.

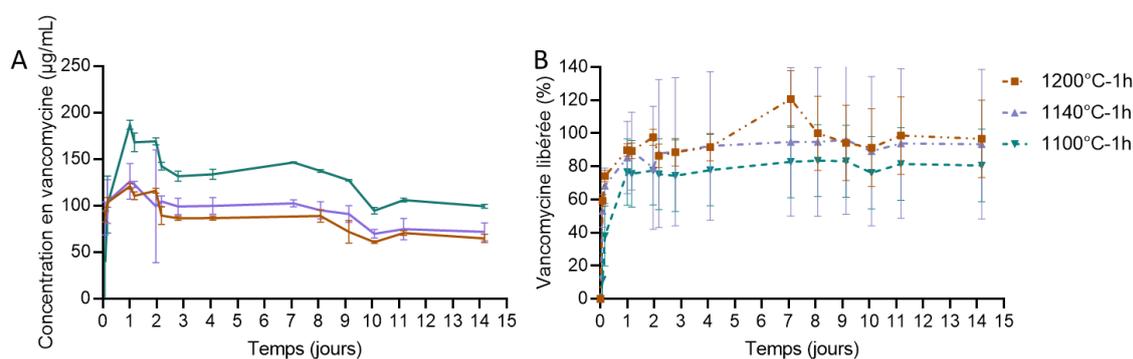


Figure 86 Étude de l'impact de la température de frittage des architectures sur la quantité de vancomycine libérée et circulante dans le bioréacteur.

A : quantité de vancomycine circulant dans le bioréacteur au cours du temps (µg/mL), B : pourcentage cumulé croissant de la vancomycine libérée au cours du temps.

D'après la Figure 86. **A**, la quantité de vancomycine circulante dans le bioréacteur est équivalente pour les pièces frittées à 1140 °C et celles frittées à 1200 °C. Pour ces conditions, elle oscille entre $61 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ et $135 \pm 31 \mu\text{g/ml}$ sur les 14 jours que dure la campagne. En revanche, la vancomycine circulante dans le bioréacteur est beaucoup plus importante dans les lignes contenant les pièces frittées à 1100 °C (entre $94 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ et $169 \pm 4 \mu\text{g/ml}$). L'état de surface des architectures module la quantité d'hydrogel pouvant être chargée dans les architectures (Tableau 23) ce qui a une incidence directe sur la quantité de vancomycine libérée dans le bioréacteur. En effet, la quantité d'hydrogel moyenne dans les pièces frittées à 1200 °C et 1140 °C sont relativement équivalentes (respectivement $124,0 \pm 2,9 \text{ mg}$ et $135,8 \pm 6,0 \text{ mg}$ d'hydrogel). Cela représente une différence d'environ 30 % avec la masse d'hydrogel chargée dans les pièces frittées à 1100 °C.

Cette même différence est retrouvée sur la Figure 86. **B**. La variation du taux de microporosité ouverte entre les températures de frittage est trop faible pour expliquer à elle seule les différences de chargement en hydrogel. Sachant que seule la microporosité de surface a été mesurée, il n'est pas à exclure la présence de micropores, voire d'un réseau interconnecté à l'intérieur des architectures. Le réseau serait d'autant plus important que la température de frittage est faible. Ce postulat permet d'expliquer à la fois pourquoi il est possible de charger plus d'hydrogel au sein des architectures frittées à 1100 °C mais également la faible accessibilité de celui-ci. En effet, la force exercée lors de la mise sous vide serait suffisante pour permettre à l'hydrogel de s'insérer dans le réseau de micropores.

Concernant la Figure 86. **B**, les profils observés sont équivalents à ceux des deux campagnes précédentes, à savoir une libération importante de la vancomycine après les premières heures, suivie après 48 h dans le bioréacteur d'une libération est plus progressive. Les profils des cinétiques de libération sont également identiques entre les pièces frittées à 1200 °C et 1140 °C. Il est à noter que 60 % de la vancomycine totale est libérée lors du premier prélèvement pour les pièces frittées 1200 °C et 1140 °C contre seulement 40 % pour les pièces frittées à 1100 °C. Au bout de 14 jours dans le bioréacteur, 100 % de la vancomycine contenue dans les pièces frittées à 1200 °C et 1140 °C a été libérée contre 80 % pour les pièces frittées à 1100 °C.

Ainsi, le faible flux dans le bioréacteur et l'obstruction du réseau microporeux par l'hydrogel limiterait son accessibilité. Cela signifie que la microporosité impacte non seulement le chargement des pièces en hydrogel, mais également son accessibilité et donc sa dégradation. En effet, pour les différentes conditions de frittages les profils des courbes de la Figure 86. **A** et ceux de la Figure 86. **B**, sont superposables entre eux, peu importe la microporosité des pièces (Tableau 22). Cela signifie que la libération du principe actif dépend de la dégradation de l'hydrogel et donc de son accessibilité au sein de l'architecture. Ainsi même si la quantité

de vancomycine libérée par les architectures frittées à 1100 °C est plus importante que celle des deux autres conditions de frittage en raison de sa microporosité, le ratio vancomycine libérée sur vancomycine totale reste inférieur à celui des autres conditions car l'hydrogel est moins accessible.

Par conséquent, la température de frittage conditionne l'état de surface mais aussi, le réseau de micropore au sein des architectures [219]. Plus la température de frittage est faible, plus il est possible de charger les pièces en hydrogel. Les résultats ont montré que plus la température de frittage est faible, plus il reste de vancomycine au sein de l'architecture au bout de 14 jours. De 2 à 14 jours, le pourcentage de vancomycine libérée par les pièces frittées à 1100 °C n'a pas évolué. La diminution de la température de frittage permet donc d'augmenter la quantité d'hydrogel pouvant être chargée, mais réduit son accessibilité et donc la libération de vancomycine dans le système.

IV.4.4. Étude morphologique des architectures après passage dans le bioréacteur

Dans le but de vérifier les hypothèses avancées dans le paragraphe précédent, l'aspect de surface des architectures a été comparé avant et après passage dans le bioréacteur. Les architectures ont donc été observées en microscopie électronique à balayage après frittage (paragraphe III.2.2) et après avoir passé 14 jours dans le bioréacteur à perfusion. Les pièces présentées ici sont issues de la dernière campagne du bioréacteur portant sur l'étude de l'impact de la température de frittage (paragraphe IV.4.3) et ont été séchées à l'air avant observation. Les micrographies des macrostructures des architectures sont présentées en Figure 87 et ont été obtenues en utilisant le protocole décrit dans le chapitre II (II.2.3).

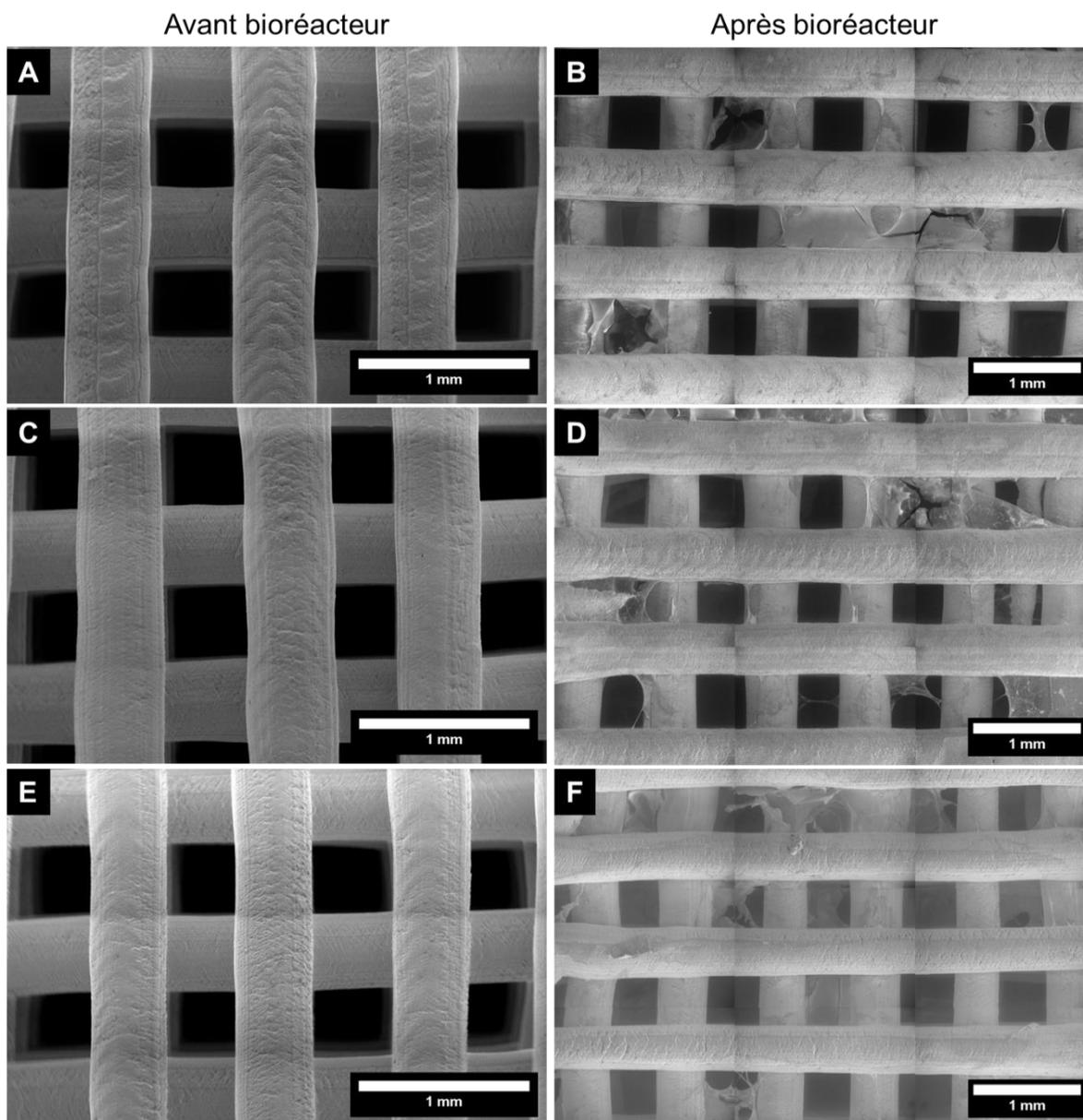


Figure 87 Comparaison de la macrostructure des architectures avant fonctionnalisation et après fonctionnalisation et passage dans le bioréacteur (vue de dessus, dans le plan xy).

A et B : pièces frittées à 1100 °C - C et D : pièces frittées à 1140 °C - E et F : pièces frittées à 1200 °C.

A cette échelle, aucune différence significative n'est observable concernant la structure des architectures et des macropores. En effet, quelles que soient les conditions de frittage, les architectures présentent le même aspect de surface (paragraphe III.2.2.3). Concernant les pièces extraites du bioréacteur (Figure 87. **B**, **D** et **F**), de l'hydrogel de chitosan est observé dans les macropores et sur les filaments. Cela signifie que 14 jours dans le bioréacteur ne sont pas suffisants pour éliminer la totalité de l'hydrogel contenu dans les pièces. Cependant, d'après les résultats du paragraphe IV.4.3, la totalité de la vancomycine contenue dans les

architectures frittées à 1140 °C et 1200 °C est libérée. La vancomycine est donc capable de diffuser au travers de l'hydrogel de chitosan.

En comparant l'état de surface des architectures avant et après passage dans le bioréacteur, l'aspect de surface est légèrement différent. Pour les pièces avant passage dans le bioréacteur (Figure 87. **A, C et E**), et malgré un facteur d'échelle, les traces liées au passage de la buse sont plus visibles que sur les pièces en sortie de bioréacteur (Figure 87. **B, D et F**). Cet état de surface différent peut être dû à une érosion des pièces dans le bioréacteur ou à la présence d'hydrogel à la surface.

Afin de voir si les pièces ayant séjournées dans le bioréacteur sont altérées, les diamètres des macropores et des filaments des architectures après passage dans le bioréacteur ont été mesurés. Les dimensions ont été évaluées par analyse des micrographies précédentes, en utilisant le logiciel ImageJ. Le Tableau 24 compare les valeurs mesurées avant et après le bioréacteur.

Tableau 24 Diamètres des macropores et des filaments avant et après passage dans le bioréacteur.

Conditions de frittage	Diamètre interne des macropores (µm)		Diamètre des filaments (µm)	
	Avant bioréacteur	Après bioréacteur	Avant bioréacteur	Après bioréacteur
1100 °C	425 ± 46	481 ± 39	463 ± 29	487 ± 23
1140 °C	438 ± 44	444 ± 60	455 ± 39	494 ± 22
1200 °C	415 ± 29	444 ± 27	451 ± 13	452 ± 36

Les mesures ont été effectuées sur une seule micrographie par condition. Pour chacune des dimensions présentées, plus de 60 mesures ont été effectuées.

Pour l'ensemble des températures de frittage, le diamètre des macropores et des filaments reste le même avant et après le passage de la pièce dans le bioréacteur (Tableau 24). Cela signifie que ni l'étape de chargement sous vide ni le passage en bioréacteur n'ont d'impact sur la macrostructure des substituts osseux. Ces observations ont également été confirmées par ICP-AES. Le contenu des réservoirs des lignes de bioréacteur a été analysé par ICP-AES, selon le protocole décrit dans le chapitre II (paragraphe II.2.4.1), après 14 jours d'incubation. Pour l'ensemble des lignes testées, aucune trace d'ion calcium, synonyme de dégradation du matériau, n'a été détectée.

L'état de surface du matériau ainsi que sa microstructure ont également été observés dans le but de comprendre le comportement de l'hydrogel au sein des architectures et du bioréacteur. Les micrographies de l'état de surface des architectures sont présentées sur la Figure 88. Les figures **A**, **B**, **C** et **D**, **E**, **F** présentent la microstructure des pièces frittées respectivement à 1100 °C, 1140 °C et 1200 °C avant et après passage dans le bioréacteur.

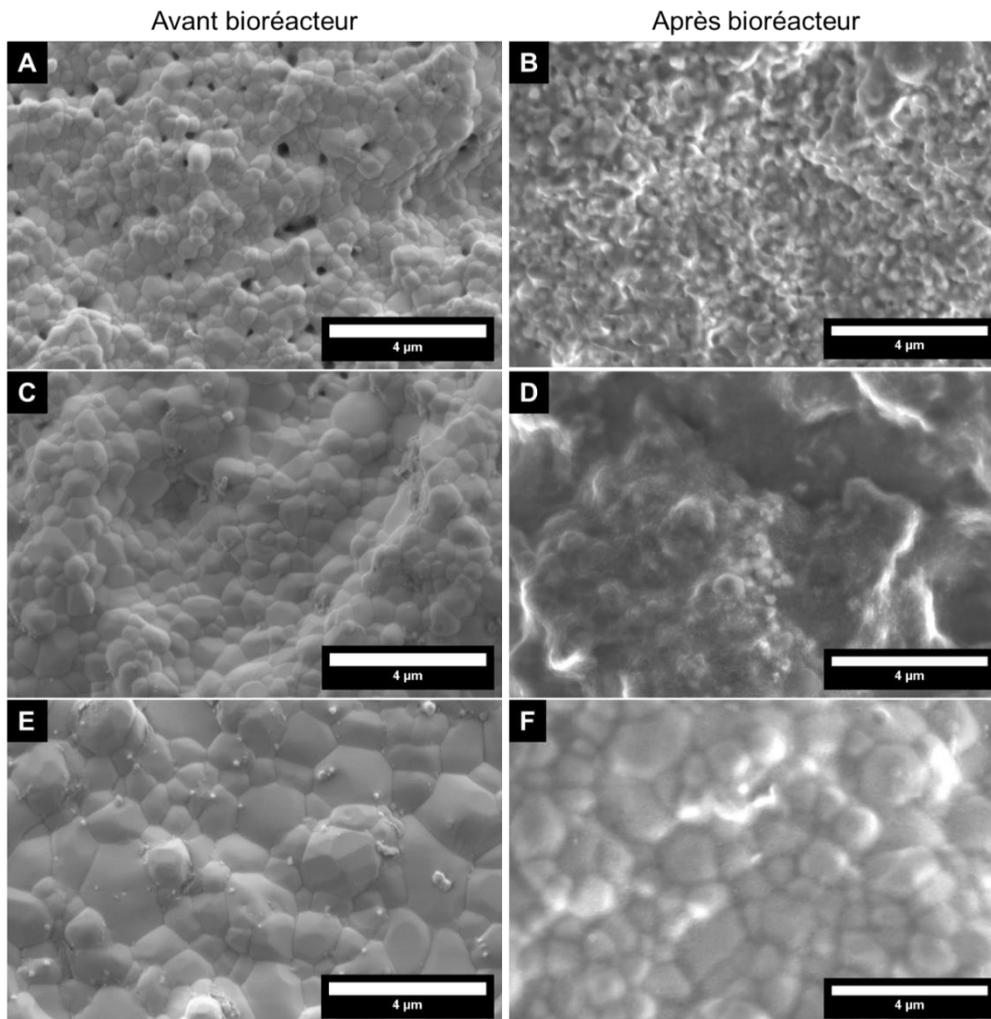


Figure 88 Comparaison de la microstructure des architectures avant fonctionnalisation et après fonctionnalisation et passage dans le bioréacteur (vue de dessus, dans le plan xy).

A et B : pièces frittées à 1100 °C - C et D : pièces frittées à 1140 °C - E et F : pièces frittées à 1200 °C.

Après fonctionnalisation et passage dans le bioréacteur, les architectures présentent un état de surface différent (Figure 88. **B**, **D**, **F**). La surface de ces architectures est recouverte d'une fine couche d'hydrogel, ce qui empêche d'obtenir une image nette de l'état de surface. Néanmoins, d'après l'ensemble des micrographies de la Figure 88, la taille des grains semble être du même ordre de grandeur avant et après passage dans le bioréacteur, pour chacune des températures de frittage. Ces observations confortent les résultats de l'analyse ICP-AES,

à savoir que ni l'étape de chargement sous vide ni le passage en bioréacteur n'ont d'impact sur la microstructure des substituts osseux. La microstructure des pièces frittées à 1100 °C (Figure 88. **B**) et 1140 °C (Figure 88. **C**) est plus difficile à discerner en sortie de bioréacteur que celle des pièces frittées à 1200 °C (Figure 88. **F**). D'après ces observations, plus l'architecture présente de microporosité et de petits grains, plus la couche d'hydrogel restante à la surface en sortie de bioréacteur est importante, rendant difficile l'observation des grains. La présence de résidus d'hydrogel à la surface de ces architectures est donc liée à la microporosité qui a limitée sa solubilité.

En associant ces résultats avec ceux de la partie IV.4.3, la quantité d'hydrogel pouvant être chargée par pièce dépend donc de la microporosité des architectures, mais également de la taille des grains et de l'aspect de surface (rugosité). Plus l'architecture est frittée à faible température, plus les grains sont petits, plus il y a de micropores et plus la surface est rugueuse, ce qui permet de charger davantage d'hydrogel. La quantité d'hydrogel pouvant être chargée dans les architectures dépend probablement de la présence d'un réseau microporeux interconnectés. La méthode de chargement sous vide permettrait donc de remplir ces interconnexions d'hydrogel et le flux du bioréacteur ne serait pas suffisant pour pénétrer le réseau de micropores et hydrolyser l'hydrogel. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait fonctionnaliser des architectures frittées à 1100 °C et 1140 °C avec une seringue à insuline.

Pour conclure, comme attendu, les conditions dynamiques n'entraînent pas la dissolution de l'HA. Les architectures conservent leurs dimensions durant toute la durée de l'étude. Cela est dû au choix du matériau, l'hydroxyapatite stœchiométrique, qui est bioactive et très peu biodégradable [174]. Le protocole de chargement permet à l'hydrogel de chitosan de recouvrir la surface de l'architecture. Après 14 jours dans le bioréacteur, il reste de l'hydrogel dans certains macropores et une fine couche est observée à la surface de l'architecture. Plus la température de frittage est faible, plus la quantité d'hydrogel présente à la surface des architectures est importante. De plus, la présence du réseau macroporeux permettrait de charger plus d'hydrogel et faciliterait son ancrage et sa persistance à la surface du matériau. Ces observations confortent les résultats obtenus précédemment concernant l'influence de la température de frittage des architectures sur le chargement et la libération de la vancomycine (paragraphe IV.4.3).

IV.4.5. Discussion et conclusion sur les cinétiques de libération

Pour l'ensemble des conditions testées, les profils obtenus sont relativement similaires avec une libération importante du principe actif dans les premières heures suivant l'inclusion dans le bioréacteur, puis une libération plus progressive au cours du temps, voire l'apparition de plateaux.

Bien que nécessaire pour délivrer une dose de charge, la quantité de vancomycine libérée dans les premières heures reste trop importante dans les premiers temps. En effet, au minimum 40 % de la quantité totale de principes actifs contenus dans les architectures est libérée dans les deux heures suivant la mise en marche du bioréacteur. Cette libération importante peut être liée à l'hydrolyse de l'hydrogel ou être liée à un phénomène de lessivage de l'hydrogel par le flux du bioréacteur. Il est possible que l'hydrogel contenu dans les macropores parallèles au sens du flux soit rapidement hydrolysé, car plus facilement accessible. Ainsi l'hydrogel restant serait celui piégé entre les filaments des différentes couches de l'architecture. En effet, la campagne étudiant l'influence de la température de frittage sur la cinétique de libération semble confirmer qu'une partie de l'hydrogel est plus difficile d'accès, temporisant ainsi sa dégradation. Cela signifie que l'accessibilité de l'hydrogel conditionne en partie la libération de l'antibiotique.

Les résultats précédents ont également démontré que la microporosité de surface observée n'était pas représentative de la microporosité générale de l'architecture. Pour les pièces frittées à 1100 °C et 1140 °C, la présence d'un réseau de micropores interconnectés expliquerait les différences de quantité d'hydrogel pouvant être chargée dans ces architectures ainsi que les différences lors de la libération. En effet, la méthode de chargement sous vide, permettrait à l'hydrogel d'infiltrer ces interconnexions. Une fois dans le bioréacteur, l'hydrogel dans ces interconnexions serait alors piégé car le flux de milieu ne serait pas suffisant pour permettre son hydrolyse. Pour confirmer ce postulat et s'assurer que les différences sont uniquement liées au réseau microporeux, il serait intéressant d'évaluer sa proportion par porosité mercure [219].

Les dimensions finales des pièces sont nettement inférieures à celle de la chambre interne du bioréacteur. Or, dans leurs travaux, Bancroft *et al.* soulignent que cela peut entraîner la formation d'un flux préférentiel au travers de l'architecture, impactant la libération de principe actifs [172]. Ce phénomène est illustré sur la Figure 89. Si flux passe au centre de la pièce (Figure 89. **A**), l'hydrogel s'érode donc en partant du centre de la pièce et est dégradé progressivement jusqu'au bord de la pièce. La seconde hypothèse est que l'hydrogel contenu dans la pièce perturbe le passage du milieu et que celui-ci passe sur les côtés de la pièce (Figure 89. **B**). Dans ce cas l'hydrogel est dégradé depuis l'extérieur jusqu'au centre de la

pièce. Ces hypothèses peuvent expliquer les cinétiques observées précédemment, car l'hydrogel serait de moins en moins accessible par le flux.

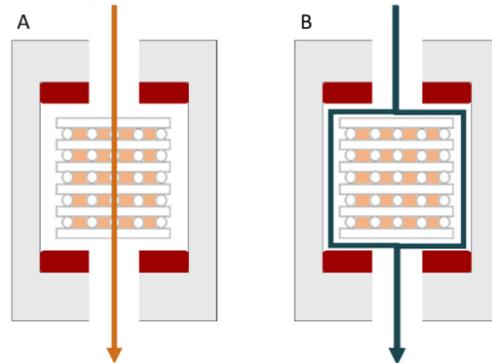


Figure 89 Schéma du passage d'un flux préférentiel au travers de la chambre du bioréacteur.

A : Au travers de la pièce, B : Autour de la pièce.

Pour éviter ce problème, il faudrait surdimensionner les pièces. Compte tenu des valeurs de retrait selon les axes x, y et z observées dans le chapitre III (paragraphe III.2.2.1), et sachant que la chambre interne du bioréacteur mesure 10 mm x 10 mm x 8 mm, les dimensions du fichier CAO devraient donc être de 11,36 mm x 11,36 mm x 11,27 mm (selon les axes x, y et z).

Bien que modifiant l'état de surface, cette couche de chitosan n'empêche pas l'adhésion et la prolifération des cellules sur le matériau [270]. Le chitosan est donc un agent gélifiant particulièrement intéressant pour la libération prolongée de principe actif, car il permet une libération sur le long terme, en se solubilisant en plus de 14 jours et permet l'adhésion et la prolifération des cellules. Par ailleurs, la formation d'un passage préférentiel du flux à travers l'architecture permet de libérer rapidement certains macropores pour fournir un espace colonisable par les cellules. L'utilisation de l'hydrogel de chitosan est donc parfaitement compatible avec le développement de culture cellulaire dynamique au sein du bioréacteur à perfusion. Cependant, la méthode de chargement sous-vide permet à l'hydrogel de pénétrer à l'intérieur du réseau microporeux de l'architecture, ce qui risque de limiter l'adsorption des cytokines à la surface du matériau.

IV.5. Évaluation de l'efficacité de la vancomycine

En préambule à l'étude de l'efficacité de la vancomycine libérée par les architectures, il a été nécessaire de déterminer les concentrations en vancomycine permettant d'inhiber la croissance, voire d'éliminer les bactéries.

L'efficacité de la vancomycine libérée par les architectures a ensuite été étudiée en mettant des échantillons issus du bioréacteur au contact de bactéries. L'ensemble des expériences ont été réalisées en utilisant une souche bactérienne de collection de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P ne présentant pas de résistance particulière à la pénicilline. En effet, le staphylocoque doré est une des bactéries responsables des infections nosocomiales pouvant survenir lors de l'implantation de substituts osseux.

L'ensemble des expériences présentées dans cette partie ont été réalisées en partenariat avec Sylvie Delebassée, maitresse de conférence au laboratoire LABCIS (UR 22722) et s'inscrivaient dans cadre du stage de master 2 « sciences chirurgicales » de Cynthia Abane.

IV.5.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

Pour évaluer l'efficacité de la vancomycine commerciale (Mylan) sur la souche bactérienne de *Staphylococcus aureus*, un test visant à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été effectué. L'objectif est de déterminer la concentration minimale en vancomycine permettant d'inhiber la croissance de la souche bactérienne en milieu liquide. Le protocole expérimental est détaillé dans le chapitre II (paragraphe II.5.1).

Après 24h d'incubation, les tubes sont observés pour détecter la présence de trouble caractéristique de la croissance bactérienne. L'expérience a été répétée trois fois et les résultats sont identiques à ceux présentés en Figure 90. L'ensemble des tubes présentent un aspect limpide à l'exception du tube contenant 0,25 µg/mL de vancomycine. Cela signifie que cette concentration n'est pas suffisante pour empêcher la croissance de la souche bactérienne. La concentration minimale en vancomycine permettant d'inhiber la croissance de cette souche bactérienne de *Staphylococcus aureus* est donc 0,5 µg/mL. Ces résultats correspondent aux valeurs de CMI habituelle pour ce type de souche bactérienne [106].

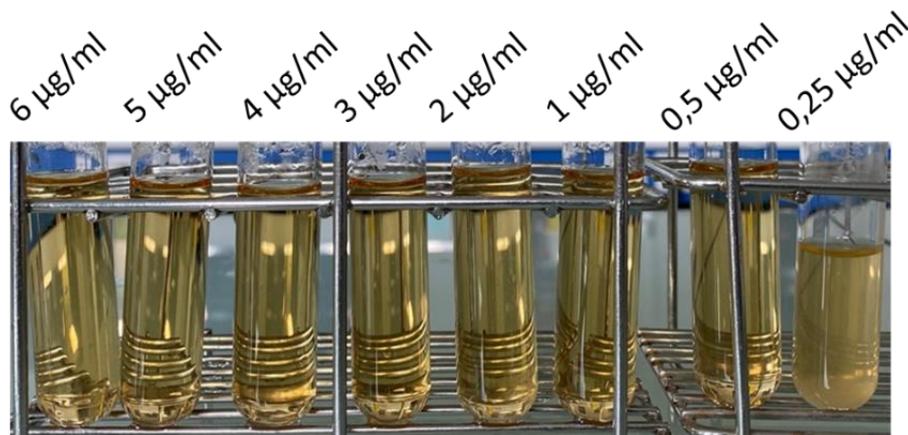


Figure 90 Illustration des résultats du test de CMI. Les valeurs correspondent aux concentrations en vancomycine dans chacun des tubes. Ces résultats sont obtenus après une incubation de 24h à 37 °C.

IV.5.2. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide

Si la CMI permet de déterminer la concentration minimale pour éviter le développement de bactéries, elle ne donne pas d'information sur l'effet bactéricide de la vancomycine. Pour cela, il faut déterminer la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).

Une fois la CMI déterminée, la concentration minimale bactéricide (quantité minimale en antibiotique permettant d'éliminer 99,99% d'une population bactérienne) a donc pu être déterminée à partir des tubes du test de CMI et après lecture des résultats. Sachant qu'une concentration de vancomycine inférieure à 0,25 µg/mL n'est pas suffisante pour inhiber la croissance bactérienne, la CMB doit être nécessairement au-dessus de cette valeur. Pour qu'un antibiotique soit le plus efficace possible, il est communément admis que les valeurs de sa CMI et de sa CMB doivent être les plus proches possibles. Par conséquent, seules les 4 premières concentrations au-dessus de la CMI ont été utilisées pour déterminer la CMB. Pour cela, 2 µl des tubes contenant 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL et 3 µg/mL de vancomycine ont été déposés sur une gélose TSA, avant d'être incubés pendant 24 h à 37 °C. Pour déterminer la CMB, chacun des résultats sera comparé à une boîte contrôle simulant une diminution de 99,99% de la population bactérienne. L'expérience a été répétée trois fois, les résultats sont identiques et correspondent à ceux présentés en Figure 91.

En comparant les résultats de la Figure 91. **B** à la simulation d'une diminution de 99,99% de la population bactérienne de la boîte contrôle (Figure 91. **A**, ligne -4) la CMB en vancomycine permettant d'éliminer 99,99% cette souche bactérienne de *Staphylococcus aureus* est donc de 1 µg/mL. Comme attendu, cette valeur est très proche de la CMI et correspond aux valeurs de CMB habituelles pour cet antibiotique sur ce type de souche bactérienne [106].

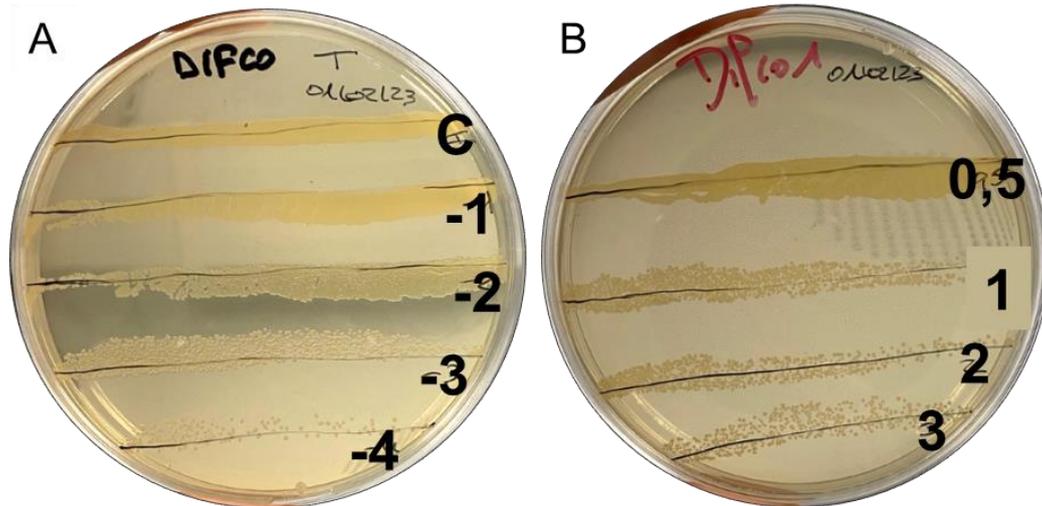


Figure 91 Illustration des résultats du test de CMB.

A : Boîte de contrôles. Les valeurs correspondent aux facteurs de dilutions avec C (pour contrôle) : sans dilution, -1 dilution à 10^{-1} , -2 dilution à 10^{-2} , -3 dilution à 10^{-3} , -4 dilution à 10^{-4} , B : conditions testées. Les valeurs sur la droite correspondent à la concentration en vancomycine en $\mu\text{g/mL}$.

Pour conclure, la concentration en antibiotique dans le bioréacteur doit être *a minima* de $0,5 \mu\text{g/mL}$ pour empêcher le développement de bactéries et supérieure à $1 \mu\text{g/mL}$ pour éliminer les bactéries en solution.

IV.5.3. Antibiogramme

Un antibiogramme est une technique qui consiste à déposer un antibiotique sur une gélose contenant des bactéries. La solution d'antibiotique diffuse alors dans la gélose. Si l'antibiotique est efficace et présent en quantité suffisante, les bactéries ne pourront pas se développer autour de la zone où il a été déposé. Ce cercle sans bactérie autour de la zone de dépôt est appelé cercle d'inhibition.

Pour déterminer l'efficacité de la vancomycine libérée par l'architecture, les prélèvements issus du bioréacteur sont mis en contact avec une gélose contenant une suspension de *S.aureus* en respectant le protocole décrit dans le chapitre II (paragraphe II.5.3). Une seconde expérience a été réalisée pour déterminer l'efficacité de la vancomycine dégradée sur les bactéries. Après incubation des boîtes de pétri pendant 24 h à 37°C , les diamètres d'inhibition sont mesurés. Les résultats de ces antibiogrammes sont illustrés en Figure 92.

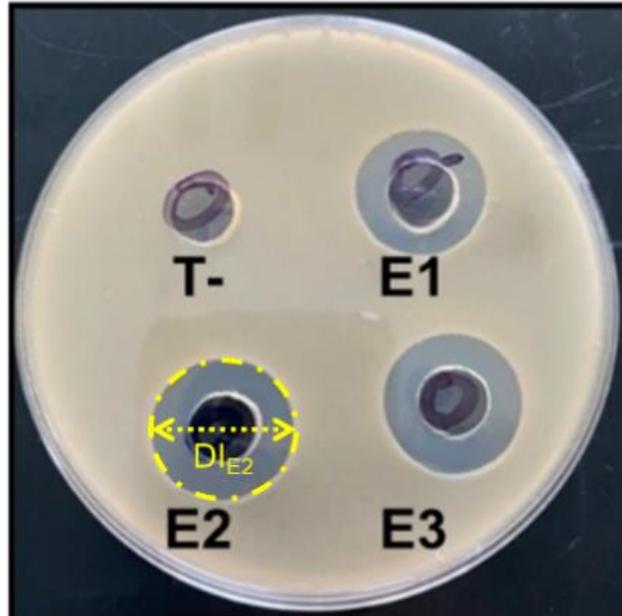


Figure 92 Illustration des résultats des différents antibiogrammes réalisés.

T- correspond aux témoins négatifs ne contenant que du PBS 1X. E1, E2 et E3 correspondent aux cercles d'inhibitions de 3 échantillons issus du bioréacteur, prélevé lors de la deuxième campagne dans laquelle la concentration en vancomycine dans l'hydrogel a été étudiée.

La présence d'un cercle d'inhibition, comme illustré sur la Figure 92, signifie que la vancomycine ayant diffusée dans la gélose est active et qu'elle est présente en quantité suffisante pour empêcher le développement des bactéries. Mesurer le diamètre d'inhibition pour chacun des prélèvements du bioréacteur permet de s'assurer de l'efficacité antibiotique de la vancomycine circulante dans le bioréacteur.

Des antibiogrammes ont été réalisés sur les prélèvements issus des campagnes 2 et 3 du bioréacteur, visant respectivement à étudier l'impact de la quantité de vancomycine dans l'hydrogel (valeur des concentrations) et l'impact des températures de frittage (valeurs des températures) sur les cinétiques de libération. Un témoin positif contenant $10 \mu\text{g/mL}^7$ de vancomycine dans du PBS 1X a été utilisé. Les résultats sont présentés en Figure 93. Chacun des points représente la moyenne des diamètres des cercles d'inhibition issus des prélèvements à l'instant t , d'au moins 3 lignes indépendantes du bioréacteur, par condition.

⁷ La concentration du témoin positif doit être nettement supérieure à la CMI. Elle a été choisie arbitrairement, en prenant en compte les résultats précédents.

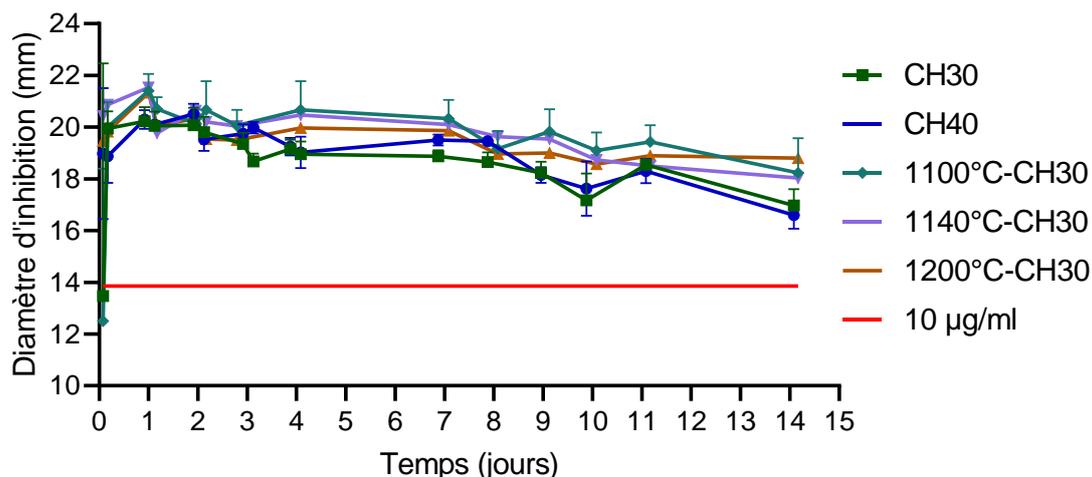


Figure 93 Évolution des diamètres d'inhibition des prélèvements issus de la campagne 2 et 3 du bioréacteur, dans lesquelles la concentration de vancomycine dans l'hydrogel et les températures de frittages ont été modulée.

Pour l'ensemble des conditions testées, le diamètre des cercles d'inhibition (DI) varie entre 18 mm et 20 mm. Cela signifie que la vancomycine circulante dans le bioréacteur reste efficace et en concentration suffisante pour inhiber la croissance bactérienne, même après 14 jours passé dans le bioréacteur. Ces observations sont confirmées par les résultats de cinétiques de libération (paragraphe IV.4) pour lesquels il a été observé que la concentration en vancomycine circulante dans le bioréacteur était comprise entre 40 et 170 µg/mL, ce qui est largement au-dessus de la CMI (0,5 µg/mL, voir paragraphe IV.5.1).

D'après la Figure 93 aucune différence significative n'est observée entre les DI de CH30 et de CH40 au cours du temps. Il semblerait donc que la différence de concentration en vancomycine des deux hydrogels ne permet pas d'avoir un impact significativement différent sur l'inhibition de la croissance de la souche bactérienne. Ces résultats sont en accord avec les concentrations de vancomycine circulante, observées lors de l'étude des cinétiques de libération, qui étaient équivalentes (paragraphe IV.4.2). Concernant la vancomycine libérée des architectures frittées à différentes températures (Figure 93), aucune différence significative d'efficacité n'est observée entre les températures de frittage. Il semblerait donc que pour l'ensemble des conditions évaluées, les concentrations en vancomycine dans le bioréacteur permettent d'inhiber la croissance bactérienne.

L'antibiogramme reste un test semi-quantitatif. Ainsi les hypothèses précédentes sont à nuancer. Il est possible que les différences de concentrations en vancomycine dans les prélèvements (temps de prélèvement, composition ou quantité l'hydrogel) aient une incidence sur la croissance de la souche bactérienne, mais que le test utilisé ne soit pas suffisamment

sensible pour la quantifier. En effet, pour l'ensemble des conditions testées, les concentrations en vancomycine étaient au minimum 80 fois supérieures à la CMI, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence. Ces résultats de l'antibiogramme sont donc en accord avec ceux décrits dans la partie IV.4, pour lesquels la concentration en vancomycine et la quantité d'hydrogel chargée dans l'architecture n'impactent pas la cinétique de libération. Ils expliquent pourquoi les DI des prélèvements du bioréacteur sont nettement supérieurs à ceux du témoin positif (14 mm). La quantité de vancomycine circulante dans le bioréacteur étant nettement supérieure à 10 µg/mL.

Néanmoins, il est intéressant de s'attarder sur la diminution du diamètre d'inhibition au cours du temps (Figure 93). En effet, le bioréacteur est un système semi-fermé dans lequel la vancomycine s'accumule au cours de l'expérience (voir paragraphe IV.4). L'évolution des DI au cours du temps dépend donc de la concentration de vancomycine efficace dans les prélèvements. Dans le paragraphe (IV.4), il a été mis en avant une dégradation de la vancomycine au cours du temps. Il est donc possible que la vancomycine circulante dans le bioréacteur soit de moins en moins efficace. La vancomycine restant efficace sur la souche bactérienne après 14 jours, trois hypothèses sont envisagées. La première est que la vancomycine se dégradant lentement, une quantité suffisante reste active à 14 jours. La deuxième est que la vancomycine dégradée reste relativement efficace sur la souche bactérienne et la dernière est que l'hydrogel protège la vancomycine de la dégradation jusqu'à sa libération. Selon cette dernière hypothèse, la vancomycine commencerait à se dégrader uniquement à partir de sa libération par l'hydrogel. La vancomycine libérée à l'instant t serait donc sous forme native.

Afin de confronter ces hypothèses, une solution de vancomycine à 1 mg/mL ainsi qu'un hydrogel CH30 ont été réalisés et stockés pendant 14 jours dans un incubateur à 37 °C. Un antibiogramme a ensuite été réalisé pour comparer l'efficacité de la vancomycine préparée extemporanément (vancomycine native), de la vancomycine « dégradée » et de celle contenue dans l'hydrogel sur la souche bactérienne. Pour les vancomycine native et dégradée, 5 concentrations différentes sont évaluées : 1, 2, 3, 4 et 10 µg/mL. Pour l'hydrogel CH30, celui-ci est préparé dans les mêmes conditions que les prélèvements du bioréacteur. Il est solubilisé à 37 °C dans du PBS 1X avant d'être filtré à 0,40 µm, 3 concentrations différentes d'hydrogel de vancomycine sont évaluées : 1, 2 et 3 µg/mL. Chacune des solutions testées a été déposée dans trois puits différents, les résultats sont présentés en Figure 94.

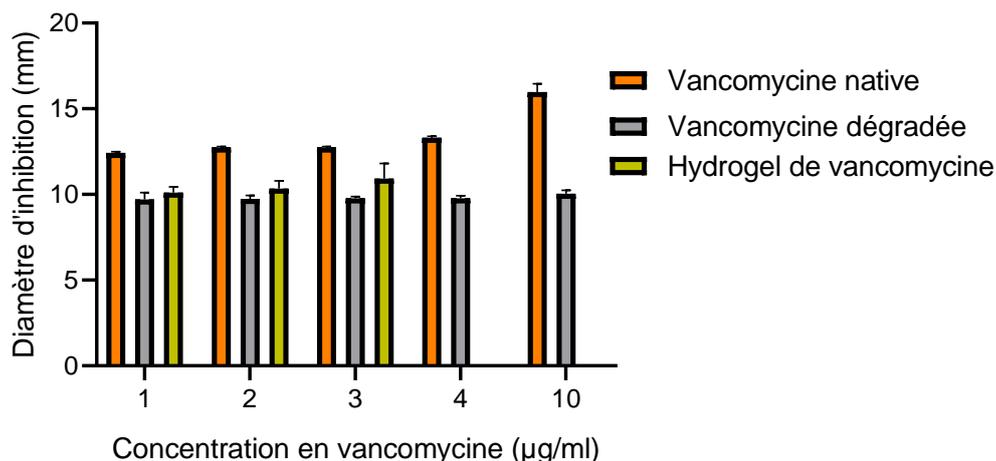


Figure 94 Évolution du diamètre d'inhibition en fonction de la concentration et de la nature de la vancomycine.

D'après les résultats et sachant que le diamètre du puit est de 10 mm, une valeur de 10 mm correspond donc à l'absence d'inhibition de la croissance bactérienne. De ce fait, aucun DI n'est observé pour les conditions contenant de la vancomycine dégradée et de l'hydrogel de vancomycine solubilisé. Il semblerait donc que la vancomycine dégradée soit moins efficace que la vancomycine native sur la souche bactérienne étudiée et que l'hydrogel ne protège pas la vancomycine de la dégradation.

IV.5.4. Conclusion sur l'efficacité de la vancomycine libérée

Pour conclure, la concentration minimale (CMI) en vancomycine permettant d'inhiber la croissance bactérienne a été déterminée à 0,5 µg/mL et correspond au seuil bactériostatique (paragraphe IV.3.1). La concentration minimale bactéricide (CMB), quant à elle, est de 1 µg/ml. D'après les résultats décrits en partie IV.4, la quantité minimum de vancomycine circulante dans le bioréacteur est de 40 µg/mL soit 80 fois la CMI et 40 fois la CMB. Ces concentrations sont donc suffisantes pour éliminer les bactéries. De plus, les résultats de l'antibiogramme ont prouvé qu'en dépit de la dégradation de la vancomycine dans le bioréacteur, celle-ci reste efficace durant 14 jours.

IV.6. Impact de la vancomycine sur les cellules

Pour déterminer le seuil de cytotoxicité, c'est-à-dire la concentration à laquelle la vancomycine est toxique pour les cellules, un test d'activité métabolique a été réalisé. Ce test repose sur la capacité des cellules à réduire un composé : la résazurine. Lorsqu'un composé est toxique,

l'activité métabolique et/ou le nombre de cellules diminuent ce qui a pour conséquence de diminuer la quantité de résazurine réduite en solution [224].

Pour être au plus proche des conditions physiologiques, les cellules testées sont celles présentent au niveau de la niche osseuse. Selon le protocole décrit dans le chapitre II (paragraphe II.4.4), trois types cellulaires différents ont été étudiés : des précurseurs ostéoblastiques issus de culture primaire, des cellules endothéliales et des monocytes.

Différentes solutions de vancomycine native ont alors été préparées en dissolvant de la vancomycine dans un milieu de culture adapté à chaque type cellulaire. Au cours de cette étude, 8 concentrations en vancomycine ont été étudiées en plus du contrôle : 100 µg/mL, 200 µg/mL, 1000 µg/mL, 2000 µg/mL, 3000 µg/mL, 4000 µg/mL, 5000 µg/mL, 10000 µg/mL. Les plus faibles concentrations (100 µg/mL, 200 µg/mL) correspondent aux concentrations de vancomycine circulante dans le bioréacteur (paragraphe IV.4). Les plus fortes concentrations ont été sélectionnées d'après la littérature [271]. Les résultats sont présentés en Figure 95.

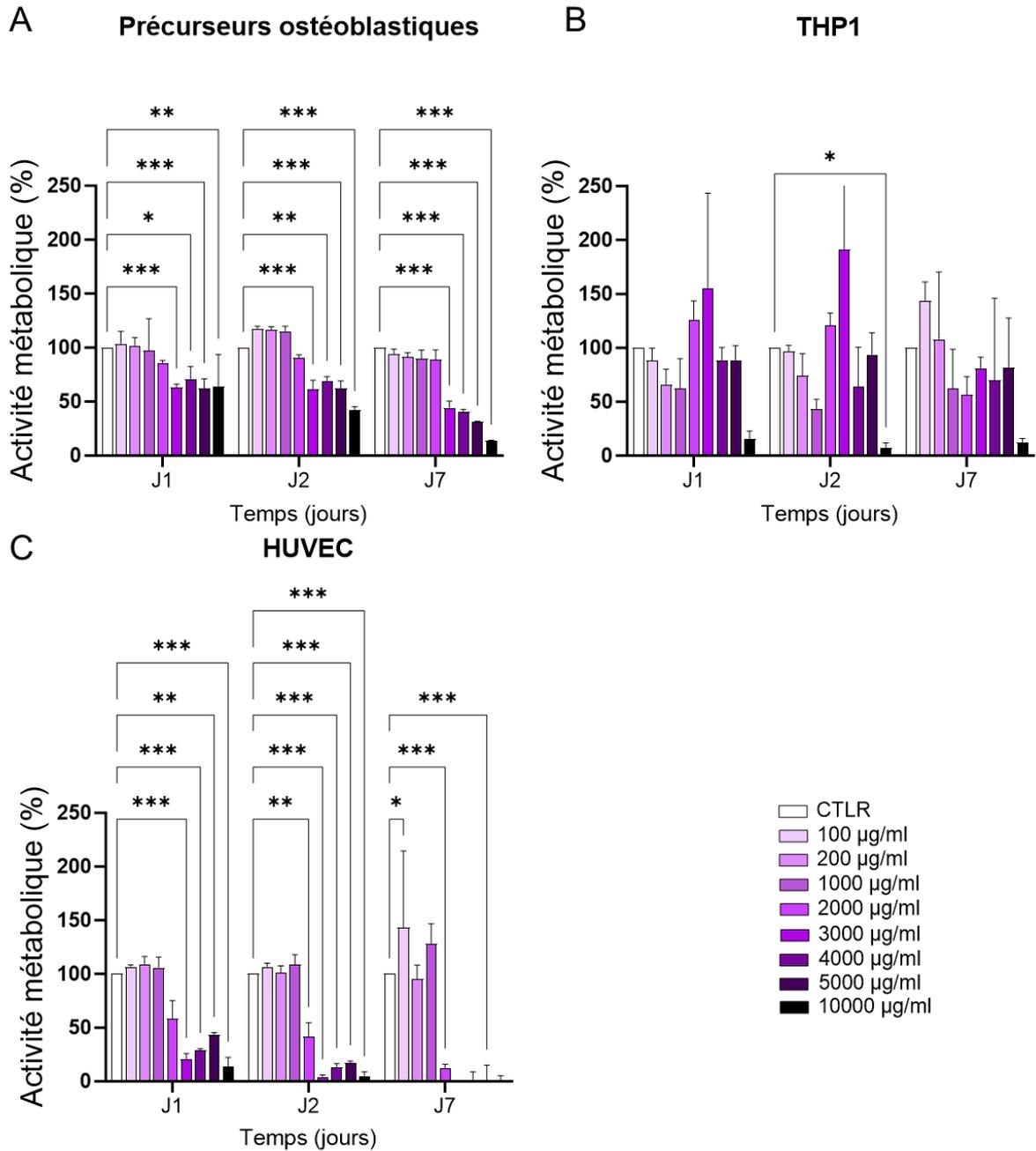


Figure 95 Evaluation de l'activité métabolique des cellules en fonction de la concentration en vancomycine.

A : activité métabolique des précurseurs ostéoblastiques, B : activité métabolique des monocytes, C : activité métabolique des cellules endothéliales. Toutes les conditions ont été réalisées en triplicat technique et biologique et les mesures ont été prises à J1, J2 et J7. Les résultats ont été normalisés par la valeur de leur contrôle respectif. Une analyse statistique a été effectuée reposant sur une ANOVA a deux facteurs, suivie d'un test de Tukey. Pour ces tests, $p < 0,05$ est considéré comme significatif. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Jusqu'à 1000 µg/mL de vancomycine, l'activité métabolique des cellules est identique au contrôle, pour tous les types cellulaires et cela, indépendamment du temps.

Pour les précurseurs ostéoblastiques, la première diminution significative de l'activité métabolique est observée dès 24 h d'incubation, à 3000 µg/mL de vancomycine (Figure 95. **A**). De plus, à partir de cette concentration, l'activité métabolique des cellules diminue significativement au cours du temps. A partir de 3000 µg/mL, l'activité métabolique diminue de plus de 25 % par rapport au contrôle. Cela signifie que le seuil de concentration au-dessus duquel la vancomycine est toxique pour les précurseurs ostéoblastiques est de 2000 µg/mL, ce qui est en accord avec les données issues de la littérature [272].

Les monocytes (THP1) semblent moins impactés par la vancomycine. En effet, la seule diminution significative de l'activité métabolique (diminution de plus de 75 % de l'activité métabolique par rapport au contrôle à J1) est observée à partir de 10 000 µg/mL de vancomycine (Figure 95. **B**). Le seuil de concentration au-dessus duquel la vancomycine est toxique pour les monocytes est de 5000 µg/mL.

Les cellules endothéliales (HUVEC) semblent, quant à elles, plus sensibles à la vancomycine. Une diminution drastique (plus de 70%) de l'activité métabolique de ces cellules est observée à partir de 2000 µg/mL de vancomycine dès J1 (Figure 95. **C**), ce qui est en accord avec les résultats issus de la littérature [271]. Le seuil de concentration au-dessus duquel la vancomycine est toxique pour les monocytes est donc de 1000 µg/mL.

Le seuil de cytotoxicité de la vancomycine sur les cellules de la niche osseuse est donc imposé par le type cellulaire le plus sensible à la vancomycine, les HUVEC, soit 1000 µg/mL. D'après ces résultats et ceux décrits en partie IV.4, la quantité de vancomycine circulante dans le bioréacteur reste inférieure à 200 µg/mL, ce qui est 5 fois inférieur au seuil de cytotoxicité déterminé précédemment. Par conséquent, la concentration de vancomycine circulante dans le bioréacteur ne présente pas de toxicité pour les trois types cellulaires étudiés. De plus, même si le seuil de cytotoxicité a pu être déterminé au travers de cette expérience, seule de la vancomycine native a été testée. A terme, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la vancomycine dégradée sur l'activité métabolique des cellules.

IV.7. Conclusion générale

D'après l'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre, il est possible de fonctionnaliser les architectures avec un hydrogel de chitosan contenant de la vancomycine.

Pour pouvoir développer un protocole d'analyse efficace permettant de détecter et de quantifier la vancomycine circulante dans le bioréacteur, il est impératif de tenir compte de la dégradation de celle-ci. Le protocole d'analyse doit permettre de séparer les pics de la vancomycine native et ceux de la vancomycine dégradée, ainsi que celui de l'étalon interne. Le choix de l'étalon interne ainsi que le protocole d'analyse est crucial car ils impactent

directement la qualité de l'analyse, la fiabilité des résultats et la durabilité de l'équipement et plus particulièrement de la colonne de séparation. Les résultats ont ainsi souligné la pertinence de la caféine en tant qu'étalon interne dans le cadre de cette étude. En effet, son utilisation a permis de développer un protocole d'analyse rapide et performant.

Même s'il est possible de détecter la vancomycine et de quantifier la vancomycine en circulation dans le bioréacteur, la méthode d'analyse par HPLC ainsi que les conditions expérimentales liées à l'utilisation du bioréacteur à perfusion, ne permettent pas en l'état d'obtenir les cinétiques de libération. Une mise en équation des conditions expérimentales a alors été nécessaire ce qui a conduit au développement d'un modèle mathématique, en tenant compte de l'accumulation du principe actif dans le système, de l'évaporation et de la perturbation du système par les prélèvements effectués.

Deux protocoles de chargement ont été mis en place, l'un consistant à charger les pièces une par une à l'aide d'une seringue à insuline et l'autre reposant sur l'utilisation d'une cloche à vide pour charger l'hydrogel à l'intérieur de l'architecture. Aucune différence n'est observée quant à la quantité d'hydrogel pouvant être chargée dans les architectures, cependant la seconde méthode semble plus pratique, car elle permet de fonctionnaliser plusieurs pièces en même temps, ne nécessite pas de chauffer l'hydrogel et elle permet de charger les microporosités. De plus elle est plus simple à mettre en place en conditions stériles.

Cette étude a prouvé qu'il est possible d'utiliser des architectures en hydroxyapatite en tant que réservoir de principe actif et que la vancomycine peut être libérée au cours du temps sur deux semaines. Par ailleurs, concernant la formulation de l'hydrogel, la modulation de la quantité de chitosan ou de vancomycine ne semble pas influencer le comportement de l'hydrogel dans le bioréacteur. Sachant que les macropores sont remplis intégralement par le chargement sous vide, il serait possible de temporiser les cinétiques de libération en réduisant la taille des macropores. Or cette modification des architectures risque de limiter les propriétés d'ostéointégration du matériau. Par conséquent la seule option pour modifier la cinétique de libération, consiste à modifier la formulation de l'hydrogel. Il serait également pertinent d'utiliser des pièces dont les dimensions correspondent parfaitement à celle de la chambre interne du bioréacteur, dans le but de s'assurer que le flux passe au travers de la pièce. Cela permettrait de comprendre précisément comment le flux passe au travers de l'architecture.

En revanche, la température de frittage des pièces module, à formulation d'hydrogel constante, les cinétiques de libération. Leur microstructure est affectée : plus la température de frittage est faible, plus la taille des grains diminue, plus la rugosité de surface est importante et plus le taux de microporosité augmente. Ces caractéristiques permettent de charger davantage d'hydrogel à sein des architectures, mais le rende aussi moins disponible. En effet,

l'hydrogel recouvre la surface du matériau et le passage du flux au travers des macropores limite son érosion. Par ailleurs, il a été prouvé que l'utilisation d'une cloche à vide permet à l'hydrogel de recouvrir la surface de l'architecture.

Or les architectures utilisées dans ces travaux doivent être doublement fonctionnalisées, par un hydrogel de vancomycine d'une part et par adsorption de cytokines à la surface du matériau d'autre part. Sachant que les cytokines sont adsorbées avant d'ajouter l'hydrogel, il faut s'assurer qu'il n'y a pas d'interaction ou d'incompatibilité de fonctionnalisation entre ces deux principes actifs.

Concernant la libération de la vancomycine dans le bioréacteur, la totalité de la vancomycine est libérée au bout de 14 jours. Une libération importante de la vancomycine est observée dans les premières heures suivant la mise en route du bioréacteur. Ce profil est souhaité car il correspond à l'administration d'une dose de charge visant à éliminer rapidement les bactéries potentiellement présentes au niveau du site osseux. Cependant, entre 50% et 80% de la vancomycine contenue dans l'architecture est libérée dans les premières 48h. Bien que souhaitée, cette libération reste trop importante pour assurer garantir l'efficacité des concentrations libérées au-delà de 14 jours.

La concentration en vancomycine circulante dans le bioréacteur est comprise entre 40 µg/mL et 200 µg/mL pendant 14 jours pour l'ensemble des conditions testées. Ces concentrations sont *a minima* 40 fois supérieures à la CMI et *a maxima* 5 fois inférieures au seuil de toxicité pour les cellules de la niche osseuse. Cela signifie que les architectures ainsi fonctionnalisées contiennent une quantité suffisante de vancomycine pour permettre de prévenir le développement des bactéries, sans être toxique pour les cellules présentes au niveau de la niche osseuse.

Lors de ces travaux, seul l'impact biologique de la concentration de vancomycine native, assimilée à la concentration de vancomycine circulante, a été évalué. Pour prouver la pertinence de l'utilisation d'un hydrogel contenant de la vancomycine pour fonctionnaliser des substituts osseux, il serait intéressant d'ajouter les cellules de la niche osseuse dans le bioréacteur à perfusion pour s'assurer que les cellules puissent adhérer et proliférer à la surface du matériau. En effet, il est possible que la présence d'hydrogel de chitosan contenant une quantité importante de vancomycine puisse avoir un impact négatif sur les cellules. Dans le but de pleinement caractériser la pertinence du DDS, la cinétique de libération doit être évaluée au moins sur 28 jours pour caractériser complètement l'antibiothérapie et les capacités d'ostéointégrations inhérente à la régénération osseuse [71], [111], [114]. Pour pouvoir évaluer ces effets sur des temps aussi longs, les protocoles d'utilisation et de prélèvement du bioréacteur doivent être modifiés. Pour limiter l'effet de l'évaporation du milieu,

il est possible d'augmenter la taille des réservoirs contenant le milieu à perfuser, de saturer l'atmosphère en humidité pour limiter l'évaporation, de compenser l'évaporation par ajout de milieu à intervalle fixe ou de renouveler entièrement le milieu.

Idéalement, il faudrait utiliser un bioréacteur en circuit ouvert, cela permettrait de s'affranchir de l'évaporation et des biais liés au protocole de prélèvement. Ce système est particulièrement difficile à mettre en place, surtout dans un incubateur de culture cellulaire. De plus ce circuit entraînerait une consommation considérable de milieu correspondant à 1,4 L par jour soit 40 L en 28 jours.

Plus raisonnablement, augmenter la taille des réservoirs permettrait de rendre négligeable l'évaporation de milieu, mais reste difficile à mettre en place en raison d'un manque d'espace dans l'incubateur. La saturation de l'atmosphère permet également de s'affranchir du phénomène d'évaporation mais les conditions expérimentales s'éloignent des conditions physiologiques. Les deux dernières solutions semblent donc les plus pertinentes.

Pour prolonger les études réalisées lors de ces travaux, le plus simple est de compenser l'évaporation par l'ajout de milieu à intervalle fixe. En effet, le taux d'évaporation a été déterminé et il suffit de modifier la formule de mise en équation des cinétiques de libération, pour prendre en compte le facteur de dilution lié à l'ajout de milieu compensant l'évaporation.

Il serait également pertinent de modifier le protocole de prélèvement. Sachant que l'efficacité de la vancomycine circulant dans le bioréacteur a été démontré, le volume des prélèvements peut être réduit pour se limiter à celui nécessaire à l'analyse HPLC (soit 1 mL). L'utilisation de pipette de classe A permettrait également de diminuer les incertitudes de mesures liées aux volumes de prélèvements.

Enfin la dernière solution est adaptée à la culture cellulaire au sein du bioréacteur à perfusion qui nécessite le renouvellement complet du milieu de culture tous les trois jours. Pour pouvoir évaluer la cinétique de libération, il faudra néanmoins prendre en compte le volume de milieu de culture dans les tubulures et dans la chambre du bioréacteur car celui-ci ne pourra pas être remplacé.

Chapitre V. Choix des cytokines et études de leur libération par les architectures

Comme présenté dans le chapitre I (paragraphe I.1.5.2), la phase inflammatoire débute immédiatement après la fracture ou l'intervention chirurgicale et peut durer une semaine. Pour stimuler cette phase et ainsi induire la prolifération et/ou la différenciation des cellules présentes au niveau osseux, il est nécessaire que des cytokines pro-inflammatoires soient libérées dans les premiers jours suivant l'implantation du substitut osseux et en quantité suffisante. Leur rôle est d'initier ou de stimuler la cascade d'activation conduisant à la régénération osseuse. Les cytokines ajoutées à la surface du matériau doivent agir à un stade précoce de la cascade d'activation pour améliorer les propriétés d'ostéointégration en induisant la différenciation des précurseurs ostéoblastiques et en inhibant celle des ostéoclastes. Le profil de libération idéale des cytokines pro-inflammatoires est présenté en Figure 96.

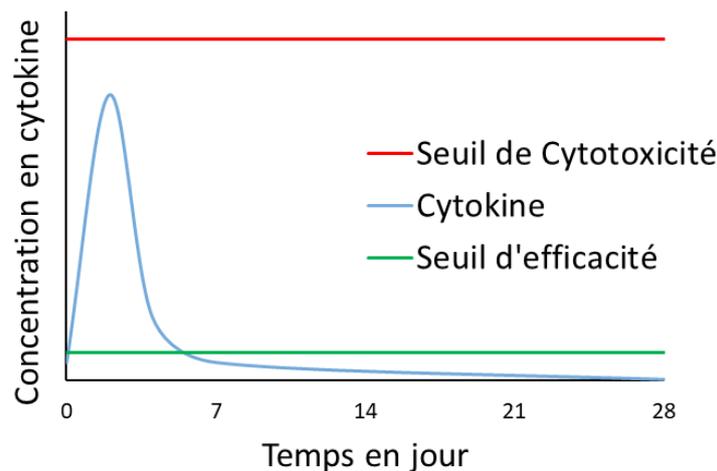


Figure 96 Profil de libération idéal de cytokines pro-inflammatoires

Celles-ci doivent être libérées dès l'implantation du substitut osseux. Les quantités libérées doivent permettre le recrutement des précurseurs osseux et/ou angiogéniques (chimiotactisme) ainsi que leur prolifération et leur différenciation. En plus d'une libération rapide et importante, celle-ci doit être courte (2 à 4 jours) pour permettre la poursuite de la cascade d'activation. En effet, tant que ces cytokines sont présentes, la cascade d'activation ne peut se poursuivre. Idéalement, après 4 jours, la totalité des cytokines contenues sur le substitut osseux doit avoir été libérée pour que les autres étapes de la régénération osseuse puissent se mettre en place (Figure 96).

Pour pouvoir être efficaces, la quantité de cytokines chargées, ainsi que la méthode de fonctionnalisation doivent permettre l'obtention de la cinétique de libération illustrée en Figure 96. Dans le cadre de la libération de cytokines, une des méthodes de fonctionnalisation permettant d'obtenir le profil de libération souhaité est l'adsorption (paragraphe 1.2.2.3.4).

L'étude sur les architectures fonctionnalisées sera conduite avec le même bioréacteur que celui utilisé pour l'étude des cinétiques de libération de la vancomycine. Le dosage des cytokines est un facteur clé car il permet d'obtenir la concentration en cytokine circulant dans le bioréacteur et donc d'en déduire les profils de libérations. La méthode de dosage doit donc être sensible et hautement spécifique pour être capable de doser uniquement la cytokine d'intérêt, présente en solution, même sous forme de trace.

L'objectif de ce chapitre est d'une part d'identifier les cytokines pertinentes pour assurer la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques à la surface du matériau et d'autre part, d'évaluer les interactions potentielles entre les cytokines, le substitut et l'hydrogel de chitosan. En effet, pour qu'un DDS soit efficace, il faut que l'ensemble des éléments du système serve les objectifs visés (paragraphe 1.4.4) [114]. Dans cette partie, sont étudiées les interactions entre le matériau et les cytokines avec et sans hydrogel de chitosan. L'impact de la vancomycine sur la cinétique de libération des cytokines ainsi que les potentielles interactions antibiotique-cytokines n'ont pas été évalué au cours de ces travaux.

Ce chapitre justifie donc le choix de l'interféron gamma (IFN- γ) et l'interleukine 17 A (IL-17A), puis décrit le protocole de fonctionnalisation des architectures avec les cytokines retenues. L'effet de ces cytokines sur la prolifération, la différenciation et l'activité métabolique des précurseurs ostéoblastiques est également présenté. Pour finir, les cinétiques de libération sont étudiées en plaçant les architectures dans le bioréacteur à perfusion.

V.1. Présentation des cytokines retenues

Au cours de ces travaux, deux cytokines ont été utilisées, l'IFN- γ et l'IL-17A en raison de leurs effets positifs connus sur la régénération osseuse (paragraphe 1.2.2.3).

V.1.1. L'interféron gamma

Découvert en 1965, l'interféron gamma (IFN- γ) est reconnu pour ses effets immunomodulateurs pléiotropes. Il est principalement sécrété par des lymphocytes actifs tels que les CD4, CD8, et NK [273]. L'IFN- γ joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie et dans les processus de régénération osseuse en permettant la différenciation des ostéoblastes et en inhibant celle des ostéoclastes. La présence d'IFN- γ induit également la production d'IL-17A par les lymphocytes T. L'interféron gamma est donc produit en continu

dans l'organisme pour assurer le remodelage osseux. Hors cas pathologiques, la concentration en IFN- γ dans le sang varie entre 100 pg/mL et 200 pg/mL, mais lors d'une inflammation, la concentration en IFN- γ augmente localement pour atteindre les doses efficaces sur les cellules environnantes [274]. Dans leurs travaux, Duque *et al.* démontrent que 10 ng/mL d'IFN- γ permet d'induire la différenciation des CSM en ostéoblastes [275].

V.1.2. Les interleukines 17

Le terme Interleukine 17 ou IL-17 fait référence à une famille de cytokines pro-inflammatoires. Cette famille se compose de six cytokines (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E et IL-17F) dont les rôles sont très variés tels qu'illustré sur la Figure 97.

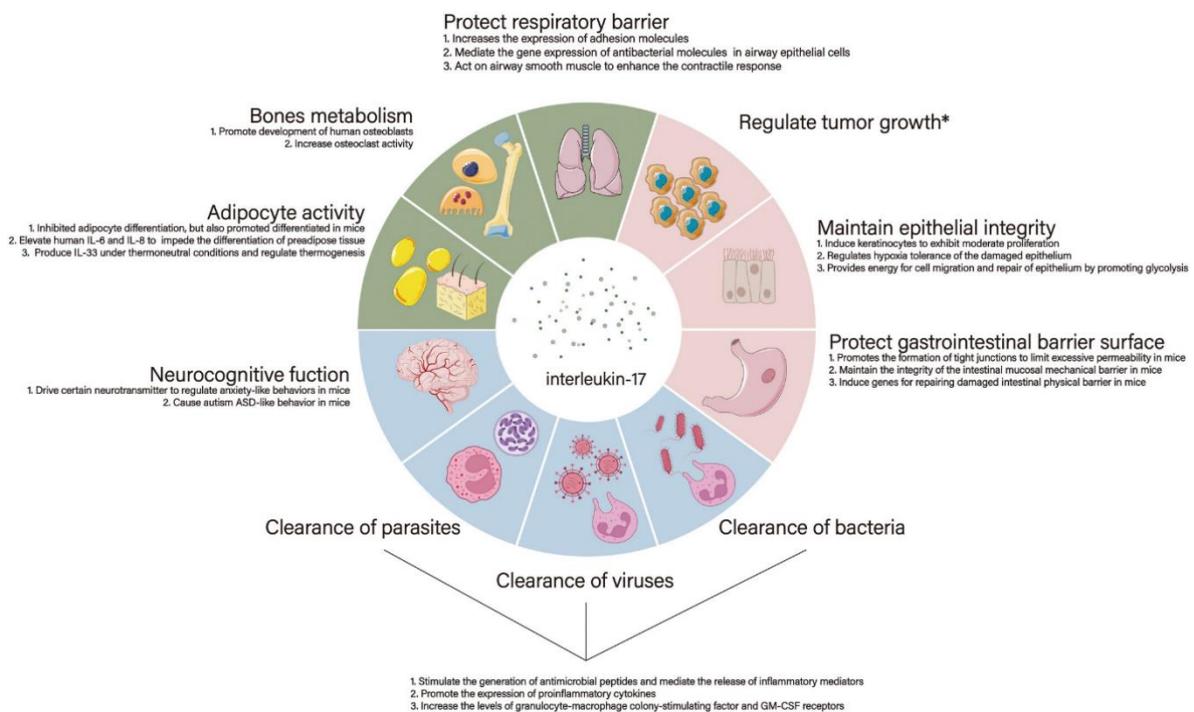


Figure 97 Rôles physiologiques des différentes IL-17 [276]

Elles participent au maintien de l'intégrité de l'épithélium, protègent la surface de la barrière gastro-intestinale, contribuent à l'élimination des pathogènes (bactéries, virus, parasites) en stimulant la production de peptides antimicrobiens et de cytokines pro-inflammatoires. Les interleukines 17 régulent également la production et l'activité des adipocytes, favorisent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et stimulent l'activité des ostéoclastes (Figure 97) [276].

Ces protéines peuvent être produites par de nombreuses cellules issues de la lignée lymphocytaire (lymphocytes T *helper* (Th17), lymphocytes *natural killer* (NK), cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3), neutrophiles et mastocytes). La diversité des actions de ces cytokines repose sur leurs structures tridimensionnelles différentes (liées à leurs séquences en acide aminé également différentes) qui ne leur permettent pas de se fixer sur les mêmes récepteurs membranaires. Par conséquent, l'effet d'une cytokine dépend de la cellule sur laquelle elles se fixe [277]. Sur les 6 structures de l'IL-17, seules l'IL-17A et l'IL-17E interviennent dans le processus de régénération tissulaire.

Les récepteurs membranaires de l'IL-17E sont produits par les kératinocytes et les cellules endothéliales. IL-17E intervient donc principalement dans la réparation et le renouvellement de l'épithélium en facilitant la prolifération, la différenciation et la migration des cellules endothéliales.

Les récepteurs de l'IL-17A sont présents à la surface des cellules endothéliales, des lymphocytes T et B, des fibroblastes, des monocytes de la moelle osseuse et des CSM. L'IL-17A, comme l'IL-17E, contribue au renouvellement de l'épithélium, mais permet également la différenciation des CSM en ostéoblastes et régule la différenciation des ostéoclastes. L'ensemble de ces raisons font de l'IL-17A une cytokine particulièrement intéressante pour la fonctionnalisation de substitut osseux [276].

Hors cas pathologiques, la concentration en IL-17A dans le sang oscille entre 0 et 10 pg/mL [274], [278], [279]. Cependant l'IL-17A, comme la plupart des cytokines pro-inflammatoires, est produite localement lors de la phase inflammatoire. La concentration en interleukine augmente alors de façon significative, jusqu'à atteindre les concentrations efficaces requises. Dans leurs travaux Huang *et al.* démontrent que 50 ng/mL d'IL-17 permettent d'induire la différenciation des CSM en ostéoblastes [147].

V.2. Évaluation biologique de l'effet des cytokines sur des cellules pré-ostéoblastiques humaines

L'objectif de cette partie est d'étudier l'effet de différentes cytokines, ainsi que leurs concentrations optimales dans le but de favoriser la régénération osseuse. Comme détaillé dans la partie V.1, l'IFN- γ et l'IL-17A ont de nombreuses cibles et effets. Ces deux cytokines se fixent sur les précurseurs ostéoblastiques pour induire leur différenciation. Dans cette partie, des précurseurs ostéoblastiques isolés à partir de déchets chirurgicaux ont donc été utilisés pour évaluer et comparer les effets de l'IFN- γ et de l'IL-17A sur l'activité métabolique et la différenciation de ces cellules.

V.2.1. Protocole d'évaluation de la différenciation des précurseurs ostéoblastiques

L'ensemble des expériences présentées dans cette partie ont été réalisées en triplicat technique et biologique sur les mêmes cellules, en suivant le protocole illustré sur la Figure 98. Ce protocole optimisé permet d'obtenir de nombreuses informations tout en limitant le nombre d'expériences et de cellules utilisées.

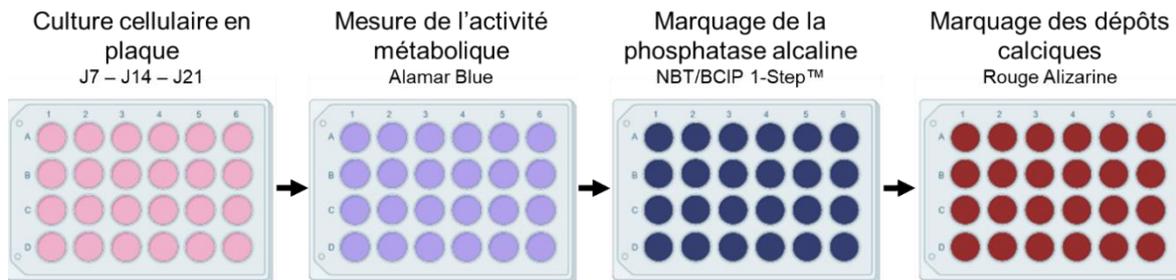


Figure 98 Schéma du protocole d'évaluation de l'impact des cytokines sur les précurseurs ostéoblastiques.

L'évaluation de l'activité métabolique permet de s'assurer que les concentrations en cytokine utilisées ne sont pas toxiques pour les cellules. Il est communément admis par la communauté scientifique qu'une diminution de plus de 30 % de l'activité métabolique des cellules par rapport au contrôle est suffisante pour justifier de la toxicité d'un principe actif.

La phosphatase alcaline est une protéine liée à la membrane cellulaire. Elle est présente sur de nombreux types cellulaires. Elle est notamment présente sur les ostéoblastes et est responsable de la production de phosphate inorganique, nécessaire au processus de minéralisation. Elle est exprimée dès les premiers jours de la différenciation des précurseurs en ostéoblastes matures. L'identification ou le marquage de la phosphatase alcaline est donc couramment utilisé par la communauté scientifique en tant que marqueur précoce de la différenciation des ostéoblastes [147], [275], [280], [281].

La coloration au rouge alizarine permet de marquer les dépôts calciques. La production de matrice minéralisée est la dernière fonction effectuée par les ostéoblastes. La présence d'une matrice minéralisée traduit la différenciation complète des précurseurs en ostéoblastes matures. Le marquage au rouge alizarine est donc un marqueur tardif de différenciation [147], [275], [280], [281].

D'un point de vue expérimental, pour étudier l'impact des cytokines sur la prolifération des cellules, celles-ci ont été spécifiquementensemencées à faible densité (10 000 cellules/cm²) dans des plaques 24 puits. Pour chacune des cytokines, 3 concentrations ont été

sélectionnées d'après les résultats de la littérature. Pour l'IL-17, les concentrations testées sont 20 nM (IL-20), 50 nM (IL-50) et 100 nM (IL-100) [282]. Pour l'IFN- γ , les concentrations testées sont 1 ng/mL (IFN-1), 10 ng/mL (IFN-10) et 100 ng/mL (IFN-100) [275].

Le but étant d'étudier l'impact d'une libération de cytokine sur les 7 premiers jours suivant l'implantation du substitut osseux, les cytokines sont ajoutées dans le milieu de différenciation uniquement lors des 7 premiers jours de l'expérience (Figure 96). En effet, l'objectif est de simuler la libération de cytokines par l'architecture lors des premiers jours suivant son implantation afin d'étudier leur impact sur les cellules ostéoblastiques. Ces expériences visent également à étudier le comportement des cellules ostéoblastiques en présence de cytokines. Une fois la ou les cytokines d'intérêt sélectionnées et les cinétiques de libération établies, le modèle d'étude pourra être complexifier en ajoutant des cellules de la niche osseuse au sein du bioréacteur à perfusion (paragraphe I.4.2). Les résultats obtenus lors de ces travaux pourront alors servir de référence pour évaluer la pertinence du modèle 3D dynamique par rapport au modèle 2D classique.

Les conditions expérimentales ainsi que les conversions associées sont résumées dans le Tableau 25. Les cellules ont également été cultivées dans un milieu complet adapté (MC – contrôle négatif) et dans un milieu permettant d'induire leur différenciation (MD – contrôle positif). Les compositions de ces deux milieux sont détaillées dans le chapitre II (paragraphe II.4.5).

Tableau 25 Résumé des conditions expérimentales de l'évaluation biologique des cytokines

Nomenclature	Milieu de culture	Concentration en IFN- γ		Concentration en IL-17	
		ng/mL	nM	ng/mL	nM
MC	Milieu complet	0	0	0	0
MD	Milieu de différenciation	0	0	0	0
IL-20	Milieu de différenciation	0	0	634	20
IL-50	Milieu de différenciation	0	0	1585	50
IL-100	Milieu de différenciation	0	0	3170	100
IFN-1	Milieu de différenciation	1	0,06	0	0
IFN-10	Milieu de différenciation	10	0,6	0	0
IFN-100	Milieu de différenciation	100	6	0	0

Pour chacun des puits, l'activité métabolique, la présence de la phosphatase alcaline et la présence de dépôts calciques ont été évaluées à J7, J14 et J21. En effet, 21 jours sont

nécessaires *in vitro* à la différenciation et à la production de la matrice minéralisée par les ostéoblastes.

V.2.2. Impact des cytokines sur l'activité métabolique

La Figure 99 présente l'impact des cytokines sur l'activité métabolique des précurseurs ostéoblastiques.

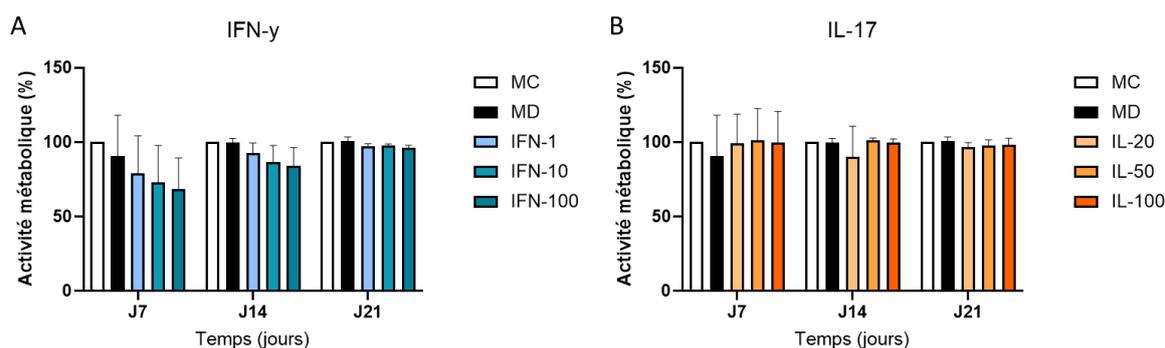


Figure 99 Impact des cytokines sur l'activité métabolique des précurseurs ostéoblastiques

A : Impact de l'IFN- γ sur l'activité métabolique des cellules, B Impact de l'IL-17 sur l'activité métabolique des cellules. L'ensemble des tests a été réalisé en triplicat technique et biologique. Les résultats ont été normalisés par ceux du milieu complet (MC). Une analyse statistique a ensuite été réalisée, consistant en une ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de Tukey. $p < 0.05$ est considéré significatif. *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

D'après les résultats obtenus, les concentrations en cytokine utilisées n'induisent pas une diminution significative de l'activité métabolique des cellules. Les concentrations en IL-17 et en IFN- γ testées ne sont donc pas toxiques pour les précurseurs ostéoblastiques. Ces résultats sont en accord avec les données issues de la littérature, ce qui conforte le choix de ces concentrations pour permettre la différenciation des précurseurs ostéoblastiques [275], [282].

En revanche, l'absence de différence entre les deux contrôles (MC ou MD) signifie que l'activité métabolique des cellules est équivalente, quelle que soit la composition du milieu de culture. Même si une augmentation de l'activité métabolique n'est pas systématique lors de la différenciation des cellules, elle est souvent une résultante de la production de gènes et de protéines [283]. D'après les résultats présentés en Figure 99, le test d'activité métabolique ne permet pas de conclure sur une potentielle différenciation des précurseurs ostéoblastiques.

V.2.3. Évaluation de la différenciation précoce des précurseurs ostéoblastiques

Comme expliqué précédemment, la phosphatase alcaline (PAL) est un marqueur précoce de la différenciation des ostéoblastes. À la suite de la mesure de l'activité métabolique, les puits ont été rincés et les cellules ont été fixées suivant le protocole décrit dans le chapitre II (paragraphe II.4.6). Une solution de 1-Step™ NBT / BCIP (Fischer scientifique) a ensuite été déposée dans chacun des puits et laissée incuber pendant 30 minutes à température ambiante. L'association de chlorure de tétrazolium (NBT) et de 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate (BCIP) entraîne la formation d'un précipité noir-violet en présence de phosphatase alcaline [282]. Les résultats présentés en Figure 100 ne permettent qu'une analyse semi-quantitative de la production de la phosphatase alcaline. Il existe des méthodes plus précises, mais elles nécessitent généralement une destruction du tapis cellulaire, ce qui ne permet pas de réaliser un marquage au rouge alizarine par la suite.

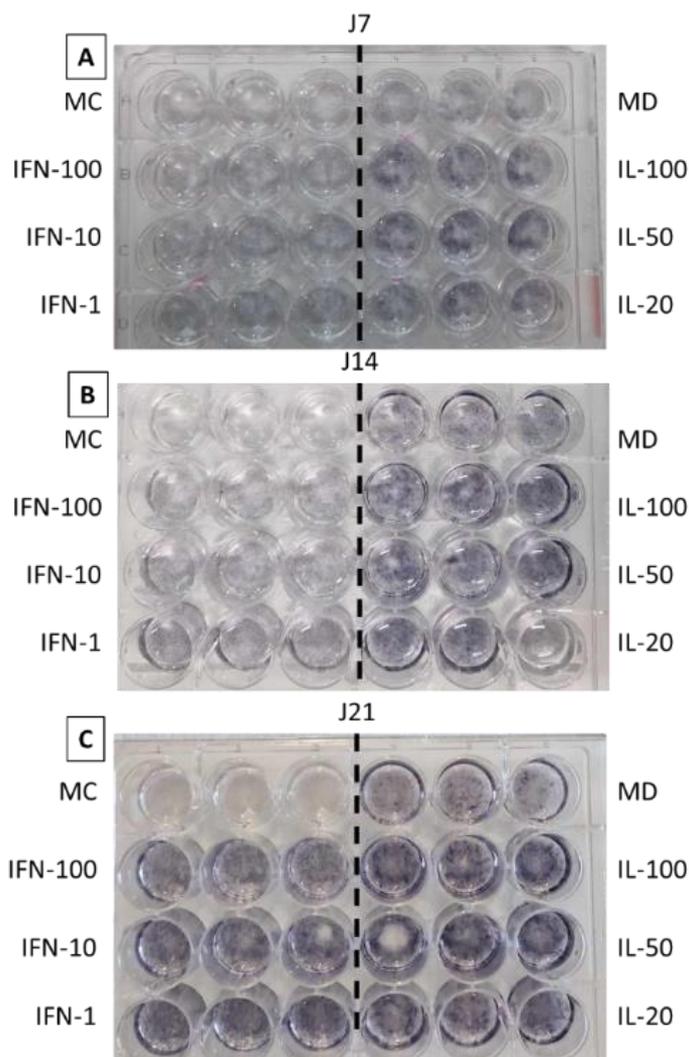


Figure 100 Illustration des résultats du marquage de la phosphatase alcaline des précurseurs ostéoblastiques en fonction de la concentration en cytokines.

A : résultat à J7, B : résultat à J14, C : résultat à J21. Chacune des photographies présentées correspond à un triplicat technique représentatif des résultats obtenus. MC : milieu complet, MD : Milieu de différenciation, IFN-100, IFN-10 et IFN-1 correspondent respectivement à des concentrations en IFN- γ de 100 ng/mL, 10 ng/mL et 1 ng/mL. IL-100, IL-50 et IL-20 correspondent respectivement à des concentrations en IL-17 de 100 nM, 50 nM et 20 nM. Les cytokines sont ajoutées dans les puits à J0 et J3 lors du changement de milieu.

À J7, la phosphatase alcaline n'est exprimée que par les cellules cultivées dans le milieu de différenciation (MD) et dans celui contenant des interleukines (Figure 100. **A**). D'après les observations, l'expression de la PAL n'est pas corrélée à la concentration en IL-17. En effet, aucune différence de coloration n'est observée entre les différentes concentrations en IL-17. Ces résultats peuvent être expliqués par les concentrations en IL-17 utilisées, qui d'après les travaux de Huang *et al.* sont *a minima* 12 fois supérieures à la concentration minimale permettant d'induire la différenciation des CSM humaines (50 ng/mL) [147]. Dans ces conditions, l'ensemble des récepteurs de l'IL-17 présents à la surface des cellules sont

saturés, ce qui ne permet pas de voir d'effet dose dépendant. Concernant les cellules cultivées avec l'IFN- γ , la PAL n'est pas exprimée à J7 et ce, quelle que soit la concentration (Figure 100. **A**). Ce résultat est surprenant, car l'IFN- γ intervient dans la différenciation des CSM en ostéoblastes, or les cellules utilisées dans ces travaux ne sont pas des CSM, mais des précurseurs ostéoblastiques, qui sont eux-mêmes issus de la différenciation des CSM. Il est possible que les cellules ostéoprogénitrices utilisées n'expriment plus les récepteurs membranaires permettant la fixation de l'IFN- γ . Il se pourrait également que l'IFN- γ perturbe le processus de différenciation des précurseurs ostéoblastiques. Cela expliquerait pourquoi les cellules cultivées en milieu de différenciation seul produisent la PAL alors que les cellules cultivées avec de l'interféron ne la produisent pas. De plus, cela expliquerait la faible diminution de l'activité métabolique observée précédemment (Figure 99. **A**).

À J14, la PAL est exprimée modérément par les cellules cultivées en milieu de différenciation (MD) et par celles ayant été en contact avec de l'IL-17. Elle est exprimée de la même façon par les cellules qui ont été en contact avec 1 ng/mL d'IFN- γ . En revanche, elle semble plus faiblement exprimée par les cellules ayant été cultivées avec 10 ng/mL et 100 ng/mL d'IFN- γ . Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse précédente selon laquelle l'IFN- γ inhiberait la différenciation des cellules ostéoprogénitrices. A J14, il resterait donc des traces suffisantes dans les puits IFN-10 et IFN-100 pour inhiber la différenciation des cellules (Figure 99. **B**). À l'inverse, la quantité d'IFN- γ restante dans les puits précédemment cultivés avec 1 ng/ml d'IFN- γ ne serait plus suffisante pour inhiber la différenciation des cellules.

A J21, seules les cellules cultivées dans le milieu complet, qui ne permet pas la différenciation des précurseurs ostéoblastiques (contrôle négatif), n'expriment pas la PAL. Aucune différence n'est observée entre l'expression de la PAL par les cellules cultivées en milieu de différenciation et celles cultivées en présence d'IFN- γ , quelle que soit la concentration. Cela signifie qu'en absence d'IFN- γ , les cellules sont capables de se différencier. La PAL est plus fortement exprimée par les cellules cultivées en présence d'IL-17 (Figure 99. **B**).

Pour conclure, l'IL-17 semble accélérer la différenciation des cellules. En effet, la présence d'IL-17 dans le milieu de culture pendant les 7 premiers jours de l'expérience a permis aux cellules d'exprimer la PAL plus rapidement qu'avec du milieu de différenciation seul. L'expression de la phosphatase alcaline au cours du temps est résumée dans le Tableau 26. D'après les résultats obtenus, la concentration en IL-17 n'a pas d'impact sur l'expression de la phosphatase alcaline. L'hypothèse avancée est que 20 nM d'IL-17 soit suffisant pour saturer l'ensemble des récepteurs membranaires des cellules. Au-vu des concentrations utilisées, il est également possible que de l'IL-17 persiste en concentration efficace dans les différents

puits de culture, stimulant d'autant plus la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques.

L'utilisation d'IFN- γ diminue l'expression de la PAL par les cellules en comparaison avec le milieu de différenciation seul. À forte concentration, l'IFN- γ inhibe l'expression de la PAL. D'après les résultats obtenus et ceux issus de la littérature, l'IFN- γ intervient à un stade précoce de la différenciation des CSM en cellules ostéoprogénitrices [275], [284]. Dans le cadre de ces travaux, l'utilisation de l'IL-17 semble donc plus appropriée, car elle permet de stimuler la différenciation des précurseurs ostéoblastiques et n'a pas d'impact négatif à forte concentration.

Tableau 26 Bilan de l'expression de la phosphatase alcaline par les précurseurs ostéoblastiques

		Expression de la phosphatase alcaline		
		J7	J14	J21
MC		-	-	-
MD		+	++	++
IFN-γ	1 ng/mL	-	++	++
	10 ng/mL	-	+	++
	100 ng/mL	-	+	++
IL-17	20 nM	+	++	+++
	50 nM	+	++	+++
	100 nM	+	++	+++

- : pas exprimée ; + : faiblement exprimée, ++ : modérément exprimée, +++ : fortement exprimée

V.2.4. Évaluation de la minéralisation de la matrice : coloration au rouge alizarine

Les cellules ont été marquées en suivant le protocole détaillé dans le chapitre II (paragraphe II.4.6). La matrice minéralisée n'a été observée que dans les puits des cellules cultivées pendant 21 jours, temps nécessaire à la différenciation des précurseurs ostéoblastiques en ostéoblastes matures. Seuls les résultats obtenus à J21 sont donc présentés en Figure 101.

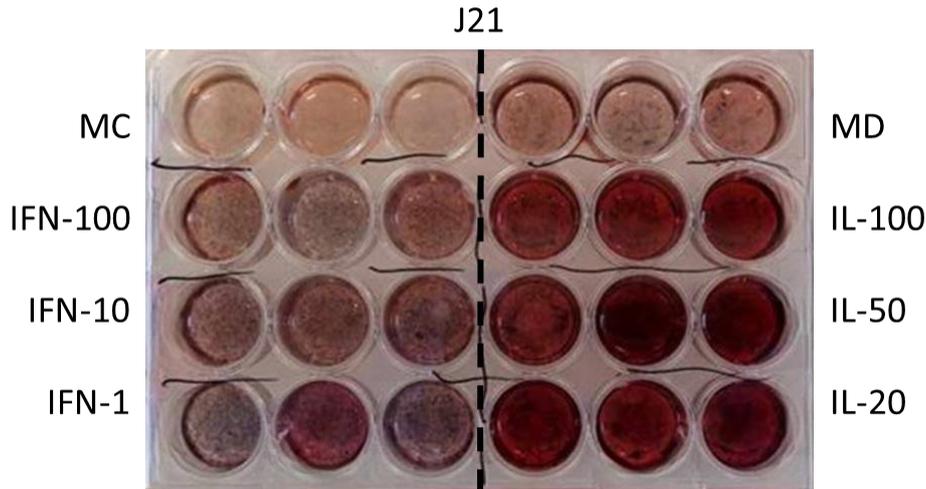


Figure 101 Illustration des résultats du marquage au rouge alizarine des précurseurs ostéoblastiques en fonction de la concentration en cytokines à 21 jours.

MC : milieu complet, MD : Milieu de différenciation, IFN-100, IFN-10 et IFN-1 correspondent respectivement à des concentrations en IFN- γ de 100 ng/mL, 10 ng/mL et 1 ng/mL. IL-100, IL-50 et IL-20 correspondent respectivement à des concentrations en IL-17 de 100 nM, 50 nM et 20 nM.

D'après les résultats de la Figure 101, seules les cellules ayant été en contact avec l'IL-17 présentent une matrice minéralisée. Les concentrations en IL-17 ne semblent pas impacter la minéralisation de la matrice, car la coloration semble identique quelle que soit la concentration. Conformément aux attentes, le milieu complet ne permettant pas la différenciation des précurseurs ostéoblastiques, aucun nodule de minéralisation n'est observé. Cependant, l'absence de nodule de minéralisation est également constatée pour les cellules cultivées dans du milieu complet, du milieu de différenciation ou de l'IFN- γ .

L'absence de minéralisation pour les cellules cultivées en milieu de différenciation (MD) signifie que l'ensemencement des cellules à 10 000 cellules/cm² était insuffisant pour induire la différenciation des précurseurs ostéoblastiques en 21 jours. En effet, la différenciation des cellules ostéoprogénitrices se déroule en deux étapes : une étape de prolifération, permettant aux cellules de coloniser la surface à minéraliser suivit d'une étape de différenciation à proprement parler visant à minéraliser la surface. La deuxième étape ne démarre que lorsque la surface a été entièrement colonisée par les cellules. De ce fait, les protocoles de différenciation décrits dans la littérature recommandent d'ensemencer les cellules à des densités élevées, proche de la confluence. Ces méthodes permettent d'obtenir une matrice minéralisée en 21 jours en utilisant un milieu de différenciation classique [148], [275]. Dans le cadre de ces travaux, les cellules ont été ensemencées à des concentrations inférieures à la confluence pour évaluer l'impact des cytokines sur la prolifération et sur la différenciation des précurseurs ostéoblastiques.

Pour conclure, lorsque les précurseurs ostéoblastiques sont ensemencés à faible densité cellulaire, seules les cellules cultivées en présence d'IL-17 ont été capable de produire une matrice minéralisée en 21 jours. De plus, l'analyse semi-quantitative utilisée lors de ces travaux n'a pas permis de mettre en évidence un effet dose dépendant. Cela signifie donc qu'une concentration de 20 nM en IL-17 permet de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules ostéoprogénitrices.

V.2.5. Effet des cytokines sur la morphologie des cellules

Une fois l'ensemble des marquages réalisé, l'aspect morphologique des cellules a été observé au microscope optique. Les images obtenues sont présentées en Figure 102.

Pour les cellules cultivées en milieu complet (MC), milieu ne permettant pas la différenciation des précurseurs ostéoblastiques, aucun changement morphologique n'est observé durant 21 jours. Concernant les cellules cultivées en milieu de différenciation, les cellules présentent une coloration bleue liée à l'expression de la phosphatase alcaline. Un changement de morphologie caractéristique (allongement) de la différenciation des cellules ostéoprogénitrices est également observé au cours du temps en fonction des différentes conditions expérimentales.

Pour les cellules cultivées avec l'IFN- γ , aucun changement morphologique ni marquage de la PAL n'est observé à J7. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle la présence d'IFN- γ inhiberait la différenciation des précurseurs ostéoblastiques. À partir de J7, les cytokines ne sont plus ajoutées dans les milieux. A J14, peu de cellules sont observées comparées aux autres conditions, l'IFN- γ pourrait donc également inhiber la prolifération des cellules. Un début de changement morphologique est observé à partir de J14 pour les cellules en contact avec 1 ng/ml d'IFN- γ . Une activité faible de la PAL (en bleu sur la Figure 102) est également observée pour les deux autres concentrations. À partir de J21, les cellules expriment la PAL et présentent un aspect morphologique comparable à MD J21 (Figure 102). Sachant que le milieu de culture est remplacé tous les 3 jours, il est raisonnable de supposer que l'IFN- γ n'est plus présent dans le milieu de culture à partir de J14. Auquel cas, seule la présence du milieu de différenciation est responsable de la différenciation des cellules traitée avec l'IFN- γ .

Concernant l'IL17, un changement d'aspect morphologique ainsi que l'expression de la PAL sont observés dès le jour 7. Au jour 14, les cellules ont proliféré et l'expression de la PAL est plus importante. Au jour 21, l'expression de la PAL s'intensifie davantage et les premiers nodules de minéralisation sont observables (en rouge sur la Figure 102).

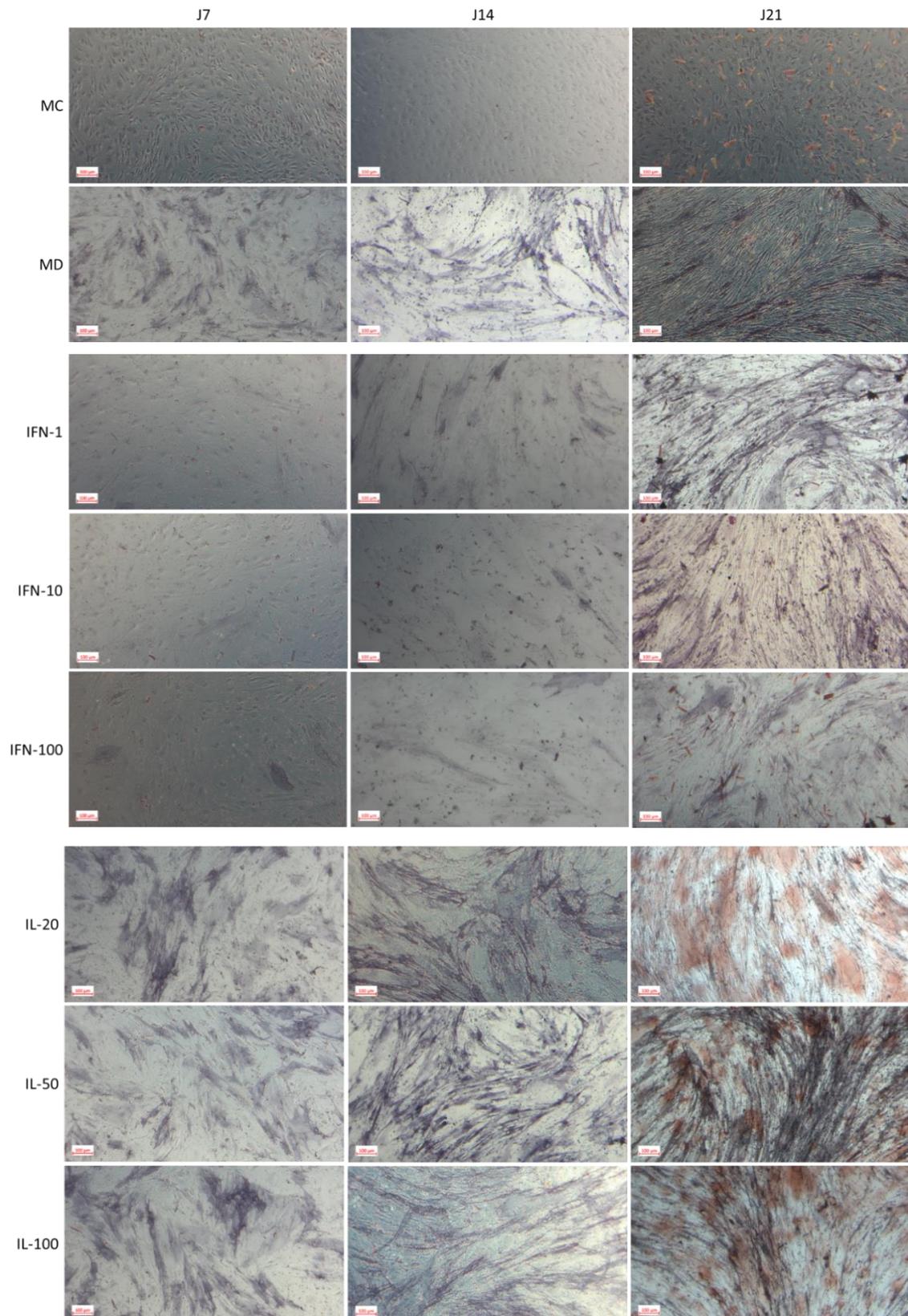


Figure 102 Observation au microscope optique de la morphologie des cellules ostéoblastiques après marquage successif à la phosphatase alcaline (bleu) et au rouge alizarine (rouge).

MC : milieu complet, MD : Milieu de différenciation, IFN-100, IFN-10 et IFN-1 correspondent respectivement à des concentrations en IFN- γ de 100 ng/mL, 10 ng/mL et 1 ng/mL. IL-100, IL-50 et IL-20 correspondent respectivement à des concentrations en IL-17 de 100 nM, 50 nM et 20 nM.

V.2.6. Conclusion de l'évaluation biologique

D'après l'ensemble des résultats présentés précédemment, les concentrations en IL-17 et en IFN- γ testées ne sont pas toxiques pour les précurseurs ostéoblastiques. Cependant, 1 ng/mL d'IFN- γ semble suffisant pour perturber la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques. En effet, lorsque la concentration en IFN- γ diminue dans les puits (dès J14 pour IFN-1 et à partir de J21 pour IFN-10 et IFN-100), les précurseurs ostéoblastiques changent de morphologie et deviennent capable de produire la PAL, qui sont des marqueurs précoces de la différenciation en ostéoblastes.

Concernant l'IL-17, sa présence induit la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques et les résultats sont observables dès le jour 7, quelle que soit la concentration en IL-17. L'IL-17 favorise la croissance et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques, dès 20 nM. D'après les travaux de Huang *et al.*, les concentrations en IL-17 utilisées ici (gamme concentration en ng/mL-Tableau 25) sont *a minima* 12 fois supérieures à la concentration minimale permettant d'induire la différenciation des CSM humaines (50 ng/mL) [147]. Les récepteurs membranaires de l'IL-17 à la surface des cellules étaient très certainement saturés. Les effets observés correspondent donc à l'activité maximale de l'IL-17 sur les précurseurs ostéoblastiques.

V.3. Fonctionnalisation et évaluation des cinétiques de libération

Pour étudier la cinétique de libération des cytokines par les substituts osseux, les architectures ont été fonctionnalisées par adsorption. S'agissant d'une étude préliminaire, une seule cytokine, l'IFN- γ , a été testée pour étudier la libération de cytokine en conditions dynamiques. Pour cela, les substituts osseux ont été fonctionnalisés par adsorption avant d'être placés dans un bioréacteur à perfusion adapté à la culture cellulaire, mimant les conditions physiologiques osseuses (II.3.1). En raison de la nature des cytokines et de leur faible poids moléculaire (31,7 kDa pour l'IL-17 et 16,8 kDa pour l'IFN- γ), il est admis que le choix de la cytokine adsorbée influence peu la cinétique de libération observée. L'étude de ces profils de libération fournira des bases pour évaluer ultérieurement l'impact du DDS sur des cultures cellulaires complexes *in vitro*.

V.3.1. Fonctionnalisation des substituts osseux

Le but de la fabrication de pièces micro-macroporeuses est d'utiliser leur microporosité de surface en tant que réservoir à cytokines. Afin d'étudier l'impact de la microporosité, les architectures présentant la microporosité la plus faible (pièces frittées à 1200 °C-1h) et celles avec la microporosité la plus forte (pièces frittées à 1100 °C-1h) ont été sélectionnées. L'état

de surface ainsi que le taux de microporosité des architectures sont rappelés sur la Figure 103 et dans le Tableau 27.

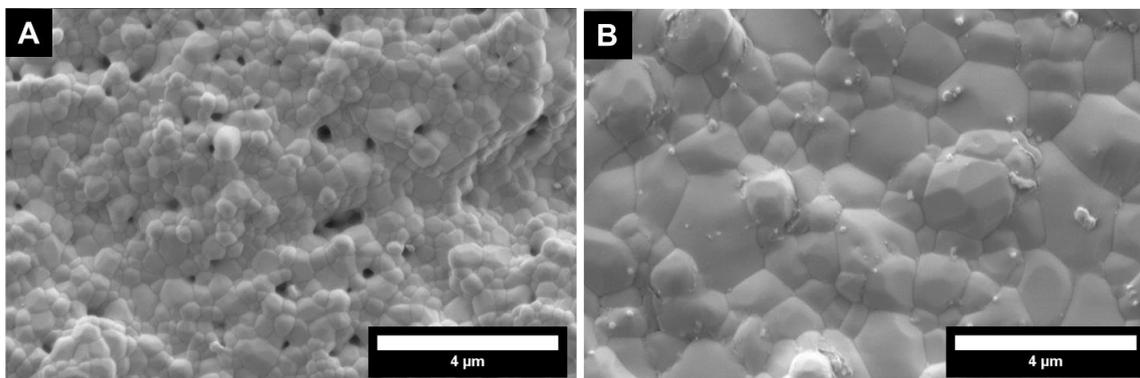


Figure 103 Microstructures des surfaces des architectures en fonction des températures de frittage.

A : état de surface des pièces frittées à 1100 °C-1h, B : état de surface des pièces frittées à 1200 °C-1h.

D'après les résultats du chapitre précédent, lorsque les architectures sont fonctionnalisées sous vide, l'hydrogel de chitosan se retrouve dans les micropores, ce qui peut impacter le chargement des cytokines. Lors d'une double fonctionnalisation, les cytokines sont dans un premier temps adsorbé à la surface du matériau avant d'ajouter l'hydrogel de vancomycine. Pour évaluer cet impact, les architectures ont donc été fonctionnalisées par des cytokines, avec ou sans hydrogel de chitosan. Afin d'étudier un système simple et de procéder par étape, un hydrogel sans vancomycine (CH avec 1,85 %m/v de chitosan) a été retenu. Ainsi seule l'influence de l'hydrogel sur la cinétique de libération de l'IFN- γ est évaluée. Les pièces avec hydrogels ont été fonctionnalisées après adsorption des cytokines, en utilisant le protocole de chargement sous vide décrit dans la partie chapitre IV (paragraphe IV.2.2.1). Les caractéristiques des pièces utilisées pour étudier l'impact de la microporosité et de l'hydrogel sont résumées dans le Tableau 27.

Tableau 27 Caractéristiques et nomenclatures de pièces placées dans le bioréacteur à perfusion. CH : hydrogel à 1,85 %m/v de chitosan (cf paragraphe IV.2.1.2).

Nomenclature	Conditions de frittage	Hydrogel utilisé	Rappel du taux de microporosité ouverte (%)
1100 °C	1100 °C - 1 h	Sans hydrogel	0,7
CH-1100 °C	1100 °C - 1 h	CH	0,7
1200 °C	1200 °C - 1 h	Sans hydrogel	0,0
CH-1200 °C	1200 °C - 1 h	CH	0,0

Pour que la libération en cytokine ait un effet sur les cellules, il faut qu'elle soit libérée rapidement et en concentration efficace. D'après les travaux de Duque *et al.*, 10 ng/ml d'IFN- γ suffisent à induire la différenciation et la prolifération des CSM. La concentration en cytokine dans la solution d'adsorption doit être nettement supérieure à celle efficace sur les cellules. De façon arbitraire, une solution d'IFN- γ de 300 ng/mL (soit 30 fois la concentration efficace) a été préparée en solubilisant l'interféron dans du PBS 1X. Les architectures ont été fonctionnalisées en suivant le protocole illustré en Figure 104.

Dans un premier temps, les pièces ont été placées dans des plaques 24 puits avant d'être recouvertes par 1,5 mL de la solution mère d'IFN- γ (Figure 104. **A** et **B**). La plaque a ensuite été agitée sur un agitateur à plaque à 100 rpm pendant 30 min à température ambiante. Puis, les pièces ont été déposées sur un papier absorbant pour retirer l'excédent de solutions d'IFN- γ contenue dans les macropores (Figure 104. **B**). Pour les pièces avec hydrogel de chitosan, ce dernier a été ajouté dans les puits contenant les pièces CH-1100 °C et CH-1200 °C et la plaque a été placée sous une cloche en verre raccordée à une pompe à vide. Le vide est maintenu à 0,75 bar en dessous de la pression atmosphérique pendant 30 min pour permettre à l'hydrogel de rentrer dans les pores de l'architecture (Figure 104. **C**). Enfin les pièces ont été placées dans le bioréacteur à perfusion.

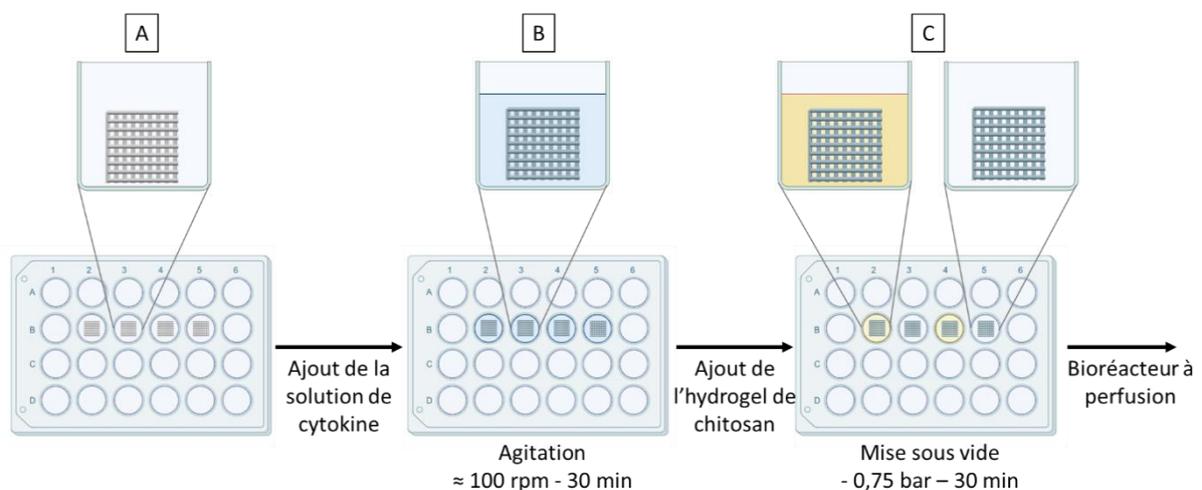


Figure 104 Schéma du protocole de fonctionnalisation des architectures par l'IFN- γ .

En bleu : fonctionnalisation de l'ensemble des architectures par adsorption d'IFN- γ . En jaune : fonctionnalisation de certaines architectures avec un hydrogel à 1,85 %m/v de chitosan.

V.3.2. Libération en conditions dynamiques avec le bioréacteur à perfusion

Les pièces fonctionnalisées ont été placées dans le bioréacteur à perfusion avec 25 mL de PBS 1X, selon le protocole décrit dans le chapitre II (paragraphe II.3.2). Compte tenu du mode d'action des cytokines et de leurs effets, celles-ci doivent être libérées rapidement par le substitut osseux, à savoir dans les 4 premiers jours après son implantation suivant un profil de libération idéal présenté en Figure 96. En raison de la sensibilité des cytokines, de leur faible *demie vie in vivo* (quelques minutes à quelques heures), et de la méthode de chargement utilisée (adsorption), la durée de l'étude en bioréacteur a été estimée à 4 jours [285], [286].

D'un point de vue pratique, comme pour l'étude de la libération de la vancomycine, deux prélèvements sont réalisés par ligne par jour avec un intervalle de 4 heures minimum. Lors des prélèvements, les lignes sont arrêtées en même temps et placées sous PSM II pour garantir le maintien de la stérilité. Sur chacune des lignes, un échantillon de 2 mL de milieu est prélevé. Afin de compenser le volume prélevé, 2 mL de PBS 1X sont ajoutés dans le réservoir du bioréacteur.

Le schéma de la gestion des échantillons est présenté en Figure 105. Une fois l'échantillon prélevé, celui est filtré avec un filtre seringue de 0,40 μm pour éliminer les potentiels débris d'hydrogel présents en solution (Figure 105. **A**, **B**). L'ensemble des échantillons a été filtré pour éliminer l'impact potentiel de la filtration sur la quantité de cytokine mesurée. Les échantillons ont ensuite été placés dans un tube Eppendorf et conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en vue du dosage ELISA (Figure 105. **C**). Une fois les échantillons des 4 jours de l'étude collectés, ceux-ci sont déposés dans une plaque 96 puits pour réaliser le dosage ELISA (Figure 105. **D**).

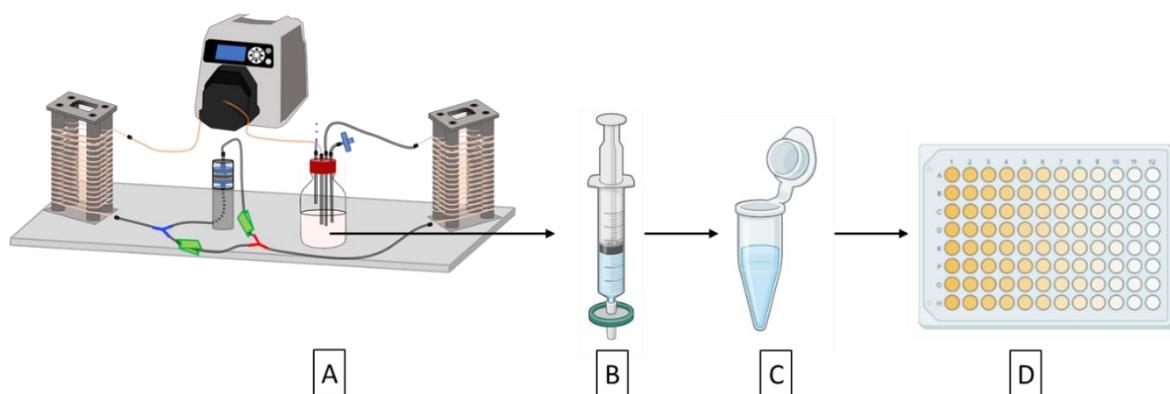


Figure 105 Schéma de la gestion des échantillons issus du bioréacteur lors de l'étude des cinétiques de libération des cytokines.

La quantité d'IFN- γ libérée au cours du temps a ensuite été déterminée en utilisant un kit ELISA sandwich (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Invitrogen). La méthode est présentée

dans le chapitre II (paragraphe II.4.7) et le protocole complet du kit est en Annexe 3. Cette technique de dosage repose sur l'utilisation de la loi d'absorption de Beer-Lambert. Le kit utilisé comporte donc 6 solutions de calibration dont les concentrations et les valeurs de densité optique sont connues. Ces concentrations vont de 0 à 30 pg/mL et permettent d'être dans un domaine linéaire. La quantité de cytokine présente dans l'échantillon a ensuite été estimée à l'aide d'un nanodrop afin de se placer dans le domaine de linéarité décrit précédemment. Cette méthode, bien que rapide, n'est pas spécifique à l'IFN- γ et reste moins sensible, néanmoins elle permet de déterminer le facteur de dilution nécessaire à l'utilisation du kit ELISA. D'après les résultats du Nanodrop, chaque échantillon a dû être dilué au 1/10 000^e. Après dilution, les échantillons ont été déposés dans les puits en suivant le protocole du kit ELISA (Annexe 3). La densité optique de chacun des puits est mesurée à 450 nm.

V.3.3. Cinétique de libération de l'IFN- γ

L'analyse des cinétiques de libération permet d'étudier l'impact de l'hydrogel et de la microporosité des architectures sur la libération de l'IFN- γ . Les concentrations en cytokines déterminées par dosage ELISA ont été multipliées par 10 000 (1 μ L d'échantillon dans 9 999 μ L de PBS 1X) afin de tenir compte du facteur de dilution et tracer les courbes présentées en Figure 106.

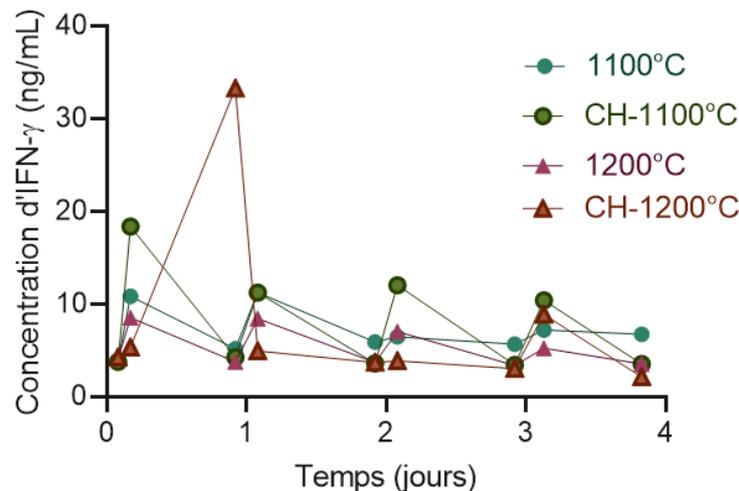


Figure 106 Quantité d'IFN- γ circulant dans le bioréacteur au cours du temps.

1100 °C : architecture frittée à 1100 °C sans hydrogel, CH-1100 °C : architecture frittée à 1100 °C fonctionnalisée avec un hydrogel de chitosan (1,85%*m/v*), 1200 °C : architecture frittée à 1200 °C sans hydrogel, CH-1200 °C : architecture frittée à 1200 °C fonctionnalisée avec un hydrogel de chitosan (1,85%*m/v*).

La Figure 106 présente l'évolution de la quantité d'IFN- γ dans les prélèvements au cours du temps. Quelles que soient les conditions, les profils de libération sont identiques, mais les quantités de cytokines dosées varient en fonction des conditions expérimentales.

Pour les deux conditions de frittage, la quantité de cytokines dosées dans les échantillons est légèrement plus importante lorsque l'architecture contient de l'hydrogel. Par exemple, les concentrations en IFN- γ circulant dans le bioréacteur oscillent entre 4 et 11 ng/mL pour les pièces frittées à 1100 °C et fonctionnalisées. Cette concentration oscille entre 4 et 18 ng/mL lorsqu'un hydrogel de chitosan est ajouté à la pièce (CH-1100 °C) (Figure 106).

Deux prélèvements sont réalisés par jour et pour l'ensemble des conditions, la concentration en IFN- γ mesurée dans le premier prélèvement est plus faible que dans le second. Bien que les mesures n'aient pas été réalisées en triplicat, ce phénomène est cyclique et est observé pour l'ensemble des conditions évaluées. Par exemple, à 22 h après la mise en fonctionnement du bioréacteur, la quantité de cytokine circulante est de 5,2 ng/mL pour l'architecture frittée à 1100 °C et de 3,8 ng/mL pour 1200 °C. A 26 h, ces concentrations étaient respectivement de 11,2 ng/mL et 8,5 ng/mL pour la pièce frittée à 1100 °C et celle à 1200 °C. Le même phénomène est observé 24 h après (soit à 46 h et 50 h) avec une concentration d'IFN- γ circulant passant de 3,7 ng/mL à 7,1 ng/mL pour 1100 °C et de 5,9 ng/mL à 6,5 ng/mL pour 1200 °C (Figure 106). Cette différence est d'autant plus marquée pour les architectures fonctionnalisées avec l'hydrogel de chitosan.

Une des hypothèses possibles est que les cytokines circulantes dans le bioréacteur finissent par s'adsorber à nouveau sur le matériau (phénomène d'adsorption/désorption). Ce phénomène serait facilité par la présence d'hydrogel à l'intérieur de la pièce. La mise en marche prolongée du bioréacteur entrainerait la formation d'un flux laminaire et seules les cytokines passant au travers des macropores resteraient en circulation. Cette hypothèse expliquerait pourquoi la quantité de cytokines circulantes diminuent dans un système fermé. Lors d'un prélèvement d'échantillon, la ligne est arrêtée et du milieu neuf est ajouté. Cela a pour conséquence de perturber l'équilibre du système en le diluant et de créer des turbulences dans le flux de milieu ce qui facilite la désorption des cytokines à la surface du matériau. Même si cette hypothèse permet d'expliquer les profils cycliques observés, les concentrations maximales mesurées devraient diminuer au cours du temps en raison de la dilution du système, dû aux prélèvements et l'ajout de milieu neuf. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait déterminer la quantité de cytokine adsorbée à la surface de l'architecture et tracer la cinétique de libération, tel que présenté dans le chapitre IV. Or, les conditions expérimentales utilisées pour évaluer la cinétique de libération ne sont pas adaptées aux cytokines. L'obtention d'un profil cyclique ne permet pas la mise en équation des données pour tracer la cinétique de libération.

D'après ces résultats, l'adsorption de cytokines à la surface des architectures permet donc leur libération et donc leur circulation dans le bioréacteur pendant 4 jours (Figure 106). Ces observations sont indépendantes de la présence d'hydrogel et des températures de frittage. Cela signifie qu'il est possible d'adsorber des cytokines à la surface d'architectures denses et que l'hydrogel n'empêche ni le chargement (en remplaçant les cytokines dans le réseau microporeux), ni la libération des cytokines. Pour la pièce frittée à 1100 °C la quantité d'IFN- γ circulante est plus importante que pour celle à 1200 °C, ce qui laisse supposer que la présence de micropores permet d'augmenter la quantité de cytokines pouvant être adsorbées sur la pièce. Bien que les expériences n'aient pas été réalisées en triplicat, le fait que les profils cycliques observés soient similaires indépendamment de la microporosité et de la présence d'hydrogel, laisse supposer que les micropores et l'hydrogel ont un effet limité sur la cinétique de libération de l'IFN- γ . Concernant la quantité de cytokine libérée, seuls les prélèvements pour CH-1100 °C contiennent suffisamment d'IFN- γ (>10 ng/mL) pour induire la différenciation des précurseurs ostéoblastiques [275].

Le kit ELISA utilisé, spécifique à l'IFN- γ , oblige à diluer fortement les échantillons pour obtenir des concentrations de l'ordre du pg/mL. À ces concentrations, les incertitudes de mesures sont particulièrement importantes pouvant conduire à l'obtention de valeurs aberrantes. En effet, les pièces ont été fonctionnalisées avec 1,5 mL d'une solution d'IFN- γ à 300 ng/mL. Même s'il n'a pas été possible de mesurer la quantité d'IFN- γ adsorbée sur chacune des pièces, elles ne peuvent pas contenir plus de 450 ng d'interféron. Si la totalité de l'IFN- γ adsorbé sur la pièce se libère dans le bioréacteur qui contient 25 mL de PBS 1X, la concentration finale d'interféron ne peut pas dépasser 18 ng/mL. Or d'après les résultats de la Figure 106. **A**, au moins deux points (CH-1100 °C-4h et CH-1200 °C-22h) sont au-dessus de cette valeur. Ces valeurs peuvent être liées à des incertitudes de mesures mais également à la présence de chitosan dans les échantillons. En effet, le chitosan absorbe à 450 nm, il est donc possible que la présence de chitosan dans les échantillons conduit à une surévaluation de la quantité de cytokine [19].

V.4. Conclusion et perspective

Concernant le choix des cytokines, les résultats démontrent l'efficacité de l'IL-17 sur la prolifération et la différenciation des cellules ostéoprogénitrices. Dès 20 nM d'IL-17, il est possible d'obtenir une matrice minéralisée à partir d'une faible densité cellulaire. À l'inverse, l'IFN- γ inhibe la différenciation et la prolifération cellulaire, même à faible concentration (1ng/ml). L'IL-17 est donc une cytokine particulièrement intéressante pour la fonctionnalisation de substitut osseux. En plus des résultats décrits précédemment, cette cytokine stimulerait la prolifération des cellules endothéliales ce qui facilite également l'intégration de l'implant [276].

D'un point de vue physiologique, l'IFN- γ reste une cytokine intéressante pour la fonctionnalisation de substitut osseux, car elle permet d'induire la différenciation des CSM et de stimuler la production d'IL-17A par les lymphocytes T [274], [275].

D'après les travaux de Huang *et al.*, les concentrations en IL-17 utilisées lors de ces travaux sont *a minima* 12 fois supérieures à la concentration minimale permettant d'induire la différenciation des CSM humaines (50 ng/mL) [147]. Bien qu'aucun effet cytotoxique n'ait été observé, il serait intéressant de reproduire cette expérience en diminuant les concentrations en IL-17. Cela permettrait de déterminer si les résultats observés sont liés à la persistance de l'IL-17 en concentration efficace dans le milieu durant 21 jours. De plus il serait également intéressant d'étudier l'effet des deux cytokines sur d'autres cellules de la niche osseuse, telles que les CSM, les cellules endothéliales et les monocytes. En effet, d'après la littérature, l'IFN- γ permet d'induire la différenciation des CSM et de stimuler la production d'IL-17A par les lymphocytes T [274], [275]. L'IL-17 aurait également des effets sur la prolifération des cellules endothéliales [276]. Il est primordial de caractériser l'ensemble de ces effets de façon indépendante pour s'assurer que les concentrations en cytokines ne sont pas toxiques pour les cellules et qu'elles n'inhibent la croissance d'un type cellulaire. Ces résultats serviront également de référence lorsque le modèle d'étude sera complexifié en ajoutant dans le bioréacteur, les architectures fonctionnalisées par les cytokines et les différents types cellulaires de la niche osseuse. Ils permettront alors de déterminer les effets synergiques ou antagonistes, le cas échéant.

L'étude de la libération de l'IFN- γ a permis de démontrer que l'adsorption de cytokines à la surface des architectures permet leur libération et donc leur circulation dans le bioréacteur pendant 4 jours. Ces résultats, observés pour l'ensemble des conditions, prouvent qu'il est possible d'adsorber des cytokines à la surface d'architectures denses et microporeuses et que l'hydrogel n'empêche ni leur chargement (en remplaçant les cytokines dans le réseau microporeux), ni leur libération. Bien que les expériences n'aient pas été réalisées en triplicat, la quantité d'IFN- γ circulante est plus importante pour la pièce frittée à 1100 °C que pour celle à 1200 °C, ce qui laisse supposer que la présence de micropores (et donc d'un réseau microporeux) permet d'augmenter la quantité de cytokines pouvant être adsorbées. De plus, le fait que les profils cycliques observés soient similaires indépendamment de la microporosité et de la présence d'hydrogel, laisse supposer que les micropores et l'hydrogel ont un effet limité sur la cinétique de libération de l'IFN- γ .

Ces expériences, bien que préliminaires, ont également permis de soulever certaines limites liées aux conditions expérimentales. En effet, le protocole expérimental utilisé pour doser les cytokines en solution correspond à celui utilisé pour la vancomycine. Or les résultats obtenus démontrent qu'il n'est pas adapté à l'étude de la libération des cytokines.

En effet, le protocole de prélèvement semble entraîner une perturbation importante du système. Celle-ci est due au prélèvement d'un grand volume (2 mL) qui perturbe l'équilibre du système en le diluant et en perturbant le flux de milieu. Cependant, contrairement à la vancomycine, le dosage de cytokine ne nécessite pas de grand volume (ici 1 μ L suffirait). Par conséquent, le volume prélevé peut-être diminué, limitant ainsi l'effet des prélèvements sur l'équilibre du système. En parallèle il serait également intéressant de réaliser des essais de désorption en condition statique pour évaluer l'effet du bioréacteur sur la cinétique de libération.

De plus, au vu des résultats préliminaires et des concentrations cibles (10 ng/mL) [275], le kit ELISA utilisé est trop sensible, ce qui nécessite de diluer les échantillons ce qui peut induire des imprécisions de mesures. Par ailleurs, le chitosan absorbe à 450 nm ce qui a pu avoir des conséquences sur la mesure de la densité optique dans chacun des puits, conduisant à une surévaluation de la quantité de cytokines contenues dans l'échantillon [19]. Pour éviter ces biais, il serait judicieux d'utiliser un kit ELISA moins sensible et d'effectuer les mesures de densité optique en dehors de la zone d'absorbance du chitosan. Cependant, mesurer la densité optique des échantillons issus du bioréacteur à 450 nm permettrait d'évaluer l'hydrolyse de l'hydrogel au cours du temps.

Enfin, le protocole de chargement doit également être amélioré car à l'heure actuelle, il ne permet pas de déterminer la quantité de cytokine absorbée à la surface du matériau. Pour cela, il faudrait mesurer la concentration en cytokine contenue dans la solution d'adsorption avant et après fonctionnalisation et ce, pour chacune des architectures. Il serait également pertinent de fonctionnaliser des architectures identiques avec des concentrations variables de cytokines pour déterminer la capacité maximale d'adsorption. Ces valeurs pourront également être comparées aux valeurs de surface spécifique et de porosité mercure pour estimer la répartition des cytokines sur le matériau.

Conclusion

Ces travaux ont permis de mettre en forme un substitut osseux dont la structure micro-macroporeuse permet non seulement de faciliter l'adhésion et la prolifération des cellules de la niche osseuse à sa surface, mais permet également le chargement de différents principes actifs. Ces caractéristiques font de ce substitut osseux un DDS (*drug delivery system*) ayant pour but d'améliorer les propriétés d'ostéointégration du substitut osseux en hydroxyapatite. Les deux principes actifs utilisés étaient la vancomycine, un antibiotique à large spectre efficace contre les bactéries gram positives, tels que *Staphylococcus aureus*, et l'IFN- γ dont le rôle est de stimuler la différenciation des CSM. Ces principes actifs ont pu être chargés selon une méthode permettant de respecter leur mode d'action. La vancomycine a été placée dans un hydrogel avant d'être introduite dans les macropores de l'architecture. L'IFN- γ a pu être ajouté par adsorption en utilisant la microporosité des substituts osseux. La libération de ces principes actifs a été évaluée en conditions dynamiques proche des conditions physiologiques osseuses, en utilisant un bioréacteur à perfusion. Pour les deux principes actifs utilisés, les concentrations circulantes dans le bioréacteur à perfusion ne sont pas toxiques pour les cellules de la niche osseuse. Pour la vancomycine, son efficacité sur les bactéries a également été prouvée.

Les biocéramiques micro-macroporeuses en hydroxyapatite ont été mises en forme par micro-extrusion. L'acquisition d'une nouvelle micro-extrudeuse par le laboratoire ainsi que les contraintes architecturales des pièces, inhérentes à l'ostéointégration et à la fonctionnalisation, ont nécessité un ajustement des protocoles de formulation et de mise en forme préétablis. Dans le but d'imprimer des pièces reproductibles tout en conservant les propriétés rhéologiques spécifiques (rhéofluidifiante et thixotrope) de la pâte, seul le taux de chargement en poudre a été modifié. Un taux de chargement de 47 %v en HA dans la pâte s'est avéré optimal pour permettre la mise en forme d'un grand nombre de pièces de façon reproductible. Cela a également été possible grâce à la nouvelle micro-extrudeuse qui dispose d'un réservoir de plus grande capacité et permet un contrôle plus précis des conditions d'extrusions (température de la platine Peltier, de la chambre d'impression et humidité relative). Ces caractéristiques ont amélioré la maîtrise du séchage de la pâte, à la fois dans le réservoir et lors de l'impression permettant de multiplier par deux le nombre d'architectures pouvant être imprimées par session.

La macroporosité des architectures, comprise entre 300 μm et 600 μm , a pu être obtenue en utilisant une buse d'extrusion de diamètre 600 μm et par l'utilisation d'un fichier CAO permettant de concevoir une architecture 3D présentant une structure en treillis. Le changement de micro extrudeuse a nécessité l'adaptation du fichier de commande, ce qui a

conduit au développement d'un g-code spécifique assurant l'impression reproductible des architectures. Afin d'en moduler la microporosité, les architectures ont ensuite été frittées à différentes températures, 1100°C, 1140°C et 1200°C, avec un palier d'une heure. Les analyses morphologiques des architectures après traitement thermique, réalisées à partir d'analyses d'images, ont confirmé l'effet de ces températures de frittage sur la taille des grains et la microporosité ouverte des architectures. La taille moyenne des grains varie entre 334 ± 140 nm pour un traitement à 1100°C et 1027 ± 475 nm pour un traitement à 1200°C. Le cycle de frittage de 1200°C-1h s'est révélé suffisant pour obtenir des architectures denses, et la diminution de la température de frittage a permis d'obtenir une porosité ouverte de surface de 0,4% pour les pièces frittées à 1140°C et de 0,7% pour celles frittées à 1100°C. Les analyses morphologiques des pièces après frittage ont également démontré que, quelle que soit la température de frittage, les dimensions des architectures restent équivalentes avec un diamètre moyen des macropores de 426 μ m, une taille moyenne des pièces de 8,7 mm x 8,7 mm x 5,3 mm et elles sont composées uniquement d'hydroxyapatite. Ces résultats confirment donc que la microporosité est le seul paramètre modifié par les différents traitements thermiques.

Ces caractéristiques architecturales sont idéales, car elles permettent de faciliter l'adhésion et la prolifération des cellules à la surface du matériau, elles peuvent être utilisées pour fonctionnaliser le substitut osseux et permettent la mise en place de ces pièces dans la chambre de perfusion du bioréacteur à perfusion afin d'étudier la cinétique de libération des principes actifs.

Pour fonctionnaliser les architectures avec l'antibiotique, un hydrogel contenant la vancomycine a été formulé. L'agent gélifiant utilisé était le chitosan en raison de sa biocompatibilité et de ses propriétés rhéologiques rhéofluidifiante et thermosensible facilitant la fonctionnalisation et la libération prolongée de l'antibiotique [254], [255]. Deux méthodes de fonctionnalisation différentes ont été étudiées, la première consiste à charger l'hydrogel avec une seringue à insuline au sein des architectures et la seconde à utiliser une pompe à vide pour faire rentrer l'hydrogel de vancomycine à l'intérieur des pièces. Cette seconde méthode est plus avantageuse, car elle permet de fonctionnaliser un grand nombre de pièces en même temps et peut être réalisée en conditions stériles, ce qui représente un intérêt majeur pour réduire les risques d'infections et de rejets de l'implant lié à la présence de pathogène [5]. De plus, l'utilisation de la pompe à vide, en créant une dépression, permet à l'hydrogel de rentrer à l'intérieur du réseau microporeux de l'architecture. Cette méthode permet donc de charger plus d'hydrogel dans les architectures. L'hydrogel contenu dans les micropores est moins accessible et s'hydrolyse plus lentement dans le bioréacteur.

La vancomycine libérée par les architectures au cours du temps a pu être quantifiée grâce à la mise en place d'un protocole d'analyse utilisant une technique de chromatographie liquide haute performance (HPLC). Le développement de ce protocole repose sur l'établissement d'un compromis entre la vitesse d'analyse, la sensibilité de détection et la capacité à séparer le principe actif de l'étalon interne. Compte tenu des conditions expérimentales et du grand nombre d'échantillons, la vitesse d'analyse et la séparation ont été privilégiées. Par ailleurs, la dégradation de la vancomycine en conditions physiologiques à partir de 48 h a été mise en évidence par l'apparition de pics supplémentaires sur le chromatogramme. Le choix de l'étalon interne et la qualité de la séparation ont alors été des paramètres cruciaux à prendre en compte lors du développement de la méthode d'analyse par HPLC. En effet l'utilisation d'un protocole ou d'un étalon interne inapproprié peut fausser les résultats. Lors de ces travaux, deux étalons internes ont été comparés, la téïcoplanine en raison de sa structure chimique et de sa fonction proche de la vancomycine, et la caféine qui est une petite molécule couramment utilisée en HPLC en tant qu'étalon interne. La structure et la composition de la téïcoplanine nécessitent le développement de protocole d'analyse complexe ce qui augmente le temps d'analyse ainsi que le traitement des données (intégration des pics). En revanche, l'utilisation de la caféine en tant qu'étalon interne a permis le développement d'un protocole d'analyse fiable, reproductible et rapide (10 min par échantillon).

Le fait d'utiliser un bioréacteur à perfusion ainsi que les conditions expérimentales associées aux prélèvements d'échantillons permettent d'obtenir la concentration en vancomycine circulante dans le bioréacteur. Ces résultats ont confirmé qu'il était possible d'utiliser des architectures en hydroxyapatite en tant que réservoir de principe actif et ont montré que la vancomycine peut être libérée au cours du temps sur deux semaines.

Dans le but d'obtenir les cinétiques de libération des principes actifs, il a été nécessaire de développer un modèle mathématique mettant en équation les conditions expérimentales du système telles que l'évaporation et la perturbation du système par les prélèvements effectués. Ce modèle a permis de constater la libération totale de la vancomycine contenue dans les architectures au bout de 14 jours ainsi qu'une libération importante du principe actif dans les premières heures suivant la mise en route du bioréacteur. Ce profil est souhaité, car il correspond à l'administration d'une dose de charge visant à éliminer rapidement les bactéries potentiellement présentes au niveau du site osseux. Le chitosan est donc un agent gélifiant particulièrement intéressant pour la libération prolongée de principe actif. De plus, l'hydrogel utilisé lors de ces travaux était relativement simple et il est possible de modifier sa formulation pour temporiser la libération de principe actif. En effet, bien que souhaité, la libération importante de vancomycine lors des premières 48h (entre 50% et 80% de la quantité totale), limite de façon significative la libération prolongée de l'antibiotique. L'utilisation d'un hydrogel

plus réticulé permettrait de réduire sa vitesse d'hydrolyse et donc d'avoir une libération plus progressive de la vancomycine. Pour cela il faudrait modifier le protocole de formulation de l'hydrogel pour obtenir un mélange homogène en augmentant la quantité de chitosan et d'agent réticulant (triphosphate pentasodique).

Par ailleurs, l'étude de l'état de surface des architectures après passage dans le bioréacteur a permis de souligner la persistance de l'hydrogel à la surface des architectures et dans certains macropores après 14 jours d'incubation dans le bioréacteur. Ces résultats laissent supposer que de l'hydrogel et donc de la vancomycine persistent dans les architectures, notamment celles présentant une microporosité élevée.

La présence d'hydrogel dans les macropores peut être liée à la formation d'un passage préférentiel du flux à travers l'architecture. Ce phénomène peut être intéressant, car il entraîne une libération importante de vancomycine lors de l'implantation du substitut correspondant à l'administration d'une dose de charge et permet de libérer rapidement certains macropores pour fournir un espace colonisable par les cellules. Sachant que les dimensions des architectures sont inférieures à celles de la chambre interne du bioréacteur (de 8,7 mm x 8,7 mm x 5,3 mm pour la pièce et de 10 mm x 10 mm x 8 mm pour la chambre), il est impossible de savoir si ce phénomène est dû au comportement intrinsèque de l'hydrogel ou s'il est lié au contournement de l'architecture par le flux. Pour confirmer ces hypothèses, il faudrait surdimensionner les dimensions du fichier CAO (11,36 mm x 11,36 mm x 11,27 mm) pour qu'après séchage et frittage, les pièces rentrent parfaitement dans la chambre interne du bioréacteur.

Concernant la présence de l'hydrogel au sein du réseau microporeux, celui-ci étant moins accessible, il s'hydrolysera au-delà de 14 jours. Le profil de libération et l'efficacité de la vancomycine contenue dans le réseau microporeux peuvent être déterminés en prolongeant la durée de l'étude en bioréacteur, ce qui nécessite de modifier légèrement le protocole expérimental compenser la baisse de volume dans le réservoir, lié à une évaporation importante du milieu.

Cependant, bien que la présence d'hydrogel modifie l'état de surface du matériau, elle n'empêche pas l'adhésion et la prolifération des cellules [270]. L'utilisation de l'hydrogel de chitosan est donc parfaitement compatible avec le développement de cultures cellulaires dynamiques au sein du bioréacteur à perfusion.

Pour l'ensemble des conditions étudiées, les concentrations en vancomycine circulante étaient comprises entre 40 µg/mL et 200 µg/mL tout au long de l'expérience. Il a été démontré expérimentalement que ces concentrations sont *a minima* 40 fois supérieures à la concentration minimale permettant d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*,

principale souche bactérienne responsable des infections nosocomiales. Par ailleurs, ces concentrations circulantes sont à *maxima* 5 fois inférieures aux concentrations toxiques pour les cellules humaines de la niche osseuse. D'un point de vue expérimental, il est donc possible de complexifier le modèle d'étude en ajoutant, dans le bioréacteur, les cellules de la niche osseuse aux architectures fonctionnalisées par l'hydrogel de vancomycine, car d'un point de vue physiologique, ces résultats confortent la pertinence du modèle d'étude. En effet, la vancomycine contenue dans l'architecture est libérée en quantité suffisante pour prévenir le développement d'infection liée à la présence de pathogènes, et ne présente pas de toxicité pour les cellules de la niche osseuse intervenant dans le processus d'ostéointégration. De plus, l'architecture fournit même un support colonisable pour les cellules. Cependant, si le chitosan n'est pas toxique pour les cellules, il reste néanmoins à déterminer les capacités de prolifération et de différenciation des cellules de la niche osseuse sur une architecture recouverte d'un hydrogel contenant une concentration importante de vancomycine.

Concernant les cytokines, les résultats ont permis de souligner l'intérêt de l'utilisation de deux cytokines, l'IFN- γ et l'IL-17A en raison de leur effet sur le recrutement, la prolifération et la différenciation de différentes cellules de la niche osseuse [147], [275], [276]. Les résultats ont montré que l'IL-17 A est particulièrement intéressante car elle permet de stimuler la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques, ce qui est en accord avec les données issues de la littérature [282]. Même si des concentrations en IFN- γ comprise entre 1 et 100 ng/mL semblent inhiber la différenciation et la prolifération des précurseurs ostéoblastiques utilisés lors de ces travaux, il intervient dans le recrutement de cellules ostéoprogénitrices et permet la production d'IL-17A. Son utilisation dans un système cellulaire complexe (co-culture) est donc pertinente, car il pourrait stimuler de façon indirecte la prolifération et la différenciation des cellules ostéogéniques. Ces travaux ont également mis en avant l'intérêt d'utiliser des céramiques microporeuses pour adsorber des cytokines. Bien que le protocole de chargement reste à améliorer pour charger les cytokines en quantité suffisante, les études préliminaires ont démontré que l'adsorption des cytokines à la surface du matériau permet une libération rapide (quelques jours) adaptée au mode d'action de ces molécules. Ces résultats ont également mis en avant la nécessité de développer un protocole de prélèvement d'échantillons du bioréacteur spécifique à l'évaluation de la cinétique de libération des cytokines.

Pour conclure, ces travaux constituent le point de départ du projet ANR Funmodular dont le but est de développer une céramique de 3^e génération favorisant l'intégration de l'implant et la régénération osseuse. Ils ont permis de démontrer la pertinence de l'utilisation de céramiques micro-macroporeuses en tant que DDS pour répondre à l'ensemble des besoins de la chambre biologique telle que décrite par Giannoudis *et al.* (concept du diamant) et permettre

l'ostéointégration du substitut osseux [8]. En effet, les principes actifs utilisés ont permis de prévenir des risques d'infections et de favoriser la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoblastiques. Enfin, ces travaux ont permis de développer un modèle d'étude complexe basé sur l'utilisation d'un système dynamique permettant de mimer les flux physiologiques au niveau du site osseux, ainsi que différents protocoles nécessaires à la poursuite du projet. Ainsi pour confirmer la pertinence DDS utilisé lors de ces travaux pour répondre à l'ensemble des besoins physiologiques nécessaire à son ostéointégration, il est nécessaire poursuivre les expériences en complexifiant le modèle d'étude.

La prochaine étape est d'ajouter les cellules de la niche osseuse dans le bioréacteur en plus des architectures fonctionnalisées par l'hydrogel de vancomycine. Cela permettra d'évaluer les interactions entre l'hydrogel et les cellules pour s'assurer que la présence d'antibiotique ne limite pas la colonisation et la différenciation des cellules à la surface du substitut. Cette étude nécessitera néanmoins la modification du protocole d'analyse HPLC, car du milieu de culture cellulaire remplacera le PBS 1X dans le réservoir du bioréacteur. Il faudra également modifier la mise en équation des conditions expérimentales pour tenir compte du changement de milieu nécessaire au maintien de la culture cellulaire.

Il serait aussi intéressant de prolonger l'étude de la cinétique de libération sur 28 jours pour s'assurer que l'antibiotique est libéré en concentration suffisante durant toute la durée de l'antibiothérapie. Cela permettra d'évaluer la capacité du réseau microporeux à délivrer de la vancomycine mais aussi de conclure sur la nécessité de modification de la formulation de l'hydrogel de chitosan.

L'étape suivante consistera à évaluer l'effet de l'adsorption des cytokines sur les cellules de la niche osseuse. Pour cela, les architectures fonctionnalisées ainsi que les cellules seront placées dans le bioréacteur à perfusion. Cela permettra de caractériser les interactions entre les cellules de la niche osseuse et les cytokines contenues sur l'architecture, pour s'assurer que profil de libération et les cytokines sélectionnées permettent de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules, améliorant l'ostéointégration du matériau.

Pour finir, la dernière étape consistera à regrouper l'ensemble des étapes évoquées précédemment pour évaluer la pertinence du substitut osseux micro-macroporeux, dans un système complexe, au plus proche des conditions physiologiques osseuses. Cette dernière étape permettra alors de s'assurer des propriétés d'ostéointégration du matériau.

Références bibliographiques

- [1] R. S. Taichman, « Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche », *Blood*, vol. 105, n° 7, p. 2631-2639, avr. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-06-2480.
- [2] E. H. Schemitsch, « Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! », *J. Orthop. Trauma*, vol. 31, n° 5, p. S20-S22, oct. 2017, doi: 10.1097/BOT.0000000000000978.
- [3] A. Ho-Shui-Ling, J. Bolander, L. E. Rustom, A. W. Johnson, F. P. Luyten, et C. Picart, « Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives », *Biomaterials*, vol. 180, p. 143-162, oct. 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.017.
- [4] L.-H. Locatelli, « Greffes osseuses autogènes à visée implantaire ».
- [5] D. J. Anderson *et al.*, « Strategies to Prevent Surgical Site Infections in Acute Care Hospitals: 2014 Update », *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, vol. 35, n° S2, p. S66-S88, sept. 2014, doi: 10.1017/S0899823X00193869.
- [6] J. Brie *et al.*, « A new custom made bioceramic implant for the repair of large and complex craniofacial bone defects », *J. Cranio-Maxillofac. Surg.*, vol. 41, n° 5, p. 403-407, juill. 2013, doi: 10.1016/j.jcms.2012.11.005.
- [7] C. Damia *et al.*, « Functionalization of phosphocalcic bioceramics for bone repair applications », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 95, p. 343-354, févr. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.01.008.
- [8] P. V. Giannoudis, T. A. Einhorn, et D. Marsh, « Fracture healing: The diamond concept », *Injury*, vol. 38, p. S3-S6, sept. 2007, doi: 10.1016/S0020-1383(08)70003-2.
- [9] P. Andrzejowski et P. V. Giannoudis, « The 'diamond concept' for long bone non-union management », *J. Orthop. Traumatol.*, vol. 20, n° 1, p. 21, déc. 2019, doi: 10.1186/s10195-019-0528-0.
- [10] F. Melsen et T. Steiniche, « Bone histomorphometry », *Osteoporos. Int.*, vol. 3, n° 1, p. 98-99, janv. 1993, doi: 10.1007/BF01621876.
- [11] E. Marieb et K. Hoehn, *Anatomie et physiologie humaines: Livre + eText + plateforme numérique MonLab - Licence étudiant 60 mois*. Pearson Education France, 2014.
- [12] J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, et P. Zioupos, « Mechanical properties and the hierarchical structure of bone », *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, n° 2, p. 92-102, mars 1998, doi: 10.1016/S1350-4533(98)00007-1.
- [13] P. Augat et S. Schorlemmer, « The role of cortical bone and its microstructure in bone strength », *Age Ageing*, vol. 35, n° suppl_2, p. ii27-ii31, sept. 2006, doi: 10.1093/ageing/af1081.
- [14] B. Clarke, « Normal Bone Anatomy and Physiology », *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN*, vol. 3, n° Suppl 3, p. S131-S139, nov. 2008, doi: 10.2215/CJN.04151206.
- [15] J. Guerrero, « Become of human mesenchymal stem cells in a three dimensional environment : application to bone tissue engineering », 2014.

- [16] J. A. Gasser et M. Kneissel, « Bone Physiology and Biology », in *Bone Toxicology*, S. Y. Smith, A. Varela, et R. Samadfam, Éd., in *Molecular and Integrative Toxicology*, Cham: Springer International Publishing, 2017, p. 27-94. doi: 10.1007/978-3-319-56192-9_2.
- [17] R. Oftadeh, M. Perez-Viloria, J. C. Villa-Camacho, A. Vaziri, et A. Nazarian, « Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review », *J. Biomech. Eng.*, vol. 137, n° 1, p. 0108021-01080215, janv. 2015, doi: 10.1115/1.4029176.
- [18] E. J. Arnsdorf, L. M. Jones, D. R. Carter, et C. R. Jacobs, « The Periosteum as a Cellular Source for Functional Tissue Engineering », *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, n° 9, p. 2637-2642, sept. 2009, doi: 10.1089/ten.tea.2008.0244.
- [19] C. Li et P. Fennessy, « The periosteum: a simple tissue with many faces, with special reference to the antler-lineage periosteum », *Biol. Direct*, vol. 16, n° 1, p. 17, déc. 2021, doi: 10.1186/s13062-021-00310-w.
- [20] A. Nahian et P. R. Chauhan, « Histology, Periosteum And Endosteum », 2022, Consulté le: 1 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557584>
- [21] A. L. Boskey et R. Coleman, « Aging and Bone », *J. Dent. Res.*, vol. 89, n° 12, p. 1333-1348, déc. 2010, doi: 10.1177/0022034510377791.
- [22] L. Folkestad *et al.*, « Bone geometry, density, and microarchitecture in the distal radius and tibia in adults with osteogenesis imperfecta type I assessed by high-resolution pQCT », *J. Bone Miner. Res.*, vol. 27, n° 6, p. 1405-1412, 2012, doi: 10.1002/jbmr.1592.
- [23] E. Donnelly, D. S. Meredith, J. T. Nguyen, et A. L. Boskey, « Bone tissue composition varies across anatomic sites in the proximal femur and the iliac crest », *J. Orthop. Res.*, vol. 30, n° 5, p. 700-706, mai 2012, doi: 10.1002/jor.21574.
- [24] W. J. Landis, « The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix », *Bone*, vol. 16, n° 5, p. 533-544, mai 1995, doi: 10.1016/8756-3282(95)00076-P.
- [25] L. Fan *et al.*, « The Use of Collagen-Based Materials in Bone Tissue Engineering », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, n° 4, p. 3744, févr. 2023, doi: 10.3390/ijms24043744.
- [26] M. Unal, A. Creecy, et J. S. Nyman, « The Role of Matrix Composition in the Mechanical Behavior of Bone », *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 16, n° 3, p. 205-215, juin 2018, doi: 10.1007/s11914-018-0433-0.
- [27] S. Weiner et H. D. Wagner, « THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations », *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, n° 1, p. 271-298, août 1998, doi: 10.1146/annurev.matsci.28.1.271.
- [28] Adele Boskey, « Bone mineral crystal size », *Osteoporos. Int.*, vol. 14, n° 5, p. 16-21, sept. 2003, doi: 10.1007/s00198-003-1468-2.
- [29] D. S. Gomes, A. M. C. Santos, G. A. Neves, et R. R. Menezes, « A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine », *Cerâmica*, vol. 65, p. 282-302, juin 2019, doi: 10.1590/0366-69132019653742706.
- [30] T. Yin, « The stem cell niches in bone », *J. Clin. Invest.*, vol. 116, n° 5, p. 1195-1201, mai 2006, doi: 10.1172/JCI28568.

- [31] K. Ikuta et I. L. Weissman, « Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, n° 4, p. 1502-1506, févr. 1992.
- [32] C. Nombela-Arrieta *et al.*, « Quantitative Imaging of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell localization and hypoxic status in the Bone Marrow microenvironment », *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, n° 5, p. 533-543, mai 2013, doi: 10.1038/ncb2730.
- [33] S. K. Nilsson, H. M. Johnston, et J. A. Coverdale, « Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches », *Blood*, vol. 97, n° 8, p. 2293-2299, avr. 2001, doi: 10.1182/blood.V97.8.2293.
- [34] I. G. Winkler *et al.*, « Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs », *Blood*, vol. 116, n° 23, p. 4815-4828, déc. 2010, doi: 10.1182/blood-2009-11-253534.
- [35] M. J. Kiel, Ö. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst, et S. J. Morrison, « SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells », *Cell*, vol. 121, n° 7, p. 1109-1121, juill. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.05.026.
- [36] A. Foudi, Y. Zhang, H. Liang, M. Wittner, et F. Louache, « Titre Environnement de la moelle osseuse et domiciliation des cellules souches hématopoïétiques », *Emc – Hematol.*, nov. 2018, Consulté le: 3 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://hal.science/hal-02381110>
- [37] S. Pinho et P. S. Frenette, « Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 20, n° 5, p. 303-320, mai 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0103-9.
- [38] C. Blanpain et E. Fuchs, « Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration », *Science*, vol. 344, n° 6189, p. 1242281, juin 2014, doi: 10.1126/science.1242281.
- [39] W. Tsuji, « Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration », *World J. Stem Cells*, vol. 6, n° 3, p. 312, 2014, doi: 10.4252/wjsc.v6.i3.312.
- [40] H. R. Khorasani, M. Sanchouli, J. Mehrani, et D. Sabour, « Potential of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Maxillofacial and Periodontal Regeneration: A Narrative Review », *Int. J. Dent.*, vol. 2021, p. 1-13, nov. 2021, doi: 10.1155/2021/4759492.
- [41] J. Kobolak, A. Dinnyes, A. Memic, A. Khademhosseini, et A. Mobasheri, « Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche », *Methods*, vol. 99, p. 62-68, avr. 2016, doi: 10.1016/j.jymeth.2015.09.016.
- [42] X. Fu, G. Liu, A. Halim, Y. Ju, Q. Luo, et G. Song, « Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair », *Cells*, vol. 8, n° 8, p. 784, juill. 2019, doi: 10.3390/cells8080784.
- [43] B. Sacchetti *et al.*, « Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment », *Cell*, vol. 131, n° 2, p. 324-336, oct. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.08.025.
- [44] R. Tevlin, G. G. Walmsley, O. Marecic, M. S. Hu, D. C. Wan, et M. T. Longaker, « Stem and Progenitor Cells: Advancing Bone Tissue Engineering », *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 6, n° 2, p. 159-173, avr. 2016, doi: 10.1007/s13346-015-0235-1.

- [45] S. Harada et G. A. Rodan, « Control of osteoblast function and regulation of bone mass », *Nature*, vol. 423, n° 6937, Art. n° 6937, mai 2003, doi: 10.1038/nature01660.
- [46] D. B. Georges, D. N. Rochet, et D. C. Joseph, « Ostéoblaste et environnement physico-chimique: effets du degré de minéralisation et des micro-vibrations ».
- [47] T. Bellido, « Osteocyte-Driven Bone Remodeling », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 94, n° 1, p. 25-34, janv. 2014, doi: 10.1007/s00223-013-9774-y.
- [48] N. Saidenberg-Kermanac'h, M. Cohen-Solal, N. Bessis, M.-C. De Vernejoul, et M.-C. Boissier, « Rôle de l'ostéoprotégérine dans l'inflammation et la polyarthrite rhumatoïde », *Rev. Rhum.*, vol. 71, n° 1, p. 11-16, janv. 2004, doi: 10.1016/S1169-8330(03)00331-4.
- [49] J. Xu, L. Yu, F. Liu, L. Wan, et Z. Deng, « The effect of cytokines on osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling in osteoporosis: a review », *Front. Immunol.*, vol. 14, p. 1222129, juill. 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1222129.
- [50] C. W. Archer et P. Francis-West, « The chondrocyte », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 35, n° 4, p. 401-404, avr. 2003, doi: 10.1016/S1357-2725(02)00301-1.
- [51] S. van Eegher *et al.*, « The differentiation of prehypertrophic into hypertrophic chondrocytes drives an OA-remodeling program and IL-34 expression », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 29, n° 2, p. 257-268, févr. 2021, doi: 10.1016/j.joca.2020.10.013.
- [52] S. G. Almalki et D. K. Agrawal, « Key Transcription Factors in the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells », *Differ. Res. Biol. Divers.*, vol. 92, n° 1-2, p. 41-51, 2016, doi: 10.1016/j.diff.2016.02.005.
- [53] W. R. Frontera et J. Ochala, « Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 96, n° 3, p. 183-195, mars 2015, doi: 10.1007/s00223-014-9915-y.
- [54] G. Gilbert *et al.*, « Calcium Signaling in Cardiomyocyte Function », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 12, n° 3, p. a035428, janv. 2020, doi: 10.1101/cshperspect.a035428.
- [55] J. Chamley-Campbell, G. R. Campbell, et R. Ross, « The smooth muscle cell in culture », *Physiol. Rev.*, vol. 59, n° 1, p. 1-61, janv. 1979, doi: 10.1152/physrev.1979.59.1.1.
- [56] K. N. Frayn, F. Karpe, B. A. Fielding, I. A. Macdonald, et S. W. Coppack, « Integrative physiology of human adipose tissue », *Int. J. Obes.*, vol. 27, n° 8, p. 875-888, août 2003, doi: 10.1038/sj.jco.0802326.
- [57] C. Michiels, « Endothelial cell functions », *J. Cell. Physiol.*, vol. 196, n° 3, p. 430-443, 2003, doi: 10.1002/jcp.10333.
- [58] B. E. Sumpio, J. Timothy Riley, et A. Dardik, « Cells in focus: endothelial cell », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 34, n° 12, p. 1508-1512, déc. 2002, doi: 10.1016/S1357-2725(02)00075-4.
- [59] M. Félétou, R. Busse, G. Edwards, I. Fleming, A. H. Weston, et P. M. Vanhoutte, « Dialogue entre cellules endothéliales et cellules musculaires lisses », *médecine/sciences*, vol. 19, n° 12, Art. n° 12, déc. 2003, doi: 10.1051/medsci/200319121242.
- [60] C. E. Kazianou, « Study of two-species chemotaxis models ».

- [61] L. Papargyris, « Mécanismes de génération des macrophages immunorégulateurs humains : rôle de l'axe IL-27 / Adénosine / PGE2 », phdthesis, Université d'Angers, 2019. Consulté le: 4 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-03385104>
- [62] J. Desoutter, R. Mentaverri, M. Brazier, et S. Kamel, « Le remodelage osseux normal et pathologique », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2012, n° 446, p. 33-42, nov. 2012, doi: 10.1016/S1773-035X(12)71733-1.
- [63] B. Charbonnier, « Développement de procédés de mise en forme et de caractérisation pour l'élaboration de biocéramiques en apatites phosphocalciques carbonatées. ».
- [64] L. J. Raggatt et N. C. Partridge, « Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling * », *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n° 33, p. 25103-25108, août 2010, doi: 10.1074/jbc.R109.041087.
- [65] K. L. Insogna *et al.*, « Colony-stimulating factor-1 induces cytoskeletal reorganization and c-src-dependent tyrosine phosphorylation of selected cellular proteins in rodent osteoclasts. », *J. Clin. Invest.*, vol. 100, n° 10, p. 2476-2485, nov. 1997, doi: 10.1172/JCI119790.
- [66] C.-M. Yang, C.-S. Chien, C.-C. Yao, L.-D. Hsiao, Y.-C. Huang, et C. B. Wu, « Mechanical Strain Induces Collagenase-3 (MMP-13) Expression in MC3T3-E1 Osteoblastic Cells * », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 21, p. 22158-22165, mai 2004, doi: 10.1074/jbc.M401343200.
- [67] J. Kenkre et J. Bassett, « The bone remodelling cycle », *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.*, vol. 55, n° 3, p. 308-327, mai 2018, doi: 10.1177/0004563218759371.
- [68] R. Wazzani, « Effets de l'exercice physique sur le tissu osseux et sa vascularisation: comparaison entre différentes modalités de course ».
- [69] T. Funck-Brentano et M. Cohen-Solal, « Le vieillissement osseux: les nouveaux acteurs de communication intercellulaire », *Médecine Longévité*, vol. 2, n° 4, p. 200-204, déc. 2010, doi: 10.1016/j.mlong.2010.05.001.
- [70] A. Vetter *et al.*, « Temporal tissue patterns in bone healing of sheep », *J. Orthop. Res.*, vol. 28, n° 11, p. 1440-1447, 2010, doi: 10.1002/jor.21175.
- [71] I. Pountos et P. V. Giannoudis, « Fracture Healing: Back to Basics and Latest Advances », in *Fracture Reduction and Fixation Techniques: Upper Extremities*, P. V. Giannoudis, Éd., Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 3-17. doi: 10.1007/978-3-319-68628-8_1.
- [72] A. Vetter *et al.*, « The mechanical heterogeneity of the hard callus influences local tissue strains during bone healing: A finite element study based on sheep experiments », *J. Biomech.*, vol. 44, n° 3, p. 517-523, févr. 2011, doi: 10.1016/j.jbiomech.2010.09.009.
- [73] M. Dooley, J. McLaren, F. R. A. J. Rose, et I. Notingher, « Investigating the feasibility of spatially offset Raman spectroscopy for in-vivo monitoring of bone healing in rat calvarial defect models », *J. Biophotonics*, vol. 13, n° 10, p. e202000190, 2020, doi: 10.1002/jbio.202000190.
- [74] I. H. Kalfas, « Principles of bone healing », *Neurosurg. Focus*, vol. 10, n° 4, p. 1-4, avr. 2001, doi: 10.3171/foc.2001.10.4.2.

- [75] P. M. Mountziaris et A. G. Mikos, « Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration », *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 14, n° 2, p. 179-186, juin 2008, doi: 10.1089/ten.teb.2008.0038.
- [76] T. A. Einhorn, « The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing », *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 355, p. S7, oct. 1998.
- [77] L. Claes, N. Maurer-Klein, T. Henke, H. Gerngross, M. Melnyk, et P. Augat, « Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing », *J. Orthop. Res.*, vol. 24, n° 6, p. 1178-1185, 2006, doi: 10.1002/jor.20173.
- [78] Z. Thompson, T. Miclau, D. Hu, et J. A. Helms, « A model for intramembranous ossification during fracture healing », *J. Orthop. Res.*, vol. 20, n° 5, p. 1091-1098, 2002, doi: 10.1016/S0736-0266(02)00017-7.
- [79] E. Roddy, M. R. DeBaun, A. Daoud-Gray, Y. P. Yang, et M. J. Gardner, « Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives », *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.*, vol. 28, n° 3, p. 351-362, avr. 2018, doi: 10.1007/s00590-017-2063-0.
- [80] H. Petite, « La bio-ingénierie de la régénération osseuse », *médecine/sciences*, vol. 18, n° 10, Art. n° 10, oct. 2002, doi: 10.1051/medsci/20021810995.
- [81] T. Albrektsson et C. Johansson, « Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration ».
- [82] P. V. Giannoudis, H. Dinopoulos, et E. Tsiridis, « Bone substitutes: An update », *Injury*, vol. 36, n° 3, Supplement, p. S20-S27, nov. 2005, doi: 10.1016/j.injury.2005.07.029.
- [83] T. Boyce, J. Edwards, et N. Scarborough, « ALLOGRAFT BONE: The Influence of Processing on Safety and Performance », *Orthop. Clin. North Am.*, vol. 30, n° 4, p. 571-581, oct. 1999, doi: 10.1016/S0030-5898(05)70110-3.
- [84] J. T. B. Ratnayake, M. Mucalo, et G. J. Dias, « Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends: Substituted HA for Bone Regeneration », *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 105, n° 5, p. 1285-1299, juill. 2017, doi: 10.1002/jbm.b.33651.
- [85] N. Naour, « Révision de catégories homogènes de dispositifs médicaux », HAS, 2013. Consulté le: 23 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2013-06/rapport_devaluation_des_substituts_osseux.pdf
- [86] V. L. Zizzari, S. Zara, G. Tetè, R. Vinci, E. Gherlone, et A. Cataldi, « Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review », *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, vol. 122, n° 4, p. 392-402, oct. 2016, doi: 10.1016/j.oooo.2016.04.010.
- [87] P. Janicki et G. Schmidmaier, « What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells », *Injury*, vol. 42, p. S77-S81, sept. 2011, doi: 10.1016/j.injury.2011.06.014.
- [88] M. Zhang *et al.*, « Recent developments in biomaterials for long-bone segmental defect reconstruction: A narrative overview », *J. Orthop. Transl.*, vol. 22, p. 26-33, mai 2020, doi: 10.1016/j.jot.2019.09.005.

- [89] H. C. Fayaz *et al.*, « The role of stem cells in fracture healing and nonunion », *Int. Orthop.*, vol. 35, n° 11, p. 1587-1597, nov. 2011, doi: 10.1007/s00264-011-1338-z.
- [90] H. Petite *et al.*, « Tissue-engineered bone regeneration », *Nat. Biotechnol.*, vol. 18, n° 9, p. 959-963, sept. 2000, doi: 10.1038/79449.
- [91] Y. Yun, B. K. Lee, et K. Park, « Controlled drug delivery systems: the next 30 years », *Front. Chem. Sci. Eng.*, vol. 8, n° 3, p. 276-279, sept. 2014, doi: 10.1007/s11705-014-1426-x.
- [92] G. Manish et S. Vimukta, « Targeted drug delivery system: A Review », 2011.
- [93] J. Gao, J. M. Karp, R. Langer, et N. Joshi, « The Future of Drug Delivery », *Chem. Mater.*, vol. 35, n° 2, p. 359-363, janv. 2023, doi: 10.1021/acs.chemmater.2c03003.
- [94] P. Davoodi *et al.*, « Drug delivery systems for programmed and on-demand release », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 132, p. 104-138, juill. 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.07.002.
- [95] « Différents antibiotiques et micro-organismes producteurs », Techniques de l'Ingénieur. Consulté le: 12 avril 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www-techniques-ingenieur-fr.ezproxy.unilim.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/nanotechnologies-et-biotechnologies-pour-la-sante-42608210/production-d-antibiotiques-par-biotechnologies-j6008/differents-antibiotiques-et-micro-organismes-producteurs-j6008niv10001.html>
- [96] E. Etebu et I. Ariekpar, « Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives ».
- [97] M. Opatowski, « Résistance bactérienne aux antibiotiques, apport du système national des données de santé ».
- [98] J. Conly et B. Johnston, « Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox », *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, vol. 16, n° 3, p. 159-160, 2005, doi: 10.1155/2005/892058.
- [99] World Health Organization, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva: World Health Organization, 2014. Consulté le: 17 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>
- [100] N. Sabtu, D. Enoch, et N. Brown, « Antibiotic resistance: What, why, where, when and how? », *Br. Med. Bull.*, vol. 116, oct. 2015, doi: 10.1093/bmb/ldv041.
- [101] A. Muller, « Bon usage des antibiotiques: résultats d'actions dans différents types d'établissements de santé ».
- [102] E. Rubinstein et Y. Keynan, « Vancomycin Revisited 60 Years Later », *Front. Public Health*, vol. 2, oct. 2014, doi: 10.3389/fpubh.2014.00217.
- [103] W. Zamoner, I. R. S. Prado, A. L. Balbi, et D. Ponce, « Vancomycin dosing, monitoring and toxicity: Critical review of the clinical practice », *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 46, n° 4, p. 292-301, 2019, doi: 10.1111/1440-1681.13066.
- [104] F. R. Bruniera *et al.*, « The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: a review ».
- [105] K. A. Mergenhagen et A. R. Borton, « Vancomycin Nephrotoxicity: A Review », *J. Pharm. Pract.*, vol. 27, n° 6, p. 545-553, déc. 2014, doi: 10.1177/0897190014546114.

- [106] « Vancomycine : substance active à effet thérapeutique », VIDAL. Consulté le: 6 mars 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/vancomycine-6898.html>
- [107] « Haute Autorité de santé », 2014.
- [108] J.-P. Stahl, « SOCIÉTÉ DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE DE LANGUE FRANÇAISE », 2009.
- [109] J. Vaida, A. D. Conti, J. J. Ray, D. A. Bravin, et M. A. Bramer, « Evaluating the efficacy of topical vancomycin powder in the treatment of open lower extremity fractures », *Trauma*, vol. 24, n° 2, p. 147-153, avr. 2022, doi: 10.1177/1460408620978142.
- [110] E. P. Murphy, M. Curtin, A. Shafqat, F. Byrne, M. Jadaan, et E. Rahall, « A review of the application of vancomycin powder to posterior spinal fusion wounds with a focus on side effects and infection. A prospective study », *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.*, vol. 27, n° 2, p. 187-191, févr. 2017, doi: 10.1007/s00590-016-1878-4.
- [111] W. Steadman, P. R. Chapman, M. Schuetz, B. Schmutz, A. Trampuz, et K. Tetsworth, « Local Antibiotic Delivery Options in Prosthetic Joint Infection », *Antibiotics*, vol. 12, n° 4, Art. n° 4, avr. 2023, doi: 10.3390/antibiotics12040752.
- [112] J. D. Caplin et A. J. García, « Implantable antimicrobial biomaterials for local drug delivery in bone infection models », *Acta Biomater.*, vol. 93, p. 2-11, juill. 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2019.01.015.
- [113] V. Badha, R. Moore, J. Heffernan, P. Castaneda, A. McLaren, et D. Overstreet, « Determination of Tobramycin and Vancomycin Exposure Required to Eradicate Biofilms on Muscle and Bone Tissue In Vitro », *J. Bone Jt. Infect.*, vol. 4, n° 1, p. 1-9, janv. 2019, doi: 10.7150/jbji.29711.
- [114] D. Campoccia, L. Montanaro, P. Speziale, et C. R. Arciola, « Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use », *Biomaterials*, vol. 31, n° 25, p. 6363-6377, sept. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.005.
- [115] C. A. Dreiss, « Hydrogel design strategies for drug delivery », *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 48, p. 1-17, août 2020, doi: 10.1016/j.cocis.2020.02.001.
- [116] Z. Li et J. Guan, « Thermosensitive hydrogels for drug delivery », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 8, n° 8, p. 991-1007, août 2011, doi: 10.1517/17425247.2011.581656.
- [117] L. P. Nicod, « Cytokines. 1. Overview. », *Thorax*, vol. 48, n° 6, p. 660-667, juin 1993.
- [118] J. J. O'Shea, M. Gadina, et R. M. Siegel, « Cytokines and Cytokine Receptors », in *Clinical Immunology*, Elsevier, 2019, p. 127-155.e1. doi: 10.1016/B978-0-7020-6896-6.00009-0.
- [119] « Cytokines in context », *J. Cell Biol.*, vol. 113, n° 5, p. 981-986, juin 1991.
- [120] Y. Xiao, Y. Ding, J. Zhuang, R. Sun, H. Sun, et L. Bai, « Osteoimmunomodulation role of exosomes derived from immune cells on osseointegration », *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, p. 989537, août 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.989537.

- [121] J. T. Rosenbaum, B. Brito, Y. B. Han, J. Park, et S. R. Planck, « Cytokines », in *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 2: Basic Science and Clinical Relevance*, D. A. Sullivan, D. A. Dartt, et M. A. Meneray, Éd., in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Boston, MA: Springer US, 1998, p. 441-446. doi: 10.1007/978-1-4615-5359-5_61.
- [122] D. Jarczak et A. Nierhaus, « Cytokine Storm—Definition, Causes, and Implications », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n° 19, Art. n° 19, janv. 2022, doi: 10.3390/ijms231911740.
- [123] T. L. Whiteside, « Cytokines and cytokine measurements in a clinical laboratory. », *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 1, n° 3, p. 257-260, mai 1994.
- [124] F. E. Dewhirst, P. P. Stashenko, J. E. Mole, et T. Tsurumachi, « Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 135, n° 4, p. 2562-2568, oct. 1985.
- [125] A. Gallois, M. Mazzorana, J. Vacher, et P. Jurdic, « Ostéoimmunologie : une vision globale et intégrée du tissu squelettique et du système immunitaire - Implication pour la recherche en rhumatologie », *médecine/sciences*, vol. 25, n° 3, Art. n° 3, mars 2009, doi: 10.1051/medsci/2009253259.
- [126] G. Schett, « Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone », *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 41, n° 12, p. 1361-1366, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02545.x.
- [127] M. B. Guglielmotti, D. G. Olmedo, et R. L. Cabrini, « Research on implants and osseointegration », *Periodontol. 2000*, vol. 79, n° 1, p. 178-189, févr. 2019, doi: 10.1111/prd.12254.
- [128] H. Wajant, K. Pfizenmaier, et P. Scheurich, « Tumor necrosis factor signaling », *Cell Death Differ.*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, janv. 2003, doi: 10.1038/sj.cdd.4401189.
- [129] S. P. Commins, L. Borish, et J. W. Steinke, « Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, n° 2, Supplement 2, p. S53-S72, févr. 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.008.
- [130] K. Kobayashi *et al.*, « Tumor Necrosis Factor α Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the Odf/Rankl–Rank Interaction », *J. Exp. Med.*, vol. 191, n° 2, p. 275-286, janv. 2000.
- [131] Z. Yao, L. Xing, C. Qin, E. M. Schwarz, et B. F. Boyce, « Osteoclast Precursor Interaction with Bone Matrix Induces Osteoclast Formation Directly by an Interleukin-1-mediated Autocrine Mechanism », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 15, p. 9917-9924, avr. 2008, doi: 10.1074/jbc.M706415200.
- [132] B. Osta, G. Benedetti, et P. Miossec, « Classical and Paradoxical Effects of TNF- α on Bone Homeostasis », *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 48, févr. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00048.
- [133] L. Gilbert *et al.*, « Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pepp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 4, p. 2695-2701, janv. 2002, doi: 10.1074/jbc.M106339200.
- [134] W. C. Liles et W. C. Van Voorhis, « Review: Nomenclature and Biologic Significance of Cytokines Involved in Inflammation and the Host Immune Response », *J. Infect. Dis.*, vol. 172, n° 6, p. 1573-1580, déc. 1995, doi: 10.1093/infdis/172.6.1573.

- [135] K. Polzer *et al.*, « Interleukin-1 is essential for systemic inflammatory bone loss », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 69, n° 01, p. 284-290, janv. 2010, doi: 10.1136/ard.2008.104786.
- [136] N. Tanabe *et al.*, « IL-1 α stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts », *Life Sci.*, vol. 77, n° 6, p. 615-626, juin 2005, doi: 10.1016/j.lfs.2004.10.079.
- [137] T. Yokota, N. Arai, F. Lee, D. Rennick, T. Mosmann, et K. Arai, « Use of a cDNA expression vector for isolation of mouse interleukin 2 cDNA clones: expression of T-cell growth-factor activity after transfection of monkey cells. », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, n° 1, p. 68-72, janv. 1985.
- [138] G. Toraldo, C. Roggia, W.-P. Qian, R. Pacifici, et M. N. Weitzmann, « IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor κ B ligand and tumor necrosis factor α from T cells », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 1, p. 125-130, janv. 2003, doi: 10.1073/pnas.0136772100.
- [139] A. P. Barhanpurkar *et al.*, « IL-3 promotes osteoblast differentiation and bone formation in human mesenchymal stem cells », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 418, n° 4, p. 669-675, févr. 2012, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.074.
- [140] Y. Abu-Amer, « IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF- κ B », *J. Clin. Invest.*, vol. 107, n° 11, p. 1375-1385, juin 2001.
- [141] A. A. te Velde, R. J. F. Huijbens, K. Heije, J. E. de Vries, et C. G. Figdor, « Interleukin-4 (IL-4) Inhibits Secretion of IL-1 β , Tumor Necrosis Factor α , and IL-6 by Human Monocytes », *Blood*, vol. 76, n° 7, p. 1392-1397, oct. 1990, doi: 10.1182/blood.V76.7.1392.1392.
- [142] S. Rose-John, « Interleukin-6 Family Cytokines », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 10, n° 2, p. a028415, févr. 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a028415.
- [143] P. Kopesky *et al.*, « Autocrine signaling is a key regulatory element during osteoclastogenesis », *Biol. Open*, vol. 3, n° 8, p. 767-776, juill. 2014, doi: 10.1242/bio.20148128.
- [144] K. W. Moore, R. De Waal Malefyt, R. L. Coffman, et A. O'Garra, « Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 19, n° 1, p. 683-765, avr. 2001, doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
- [145] P. V. Vlasselaer, B. Borremans, R. V. D. Heuvel, U. V. Gorp, et R. de W. Malefyt, « Interleukin-10 Inhibits the Osteogenic Activity of Mouse Bone Marrow », *Blood*, vol. 82, n° 8, p. 2361-2370, oct. 1993, doi: 10.1182/blood.V82.8.2361.2361.
- [146] M. Kawaguchi, M. Adachi, N. Oda, F. Kokubu, et S.-K. Huang, « IL-17 cytokine family », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 114, n° 6, p. 1265-1273, déc. 2004, doi: 10.1016/j.jaci.2004.10.019.
- [147] H. Huang *et al.*, « IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling », *Cell Death Differ.*, vol. 16, n° 10, Art. n° 10, oct. 2009, doi: 10.1038/cdd.2009.74.
- [148] Z. Wang *et al.*, « The positive effects of secreting cytokines IL-17 and IFN- γ on the early-stage differentiation and negative effects on the calcification of primary osteoblasts in vitro », *Int. Immunopharmacol.*, vol. 57, p. 1-10, avr. 2018, doi: 10.1016/j.intimp.2018.02.002.

- [149] N. J. Horwood *et al.*, « Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. », *J. Clin. Invest.*, vol. 101, n° 3, p. 595-603, févr. 1998.
- [150] M. Gowen, B. R. Macdonald, R. Graham, et G. Russell, « Actions of recombinant human γ -interferon and tumor necrosis factor α on the proliferation and osteoblastic characteristics of human trabecular bone cells in vitro », *Arthritis Rheum.*, vol. 31, n° 12, p. 1500-1507, 1988, doi: 10.1002/art.1780311206.
- [151] T. Maruhashi *et al.*, « DCIR Maintains Bone Homeostasis by Regulating IFN- γ Production in T Cells », *J. Immunol.*, vol. 194, n° 12, p. 5681-5691, juin 2015, doi: 10.4049/jimmunol.1500273.
- [152] H. B. Kwak *et al.*, « Reciprocal cross-talk between RANKL and interferon- γ -inducible protein 10 is responsible for bone-erosive experimental arthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 58, n° 5, p. 1332-1342, 2008, doi: 10.1002/art.23372.
- [153] B. Moser et P. Loetscher, « Lymphocyte traffic control by chemokines », *Nat. Immunol.*, vol. 2, n° 2, Art. n° 2, févr. 2001, doi: 10.1038/84219.
- [154] L. J. Brylka et T. Schinke, « Chemokines in Physiological and Pathological Bone Remodeling », *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 2182, sept. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02182.
- [155] M. GEINDREAU, M. BRUCHARD, et F. VEGRAN, « Role of Cytokines and Chemokines in Angiogenesis in a Tumor Context », *Cancers*, vol. 14, n° 10, p. 2446, mai 2022, doi: 10.3390/cancers14102446.
- [156] W. F. Oliveira, I. R. S. Arruda, G. M. M. Silva, G. Machado, L. C. B. B. Coelho, et M. T. S. Correia, « Functionalization of titanium dioxide nanotubes with biomolecules for biomedical applications », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 81, p. 597-606, déc. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.08.017.
- [157] Z. Tu *et al.*, « Design of therapeutic biomaterials to control inflammation », *Nat. Rev. Mater.*, vol. 7, n° 7, p. 557-574, févr. 2022, doi: 10.1038/s41578-022-00426-z.
- [158] D. Hachim, T. E. Whittaker, H. Kim, et M. M. Stevens, « Glycosaminoglycan-based biomaterials for growth factor and cytokine delivery: Making the right choices », *J. Controlled Release*, vol. 313, p. 131-147, nov. 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2019.10.018.
- [159] C. Pinholt, R. A. Hartvig, N. J. Medlicott, et L. Jorgensen, « The importance of interfaces in protein drug delivery – why is protein adsorption of interest in pharmaceutical formulations? », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 8, n° 7, p. 949-964, juill. 2011, doi: 10.1517/17425247.2011.577062.
- [160] H. Greim, U. Andrae, U. Forster, et L. Schwarz, « Application, Limitations and Research Requirements of in Vitro Test Systems in Toxicology », in *Toxic Interfaces of Neurones, Smoke and Genes*, C. M. Chambers, P. L. Chambers, et J. Tuomisto, Éd., Berlin, Heidelberg: Springer, 1986, p. 225-236. doi: 10.1007/978-3-642-71248-7_32.
- [161] H. C. Lehmann, N. P. Staff, et A. Hoke, « Modeling chemotherapy induced peripheral neuropathy (CIPN) in vitro: Prospects and limitations », *Exp. Neurol.*, vol. 326, p. 113140, avr. 2020, doi: 10.1016/j.expneurol.2019.113140.
- [162] P. Flecknell, « Replacement, Reduction, Refinement », *ALTEX - Altern. Anim. Exp.*, vol. 19, n° 2, Art. n° 2, mai 2002.

- [163] E. Maestri, « The 3Rs Principle in Animal Experimentation: A Legal Review of the State of the Art in Europe and the Case in Italy », *BioTech*, vol. 10, n° 2, Art. n° 2, juin 2021, doi: 10.3390/biotech10020009.
- [164] « Évolution vers différents types de modèles 3D », Techniques de l'Ingénieur. Consulté le: 17 mars 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www-techniques-ingenieur-fr.ezproxy.unilim.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/nanotechnologies-et-biotechnologies-pour-la-sante-42608210/alternatives-in-vitro-et-in-silico-aux-modeles-animaux-en-toxicologie-re295/evolution-vers-differents-types-de-modeles-3d-re295niv10004.html>
- [165] M. Ravi, A. Ramesh, et A. Pattabhi, « Contributions of 3D Cell Cultures for Cancer Research », *J. Cell. Physiol.*, vol. 232, n° 10, p. 2679-2697, 2017, doi: 10.1002/jcp.25664.
- [166] M. Kapalczyńska *et al.*, « 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures », *Arch. Med. Sci.*, 2016, doi: 10.5114/aoms.2016.63743.
- [167] J. W. Haycock, « 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques », in *3D Cell Culture: Methods and Protocols*, J. W. Haycock, Éd., Totowa, NJ: Humana Press, 2011, p. 1-15. doi: 10.1007/978-1-60761-984-0_1.
- [168] A. S. Serras, J. S. Rodrigues, M. Cipriano, A. V. Rodrigues, N. G. Oliveira, et J. P. Miranda, « A Critical Perspective on 3D Liver Models for Drug Metabolism and Toxicology Studies », *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, p. 626805, févr. 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.626805.
- [169] H. W. Hoyle, C. M. L. Stenger, et S. A. Przyborski, « Design considerations of benchtop fluid flow bioreactors for bio-engineered tissue equivalents in vitro », *Biomater. Biosyst.*, vol. 8, p. 100063, déc. 2022, doi: 10.1016/j.bbiosy.2022.100063.
- [170] J. Hua, L. E. Erickson, T.-Y. Yiin, et L. A. Glasgow, « A Review of the Effects of Shear and Interfacial Phenomena on Cell Viability », *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 13, n° 4, p. 305-328, janv. 1993, doi: 10.3109/07388559309075700.
- [171] E. Champion, A. Magnaudeix, P. Pascaud-Mathieu, et T. Chartier, « Advanced processing techniques for customized ceramic medical devices », in *Advances in Ceramic Biomaterials*, Elsevier, 2017, p. 433-468. doi: 10.1016/B978-0-08-100881-2.00015-4.
- [172] G. N. Bancroft, V. I. Sikavitsas, et A. G. Mikos, « Technical Note: Design of a Flow Perfusion Bioreactor System for Bone Tissue-Engineering Applications », *Tissue Eng.*, vol. 9, n° 3, p. 549-554, juin 2003, doi: 10.1089/107632703322066723.
- [173] D. A. Gaspar, V. Gomide, et F. J. Monteiro, « The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering », *Biomatter*, vol. 2, n° 4, p. 167-175, oct. 2012, doi: 10.4161/biom.22170.
- [174] V. Campana *et al.*, « Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice », *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, n° 10, p. 2445-2461, oct. 2014, doi: 10.1007/s10856-014-5240-2.
- [175] J. R. Porter, T. T. Ruckh, et K. C. Popat, « Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies », *Biotechnol. Prog.*, vol. 25, n° 6, p. 1539-1560, 2009, doi: 10.1002/btpr.246.
- [176] S. T. Kao et D. D. Scott, « A Review of Bone Substitutes », *Oral Maxillofac. Surg. Clin. N. Am.*, vol. 19, n° 4, p. 513-521, nov. 2007, doi: 10.1016/j.coms.2007.06.002.

- [177] J. M. Bouler, P. Pilet, O. Gauthier, et E. Verron, « Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response », *Acta Biomater.*, vol. 53, p. 1-12, avr. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.076.
- [178] H.-S. Sohn et J.-K. Oh, « Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries », *Biomater. Res.*, vol. 23, n° 1, p. 9, mars 2019, doi: 10.1186/s40824-019-0157-y.
- [179] A. Bignon *et al.*, « Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response », *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 14, n° 12, p. 1089-1097, déc. 2003, doi: 10.1023/B:JMSM.0000004006.90399.b4.
- [180] K. A. Hing, « Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry », *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, vol. 2, n° 3, p. 184-199, 2005, doi: 10.1111/j.1744-7402.2005.02020.x.
- [181] G. Hannink et J. J. C. Arts, « Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? », *Injury*, vol. 42, p. S22-S25, sept. 2011, doi: 10.1016/j.injury.2011.06.008.
- [182] T. J. Blokhuis, M. F. Termaat, F. C. den Boer, P. Patka, F. C. Bakker, et H. J. T. M. Haarman, « Properties of Calcium Phosphate Ceramics in Relation to Their In Vivo Behavior », *J. Trauma Acute Care Surg.*, vol. 48, n° 1, p. 179, janv. 2000.
- [183] M. Montazerian, « Clinical Applications of Biomaterials State-of-the-Art Progress, Trends, and Novel Approaches », Consulté le: 12 mars 2024. [En ligne]. Disponible sur: https://www.academia.edu/35272045/Clinical_Applications_of_Biomaterials_State_of_the_Art_Progress_Trends_and_Novel_Approaches
- [184] M. Lasgorceix, « Mise en forme par microstéréolithographie et frittage de céramiques macro-micro-poreuses en hydroxyapatite silicatée et évaluation biologique », 2014. doi: 10.13140/RG.2.1.1895.8484.
- [185] 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, p. 510-528, avr. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.12.046.
- [186] V. Karageorgiou et D. Kaplan, « Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis », *Biomaterials*, vol. 26, n° 27, p. 5474-5491, sept. 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
- [187] H. Yuan, K. Kurashina, J. D. de Bruijn, Y. Li, K. de Groot, et X. Zhang, « A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics », *Biomaterials*, vol. 20, n° 19, p. 1799-1806, oct. 1999, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00075-7.
- [188] A. L. Rosa, M. M. Beloti, et R. van Noort, « Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography », *Dent. Mater.*, vol. 19, n° 8, p. 768-772, déc. 2003, doi: 10.1016/S0109-5641(03)00024-1.
- [189] D. M. L. Cooper, J. R. Matyas, M. A. Katzenberg, et B. Hallgrímsson, « Comparison of Microcomputed Tomographic and Microradiographic Measurements of Cortical Bone Porosity », *Calcif. Tissue Int.*, vol. 74, n° 5, p. 437-447, mai 2004, doi: 10.1007/s00223-003-0071-z.

- [190] K. Gupta et K. Meena, « Artificial bone scaffolds and bone joints by additive manufacturing: A review », *Bioprinting*, vol. 31, p. e00268, juin 2023, doi: 10.1016/j.bprint.2023.e00268.
- [191] O. Gauthier, J.-M. Bouler, E. Aguado, P. Pilet, et G. Daculsi, « Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth », *Biomaterials*, vol. 19, n° 1, p. 133-139, janv. 1998, doi: 10.1016/S0142-9612(97)00180-4.
- [192] K. J. L. Burg, S. Porter, et J. F. Kellam, « Biomaterial developments for bone tissue engineering », *Biomaterials*, vol. 21, n° 23, p. 2347-2359, déc. 2000, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00102-2.
- [193] 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, p. 179-189, juill. 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2016.04.039.
- [194] J. Knychala, N. Bouropoulos, C. J. Catt, O. L. Katsamenis, C. P. Please, et B. G. Sengers, « Pore Geometry Regulates Early Stage Human Bone Marrow Cell Tissue Formation and Organisation », *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 41, n° 5, p. 917-930, mai 2013, doi: 10.1007/s10439-013-0748-z.
- [195] M. L. Wickramasinghe, G. J. Dias, et K. M. G. P. Premadasa, « A novel classification of bone graft materials », *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 110, n° 7, p. 1724-1749, 2022, doi: 10.1002/jbm.b.35029.
- [196] N. Abbasi, S. Hamlet, R. M. Love, et N.-T. Nguyen, « Porous scaffolds for bone regeneration », *J. Sci. Adv. Mater. Devices*, vol. 5, n° 1, p. 1-9, mars 2020, doi: 10.1016/j.jsamd.2020.01.007.
- [197] A. Al Rashid, S. A. Khan, S. G. Al-Ghamdi, et 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.
- [198] T. Chartier, V. Pateloup, et C. Chaput, « Élaboration de pièces céramiques par fabrication additive », *Verres Céramiques*, févr. 2018, doi: 10.51257/a-v1-n4807.
- [199] T. Chartier, « Additive Manufacturing to Produce Complex 3D Ceramic Parts », *J. Ceram. Sci. Tech.*, n° 02, 2014, doi: 10.4416/JCST2014-00040.
- [200] Y. Yang *et al.*, « Additive manufacturing of bone scaffolds », *Int. J. Bioprinting*, vol. 5, n° 1, p. 148, déc. 2018, doi: 10.18063/IJB.v5i1.148.
- [201] M. Kotlarz, P. Melo, A. M. Ferreira, P. Gentile, et K. Dalgarno, « Cell seeding via bioprinted hydrogels supports cell migration into porous apatite-wollastonite bioceramic scaffolds for bone tissue engineering », *Biomater. Adv.*, vol. 153, p. 213532, oct. 2023, doi: 10.1016/j.bioadv.2023.213532.
- [202] S. Legutko, « Additive techniques of manufacturing functional products from metal materials », *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 393, p. 012003, août 2018, doi: 10.1088/1757-899X/393/1/012003.
- [203] B. Duan et M. Wang, « Customized Ca–P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth

factor », *J. R. Soc. Interface*, vol. 7, n° Suppl 5, p. S615-S629, oct. 2010, doi: 10.1098/rsif.2010.0127.focus.

[204] S. Mondal, S. V. Dorozhkin, et U. Pal, « Recent progress on fabrication and drug delivery applications of nanostructured hydroxyapatite », *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 10, n° 4, p. e1504, 2018, doi: 10.1002/wnan.1504.

[205] D. L. Vaux, « Basic Statistics in Cell Biology », *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 30, n° 1, p. 23-37, oct. 2014, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013303.

[206] D. Arcos et M. Vallet-Regí, « Bioceramics for drug delivery », *Acta Mater.*, vol. 61, n° 3, p. 890-911, févr. 2013, doi: 10.1016/j.actamat.2012.10.039.

[207] K. Zhang, Y. Fan, N. Dunne, et X. Li, « Effect of microporosity on scaffolds for bone tissue engineering », *Regen. Biomater.*, vol. 5, n° 2, p. 115-124, mars 2018, doi: 10.1093/rb/rby001.

[208] S. Shukla et A. Shukla, « Tunable antibiotic delivery from gellan hydrogels », *J. Mater. Chem. B*, vol. 6, n° 40, p. 6444-6458, oct. 2018, doi: 10.1039/C8TB00980E.

[209] Q. Wang et W.-M. Zhao, « Optical methods of antibiotic residues detections: A comprehensive review », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 269, p. 238-256, sept. 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.04.097.

[210] C. Liu, D. Chu, K. Kalantar-Zadeh, J. George, H. A. Young, et G. Liu, « Cytokines: From Clinical Significance to Quantification », *Adv. Sci.*, vol. 8, n° 15, p. 2004433, 2021, doi: 10.1002/advs.202004433.

[211] G. Shankar et D. A. Cohen, « Enhanced Cytokine Detection by a Novel Cell Culture-Based Elisa », *J. Immunoassay*, vol. 18, n° 4, p. 371-388, nov. 1997, doi: 10.1080/01971529708005828.

[212] J. A. Stenzen et A. J. Poschenrieder, « Bioanalytical chemistry of cytokines – A review », *Anal. Chim. Acta*, vol. 853, p. 95-115, janv. 2015, doi: 10.1016/j.aca.2014.10.009.

[213] M. W. Dong, *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley & Sons, 2006.

[214] Y. V. Kazakevich et R. LoBrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, 2007.

[215] S. D. Gan et K. R. Patel, « Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, n° 9, p. 1-3, sept. 2013, doi: 10.1038/jid.2013.287.

[216] L. Ward, *Sex differences in atherosclerosis and exercise effects*, vol. 1676. in Linköping University Medical Dissertations, vol. 1676. Linköping: Linköping University Electronic Press, 2019. doi: 10.3384/diss.diva-156366.

[217] Bio-Rad, « Types of ELISA », Bio-Rad. Consulté le: 12 avril 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>

[218] S. Raynaud, E. Champion, J. P. Lafon, et D. Bernache-Assollant, « Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio III. Mechanical properties and degradation in solution of hot pressed ceramics », *Biomaterials*, vol. 23, n° 4, p. 1081-1089, févr. 2002, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00220-4.

- [219] L. Marie, « Mise en forme par microstéréolithographie et frittage de céramiques macro-micro-poreuses en hydroxyapatite silicatée et évaluation biologique ».
- [220] « ISO 13779-2:2008(en), Implants for surgery — Hydroxyapatite — Part 2: Coatings of hydroxyapatite ». Consulté le: 28 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:13779:-2:ed-2:v1:en>
- [221] J. C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. Elsevier, 2013.
- [222] J. Schindelin *et al.*, « Fiji: an open-source platform for biological-image analysis », *Nat. Methods*, vol. 9, n° 7, p. 676-682, juill. 2012, doi: 10.1038/nmeth.2019.
- [223] D. Gourdonnaud, « Micro-extrusion de pâtes céramiques respectueuses de l'environnement : relation entre formulation, imprimabilité, stratégie de dépôt et propriétés mécaniques des pièces frittées », These de doctorat, Limoges, 2022. Consulté le: 9 février 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2022LIMO0135>
- [224] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, et F. Pognan, « Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity », *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, n° 17, p. 5421-5426, 2000, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.
- [225] C. A. Gregory, W. Grady Gunn, A. Peister, et D. J. Prockop, « An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction », *Anal. Biochem.*, vol. 329, n° 1, p. 77-84, juin 2004, doi: 10.1016/j.ab.2004.02.002.
- [226] H. Yang, S. Yang, X. Chi, et J. R. G. Evans, « Fine ceramic lattices prepared by extrusion freeforming », *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 79B, n° 1, p. 116-121, 2006, doi: 10.1002/jbm.b.30520.
- [227] A. F. Lemos, J. D. Santos, et J. M. F. Ferreira, « Influence of characteristics of the starting hydroxyapatite powders and of deagglomeration procedure, on rheological behaviour of HA suspensions », *Materials Science Forum*, 2004.
- [228] J. N. Stuecker, J. Cesarano, et D. A. Hirschfeld, « Control of the viscous behavior of highly concentrated mullite suspensions for robocasting », *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 142, n° 2, p. 318-325, nov. 2003, doi: 10.1016/S0924-0136(03)00586-7.
- [229] E. Saiz, L. Gremillard, G. Menendez, P. Miranda, K. Gryn, et A. P. Tomsia, « Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, n° 3, p. 546-550, avr. 2007, doi: 10.1016/j.msec.2006.05.038.
- [230] N. Vitorino, C. Freitas, M. J. Ribeiro, J. C. C. Abrantes, et J. R. Frade, « Extrusion of ceramic emulsions: Plastic behavior », *Appl. Clay Sci.*, vol. 101, p. 315-319, nov. 2014, doi: 10.1016/j.clay.2014.08.021.
- [231] B. C. O'Kelly, « Review of Recent Developments and Understanding of Atterberg Limits Determinations », *Geotechnics*, vol. 1, n° 1, Art. n° 1, sept. 2021, doi: 10.3390/geotechnics1010004.
- [232] J. Franco, P. Hunger, M. E. Launey, A. P. Tomsia, et E. Saiz, « Direct write assembly of calcium phosphate scaffolds using a water-based hydrogel », *Acta Biomater.*, vol. 6, n° 1, p. 218-228, janv. 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2009.06.031.

- [233] F. Baino, J. Barberi, E. Fiume, G. Orlygsson, J. Massera, et E. Verné, « Robocasting of Bioactive SiO_2 - P_2O_5 - CaO - MgO - Na_2O - K_2O Glass Scaffolds », *J. Healthc. Eng.*, vol. 2019, p. 1-12, avr. 2019, doi: 10.1155/2019/5153136.
- [234] E. Feilden, E. G.-T. Blanca, F. Giuliani, E. Saiz, et L. Vandeperre, « Robocasting of structural ceramic parts with hydrogel inks », *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 36, n° 10, p. 2525-2533, août 2016, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2016.03.001.
- [235] Y. Ko, C. Lee, Y. Kim, Y. Kim, Y. J. Yun, et Y. Jun, « Dew point temperature as an invariant replacement for relative humidity for advanced perovskite solar cell fabrication systems », *J. Mater. Chem. A*, vol. 6, n° 42, p. 20695-20701, 2018, doi: 10.1039/C8TA06689B.
- [236] N. Lauro, « Caractérisation et modélisation des retraits de séchage dans le procédé de microextrusion d'une pâte céramique ».
- [237] G. W. Scherer, « Theory of Drying », *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 73, n° 1, p. 3-14, 1990, doi: 10.1111/j.1151-2916.1990.tb05082.x.
- [238] D. Glymond et L. J. Vandeperre, « Robocasting of MgO-doped alumina using alginic acid slurries », *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 101, n° 8, p. 3309-3316, 2018, doi: 10.1111/jace.15509.
- [239] M. N. Rahaman, *Ceramic processing and sintering*, 2nd ed. in Materials engineering, no. 23. New York: M. Dekker, 2003.
- [240] J.-P. Lafon, « Synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées ».
- [241] « Procédés de frittage PIM », Techniques de l'Ingénieur. Consulté le: 10 février 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www-techniques-ingenieur-fr.ezproxy.unilim.fr/base-documentaire/materiaux-th11/ceramiques-proprietes-et-elaboration-42578210/procedes-de-frittage-pim-m3320/>
- [242] A. M'Barki, L. Bocquet, et A. Stevenson, « Linking Rheology and Printability for Dense and Strong Ceramics by Direct Ink Writing », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, juill. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06115-0.
- [243] J. Zhang *et al.*, « Robocasting of dense 8Y zirconia parts: Rheology, printing, and mechanical properties », *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 43, n° 7, p. 2794-2804, juill. 2023, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2022.11.042.
- [244] « Phénomène de défauts d'extrusion », Techniques de l'Ingénieur. Consulté le: 19 avril 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www-techniques-ingenieur-fr.ezproxy.unilim.fr/base-documentaire/materiaux-th11/plasturgie-procedes-d-extrusion-42150210/defauts-d-extrusion-am3657/phenomene-de-defauts-d-extrusion-am3657niv10001.html>
- [245] H. Ismail, M. N. Z. Zakri, A. Ahmad, et H. Mohamad, « Effect of sintering temperature on the phase, microstructural, physical, mechanical, and in vitro biomineralisation properties of porous wollastonite ceramics fabricated using the gel casting method », *Ceram. Int.*, vol. 49, n° 9, p. 14166-14176, mai 2023, doi: 10.1016/j.ceramint.2023.01.003.
- [246] M. S. Klee et L. M. Blumberg, « Theoretical and Practical Aspects of Fast Gas Chromatography and Method Translation », *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 40, n° 5, p. 234-247, mai 2002, doi: 10.1093/chromsci/40.5.234.

- [247] M. Caude et A. Jardy, « Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation », *Tech. Anal.*, oct. 1994, doi: 10.51257/a-v2-p1455.
- [248] M. Cao, Y. Feng, Y. Zhang, W. Kang, K. Lian, et L. Ai, « Studies on the metabolism and degradation of vancomycin in simulated in vitro and aquatic environment by UHPLC-Triple-TOF-MS/MS », *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, p. 15471, oct. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-33826-9.
- [249] K. Kuo, R. Still, S. Cale, et I. McDowell, « Standardization (External and Internal) of HPLC Assay for Plasma Homocysteine », *Clin. Chem.*, vol. 43, n° 9, p. 1653-1669, sept. 1997, doi: 10.1093/clinchem/43.9.1653.
- [250] K. J. Bronsema, R. Bischoff, et N. C. van de Merbel, « Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry », *J. Chromatogr. B*, vol. 893-894, p. 1-14, avr. 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.02.021.
- [251] G. Marrubini *et al.*, « A new MS compatible HPLC-UV method for Teicoplanin drug substance and related impurities, part 1: Development and validation studies », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 162, p. 185-191, janv. 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2018.09.040.
- [252] P. Patil, « Caffeine in various samples and their analysis with HPLC - A review », *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 16, p. 76-83, sept. 2012.
- [253] M. J. Wood, « The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin ».
- [254] R. A. A. Muzzarelli et C. Muzzarelli, « Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences », in *Polysaccharides I*, vol. 186, T. Heinze, Éd., in *Advances in Polymer Science*, vol. 186., Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, p. 151-209. doi: 10.1007/b136820.
- [255] F. Ahmadi, Z. Oveisi, S. M. Samani, et Z. Amoozgar, « Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications », *Chitosan Based Hydrogels*.
- [256] N. Prasanthi, H. Roy, N. Jyothi, et V. Vajrapriya, « A Brief Review on Chitosan and Application in Biomedical Field », *Am. J. PharmaTech Res.*, janv. 2016.
- [257] I. Younes et M. Rinaudo, « Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications », *Mar. Drugs*, vol. 13, n° 3, p. 1133-1174, mars 2015, doi: 10.3390/md13031133.
- [258] A. Singh, S. S. Narvi, P. K. Dutta, et N. D. Pandey, « External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde », *Bull. Mater. Sci.*, vol. 29, n° 3, p. 233-238, juin 2006, doi: 10.1007/BF02706490.
- [259] Z. Zhou, S. Lin, T. Yue, et T.-C. Lee, « Adsorption of food dyes from aqueous solution by glutaraldehyde cross-linked magnetic chitosan nanoparticles », *J. Food Eng.*, vol. 126, p. 133-141, avr. 2014, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.11.014.
- [260] M. Rinaudo, G. Pavlov, et J. Desbrières, « Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan », *Polymer*, vol. 40, n° 25, p. 7029-7032, déc. 1999, doi: 10.1016/S0032-3861(99)00056-7.
- [261] S. Honary, B. Hoseinzadeh, et P. Shalchian, « The Effect of Polymer Molecular Weight on Citrate Crosslinked Chitosan Films for Site-Specific Delivery of a Non-Polar Drug », *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 9, n° 6, Art. n° 6, 2010, doi: 10.4314/tjpr.v9i6.63550.

- [262] S. A. Papadimitriou, D. S. Achilias, et D. N. Bikiaris, « Chitosan-g-PEG nanoparticles ionically crosslinked with poly(glutamic acid) and tripolyphosphate as protein delivery systems », *Int. J. Pharm.*, vol. 430, n° 1, p. 318-327, juill. 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.004.
- [263] J. Pérez-Calderón, M. V. Santos, et N. Zaritzky, « Synthesis, characterization and application of cross-linked chitosan/oxalic acid hydrogels to improve azo dye (Reactive Red 195) adsorption », *React. Funct. Polym.*, vol. 155, p. 104699, oct. 2020, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104699.
- [264] A. K. Anal, W. F. Stevens, et C. Remuñán-López, « Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin », *Int. J. Pharm.*, vol. 312, n° 1, p. 166-173, avr. 2006, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.01.043.
- [265] I. Dmour et M. O. Taha, « Natural and semisynthetic polymers in pharmaceutical nanotechnology », in *Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery*, Elsevier, 2018, p. 35-100. doi: 10.1016/B978-0-12-813663-8.00002-6.
- [266] M. A. Mograne, « Viscosimétrie ultrasonore ultra large bande ».
- [267] M. K. Krokida, Z. B. Maroulis, et G. D. Saravacos, « RHEOLOGICAL PROPERTIES OF FLUID FRUIT AND VEGETABLE PUREE PRODUCTS: COMPILATION OF LITERATURE DATA », *Int. J. Food Prop.*, vol. 4, n° 2, p. 179-200, juill. 2001, doi: 10.1081/JFP-100105186.
- [268] K. H. Bodek, « Study on the rheological properties of microcrystalline chitosan hydrogels used as drug carriers », *Polimery*, vol. 45, n° 11-12, Art. n° 11-12, 2000, doi: 10.14314/polimery.2000.818.
- [269] « 1X Phosphate-Buffered Saline (PBS) Recipe Calculator ». Consulté le: 20 avril 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/support/calculators-and-apps/1x-phosphate-buffered-saline>
- [270] C. Ji, A. Khademhosseini, et F. Dehghani, « Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications », *Biomaterials*, vol. 32, n° 36, p. 9719-9729, déc. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.003.
- [271] M. Drouet *et al.*, « Influence of Vancomycin Infusion Methods on Endothelial Cell Toxicity », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, n° 2, p. 930-934, févr. 2015, doi: 10.1128/AAC.03694-14.
- [272] J. T. Bariteau, R. J. Kadakia, B. C. Traub, M. Viggesswarapu, et N. J. Willett, « Impact of Vancomycin Treatment on Human Mesenchymal Stromal Cells During Osteogenic Differentiation », 2018, doi: <https://doi.org/10.1177/1071100718766655>.
- [273] J. D. Burke et H. A. Young, « IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place », *Semin. Immunol.*, vol. 43, p. 101280, juin 2019, doi: 10.1016/j.smim.2019.05.002.
- [274] G. Kleiner, A. Marcuzzi, V. Zanin, L. Monasta, et G. Zauli, « Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects », *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, p. e434010, mars 2013, doi: 10.1155/2013/434010.
- [275] G. Duque *et al.*, « Autocrine Regulation of Interferon γ in Mesenchymal Stem Cells Plays a Role in Early Osteoblastogenesis », *Stem Cells*, vol. 27, n° 3, p. 550-558, mars 2009, doi: 10.1634/stemcells.2008-0886.

- [276] Y. Liu *et al.*, « Physiological roles of human interleukin-17 family », *Exp. Dermatol.*, vol. 33, n° 1, p. e14964, 2024, doi: 10.1111/exd.14964.
- [277] Y. Ge, M. Huang, et Y. Yao, « Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis », *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 1558, juill. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01558.
- [278] E. Robak, Z. Gerlicz-Kowalczyk, B. Dziankowska-Bartkowiak, A. Wozniacka, et J. Bogaczewicz, « Serum concentrations of IL-17A, IL-17B, IL-17E and IL-17F in patients with systemic sclerosis », *Arch. Med. Sci. AMS*, vol. 15, n° 3, p. 706-712, mai 2019, doi: 10.5114/aoms.2019.84738.
- [279] M. A. Ponce-Gallegos *et al.*, « Genetic variants in IL17A and serum levels of IL-17A are associated with COPD related to tobacco smoking and biomass burning », *Sci. Rep.*, vol. 10, n° 1, p. 784, janv. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-57606-6.
- [280] G. R. Beck Jr., « Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation », *J. Cell. Biochem.*, vol. 90, n° 2, p. 234-243, 2003, doi: 10.1002/jcb.10622.
- [281] E. E. Golub et K. Boesze-Battaglia, « The role of alkaline phosphatase in mineralization », *Curr. Opin. Orthop.*, vol. 18, n° 5, p. 444-448, sept. 2007, doi: 10.1097/BCO.0b013e3282630851.
- [282] H. J. Kim, S. J. Seo, J.-Y. Kim, Y.-G. Kim, et Y. Lee, « IL-17 promotes osteoblast differentiation, bone regeneration, and remodeling in mice », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 524, n° 4, p. 1044-1050, avr. 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.054.
- [283] J. Ye *et al.*, « The Interaction Between Intracellular Energy Metabolism and Signaling Pathways During Osteogenesis », *Front. Mol. Biosci.*, vol. 8, p. 807487, janv. 2022, doi: 10.3389/fmolb.2021.807487.
- [284] M. Ponzetti et N. Rucci, « Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n° 13, p. 6651, juin 2021, doi: 10.3390/ijms22136651.
- [285] J. C. Oliver *et al.*, « Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge », *Lymphokine Cytokine Res.*, vol. 12, n° 2, p. 115-120, avr. 1993.
- [286] J. M. Tarrant, « Blood Cytokines as Biomarkers of In Vivo Toxicity in Preclinical Safety Assessment: Considerations for Their Use », *Toxicol. Sci.*, vol. 117, n° 1, p. 4-16, sept. 2010, doi: 10.1093/toxsci/kfq134.

Annexes

Annexe 1. Fiche produit : Staphylococcus aureus ATCC 6538P	267
Annexe 2. Spectre de masse correspondant à chacun des pics de la Figure 69.....	272
Annexe 3. Script python permettant de tracer les cinétiques de libération de la vancomycine.....	273
Annexe 4. Protocole Kit ELISA Human IFN- γ	279

Annexe 1. Fiche produit : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P



Staphylococcus aureus subsp. *aureus* Rosenbach 6538P™

Product Sheet

Description

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* strain FDA 209P is a whole-genome sequenced bacterium with applications in media testing, sterility testing, and susceptibility testing.

Strain designation: FDA 209P

Deposited As: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach

Type strain: No

Storage Conditions

Product format: Freeze-dried

Storage conditions: 2°C to 8°C

Intended Use

This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use.

BSL 2

ATCC determines the biosafety level of a material based on our risk assessment as guided by the current edition of *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, U.S. Department of Health and Human Services. It is your responsibility to understand the hazards associated with the material per your organization's policies and procedures as well as any other applicable regulations as enforced by your local

***Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach**

6538P

or national agencies.

ATCC highly recommends that appropriate personal protective equipment is always used when handling vials. For cultures that require storage in liquid nitrogen, it is important to note that some vials may leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vial exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris. Unless necessary, ATCC recommends that these cultures be stored in the vapor phase of liquid nitrogen rather than submersed in liquid nitrogen.

Certificate of Analysis

For batch-specific test results, refer to the applicable certificate of analysis that can be found at www.atcc.org.

Growth Conditions

Medium:

ATCC Medium 117: Micrococcus medium

Temperature: 37°C

Atmosphere: Aerobic

Handling Procedures

1. Open vial.
2. Rehydrate the entire pellet with approximately 0.5 mL of #117 broth.
Aseptically transfer the entire contents to a 5-6 mL tube of #117 broth.
Additional test tubes can be inoculated by transferring 0.5 mL of the primary

***Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach**

6538P

- broth tube to these secondary tubes.
3. Use several drops of the primary broth tube to inoculate a #117 plate and/or #117 agar slant.
 4. Incubate at 37°C for 18 to 24 hours.

Notes

ATCC 6538P was found moderately resistant to penicillin in 1944 using a Penicillin P2 disk. This result was confirmed in initial characterization at ATCC, but subsequent investigation using a Penicillin P10 disk did *not* show resistance. Resistance has *not* been confirmed using modern methods in accordance with the Clinical & Laboratory Standards Institute guidelines.

For best results, propagate on ATCC Medium #117. Growth on alternate media may result in the loss of traits such as antibiotic resistance. According to the depositor, this strain has demonstrated resistance to Penicillin using the P2 antibiotic disk.

Strain is coagulase positive and β -lactamase negative.

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

Material Citation

If use of this material results in a scientific publication, please cite the material in the following manner: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 6538P)

References

References and other information relating to this material are available at www.atcc.org.

***Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach**

6538P

Warranty

The product is provided 'AS IS' and the viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, provided that the customer has stored and handled the product according to the information included on the product information sheet, website, and Certificate of Analysis. For living cultures, ATCC lists the media formulation and reagents that have been found to be effective for the product. While other unspecified media and reagents may also produce satisfactory results, a change in the ATCC and/or depositor-recommended protocols may affect the recovery, growth, and/or function of the product. If an alternative medium formulation or reagent is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid. Except as expressly set forth herein, no other warranties of any kind are provided, express or implied, including, but not limited to, any implied warranties of merchantability, fitness for a particular purpose, manufacture according to cGMP standards, typicality, safety, accuracy, and/or noninfringement.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use. Any proposed commercial use is prohibited without a license from ATCC.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate or complete and the customer bears the sole responsibility of confirming the accuracy and completeness of any such information.

This product is sent on the condition that the customer is responsible for and assumes all risk and responsibility in connection with the receipt, handling, storage, disposal, and use of the ATCC product including without limitation taking all appropriate safety and handling precautions to minimize health or environmental risk. As a condition of receiving the material, the customer agrees that any activity

***Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach**

6538P

undertaken with the ATCC product and any progeny or modifications will be conducted in compliance with all applicable laws, regulations, and guidelines. This product is provided 'AS IS' with no representations or warranties whatsoever except as expressly set forth herein and in no event shall ATCC, its parents, subsidiaries, directors, officers, agents, employees, assigns, successors, and affiliates be liable for indirect, special, incidental, or consequential damages of any kind in connection with or arising out of the customer's use of the product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the material transfer agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is available at www.atcc.org.

Copyright and Trademark Information

© ATCC 2023. All rights reserved.

ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

Revision

This information on this document was last updated on 2023-03-11

Contact Information

ATCC

10801 University Boulevard

Manassas, VA 20110-2209

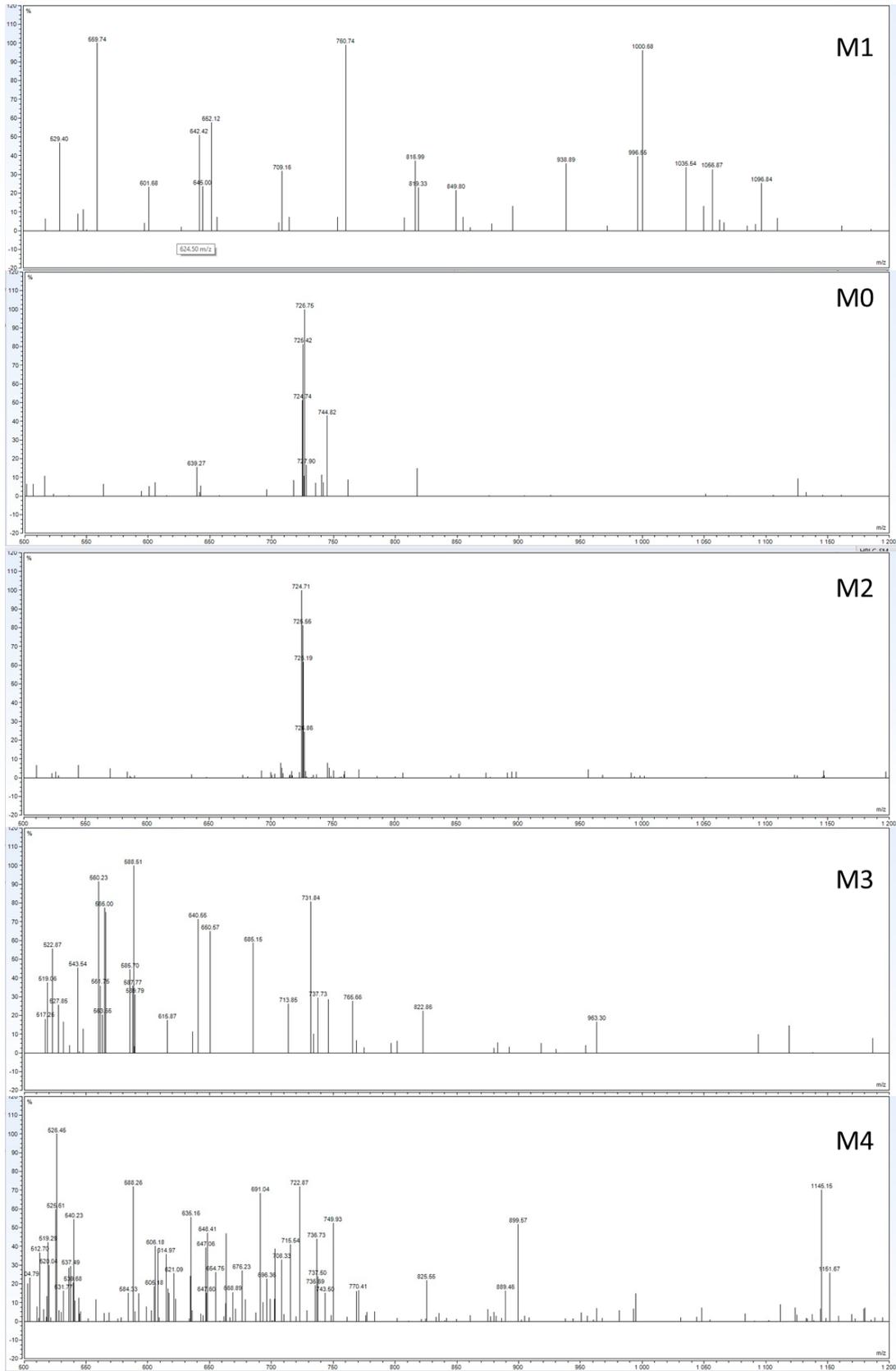
USA

US telephone: 800-638-6597

Worldwide telephone: +1-703-365-2700

Email: tech@atcc.org or contact your local distributor

Annexe 2. Spectre de masse correspondant à chacun des pics de la Figure 69



Annexe 3. Script python permettant de tracer les cinétiques de libération de la vancomycine

```
def process_sample(df, sample, sample_number, Vp, Evap_rate, Initial_volume, result_time, result_volume, result_percentage_of_total_mass, result_concentration):
```

```
    # Get time data (days)
    time = np.array(df[sample, 'Temps (jours)'][1:].dropna())
    # Get concentration data (µg/ml)
    concentration = np.array(df[sample, 'Qt vanco (µg/ml)'][1:].dropna())
    # Get total mass of vanco (µg)
    total_mass = np.array(df[sample, 'Temps (jours)'][0])
    # Init volume and mass vectors
    volume = np.zeros(len(time), dtype=float)
    percentage_of_total_mass = np.zeros(len(time), dtype=float)
    released_concentration = np.zeros(len(time), dtype=float)
    # Init at step 0
    volume[0] = Initial_volume
    percentage_of_total_mass[0] = 100 * concentration[0] * volume[0] / total_mass
    released_concentration[0] = concentration[0]
    # Other steps
    for i in np.arange(1, len(time)):
        if concentration[i-1] == 0.0: # If precedent concentration was 0, take a new start
            volume[i] = Initial_volume
            percentage_of_total_mass[i] = 100 * concentration[i] * volume[i] / total_mass
            released_concentration[i] = concentration[i]
        else:
            volume[i] = volume[i-1] - Evap_rate * (time[i] - time[i-1])
            measured_mass = concentration[i] * volume[i]
            expected_mass = concentration[i-1] * volume[i-1] - concentration[i-1] * Vp
            percentage_of_total_mass[i] = 100 * (measured_mass - expected_mass) / total_mass
            released_concentration[i] = (measured_mass - expected_mass) / volume[i]
    # Append data to result dataframe
    result_time.insert(len(result_time.columns), sample, time)
    result_volume.insert(len(result_volume.columns), sample, volume)
    result_percentage_of_total_mass.insert(len(result_percentage_of_total_mass.columns), sample, percentage_of_total_mass)
```

```

    result_concentration.insert(len(result_concentration.columns),
                                sample,
                                released_concentration)

    return result_time, result_volume, result_percentage_of_total_mass, result_concentration
def process_group(label, samples, result_time, result_volume,
result_percentage_of_total_mass, result_concentration, final_result):
    data = []
    data_cumul = []
    std_dev = []
    std_dev_cumul = []
    variance_sum = 0
    data_concentration = []
    time = result_time[samples[0]]
    for i in np.arange(len(time)):
        if i != 0:
            precedent_data = data_cumul[-1]
        else:
            precedent_data = 0
        data.append(np.mean(result_percentage_of_total_mass.loc[i,samples]))
        std_dev.append(np.std(result_percentage_of_total_mass.loc[i,samples]))
        data_cumul.append(precedent_data
np.mean(result_percentage_of_total_mass.loc[i,samples]))
        variance_sum += np.var(result_percentage_of_total_mass.loc[i,samples])
        std_dev_cumul.append(np.sqrt(variance_sum))
        data_concentration.append(np.mean(result_concentration.loc[i,samples]))
    final_result.loc[label][\"time\"] = list(time)
    final_result.loc[label][\"mean percentage of total mass released (%)\"] = data
    final_result.loc[label][\"mean percentage of total mass released (%) std_dev\"] = std_dev
    final_result.loc[label][\"cumulated mean percentage of total mass released (%)\"] =
data_cumul
    final_result.loc[label][\"cumulated mean percentage of total mass released (%) std_dev\"] =
std_dev_cumul
    final_result.loc[label][\"released concentration (µg/ml)\"] = data_concentration
    return final_result
def plot_group_data(final_result, plot_name, user_parameters):
    fig, ax = plt.subplots()

```

```

if plot_name == 'plot_percentage_mass_released':
    data_to_plot = "mean percentage of total mass released (%)"
elif plot_name == 'plot_cumulated_percentage_mass_released':
    data_to_plot = "cumulated mean percentage of total mass released (%)"
elif plot_name == 'plot_released_concentration':
    data_to_plot = "released concentration (µg/ml)"
else:
    print("unknown data selected for plot")
    return -1

colors = user_parameters[plot_name]['colors']
with_error_bars = user_parameters[plot_name]['with_error_bars'] == 'True'

for index, label in enumerate(final_result.index):
    if with_error_bars:
        ax.errorbar(final_result.loc[label]['time'], final_result.loc[label][data_to_plot],
yerr=final_result.loc[label][data_to_plot+" std_dev"], label=label, capsize=5.0,
color=colors[index])
    else:
        ax.plot(final_result.loc[label]['time'], final_result.loc[label][data_to_plot], label=label,
color=colors[index])

    ax.set(xlabel=user_parameters[plot_name]['x_axis'],
ylabel=user_parameters[plot_name]['y_axis'], title='Vanco release')

    ax.legend()

def higuchi_model(t, a, b):
    return a * np.power(t, 0.5) + b

def hixson_crowell_model(t, c, d):
    return c * t + d

def plot_fits(final_result, user_parameters):
    fig, ax = plt.subplots()

    higuchi_start, higuchi_stop, hixson_crowell_start, hixson_crowell_stop =
user_parameters['higuchi_start'], user_parameters['higuchi_stop'],
user_parameters['hixson_crowell_start'], user_parameters['hixson_crowell_stop']

    colors = user_parameters['higuchi_hixson_crowell_colors']

    for index, label in enumerate(final_result.index):
        # Plot Higuchi fits
        higuchi_interval = pd.Series(final_result.loc[label,"time"]).between(higuchi_start,
higuchi_stop)

```

```

xdata_higuchi = pd.Series(final_result.loc[label,"time"])[higuchi_interval]
ydata_higuchi = pd.Series(final_result.loc[label,"cumulated mean percentage of total
mass released (%)"])[higuchi_interval]
popt, pcov = curve_fit(higuchi_model, xdata_higuchi, ydata_higuchi)
ax.plot(final_result.loc[label]['time'], final_result.loc[label,"cumulated mean percentage of
total mass released (%)", 'o', label=label, color=colors[index])
# Higuchi's release rate is better expressed in %/h^0.5 : a_hour = a_day / sqrt(24)
a_hours = pop[0] / np.sqrt(24)
ax.plot(pd.Series(final_result.loc[label,"time"])[higuchi_interval],
higuchi_model(pd.Series(final_result.loc[label,"time"])[higuchi_interval], pop[0], pop[1]),
label="a={:.2f}%/h^0.5".format(a_hours), color=colors[index])
# Plot Hixson-Crowell fits
hixson_crowell_interval =
pd.Series(final_result.loc[label,"time"]).between(hixson_crowell_start, hixson_crowell_stop)
y_for_hixson_crowell = [np.power(100,1/3) - np.power(100-y,1/3) for y in
final_result.loc[label,"cumulated mean percentage of total mass released (%)"]]
xdata_hixson_crowell = pd.Series(final_result.loc[label,"time"])[hixson_crowell_interval]
ydata_hixson_crowell = pd.Series(y_for_hixson_crowell)[hixson_crowell_interval]
# If there is data superior to 100%, Hixson-Cromwell model results in cube roots of
negative number, that is nan
# Since nan values prevent curve_fit, nan values are removed from the list
xdata_hixson_crowell_curated =
np.array(xdata_hixson_crowell)[~np.isnan(ydata_hixson_crowell).astype(bool)]
ydata_hixson_crowell_curated =
np.array(ydata_hixson_crowell)[~np.isnan(ydata_hixson_crowell).astype(bool)]
# Process curve fitting and generate data to display the result
popt, pcov = curve_fit(hixson_crowell_model, xdata_hixson_crowell_curated,
ydata_hixson_crowell_curated)
t_display = np.linspace(min(xdata_hixson_crowell_curated),
max(xdata_hixson_crowell_curated), 50)
y_display = [100 - np.power(np.power(100,1/3) - pop[0] * t - pop[1], 3) for t in t_display]
# Hixson-Cromwell's release rate is better expressed in %^(1/3)/h : c_hour = c_day / 24
c_hours = pop[0] / 24
# Plot the curve fitting in dashed lines
ax.plot(t_display, y_display, label="c={:.2e}%^(1/3)/h".format(c_hours), linestyle = '--',
color=colors[index])
# Complete graph

```

```

    ax.set(xlabel='time (days)', ylabel="cumulated mean percentage of total mass released
(%)", title='Vanco release')
    ax.legend()
def main():
    # Manage argument
    parser = argparse.ArgumentParser(
        prog='DissoVanco',
        description='Analyses data of drug release in closed circuit with evaporation.',
        epilog='See https://gitlab.xlim.fr/beauumont/dissovanco for help')
    parser.add_argument('filename', help='parameter file')
    # Read parameters
    if parser.parse_args().filename == "Disso4.yaml":
        filename = "Disso4.yaml"
    else:
        filename = parser.parse_args().filename
    with open(filename) as file:
        user_parameters = yaml.load(file, Loader=yaml.FullLoader)
    # Read data file
    df = pd.read_excel('Nomenclature - Bilan disso.xlsx', sheet_name='Bilan valeurs',
index_col=None, header=[1,2])
    # Constants
    Vp = 2 # Sample volume (ml)
    Evap_rate = 24 * 0.022 # Evaporation rate (ml/day)
    Initial_volume = 25 #Initial volume (ml)
    # Prepare result dataframe
    result_time = pd.DataFrame(data=None)
    result_volume = pd.DataFrame(data=None)
    result_percentage_of_total_mass = pd.DataFrame(data=None)
    result_concentration = pd.DataFrame(data=None)
    # Define groups
    groups = user_parameters['groups']
    # Loop on samples
    sample_list = [values for _,list_of_values in groups.items() for values in list_of_values]
    sample_number = 0
    for sample in sample_list:

```

```

    result_time, result_volume, result_percentage_of_total_mass, result_concentration =
process_sample(df, sample, sample_number, Vp, Evap_rate, Initial_volume, result_time,
result_volume, result_percentage_of_total_mass, result_concentration)

    # Increment sample number

    sample_number += 1

    # Create the data frame containing all results for groups

    final_result = pd.DataFrame(data=None, index=list(groups.keys()), columns=["time", "mean
percentage of total mass released (%)", "mean percentage of total mass released (%) std_dev",
"cumulated mean percentage of total mass released (%)", "cumulated mean percentage of
total mass released (%) std_dev", "released concentration (µg/ml)"])

    # Process data for groups: mean values, standard deviations

    for label, samples in groups.items():

        final_result = process_group(label, samples, result_time, result_volume,
result_percentage_of_total_mass, result_concentration, final_result)

        print("**** Resulting mass values :")
        print(result_percentage_of_total_mass)
        print("**** Resulting volume values :")
        print(result_volume)
        print("**** Resulting mean values :")
        print(final_result)

    # Plot

    plot_group_data(final_result, "plot_percentage_mass_released", user_parameters)
    plot_group_data(final_result, "plot_cumulated_percentage_mass_released",
user_parameters)
    plot_group_data(final_result, "plot_released_concentration", user_parameters)

    # Fit with Higuchi's and Hixson-Crowell's models

    # Source : Hiva Baradari's PhD thesis

    plot_fits(final_result, user_parameters)

    # Show all plots

    plt.tight_layout()

    plt.show()

if __name__ == "__main__":
    main()

```

Human IFN- γ ELISA Kit

Catalog Number KAC1231 (96 tests)

Pub. No. MAN0007823 Rev. 2.0

CAUTION! This kit contains materials with small quantities of sodium azide. Sodium azide reacts with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. Upon disposal, flush drains with a large volume of water to prevent azide accumulation. Avoid ingestion and contact with eyes, skin and mucous membranes. In case of contact, rinse affected area with plenty of water. Observe all federal, state, and local regulations for disposal.

Note: For safety and biohazard guidelines, see the "Safety" appendix in the *ELISA Technical Guide* (Pub. no. MAN0006706). Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

Product description

The Invitrogen™ Human IFN- γ ELISA Kit is a solid-phase sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). This assay is designed to detect and quantify the level of human IFN- γ in serum, plasma, cell culture supernatant, and other biological fluids. The assay recognizes both natural and recombinant human IFN- γ .

IFN- γ (type II interferon) is IFN- γ is a lymphokine produced by activated T (and NK) cells. The IFN- γ gene encodes a 146 amino acid protein that is post-translationally processed into 20 kDa and 25 kDa species that differ by glycosylation. Native IFN- γ is pH2-labile, highly basic, and can aggregate to form dimers that are biologically active. IFN- γ plays a role in regulating cell growth, innate immunity, and adaptive immunity. IFN- γ is a principal macrophage activating factor (MAF), and it also regulates the pathway of differentiation of myeloid cells.

Contents and storage

Upon receipt, store the kit at 2°C to 8°C. Store the Wash Solution Concentrate at room temperature. When stored as indicated, all reagents are stable until the expiration date.

Contents	Cat. No. KAC1231 (96 tests)	Color code
Zero Calibrator; in human serum, with benzamidine and thymol; lyophilized (see vial label for quantity and reconstitution volume)	2 vials	Black
Calibrators 1 to 5; in human serum, with benzamidine and thymol; lyophilized (see vial label for quantity and reconstitution volume)	5 vials	Yellow
Controls 1 and 2; in human serum, with benzamidine and thymol; lyophilized. Refer to vial label for reconstitution volume and range	2 vials	Silver
IFN- γ Antibody-Coated Wells, 96-well strip-well plate	1 plate	Blue
Anti-IFN- γ -HRP Conjugate; in Tris-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	6 mL	Red
Wash Solution Concentrate (200X)	10 mL	Brown
Chromogenic TMB (tetramethylbenzidine) in DMF	12 mL	Brown
Stop Solution (1 N HCl)	12 mL	White

Materials required but not supplied

- Distilled or deionized water
- Microtiter plate reader with software capable of measurement at 450 nm, 490 nm, and 650 nm (polychromatic reading)
- Plate washer—automated or manual (squirt bottle, manifold dispenser, or equivalent)
- Calibrated adjustable precision pipettes and glass or plastic tubes for diluting solutions; beakers, flask and cylinders for preparation of reagents
- Horizontal microplate shaker capable of 700 rpm \pm 100 rpm
- Magnetic stirrer

Before you begin

IMPORTANT! Reagents are lot-specific. Do not mix or interchange different reagent lots from various kit lots.

- Review the **Procedural guidelines** and **Plate washing directions** in the *ELISA Technical Guide* available at thermofisher.com.
- Allow reagents to reach room temperature before use. Mix to redissolve any precipitated salts.

Prepare 1X Wash Buffer

1. Dilute 2 mL of Wash Solution Concentrate (200X) with 398 mL of deionized or distilled water. Label as 1X Wash Buffer.
2. Use a magnetic stirrer to mix the solution.

Note: Use 1X Wash Buffer on the same day it is prepared. Discard unused 1X Wash Buffer at the end of the day.

Sample preparation guidelines

- Refer to the *ELISA Technical Guide* at thermofisher.com for detailed sample preparation procedures.
- Collect samples in pyrogen/endotoxin-free tubes.
- Freeze samples after collection if samples will not be tested immediately. Avoid multiple freeze-thaw cycles of frozen samples. Thaw completely and mix well (do not vortex) prior to analysis.
- Avoid the use of hemolyzed or lipemic sera. If large amounts of particulate matter are present in the sample, centrifuge or filter sample prior to analysis.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Reconstitute Calibrators

Note: Calibrators are stable for 4 days at 2–8°C. For longer term storage, make aliquots and store at –20°C for up to 2 months. Avoid successive freeze thaw cycles.

1. Reconstitute the Zero Calibrator with distilled water. See the vial label for the exact volume.

Note: Use the Zero Calibrator for sample dilutions.

2. Reconstitute Calibrators 1 to 5 by adding 0.5 mL of distilled water to each vial.

Note: The calibrators are used to create a standard curve. 1 IU of calibrator is equivalent to 1 IU NIBSC 87/586. See the exact values of each calibrator on vial labels.

Reconstitute controls

Note: Controls are stable for 4 days at 2–8°C. For longer term storage, make aliquots and store at –20°C for up to 2 months. Avoid successive freeze thaw cycles.

Reconstitute Controls 1 and 2 by adding 0.5 mL of distilled water to each vial.

If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy can be determined.

Pre-dilute samples

Sample concentrations should be within the range of the standard curve. Because conditions may vary, each investigator should determine the optimal dilution for each application.

- Dilute the sample with reconstituted Zero Calibrator as needed.
- If samples generate values higher than the highest standard, dilute samples further and repeat the assay.

Perform ELISA (Total assay time: 2.5 hours)

IMPORTANT! Perform a standard curve with each assay.

- Allow all components to reach room temperature before use. Mix all liquid reagents prior to use.
- Determine the number of 8-well strips required for the assay. Insert the strips in the frames for use. Re-bag any unused strips and frames, and store at 2°C to 8°C for future use.



1	Bind antigen 	<ol style="list-style-type: none">a. Add 50 µL of calibrators, controls, or samples (see “Pre-dilute samples” on page 2) to the appropriate wells. Leave the wells for chromogen blanks empty.b. Add 50 µL of anti-IFN-γ HRP Conjugate solution into each well except the chromogen blanks.c. Tap the side of the plate to mix. Cover the plate with a plate cover and incubate 2 hours at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 10 rpm.d. Thoroughly aspirate the solution and wash wells 3 times with 1X Wash Buffer.
2	Add Chromogenic TMB 	<ol style="list-style-type: none">a. Add 100 µL of Chromogenic TMB to each well. The substrate solution begins to turn blue.b. Incubate for 15 minutes at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 10 rpm in the dark. Note: TMB should not touch aluminum foil or other metals.
3	Add Stop Solution 	Add 100 µL Stop Solution to each well. Tap the side of the plate to mix. The solution in the wells changes from blue to yellow.

Read the plate and generate the standard curve

1. Read the absorbance at 450 nm. Read the plate within 3 hours after adding the Stop Solution.
2. Use curve-fitting software to generate the standard curve. A 4 parameter algorithm provides the best standard curve fit. Optimally, the background absorbance may be subtracted from all data points, including standards, unknowns and controls, prior to plotting.
3. Read the concentrations for unknown samples and controls from the standard curve. Multiply value(s) obtained for sample(s) by the appropriate factor to correct for the sample dilution.

Note: Dilute samples producing signals greater than the upper limit of the standard curve in Standard Diluent Buffer and reanalyze. Multiply the concentration by the appropriate dilution factor.

Performance characteristics

Standard curve example

The following data obtained for calibrators 0 to 5 are for illustration only and should never be used in place of a real time standard curve.

Calibrator	Concentration (pg/mL)	Optical Density (450 nm)
5	30	3.11
4	10	1.35
3	5	0.70
2	2	0.34
1	1	0.17
0	0	0.03

Inter-assay precision

Samples were assayed 20 times in multiple assays to determine precision between assays.

Parameters	Sample 1	Sample 2
Mean (IU/mL)	1.61	5.72
Standard Deviation	0.03	0.51
% Coefficient of Variation	5.8	8.8

Intra-assay precision

Samples of human IFN- γ were assayed in replicates of 10 to determine precision within an assay.

Parameters	Sample 1	Sample 2
Mean (IU/mL)	1.26	12.28
Standard Deviation	0.03	0.35
% Coefficient of Variation	3.2	3.8

Expected values

These values are given only for guidance and it is recommended that each laboratory establishes its own normal values.

Sample	Range (IU/mL)	Average (IU/mL)	Standard deviation
Serum (n=30)	0-0.77	0.28	0.15
Plasma (n=60)	0-0.89	0.08	0.12

Linearity of dilution

Dilution	Serum		Plasma		Cell culture medium (1:4 dilution)	
	Measured conc. (IU/mL)	Theor. conc. (IU/mL)	Measured conc. (IU/mL)	Theor. conc. (IU/mL)	Measured conc. (IU/mL)	Theor. conc. (IU/mL)
1/1	18	18	11.72	11.72	—	—
1/2	8.98	9	5.89	5.86	—	—
1/4	4.41	4.5	3.17	2.93	23.32	23.32
1/8	2.39	2.25	1.59	1.47	12.13	11.66
1/16	1.17	1.13	0.79	0.73	5.67	5.83
1/32	0.6	0.56	0.41	0.37	3.15	2.92
1/64	—	—	—	—	1.58	1.46
1/128	—	—	—	—	0.75	0.73

High-dose hook effect

A sample spiked with human IFN- γ up to 500,000 IU/mL gives a response higher than that obtained for the last standard point.

Recovery

Sample	Added IFN- γ (IU/mL)	Recovery IFN- γ (IU/mL)	Recovery %
Serum	20.46	20.3	99
	9.85	10.12	103
	4.73	4.76	101
	2.41	2.25	94
	1.04	1.03	99
Plasma	20.46	20.33	99
	9.85	9.53	97
	4.73	4.81	102
	2.41	2.43	101
	1.04	1	96
Cell culture medium (1:4 dilution)	20.46	20.14	98
	9.85	10.37	105
	4.73	4.88	103
	2.41	2.58	107
	1.04	1.07	103

Sensitivity

The minimum detectable dose of human IFN- γ is 0.03 IU/mL. This was determined by adding two standard deviations to the mean O.D. obtained when the zero standard was assayed 20 times, and calculating the corresponding concentration.

Specificity

No significant cross-reaction was observed in presence of 50 ng of IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- β , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF, and RANTES. This kit is specific for human natural and recombinant human IFN- γ .

Time delay between dispensing last calibrator and last sample

IMPORTANT! To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in this section.

Assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

Sample	Time delay			
	0 minutes	10 minutes	20 minutes	30 minutes
S1	2.7	2.7	2.7	2.7
S2	6.8	6.8	6.5	6.7
S3	4.2	4.1	4.0	4.0
N1	22.7	21.2	19.4	22.0
N2	24.9	23.7	21.7	20.1
N3	14.7	14.8	13.1	12.6
N4	17.9	15.3	13.8	13.9
N5	17.4	16.5	15.6	15.0

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.

Product label explanation of symbols and warnings

 REF	Catalog Number	 LOT	Batch code		Temperature limitation		Use by		Manufacturer		Consult instructions for use		Caution, consult accompanying documents
---	----------------	---	------------	---	------------------------	---	--------	---	--------------	---	------------------------------	---	---

 Life Technologies Corporation | 7335 Executive Way | Frederick, MD 21704 | USA
For descriptions of symbols on product labels or product documents, go to thermofisher.com/symbols-definition.

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

©2019 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion
thermofisher.com

5 June 2019

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Biocéramiques fonctionnalisées pour une ostéoimmunomodulation et une libération locale de molécules actives

Les céramiques poreuses en phosphate de calcium possèdent des propriétés bioactives et ostéoconductrices intrinsèques, mais elles ne sont pas suffisantes pour permettre l'intégration de grands implants. En effet, au-delà de 1 cm³, ces implants sont difficilement colonisés par les cellules. Le manque de vascularisation ainsi que l'absence de matrice organique ne permettent pas à ces substituts osseux d'avoir des propriétés mécaniques suffisantes pour permettre leur utilisation au sein des os longs, dont le rôle est d'assurer un soutien mécanique. Les risques d'infection liés à l'intervention chirurgicale peuvent conduire au rejet de l'implant. Ces travaux proposent de développer une céramique en hydroxyapatite, élaborée par micro-extrusion, présentant une porosité multi-échelle pour améliorer les propriétés ostéoconductrices. Dans le but de lui conférer des propriétés ostéoinductrices, le matériau a été fonctionnalisé par des cytokines (IL-17 et IFN- γ), adsorbées au niveau des micropores, pour favoriser l'ostéoimmunomodulation, et par un antibiotique (vancomycine), contenu dans un hydrogel, placé dans les macropores de l'architecture, pour prévenir les risques d'infections. Afin de mimer les conditions physiologiques, les cinétiques de libération des molécules actives ont été évaluées en condition dynamique dans un bioréacteur à perfusion. Les résultats ont démontré la pertinence de la vancomycine et de son système de chargement, qui permet une libération sur 14 jours à des concentrations inhibant la croissance bactérienne sans être toxique pour les cellules de la niche osseuse. Concernant les cytokines, 20 nM d'IL-17 est suffisant pour induire la différenciation des cellules pré-ostéoblastiques, et les premières études de libération en conditions dynamiques ont pu être réalisées.

Mots-clés : Impression 3D, Fonctionnalisation, Libération

Functionalized bioceramics for osteoimmunomodulation and local release of active molecules

Calcium phosphate porous ceramics possess intrinsic bioactive and osteoconductive properties, but these are insufficient for the integration of large implants. Indeed, beyond a volume of 1 cm³, these implants are difficult to be colonized by cells. The lack of vascularization and the absence of an organic matrix do not allow these bone substitutes to achieve the mechanical properties mandatory for using them to repair long bones. Surgical intervention-related infection risks may lead to implant rejection. This work proposes the development of a hydroxyapatite ceramic, fabricated by micro-extrusion, featuring multi-scale porosity to enhance osteoconductive properties. To confer osteoinductive properties, the material was functionalized with cytokines (IL-17 and IFN- γ), adsorbed at the micropores to promote osteoimmunomodulation, and with an antibiotic (vancomycin), contained in a hydrogel, placed within the macropores of the architecture to prevent infection risks. To mimic physiological conditions, the release kinetics of the active molecules were evaluated under dynamic conditions in a perfusion bioreactor. Results demonstrated the effectiveness of vancomycin and its loading system, which allows for a 14-day release at concentrations that inhibit bacterial growth without being toxic to bone niche cells. Regarding cytokines, 20 nM of IL-17 is sufficient to induce the differentiation of pre-osteoblastic cells, and initial release studies under dynamic conditions have been conducted.

Keywords: 3D printing, Functionalization, Local delivery

