

**Thèse de doctorat
Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Lille**

Spécialité du doctorat :
Recherche clinique, innovation technologique, Santé publique

Section CNU :
Pathologie ostéo-articulaire, dermatologie et chirurgie plastique

**Présentée et soutenue par WOJCIK Thomas
Le 25 novembre 2024, à Lille**

École doctorale :
Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

Équipe de recherche, Laboratoire :
Advanced Drug Delivery, Unité INSERM U1008

Titre de la thèse :
Prototypage et vascularisation de matrices phosphocalciques

JURY

Rapporteurs

- Brix, Murielle.PU.PH, Université de Nancy
- Bertrand, Ghislaine. PU, Université de Toulouse

Examineurs

- Brix, Murielle.PU.PH, Université de Nancy
- Bertrand, Ghislaine. PU, Université de Toulouse
- HORNEZ, Jean-Christophe. MCU, HDR, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis (co-directeur de thèse)
- RAOUL, GWENAEL. PU.PH, Université de Lille (co-directeur de thèse)

Président

- FERRI,JOEL. PU.PH, Université de Lille

Résumé :

Les phosphates de calcium et en particulier le β -TCP sont utilisés depuis des décennies comme substitut osseux synthétique du fait de leurs propriétés physico-chimiques qui les rapprochent des apatites biologiques présentes dans l'os natif. La principale limite à leur utilisation dans des reconstructions de larges pertes de substance, comme pour les greffes osseuses, est leur absence de vascularisation propre. Afin d'outrepasser cette limite, une des stratégies adoptées est de mimer un lambeau libre osseux et en particulier sa vascularisation interne qui en fait la technique de référence dans les reconstructions de grands volumes tissulaires.

De plus, les propriétés des matrices phosphocalciques sont très variables en fonction de leur composition, mais également de leur micro et macroarchitectures. C'est pourquoi nous avons souhaité développer et tester un processus de production qui s'étend de la synthèse des poudres à leur mise en forme finale par impression tridimensionnelle.

Nous avons également souhaité étudier l'impact d'un dépôt protéique sur nos matrices afin d'améliorer la survie et la prolifération des cellules endothéliales en culture in vitro. Enfin, afin, de pouvoir étudier dans le futur la culture de cellules endothéliales en flux, au sein de matrices présentant des réseaux micro fluidique, nous avons développé un réacteur de culture répondant à nos besoins et contraintes.

Mots clés : os, vascularisation, phosphate tricalcique, ingénierie tissulaire, impression 3D, digital light processing

Abstract:

Due to their physico-chemical properties, which make them similar to the biological apatites present in native bone, calcium phosphates, and in particular β -TCP, have been used for decades as synthetic bone substitutes. The main limitation in their use in reconstructing large bone defects, as with bone grafts, is their lack of proper vascularisation. To overcome this limitation, one of the strategies adopted is to mimic a free bone flap, and particularly its internal vascularisation, which makes it the gold standard for reconstructing large volumes of tissue.

Furthermore, the properties of phosphocalcic matrices are highly variable, depending not only on their composition but also on their micro and macro architectures. This is why we decided to develop and test a production process that extends from the synthesis of powders to their final shaping by three-dimensional printing.

We also wanted to study the impact of protein deposition on our matrices to improve the survival and proliferation of endothelial cells in in-vitro culture. Finally, to study in the future the flow culture of endothelial cells within matrices including micro-fluidic networks, we developed a culture reactor that meets our needs and constraints.

Key words: bone, vascularization, tricalcium phosphate, tissular engineering, 3D printing, digital light processing

Remerciements.

Ce travail a été effectué au sein des locaux du Laboratoire des Matériaux Céramiques et Procédés Associés, mais également, au sein de l'unité INSEM 1008 et enfin de la société Cryoceram, je tiens en premier lieu à remercier l'ensemble des membres de ses structures qui ont permis à ce travail d'aboutir malgré de nombreuses contraintes.

Je souhaite remercier Madame la Professeure Muriel Brix et Madame la Professeure Ghislaine Bertrand qui m'ont fait l'honneur d'endosser le rôle de rapportrices et de participer à mon jury.

Je remercie le Professeur Ferri d'avoir accepté de participer à mon jury et pour avoir soutenu mon travail durant toutes ces années. Je sais que ce n'est jamais assez rapide pour vous, mais nous ne lâchons pas la barre.

Je souhaite remercier le Professeur Gwenaël Raoul d'avoir accepté de codiriger ce travail. Depuis de nombreuses années maintenant tu guides ma réflexion clinique et fondamentale sur les reconstructions osseuses. Je pense que les deux sont intimement liées et ton soutien sans faille au cours de ses années de recherche a été d'une aide précieuse.

Je remercie également le Docteur Jean-Christophe Hornez d'avoir bien voulu codiriger cette thèse. Je te remercie de m'avoir ouvert les portes du LMCPA qui a été un lieu de découvertes et d'expérimentations qui m'a permis d'appréhender les matrices phosphocalciques dans toute leur complexité. Depuis mon master 1, tu as toujours été à l'écoute de mes questions et de mes demandes et sans ton soutien ce travail n'aurait pas été envisageable.

Je remercie les Professeurs Juergen Siepmann et Nicolas Blanchemain qui m'ont accueilli au sein de l'Unité INSERM 1008, m'ont soutenu et rendu ce travail possible.

Je tiens également à remercier Madame Feng Chai, Ingénieure d'étude à l'université de Lille pour son aide indispensable dans la réalisation de nos cultures cellulaires.

Un remerciement très spécial à Vincent Hornez, pour son implication et sa passion sans laquelle ce travail n'aurait pas été possible. Nous avons passé de longues heures et journées sur nos essais et développement et j'espère que le temps passé nous sera profitable à tous les deux.

Je tiens à remercier mes collègues tant au Centre oscar Lambret que CHU de Lille qui m'ont permis de m'accorder du temps afin de mener à bien ce travail de recherche.

Merci aux Branlotins d'être toujours présents.

Merci à mes parents et ma famille pour leur soutien et leur amour.

Merci à Aurore et Sibylle qui emplissent ma vie de bonheur, je vous aime.

Sommaire.

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET CONTEXTUALISATION :	7
1 ORGANISATION STRUCTURALE, ARCHITECTURALE, COMPOSITION ET BIOLOGIE OSSEUSE :	7
1.1 STRUCTURE.....	7
1.1.1 OS FIBRILLAIRE.....	7
1.1.2 OS LAMELLAIRE.....	8
1.2 ARCHITECTURE	8
1.2.1 OS CORTICAL :.....	8
1.2.2 OS SPONGIEUX :.....	8
1.3 COMPOSITION	9
1.3.1 CELLULES :.....	9
1.3.1.1 Ostéoblastes :	9
1.3.1.2 Ostéoclastes :.....	10
1.3.1.3 Matrice osseuse :.....	10
1.3.1.4 Matrice inorganique minéralisée :.....	11
1.3.1.5 Matrice organique :	11
1.3.1.5.1 Protéines collagéniques.....	11
1.3.1.5.2 Protéines non collagéniques :.....	11
1.4 PROCESSUS D’OSSIFICATION.....	12
1.4.1 OSSIFICATION PRIMAIRE :.....	12
1.4.1.1 Ossification enchondrale :	12
1.4.1.2 Ossification membraneuse :	13
1.4.2 OSSIFICATION SECONDAIRE :.....	14
1.4.3 OSSIFICATION TERTIAIRE :.....	14
1.4.4 REMODELAGE OSSEUX :.....	15
1.4.4.1 Activation :.....	15
1.4.4.2 Résorption :.....	16
1.4.4.2.1 Dissolution des minéraux de la matrice :	16
1.4.4.2.2 Dégradation de la matrice organique :.....	16
1.4.4.3 Inversion :	17

1.4.4.4	Formation :.....	17
1.4.4.4.1	Synthèse de la matrice organique	17
1.4.4.4.2	Minéralisation.....	17
2	PHYSIOLOGIE VASCULAIRE ET VASCULARISATION OSSEUSE.....	19
2.1	STRUCTURE.....	19
2.2	MORPHOLOGIE.....	19
2.2.1	ARTERES ET ARTERIOLES :.....	19
2.2.1.1	Artères élastiques :.....	19
2.2.1.2	Artères musculaires :	19
2.2.1.3	Artérioles :.....	20
2.2.1.4	Capillaires :.....	20
2.2.1.4.1	Capillaires continus.....	20
2.2.1.4.2	Capillaires fenestrés	20
2.2.1.4.3	Capillaires sinusoïdes.....	20
2.2.2	VEINES ET VEINULES :.....	20
2.2.2.1	Veinules :.....	21
2.2.2.2	Veines propulsives/ musculaires :	21
2.2.2.3	Veines réceptrices :.....	21
2.3	COMPOSITION	22
2.3.1	CELLULE ENDOTHELIALE ET ENDOTHELIUM :.....	22
2.3.2	PERICYTES :.....	22
2.4	BIOLOGIE.....	23
2.4.1	ANGIOGENESE :.....	23
2.4.1.1	Sélection et activation :	24
2.4.1.2	Migration et prolifération :.....	24
2.4.1.3	Fusion et formation de la lumière :	24
2.4.1.4	Maturation et retour à la quiescence :.....	24
2.5	VASCULARISATION OSSEUSE	25
2.5.1	VASCULARISATION ENDOSTEE :.....	26
2.5.2	VASCULARISATION PERIOSTEE :.....	27
2.6	IMPORTANCE DE LA VASCULARISATION DANS L'HOMÉOSTASIE OSSEUSE	29
3	BIOMATERIAUX.....	31
3.1	LES SUBSTITUTS OSSEUX	31

3.1.1	APATITES BIOLOGIQUES :.....	32
3.1.2	APATITES SYNTHETIQUES :.....	33
3.1.2.1	L'hydroxyapatite :.....	33
3.1.2.2	Le béta tri calcium phosphate :.....	33
3.1.2.3	Le calcium phosphate biphasique (BCP) :.....	34
3.2	SYNTHESE	34
3.2.1	SYNTHESE PAR VOIE HUMIDE :.....	34
3.3	PROPRIETE PHYSICO-CHIMIQUES ET ARCHITECTURALES	35
3.3.1	PROPRIETES BIOLOGIQUES DES MATERIAUX :.....	35
3.3.1.1	Biodégradabilité et bioactivité :.....	36
3.3.1.2	Osteoconduction :.....	38
3.3.1.3	Ostéoinduction	38
3.3.2	IMPACT DE LA GEOMETRIE :.....	41
3.3.2.1	Microarchitecture des matrices phosphocalciques :.....	41
3.3.2.2	Macroarchitecture des matrices phosphocalciques :.....	41
4	TECHNIQUE DE MISE EN FORME DE MATRICES PHOSPHOCALCIQUES.....	44
4.1	IMPREGNATION D'UN NEGATIF DE MATRICE EN POLY METHYL METHACRYLATE (PMMA) PAR SUSPENSION DE β -TCP	44
4.1.1	MISE EN FORME DU NEGATIF DE LA MATRICE FINALE :.....	45
4.1.2	IMPREGNATION DU NEGATIF ET DELIANTAGE :.....	46
4.1.3	FRITTAGE :.....	47
4.2	CONGELATION ORIENTEE	49
4.2.1	PREPARATION DE LA SUSPENSION :.....	49
4.2.2	ORIENTATION DE LA CONGELATION :.....	49
4.2.3	FORMATION DES STRUCTURES POREUSES :.....	50
4.2.4	SUBLIMATION (LYOPHILISATION) :.....	50
4.2.5	TRAITEMENT THERMIQUE :.....	50
4.3	PROTOTYPAGE RAPIDE ET IMPRESSION TRIDIMENSIONNELLE	51
4.3.1	LES TECHNIQUES D'IMPRESSON TRIDIMENSIONNELLES :.....	51
4.3.1.1	Extrusion ou dépôt de fil fondu :.....	51
4.3.1.2	Stéréolithographie ou photo polymérisation :.....	52
4.3.1.2.1	Stereo Lithograph Apparatus (SLA)	52
4.3.1.2.2	Digital Light Processing (DLP)	53
4.3.1.2.3	Le Continuous Light Interface Production (CLIP).....	53
4.3.1.3	Frittage sélectif par laser :.....	53

4.3.1.4	Projection ou jet de matière :	53
4.4	CONCLUSION	54
5	VASCULARISATION ET INGENIERIE TISSULAIRE.....	55
5.1	APPROCHES CHIRURGICALES.....	56
5.1.1	MEMBRANE INDUITE :	56
5.1.2	LAMBEAUX LIBRES :	57
5.1.3	BOUCLE ARTERIOVEINEUSE :	57
5.2	INDUCTION D'UNE NEOVASCULARISATION PAR LES TISSUS ENVIRONNANTS	58
5.3	BIO-IMPRESSON D'UN RESEAU VASCULAIRE	59
6	PLASMA RICHE EN PLAQUETTES (PRP).....	60
CHAPITRE 2 : METHODES EXPERIMENTALES ET DEVELOPPEMENT DE MATERIEL.....		63
1	SYNTHESE DES POUDRES DE β -TCP.....	63
2	CARACTERISATION DES POUDRES.....	65
2.1	DIFFRACTION A RAYONS X	65
2.2	SPECTROMETRIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER	66
3	RECHERCHE DE POLLUANTS OU D'ELEMENTS TRACES DANS LA POUDRE PRODUITE.....	67
4	TECHNIQUES DE MISE EN FORME DES MATRICES.....	67
4.1	PROTOTYPAGE RAIDE PAR DLP	67
4.1.1	MISE EN FORME ASSISTEE INFORMATIQUEMENT :	67
4.1.2	IMPRESSON TRIDIMENSIONNELLE PAR DLP :	68
4.2	TECHNIQUE DE MISE EN FORME CONVENTIONNELLE	70
5	DELIANTAGE ET FRITTAGE.....	71
6	CARACTERISATION DES PIECES PRODUITES.....	72
6.1	DETERMINATION DE LA MICROPOROSITE OUVERTE DES MATRICES	72
6.2	CONTROLE DE LA PRECISION DE NOTRE TECHNIQUE D'IMPRESSON PAR DLP	72

6.3	RELARGAGE DES IONS CALCIUM EN MILIEU AQUEUX	73
7	ÉVALUATION DE LA BIOCOMPATIBILITE DE LA TECHNIQUE D'IMPRESSION DES MATRICES DE β -TCP	75
7.1	ÉTUDE DE L'IMPACT DE LA TEMPERATURE DE FRITTAGE ET DE LA TECHNIQUE DE MISE EN FORME	75
7.2	IMPACT DU RINÇAGE DES MATRICES	76
8	ÉTUDE QUALITATIVE DE DEPOTS PROTEIQUES SUR MATRICES PHOSPHOCALCIQUES.....	77
9	PRODUCTION DE PLASMA RICHE EN PLAQUETTES.....	79
10	ÉTUDE DE L'IMPACT D'UN DEPOT DE PLASMA RICHE EN PLAQUETTES ACTIVEES (PRPAC) SUR LA PROLIFERATION D'HUVECS.....	81
11	ÉTUDE EN MICROSCOPIE CONFOCALE DE LA CULTURE D'HUVECS SUR MATRICES DE β -TCP.....	83
12	DEVELOPPEMENT D'UNE MATRICE TUBULAIRE DE CULTURE EN FLUX.....	85
13	DEVELOPPEMENT D'UN BIOREACTEUR DE CULTURE EN FLUX.....	88
13.1	MODULES D'HOMOGENEISATION DU MILIEU DE CULTURE :	90
13.2	MODULE DE CULTURE :	91
13.3	MODULE DE TAMPONNEMENT DU MILIEU :	93
13.4	DEVELOPPEMENT D'UNE INTERFACE DE CONTROLE ET D'ENREGISTREMENT	94
14	VALIDATION DE LA STERILITE DU MONTAGE DU REACTEUR ET DE L'ENREGISTREMENT DES PARAMETRES	96
CHAPITRE 3 : RESULTATS.....		97
1	CARACTERISATION ET CONTROLE DES POUDRES PRODUITES.....	97
1.1	DIFFRACTION A RAYONS X	97
1.2	DETERMINATION DE LA PURETE PAR SPECTROMETRIE INFRAROUGE A TRANSFORME DE FOURIER.....	97
1.3	RECHERCHE DE POLLUANTS OU ELEMENTS TRACES DANS LA POUDRE PRODUITE	99
2	CARACTERISATION DES PIECES PRODUITES.....	100

2.1	DETERMINATION DE LA MICROPOROSITE DES PIECES PAR PESEE HYDROSTATIQUE	100
2.2	CONTROLE DE LA PRECISION D'IMPRESSION DES PIECES.....	100
2.3	RELARGAGE DES IONS CALCIUM	102
3	ÉVALUATION DE LA BIOCOMPATIBILITE DE LA TECHNIQUE D'IMPRESSION.....	104
3.1	ÉTUDE DE L'IMPACT DE LA TEMPERATURE DE FRITTAGE ET DE LA TECHNIQUE DE MISE EN FORME	104
3.2	IMPACT DU RINÇAGE DES MATRICES	105
4	ÉTUDE QUALITATIVE DE DEPOTS PROTEIQUES SUR MATRICES PHOSPHOCALCIQUES.....	106
5	ÉTUDE DE L'IMPACT D'UN DEPOT DE PLASMA RICHE EN PLAQUETTES ACTIVEES (PRPAC) SUR LA PROLIFERATION D'HUVECS.....	108
6	ÉTUDE EN MICROSCOPIE CONFOCALE DE LA CULTURE D'HUVECS SUR MATRICES DE β -TCP.....	110
	CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	113
1	APATITES SYNTHETIQUES EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE.....	114
1.1	IMPACT DE LA COMPOSITION DES MATRICES	114
1.2	IMPACT DES PROPRIETES PHYSIQUES DES MATRICES	115
2	PURETE DES MATRICES PRODUITES PAR DLP ET BIOCOMPATIBILITE :.....	117
3	UTILISATION DU DLP POUR LES APPLICATIONS D'INGENIERIE TISSULAIRE.....	118
4	UTILISATION DU PRPAC COMME INTERFACE DE CULTURE D'HUVECS SUR MATRICES DE β -TCP.....	124
	CONCLUSION.....	125
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	129
	TABLES DES ILLUSTRATIONS.....	145
1	TABLE DES FIGURES.....	145

2	TABLE DES TABLEAUX.....	148
	ANNEXES.....	149
1	LISTE DES ABREVIATIONS.....	149
2	ARTICLE PUBLIE.....	151

Introduction

Notre première vision de l'os est classiquement celle d'une matrice minérale amorphe. Toutefois, la réalité est toute autre et l'os est un tissu vivant qui joue différents rôles essentiels au sein de l'organisme. De plus, l'organisation des tissus osseux est variable au sein d'un même organisme, ainsi, on peut distinguer au niveau structurel l'os cortical et spongieux, mais également au niveau microstructurel, différentes organisations en systèmes haversiens, trabécules ou ostéons.

Les fonctions les plus évidentes du squelette, formé de l'ensemble des os du corps, sont de protéger les organes internes et de permettre la mobilité de l'organisme. Toutefois les os contribuent également à la régulation de l'équilibre phosphocalcique, en effet, 99% du calcium et 90% du phosphore de notre organisme y sont retrouvés et ils jouent un rôle prépondérant dans notre vie cellulaire. De plus, l'os joue un rôle de détoxification de l'organisme en captant les métaux lourds. Enfin, les os et plus particulièrement la moelle osseuse située dans les os spongieux sont le siège de l'hématopoïèse qui est le processus de production des cellules sanguines. Ainsi, l'os est composé d'environ à 60% d'une matrice phosphocalcique, à 35% d'une matrice protéique et à 5% de cellules.

Ces différentes fonctions impliquent une capacité de remodelage en continu de ce tissu.

Deux types cellulaires sont primordiaux dans cette alternance de phases de destruction du tissu osseux (ostéoclasie) assurée par les ostéoclastes et de croissance (ostéogenèse) ou entrent en jeu les ostéoblastes.

L'alternance des phases d'ostéogenèse et ostéoclasie vont ainsi permettre de capter ou libérer des minéraux en fonction des besoins de l'organisme, mais également de moduler l'anatomie des travées minérales des os afin de répondre aux contraintes mécaniques qui y sont appliquées, c'est le concept de mécanostat de Frost (1,2).

Enfin, les nombreux échanges de minéraux et de cellules nécessitent un métabolisme important et la vascularisation osseuse est de ce fait essentielle au maintien de l'homéostasie de cet organe. La vascularisation osseuse est assurée d'une part, par des vaisseaux présents au sein de la matrice et on parle alors de vascularisation endostée. D'autre part, le périoste qui est une membrane de tissu entourant les os, compte également une vascularisation périostée qui vient compléter la vascularisation endostée.

La plupart des processus de cicatrisation vont aboutir à un tissu fibreux, mais ce n'est pas le cas du tissu osseux qui possède une capacité de régénération qui vise à restaurer l'architecture osseuse préexistante ou l'adapter à de nouvelles contraintes mécaniques. Comme nous allons le voir, ces phénomènes de cicatrisation cellulaire impliquent alors une interaction poussée des phénomènes d'ostéogenèse et d'angiogenèse (3,4).

Une fracture est ainsi définie comme une perte de continuité osseuse. Elle va déclencher différents phénomènes qui peuvent être divisés en trois phases essentielles.

Une première phase dite inflammatoire qui se caractérise en premier lieu par la constitution d'un hématome au niveau du site de fracture. Celui-ci s'organise rapidement à partir des néo vaisseaux présents dans les tissus sains environnants. Il est ensuite envahi par des cellules du système immunitaire (polynucléaires et macrophages) chargées de la détersion (nettoyage) du site. On parle alors d'une organisation de l'hématome qui va progressivement être remplacé par un tissu conjonctif fibroblastique très vascularisé. Durant cette phase, de nombreuses molécules sont libérées afin de stimuler l'angiogenèse et le recrutement de cellules ostéoprogénitrices. On parle alors des phénomènes d'ostéoinduction.

On aboutit ainsi à la seconde phase du processus cicatriciel durant laquelle va se constituer un tissu ostéoïde. Ce tissu jeune, non minéralisé va assurer une stabilité à la fracture qui est essentielle au développement d'une néo vascularisation et aux phénomènes de minéralisation qui vont suivre. On va alors assister dans un premier temps à la transformation des tissus conjonctifs du cal en un tissu cartilagineux. C'est la stabilité du cal et le développement de la vascularisation permettant la bonne nutrition et oxygénation des tissus, qui va conduire à la transformation progressive des chondrocytes en ostéocytes.

Lors de la troisième phase de cicatrisation, le tissu ostéoïde est progressivement envahi par les cellules ostéoblastiques qui vont s'appuyer sur la trame du tissu préexistant afin de guider la minéralisation progressive de la trame osseuse et ainsi jouer un rôle d'ostéoconduction. Ces phénomènes vont aboutir à la récupération d'une continuité osseuse après un remodelage visant à complètement éliminer le cal fibreux primaire et s'adapter à l'environnement biomécanique. Ces étapes sont résumées dans la figure 1.

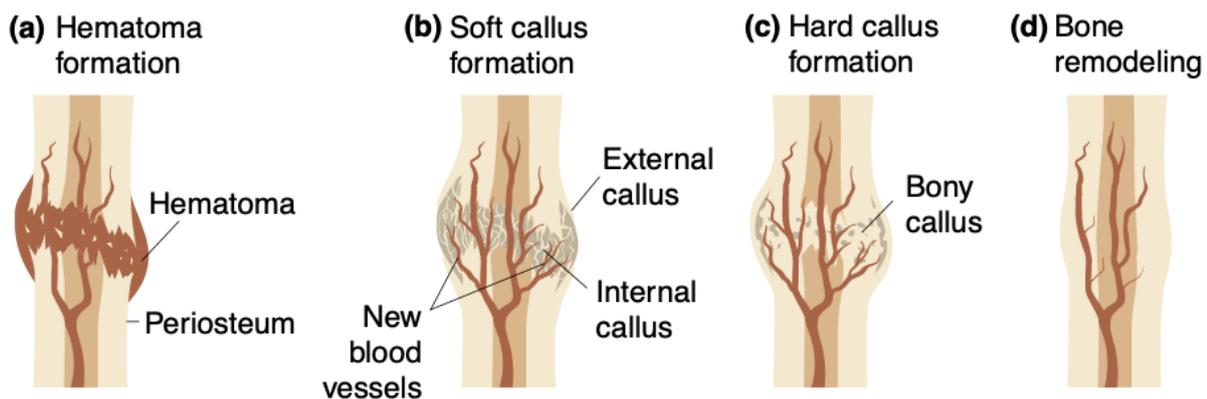


Figure 1. étapes de la cicatrisation osseuse

Carano RAD, 2003

Toutefois, dans certaines conditions, la cicatrisation osseuse ne peut être spontanément réalisée et des techniques doivent être mises en place afin de pallier cet état de fait.

Dans ce cadre, les greffes osseuses représentent plus de 2,2 millions d'actes par an et l'os est le second tissu le plus greffé après le sang. Le coût total de ces actes est évalué à plus de 2,5 milliards de dollars par an pour 500.000 actes durant les années 2010 aux États-Unis et des projections prévoient un doublement durant la décennie suivante (6). L'autogreffe osseuse est à ce jour le mètre étalon dans le cadre de ces procédures. Toutefois, en France, un rapport de la Haute Autorité de Santé (HAS) recense dans ce cadre la mise en place d'environ 43000 substituts osseux par an, dont la plupart (60%) sont d'origine synthétique (7).

Différentes techniques et approches cohabitent donc dans la prise en charge des pertes de substance osseuse.

- Greffes osseuses autologues non vascularisées
- Allogreffes et xélogreffes
- Distraction ostéogénique
- Reconstruction par lambeau libre micro anastomosé
- Biomatériaux et substituts osseux synthétiques.

La greffe autologue ou autogreffe consiste à prélever et transplanter les tissus sur un même sujet. La greffe osseuse autologue est à ce jour la technique de référence dans la reconstruction de petites pertes de substance osseuse. Cette technique présente l'avantage de ne pas induire de rejet (histocompatible), d'être ostéoinductrice et ostéoconductrice. En effet, elle transfère les différents composants de l'os, à savoir ses matrices organiques et inorganiques ainsi que son contingent cellulaire, permettant de très bons résultats cliniques pour des volumes reconstruits limités (8–12). Toutefois, elle présente également des contraintes. Premièrement, prélever des tissus nécessite la

réalisation de cicatrices et peut endommager les tissus environnants (nerfs, vaisseaux, muscle.), on parle alors de morbidité du site donneur (13,14). La quantité de tissu est par ailleurs limitée, en effet, un patient ne possède qu'un nombre limité de sites donneurs et chaque site présente des avantages et inconvénients propres en termes de morbidité, de composition et de qualité osseuse. D'un point de vue pragmatique, cette procédure nécessite durant la même intervention la réalisation du prélèvement et la greffe en elle-même ce qui impose une contrainte de temps.

Enfin, la principale limite de la greffe osseuse est l'absence de vascularisation propre du greffon. De ce fait, la réussite du geste est tributaire de la vascularisation des tissus adjacents et la greffe osseuse est sensible aux infections qui peuvent conduire à la perte du greffon (15).

La première alternative à l'autogreffe est l'allogreffe (16,17) . Dans ce cas, donneur et receveur sont deux individus distincts appartenant à la même espèce. Ces tissus proviennent alors d'une banque d'os qui regroupe des greffons prélevés chez des donneurs vivants ou décédés. Ces greffons sont par la suite traités afin d'être décellularisés et stérilisés pour réduire les phénomènes de rejet du greffon.

La xéno greffe est une seconde alternative et elle consiste à greffer des tissus issus d'une autre espèce que celle du receveur (18,19). Comme pour les allogreffes, les greffons subissent un traitement visant à réduire leur potentiel immunogène et les stériliser.

Les avantages de ces types de greffes sont multiples. Elles ne nécessitent pas d'augmentation de temps opératoire, elles éliminent la morbidité du site donneur, le volume disponible n'est pas limité et elles amènent une trame inorganique et organique qui possède des capacités d'ostéoconduction et d'ostéoinduction. Toutefois, malgré les traitements réalisés, le risque de transmission de pathologies infectieuses ne peut être complètement écarté. De plus, les risques d'échec de la procédure sont plus importants, du fait de réactions immunitaires de rejet et leurs propriétés biologiques, en particulier d'ostéoinduction sont inférieures à celles des autogreffes. C'est pourquoi, à ce jour, les allogreffes et xéno greffes ne sont qu'une alternative à la technique de référence, à savoir l'autogreffe.

En alternative aux techniques de greffes osseuses, on peut évoquer la distraction ostéogénique. Son principe est d'utiliser le processus de cicatrisation tissulaire afin de générer de nouveaux tissus. Pour cela, on va réaliser une fracture contrôlée puis appliquer progressivement une traction sur la zone de cicatrisation. Ceci va aboutir à une néoformation osseuse, mais également des tissus environnants (vaisseaux, nerfs, muqueuses). De larges pertes de substances peuvent ainsi être comblées, mais comme pour la greffe osseuse, elle nécessite une très bonne trophicité de l'os et des tissus environnants, ce qui limite ses applications. De plus, cette technique est très contraignante pour les patients, car elle nécessite le plus souvent du matériel encombrant afin de permettre une bonne stabilité du cal osseux et présente un temps de mise en œuvre assez long avec une vitesse d'activation d'environ 1mm par jour(20–22). Pour ces différentes raisons, elle ne s'est pas imposée comme la technique de référence pour la prise en charge des pertes osseuses étendues.

Nous l'avons vu, une des limites des greffes tissulaires est la nécessité de posséder un environnement sain et bien vascularisé. Toutefois, même dans ces conditions, les volumes osseux reconstructibles sont limités. Ceci est lié à la problématique de la vascularisation du greffon. En effet, l'apport en nutriment et oxygène n'est initialement réalisé que par imbibition à partir de la vascularisation contenue dans les tissus environnants. Bien entendu, l'hypoxie produite par cet état de fait déclenche la libération de molécules pro-angiogéniques qui vont induire un envahissement progressif des tissus greffés par une néo-vascularisation.

Toutefois, pour être correctement oxygénées et nourries, des cellules doivent généralement se trouver à moins de 100 µm d'un vaisseau et de ce fait ; le centre du tissu greffé peut aisément se retrouver dévascularisé pendant de nombreux jours et nécroser.

C'est pourquoi dans le cadre des vastes pertes de substance osseuses, on a recours à la technique des lambeaux libres. Celle-ci consiste à transplanter des tissus accompagnés des vaisseaux assurant leur vascularisation. Les vaisseaux sont anastomosés à des vaisseaux présents sur le site à reconstruire, ce qui assure la vascularisation complète des tissus transplantés.

Cette technique a principalement été développée au cours des années 80 et dans le champ Maxillo-Facial, c'est le lambeau libre de fibula qui est considéré comme la référence en matière de reconstructions de pertes de substances étendues (23,24). Ses avantages sont multiples. D'une part, il possède une vascularisation propre qui assure de très bonnes capacités de cicatrisation, mais également de résistance aux infections, ce qui n'est pas le cas de greffes osseuses non vascularisées. Par ailleurs, ce lambeau permet de transplanter de l'os, mais également des muscles et de la peau, permettant de prendre en charge des pertes de substance pluritissulaires. De plus, biomécaniquement, la fibula est assez proche de la mandibule et permet la mise en place de réhabilitations implantaires complexes. Enfin, le lambeau libre autologue étant une autogreffe pluritissulaire, il n'existe pas de risque de rejet lié à une réaction immunitaire.

Toutefois, comme toute technique la reconstruction par lambeau libre présente des limites et contraintes. Premièrement, comme pour les autogreffes non vascularisées, elle nécessite des interventions longues et présente un risque de morbidité des sites donneurs. Par exemple pour le lambeau de fibula, il existe une rançon cicatricielle potentiellement associée avec des douleurs qui peuvent être chroniques et une instabilité des articulations du genou et de la cheville(25–27). Par ailleurs, comme pour les autogreffes, la quantité de tissus prélevable est limitée.

C'est du fait des limites de ces techniques que ce développe depuis plus de 30 ans l'ingénierie tissulaire osseuse dont l'objectif est de rétablir ou améliorer les propriétés biologiques et mécaniques de l'os natif(28). Comme pour toute technique d'ingénierie tissulaire trois approches « classiques » sont considérées. La plus populaire est l'utilisation de matrices biologiques ou synthétiques, mais il existe également des approches cellulaires ou moléculaires qui peuvent être développées de manière indépendante ou combinée.

Une technique « idéale » d'ingénierie tissulaire osseuse présenterait les caractéristiques suivantes : propriétés biologiques d'ostéoconduction et ostéoinduction élevées, absence de rejet, absence d'infection, d'effet secondaire et de morbidité de site donneur, pas de limite de volume à reconstruire, faible coût et facilité de production.

De plus, nous l'avons vu, l'os est en perpétuel renouvellement et il est le siège de différents processus physiologiques. De ce fait, les techniques d'ingénierie tissulaire doivent prendre en compte ces éléments et à ce jour les différentes voies explorées pour répondre à ces contraintes ne permettent que des réponses partielles.

Le but de notre travail était :

- Contribuer au développement d'une alternative aux reconstructions de vastes pertes de substance osseuse par lambeau libre.
- Dans ce cadre, nous avons souhaité nous concentrer leur vascularisation propre qui est un élément fondamental expliquant la supériorité des lambeaux libres dans ces reconstructions complexes.
- Nous avons donc développé une technique de prototypage rapide de matrices phosphocalciques permettant une conformation sur mesure à macroarchitecture contrôlée.
- Nous avons travaillé à l'amélioration de la culture des cellules endothéliales sur ces matrices. Notre objectif final était d'observer l'organisation de cellules endothéliales cultivées en flux dans une matrice phosphocalcique conformée en un réseau fluide simple. C'est pourquoi nous avons développé des matrices permettant cette culture et l'observation des cellules. Enfin, nous avons travaillé au développement d'un réacteur de culture en flux permettant une variation précise et calibrée des paramètres de culture et l'enregistrement de ceux-ci afin de faciliter l'interprétation des résultats de culture.

Chapitre 1 : Étude bibliographique et contextualisation :

1 Organisation structurale, architecturale, composition et biologie osseuse :

Nous l'avons vu, l'os est un tissu biologique vivant aux nombreuses fonctions biologiques. De ce fait, c'est un tissu très dynamique qui présente des caractéristiques macroscopiques variables. En effet, notre squelette se compose de plus de 206 os qui remplissent des fonctions très différentes. Nous allons ainsi décrire des os longs (tibia, ...), courts (phalanges, ...), ou plats (sternum, ...). D'un point de vue biologique, il s'agit d'un tissu conjonctif fortement minéralisé. Sa matrice organique est majoritairement composée (~ 90%) de glycoprotéines de collagène et plus particulièrement de collagène de type I. Du fait de leurs propriétés physico-chimiques, ces glycoprotéines vont s'organiser de manière tridimensionnelle, elles vont être associées à d'autres molécules sécrétées par les ostéoblastes et ainsi constituer un tissu ostéoïde qui servira de support au dépôt de la matrice minérale. Le reste de la matrice organique osseuse va se composer d'une part de protéines spécifiques telles que l'ostéocalcine, d'autre part, de facteurs de croissance qui vont contribuer à l'homéostasie du tissu et enfin de protéines plasmatiques non spécifiques.

1.1 Structure

L'os va présenter des structures de morphologie différente en fonction de son degré de maturation et des contraintes qui lui sont appliquées.

Du fait de leur organisation spatiale différente, on va distinguer l'os lamellaire et fibrillaire.

1.1.1 Os fibrillaire

L'os fibrillaire est un os immature (primaire) caractéristique de l'os fœtal. Il présente une trame collagénique désordonnée dont la synthèse est rapide et qui présente une importante concentration d'ostéocytes, mais une faible minéralisation. C'est le seul os dont la synthèse peut être réalisée sans matrice préalable. On le retrouve également lors de processus pathologiques tels que les pseudarthroses, tumeurs ostéogéniques, ...

Lors de sa maturation, cet os sera progressivement remplacé par un lamellaire mature.

1.1.2 Os lamellaire

L'os lamellaire ou mature nécessite du temps pour sa mise en place. Il présente une organisation régulière constituée de lamelles parallèles de 3 à 7 microns d'épaisseur qui renferment des ostéocytes. Il va constituer à la fois l'os cortical et spongieux.

1.2 Architecture

Les tissus osseux vont principalement présenter 2 formes macroscopiques principales qui sont d'une part, un os cortical et d'autre part un os spongieux.

1.2.1 Os cortical :

Constitué d'ostéons faits de lamelles osseuses cylindriques disposées de manière concentrique autour d'un canal de Havers. Ces derniers vont contenir des vaisseaux sanguins, vaisseaux lymphatiques et filets nerveux entourés de tissu conjonctif. Ces canaux de Havers sont orientés dans le grand axe de l'os cortical, mais sont reliés entre eux, avec la surface de l'os et la cavité médullaire par les canaux de Volkmann à l'orientation perpendiculaire ou oblique des canaux Haversiens. Entre les lamelles osseuses des ostéons, on va retrouver des logettes ou ostéoplastes qui contiennent des ostéocytes. Ces Ostéoplastes sont reliées entre elles par des canalicules qui permettent une communication entre ostéocytes.

L'os cortical présente ainsi une haute résistance mécanique du fait d'une densité élevée et une faible porosité comprise entre 5 et 30% et de pores de 100 à 300 μm de diamètre. La figure 2 présente un schéma de l'organisation et de la vascularisation de l'os cortical

1.2.2 Os spongieux :

Il est principalement retrouvé dans les os plats, courts et dans les épiphyses des os longs.

Il s'agit également d'un os lamellaire, mais à l'organisation architecturale différente de l'os cortical. Dans ce cas, on décrit des trabécules de tissu lamellaire ramifiées qui constituent un labyrinthe de cavités interconnectées occupées par la moelle osseuse et la vascularisation endostée.

Cela se traduit par une porosité élevée de l'ordre de 30 à 90% avec des diamètres de pores de l'ordre de 200 à 600 μm de diamètre.

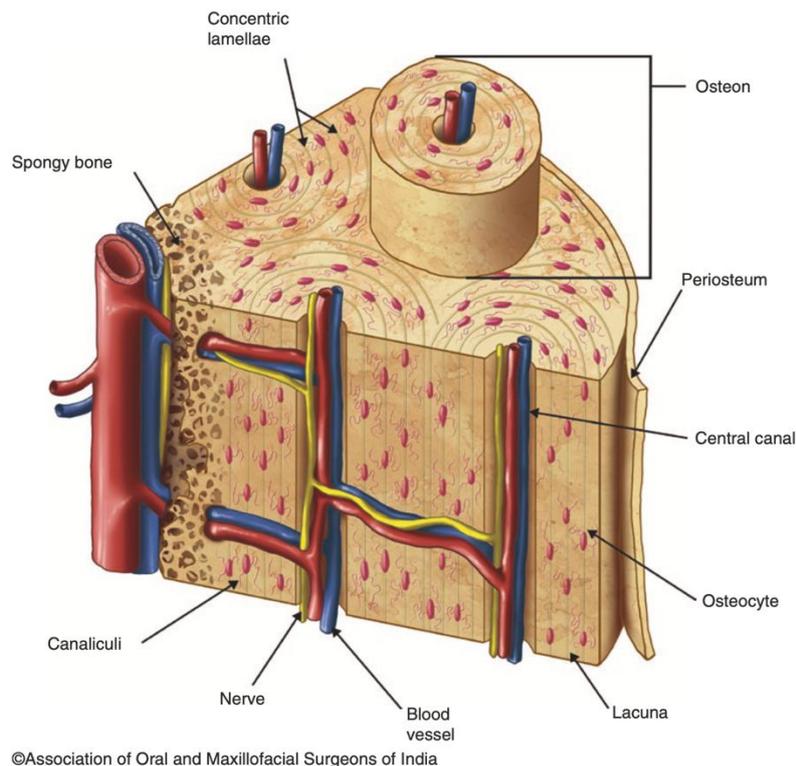


Figure 2. Organisation de l'os cortical

Kumar V, 2021

1.3 Composition

1.3.1 Cellules :

1.3.1.1 Ostéoblastes :

Le terme d'ostéoblastes regroupe des cellules issues d'une même lignée de cellules mésenchymateuses, mais exerçant des fonctions variées (30). Les cellules souches mésenchymateuses sont présentes dans la moelle osseuse de même que les cellules souches hématopoïétiques et sont à l'origine en plus de la lignée ostéoblastique, de la lignée chondroblastique, mais également des lignées fibroblastiques, adipocytaires et endothéliales.

On distingue ainsi un premier type d'ostéoblaste qui est l'ostéoblaste mature. Il est de forme cubique et son cytoplasme comporte de nombreux organites tels que des mitochondries, appareil de Golgi ou réticulum endoplasmique. Ces derniers contribuent à la principale activité de l'ostéoblaste mature qui est la synthèse de la matrice extracellulaire puis sa minéralisation. Au sein de cette matrice on observe principalement du collagène de type I, mais également des phosphoprotéines, glycoprotéines, ou protéines non collagéniques.

Les ostéocytes constituent le second groupe cellulaire. Il s'agit d'ostéoblastes matures qui se sont laissés emmurer dans la matrice minéralisée. Une fois emmurés, ils vont progressivement s'effiler et devenir fusiformes avec un noyau central condensé. L'ostéocyte est contenu au sein d'une logette appelée ostéoplaste. Ces différentes logettes sont reliées entre elles par des canalicules qui permettent des échanges entre ostéocytes et avec les tissus environnants. Ces cellules jouent un rôle central dans l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme et jouent le rôle de mécano transducteurs qui vont réguler le remodelage osseux en réponse à des contraintes mécaniques.

Enfin les cellules bordantes représentent un dernier type cellulaire. Il s'agit d'ostéoblastes qui entrent en phase quiescente et modifient leur architecture. Ils s'aplatissent progressivement et forment une couche de revêtement sur les surfaces osseuses provisoirement non soumises à des remaniements. Ces cellules communiquent avec les ostéocytes par le biais des canalicules. En cas de stimuli, ces cellules bordantes pourraient être réactivées en ostéoblastes actifs. Ces cellules guideraient l'activité de remodelage osseux ostéoclastique en libérant des substances reconnues par les précurseurs ostéoclastiques.

1.3.1.2 Ostéoclastes :

Contrairement à la lignée ostéoblastique, la lignée ostéoclastique dérive de la lignée hématopoïétique. Ces précurseurs sont libérés dans le flux sanguin où ils forment des précurseurs circulants apparentés à la lignée monocytaire. Par la suite, en réintégrant la moelle osseuse et au contact de cellules stromales pré-ostéoblastiques, ces cellules pré-ostéoclastiques vont se différencier. Durant ce processus, les pré-ostéoblastes vont confluer et fusionner afin de former des cellules ostéoclastiques matures multinucléées et polarisées. Ces cellules vont ainsi être caractérisées par leur aspect multinucléé, mais également du fait de leur taille très importante avec un diamètre moyen de 100 μm . La polarisation de ces cellules est importante, car à leur pôle basal, on décrit la bordure en brosse qui est une structure au contact de laquelle va s'effectuer la résorption de la matrice osseuse. Enfin le cytoplasme de ces ostéoclastes matures se caractérise par des lysosomes contenant de multiples enzymes telles que phosphatase acide, cathepsine, collagénases et métalloprotéinases, qui vont contribuer à son rôle de résorption de la matrice osseuse.

1.3.1.3 Matrice osseuse :

La matrice extracellulaire osseuse est constituée principalement d'une matrice inorganique minéralisée, mais contient également une fraction organique dont le collagène de type I est la protéine la plus représentée. C'est l'ostéoblaste qui joue un rôle central dans la synthèse et la minéralisation de cette matrice.

1.3.1.4 Matrice inorganique minéralisée :

La fraction minérale de la matrice osseuse représente environ 70% de cette dernière. Elle est, elle-même très majoritairement composée de cristaux d'hydroxyapatite de calcium.

Sa formation va nécessiter une concentration minérale adéquate et la présence de sites de nucléations situés sur les fibres de collagène de type I, où se forment les cristaux d'hydroxyapatite (HA) $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$. Ces apatites biologiques présentent une importante capacité de substitutions chimiques qui vont avoir un impact sur leurs propriétés physico-chimiques de déformabilité, résistance ou solubilité. Ainsi, ces apatites peuvent contenir différents minéraux tels que groupement carbonate (CO_3^{2-}), magnésium (Mg), sodium (Na), potassium (K,) silicium (Si), chlore (Cl) ou fluor (F) qui vont conférer à la matrice des propriétés variables.

De même cette matrice est en perpétuel renouvellement et sa composition peut varier, car un de ses rôles est la capacité de captation de métaux lourds nocifs pour l'organisme.

1.3.1.5 Matrice organique :

La matrice organique peut également être divisée en protéines collagéniques, qui sont largement majoritaires (90%) et en protéines non collagéniques.

1.3.1.5.1 Protéines collagéniques

La matrice organique osseuse est principalement constituée de collagène de type I, mais d'autres sous-types sont représentés tels que les collagènes II, IV et V. Le collagène de type I est essentiel à la minéralisation de la matrice, car il contient les sites de nucléations où vont se développer les cristaux d'hydroxyapatite. Le collagène de type I est une glycoprotéine fibrillaire assemblée sous forme de triple hélice. Au sein de l'os, ces fibrilles de collagène présentent une organisation tridimensionnelle en couches de fibrilles parallèles en elles et perpendiculaires aux fibrilles des couches sus et sous-jacentes.

1.3.1.5.2 Protéines non collagéniques :

Elles sont très minoritaires dans la matrice osseuse. Les plus fréquentes sont spécifiques de la matrice osseuse, telle que l'ostéocalcine qui est sécrétée par les ostéoblastes et dont le dosage dans le sang circulant permet de mettre en évidence la formation osseuse.

On met également en évidence au sein de la matrice des facteurs de croissance tels des Insulin-like Growth-Factors (IGFs) ou Transforming Growth-Factor beta ($\text{TGF}\beta$) qui vont participer à l'homéostasie du tissu osseux. Enfin, on retrouve des protéines plasmatiques non spécifiques synthétisées par d'autres organes et qui peuvent s'accumuler dans la matrice organique osseuse.

1.4 Processus d'ossification

1.4.1 Ossification primaire :

C'est la première phase de l'ossification. Elle va consister en la mise en place des ébauches osseuses lors de la vie embryonnaire et fœtale. Elle nécessite des contraintes mécaniques faibles. Le tissu osseux formé est provisoire et sera remplacé lors de l'ossification secondaire.

On distingue deux types d'ossification primaire en fonction des origines embryologiques des tissus.

1.4.1.1 Ossification enchondrale :

Cette ossification concerne la majorité du squelette en formation et en particulier les os longs ou la base du crâne. L'ossification enchondrale comme son nom l'indique se caractérise par le développement d'un tissu osseux sur la base d'une matrice cartilagineuse préexistante.

Du fait de stimulations moléculaires, des cellules mésenchymateuses vont tout d'abord migrer et se condenser avant de se différencier en cellules de la lignée chondrocytaire. Les chondrocytes vont progressivement s'hypertrophier et sécréter une matrice riche en collagène qui va faiblement se calcifier et formera l'ébauche des futures structures osseuses.

Une seconde phase d'ossification enchondrale proprement dite va alors se dérouler. L'ébauche cartilagineuse va être envahie par une néo-vascularisation. Ceci va aboutir à l'apoptose des chondrocytes présents dans la matrice. En parallèle, la vascularisation va amener des chondroblastes qui vont résorber la matrice et des cellules mésenchymateuses qui vont se différencier en ostéoblastes. Ces phénomènes aboutissent à un remplacement progressif de la matrice cartilagineuse par une matrice osseuse, en particulier au niveau de la diaphyse (partie centrale de l'os). Au niveau des épiphyses (extrémités), une ossification va également se produire avec une couche cartilagineuse qui va persister et former le cartilage articulaire. Enfin, les chondrocytes ne sont pas tous remplacés et forment des cartilages de conjugaison à proximité des épiphyses qui vont être des centres de croissance osseuse permettant l'allongement progressif de l'os jusqu'à la fin de l'adolescence (figure 3).

A Endochondral ossification (LONG BONES)

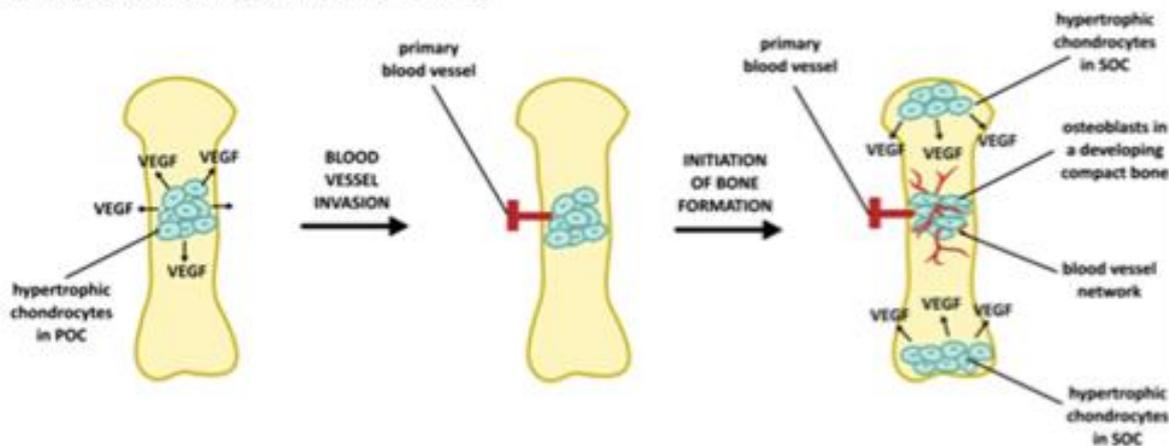


Figure 3. Etapes de l'ossification enchondrale

Filipowska J,2017

1.4.1.2 Ossification membraneuse :

Cette ossification concerne en particulier les os plats, dont ceux de la voûte crânienne et la majorité des os de la face. Elle se caractérise par la métaplasie directe d'un tissu conjonctif en tissu osseux. Ainsi, du fait de stimulations moléculaires, comme lors de l'ossification enchondrale, des cellules mésenchymateuses vont migrer et se condenser. Elles vont par la suite se différencier en ostéoblastes dans le cadre de l'ossification membraneuse. Ces ostéoblastes vont sécréter une matrice extracellulaire riche en fibres collagènes et non minéralisée qui est appelée matrice ostéoïde. Par la suite, cette matrice se minéralise progressivement pour devenir une matrice osseuse (figure 4).

B Intramembraneous ossification (FLAT BONES)

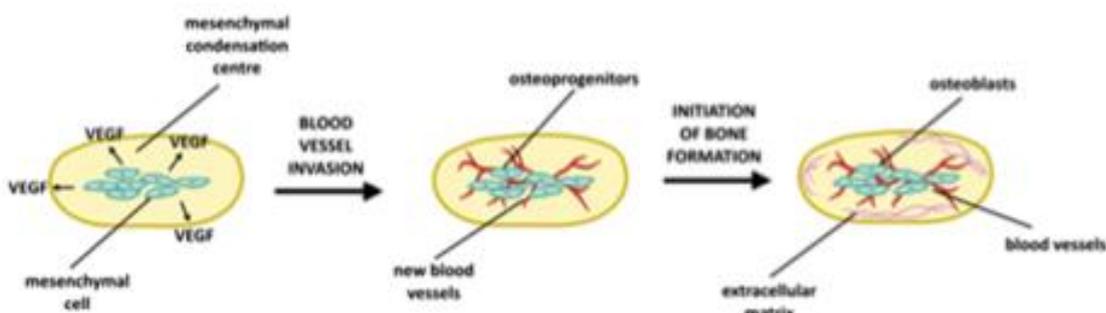


Figure 4. Etapes de l'ossification membraneuse

Filipowska J,2017

1.4.2 Ossification secondaire :

Lors de ce processus, l'os fibrillaire faiblement organisé va être résorbé et remplacé par un os lamellaire mature. Ces phénomènes vont aboutir progressivement à la formation des os spongieux et corticaux typiques de l'anatomie des os matures.

1.4.3 Ossification tertiaire :

L'ossification tertiaire correspond au remodelage permanent de l'os et lui confère sa capacité d'adaptation. Les Os corticaux et spongieux sont tous les deux concernés par ce processus de remaniement constant. Bien entendu, comme tout phénomène physiologique, le renouvellement osseux va connaître de degrés d'activité variables au cours la vie et sera régulé par de nombreux facteurs locaux ou systémiques.

Les phases de résorption et formation osseuse ne peuvent être séparées et sont interdépendantes. Elles sont basées sur les interactions étroites entre ostéoblastes et ostéoclastes au sein d'unités fonctionnelles de remodelage. Ces unités morphologiques sont indépendantes entre elles et sont caractérisées par la succession dans le temps et l'espace d'une activité de résorption et de formation. Dans des conditions physiologiques, l'alternance des phases de stabilité de la matrice, de résorption et de formation reste constante, assurant l'homéostasie du tissu. C'est la coordination spatiale et temporelle au sein de chaque unité entre ostéoblastes et ostéoclastes qui garantit le déroulement physiologique du processus. Du fait de la plus grande surface de contact de l'os spongieux avec la moelle osseuse en comparaison avec l'os cortical, on estime qu'environ 25% de celui-ci est renouvelé chaque année pour environ 5% de l'os cortical. Le renouvellement osseux va donc se caractériser par la succession de différentes phases et un cycle complet prend en moyenne 3 à 4 mois (32). Ces étapes sont résumées dans le schéma de la figure 5.

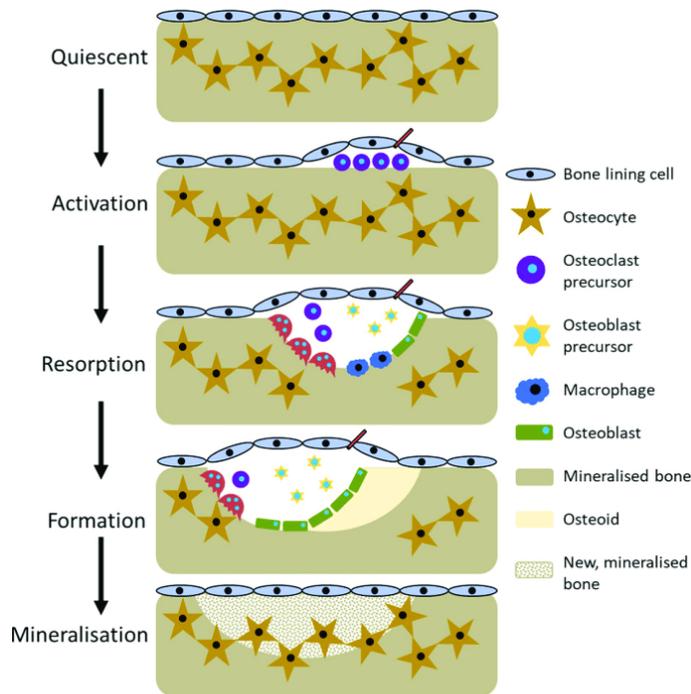


Figure 5. Etapes du remodelage osseux

Siddiqui JA,2016

1.4.4 Remodelage osseux :

1.4.4.1 Activation :

Elle succède à une phase de quiescence et se caractérise par la conversion d'une surface osseuse inactive en surface active.

L'activation est initiée par le recrutement d'ostéoclastes qui vont être attirés sur les surfaces à résorber par des phénomènes de chimiotactisme provoqués par des facteurs ostéorésorbants tels que l'hormone parathyroïdienne (PTH), la vitamine D3 ou encore la prostaglandine Pg E2. Afin de permettre l'accès et la fixation à la surface osseuse aux ostéoclastes, les cellules bordantes allongées en phase quiescente vont quant' à elles se détacher de la matrice minérale et contribuer à délimiter le compartiment de remodelage osseux qu'elles isolent des néovaisseaux développés lors de la phase d'activation et de résorption. Ce compartiment de remodelage est un site dont l'environnement contrôlé va permettre le bon déroulement du remodelage osseux. Il sert d'interface entre le processus de remodelage et la microvascularisation osseuse essentielle au déroulement du processus en permettant l'apport de facteurs régulant le processus tels que la PTH, les œstrogènes ou la vitamine D. Par ailleurs, en isolant ostéoblastes et ostéoclastes du reste de l'environnement, il optimise leurs interactions. De plus, les cellules constituant sa barrière présentent un phénotype proche des ostéoblastes qui leur

permettrait de « recruter » des ostéoclastes circulant au sein de la microvascularisation osseuse au contact du compartiment de remodelage. C'est pourquoi, en cas d'altération de sa barrière cellulaire, on observe l'apparition d'altération du tissu osseux régénéré.

L'afflux des ostéoclastes est favorisé par la stimulation de leurs précurseurs par des molécules telles que le *Macrophage Stimulating Colony Factor* (M-CSF) sécrété par les ostéoblastes en réponse à leur stimulation par la vitamine D3 ou encore la PTH. De même, la différenciation de ces précurseurs en cellules matures dépendra de l'interaction de molécules telles que l'*Osteoclast Differentiating Factor* (ODF), l'*Ostéoprotégérine* (OPG) le *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B* (RANK). Ainsi, l'OPG peut soit se lier à ODF qui est situé sur la membrane cellulaire des ostéoblastes et inhiber la différenciation ostéoclastique ou l'ODF peut se fixer à RANK qui est situé sur la membrane des précurseurs ostéoclastiques et activer leur différenciation.

1.4.4.2 Résorption :

Durant cette phase qui dure une dizaine de jours, les ostéoclastes sont fixés sur la matrice à résorber par leur pôle inférieur. On va alors décrire au niveau des ostéoclastes la formation d'un anneau périphérique de scellage qui va permettre la constitution d'une chambre de résorption étanche entre le pôle basal de l'ostéoclaste et la matrice osseuse minéralisée. Une fois une zone de matrice résorbée, l'ostéoclaste va se déplacer et recommencer son activité sur un site adjacent jusqu'à la phase d'inversion.

Deux étapes de résorptions successives vont se réaliser au niveau de cette zone de résorption.

1.4.4.2.1 Dissolution des minéraux de la matrice :

La bordure en brosse située à l'apex de la chambre de résorption (et au pôle basal de l'ostéoclaste) va sécréter à l'aide d'une pompe à proton des ions H⁺ qui vont contribuer à l'acidification de la chambre et dissoudre la phase minérale de la matrice osseuse exposée au niveau de la chambre de résorption.

1.4.4.2.2 Dégradation de la matrice organique :

C'est également au niveau de la bordure en brosse que vont s'ouvrir les lysosomes contenus dans le cytoplasme des ostéoclastes. Ceux-ci vont libérer dans la chambre de résorption des enzymes telles que des phosphatases acide, cathepsine, collagénases et métalloprotéinases qui vont permettre la digestion de la matrice osseuse organique. Ces processus entraînent l'apparition d'une lacune osseuse.

1.4.4.3 Inversion :

Cette phase correspond à la fin de la formation d'une lacune osseuse par une unité fonctionnelle de remodelage. On observe alors l'entrée en apoptose des ostéoclastes qui vont être remplacés par des macrophages qui vont éliminer les résidus de la résorption matricielle et participer à la création d'une ligne cimentante qui va distinguer la matrice préexistante et celle qui va être nouvellement formée. Lors de cette phase, les cellules délimitant le compartiment de remodelage du compartiment interagiraient avec les ostéocytes contenus dans la matrice osseuse sous-jacente. Sous l'action de ces dernières à travers des « gaps jonctions », les cellules du compartiment de remodelage relâcheraient des molécules telles *l'insulin growth factor* (IGF) ou des prostaglandines qui contribueraient à la maturation des ostéoblastes et la synthèse d'une nouvelle matrice.

1.4.4.4 Formation :

C'est la phase la plus longue du renouvellement osseux et qui s'étend sur environ 3 mois. Elle va elle-même comporter deux phases distinctes qui vont être dans un premier temps la synthèse d'une matrice organique par les ostéoblastes avant la minéralisation de celle-ci.

1.4.4.4.1 Synthèse de la matrice organique

Une fois la phase d'inversion achevée, des ostéoblastes de différentes origines, peuvent être « recrutés ». D'une part, les cellules bordantes situées au niveau de la ligne cimentante vont se multiplier et se transformer en ostéoblastes matures, en parallèle des ostéoblastes circulant sont déposés à l'aide de la vascularisation capillaire développée au contact du compartiment de remodelage osseux et enfin des péricytes originaires de la paroi des capillaires peuvent se différencier en ostéoblastes matures. Ces ostéoblastes matures vont synthétiser une nouvelle matrice extracellulaire non minéralisée qui va aboutir au comblement de la lacune osseuse par un tissu ostéoïde.

1.4.4.4.2 Minéralisation

La matrice organique va par la suite connaître une minéralisation progressive sur les sites de nucléation des fibres de collagène. Durant cette phase de minéralisation, les ostéoblastes contrôlent les niveaux de calcium et de phosphate dans la matrice extracellulaire en régulant les canaux ioniques, les pompes et les échanges membranaires. Ils sécrètent également des enzymes comme la phosphatase alcaline, qui hydrolyse les esters de phosphate, augmentant ainsi la concentration locale de phosphate inorganique. Une fois que les niveaux de calcium et de phosphate sont suffisants, la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) commence. Ce processus est favorisé par les protéines de liaison du calcium et du phosphate sécrétées par les ostéoblastes, qui fournissent des sites de

nucléation pour les cristaux. Enfin, les cristaux d'hydroxyapatite croissent progressivement pour former des structures bien organisées. Les ostéoblastes continuent à réguler l'équilibre entre la formation et la résorption des cristaux en sécrétant diverses enzymes et facteurs de croissance.

2 Physiologie vasculaire et vascularisation osseuse

2.1 Structure

Le réseau vasculaire est l'organe de la circulation sanguine et permet ainsi l'oxygénation et la nutrition des différents organes. Il est tributaire de l'organe cardiaque avec lequel il fonctionne en équilibre. On estime la longueur totale de ce réseau à plus de 50 kilomètres, dont la plupart (90%), est dévolu à la microvascularisation. Différentes organisations vont être rencontrées successivement au sein des arborisations vasculaires et ainsi, on va distinguer artères, artérioles, capillaires, veinules et veines. Ces différents vaisseaux vont toutefois comporter une organisation commune en trois tuniques :

- La tunique interne ou Intima se compose de cellules endothéliales jointives qui tapissent la paroi interne des vaisseaux.
- La tunique intermédiaire ou Media est quant à elle composée de fibres élastiques et musculaires
- La tunique externe ou Adventice est enfin composée d'une matrice fibreuse riche en collagène

2.2 Morphologie

2.2.1 Artères et artérioles :

À l'exception des artères pulmonaires et placentaires, dont le rôle est de transporter un sang oxygéné et des nutriments aux tissus. Le système artériel est décrit comme à haute pression en lien avec l'éjection sanguine ventriculaire. On distingue différents types d'artères en fonction de leurs architectures.

2.2.1.1 Artères élastiques :

Leur media est riche en tissu fibroélastique. Elles se situent principalement à proximité du cœur et sont de gros calibres (Aorte, ...).

2.2.1.2 Artères musculaires :

Elles sont plus fines (0,5 à 2mm) et périphériques. Elles sont pauvres en fibres élastiques qui forment des limitantes interne et externe qui séparent la media de l'intima et de l'adventice. Leur media se caractérise par une forte densité de fibres musculaires lisses réparties en 3 à 10 couches et permet aux artères musculaires de répondre à des stimuli et adapter leurs calibres.

2.2.1.3 Artérioles :

Elles jouent un rôle de transition entre artères musculaires et réseau vasculaire. Elles se caractérisent par une disparition progressive des limitantes et de la couche adventitielle.

2.2.1.4 Capillaires :

Les capillaires sont des vaisseaux fins (5 à 15 μm). Ils sont organisés en structures arborescentes au sein des tissus qui vont relier artérioles et veinules et ainsi boucler le réseau vasculaire. Ils représentent la majorité du réseau vasculaire (90%). C'est à leur niveau que vont se réaliser les échanges gazeux, des nutriments et déchets, mais également la diapédèse qui est le passage de leucocyte du système vasculaire aux tissus environnants. L'architecture des capillaires se caractérise par la présence de cellules endothéliales aplaties et présente une lame basale ou se situent des péricytes. Elle se caractérise également par l'absence de couche médiale et adventitielle.

Cette architecture est toutefois variable et amène à décrire trois types de capillaires.

2.2.1.4.1 Capillaires continus

Comme leur nom le signifie, ils sont constitués d'un endothélium continu dans lequel les cellules endothéliales sont organisées de manière jointive. Ce type de capillaires se retrouve par exemple au niveau des tissus pulmonaires et musculaires.

2.2.1.4.2 Capillaires fenestrés

Ils se caractérisent par la présence de micropores (100nm) permettant les échanges liquidiens. Ils sont présents dans les tissus nécessitant des échanges moléculaires intensifs tels que les intestins, les glandes endocrines ou les reins

2.2.1.4.3 Capillaires sinusoïdes

Ils se rapprochent des capillaires fenestrés, mais présentent un calibre et une porosité bien plus importante. On décrit dans ces capillaires des pores (jusqu'à 3 μm) qui facilitent les échanges macromoléculaires. Ils sont retrouvés en particulier dans les os et la moelle osseuse, la rate ou le foie.

2.2.2 Veines et veinules :

Les veines et veinules à l'exception des veines pulmonaires et placentaires vont permettre d'évacuer des tissus le sang pauvre en oxygène et les déchets métaboliques qui sont ramenés vers le cœur.

Contrairement au système artériel, il s'agit d'un compartiment à basse pression qui correspond environ à deux tiers de la volémie sanguine totale de l'organisme. Ce système veineux joue de ce fait un rôle essentiel dans la régulation de la volémie et ceci grâce à la capacité de distensibilité et contractibilité des veines.

Comme pour les artères, les veines présentent une organisation de leurs parois en trois feuillets d'intima, media et adventice. Toutefois, les veines présentent des calibres supérieurs aux artères et des parois bien plus avec une media présentant des composantes musculaires et élastiques peu présentes et une adventice plus développée. Différentes organisations architecturales sont également décrites

2.2.2.1 Veinules :

Elles font suite au réseau capillaire. Leur paroi est constituée de cellules endothéliales empilées sur un minimum de trois couches et reposant sur des tissus conjonctifs. Des veinules d'un calibre de plus de 45 µm peuvent présenter quelques cellules musculaires lisses au sein de leur média, mais sans présenter d'organisation fonctionnelle concentrique telle qu'on la décrit dans les artérioles.

2.2.2.2 Veines propulsives/ musculaires :

Anatomiquement, ces veines sont présentes dans les tissus situés sous le plan cardiaque et doivent donc assurer un retour sanguin contre la pesanteur. La propulsion de la masse sanguine va principalement être assurée par les contractions des masses musculaires entourant les veines, et un système de valvules est présent au sein des veines afin d'éviter les reflux sanguins entre deux phases de contractions musculaires. On va donc décrire dans ces veines la présence de valvules qui sont des replis de l'intima. La media présente quant à elle des fibres musculaires lisses distantes et noyées au sein d'un tissu conjonctif. L'adventice est quant à elle très développée, mais son tissu conjonctif est mal défini et fusionne avec celui des tissus environnants.

2.2.2.3 Veines réceptrices :

Il s'agit des veines situées au-dessus du plan cardiaque et le retour du sang veineux est alors principalement assuré par la pesanteur. La media et l'adventice de ces veines sont particulièrement fines et peu pourvues en fibres musculaires.

2.3 Composition

2.3.1 Cellule endothéliale et endothélium :

Les cellules endothéliales sont des cellules hautement spécialisées qui forment la paroi interne des vaisseaux et la surface totale qu'elles recouvrent au sein de l'organisme est évaluée à environ 6500 mètres carrés.

Elles sont issues principalement de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) qui eux même, dérivent d'hémangioblastes situés dans la moelle et qui sont également à l'origine des cellules de la lignée hématopoïétique. Toutefois, d'autres cellules progénitrices des PEC ont été mises en évidence et en particulier des *multipotent adult progenitor cells* (MAPC), qui peuvent se différencier en cellules endothéliales et musculaires lisses et qui sont également localisées au niveau médullaire. Anatomiquement, les cellules endothéliales adultes se présentent sous la forme de cellules aplaties et allongées et leur grand axe est orienté de manière parallèle au sens d'écoulement du flux sanguin. Elles sont également polarisées, leur pôle supérieur étant en contact avec la lumière du vaisseau et leur pôle basal en contact avec une lame basale de matrice extracellulaire riche en collagène. Dans la majorité des cas, elles se présentent sous la forme de cellules losangiques allongées. Toutefois, au plus le cisaillement auquel elles sont soumises est important, au plus elles présentent un caractère allongé. Il est également à noter que dans les capillaires les plus fins elles peuvent prendre une forme tubulaire.

L'endothélium qu'elles forment joue de nombreux rôles, le plus évident étant de permettre l'écoulement du flux sanguin et le contrôle des échanges moléculaires entre le sang et les tissus. De ce fait, il joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation tissulaire et l'immunosurveillance en permettant la circulation des cellules et molécules entre flux sanguins et tissus. Il va également pouvoir jouer un rôle sur la vasomotricité en relarguant sous l'effet de stimuli du monoxyde d'azote (NO) qui va entraîner la relaxation des cellules musculaires de la media et ainsi une vasodilatation. L'endothélium joue également un rôle de régulateur de la coagulation. En effet, le maintien de son intégrité permet d'éviter l'exposition de la lame basale qui elle présente des facteurs favorisant l'agrégation de thrombocytes et ainsi la formation de thrombus vasculaires.

2.3.2 Péricytes :

Les péricytes sont des cellules peu différenciées décrites au niveau de la membrane basale des capillaires. Ces cellules sont capables de contribuer à l'ostéogenèse. En effet, elles présentent la capacité de se différencier en adipocytes et fibroblastes, mais plus particulièrement en chondroblastes et ostéoblastes. On les distingue aisément des cellules endothéliales du fait de leurs noyaux plus

volumineux et de leurs extensions cytoplasmiques qui s'enroulent autour des capillaires. Ils possèdent également des extensions qui leur permettent d'entrer en contact et de communiquer avec les cellules endothéliales qu'ils entourent. Leurs origines embryologiques sont multiples et ils dérivent soit de mésoderme, soit de l'ectoderme. Leurs rôles au niveau des capillaires seraient complémentaires de ceux des cellules endothéliales. En premier lieu, ils seraient capables d'une activité contractile qui leur permettrait de réguler le calibre des capillaires et ainsi modifier la pression et le débit du flux sanguin à ce niveau. Ils joueraient également un rôle dans la régulation des échanges entre le flux sanguin et les tissus environnants, en particulier ils seraient primordiaux au bon fonctionnement de la barrière hématoencéphalique. De même lors des phénomènes d'angiogenèse, les péricytes vont migrer et entraîner une invagination des cellules endothéliales et une prolifération des celles-ci, ce qui va aboutir à la création d'un nouveau capillaire. Enfin, lors des phénomènes de cicatrisation tissulaires, les péricytes vont être capables de se séparer des capillaires et de se différencier. En particulier dans les phénomènes de cicatrisation osseuse, ils vont contribuer à la synthèse de matrice extracellulaire et à la formation du tissu ostéoïde.

2.4 Biologie

2.4.1 Angiogenèse :

L'angiogenèse est le processus de création de nouveaux vaisseaux depuis un réseau préexistant et qui a pour but d'apporter oxygène et nutriments aux tissus (figure 6). Celle-ci est principalement observée durant la vie embryonnaire, mais également lors de phénomènes physiologiques (formation du placenta, croissance de l'organisme, cycles menstruels ou phénomène de cicatrisation) ou pathologiques (développement tumoral) chez l'adulte. Elle doit être distinguée de la vasculogenèse qui consiste dans le développement de vaisseaux « *de novo* » à partir de précurseurs cellulaires. Un des principaux stimuli à l'initiation de l'angiogenèse est l'hypoxie tissulaire qui va entraîner la production de facteur pro-angiogéniques dans les tissus concernés.

Lors de ce processus, les cellules endothéliales, qui sont dans leur écrasante majorité quiescente, peuvent être réactivées et acquérir un phénotype angiogénique. En effet, un équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques va être rompu et orienter les cellules endothéliales vers un phénotype angiogénique. De nombreuses molécules sont impliquées dans cet équilibre et les principaux facteurs pro-angiogéniques sont la famille des *vascular epithelial growth factor* (VEGF), qui vont jouer un rôle essentiel dans l'activation cellulaire en s'appuyant sur d'autres molécules telles que *l'angiopoïétine 2* (ANG-2). En parallèle, d'autres molécules vont contribuer à la stabilité de l'architecture endothéliale et parmi celles-ci on citera le *platelet derived growth factor* (PDGF), le *transforming growth factor beta* (TGF- β), la *bone morphogenetic protein 9* (BMP-9), le *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) et *l'angiopoïétine 1* (ANG-1).

Ces différentes molécules vont se succéder lors de l'angiogenèse afin de permettre le déroulement physiologique du processus.

2.4.1.1 Sélection et activation :

Durant cette première phase, on va tout d'abord noter un décollement des péricytes et une désorganisation de la membrane basale de l'endothélium. En parallèle les molécules pro-angiogéniques vont conduire à une activation des cellules endothéliales. Deux typologies cellulaires vont alors apparaître. D'une part des cellules dites « de front » qui vont guider la croissance du néovaisseau et d'autre part des cellules « de soutien » qui vont permettre son allongement progressif. Durant cette phase, c'est le VEGF et ses différents récepteurs qui semblent jouer un rôle fondamental en association avec l'ANG-2 dans l'activation cellulaire et la dissociation des jonctions entre cellules endothéliales.

2.4.1.2 Migration et prolifération :

Une fois la membrane basale rendue plus perméable, les cellules de front vont proliférer et présenter une modification morphologique importante qui est l'apparition d'extensions cytoplasmiques appelées filopodes. Les cellules de soutien quant à elles vont principalement proliférer et permettre ainsi la croissance du bourgeon vasculaire.

2.4.1.3 Fusion et formation de la lumière :

Lorsque les cellules de front de deux néovaisseaux vont rentrer en contact, on va assister à une fusion de ceux-ci et la formation d'un vaisseau. Après cette fusion, on va assister à la création d'une lumière au sein du néovaisseau qui est le phénomène de tubulogenèse.

2.4.1.4 Maturation et retour à la quiescence :

Le vaisseau n'est toutefois pas encore fonctionnel. Pour cela, les cellules endothéliales vont devoir se réorganiser et recréer des jonctions entre elles. En parallèle, une membrane basale va être synthétisée et des péricytes ainsi que des cellules musculaires lisses, être recrutés afin de donner une stabilité architecturale fonctionnelle au vaisseau, permettant l'écoulement d'un flux sanguin et le rétablissement d'une barrière endothéliale. Lors de cette phase de maturation, vont principalement être impliqués les facteurs de croissance proangiogéniques : PDGF, TGF-, ANG1 et BMP-9.

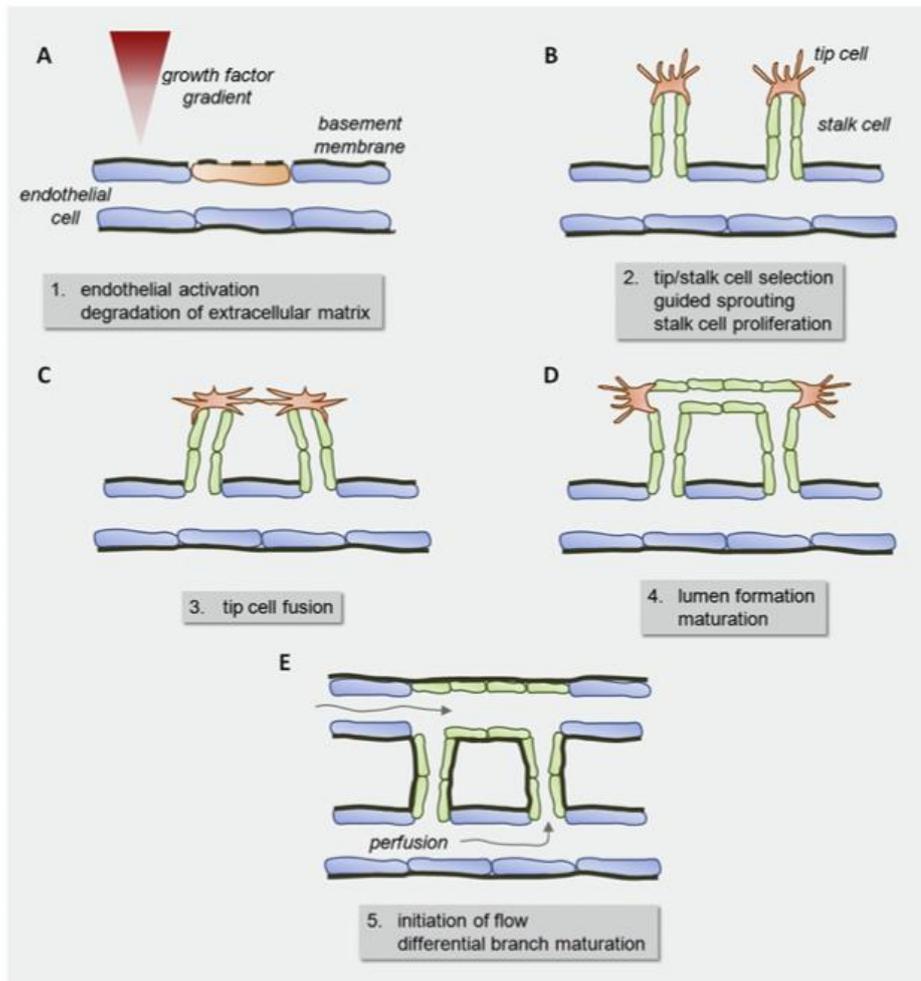


Fig. 1. Physiological blood vessel formation. The first step of angiogenesis is vessel sprouting. Angiogenic growth factors trigger endothelial cells to degrade the basement membrane (A) and select for tip and stalk cells. Tip cells then migrate into the tissue stroma while stalk cells proliferate (B). A lumen is formed by fusion of tip cells (C–D) and flow initiates differential branch maturation (E).

Figure 6. Etapes de l'angiogénèse

Stegen S,2015

2.5 Vascularisation Osseuse

La vascularisation osseuse joue un rôle essentiel dans les fonctions assurées par l'os au sein de l'organisme. Par exemple, elle est indispensable aux échanges de minéraux et à la circulation des cellules d'origine hématopoïétiques. De même, la vascularisation joue un rôle essentiel lors des phases de remodelage osseux et d'ostéogénèse.

On va distinguer différents types de vascularisations osseuses, d'une part, une vascularisation dite endostée dont les vaisseaux sont présents au sein de la matrice et d'autre part une vascularisation périostée qui est développée dans un tissu recouvrant la surface externe des os. Enfin, ces deux vascularisations sont reliées par les canaux Haversiens et de Volkmann qui réalisent un réseau intracortical (figures 7 et 8).

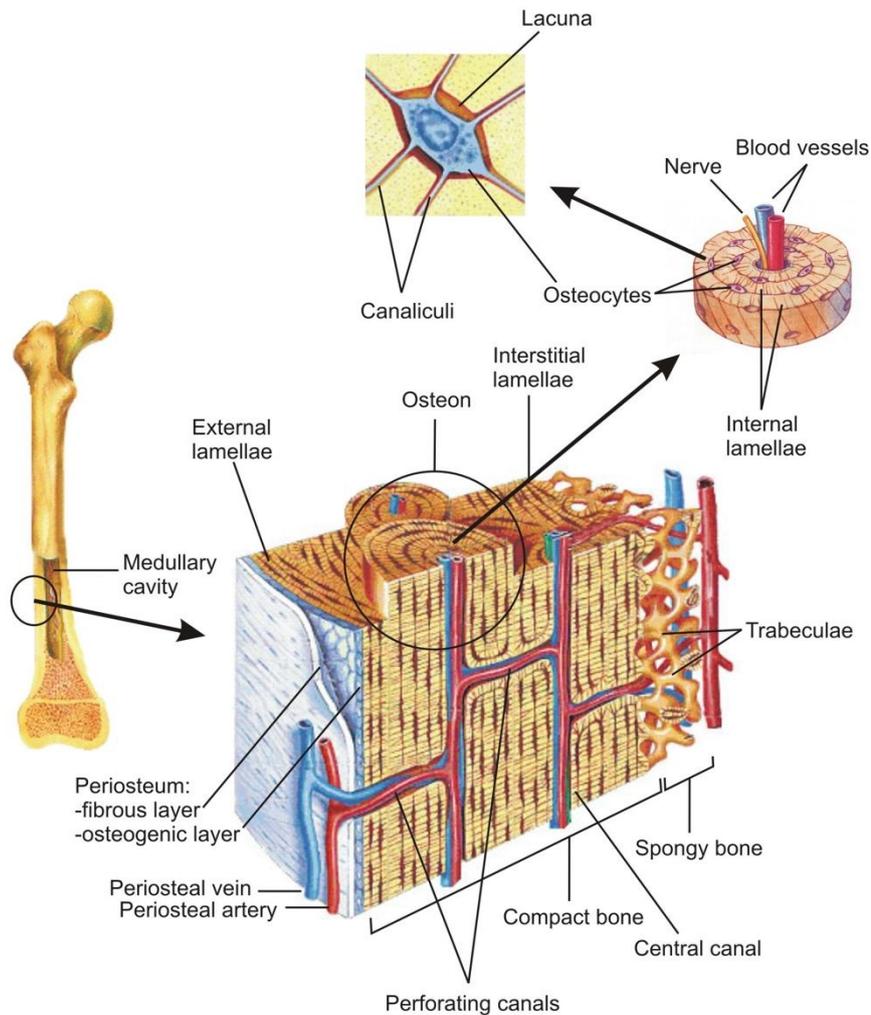


Figure 7. Vascularisation périostée et endostée

Augustin G, 2007

2.5.1 Vascularisation endostée :

Les vascularisations corticales et ostéomédullaires présentent la particularité qu'elles sont développées au sein d'une enveloppe non extensible et qu'elles doivent maintenir une pression constante. La vascularisation corticale va être assurée au travers de canaux de Havers de Volkmann et sera évolutive en fonction des phénomènes de résorption et formation osseuses.

La vascularisation ostéomédullaire permet comme la vascularisation corticale d'assurer les échanges de minéraux et de métaux lourds avec le corps, mais également la circulation des cellules hématopoïétiques. C'est pourquoi, l'arborisation vasculaire est particulièrement développée dans le secteur ostéomédullaire. Au niveau des os longs, on va décrire des artères étagées le long de métaphyses, épiphyses et diaphyses et qui vont passer la corticale puis se ramifier en artérioles et capillaires. Ces ramifications présentent une anatomie proche de celle décrite dans les autres tissus à

l'exception d'une tendance à la calcification de l'adventice des artérioles. D'autre part, de très nombreuses anastomoses entre ces différents réseaux vasculaires sont présentes afin de garantir un maillage très dense de la médullaire osseuse. Surtout, cette circulation présente également la particularité de devoir maintenir une pression constante afin de ne pas entraîner de variation de la pression intraosseuse. En effet, des variations de cette dernière entraînent l'apparition de phénomènes pathologiques. Ainsi, l'ostéonécrose aseptique de hanche est liée à une hyperpression intraosseuse qui peut être traitée en urgence par un forage cortical de décompression. Des évaluations du débit osseux montrent que celui-ci se situe physiologiquement entre 5 et 20 ml/min par 100g d'os.

Deux moyens de contrôle de la pression intraosseuse ont par ailleurs été mis en évidence, d'une part, une variation du débit vasculaire qui va être régulé à l'aide de la vasodilatation ou vasoconstriction des capillaires et artérioles et d'autre part une variation de la prolifération des néo-capillaires qui va être régulée par les mêmes mécanismes que dans le reste de l'organisme.

L'interaction entre la vascularisation osseuse et les fonctions de ce tissu ont par ailleurs pu être mises en évidence. De longue date, il a ainsi été démontré lors de l'ostéoporose sénile une réduction des capillaires ostéomédullaires en parallèle d'une involution graisseuse de la moelle hématopoïétique alors qu'à l'inverse l'hyperparathyroïdie se traduit par une augmentation de la vascularisation intraosseuse associée à une augmentation du remodelage et de la production de la moelle osseuse.

2.5.2 Vascularisation périostée :

Le périoste est une enveloppe principalement fibroélastique qui entoure les os longs et plats de manière quasi continue à l'exception de leurs portions articulaires et des zones d'insertion tendineuses. Il assure un rôle de protection, de nutrition, de croissance et de régénération de l'os cortical sous-jacent. Il se compose d'un assemblage de trois couches, la plus profonde contient des ostéoblastes alors que les couches intermédiaires s'appauvrissent progressivement en fibres élastiques pour ne plus être que fibreuses en périphérie.

Lors de la croissance, le périoste participe à l'ossification membraneuse des tissus sous-jacents et ainsi assurer la croissance en épaisseur des os. Par la suite, le périoste joue un rôle majeur dans le processus de cicatrisation des fractures par l'apport de cellules ostéoprogénitrices, la libération de facteurs de croissance et sa vascularisation à partir de laquelle se développe la néo angiogenèse qui va envahir le cal cartilagineux cicatriciel. Cette dernière est essentielle à la mise en place de conditions favorables à l'ostéogenèse. En effet, en cas de mauvaise vascularisation lors de l'ossification enchondrale durant le processus de cicatrisation, les cellules progénitrices vont s'orienter vers une chondrogenèse et non une ostéogenèse qui va aboutir à un phénomène pathologique de pseudarthrose.

Cette vascularisation périostée est issue d'une part de collatérales des artères et veines nourricières de la médullaire osseuse et d'autre part par des collatérales des vaisseaux présents dans les tissus environnants. Bien que moins dense que la vascularisation endostée, elle s'étend longitudinalement et circulairement autour de l'os cortical et de nombreuses anastomoses entre ces différents réseaux garantissent une importante vascularisation au périoste. Le potentiel de cicatrisation osseuse du périoste est étudié de longue date et Ilizarov en particulier a mis en évidence l'intérêt de sa préservation lors de procédure de distraction ostéogénique qui consiste à réaliser une « fracture contrôlée de l'os » ou ostéoclasie avant d'étirer progressivement le cal cicatriciel et d'accroître la masse osseuse. Les capacités de cicatrisation osseuse du périoste ont également amené plus récemment au développement de lambeaux libres périostés seuls ou en association avec des greffes non vascularisées afin de traiter des zones d'ostéonécrose ou de perte de substance osseuse(35).

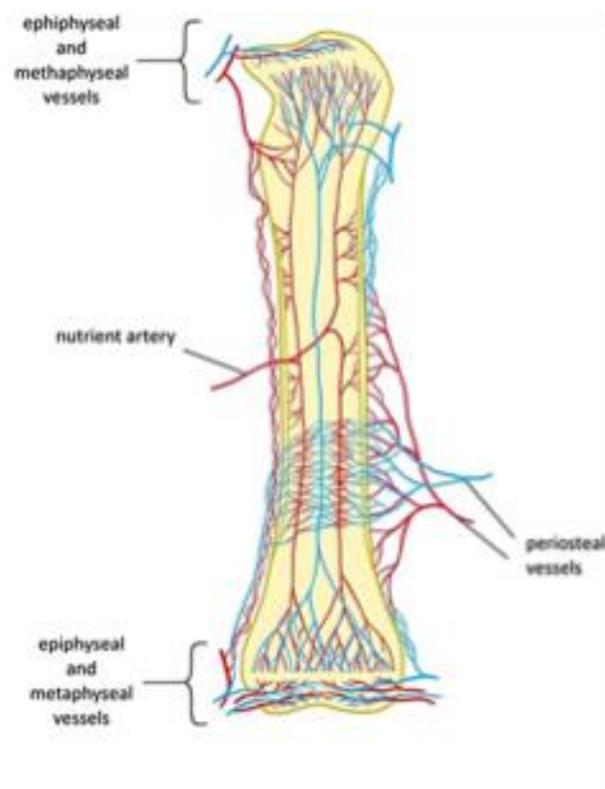


Figure 8. Exemple d'interactions entre vascularisation endostée et périostée des os longs

Filipowska J,2017

2.6 Importance de la vascularisation dans l'homéostasie osseuse

L'os est un tissu vivant capable d'adapter sa masse et sa microarchitecture en réponse à des contraintes mécaniques ou biochimiques grâce à ses capacités de remodelage.

Il participe d'une part à la locomotion et à la protection des organes internes du fait de ses propriétés mécaniques. Il est également essentiel à la régulation du métabolisme phosphocalcique et la captation des métaux lourds au sein de l'organisme. Enfin, il est central dans l'hématopoïèse.

Toutes ces fonctions essentielles à l'homéostasie de l'organisme ne seraient pas possibles sans une vascularisation et une interaction poussée entre celle-ci et le tissu osseux dans lequel elle évolue. Ainsi, l'angiogenèse joue un rôle important lors du remodelage osseux et le processus de cicatrisation après fracture. Il existe donc des relations étroites entre cellules osseuses et vasculaires. Un des éléments témoignant de ces relations est la mise en évidence de précurseurs ostéoblastiques dans le flux de la circulation sanguine ainsi qu'au niveau de la paroi des capillaires intraosseux où ils pourraient être issus de la différenciation de péricytes.

Cette coordination poussée entre tissus osseux et vasculaires n'est possible que par la présence d'interactions poussées au niveau moléculaire, les cellules osseuses produisant de facteurs angiogéniques et les cellules endothéliales des facteurs ostéogéniques. De plus en plus de recherches se centrent sur la compréhension de ces interactions, mais à ce jour, notre compréhension en reste partielle. Les péricytes par exemple présentent la capacité de se différencier en ostéoblastes. Leur régulation est assurée par les cellules endothéliales à travers un mécanisme paracrine, lié au *platelet derived growth factor* (PDGF), mais également à l'*Heparin binding epithelial growth factor like* (HB-EGF) qui sont à la fois sécrétés par les cellules endothéliales et les cellules osseuses. Les cellules osseuses joueraient ainsi un rôle de régulation des péricytes au niveau de la vascularisation osseuse. Les interactions fines entre vascularisation et remodelage osseux ne sont, à ce jour, pas encore parfaitement décrites, mais de nombreuses pathologies telles que la Maladie de Paget, l'ostéoporose, l'ostéoarthrite et bien d'autres témoignent de ce lien étroit.

Lors du remodelage osseux, la vascularisation osseuse est primordiale à la coordination temporo-spatiale des unités fonctionnelles de remodelage et permet le transfert rapide de précurseur ostéoblastique et ostéoclastique, ainsi que de molécules sur les sites de remodelage osseux.

Dans un premier temps, lors des phases d'activation et de résorptions, on note le développement d'une néovascularisation, au contact du compartiment de remodelage osseux. Cette interaction est essentielle au couplage entre résorption et formation osseuse, ce qui a pu être démontré par des études portant sur la maladie de Cushing et le myélome.

Par ailleurs, les cellules osseuses joueraient elles-mêmes un rôle dans l'angiogenèse osseuse au cours du remodelage. Les ostéocytes, en particulier, contribueraient à l'initiation du processus de remodelage en synthétisant des facteurs angiogéniques tels que le VEGF, bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) et receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL).

Le VEGF est un facteur de régulation bien connu des cellules endothéliales et de la vascularisation tissulaire en général. Au cours du processus d'ossification enchondrale et de cicatrisation osseuse, les chondrocytes vont synthétiser du VEGF afin de stimuler la néoangiogenèse essentielle au processus d'ossification. Il va également être synthétisé par les ostéoblastes durant leur différenciation et en parallèle des récepteurs au VEGF sont retrouvés sur des ostéoblastes en cours de différenciation. Cette molécule est également connue pour jouer un rôle de chimiotactisme auprès des ostéoblastes et ostéoclastes. Les ostéoclastes sont d'ailleurs également capables de synthétiser du VEGF et en particulier en réponse à l'hypoxie. Dans le cas des ostéocytes, c'est la stimulation par des contraintes mécaniques importantes qui va entraîner leur sécrétion de VEGF. Ainsi, de même que pour les ostéoblastes, des récepteurs au VEGF sont retrouvés sur les ostéoclastes et contribuent dans ce cas à la stimulation de la résorption osseuse et la survie des ostéoclastes.

Le système RANK/RANKL/Ostéoprotégérine contribue quant' à lui à l'homéostasie osseuse, mais également vasculaire. En effet, le RANKL va stimuler la différenciation et l'activation des ostéoclastes et sa fixation sur ses récepteurs RANK présents sur les cellules endothéliales va contribuer à leur survie. Par ailleurs, RANKL présente des propriétés pro-angiogéniques démontrées in vitro et in vivo. L'Ostéoprotégérine, un récepteur soluble, va contribuer à réguler l'action de RANKL en l'empêchant de se lier à ses récepteurs. Le RANKL et l'Ostéoprotégérine sont sécrétés par de nombreuses cellules incluant les ostéoblastes et cellules endothéliales. Le RANKL en particulier est sécrété par les ostéocytes et jouerait un rôle majeur dans le remodelage osseux postnatal.

La famille des BMPs, quant' à elle joue un rôle majeur dans la formation osseuse lors de toutes les étapes de la vie, mais également va contrôler la prolifération et la migration des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse. Ainsi, la BMP-7 contribuerait à la survie des cellules endothéliales et la stimulation de l'angiogenèse en augmentant la sécrétion de VEGF. Les ostéocytes, ostéoclastes et ostéoblastes sont tous capables de la sécréter et comme pour le VEGF, sa sécrétion au niveau des ostéocytes semble stimulée par des contraintes mécaniques importantes appliquées à la cellule.

Bien d'autres molécules concourent à l'interaction et la régulation des processus de régénération osseuse et néoangiogenèse. Ces processus et les molécules qui les régulent nécessitent encore de nombreuses explorations, mais nos connaissances actuelles éclairent de plus en plus les interactions qui se produisent entre cellules endothéliales et osseuses lors du processus de remodelage.

3 BIOMATERIAUX

3.1 Les substituts osseux

Dans l'idéal, un substitut osseux devrait présenter des caractéristiques physico-chimiques superposables à l'os natif. Il devrait ainsi être biocompatible, bioactif, ostéoconducteur, ostéoinducteur, résorbable et présenter des propriétés mécaniques identiques à l'os natif. Par ailleurs, afin d'être utilisé en pratique clinique courante, il devrait présenter un coût de production contenu, sans limites de quantité et facilement mis en œuvre. Leur intérêt est également de s'affranchir des risques de transmission infectieuse liés à la réalisation d'allogreffes ou xéno greffes.

De nos jours, les substituts osseux commencent à voir leur utilisation clinique et expérimentale se répandre, mais pour cela doivent répondre à certains critères qui sont (figure 9) :

- Biocompatibilité répondant à la norme NF EN ISO 10993
- Ostéoconduction et ostéointégration avec présence d'une néoformation osseuse et absence de coque fibreuse au pourtour du greffon dans les 3 mois post implantation.
- Résorption (si applicable) dans les 2 ans post implantation
- Identification du biomatériau pendant au minimum 3 mois post implantation par présence d'un agent opacifiant
- Propriété mécanique avec une résistance à la compression comprise entre 5 et 550 MPa.
- Stérilisation afin de garantir un risque de non-stérilité inférieur à 10^{-6}
- Agrément réglementaire répondant aux contraintes de la Haute Autorité de Santé pour la France

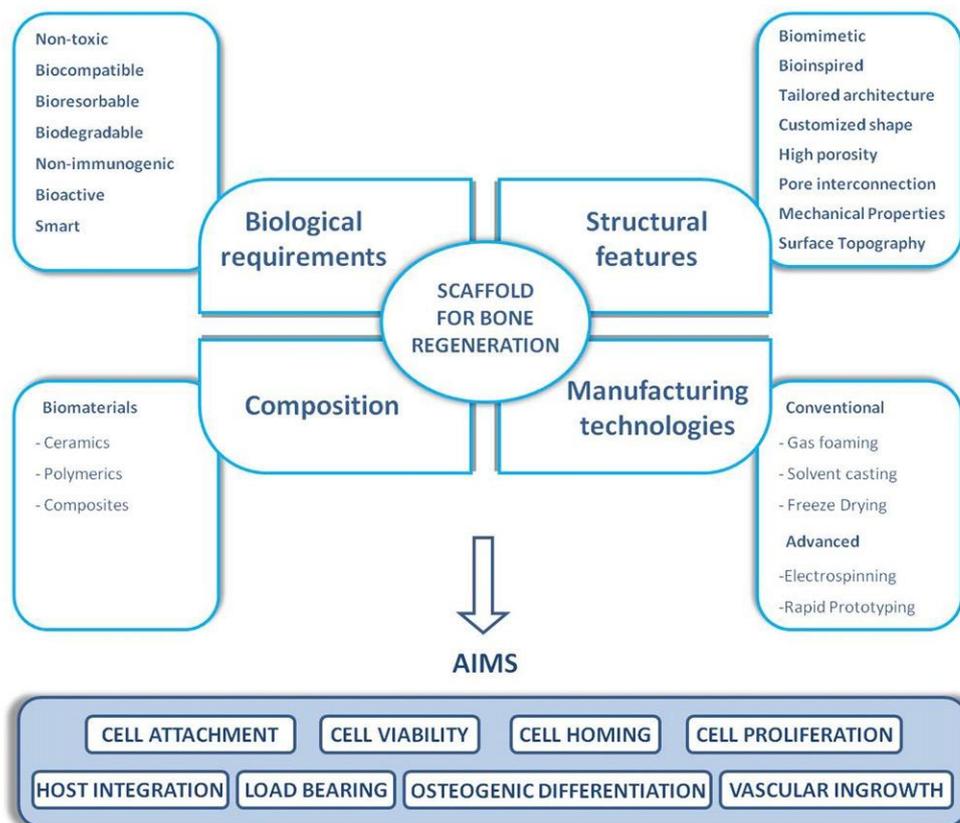


Figure 9. Schéma des propriétés des matrices pour l'ingénierie osseuse

Roseti L,2017

3.1.1 Apatites biologiques :

Les apatites biologiques sont présentes dans la phase minérale de l'os, la dentine ou encore l'émail. L'hydroxyapatite représente ainsi environ 70 % de l'os, le collagène de type I 20% et l'eau environ 10%. Classiquement, la matrice minérale inorganique est décrite comme proche de l'hydroxyapatite phosphocalcique $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ou $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Chez les mammifères, l'apatite biologique correspond à une forme déficiente en hydroxyle et riche en carbonate, présentant un ratio Ca/P inférieur à 1,67. Les apatites présentent une grande flexibilité chimique et acceptent de ce fait des substitutions qui vont amener à de multiples variations de leurs compositions et structures. Ainsi, elles peuvent contenir différents minéraux tels que groupement carbonate (CO_3^{2-}), magnésium (Mg), sodium (Na), potassium (K), silicium (Si), chlore (Cl) ou fluor (F) qui vont entraîner une grande variabilité des propriétés de ces minéraux tel que leurs solubilités, résistances mécaniques, stabilités thermiques ou propriétés optiques.

3.1.2 Apatites synthétiques :

Présentant des propriétés physico-chimiques proches des apatites biologiques, les apatites de synthèses peuvent s'intégrer au remodelage minéral de la matrice osseuse et en ont fait certains des matériaux de substitution osseuse les plus populaires (37). Elles possèdent ainsi des propriétés d'ostéoconduction en permettant l'adhésion et la prolifération de cellules ostéoblastiques et ainsi guider la néoformation osseuse. Mais elles possèdent également des propriétés d'ostéoinduction en permettant la néoformation osseuse en l'absence de facteurs ostéogéniques (38). Bien entendu, les différents types d'apatites synthétiques vont présenter des propriétés propres et ainsi si la plupart sont ostéonconduites, la capacité d'ostéoinduction est bien moins systématique. Ces différences sont liées à leur composition et leur architecture qui vont dépendre de paramètres lors de la phase de synthèse, tels que les réactifs utilisés et la présence d'impuretés, la taille des cristaux obtenus et leur morphologie, les concentrations des réactifs, le rapport Ca/P, ainsi que le pH et la température. De même, les propriétés physico-chimiques des matériaux dépendent des traitements thermiques appliqués durant les phases de séchage et de frittage. En effet, contrairement aux apatites biologiques qui sont synthétisées *in vivo* à la température du corps, ces apatites synthétiques telles que l'hydroxyapatite (HA) et de béta tri calcium phosphate (β -TCP) nécessitent un traitement à haute température.

Ces matériaux peuvent être produits par différentes techniques dites voie aqueuse ou voie sèche, mais c'est la voie aqueuse qui est privilégiée du fait de sa meilleure rentabilité en termes de quantité et de coût (39,40).

3.1.2.1 L'hydroxyapatite :

L'hydroxyapatite, ou HA de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ est avec la brushite l'une des deux formes stables de céramique phosphocalcique lorsqu'elle est mise en milieu aqueux tel que le liquide physiologique. Son rapport Ca/P est de 1,67 ou 10/6, ce qui est proche des ratios observés dans les apatites biologiques contenues dans l'os 1,65, la dentine 1,67 et l'émail 1,59.

3.1.2.2 Le béta tri calcium phosphate :

Le béta tri calcium phosphate ou β -TCP de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nécessite quant à lui un excès de calcium avec un rapport Ca/P de 1,5. En cas d'excès de calcium, on favorisera l'apparition d'HA et en cas de déficit, c'est du pyrophosphate de calcium $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ qui pourra apparaître dans la synthèse. Il est l'une des trois formes de phosphate tricalcique dont l'organisation cristalline et la stabilité dépendent de la température de frittage. Ainsi, en dessous de 700°C, le phosphate tricalcique apatitique (α -TCP) est amorphe. Entre 700 et 1125°C, on obtient une phase stable qui est le β -TCP et enfin, au-delà de

1125°C, on observe une augmentation de la maille cristalline et de la réactivité de la phase apatitique que l'on nomme alpha tri calcium phosphate (α -TCP).

3.1.2.3 Le calcium phosphate biphasique (BCP) :

Le BCP est un assemblage d'HA et de β -TCP qui peut être obtenu en mélangeant des poudres contenant ses deux composants synthétisés de manière séparée, ou en réalisant directement une synthèse mêlant particules d'HA et β -TCP. Bien entendu, les propriétés physico-chimiques de ce matériau vont être modulés par le ratio HA/ β -TCP en son sein, mais également par les modalités de synthèse et de frittage de chacun de ces composants.

Le mélange de deux poudres distinctes va ainsi permettre un contrôle fin des températures de frittage de l'HA et du β -TCP, mais ne permettra pas une parfaite homogénéité du BCP obtenu alors qu'une synthèse conjointe de ses composants, garanties l'homogénéité de leur répartition au niveau moléculaire, mais nécessitera un compromis quant à la température de frittage appliquée à la matrice phosphocalcique.

3.2 Synthèse

Deux voies de synthèse sont donc possibles pour la réalisation de poudres d'apatites synthétiques. La voie dite sèche nécessite des traitements à haute température qui s'avèrent coûteux, énergivores et présentent un faible rendement. C'est pourquoi la synthèse par voie humide est largement privilégiée.

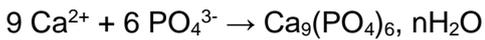
3.2.1 Synthèse par voie humide :

Comme son nom l'indique, elle se déroule en milieu aqueux et va consister en la double décomposition de sels de calcium et phosphate qui va aboutir à un phosphate de calcium amorphe. Lors de cette synthèse, de nombreux paramètres vont influencer le matériau produit. Ainsi, les réactifs utilisés, leur mélange progressif, le rapport Ca/P, le pH, la température, le temps de maturation ou encore l'ajout de composés organiques, vont influencer sur le produit final. Le rapport Ca/P étant un élément essentiel, ainsi, un rapport inférieur à 1,5 va aboutir à l'obtention de pyrophosphate de calcium, et un rapport supérieur à 1,67 à la production de chaux.

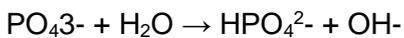
La maîtrise de ces différents paramètres va permettre de produire des formes plus ou moins pures des différentes apatites de synthèse.

Le processus démarre par la réalisation d'une solution nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ dans laquelle sera progressivement introduite une solution d'hydrogénophosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Ce mélange bénéficie d'une agitation constante, d'un contrôle de sa température et d'un contrôle de son pH qui est maintenu légèrement acide par l'injection régulée d'ammoniaque. Vont alors se succéder différentes réactions durant la phase de maturation qui va aboutir à la formation de phosphate apatitique tricalcique.

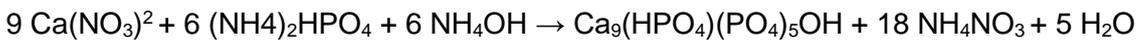
Dans un premier temps va se former un phosphate tricalcique amorphe :



Par la suite se produit une hydrolyse :

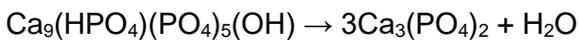


Celle-ci va aboutir à la formation du phosphate apatitique tricalcique :



On va alors filtrer et sécher le précipita obtenu, ce qui va permettre d'obtenir une poudre de phosphate apatitique tricalcique.

Cette poudre va ensuite bénéficier d'un traitement thermique par calcination à une température supérieure à 700°C qui va aboutir à la formation de β -TCP par élimination des molécules d'eau.



Lors de notre travail de recherche, nous avons cherché à obtenir d'une part des particules de β -TCP avec moins de 4% d'HA, nous avons donc visé un rapport Ca/P légèrement supérieur à 1,5. D'autre part, nous avons souhaité étudier l'utilisation d'un composé biphasique (BCP) contenant 45% d'HA et 55% de β -TCP et avons donc modulé le rapport Ca/P entre 1,5 et 1,67 afin d'obtenir un phosphate apatitique tricalcique qui après calcination réponde à cette contrainte (figure 10).

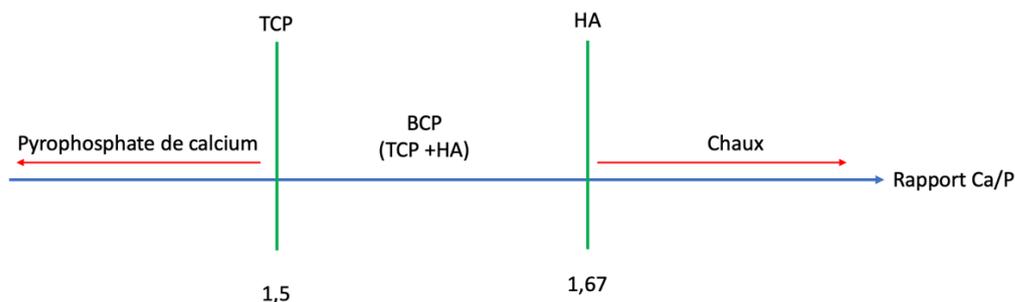


Figure 10. Impact du rapport Ca/P sur la synthèse de poudres phosphocalciques de β -TCP et d'HA.

3.3 Propriété physico-chimiques et architecturales

3.3.1 Propriétés biologiques des matériaux :

Depuis des décennies, les matrices phosphocalciques sont reconnues comme un matériau de choix pour l'ingénierie tissulaire osseuse. En effet, elles sont biocompatibles et la réaction inflammatoire inhérente au geste chirurgical ne va pas entraîner de réaction immunitaire conduisant à leur rejet de l'organisme. Au contraire, des cascades de réactions locales vont conduire à son intégration au sein

des tissus de l'organisme. On va noter dans un premier temps des échanges ioniques et l'apparition des dépôts protéiques issus de la matrice extracellulaire. Différents paramètres vont influencer sur cette adsorption protéique par les matériaux, parmi ceux-ci, on citera leurs porosités, rugosités, solubilités, charges de surface ou encore propriétés biologiques du site d'implantation.

Cette nouvelle couche protéique composée entre autres de fibrinogène, de molécules d'adhésion de la matrice extracellulaire va conduire à une modification des propriétés de surface des matrices et permettre l'adhésion cellulaire. Comme pour l'adhésion protéique, l'adhésion cellulaire dépend également des propriétés physico-chimiques du matériau employé. Parmi les premières cellules impliquées, on retrouvera entre autres les cellules immunitaires qui sont impliquées dans la réponse inflammatoire et sa régulation (figure 11).

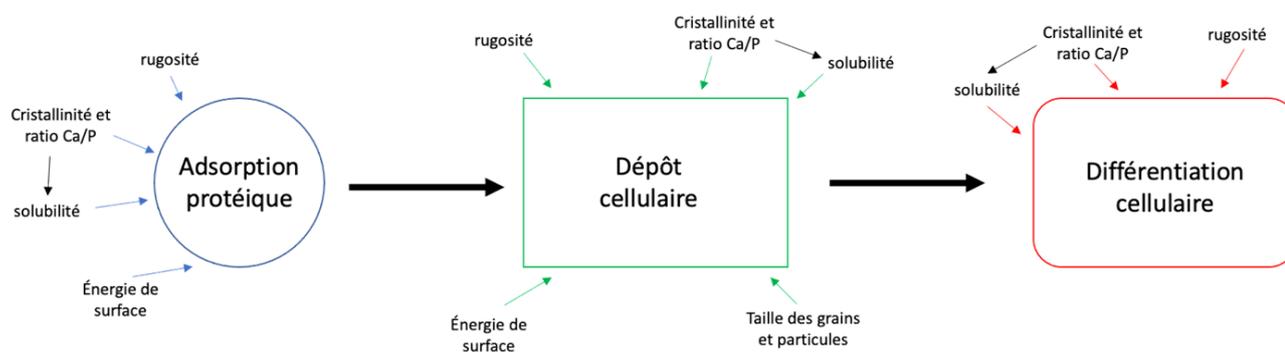


Figure 11. Impact de la composition et de l'architecture des matrices phosphocalciques sur leurs propriétés biologiques

3.3.1.1 Biodégradabilité et bioactivité :

La capacité des matériaux à être dégradés est étudiée in vitro en les immergeant au sein de solution acide, visant à reproduire l'environnement présent durant l'activité ostéoclastique, et en monitorant la libération progressive d'ions Ca^{2+} (41). On a ainsi pu démontrer des variations de cette propriété liée au type d'apatite synthétique ou biologique étudiée. Ainsi, a pH physiologique (pH 7,4) le β -TCP est plus susceptible de se dissoudre que l'hydroxyapatite (figure 12), et il a été déterminé que le taux de dégradation des matériaux par ordre décroissant retrouve :

β -TCP >> os bovin fritté > os bovin non fritté > HA de corail > HA synthétique(40). De même, la dégradation du BCP dépend du rapport HA/ β -TCP, plus ce rapport est élevé, moins il apparaît biodégradable.

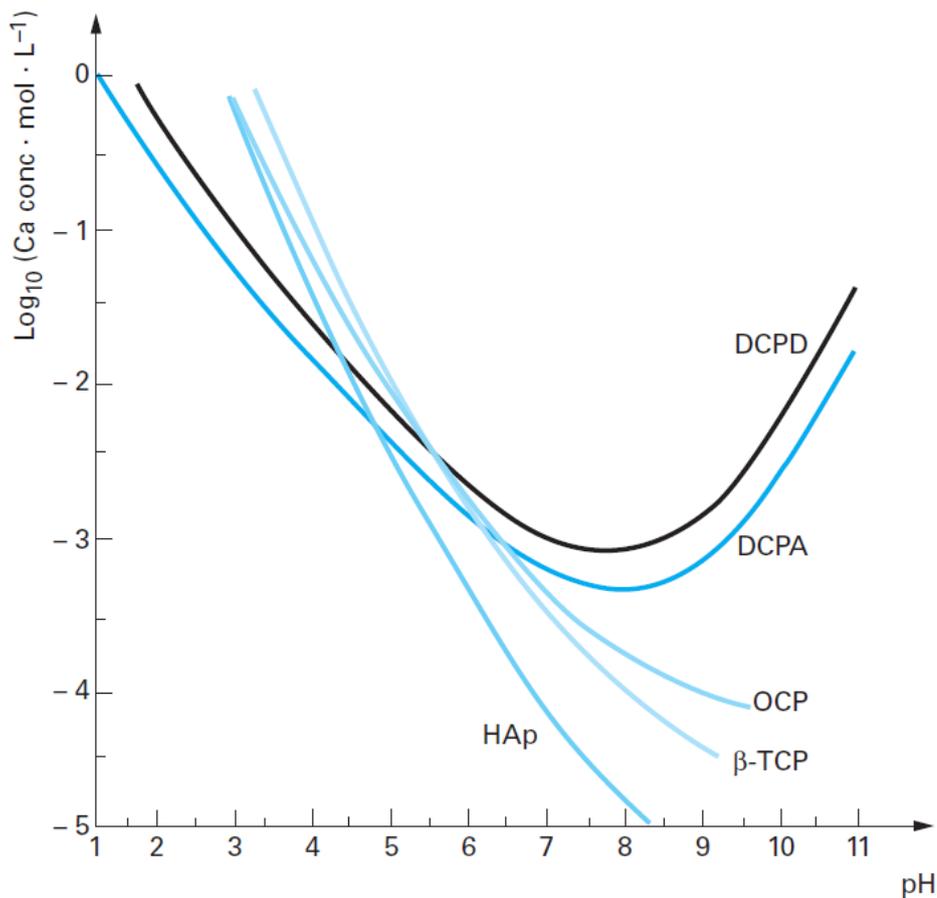


Figure 12. Isothermes de solubilité des phosphates de calcium à 37°C en fonction du pH

Combes C, 2013

La bioactivité est la capacité de ces matériaux à se lier avec l'os nouvellement formé (42). Ce matériau bioactif va à se lier à l'os nouvellement formé à travers la formation d'une couche d'apatite biologique et l'on a démontré in vitro qu'une couche plus importante se forme sur de l'HA biologique de corail en comparaison à de l'HA synthétique (43,44). L'étude in vitro de la bioactivité est réalisée en immergeant les biomatériaux au sein d'un liquide reproduisant les propriétés du sérum. In vivo, l'activité cellulaire ostéoclastique mais également des cellules mésenchymateuses, monocytes et macrophages associés à un environnement acide va induire une dissolution partielle du matériau phosphocalcique avec relargage d'ions calcium et phosphate (45). Ce phénomène va entraîner une saturation du micro-environnement qui va induire une précipitation d'apatites biologiques incorporant différents ions calcium (Ca^{2+}), phosphate (PO_4^{3-}), magnésium (Mg^{2+}), sodium (Na^{2+}), carbonate (CO_3^{2-}) et de l'acide phosphorique (HPO_4^{2-}), présents dans l'environnement et cette cascade de réactions va conduire à la néoformation osseuse. Ce phénomène de dissolution/précipitation va ainsi être un élément central de la bioactivité des biomatériaux (38).

3.3.1.2 Osteoconduction :

Du fait de leurs propriétés biocompatibilité et bioactivités, les matériaux phosphocalciques sont qualifiés d'ostéoconducteurs (46). En effet, l'ostéoconduction est définie comme la capacité des matériaux à permettre l'adhésion, la prolifération, la migration et la différenciation des cellules osseuses, conduisant à la néoformation osseuse sur leurs surfaces.

La formation d'apatites biologiques à la surface de ces matériaux va permettre l'adsorption des protéines de l'environnement biologique qui vont par la suite autoriser les dépôts d'ostéoblastes, leurs migration, prolifération, et différenciation. Ceci va entraîner la production d'une matrice et sa minéralisation progressive qui va aboutir à la néoformation osseuse qui va suivre la surface de la trame du biomatériau.

3.3.1.3 Ostéoinduction

La capacité d'ostéoinduction va permettre d'induire un phénomène d'ostéogenèse en recrutant et en induisant la différenciation de progéniteurs ou cellules indifférenciées en cellules de la lignée ostéoblastique. On met en évidence cette propriété des matériaux en observant cette ostéogenèse lors de leurs implantations ectopiques par exemple en localisation intramusculaire ou sous-cutanée. Ceci a été pour la première fois observé en 1965 après l'implantation de matrice osseuse déminéralisée en localisation intramusculaire sur modèle animal (47). Différentes protéines impliquées dans la différenciation ostéoblastique peuvent être utilisées comme marqueurs afin de mettre en évidence ce phénomène. Parmi celles-ci, on peut citer le collagène de type 1, la phosphatase alcaline (ALP), la bone morphogenic protein-2 (BMP-2), l'osteopontin (OPN), l'osteocalcine (OCN) ou la bone sialoprotein (BSP) dont les rôles sont présentés dans le tableau 1.

Name	Type	Primary function during differentiation
Runx2	Transcription factor	Helps in the differentiation of MSCs into immature osteoblasts
Osterix (OSX)	Transcription factor	Acts downstream of Runx2 and promotes osteogenesis, while inhibiting chondrogenesis
Alkaline phosphatase (ALP)	Enzyme	Increases local concentration of phosphate ions that in turn initiate mineral growth
Type I collagen	ECM protein	Mineral nucleation begins at the junction between two collagen fiber bundles
Osteopontin (OPN)	ECM protein	Acts as an inhibitor towards irregular formation of mineral crystals
Bone sialoprotein (BSP)	ECM protein	Binds to Ca ²⁺ via free hydroxyl groups and promotes nucleation of mineral
Osteocalcin (OCN)	ECM protein	Regulates mineral growth, direction, size and quantity during late stages of differentiation
Osteonectin (ONN)	ECM protein	Similar role to that played by osteocalcin
Bone morphogenic protein 2 (BMP2)	Growth factor	Secreted by immature osteoblasts and may trigger a variety of autocrine/paracrine pathways
Bone morphogenic protein 7 (BMP7)	Growth factor	Similar role to that played by BMP2

Tableau 1. Marqueurs de la différenciation ostéoblastique

Samavedi S,2013

Contrairement à l'ostéoconduction, tous les matériaux phosphocalciques ne présentent pas de propriété d'ostéoinduction(37). Les matériaux tels que l'HA synthétique, le β -TCP ou encore le Bi calcium phosphate (BCP) macroporeux présentent cette capacité et sont décrit en opposition aux matériaux non ostéoinducteurs comme ayant une propriété d'ostéoinduction « intrinsèque ». Les paramètres jouant un rôle dans l'ostéoinduction incluent : la composition chimique des matériaux, leur architecture et macroporosité, les propriétés microstructurelles de surface, la taille des grains, la microporosité, la rugosité et la surface spécifique (49). La présence de calcium et phosphate est essentielle à la formation d'os hétérotopique et la formation de site de nucléation permettant le dépôt d'apatites biologiques (50).

L'ostéoinduction est modulée par la dégradabilité du matériau et une dégradation rapide stimule l'ostéoinduction. Toutefois, une surface stable est également nécessaire aux dépôts, minéraux, protéiques et cellulaires pour permettre l'ostéogenèse. Un équilibre entre les phénomènes de dissolution et précipitation est donc nécessaire (38). Comme nous l'avons vu, les différentes apatites présentes des solubilités variables, le β -TCP étant plus soluble que le BCP qui l'est plus que l'HA. Toutefois, la phase apatitique n'est qu'un des éléments à prendre en compte dans les propriétés d'ostéoinduction. En effet, la dissolubilité du matériau est également liée à sa surface spécifique et elles varient de concert. Lors du processus de mise en forme, on peut moduler cette surface spécifique en variant la température de frittage. Une augmentation de cette dernière va entraîner une diminution de la microporosité et une augmentation de la taille des grains, ce qui va conduire à une réduction de la surface spécifique et de la dissolubilité du matériau. À l'inverse, une diminution de la température de frittage va induire une augmentation de la microporosité et la diminution de la taille des grains qui vont se traduire par une augmentation de la surface spécifique et une augmentation de la dissolubilité (51). En comparaison avec la surface spécifique, dans l'os, qui est inférieure à $80 \text{ m}^2/\text{g}$; celle de l'HA après traitement thermique va s'établir autour de $1 \text{ m}^2/\text{g}$ (52,53).

Finalement, l'on doit comprendre qu'à ce jour, nous n'avons pas les moyens de reproduire les propriétés physiques et biologiques des apatites biologiques et des compromis sont nécessaires en termes de composition, température de frittage ou encore technique de mise en forme afin de nous approcher des propriétés des apatites biologiques. L'utilisation d'apatites synthétiques biphasiques (BCP) semble prometteuse en permettant d'associer les propriétés complémentaires de l'HA et du β -TCP. Ainsi, comme nous l'avons vu, la résorption du BCP dépend de sa composition et plus précisément, un accroissement de la proportion de β -TCP entraîne une augmentation de la résorption ostéoclastique (54). Le BCP en comparaison avec l'HA va présenter de meilleures propriétés d'ostéoinduction en augmentant d'une part le relargage ionique dans le micro-environnement et en stimulant la différenciation et la maturation cellulaire des ostéoblastes et précurseurs présents (55–57). Des modèles animaux ont ainsi comparé différents types de BCP, présentant des ratios HA/ β -TCP

variables. Ces différentes études ont conclu à une néoformation osseuse inversement proportionnelle au ratio HA/ β -TCP (54,58). Toutefois, il faut mettre en perspective la nécessité d'une stabilité mécanique de la matrice produite qui elle sera favorisée par la présence d'HA. Le ratio HA/ β -TCP devra ainsi être adapté afin de répondre à des caractéristiques physico-chimiques de la perte de substance osseuse à reconstruire. La taille des particules de BCP semble également jouer un rôle sur la capacité du matériau à provoquer une ostéogenèse. Des particules fines d'une taille proche des 10 à 20 μ m provoqueraient une importante réaction inflammatoire initiale qui aboutirait à la meilleure capacité d'ostéogenèse (59,60).

3.3.2 Impact de la géométrie :

3.3.2.1 Microarchitecture des matrices phosphocalciques :

L'objectif de nos biomatériaux est de se substituer aux greffes osseuses autologues. Ils doivent donc présenter des propriétés biologiques, mais également architecturales et mécaniques permettant de se substituer à l'os natif.

Les apatites synthétiques se distinguent de leurs homologues biologiques en présentant une cristallinité plus élevée, des tailles de cristaux plus élevées, une composition stœchiométrique et l'absence de substitutions ioniques. Par exemple lors du processus de mise en forme par traitement à haute température, on observe une croissance de la taille des cristaux jusqu'à atteindre 600 à 3000 nm, alors que les cristaux d'apatites biologiques ne dépassent pas les quelques dizaines de microns (61).

Comme nous l'avons précédemment vu, la microporosité joue un important rôle dans la bioactivité des apatites synthétiques. Ainsi des micropores de mois de 1 μm vont permettre une bonne adsorption protéique et contribuer à l'amélioration de l'ostéoinduction par l'augmentation de la surface spécifique des matrices (62).

3.3.2.2 Macroarchitecture des matrices phosphocalciques :

À ce jour en application clinique, la plupart des biomatériaux proposés le sont sous forme de poudres qui permettent de combler les pertes de substance. Toutefois, cette forme présente des désavantages. Leur manipulation peut s'avérer plus ou moins complexe, des granules peuvent se mobiliser et cette forme n'assure pas de stabilité à la reconstruction (63,64). Des formes plus mécaniquement stables telles que des blocs ont ainsi été développées afin de pallier cette limite des granules. Toutefois ces pièces possèdent une architecture prédéfinie qu'il est difficile de modifier du fait des propriétés mécaniques des céramiques, et leur adaptation aux pertes de substance osseuse afin de les combler reste complexe (65).

De plus, les apatites synthétiques bien qu'elles soient proches des apatites biologiques s'en différencient toutefois d'un point de vue mécanique en présentant un module d'élasticité et une résistance à la compression bien plus élevée pouvant théoriquement induire une résorption de l'os au contact du biomatériau (37,66). Toutefois, l'architecture et la composition très variables des matrices phosphocalciques entraînent une très grande hétérogénéité de ces propriétés mécaniques et la simple modification d'une forme cubique en une forme en diamant des pores induit une réduction de la résistance à la compression de la pièce produite (67). La modulation des propriétés mécaniques des matrices afin de correspondre aux contraintes de leurs environnements devient un élément majeur intégré à l'ingénierie tissulaire osseuse (figure 13) (68).

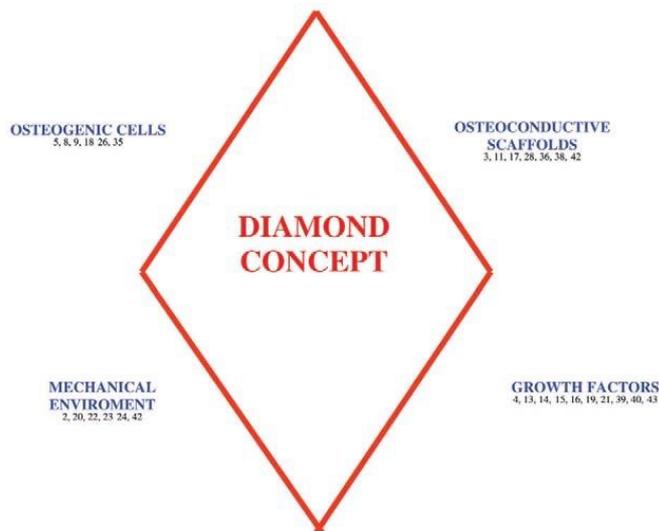


Figure 13. Concept du diamant en ingénierie tissulaire osseuse

Giannoudis PV,2007

Afin de répondre à ces contraintes, le prototypage rapide en ingénierie tissulaire osseuse se développe. Celui-ci est déjà utilisé en pratique clinique afin de réaliser du matériel d'ostéosynthèse sur mesure et l'adaptation de cette technique afin de réaliser des pièces spécifiquement adaptées aux pertes de substances à traiter paraît une évolution logique (69).

D'un point de vue architectural, les matrices phosphocalciques utilisées comme substituts osseux le sont sous forme macroporeuse afin de permettre la croissance osseuse et vasculaire au sein des pores et ainsi assurer le développement d'une ostéogenèse en leurs seins. L'os présente toutefois des porosités variables et si celle de l'os cortical est d'environ 20% avec des dimensions de pores variant autour de 1 à 100 μm , celle de l'os médullaire varie de 50 à 90% et ses pores font de 200 à 600 μm (70,71). La régénération tissulaire osseuse semble également nécessiter une macroporosité interconnectée afin de permettre les échanges de gaz et de nutriments, mais également le développement d'une néo-angiogenèse au sein des matrices (72,73). En effet, on note une meilleure croissance tissulaire au sein de l'os médullaire en comparaison de l'os cortical qui serait liée à la meilleure vascularisation en lien avec sa plus grande porosité (74). Des essais de biomatériaux comportant une macroporosité ont démontré l'intérêt d'une macroporosité interconnectée avec des pores de plus de 100 μm , associée à une microporosité. La macroporosité permettant la croissance vasculaire, les échanges de gaz et nutriments et la néoformation osseuse et la microporosité étant quant à elles liées à l'accroissement de la surface spécifique et l'ostéoconduction(75–78). Des essais portant sur le contrôle de l'architecture des pièces produites sont réalisés depuis de nombreuses années et ont montré son intérêt (79). Toutefois, afin de contrôler précisément la taille des pores, leur interconnexions et l'architecture globale de la pièce permettant de parfaitement combler la perte de substance, mais également répondre aux contraintes mécaniques locales, le prototypage rapide

semble une réponse appropriée (80). L'impression de matrices apatitiques reste marginale en comparaison à celle de polymères, qui présentent toutefois des propriétés biologiques moins intéressantes (81,82). La raison principale de cette différence est liée à la plus grande difficulté de mise en forme des matrices phosphocalciques. Toutefois des technologies d'impression telles que le Digital Light Processing (DLP) semblent prometteuses, afin de permettre de répliquer l'architecture osseuse et d'améliorer les propriétés biologiques et mécaniques des matrices phosphocalciques (67,83). Ainsi, une publication focalisée sur l'impact de la modulation de l'architecture des pores dans une matrice de BCP a démontré que la simple modification d'une forme cubique en une forme en diamant de ces pores induit une réduction de la résistance à la compression de la pièce (67). Ceci confirme l'importance de l'architecture des pièces produites sur leurs propriétés mécaniques indépendamment de leur composition. L'impression en permettant une grande liberté de formes et de dimensions de la macroarchitecture de nos matrices devrait ainsi être un élément complémentaire à leur composition dans la modulation de leurs propriétés physico-chimiques, biologiques et mécaniques. L'exploration de cette grande variété de compositions et d'architectures nécessitera encore de nombreux travaux avant d'aboutir. Toutefois, elle fait écho à l'hétérogénéité de l'architecture et de la composition des os du squelette. Nous devrions ainsi pouvoir aboutir à terme à la confection de reconstructions « sur mesure » permettant de mimer au mieux les propriétés des matrices minérales à reconstruire.

4 Technique de mise en forme de matrices phosphocalciques

4.1 Imprégnation d'un négatif de matrice en poly méthyl méthacrylate (PMMA) par suspension de β -TCP

Cette technique va nécessiter deux étapes de mise en forme successives. Dans un premier temps, on va réaliser une structure en billes de polymère, qui sera par la suite imprégnée d'une barbotine de -TCP qui après séchage, va nécessiter la réalisation d'un traitement thermique par déliantage puis frittage (figure 14).

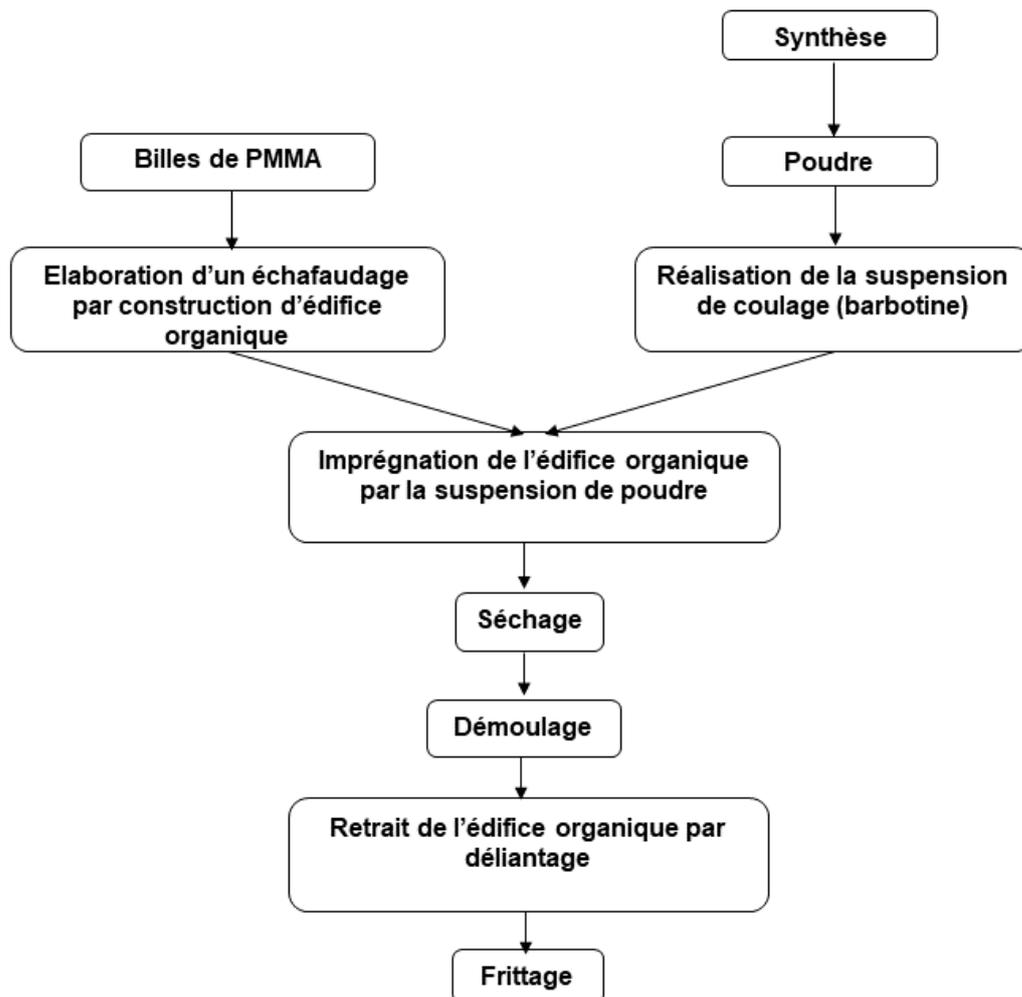


Figure 14. Schéma d'une technique de mise en forme de matrices phosphocalciques par négatif de PMMA et coulée

4.1.1 Mise en forme du négatif de la matrice finale :

La forme finale de notre matrice va être guidée par deux éléments lors de cette première étape. D'une part, la morphologie externe de la matrice va dépendre d'un moule de plâtre dans lequel la préforme de polymère sera insérée avant la coulée de barbotine. D'autre part ; l'architecture interne de la matrice finale sera le négatif d'une structure poreuse constituée de billes de PMMA interconnectées.

L'avantage du PMMA dans cette application est lié à sa solubilité au contact de solvants organiques tels que l'éthanol ou l'acétone, mais également à sa facilité d'élimination par traitement thermique ici appelé déliantage. La macroporosité sera alors dépendante de la taille des billes sélectionnées et la taille des interconnexions dépendra quant à elle de la fusion des points de contact entre billes.

Dans une première étape, les billes de PMMA sont introduites dans un moule le plus souvent cylindrique qui reproduit le moule de plâtre. Par la suite, une solution contenant un solvant organique va être introduite et entraîne la dissolution lente et superficielle des billes. Une force constante va leur être appliquée à l'aide d'un piston qui va permettre de contrôler la fusion des billes au niveau de leurs points de contact, ce qui va entraîner une variation de hauteur du piston par rapport au moule (figure 15). Ce retrait peut alors être corrélé au diamètre d'interconnexions des billes selon deux modèles dits empiriques et géométriques (84).

Ces modèles permettent ainsi de déterminer les retraits nécessaires à la création d'interconnexions précises entre les billes de PMMA et donc le contrôle précis des interconnexions présentes dans la matrice phosphocalcique finale.

Une fois réalisé, le négatif en PMMA de la matrice phosphocalcique peut être inséré dans le moule en plâtre ou sera réalisé son imprégnation.

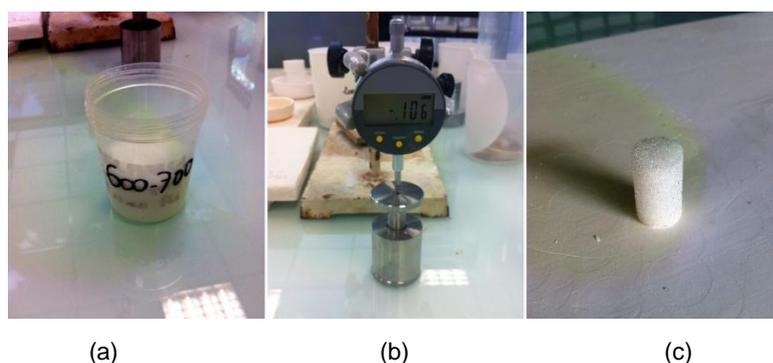


Figure 15. Processus de mise en forme des édifices organiques par pressage à l'aide de billes de polyméthacrylate de méthyle (a), positionnées dans un moule rempli de solvant (acétone) sur lequel une masse est appliquée jusqu'à obtenir le retrait souhaité (b) puis démouler l'édifice organique (c).

4.1.2 Imprégnation du négatif et déliantage :

Afin d'imprégner la matrice de PMMA, la poudre phosphocalcique doit être mise en suspension. Cette barbotine résulte de la mise en suspension de matière sèche (poudre phosphocalcique) dans un solvant aqueux dans lequel seront ajoutés certains composants tels qu'un dispersant qui va empêcher les particules de s'agglomérer et de se sédimenter, un liant qui va permettre la manipulation de la pièce après la phase de coulage et le déliantage et enfin, un mouillant qui va permettre d'assurer un bon contact entre suspensions et billes.

Une fois réalisée, cette barbotine est donc coulée dans le moule de plâtre afin d'imprégner la structure de PMMA. Celui-ci permet de sécher la pièce par phénomènes de capillarité et ainsi d'obtenir une matrice dite à l'état cru. Une fois démoulée, la pièce doit être retravaillée afin d'éliminer les excès de matière (figure 16).

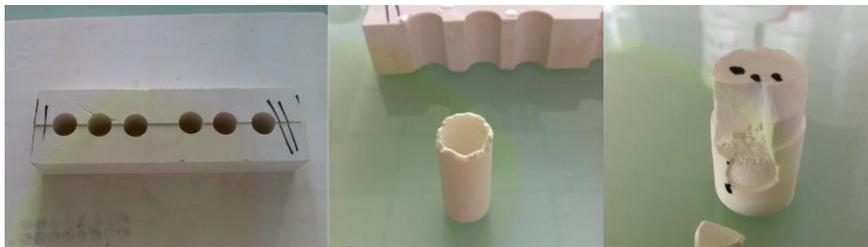


Figure 16. Coulée de barbotine pour imprégnation du négatif de PPMA

Afin de finaliser sa mise en forme, la pièce doit alors bénéficier d'un premier traitement thermique long à basse température appelé déliantage qui va permettre l'élimination du PMMA. Ceci est nécessaire afin de permettre la dégradation et l'élimination progressive des billes et ainsi d'éviter une augmentation brutale du volume gazeux qui conduirait à des fractures et des géométries non contrôlées au sein de la matrice (figure 17).

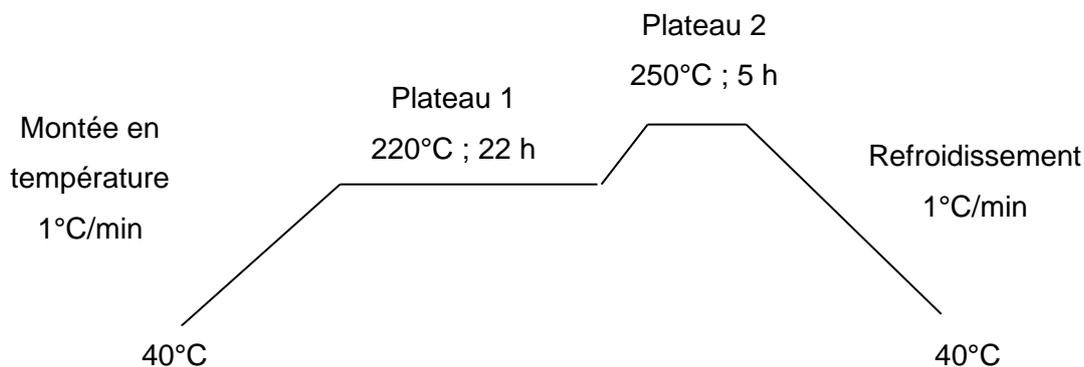


Figure 17. Exemple de cycle thermique de déliantage

4.1.3 Frittage :

La dernière étape de la mise en forme de la matrice phosphocalcique est la réalisation d'un traitement thermique à haute température de la matrice appelé frittage. Après déliantage, les édifices en céramique obtenus sont fragiles du fait du retrait de leur négatif de PMMA et le frittage va permettre de remédier à cela. En effet, celui-ci en portant la céramique à haute température (1000-1120°C) dans un four va permettre d'augmenter la cohésion du matériau et ainsi de le rendre plus résistant. La montée en température et le refroidissement sont progressifs afin de permettre la rétraction de la céramique qui est environ de 10 à 20% (figures 19 et 20)). Durant cette étape va également apparaître la microporosité du matériau qui sera variable en fonction de l'étape de synthèse du β -TCP et de celle de calcination, mais qui est découplée de la macroporosité ouverte liée à la technique de mise en forme (figure 20). Il est à noter qu'en fonction des différents paramètres de synthèse et de frittage différentes phases apatitiques peuvent être obtenues comme illustré sur les figures 21 et 22.

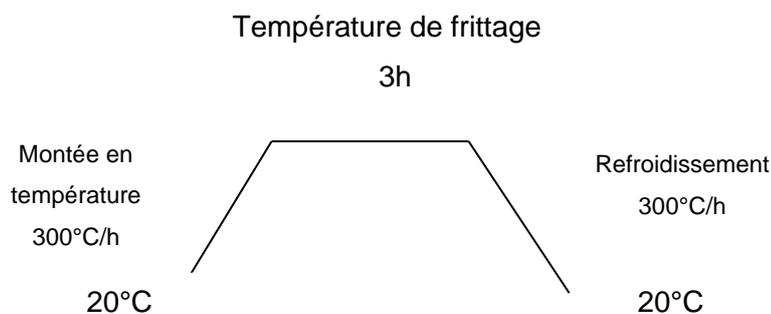


Figure 18. Exemple de cycle thermique de frittage



Figure 19. De gauche à droite, aspect d'une pièce à cru, d'une pièce après déliantage et d'une pièce après frittage

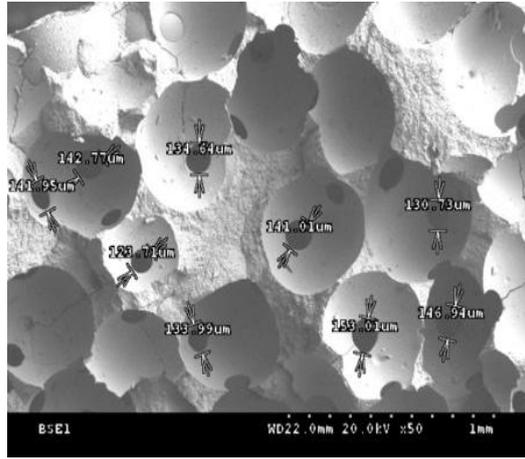


Figure 20. Evaluation au microscope électronique à balayage de la macroporosité ouverte

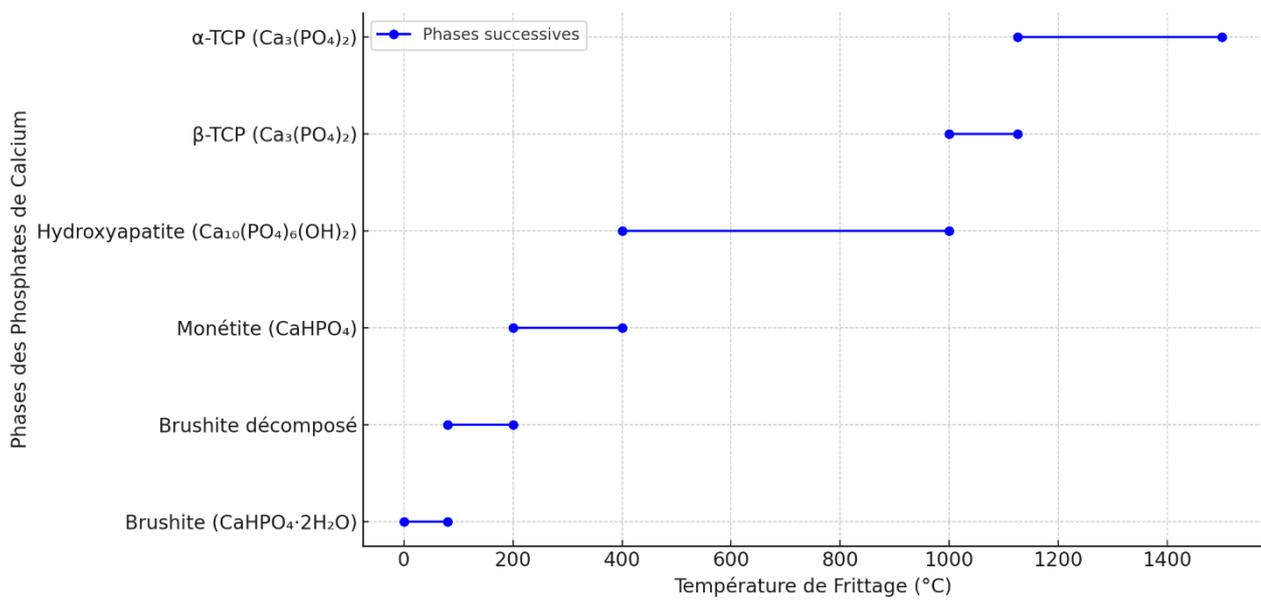


Figure 21. Phases de phosphates de calcium en fonction de la température de frittage

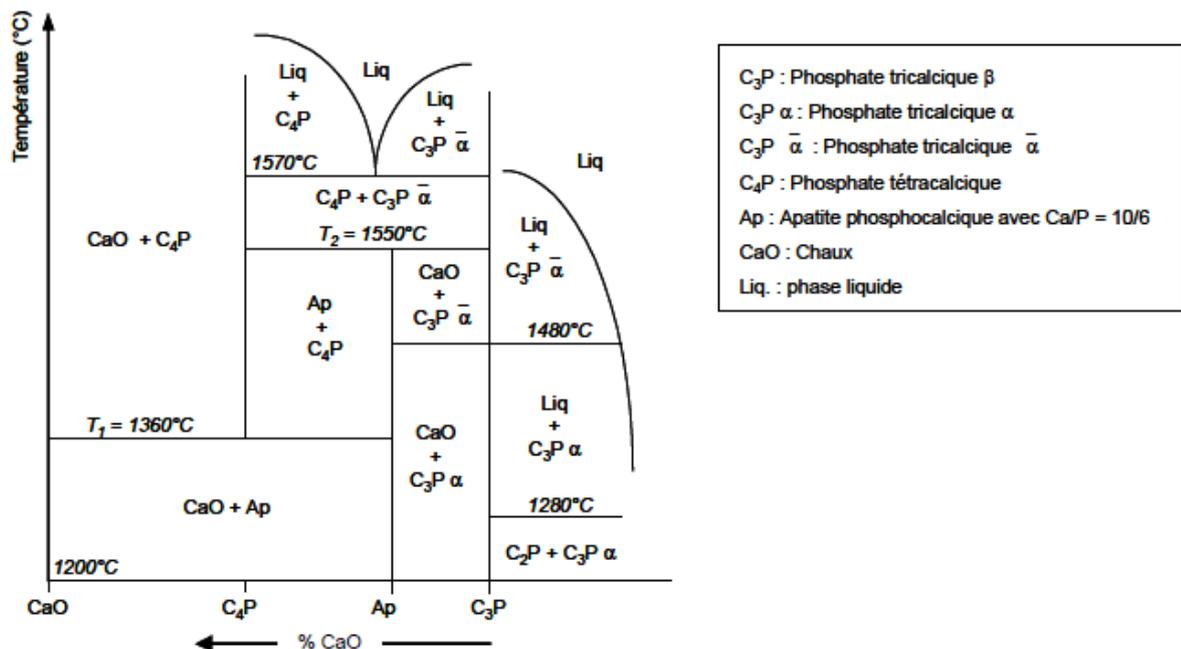


Figure 22. Diagramme de phase CaO-P₂O₅-H₂O établi pour H₂O P = 500 mm Hg

Riboud
P.V, 1973

4.2 Congélation orientée

Technique de structuration des matériaux utilisée dans la mise en forme de matrices phosphocalciques, en particulier pour créer des architectures poreuses et hiérarchiques, souvent dans les biomatériaux destinés à la régénération osseuse. Comme la technique d'imprégnation, elle se divise en différentes phases (figure 23).

4.2.1 Préparation de la suspension :

On prépare d'abord une suspension de phosphates de calcium dans un solvant aqueux (généralement de l'eau), parfois avec des additifs stabilisants.

4.2.2 Orientation de la congélation :

La suspension est ensuite congelée de manière contrôlée et orientée. Pour cela, on utilise un gradient de température pour diriger le front de congélation dans une direction précise. Par exemple, on peut refroidir un moule par le bas pour que le front de congélation progresse de bas en haut.

4.2.3 Formation des structures poreuses :

Au fur et à mesure que l'eau gèle, les cristaux de glace se forment et se propagent dans la direction du gradient thermique, entraînant une ségrégation des particules de phosphate de calcium. Ces particules sont repoussées entre les cristaux de glace qui occupent progressivement tout l'espace. Une fois que l'eau est totalement gelée, elle forme une structure de canaux de glace orientés.

4.2.4 Sublimation (lyophilisation) :

Une fois la congélation achevée, la glace est sublimée par lyophilisation. Cela laisse des canaux vides dans la matrice, créant ainsi une structure poreuse et alignée dans la direction de la congélation. On obtient alors une pièce dite verte et très fragile.

4.2.5 Traitement thermique :

Enfin, un traitement thermique par frittage va être appliqué pour améliorer la cohésion de la matrice produite.

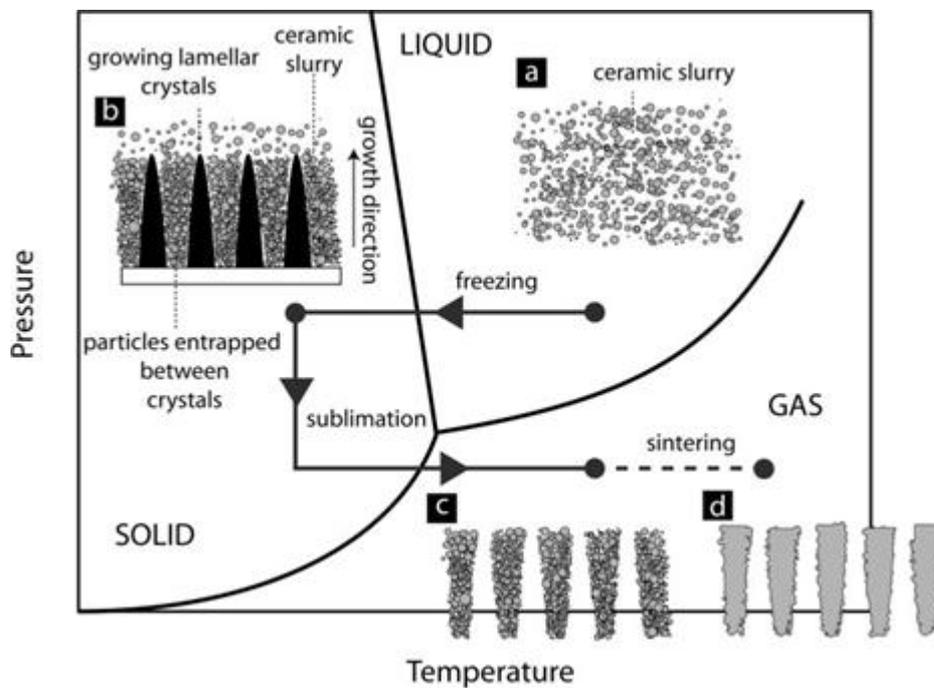


Figure 23 Schéma de mise en forme de matrice par congélation orientée

Deville S, 2008

4.3 Prototypage rapide et impression tridimensionnelle

L'impression tridimensionnelle (3D) est une technique de fabrication additive d'objets par addition de couches successives de matériau. Elle s'intègre plus largement dans un processus dit de prototypage rapide. Ce dernier consiste à réaliser des modèles numériques d'objets qui seront par la suite matérialisés grâce à différentes techniques d'impression.

Ainsi, depuis les années 80, de nombreuses techniques d'impressions de différents matériaux ont été développées, mais le processus de création de l'objet reste dans l'ensemble le même.

La première étape, indispensable au processus d'impression, est la réalisation d'un modèle virtuel de l'objet.

Ces modèles peuvent être réalisés à l'aide de différents logiciels de Conception Assistée par Ordinateur (CAO) ou de Dessin Assisté par Ordinateur (DAO). Ils peuvent également être élaborés à partir de données acquises grâce à des techniques d'imagerie numérique telles que la tomodensitométrie, l'imagerie par résonance magnétique ou cône beam. Les données acquises sont alors converties afin d'être intégrées dans un logiciel de CAO.

Par la suite, le modèle doit être exporté dans un format compatible avec les matériels d'impression en générant un fichier contenant les images des couches d'impression nécessaires. On aboutit alors à la phase d'impression à proprement parler.

Les intérêts du prototypage rapide sont multiples. Il permet un gain de temps et de coût dans la création d'objets en évitant de recourir à de nombreux outillages coûteux pour la réalisation d'objets complexes ce qui autorise la réalisation de différents prototypes de l'objet jusqu'à sa forme finale. Enfin, cette technique permet la réalisation de formes complexes qui peuvent être reproduites de manière fidèle pour toute une série de pièces.

4.3.1 Les techniques d'impression tridimensionnelles :

Il existe différentes techniques d'impression qui présente chacune des spécificités en termes de résolution, de vitesse, de coût ou encore de matériau utilisé. Dans le cadre d'imprimantes ayant comme finalité la production de pièces biocompatibles, les matériaux utilisés seront ainsi sélectionnés afin de répondre aux contraintes biologiques et mécaniques environnantes. Des étapes dites de post-traitement sont parfois nécessaires afin d'affiner la surface des objets produits.

4.3.1.1 Extrusion ou dépôt de fil fondu :

Comme son nom l'indique, cette technique consiste à chauffer un filament de matériau au niveau de la tête d'impression, ou buse d'extrusion. Celle-ci se déplace selon des axes X et Y afin de déposer en

continu le matériau sur un plateau qui lui se déplace de haut en bas selon un axe Z afin de générer l'objet à imprimer.

À ce jour, il s'agit de la technique d'impression la plus populaire du fait de son faible coût et de sa facilité de mise en œuvre.

En contrepartie, c'est la technique qui présente en général la finesse d'impression la moins élevée. En effet, bien que certaines imprimantes puissent en théorie atteindre des finesses d'impression de 50 microns par couche, on note un aspect de crénelage intercouches qui peut nécessiter une phase de post traitement afin d'améliorer le rendu final de l'objet.

Un autre inconvénient de cette technique est la nécessité d'imprimer chaque point de l'objet individuellement en déplaçant la buse d'extrusion, ce qui implique un temps d'impression assez long de chaque pièce et empêche la réalisation de pièces en parallèle sur le même plateau.

De nombreux matériaux peuvent désormais être utilisés afin de produire des objets aux différentes caractéristiques mécaniques. Les thermoplastiques les plus populaires restent à ce jour l'acide polylactique (PLA) et l'acrylonitrile butadiène styrène (ABS), mais bien d'autres matériaux sont explorés par les utilisateurs de cette technique. On peut noter en particulier le polyetheretherketone (PEEK) qui du fait de ses propriétés de résistance mécanique, chimique et thermique est utilisé dans le domaine médical (85).

4.3.1.2 Stéréolithographie ou photo polymérisation :

Différentes technologies sont regroupées sous cette appellation.

4.3.1.2.1 Stereo Lithograph Apparatus (SLA)

Elle utilise comme matériau une résine liquide qui va photo polymériser sous l'action d'une lumière ultra-violette (UV). C'est le procédé initialement développé afin de développer l'impression 3D durant les années 80. Il n'y a pas dans ce cas de buse d'impression et elle consiste en l'utilisation d'un laser venant frapper la surface d'une résine photopolymérisable. Chaque point de l'objet doit ainsi être polymérisé de manière distincte, ce qui rapproche la technique de celle de dépôt de fil fondu, mais avec une précision d'impression bien plus grande. Le laser vient donc frapper la surface d'une résine contenue dans un bac en suivant des axes X et Y et une plateforme solide située sous la surface de résine se déplace progressivement selon un axe Z de haut en bas, afin de superposer les couches imprimées. Comme dans le cas de la technique de fil fondu, une pièce à la fois peut être produite et la vitesse d'impression est limitée par la photopolymérisation indépendante de chaque point.

4.3.1.2.2 Digital Light Processing (DLP)

Ce second procédé est quasiment identique à la SLA, mais consiste à utiliser un calque au travers duquel est projeté un faisceau lumineux de plus faible intensité qu'un laser. Ainsi, il n'y a pas de déplacement du faisceau lumineux, mais c'est une couche complète qui est photopolymérisée à chaque image projetée. Ceci permet un important gain de temps d'impression d'autant plus que différents objets peuvent être projetés en parallèle, ce qui entraîne un gain de productivité intéressant pour cette technique. Toutefois, en contrepartie, le DLP présente une résolution d'impression inférieure à la SLA.

4.3.1.2.3 Le Continuous Light Interface Production (CLIP)

Elle est quant à elle, une technique dérivée du DLP, qui contrôle l'environnement chimique lors de l'impression afin de permettre un gain en termes de vitesse d'impression. Moins répandue que la technique par fil fondu, cette technique de mise en forme et principalement le DLP se reprend de plus en plus du fait de la qualité des pièces imprimées et de ses coûts d'impression.

4.3.1.3 Frittage sélectif par laser :

Le Selective Laser Sintering (SLS) utilise comme la stéréolithographie un laser. Mais dans ce cas, le laser ultraviolet sert à appliquer un traitement thermique à haute température qui va entraîner la solidification de grains d'un matériau sans fusion de celui-ci. Le laser vient donc frapper la surface d'une poudre contenue dans un bac en suivant des axes X et Y. Après frittage d'une première couche, une nouvelle couche de poudre est déposée et lissée avant de reproduire le processus jusqu'à l'obtention de l'objet. Cette technique est largement utilisée dans l'industrie et sert notamment à la production de matériel chirurgical d'ostéosynthèse sur mesure. Cette technique présente comme principal inconvénient un coût de production élevé.

4.3.1.4 Projection ou jet de matière :

Cette technique consiste dans le dépôt de couches successives de résines liquides photo polymérisables sur un plateau en l'exposant à une lumière ultraviolette qui va entraîner leur durcissement. Elle se rapproche du DLP dans son concept et permet la production de pièces présentant une bonne résolution d'impression en maintenant un coût de production accessible.

4.4 Conclusion

Pour notre part, nous avons choisi de développer une technique d'impression basée sur le DLP du fait de la précision suffisante dans la réalisation de nos pièces et de ses coûts de mise en œuvre. Comme pour la technique de mise en forme classique par coulée de barbotine, les pièces produites vont nécessiter une phase de déliantage puis de frittage afin d'obtenir la matrice finale. Cette étape intermédiaire de pièce verte est très sensible du fait de la fragilité des pièces. Par ailleurs comme pour la technique de mise en forme dite classique, la phase de frittage va induire un retrait des pièces qui dépendra de la charge en matière sèche de la barbotine ainsi que de la température de frittage. Ceci accroît encore la finesse de dimension des structures réalisables, mais nécessite de nombreux essais de développement afin de maîtriser les paramètres de mise en forme et d'obtenir des pièces possédant les caractéristiques mécaniques et architecturales souhaitées.

5 Vascularisation et ingénierie tissulaire

Comme nous l'avons précédemment développé, la vascularisation joue un rôle central dans la physiologie osseuse. Elle permet d'une part les échanges moléculaires pour la communication intercellulaire, mais également les échanges de gaz, de nutriments et l'élimination des déchets nécessaire à la survie cellulaire. Toutefois, le développement d'une néo-angiogenèse est très lent, de l'ordre de moins de 5 $\mu\text{m}/\text{h}$ (86,87) et la diffusion d'oxygène autour des vaisseaux, est limitée à une distance de 150 à 200 μm (88,89).

Ainsi, en plus des différents paramètres pris en compte en ingénierie tissulaire osseuse que sont l'utilisation de cellules ostéoprogénitrices, de matrices ostéoconductrices de facteurs de croissance et la prise en compte des contraintes mécaniques, la vascularisation des tissus à reconstruire s'impose comme un élément prépondérant supplémentaire (90).

En pratique clinique, c'est une donnée fondamentale qui va orienter vers le choix de la reconstruction à réaliser. Ainsi, dans des tissus présentant une bonne trophicité et pour un faible volume à reconstruire, on pourra se tourner vers la réalisation de greffes osseuses non vascularisées. Au contraire, en cas de tissus présentant une trophicité défailante ou d'un important volume osseux à reconstruire, on se tournera vers la réalisation d'un lambeau libre osseux. Le grand avantage de ces derniers est qu'ils possèdent une vascularisation propre qui leur permet de s'affranchir de la nécessité de revascularisation par les tissus environnants.

Un défi majeur de l'ingénierie osseuse et donc de pouvoir assurer la vascularisation de matrices de grands volumes. Dans ce contexte, différentes approches de développement d'une microvascularisation ont été étudiées en ingénierie tissulaire et un résumé est présenté dans le tableau 2.

Vascularization Strategy	Advantages	Disadvantages
Angiogenic growth factors	technically simple	optimization of drug-release system is necessary
	numerous angiogenic growth factors are commercially available	time delay between implantation and achieving sufficient blood supply of implant
	combination of angiogenic and osteogenic growth factors is possible	short half-life of some angiogenic growth factors
Cell-based strategies	prevascularization of vessel networks in the implant is possible by seeding endothelial cells	limited survival of implanted cells
	combination of endothelial cells and bone-forming cells is feasible	in a prospective clinical setting, autologous cells have to be used
Biofabrication of vessel networks	precise control of the spatial distribution of cells	limited survival of implanted cells
	combined printing of cells and drug release hydrogels is feasible	
	combined printing of endothelial cells and bone-forming cells is feasible	in a prospective clinical setting, autologous cells have to be used
	acceleration of vessel formation by spatial alignment of endothelial cells	
Surgical strategies	immediate blood supply can be achieved	technically challenging
	combination of immediate vascularization and naturally occurring vascular sprouting in the AV-loop model	two stage approach is necessary to create a vascularized implant
	integration of growth factors and cells is feasible in the AV-loop model	

Tableau 2. Stratégies de vascularisation en ingénierie tissulaire osseuse

Simunovic F, 2021

5.1 Approches chirurgicales

Depuis la création de la chirurgie de reconstruction tissulaire, la compréhension des différents phénomènes impliqués dans la réussite ou l'échec des procédures est une problématique centrale. Celle-ci nous a progressivement amené au développement de techniques utilisant les propriétés de cicatrisation afin de rendre possible la reconstruction de pertes de substance plus étendues et complexes. On peut ainsi citer, la technique des lambeaux libres qui transpose les tissus ainsi que leur vascularisation propre ou la distraction ostéogénique qui détourne la cicatrisation tissulaire osseuse afin de générer des tissus en plus grande quantité (92). C'est l'association de ces chirurgies de reconstruction dites « conventionnelles » avec le l'ingénierie tissulaire, qui a poussée au développement du concept de « bioréacteur in vivo ».

Différentes approches sont ainsi étudiées dans le contexte de l'ingénierie tissulaire osseuse.

5.1.1 Membrane induite :

La technique des membranes induites est utilisée depuis les années 80(93). Celle-ci est réalisée en 2 étapes.

La première consiste à positionner au niveau de la perte de substance osseuse un « spacer » de ciment chirurgical souvent composé de poly méthyl méthacrylate (PMMA). Après l'implantation, une période de plusieurs semaines est respectée afin d'induire une réponse locale à corps étranger qui va provoquer la formation d'une membrane au contact du ciment.

La seconde étape consiste à réintervenir afin de retirer ce ciment et réaliser une greffe d'os non vascularisé.

Cette membrane présente une épaisseur variable de 100 à 1000 m et se compose de 2 couches. Une couche interne qui contient des cellules au contact du ciment et une couche externe plus fibreuse (94). Différents types cellulaires impliqués dans la réaction inflammatoire et cicatricielle osseuse sont mis en évidence, tels que des lymphocytes et macrophages, des cellules endothéliales, et également des cellules des lignées ostéoblastiques et ostéoclastiques (95–97). De même, est observée au sein des membranes une prolifération vasculaire.

Sont également présents, de manière non exhaustive, des molécules et facteurs de croissance tels que le BMP2, le TGFb, le VEGF, l'ANG2, le FGF2, IL6, IL8 et 10 ou encore le TNF (97,98).

Les mécanismes impliqués dans la capacité de cicatrisation accrue de cette technique ne sont pas tous identifiés à ce jour, mais celle-ci contribue à un taux de succès très important de ces greffes sur des pertes de substance étendues (99).

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, les propriétés de ces membranes induites apparaissent d'un intérêt majeur en augmentant les capacités de cicatrisation osseuse locale. Des essais ont ainsi été réalisés, en remplaçant la greffe osseuse par des biomatériaux tels que le TCP ou le BCP mais avec des résultats non concluants.

Toutefois, la meilleure compréhension des mécanismes de cicatrisation osseuse au contact de ces membranes devrait en faire à terme un élément à intégrer afin d'optimiser nos techniques d'ingénierie tissulaire.

5.1.2 Lambeaux libres :

Plus proche du concept de bioréacteur vivant est la combinaison de techniques d'ingénierie tissulaire avec celle des lambeaux libres.

Le concept de cette technique implique une prise en charge en 2 étapes avec dans un premier temps l'implantation de cellules, molécules ou matrice au sein d'un tissu (généralement un muscle) qui assure une très bonne vascularisation. Après une période d'incubation, on prélève le lambeau et les tissus qu'il contient avant de les transposer et anastomoser le pédicule du lambeau à des vaisseaux receveurs (100,101). On essaie ainsi de garantir ainsi une bonne vascularisation aux tissus reconstruits en s'affranchissant de la trophicité des tissus environnants. Ceci permet également de s'appuyer sur l'ensemble des mécanismes de cicatrisation présents in vivo que nous ne savons reproduire in vitro.

Des essais humains ont été réalisés avec par exemple l'utilisation de cellules pluripotentes induites associée à du TCP et du BMP2. Après incubation, ces tissus ont été implantés dans le muscle grand droit du patient puis après 8 mois, le muscle et les tissus qu'il contenait ont été transférés au niveau d'une perte de substance maxillaire et les vaisseaux du lambeau anastomosés (102). Un autre exemple est celui d'une reconstruction mandibulaire à l'aide d'une cage de titane associée à des blocs osseux, du BMP 7 et de la moelle du patient. Après implantation, les tissus ont été transférés au sein du lambeau de grand dorsal après une période d'incubation de 7 semaines (103). Cette technique présente ainsi l'avantage de ne pas prélever d'os au patient et de s'assurer de la bonne vitalité des tissus avant leur transplant, toutefois, elle nécessite toujours la réalisation d'un lambeau libre et la morbidité qui lui est associée ainsi qu'une période de prise en charge s'étalant sur plusieurs mois.

5.1.3 Boucle artérioveineuse :

Afin de se rapprocher de la technique du lambeau libre tout en évitant la morbidité du site donneur lié à celui-ci, la technique de la boucle artérioveineuse semble une alternative. Elle consiste à anastomoser une artère et une veine ou utiliser un greffon veineux entre une artère et une veine. On vient alors déposer des cellules, molécules ou matrice au contact de ce pédicule. On observe alors comme dans les construits osseux au sein de lambeau, une néo-angiogenèse qui va se développer et apporter la trophicité au construit (104). Bien que des essais sur modèle animal ou sur l'homme ont démontré son efficacité, cette technique reste d'un emploi limité du fait du temps nécessaire à la croissance vasculaire au sein du construit (105–108).

5.2 Induction d'une néovascularisation par les tissus environnants

Une voie de recherche en ingénierie tissulaire consiste à développer une néovascularisation à partir des tissus environnants.

On peut dans ce cadre utiliser des facteurs de croissance qui seront intégrés au sein de matrices ou d'hydrogels qui vont permettre leur relargage progressif et contrôlé (109,110). En effet, le contrôle spatial et temporel des facteurs de croissance est essentiel au développement de tissus fonctionnels. Par exemple, concernant le VEGF, il a été démontré qu'un relargage initial trop rapide conduit à la formation de vaisseaux non fonctionnels et immatures alors qu'un relargage mieux contrôlé va permettre la croissance de vaisseaux fonctionnels et matures (111). De même, l'utilisation de différents facteurs de croissance ayant un effet synergétique peut permettre une amélioration de la cicatrisation osseuse en coordonnant la croissance vasculaire et osseuse (112).

Une autre approche va se baser sur la forte interaction présente entre cellules des lignées vasculaires et osseuses et dans ce cadre des cocultures sont réalisées (113). De nombreux types cellulaires ont été étudiés dans ce cadre tel que les ostéoblastes, les cellules ostéoprogénitrices issues de la moelle osseuse, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules souches embryonnaires ou encore les cellules souches pluripotentes induites (114–116). Toutefois, les lignées ostéoblastiques immortalisées sont les plus fréquemment utilisées. Bien que leurs propriétés puissent différer des ostéoblastes, leur facilité d'emploi et de la reproductibilité des résultats en ont fait un modèle de choix (117). Les cellules endothéliales peuvent quant à elles être issues d'artères, veine ou capillaires et présentent de ce fait une grande hétérogénéité de propriétés (118). Le modèle le plus proche serait celui des cellules endothéliales issues de la microvascularisation, mais du fait de la difficulté à leur prélèvement, on leur préfère l'utilisation de cellules endothéliales de veines de cordon ombilical humain (HUVECs)(119).

Les communications intercellulaires peuvent se réaliser par voie paracrine en libérant des molécules dans le milieu intercellulaire, mais également par contact intercellulaire ou encore par échanges cytoplasmiques dans le cadre de « gap junctions ». Ainsi, lors d'essais de coculture, on peut tester ces différentes voies de communication en autorisant ou non les contacts cellulaires. On a ainsi pu démontrer qu'un contact direct entre cellules angiogéniques et ostéogéniques permet une interaction optimale en reproduisant au mieux les conditions d'interactions physiologiques (120,121). Concernant les interactions cellulaires, il est également nécessaire de prendre en compte les conditions de cultures sur matrices bi ou tridimensionnelles qui vont avoir un impact direct sur l'architecture et les interactions cellulaires, les matrices tridimensionnelles se rapprochant plus des conditions physiologiques de croissance des cellules (122). Il est toutefois à noter que dans l'ensemble des techniques évoquées précédemment, il est impossible d'avoir un contrôle précis sur l'architecture du réseau vasculaire formé.

5.3 Bio-impression d'un réseau vasculaire

Une seconde stratégie de vascularisation consiste dans le développement d'un réseau vasculaire. Dans ce cadre les techniques de prototypage rapide et de bioprinting vont trouver tout leur intérêt en permettant une répartition tridimensionnelle contrôlée des cellules qui peuvent être de différentes origines, elles constituent de ce fait une avancée majeure en comparaison aux techniques classiques de revascularisation. Les techniques de bioprinting sont ainsi adaptées de techniques d'impression de matériaux conventionnelles. Ainsi, on peut réaliser l'impression de cellules au sein de matrices d'hydrogel, à l'aide de bioencres(123), en reproduisant la technique d'impression par jet d'encre. Les hydrogels employés pour la réalisation des matrices doivent donc présenter des propriétés de cytocompatibilité et de stabilité mécanique (124). L'impression à jet d'encre est largement utilisée, car elle permet une haute vitesse d'impression et une bonne résolution, mais nécessite des bioencres avec une faible viscosité. Dans les techniques d'impression, il faut également citer la technique par extrusion, qui va utiliser une microbuse pour guider l'impression. Cette technique permet l'utilisation d'encres avec une viscosité plus variée et présente également une bonne résolution, mais avec en contrepartie une vitesse d'impression plus faible (125). À ce jour, on va distinguer deux types d'approches dans la bio-impression.

D'une part, l'impression de cellules endothéliales afin d'induire la formation de néovaisseaux. Ces cellules endothéliales, contenues dans une bioencre sont donc déposées afin de reproduire l'architecture d'un microvaisseau. Par la suite après mise en culture les interactions cellulaires vont conduire à la formation de lumières qui vont mimer l'organisation des capillaires vasculaires (126,127). D'autre part, l'impression de structures destructibles qui sont les négatifs de réseaux vasculaires. Ceux-ci sont imprimés à l'aide de bioencres résorbables au sein de matrices d'hydrogels contenant des cellules endothéliales. Une fois l'impression achevée, les structures sont résorbées par traitement enzymatique, mécanique ou encore thermique. Les canaux ainsi formés sont bordés des cellules endothéliales contenues dans la matrice. Elles vont alors s'organiser afin de former une couche uniforme monocellulaire (128–130).

6 Plasma riche en plaquettes (PRP)

Les plaquettes ou thrombocytes sont un élément figuré du sang. Elles sont issues de la fragmentation de mégacaryocytes. Elles mesurent de 2 à 3 μm et circulent dans le sang entre 7 et 10 jours à une concentration approximative de $150 \text{ à } 400 \times 10^3 / \mu\text{l}$.

Leur rôle principal est d'arrêter les saignements en intervenant lors de l'hémostase primaire. Elles sont activées lors de ces traumatismes par le contact du collagène qui se retrouve alors exposé au sein de la lumière vasculaire et contribuent à la cicatrisation des parois vasculaires et des tissus qui les entourent. Durant leur première heure d'activation, les plaquettes présentent une très importante activité en s'agrégeant et en libérant des facteurs de croissance et cytokines stockées dans leur cytoplasme et granules α , puis, par la suite vont continuer à les synthétiser et sécréter pendant environ 1 semaine. Ce seront plusieurs centaines de types de protéines différentes qui sont sécrétées et présentes des effets sur différents types cellulaires qui vont conduire à leur migration, prolifération ou encore stimuler l'angiogenèse, ce qui va permettre la régénération tissulaire (131). Parmi les peptides libérés par les granules α , on peut citer, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance transformant β_1 (TGF- β_1), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le facteur de croissance basique des fibroblastes (FGF) ou le facteur de croissance épidermique (EGF). Les types cellulaires concernés par les effets de ces facteurs de croissance sont variés et l'on peut citer de manière non exhaustive les ostéoblastes, cellules endothéliales, chondrocytes, myocytes, fibroblastes ou encore des cellules souches mésenchymateuses (132–137). Le PDGF jouera un rôle dans le chimiotactisme, la prolifération cellulaire, la différenciation et l'angiogenèse et avec les bFGF et TGF- β_1 , ils contribuent à la prolifération des ostéoblastes humains (138–140).

L'intérêt du PRP en comparaison à l'administration de facteurs de croissance recombinants viendrait d'une part de la libération progressive des différents facteurs de croissance qui aurait un effet positif sur la cicatrisation tissulaire. Le coût et la facilité de production du PRP étant un autre avantage en comparaison de l'utilisation de molécules recombinantes (141).

Le plasma riche en plaquettes (PRP) est comme son nom l'indique du plasma enrichi en plaquettes. Afin d'être qualifiée de PRP, la concentration plaquettaire de celui-ci doit être d'au minimum $200.000 / \mu\text{l}$ (142). En parallèle de cette concentration plaquettaire, on va également observer un accroissement de la concentration des facteurs de croissance selon un facteur de 3 à 5. Sa préparation va utiliser le gradient de densité présent entre les différents éléments figurés du sang afin de concentrer les plaquettes. La centrifugation est la méthode de choix pour cette préparation. Celle-ci va aboutir à l'agrégation des érythrocytes au fond du tube et à l'autre extrémité à du sérum surnageant contenant les plaquettes. Un culot de leucocytes va se former à la jonction entre les érythrocytes et le plasma surnageant et la concentration maximale de plaquettes va être observée à ce niveau, un gradient

plaquettaire décroissant étant observé dans le plasma en s'éloignant du culot leucocytaire. C'est à ce niveau de concentration maximal que seront prélevées les plaquettes. Dans la plupart des protocoles, une seconde étape de centrifugation sera réalisée afin de concentrer les plaquettes et éliminer les érythrocytes encore présents.

Depuis plusieurs dizaines d'années, des essais cliniques sont réalisés à partir du PRP afin d'améliorer la cicatrisation tissulaire (143,144). Il est également utilisé pour d'autres applications telles que ses effets anti-inflammatoires et analgésiques (145–147). Dans le cadre de la recherche fondamentale, il a été démontré que la perfusion de PRP au sein de microvaisseaux conçus in vitro va conduire à une accélération de la maturation et de la fonctionnalisation de leur endothélium (148). Concernant l'effet sur l'ostéogenèse, des essais in vitro et in vitro ont montré que l'utilisation de PRP induit une augmentation des propriétés d'ostéoinduction et d'ostéogenèse des matrices de β -TCP (149). Toutefois, les résultats obtenus lors de différents essais sont variables et cela peut s'expliquer par l'absence de standardisation de la production de PRP ce qui conduit à une probable variabilité de sa composition finale et donc de ses effets biologiques. Ainsi, pour certains, il favoriserait la différenciation de cellules mésenchymateuses en ostéoblastes et pour d'autres en chondrocytes (150,151). D'autres études centrées sur la concentration plaquettaire et ses effets sur la croissance cellulaire ont quant à elles montré qu'une faible concentration n'apporterait pas une stimulation efficace, et une concentration trop importante conduirait à une inhibition (152,153). Ces résultats peuvent ainsi s'expliquer par la variabilité des protocoles de production qui aboutissent à des PRP de compositions variables qui ne sont la plupart du temps pas détaillées. Les caractéristiques du sang prélevé telles que le taux d'hématocrite ou la concentration plaquettaire, de même qu'un éventuel stockage vont également avoir un effet sur la composition du PRP produit et les facteurs de croissance qu'il contient (154,155). La caractérisation des PRP produits ainsi que la standardisation des protocoles de production semblent ainsi un élément central afin de déterminer ses effets biologiques (156–158). Il faut toutefois noter en application clinique que les variations interindividuelles ou chez un même individu de la concentration plaquettaire au cours du cycle nycthéral rendent plus aléatoire les résultats à attendre du PRP. Le PRP semble toutefois un excellent candidat dans le cadre de l'ingénierie osseuse du fait de ses effets positifs sur l'angiogenèse et l'ostéogenèse.

Chapitre 2 : Méthodes expérimentales et développement de matériel

1 Synthèse des poudres de β -TCP

Lors de ce travail, nous avons décidé de nous focaliser sur la synthèse de poudre par voie humide afin d'obtenir une phase de β -TCP quasi pure, comportant moins de 4% d'HA.

Les poudres de phosphate de calcium ont été préparées par une technique de précipitation aqueuse utilisant une solution de phosphate diammonique $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Carlo Erba, France) et une solution de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Brenntag, France) (159,160). Au sein d'un réacteur de 50 litres était introduite une solution de nitrate de calcium tétrahydraté $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dissout dans 16 litres d'eau distillée. Une agitation constante à 75 tours/minute était réalisée et un contrôle de la température à 30°C à l'aide d'un thermocryostat. Une solution d'hydrogénophosphate de diammonium, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ diluée dans 16 litres d'eau stérile était injectée progressivement à l'aide d'une pompe péristaltique avec un débit de $2 \times 100 \text{ ml/min}$. Le pH du milieu était maintenu à une constante de 6.4 par injection ponctuelle d'une solution d'ammoniaque à 30% à l'aide d'un système de contrôle comprenant une sonde de mesure de pH couplée à une pompe doseuse. Ces paramètres avaient pour but de stabiliser le TCP en phase β et éviter la formation d'hydroxyapatite. Les rapports molaires Ca/P initiaux étaient de 1,5 avec un temps de maturation de 20 heures. Par la suite, le réacteur était vidé et le précipité filtré sur Büchner. Les gâteaux de poudres ainsi obtenues étaient rincés à l'eau distillée afin de nettoyer la majeure partie du nitrate d'ammonium encore présent à cette étape. Enfin, les poudres étaient séchées à 70°C pendant 24h au sein d'étuves (figure 24).



Figure 24. Réacteur de synthèse par voie aqueuse de poudres phosphocalciques et pains de poudre

Celles-ci ont ensuite été calcinées à 850°C pendant 3 heures avec une vitesse de montée et descente de 5 °C/minute. Ce processus de calcination permet la transformation de la phase de phosphate de calcium apatitique en β -TCP, l'élimination des nitrates résiduels et la réduction de la surface spécifique des grains, ce dernier élément, permettant de faciliter l'utilisation de la poudre dans notre technique d'impression 3D.

Durant cette calcination, les cristallites s'agglomèrent et il est ainsi nécessaire de réaliser un broyage des agglomérats afin de réhomogénéiser la production. Cette étape permet d'augmenter la surface spécifique de la poudre brute ce qui conduit à une modification de ses propriétés de mise en suspension et de frittage et garantit l'homogénéité des pièces produites.

Ainsi, la poudre était broyée au sein de jarres de polyéthylène haute densité d'une contenance de 6,6 l au sein desquelles étaient introduites 9,1 kg de billes de zircone. La surface spécifique était mesurée par la méthode BET (Micromeritics, Flow Sorb 3) après un dégazage des poudres à 250°C pendant 24 heures et les surfaces spécifiques mesurées étaient de 70m²/g (avant calcination) à 5,5 m²/g après broyage.

2 Caractérisation des poudres

Lors des phases de synthèse et de calcination, malgré le contrôle le plus strict des différents paramètres, la synthèse du β -TCP peut produire des molécules d'Hydroxy Apatite et de Pyrophosphate de Calcium en quantité variable. La variation de ces proportions a un impact sur les propriétés biologiques et physiques des matériaux et principalement sur leur résistance mécanique. Afin d'être caractérisées la poudre brute a subi une calcination à 1000°C pendant 15 heures afin d'augmenter la proportion de phases cristallines.

Ainsi, nous avons utilisé la diffraction à rayons X (DRX) et la spectrométrie infrarouge (FT-IR) pour étudier la composition de notre production. Ainsi, nous avons utilisé la diffraction des rayons X et la spectrométrie infrarouge pour étudier la composition de notre poudre. Cependant, la poudre peut contenir d'autres phases en quantités trop faibles pour être détectées par les rayons X. Dans ce cas, un test phénolique négatif a été réalisé. Dans ce cas, un test négatif à la phénolphthaléine indique que la poudre ne contient pas de traces de chaux (CaO) (161). La phénolphthaléine est un indicateur coloré qui passe d'incolore au rose pour un pH supérieur à 8,2, ce qui permet de détecter les traces de CaO.

2.1 Diffraction à rayons X

La diffraction par rayons X (DRX) permet d'identifier et de quantifier les différentes phases cristallines qui composent la poudre en étudiant les distances entre les plans cristallins spécifiques du matériau synthétisé.

Les rapports calcium/phosphate (rapport Ca/P) ont été déterminés par analyse de diffraction des rayons X sur poudre (Rigaku Miniflex) en utilisant le rapport d'intensité des raies HA (211)/TCP (0210) selon la méthode des ajouts proportionnés (162,163). Dans ce contexte, les raies d'intérêt sont (210) ($2\theta = 28.971^\circ$) ou (211) ($2\theta = 31.772^\circ$) pour l'HA et (0210) ($2\theta = 31.027^\circ$) pour le β -TCP. Cependant, pour des proportions d'HA inférieures à 30%, la droite (210) est difficilement observable, et nous préférons donc dans ce cas la droite (211) qui reste exploitable pour des taux d'HA supérieurs à 0,5%.

En fonction des données recueillies, on peut alors calculer le pourcentage massique de β -TCP dans les mélanges biphasés HA/ β -TCP.

2.2 Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier

La présence de pyrophosphate de calcium a été contrôlée par spectroscopie infrarouge sur un spectromètre à transformée de Fourier (Jasco-FT/IR-460 Plus) et vient compléter celle réalisée au DRX. Ainsi, trois échantillons de matrices imprimées et coulées ont été broyés pour obtenir des poudres qui ont été caractérisées avec le même protocole.

Les spectres infrarouges sont enregistrés en transmission par un spectrophotomètre à transformée de Fourier entre 400 et 4000 cm^{-1} (Jasco FT/IR-460plus) sur des pastilles contenant 298 mg de bromure de potassium (KBr) et 2 mg de poudre de β -TCP. Ces mesures permettent de déterminer la présence ou l'absence de CPP dans le β -TCP en observant, en particulier, les bandes caractéristiques CPP à 720 cm^{-1} et 1200 cm^{-1} .

Peuvent par ailleurs être étudiées, les bandes 757 cm^{-1} et à 434 cm^{-1} qui signent la présence de la forme α du pyrophosphate de calcium ou encore les bandes 1210 cm^{-1} et 1185 cm^{-1} à 723 cm^{-1} et à 454 cm^{-1} qui elles sont caractéristiques de la forme β du pyrophosphate de calcium. L'absence de ces différentes bandes lors de l'analyse par FT-IR indique donc une contamination indétectable par le CPP de la production de β -TCP. L'absence de bande autour de 3 570 cm^{-1} est recherchée pour vérifier la pureté du β -TCP et l'absence de phases hydroxylées comme l'hydroxyapatite.

La spectroscopie infrarouge a été préférée aux techniques quantitatives telles que la Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS) ou la Spectroscopie dispersive en longueur d'onde des rayons X (WDS) En effet, utilisant la bande d'absorption 721 cm^{-1} caractéristique de la vibration d'étirement de la liaison P-O-P du groupe Pyro, la spectroscopie infrarouge est la méthode la plus sensible pour détecter la présence de pyrophosphate dans le TCP (figure 25).

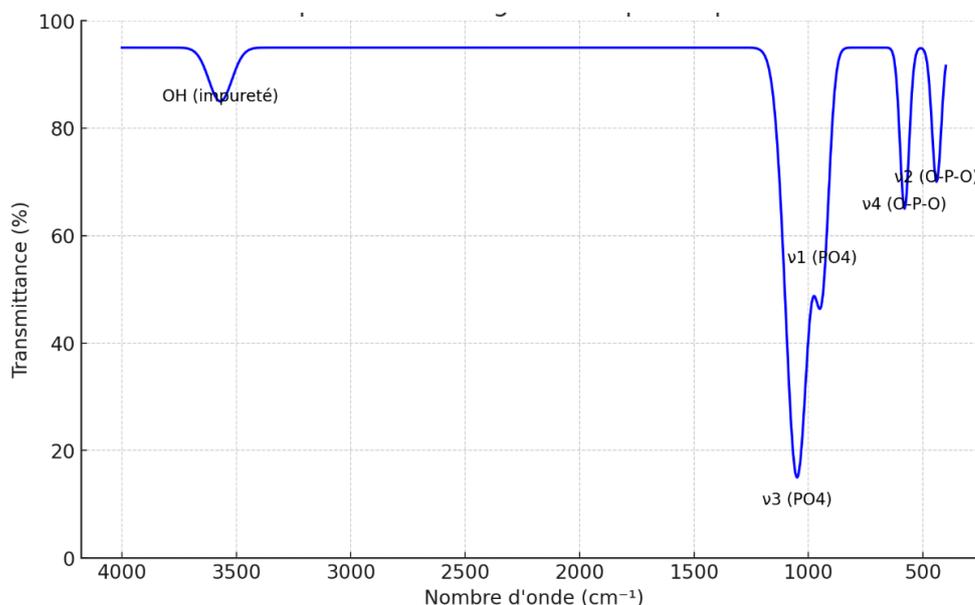


Figure 25. Spectre Infrarouge Théorique du β -TCP

3 Recherche de polluants ou d'éléments traces dans la poudre produite

Afin de permettre de quantifier la présence d'éléments traces et en particulier de métaux lourds, une analyse par spectrométrie à plasma à couplage inductif a été réalisée. Les échantillons ont été ionisés à l'aide d'une torche à plasma, produisant des ions détectés par spectroscopie de masse. Deux échantillons ont été testés. Le premier était composé de poudre prélevée après le processus de synthèse et le second était une pièce imprimée.

Cette recherche a été réalisée par une société externe (FILAB', Dijon, France).

Les éléments recherchés étaient : mercure (Hg), arsenic (As), plomb (Pb), cadmium (Cd), antimoine (Sb), chrome (Cr), nickel (Ni), Baryum (Ba), Cuivre (Cu).

4 Techniques de mise en forme des matrices

4.1 Prototypage rapide par DLP

4.1.1 Mise en forme assistée informatiquement :

Compte tenu de nos objectifs, nous avons décidé de concevoir différentes pièces. Pour la culture d'ostéoblastes, des matrices non macroporeuses, constituées de disques de 6 mm de diamètre et de 2 mm d'épaisseur, ont été conçues pour être introduites dans des plaques de 96 puits. Pour étudier la précision de notre technique d'impression, nous avons conçu deux cubes microporeux : le premier de 5 mm de côté et 4 fenêtres carrées de 1 mm de large par côté et le second de 10 mm de côté et 4 fenêtres carrées de 2 mm par côté. L'ensemble des modèles tridimensionnels des pièces utilisées durant ce travail ont été développées à l'aide du logiciel Windows 3D Builder (version 5.2, Microsoft, Redmond, WA, USA) sous forme de fichiers STL. Afin de prendre en compte le retrait des échantillons pendant le processus de frittage, leurs modèles numériques ont été surdimensionnés.

Les modèles étaient ensuite découpés en couches de 50 micromètres (μm) d'épaisseur à l'aide du logiciel Creation workshop (Version 1.0.0.75, freeware, Steve Hernandez). Les fichiers étaient alors transmis au logiciel de commande de l'imprimante (Cryoceram, Cryoberyl Software Version 1.2, Cryoceram, Bry, France).

4.1.2 Impression tridimensionnelle par DLP :

La technique d'impression retenue et développée avec la société Cryoberyl était celle d'une imprimante DLP descendante (figure 26).

Celle-ci consiste en la projection d'un masque dynamique noir et blanc de lumière ultraviolette sur la surface d'une barbotine associant des résines photopolymérisables et une suspension de poudre phosphocalcique. L'objet en cours de création repose sur un plateau motorisé qui est progressivement immergé après chaque couche dans la barbotine sous contrôle d'un moteur pas à pas monté sur un guide linéaire de haute précision. Cette descente contrôlée de l'objet permet l'addition progressive des couches qui le compose (figure 27). Une résolution mécanique de moins d'un micron a pu être obtenue dans l'axe Z, et le projecteur DLP a pu fournir des masques dynamiques avec une résolution dans l'axe XY de près de 40 µm. Notre résolution théorique maximale couche/Z était de 50 µm avant frittage. Les dimensions maximales imprimables sont de 95 × 50 × 150 mm.



Figure 26. Imprimante développée pour ce projet

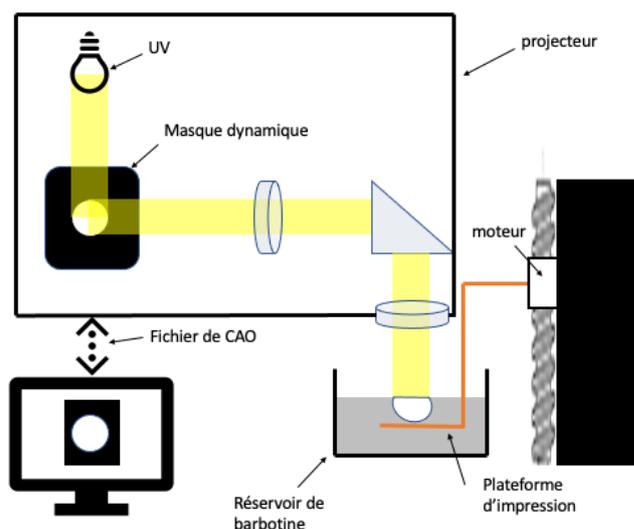
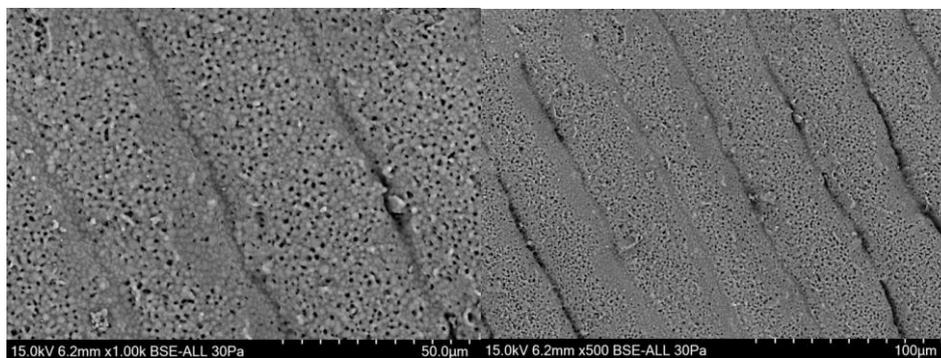


Figure 27. Principe de l'impression descendante par DLP

La barbotine utilisée dans cette technique est différente de celles utilisées dans les techniques de coulée conventionnelles. Les poudres de β -TCP ont été incorporées dans une résine acrylique photosensible qui constituait le réel « squelette » de l'objet imprimé avant les phases de déliantage et de frittage. Lors de ce travail, la poudre de β -TCP était incorporée dans une résine acrylique photosensible ($\lambda = 350-400$ nm) (T4-CaP ; CryoBeryl software, Bry, France) pour obtenir des barbotines à 68% (poids/poids) de matière sèche qui ont été homogénéisées à 150 rpm (rotations par minutes) par broyage planétaire pendant 30 min (PM100 ; Retsch, Haan, Allemagne).

Comme pour les barbotines conventionnelles, le taux de charge en matière a un impact direct sur la densité et la microporosité de l'objet final. En outre, afin de maintenir la planéité de la surface de la barbotine, aucun dispositif externe de type racleur ou égaliseur n'était utilisé. La suspension devait donc présenter une faible viscosité, lui conférant un temps de relaxation court, afin de réduire au maximum le délai entre l'impression de deux couches successives.

Le temps de projection du masque dynamique sur la barbotine était de 6 secondes par couche. Entre chaque exposition, l'échantillon était immergé dans la barbotine avant de remonter à 50m de la surface afin de réaliser la polymérisation de la couche suivante. Un délai de 10 secondes était nécessaire entre l'impression de chaque couche afin d'assurer la planéité de la surface de la barbotine. Les pièces produites sont dites vertes et doivent bénéficier d'une phase de déliantage et de frittage afin d'obtenir les pièces finales. Comme pour les mises en forme conventionnelles, cette dernière étape aboutit à un retrait de pièces et donc à un accroissement de la définition de la technique d'impression (figure 28)



(a)

(b)

Figure 28. Images d'une pièce imprimée au microscope électronique avec une résolution de 50 μ m. On constate qu'aux grossissements 500x (a) et 100x (b), les couches ont une épaisseur inférieure à 50 μ m en raison du frittage à 1050°C, mais que les matrices conservent un niveau élevé de porosité ouverte.

4.2 Technique de mise en forme conventionnelle

Pour tester et comparer la sécurité de la technique d'impression par DLP descendante, nous avons également produit des matrices par technique conventionnelle. Dans ce cas, les matrices ont été préparées à l'aide d'une technique de coulée. La poudre de β -TCP utilisée était la même pour les techniques d'impression (DLP) et de coulée.

La poudre de β -TCP a été mise en suspension dans une solution d'eau avec un dispersant (Darvan C) et un surfactant (B1001) pour obtenir des barbotines à 68 % (poids/poids) de matière sèche, homogénéisées par broyage planétaire pendant 30 minutes à 150 rpm (PM100 ; Retsch, Haan, Allemagne). La suspension a ensuite été coulée dans un moule en plâtre conçu pour obtenir des disques de 6 mm de diamètre. Le moule a ensuite été placé dans une étuve pendant une nuit (12 heures) à 30 °C.

5 Déliantage et frittage

Une fois l'impression des pièces réalisées, celles-ci étaient prélevées afin d'être placées en four (Ecotop 60, ROHDE, Prutting Germany) et subir leurs cycles de déliantage et frittages couplés en 1 seule étape. Lors d'une première phase, la montée en température était de 1°C/min jusqu'à une température de 600°C qui était maintenue en plateau durant 1 heure. Cette première phase de montée en température consistait en un déliantage des pièces et ainsi à l'élimination progressive des résines et composés organiques. La seconde phase d'ascension thermique était réalisée à une vitesse de 5°C/minute jusqu'à atteindre la température de frittage de qui était maintenue pendant 3 heures. Enfin, les pièces étaient ramenées à la température ambiante selon une courbe de descente de température de 5°C/min. Cette association des processus de déliantage et frittage est innovante, car classiquement, ce sont 2 étapes successives qui sont réalisées. Dans un premier temps les pièces sont déliantées afin de retirer la résine et les composés organiques présents dans les pièces. Les édifices obtenus après cette première étape sont fragiles du fait du retrait de leur échafaudage Par la suite, un second processus de frittage permet la densification des matrices afin d'acquérir leurs propriétés physico-chimiques définitives. Des températures de frittage de 1000, 1050 et 1120°C ont été choisies afin de pouvoir étudier la microporosité ouverte et les propriétés biologiques des matrices. Ce processus est innovant, car il réduit le temps de production des pièces et réduit liés à la manipulation des pièces (figure 29).

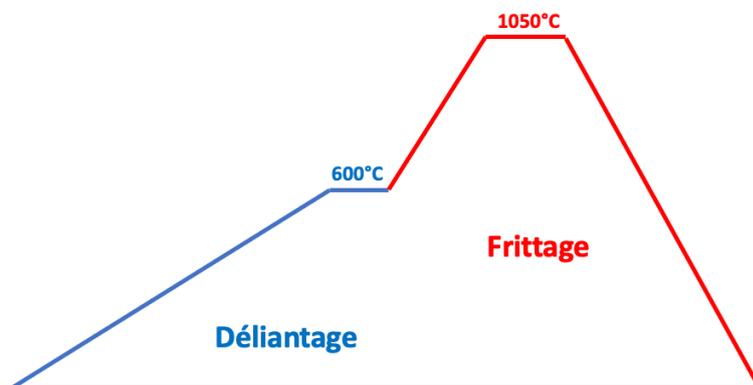


Figure 29. Exemple de courbe de déliantage et frittage en 1 étape

6 Caractérisation des pièces produites

6.1 Détermination de la microporosité ouverte des matrices

Les porosités des matrices ont été établies par pesée hydrostatique. Cette méthode permet de calculer la densité apparente et la porosité ouverte d'un échantillon en mesurant sa masse dans différentes conditions.

Pour déterminer leur masse sèche, les échantillons ont été séchés dans un four pendant 30 minutes à 150°C. Ils ont ensuite été placés dans une chambre à vide pour obtenir un vide approximatif (<1 kPa). Ces conditions ont été maintenues pendant un minimum de 30 minutes avant de rompre le vide et peser les échantillons.

La masse humide des échantillons a ensuite été mesurée. Ceux-ci ont été placés dans une chambre à vide pour obtenir un vide approximatif (<1 kPa) pendant 1 heure. Par la suite, les échantillons ont été immergés dans l'eau distillée et le vide rompu. Par la suite, la plateforme supportant l'échantillon était agitée pour éliminer les microbulles provenant du dégazage de l'eau et l'immersion était maintenue pour au minimum 1 heure. Durant ce temps, le vide était remis en place puis cassé toutes les 20 minutes pendant trois cycles, laissant les échantillons immergés avant d'être pesés. Enfin, les différentes mesures de masse sèche et humide ont été comparées afin de déterminer la porosité des échantillons.

Trois types de matrices non macroporeuses, comprenant chacune six échantillons, ont été produits afin d'étudier l'impact de la température de frittage à 1050 et 1120°C et de l'épaisseur d'impression de 50 et 100 µm (groupe 1 : 1050°C et 50 µm ; groupe 2 : 1050°C et 100 µm ; groupe 3 : 1120°C et 50 µm).

6.2 Contrôle de la précision de notre technique d'impression par DLP

La température de frittage joue un rôle majeur dans le retrait des pièces produites, en fonction de leur composition et des paramètres de production. Des tests préliminaires ont été effectués pour déterminer le retrait induit dans notre matériau à différentes températures. Une fois ces données recueillies, nous avons pu déterminer que les pièces imprimées devaient être surdimensionnées de 21% à 1050°C pour obtenir les dimensions souhaitées après frittage. Dans ce travail, afin de confirmer la précision de notre technique de mise en forme, nous avons produit des cubes avec quatre fenêtres par côté. Un repère a été placé sur le dessus du cube pour identifier les axes X/Y/Z. Nous avons utilisé la même barbotine que lors de nos différents tests d'impression.

Lors du premier essai, deux cubes de 5 mm de côté, comportant chacun quatre fenêtres de 1 mm sur 1 mm, ont été imprimés et frittés à 1050°C pour être mesurés (figure 30).

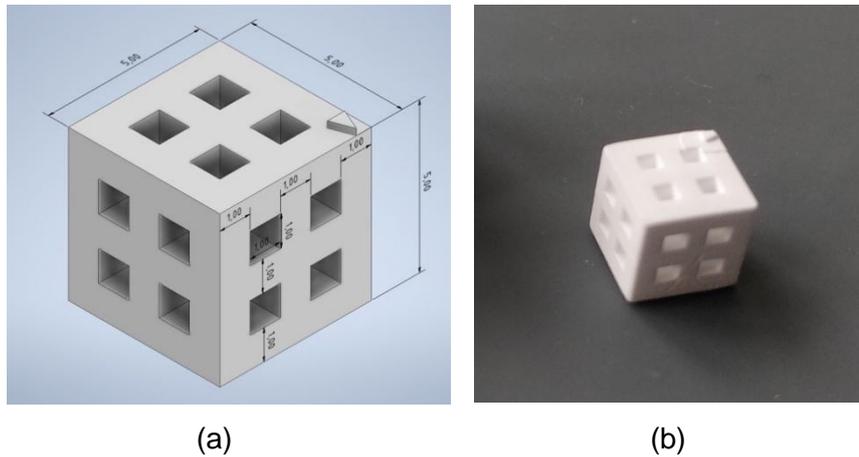


Figure 30. Modèle virtuel du cube avant surdimensionnement (a) et cube produit après frittage (B)

Nous avons effectué un second test en utilisant deux dimensions de cube différentes pour confirmer nos résultats et l'impact potentiel des dimensions sur la précision de la technique. Le premier cube était identique à ceux que nous avons produits pour le premier test. Le second cube a été conçu avec des arêtes de 1 cm, chaque face comportant quatre fenêtres de 2 mm. Comme pour le premier test, la température de frittage était fixée à 1050°C.

L'évaluation de la précision d'impression a été réalisée à l'aide d'un scanner de microtomodensitométrie (micro-CT) (Bruker Skyscan 1172) couplé au logiciel 3D systems/Geomagic Control X afin de réaliser les mesures. Les dimensions des arêtes ont été mesurées en utilisant les dimensions moyennes entre tous les points d'une face et leurs antagonistes orthogonaux sur la face opposée.

6.3 Relargage des ions calcium en milieu aqueux

Afin d'étudier le relargage ionique de notre matériau, nous avons observé la variation de la conductimétrie de l'eau distillée dans laquelle étaient immergées des pastilles de 11.5 mm de diamètre, 2.1 mm d'épaisseur et d'une masse de 0.55g. Celles-ci ont été fabriquées à l'aide de notre technique d'impression. Trois températures de frittage ont été étudiées, 1000°C, 1050°C et 1100°C, et pour chacune deux échantillons produits.

Afin de reproduire nos conditions de cultures, une pastille était lavée 5 minutes dans l'eau distillée et l'autre pendant 1 heure avant d'être stérilisée à 170°C pendant 1 heure.

Un dispositif spécifique a été développé pour tester 8 échantillons en parallèle et ceux-ci étaient laissés dans de l'eau pure thermostatée à 37°C pendant 6 jours. Pour convertir ces résultats de conductimétrie en un dosage du Ca^{2+} , nous avons utilisé un système de chromatographie d'échange d'ions AQUION ICS900.

Ainsi, nous avons étudié le relargage ionique sur les 6 groupes suivants :

- β -TCP avec lavage de 5 minutes frittage à 1000°C
- β -TCP avec lavage 1 heure frittage 1000°C
- β -TCP avec lavage de 5 minutes Frittage à 1050°C
- β -TCP avec lavage de 1 heure frittage 1050°C
- β -TCP avec lavage de 5 minutes Frittage 1100°C
- β -TCP avec lavage d'une heure Frittage à 1100°C

7 Évaluation de la biocompatibilité de la technique d'impression des matrices de β -TCP

7.1 Étude de l'impact de la température de frittage et de la technique de mise en forme

Étude de l'impact de la température de frittage et de la technique de mise en forme :

Afin d'évaluer la biocompatibilité de notre technique d'impression, nous l'avons comparée à la technique de mise en forme classique par coulée. Ainsi, nous avons imprimés une série de pastilles de β -TCP et coulé une autre série de pastilles à l'aide de β -TCP appartenant à la même production. Ces pastilles présentaient une forme circulaire adaptée à la réalisation de cultures au sein de plaques de 24 puits. Deux températures de frittage ont été sélectionnées, une première à 1000°C et la seconde à 1100°C. L'objectif de ces deux températures était d'étudier l'impact de la microporosité et de la dégradation des matrices sur la culture cellulaire. Avant la mise en culture, les pastilles ont été rincées à l'eau pure pendant 5 minutes avant d'être stérilisées à 170°C pendant 1 heure.

De plus, les durées de cultures ont été étudiées avec un comptage cellulaire effectué à 3 et 6 jours.

Différents groupes étaient formés, comprenant chacun 6 échantillons :

- . β -TCP coulé et fritté à 1000°C
- . β -TCP imprimé et fritté à 1000°C
- . β -TCP coulé et fritté à 1100°C
- . β -TCP imprimé et fritté à 1100°C
- . MC3T3-E1 sur fond de puit (groupe témoin)

Les cellules choisies pour cet essai étaient des MCT3T3-E1, lignée cellulaire immortalisée issue de précurseurs d'ostéoblastes de calvaria de souris. Chaque puits étaitensemencé de 8000 cellules en suspension et 900 μ l de milieu spécifique de culture était ajouté dans chaque puits. Par la suite, la plaque de culture était mise en incubation au sein d'une enceinte (CB 150/APT line/Binder, LabExchange, Paris, France) avec comme paramètres : température à 37°C, atmosphère à 5% CO₂ et 100% de saturation en eau.

La vitalité des cellules a été étudiée à l'aide d'un indicateur redox, l'Alamar Blue. Les milieux de culture étaient nettoyés de chaque puits, puis remplacés par un milieu de culture contenant 10% de colorant

bleu Alamar® fluorescent (Interchim), avant d'être remis en incubation pendant 2 heures. Le bleu alamar, ou résurazine est un réactif bleu qui lorsqu'il est réduit, se transforme en résorufine à la couleur rose fortement fluorescente dans le rouge. Il est donc utilisé comme marqueur de la viabilité cellulaire en mettant en évidence la présence d'une activité d'oxydoréduction liée au nombre de cellules présentes et à leur activité mitochondriale.

Les solutions ont ensuite été transférées dans des plaques de 96 puits (Nunc) et l'absorption de fluorescence mesurée par fluoromètre (Twinkle™ LB 970, Berthold Technologies) à 530 nm pour l'excitation et 590 nm pour l'émission. Ceci a permis d'évaluer l'activité mitochondriale et donc la vitalité des différents groupes. Le taux de vitalité des cellules des différents groupes était calculé en réalisant le ratio entre leur absorbance et celle des cellules du Groupe témoin.

7.2 Impact du rinçage des matrices

Afin d'améliorer nos résultats de vitalité cellulaires, notre protocole a été modifié afin d'évaluer l'impact d'un rinçage à l'eau pure plus long des pastilles. Un rinçage plus long est censé éliminer les phases les plus instables des matrices et ainsi limiter la libération d'ions pendant la culture des cellules, ce qui peut être préjudiciable à leur survie. De même, le renouvellement quotidien du milieu de culture à partir de la 24^e heure de culture a été étudié sur des cellules cultivées sur fond de boîte et sur des matrices rincées pendant 1 heure. Un rinçage plus long est supposé éliminer les phases les plus instables des matrices et ainsi limiter la libération d'ions pendant la culture des cellules, ce qui pourrait être préjudiciable à leur survie. De même, le renouvellement quotidien du milieu de culture à partir de la 24^e heure de culture a été étudié sur des cellules cultivées sur fond de boîte et sur des matrices rincées pendant 1 heure.

Nous avons donc cultivé des cellules MC3T3-E1 sur des matrices β -TCP mises en forme à l'aide de notre technique d'impression puis frittées à 1050°C.

Le protocole de culture et d'évaluation de la vitalité cellulaires était par ailleurs identique au précédent test de biocompatibilité.

Les groupes formés étaient ainsi :

- β -TCP lavé 5 minutes
- β -TCP lavé 1 heure
- β -TCP lavé 1 heure avec changement de milieu de culture/24 heures
- MC3T3-E1 sur fond de puits avec changement de milieu de culture/24 heures
- MC3T3-E1 sur fond de puits (groupe témoin)

8 Étude qualitative de dépôts protéiques sur matrices phosphocalciques

En préambule aux essais de culture a été réalisé un test d'accroche et de nettoyage de la solution de coloration sélectionnée. Afin de calibrer notre protocole d'observation de premiers tests avec une grande variabilité des durées d'immersion des pastilles ont été réalisés afin de tester l'accroche protéique. De même, nous avons cherché à évaluer différentes techniques de marquage afin de faciliter l'observation du dépôt protéique en microscopie optique. Le protocole décrit résulte de ces essais préliminaires.

L'objectif de ce travail était d'étudier :

- La durée nécessaire de séchage nécessaire à l'accroche d'un dépôt protéique sur des matrices phosphocalciques frittées à différentes températures.
- La qualité du film déposé en microscopie optique.

Les essais ont été menés sur des pastilles de matrices non macroporeuses de β -TCP mises en forme par prototypage rapide. Les températures de frittage sélectionnées étaient de 1050°C et 1100°C afin de faire varier la porosité des matrices et étudier l'impact sur l'adhésion d'un film protéique à la surface du matériau. Du sérum de veau fœtal (Corning™ 35-015-CV) a été utilisé comme source de protéines pour la réalisation des dépôts. La solution de coloration été : bleu de Coomassie 2.5% (p/v), éthanol 50% (v/v), acide acétique 10% (v/v). La solution de nettoyage été composée de : éthanol 20% (v/v), acide acétique 7.5% (v/v). La méthode d'étude comprenait un premier temps de trempage dans le sérum de veau fœtal avant une ou des phases de séchage. Plusieurs groupes ont été formés afin de déterminer la durée minimale nécessaire à la réalisation d'une accroche protéique efficace sur les pastilles :

Groupe 1 : 4 pastilles frittées à 1050°C immergées pendant 5 minutes dans le sérum de veau fœtal, sans temps de séchage avant coloration.

Groupe 2 : 4 pastilles frittées à 1050°C immergées pendant 5 minutes dans le sérum de veau fœtal avant séchage de 15 minutes.

Groupe 3 : : 4 pastilles frittées à 1100°C immergées pendant 5 minutes dans le sérum de veau fœtal, sans temps de séchage avant coloration.

Groupe 4 : 4 pastilles frittées à 1100°C immergées pendant 5 minutes dans le sérum de veau fœtal avant séchage de 15 minutes.

Groupe 5 : 4 pastilles témoins frittées à 1050°C.

Par la suite l'ensemble des pastilles étaient rincées à l'eau stérile avant d'être immergées en solution de coloration pendant 5 minutes. Les pastilles étaient par la suite trempées en solution de décoloration pendant 5 minutes avant rinçage final à l'eau stérile. Une fois les pastilles préparées, elles étaient étudiées en microscopie optique (BRESSER Science Infinity) à des grossissements de x4 et x10, par deux opérateurs.

9 Production de plasma riche en plaquettes

Notre technique d'extraction est basée sur les travaux d'Amable (137) visant à l'optimisation des cytokines et facteurs de croissance présents au sein du plasma riche en plaquettes (PRP) dans le cadre de la médecine régénérative. Nous avons donc choisi d'utiliser un PRP activé (PRPaC). Afin de diminuer les variations du PRPaC produit les prélèvements ont été réalisés sur un donneur unique avec un horaire constant de prélèvement compris entre 8h et 8h30 et utilisé frais le jour même de sa production.

Les étapes de production sont les suivantes :

- Prélèvement sanguin sur tube citraté Vacutainer ® Ref : 369714. Le nombre de tubes était dépendant de la quantité de PRPaC à produire.
- Réalisation d'une première étape de centrifugation des tubes à 300g pendant 5 minutes à 18°C (Ependorf centrifugeuse réfrigérée 5415R) avec montée et descente rapide en vitesse de centrifugation. Après centrifugation, l'ensemble du plasma situé au-dessus du culot leucocytaire (PRP1) était prélevé afin d'écarter les érythrocytes et leucocytes (figure 31).



Figure 31. Aspect après première étape de centrifugation mettant en évidence le culot érythrocytaire, le culot plaquettaire et le plasma concentré en plaquettes surnageant.

Par la suite une centrifugation du PRP1 était réalisée à 700g pendant 17minutes et à 18°C. On obtenait alors un culot plaquettaire et un plasma pauvre en plaquettes (PPP) surnageant (figure 32). Le culot plaquettaire était alors remis en suspension dans 3/10 du volume de PPP produit. Ceci permettait d'obtenir une nouvelle production appelée PRP2.



Figure 32. Culot plaquettaire et PPP après seconde étape de centrifugation

- Les plaquettes contenues dans le PRP2 étaient alors activées en ajoutant 20 μ l de CaCl₂/ml de PRP2 puis mises en incubation à 37°C (BINDER® CB 150-ul 9040-0054 CO2 150L) pendant 1 heure. Cette étape permettait d'obtenir une production de PRP activé (PRPa). Enfin, le PRPa était centrifugé à 3000g pendant 20 minutes à 18°C. Le surnageant était alors récupéré et constituait le PRP activé centrifugé (PRPaC) en étant séparé du culot plaquettaire (figure 33).

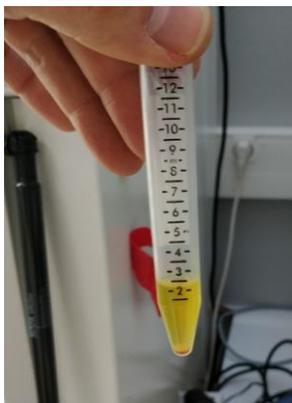


Figure 33. Culot plaquettaire et PRPaC produit après étape finale de centrifugation

10 Étude de l'impact d'un dépôt de plasma riche en plaquettes activées (PRPaC) sur la prolifération d'HUVECs

Afin d'étudier l'intérêt d'un dépôt protéique de PRPaC sur matrice phosphocalcique pour la culture de cellules endothéliales, nous avons choisi comme modèle cellulaire, des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVECs). L'intérêt de l'utilisation de ces cellules comme modèle était leur facilité d'accès et de manipulation ainsi que la reproductibilité des résultats obtenus lors des expérimentations. Ainsi, des pastilles de β -TCP ont été produites par technique d'impression puis frittées à 1050°C avant d'être nettoyées en eau ultrapure pendant 2 heures à 3 reprises avec agitation à 80 rpm et 37°C avant stérilisation à 170°C. Par la suite, les pastilles ont été déposées dans une plaque de culture de 96 puits (Nunc).

Le jour de l'expérimentation, du PRPaC était produit selon le protocole précédemment détaillé. 150 μ l étaient déposés dans les puits contenant les pastilles devant bénéficier d'un dépôt protéique ou dans les puits ne contenant pas de pastille, mais devant recevoir un dépôt de PRPaC. Par la suite, le PRPaC était réaspiré au bout de 30 minutes puis séché sous hotte aspirante pendant 30 minutes. Sur les pastilles testées pour un multidépôt, cette étape était répétée une seconde fois.

Une fois l'ensemble des échantillons préparés, des HUVECs (Promocell) étaient introduites dans chaque puits à raison de 10000 cellules par puits de culture. Par la suite, était introduit dans chaque puits de culture 440 μ l d'un milieu de culture spécifique des cellules endothéliales (Promocell GmbH, Heidelberg, Allemagne) préalablement enrichi de 21 μ l/ml d'une supplémentation de culture spécifique des HUVECs (Promocell GmbH, Heidelberg, Allemagne), de streptomycine (0,1mg/ml) et de pénicilline (100UI/ml), avant de placer la plaque de culture en étuve (CB 150/APT line/Binder, LabExchange, Paris, France) avec comme paramètres : température à 37°C, atmosphère à 5% CO₂ et 100% de saturation en eau. La durée de culture pour cet essai était fixée à 6 jours et un changement de milieu était réalisé chaque jour.

Différents groupes contenant chacun 6 échantillons étaient ainsi formés :

- β -TCP mono dépôt
- β -TCP multi dépôt
- β -TCP lavage NaCl
- Fond de puits avec dépôt
- Fond de puits sans dépôt (groupe témoin)

Pour les mesures de vitalité, les milieux de culture étaient nettoyés de chaque puits, puis remplacés par un milieu de culture contenant 10% de colorant bleu Alamar® fluorescent (Interchim), avant d'être remis en incubation pendant 2 heures.

Par la suite, l'absorption de fluorescence était mesurée par fluoromètre (Twinkle™ LB 970, Berthold Technologies) à 530nm pour l'excitation et 590nm pour l'émission. Le taux de vitalité des cellules des différents groupes était calculé en réalisant le ratio entre leur absorbance et celle des cellules du Groupe témoin.

11 Étude en microscopie confocale de la culture d'HUVECs sur matrices de β -TCP

Afin de pouvoir étudier l'organisation cellulaire de cellules endothéliales cultivées sur une matrice de β -TCP présentant un dépôt de PRPaC, la microscopie confocale nous est apparue comme une technique présentant un intérêt certain. En effet, elle permet une étude précise de l'organisation cellulaire en présentant un plan focal extrêmement réduit. Durant ce même essai, la vitalité cellulaire a également été étudiée et comparée à nos précédents résultats.

Les HUVECs ont à nouveau été sélectionnées comme modèle de cellules endothéliales et les pastilles de β -TCP (11x1,8mm) utilisées étaient imprimées avant d'être frittées à 1050°C puis nettoyées en eau pure pendant 2 heures à 3 reprises avec agitation à 80 rpm et 37°C avant d'être stérilisées à 170°C. Le PRPaC était produit selon les modalités précédemment détaillées.

Les pastilles étaient déposées dans des plaques de 48 puits (NUNC) et le dépôt de PRPaC consistait en un dépôt de 150 μ l dans chaque puits concerné, avant aspiration après 1 minute de trempage et enfin les pastilles étaient laissées à sécher 5 minutes sous hotte à flux laminaire.

Différents groupes ont été mis en place afin d'étudier la culture cellulaire à 4 heures, 24 heures et 3 jours. La quantité de cellules de ces groupes a été adaptée afin de faciliter les observations. Ainsi, 30.000 cellules ont été introduites dans les puits des groupes étudiés après 3 heures et 24 heures de culture et 10.000 cellules ont été déposées dans les puits des groupes étudiés après 3 jours de culture. Par la suite, était introduit dans chaque puit de culture 440 μ l d'un milieu de culture spécifique des cellules endothéliales (Promocell GmbH, Heidelberg, Allemagne) préalablement enrichi de 21 μ l/ml d'une supplémentation de culture spécifique des HUVECs (Promocell GmbH, Heidelberg, Allemagne), de streptomycine (0,1mg/ml) et de pénicilline (100UI/ml), avant de placer la plaque de culture en étuve (CB 150/APT line/Binder, LabExchange, Paris, France) avec comme paramètres : température à 37°C atmosphère à 5% CO₂ et 100% de saturation en eau.

Les groupes formés étaient :

- 2 Pastilles de β -TCP sans dépôt de PRPaC pour observation à 4 heures, 24 heures et 3 jours.
- 2 Pastilles de β -TCP avec PRPaC pour observation à 4 heures
- 2 Pastilles de β -TCP avec PRPaC et HUVECs pour observation confocale à 4 heures
- 2 Pastilles de β -TCP avec PRPaC et HUVECs pour observation confocale à 24 heures
- 2 Pastilles de β -TCP avec PRPaC et HUVECs pour observation confocale à 3 jours.
- 2 Pastilles de β -TCP avec PRPaC et HUVECs pour vitalité à 3 jours.
- 2 puits avec dépôt de PRPaC et HUVECs pour vitalité à 3 jours.
- 2 puits sans dépôt et HUVECs pour vitalité à 3 jours (groupe témoin).

Lors de ces essais, aucun renouvellement du milieu de culture n'était réalisé.

Pour les observations en microscopie confocale les échantillons étaient traités par FISHER : Live/Dead fluorescence kit. Ils étaient prélevés de la première plaque et trempaient 30 minutes en solution de coloration. 250 µl de solution de coloration/puits. Les cellules vivantes étaient marquées par la présence de Calcéine rendue hautement fluorescente (Verte : ex/em ~495 nm/~515 nm) en intracellulaire par l'action des estérases. L'Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) pour sa part pénétrait les cellules présentant une membrane cellulaire endommagée. En se fixant aux acides nucléiques, sa fluorescence était alors multipliée par 40 (Rouge : ex/em ~495 nm/~635 nm). Ceci permettait le repérage des cellules mortes.

L'observation était réalisée à l'aide d'un microscope photonique à balayage laser ZEISS LSM 710 avec un grossissement X10 afin de permettre l'acquisition des échantillons afin de visualiser uniquement la fluorescence émise sur le plan focal.

Enfin, afin de confirmer les données de notre précédent test de culture, nous avons réalisé des mesures de vitalité. Les milieux de culture étaient ainsi nettoyés de chaque puits, puis remplacés par un milieu de culture contenant 10% de colorant bleu Alamar® fluorescent (Interchim), avant d'être remis en incubation pendant 2 heures. Les solutions ont ensuite été transférées dans des plaques de 48 puits (Nunc) et l'absorption de fluorescence mesurée par fluoromètre (Twinkle™ LB 970, Berthold Technologies) à 530nm pour l'excitation et 590nm pour l'émission. Ceci permettait donc d'évaluer l'activité mitochondriale et le taux de vitalité des différents groupes, en réalisant le ratio entre leur absorbance et celle des cellules du groupe témoin.

12 Développement d'une matrice tubulaire de culture en flux

La matrice tubulaire jouera à terme un rôle central dans le fonctionnement de notre bioréacteur et la réalisation de culture en flux de cellules endothéliales. Son rôle lors des premiers essais sera de réaliser la mono culture d'HUVECS avec dépôt de PRPaC sur matrice de β -TCP sous flux laminaire de milieu de culture thermostaté.

Dans ce contexte, nous avons développé un design répondant à différents impératifs et le prototypage rapide a été utilisé afin de pouvoir rapidement tester nos évolutions de design. Les pièces étaient donc, dans un premier temps, conçues informatiquement puis imprimées pour une première série de tests en résine. Une fois cette première validation physique réalisée, une seconde série de pièces étaient imprimées en céramique afin de valider le concept (figures 34, 35 et 36).

Pour la réalisation de notre bioréacteur, il a été décidé que les éléments en contact avec les matrices et les fluides de culture devaient être à usage unique ou facilement stérilisables et accessibles financièrement. Il a donc été décidé de positionner la matrice de culture dans le corps de 2 seringues de 5 millilitres (Seringues stériles Luer-Lock PIC solution - 5ml) sectionnées en leur centre et reliées par une tubulure en silicone stérilisable. Ce premier élément a conditionné le design externe de nos matrices et en particulier leur diamètre.

Un second élément conditionnant était le diamètre interne de l'embout de nos seringues qui était de 2 millimètres, ce qui conditionnait le diamètre de l'extrémité de nos matrices afin de réaliser une jonction avec le moins de turbulence de l'écoulement du milieu de culture.

Nous avons également souhaité utiliser l'embout silicone des seringues et les extrémités de nos matrices ont été dessinés afin de permettre leur insertion et rétention. Afin de permettre l'écoulement du liquide de culture, l'extrémité de l'embout est simplement perforée à l'aide d'un bistouri circulaire de type true cut (figure 37).

Le diamètre de la zone de culture cellulaire au sein des matrices, a quant à lui était fixé à 5 millimètres afin de pouvoir faciliter l'étude de l'organisation cellulaire sur les parois. En effet, nous prévoyons une étude en microscopie confocale de l'organisation des cellules endothéliales cultivée sur les parois internes de nos matrices, ce qui nécessite leur clivage pour exposer les cellules. Cette notion de clivage est très importante, car les céramiques présentent une très faible élasticité et une grande rigidité.

La réalisation de matrices à la fois résistantes aux manipulations et pouvant être facilement ouvertes a nécessité le développement d'un design dit à « rupture contrôlée ». Celui-ci consiste dans le développement de zones où la matrice est creusée afin de rompre préférentiellement.

Cette notion de rupture nous a conduit au développement d'une matrice modulaire. En effet, deux types de modules ont été développés, d'une part, des modules dits de culture qui serviront à l'étude des cellules en culture et d'autre part des modules dits de jonctions qui servent à relier les modules de

culture à l'extrémité conique des seringues. Finalement, les pièces produites ont consisté en l'assemblage de 2 modules de culture avec 2 modules de jonctions.

Afin de faciliter les observations en microscopie confocale, nous avons également souhaité que les surfaces étudiées soient les plus planes possibles (figure 38). Finalement, cela a abouti à un design de matrices clivables, permettant de récupérer 8 zones de culture cellulaires, 4 proximales et 4 distales en fonction de l'écoulement du flux de milieu de culture. Cela nous a semblé important afin de multiplier les échantillons exploitables lors d'un test et de nous assurer de l'homogénéité de l'organisation cellulaire au sein de la matrice.

L'utilisation de la technologie de prototypage rapide a largement démontré son intérêt lors de cette phase de développement en nous permettant de rapidement modifier nos designs et réaliser des essais afin d'affiner les caractéristiques architecturales de nos modules.

Ceci nous a permis de démontrer la faisabilité d'un dépôt au sein de nos matrices et la précision des zones de clivage qui permet l'obtention des zones d'études planes et régulières qui facilitent les observations.

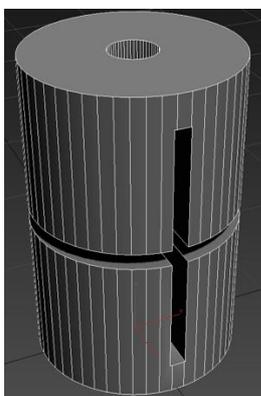
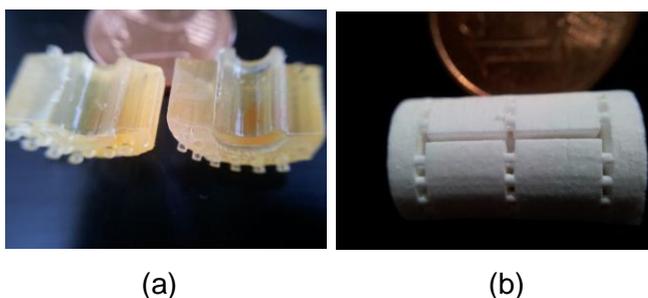


Figure 34. Étude préliminaire de design externe de 2 modules de culture assemblés



(a)

(b)

Figure 35. Essai de clivage longitudinal sur module de culture imprimé en résine (a) et module de culture imprimé afin de réaliser des essais de clivage (b)

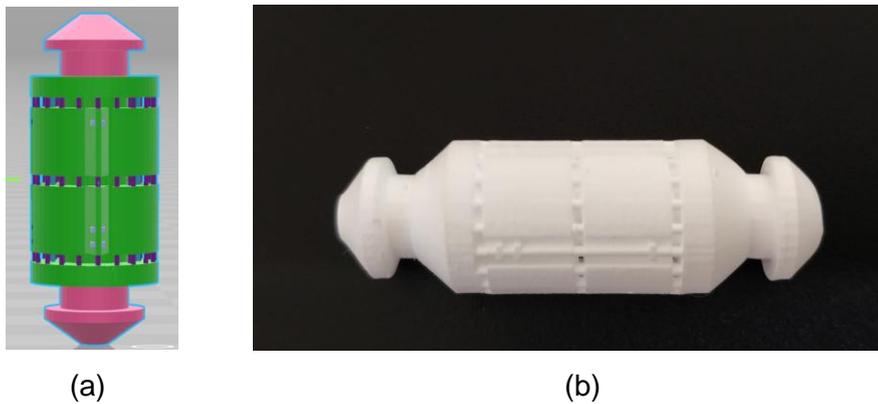


Figure 36. Modèle numérique (a) et physique (b) du design « définitif » des matrices.



Figure 37. Montage du noyau du bioréacteur composé de 2 seringues de 5ml reliée par une tubulure silicone afin d'assurer son étanchéité

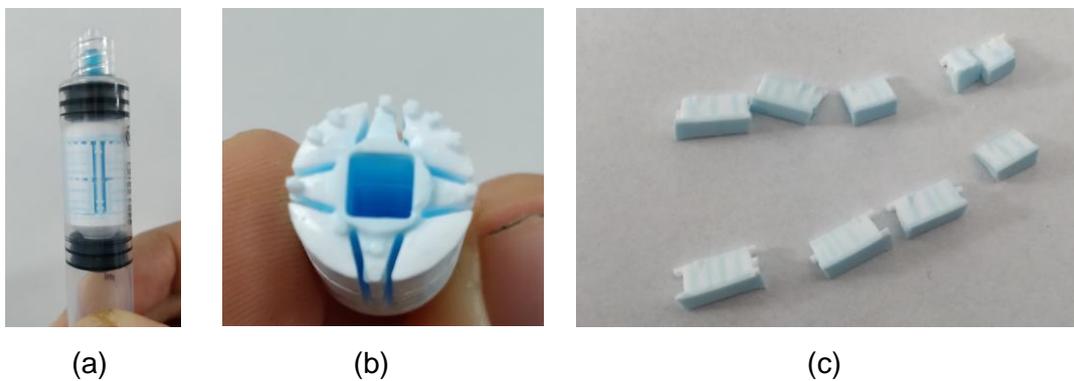


Figure 38. Démonstration de la technique de dépôt et du clivage de la matrice permettant de recueillir les pièces nécessaires à l'observation en microscopie confocale. Matrice complète en cours d'exposition au colorant (a). Sommet de matrice clivé afin d'exposer son canal central et les lignes de fracture contrôlées (b). Fragments de matrice destinés à l'étude par microscopie confocale (C).

13 Développement d'un bioréacteur de culture en flux

Afin de réaliser des cultures *in vitro* dynamiques de cellules endothéliales, nous avons souhaité développer un réacteur de culture en flux répondant à nos besoins spécifiques (figures 34 et 35). Notre objectif principal était de maintenir un milieu stérile à température constante et avec un flux contrôlé pour une durée de culture de 6 jours. Nous souhaitons ainsi un contrôle précis des paramètres de culture, mais également l'enregistrement de ces paramètres en continu durant la totalité de la culture et ceci afin de détecter des variations pouvant influencer sur les résultats obtenus.

Nous avons donc déterminé un cahier des charges à remplir par notre matériel :

- Réalisation d'un matériel modulaire pouvant évoluer dans le temps, chaque module pouvant ainsi être remplacé en cas de panne ou d'évolution.
- Température constante comprise entre 37 et 39°C au niveau des matrices de culture malgré les variations de flux de milieu de culture.
- Homogénéisation du milieu de culture et tamponnement du milieu.
- Capacité à contrôler les flux de manière très précise : culture à faible contrainte mécanique versus hautes contraintes (1 à 100ml/ min), variations quasi instantanées.
- Montage stérile et mise en route rapide.
- Développement d'un logiciel intelligent de contrôle et d'enregistrement des différents paramètres de fonctionnement.
- Différents modules indépendants ont ainsi été progressivement développés à l'aide de la technique du prototypage rapide afin de répondre à ce cahier des charges (figure 39, 40).

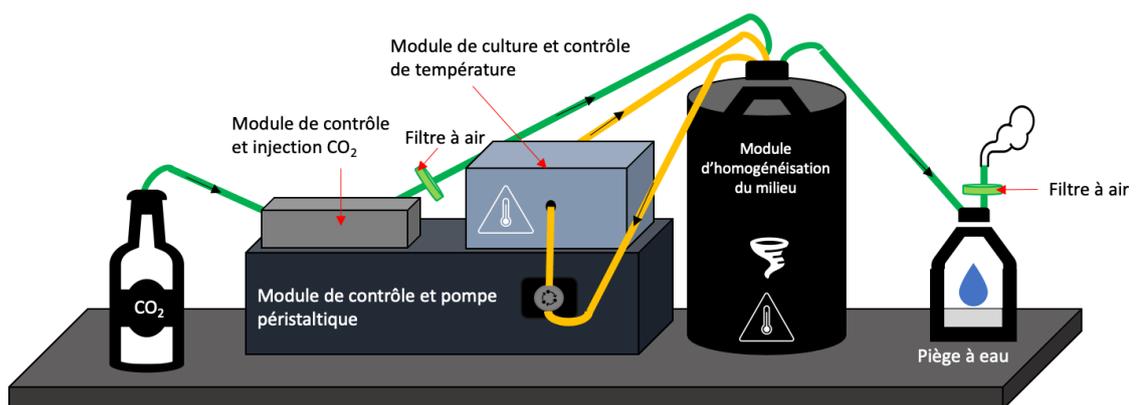


Figure 39. Schéma du réacteur



Figure 40. Réacteur assemblé avec ses différents modules.

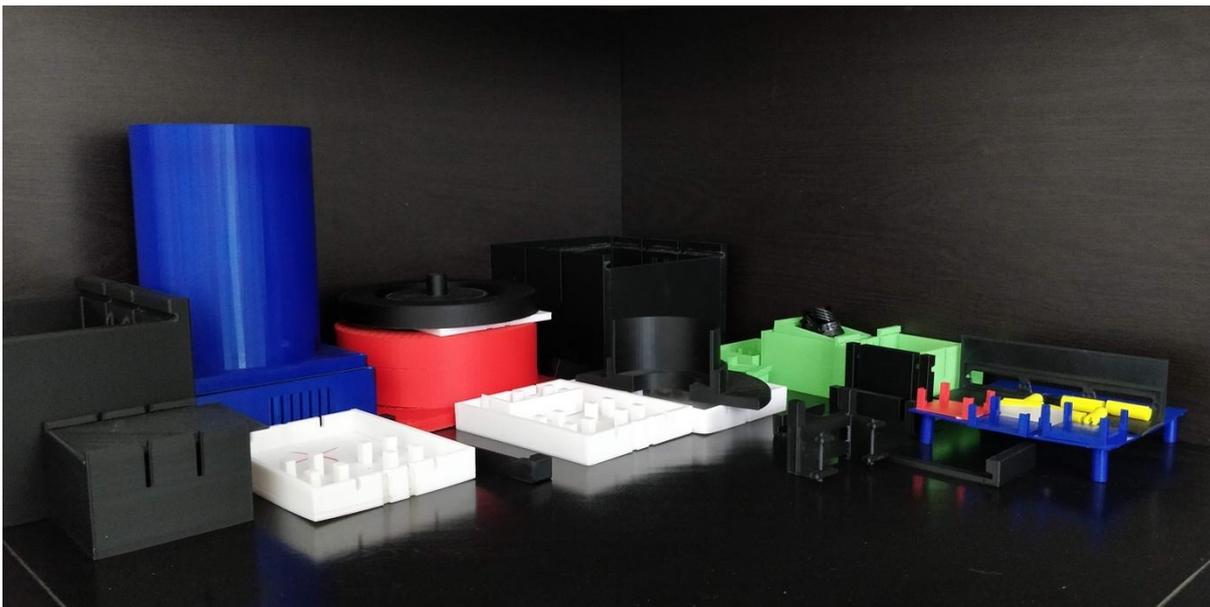


Figure 41. Prototypes ayant servi au développement du design des modules

Afin de répondre à notre cahier des charges, les choix techniques adoptés ont été :

- Utilisation du prototypage rapide pour le développement et l'optimisation des modules du réacteur (figure 41).
- Contrôle de la température de culture au niveau des matrices par le développement d'un module de culture contenant un chauffage ventilé permettant de stabiliser la température de culture au niveau de la matrice (module de culture).

- Maintien en température et homogénéisation du milieu de culture par utilisation de chauffages au contact d'un flacon contenant le milieu de culture, logé au sein d'un cylindre isolant (module d'homogénéisation).
- Utilisation d'une pompe péristaltique avec modulation possible en temps réel du flux de culture de 1 à 100ml/min (module de contrôle).
- Tamponnement du milieu de culture : injection contrôlée de CO₂ au niveau du module d'homogénéisation. Création d'un module d'injection.
- Utilisation de tubulures à usage unique (origine médicale) ou pièces stérilisables, afin de permettre la culture en milieu stérile.

Afin de permettre la mise en température rapide de la culture et la stabilité de celle-ci, nous avons décidé d'utiliser des régulateurs Proportionnel/Intégrale/Dérivée (PID) afin de contrôler les différents chauffages, atteindre les températures cibles le plus rapidement possible, la maintenir et pouvoir la retrouver en fonction des modifications de flux du milieu de culture. Par ailleurs, la même technique a été sélectionnée pour le tamponnement du milieu de culture par injection de CO₂.

Nous avons également décidé de développer une interface graphique de contrôle et d'enregistrement des paramètres du bioréacteur. Deux interfaces de contrôles sont développées, une interface permettant de visualiser de manière étendue les paramètres, elle est dite « mode expert » et une interface focalisée sur les paramètres essentiels : température du milieu de culture dans le flacon et dans la matrice, vitesse du flux de culture, pourcentage de CO₂ présent dans la phase gazeuse du flacon de culture. La partie hardware est incluse dans le module qui supporte la pompe péristaltique.

13.1 Modules d'homogénéisation du milieu de culture :

Les objectifs de ce module étaient de chauffer et maintenir le milieu de culture en température, mais également homogénéiser celui-ci. Ce module a été développé afin d'accueillir un flacon de 500 millilitres de milieu de culture. Son design est basé sur une structure tubulaire en nid d'abeille contenant des sondes thermiques, des chauffages au niveau des parois et un agitateur magnétique intégré au socle.

Afin de calibrer ces sondes pour qu'elles reflètent la température du milieu de culture, des essais ont été réalisés avec des sondes positionnées directement au sein du flacon. Une fois les températures corrélées, seules les sondes de paroi ont été maintenues (figures 37 et 38).

De même, la régulation des chauffages a été contrôlée avec un PID. (Le module permet de passer la température du milieu de 4°C à 39°C en moins de 2h puis maintient une température au 1/10 de degré si le flux de culture est constant). Ceci doit permettre une mise en route rapide du réacteur en parallèle de la préparation de la matrice de culture puis du dépôt cellulaire en culture statique.

C'est également au niveau du flacon contenant le milieu de culture qu'est réalisé le tamponnement du milieu par injection de CO₂ afin de maintenir une concentration atmosphérique de celui-ci de 5%. Un piège à eau avec un filtre à air est également relié à ce flacon afin de permettre l'expulsion des gaz.

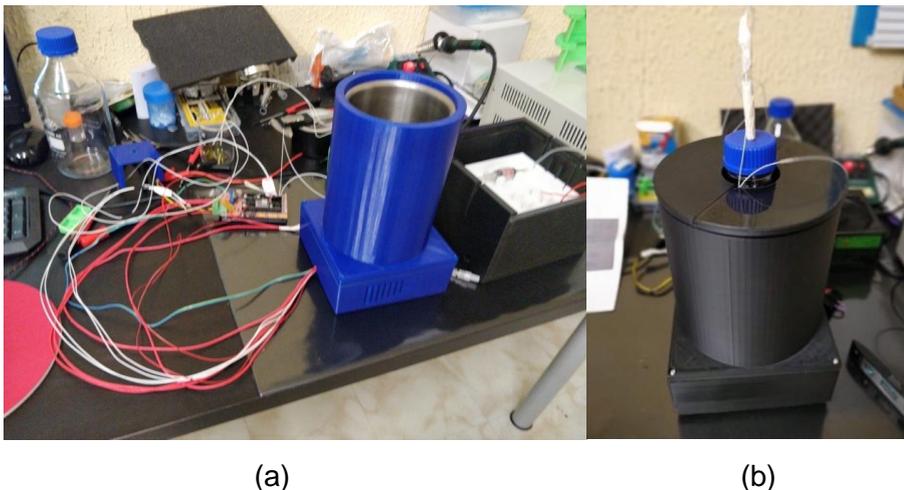


Figure 42. Premier prototype du module (a) et module final avec sondes de températures ayant servies à la calibration (b).

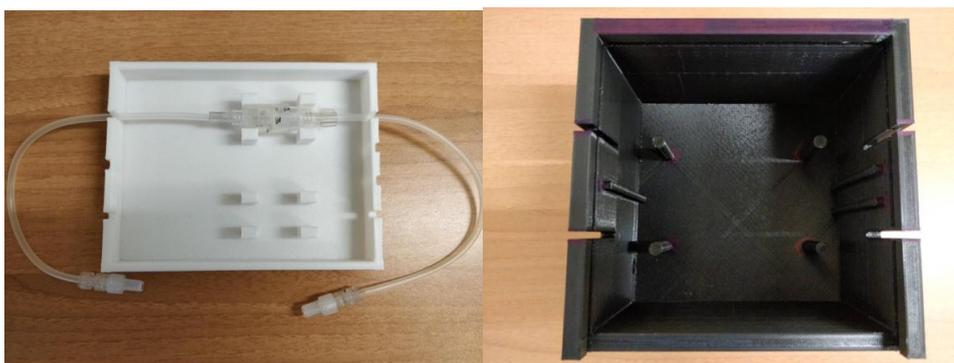


Figure 43. Montage ayant servi à la calibration du module de chauffage et d'homogénéisation

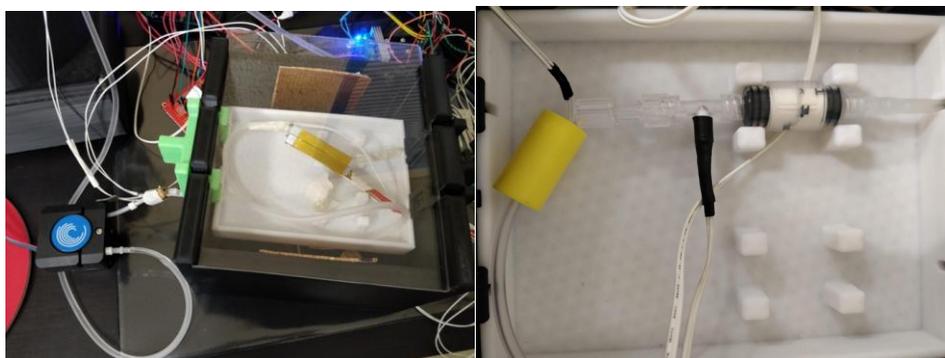
13.2 Module de culture :

Ce second module se compose d'une enceinte close contenant un plateau sur lequel vient se positionner la matrice de culture (figure 44). Ce plateau a pour fonctions de stabiliser la matrice et contenir une éventuelle fuite de milieu de culture. Au-dessous de celle-ci se positionnent les chauffages et ventilateurs. Du fait du caractère modulaire du réacteur, le milieu de culture chemine hors des modules au sein des tubulures sur environ 50 cm (A ce niveau est située la pompe péristaltique). Nous

avons noté une perte de température du milieu de 10°C au moment de son entrée dans le module de culture pour une vitesse de perfusion de $1\text{ml}/\text{min}$ à une température environnante de 20°C . Il nous est donc apparu essentiel d'intégrer au niveau du module de culture un second chauffage du milieu. Celui-ci consiste en un chauffage pulsé sur la tubulure positionnée afin de favoriser les échanges thermiques. Ce chauffage est contrôlé comme pour le module de chauffage et d'homogénéisation par un PID, ce qui ici nous est apparu encore plus important. En effet, c'est à ce niveau que la température du milieu doit être contrôlée le plus finement du fait de la présence des cellules cultivées. La calibration des sondes thermiques présentes au niveau de ce module a également été réalisée à l'aide de sondes provisoires positionnées au contact du liquide au plus proche de la matrice (figure 40).



(a) (b)
Figure 44. Plateau de culture (a) et enceinte (b) du module de culture.



(a) (b)
Figure 45. Module de culture avec sondes de températures ayant servies à la calibration (a). En jaune, on peut voir un prototype d'isolant de la sonde thermique placée au contact de la tubulure. On peut également observer la matrice phosphocalcique et une sonde provisoire positionnée au plus près de la matrice (b).

Une fois la phase de calibration achevée, les sondes provisoires au contact du milieu de culture ont été retirées afin d'assurer la stérilité du montage.

Finalement, cette calibration nous a permis d'obtenir une stabilité de la température de culture se maintenant au $1/10$ de degré près pour une vitesse de perfusion stable et la variation de température est limitée à 1.5°C lors de fortes variations de vitesse de perfusion (passage de 1 à $100\text{ml}/\text{min}$) et la

température revient à moins de 0,5°C de la température cible en moins de 5 minutes. Cela est permis du fait l'utilisation des PID au niveau des deux modules qui agissent en synergie.

De même, la mise en œuvre qui signifie pour nous d'amener le milieu de culture de 4°C à la température cible au niveau de la matrice (37,5°C) après montage du réacteur a pu être ramenée à moins de 2 heures. Ceci nous est apparu tout à fait compatible avec la durée des phases de manipulation cellulaires nécessaires à la réalisation de la culture en flux (figure 46).

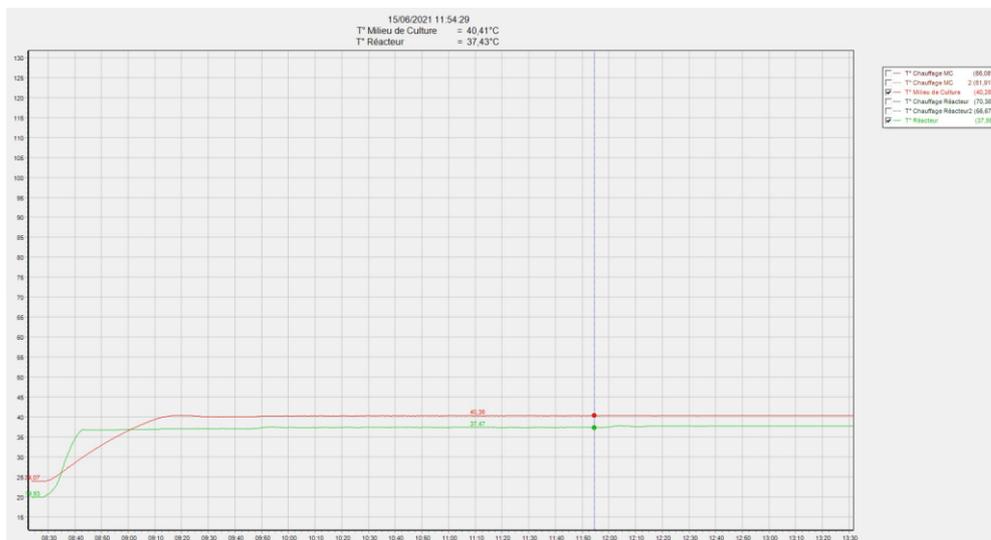


Figure 46. Exemple de graphique de suivi de température du flacon d'homogénéisation et du réacteur

13.3 Module de tamponnement du milieu :

Afin d'assurer le tamponnement du pH du milieu de culture, nous avons souhaité utiliser la technique la plus souvent employée, qui consiste à maintenir la concentration de CO₂ au sein de la phase gazeuse du flacon à 5%. Un module d'injection de CO₂ a donc été développé afin d'être connecté au bouchon du flacon situé au sein du module de chauffe et d'homogénéisation. Au sein de ce module, une électrovanne connectée à une bouteille de CO₂ s'ouvre de manière contrôlée, puis le mélange gazeux contenant de l'air ambiant enrichi en CO₂ est pompé puis injecté au niveau du flacon par une tubulure stérile après passage par un filtre à microparticules pour éviter les contaminations. Un capteur de CO₂ est positionné au sein du module et contrôle à travers l'utilisation d'un PID l'ouverture de l'électrovanne et l'activation de la pompe. Afin de ventiler la phase gazeuse contenue dans le flacon, une tubulure de sortie est également mise en place, celle-ci est connectée à un piège à eau puis à un filtre à microparticules (figure 47).

Afin de calibrer le PID contrôlant les injections de CO₂ une fois de plus, des capteurs provisoires ont été positionnés en amont et en aval du flacon et ont permis de contrôler l'efficacité de notre technique de tamponnement gazeux.

En 30 minutes environ, ce module nous permet d'obtenir une atmosphère contenant environ 5% de CO₂ au niveau du flacon de milieu de culture (variation entre 5,5 et 4,5%).

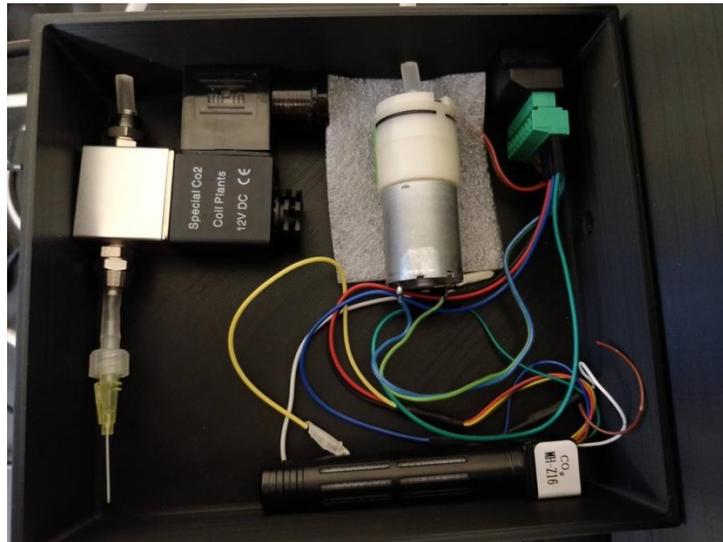


Figure 47. Module d'injection du CO₂ avec l'électrovanne à gauche, la pompe d'injection à droite et le capteur sur la partie basse de l'image

13.4 Développement d'une interface de contrôle et d'enregistrement

Nos différents modules nécessitent une coordination afin d'assurer leurs fonctions.

Le développement d'une interface spécifique de contrôle et d'enregistrement a donc été nécessaire afin de répondre aux contraintes posées lors de la conception du réacteur. Comme pour le réacteur lui-même, différentes itérations ont été nécessaires pour le développement de celle-ci et ce sont finalement deux interfaces distinctes que nous avons souhaité mettre en place.

Une première interface dite « mode expert » qui est celle que nous avons utilisées durant la phase de développement du réacteur. Celle-ci présente l'ensemble des paramètres enregistrés et les valeurs cibles demandées. Cette interface est plus « brute » mais permet d'étudier finement les réactions du réacteur (figure 48). Cette interface est débloquée par les utilisateurs mais ne nous est pas apparue compatible avec une utilisation en routine de culture.

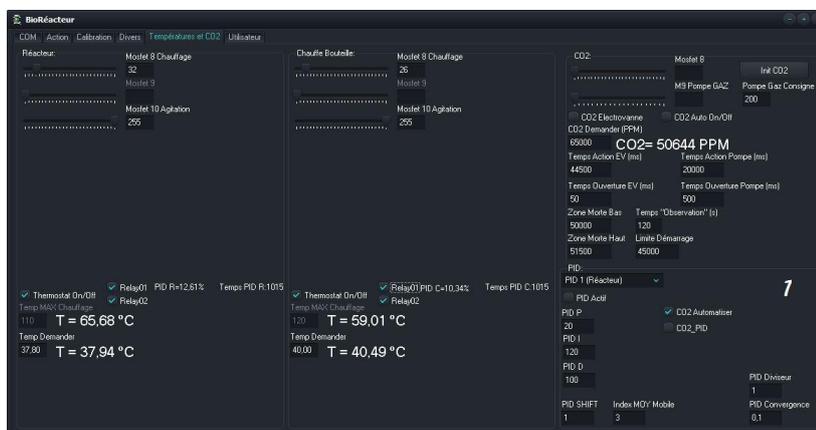


Figure 48. Interface « mode expert »

L'interface principale que nous avons développée par la suite visait à faciliter l'expérience utilisateur. Ainsi, l'interface graphique est plus agréable et centrée sur les valeurs importantes lors de la culture cellulaire. Elle permet également la mise en route des différentes fonctions du réacteur et d'appeler les données enregistrées par les différents capteurs durant le fonctionnement du réacteur. On peut ainsi contrôler d'un coup d'œil le bon fonctionnement du réacteur, mais également revenir sur les données enregistrées durant la culture afin d'expliquer des résultats pouvant être liés à un dysfonctionnement matériel (figure 49). Elle permet de contrôler la vitesse du flux, les températures cibles et instantanées du milieu de culture et du réacteur ainsi que le taux de CO₂ (à noter les bornes marquant les données extrêmes une fois que le réacteur a atteint sa cible). On peut également noter les boutons de mise en marche et arrêt des différentes fonctions du réacteur et les boutons représentant un graphique appellent les courbes d'enregistrement des données.



Figure 49. Interface « mode utilisateur »

14 Validation de la stérilité du montage du réacteur et de l'enregistrement des paramètres

Afin de valider le fonctionnement de notre réacteur, un essai de mise en circulation de milieu de culture sans matrice ou cellule a été réalisé.

Cet essai a porté sur une durée de 14 jours et nous a permis d'enregistrer la grande stabilité de nos paramètres prédéfinis dans le temps, mais également d'observer l'absence de contamination de notre milieu de culture sur une durée qui nous semble significative, nos essais de culture ultérieurs étant prévus sur des durées de 3 à 6 jours (figure 50).



Figure 50. Réacteur lors de l'essai de stérilité du montage

Chapitre 3 : Résultats

1 Caractérisation et contrôle des poudres produites

1.1 Diffraction à rayons X

Lors de nos analyses sur les matrices coulées et imprimées, nous avons observé les mêmes éléments et des graphiques similaires. L'étude du graphique de diffraction des rayons X montre la présence d'un pic important de β -TCP, alors que ceux de l'hydroxyapatite et du pyrophosphate sont absents (En utilisant l'angle 2θ $31,773^\circ$, la diffraction par rayon X est la méthode la plus sensible pour détecter la présence de traces d'HA dans le TCP). La figure 51 donne un exemple de graphique de diffraction par rayons X que nous avons obtenu lors de l'étude d'une matrice imprimée.

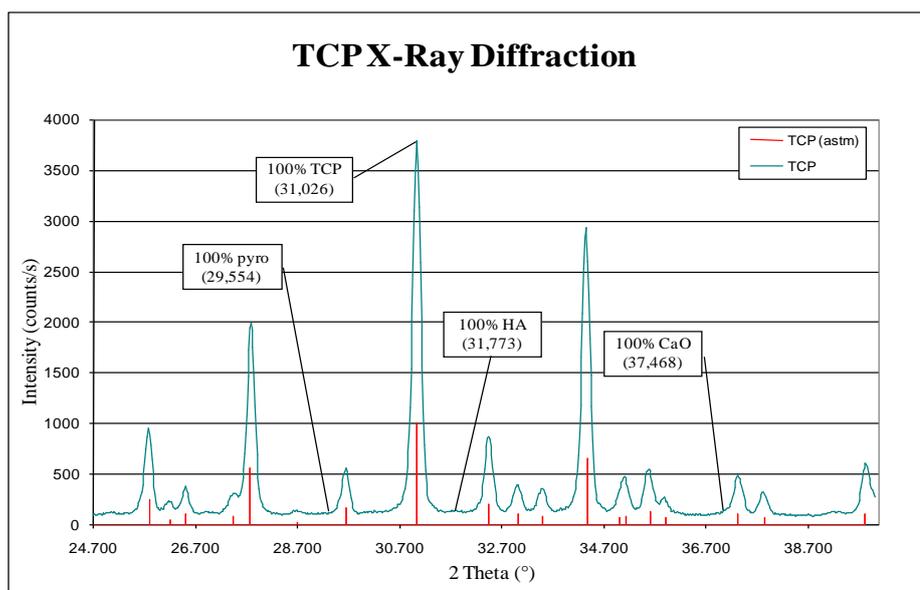


Figure 51. Spectre de diffraction des rayons X d'une matrice imprimée. Ce spectre illustre le pic de β -TCP et l'absence de détection de pyrophosphates, d'hydroxyapatite ou de chaux.

1.2 Détermination de la pureté par spectrométrie infrarouge à transformé de Fourier

L'analyse des graphiques obtenus par spectroscopie infrarouge correspond aux données recueillies par diffraction aux rayons X, et nous avons observé l'absence de bandes caractéristiques du pyrophosphate (en utilisant la bande d'absorption au nombre d'onde de 721 cm^{-1} caractéristique de la vibration d'étirement de la liaison P-O-P du groupe pyro, l'infrarouge est la méthode la plus sensible pour détecter la présence de pyrophosphate dans le TCP). Ainsi, nous avons conclu que notre production de poudre et nos techniques de mise en forme ont permis d'obtenir des matrices de β -TCP

avec des traces négligeables de pyrophosphate et d'hydroxyapatite. La figure 52 donne un exemple de spectre infrarouge que nous avons obtenu lors de l'étude d'une matrice imprimée.

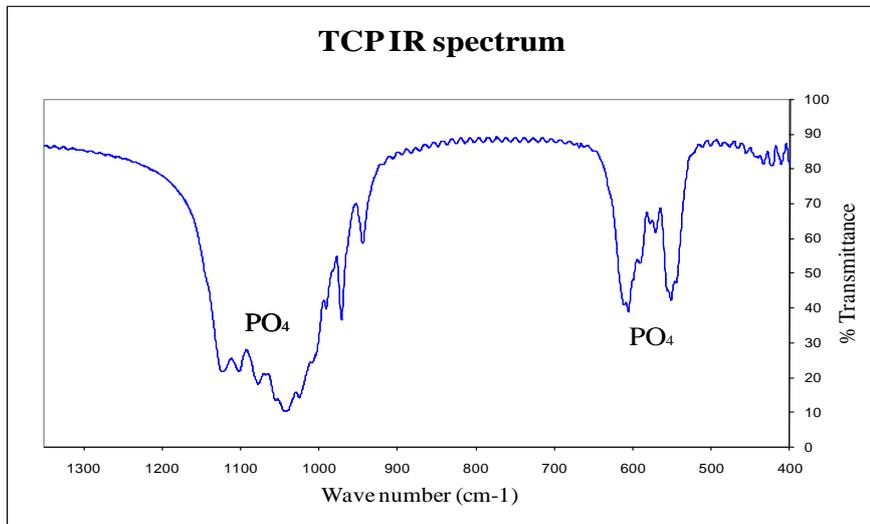


Figure 52. Spectre infrarouge de la même matrice imprimée que dans la figure 51, confirmant qu'aucun pyrophosphate n'est détecté.

1.3 Recherche de polluants ou éléments traces dans la poudre produite

Les résultats obtenus sur nos échantillons confirment la sécurité de notre technique de production. En effet, aucune contamination ou pollution n'avait été observée pendant la synthèse de la poudre ou le processus d'impression.

Les recherches externes de polluants dans la poudre sont résumées dans le tableau 3.

Les données du tableau sont exprimées en milligrammes par kilogramme. Toutes les données avant et après l'impression indiquent que les contaminants sont présents en quantités indétectables ou très faibles. < 1.0 signifie que l'appareil ne peut pas détecter une quantité inférieure à 1 milligramme par kilogramme qui est bien en dessous des valeurs limites acceptables. Elles ont confirmé la très faible variation dans la composition du matériau avant et après impression. Tous les contaminants à haut risque testés étaient indétectables ou présentaient des niveaux très faibles, ce qui confirme la sécurité de notre production pour une future utilisation clinique.

Elément	Avant impression	Après impression
Mercure/Hg	<0.050	<0.050
Arsenic/As	<1.0	<1.0
Plomb/Pb	<1.0	<1.0
Cadmium/Cd	<1.0	<1.0
Antimoine/Sb	<1.0	<1.0
Chrome/Cr	<1.0	<1.0
Nickel/Ni	<1.0	<1.0
Baryum/Ba	2.7	2.8
Cuivre/Cu	<0.050	<1.0

Tableau 3. Recherche de polluants ou d'oligo-éléments dans la poudre exprimée en mg/kg, avant et après le processus d'impression

2 Caractérisation des pièces produites

2.1 Détermination de la microporosité des pièces par pesée hydrostatique

Au cours de ces mesures, nous avons observé et confirmé que la porosité des matrices était liée à leur température de frittage et non à l'épaisseur des couches d'impression. Une température plus élevée induit une diminution de la porosité ouverte. En effet, même si nous avons observé une variabilité entre les échantillons, leur porosité est d'environ 20% pour une température de frittage de 1050°C et diminue autour des 9 à 10% pour une température de frittage de 1120°C. À l'inverse, malgré les variations d'épaisseur des couches d'impression, la porosité ouverte reste stable pour une température de frittage constante. Les données sont résumées dans le tableau 4.

Paramètres des matrices	1	2	3	4	5	6	Moyenne
50 µm / 1050°C	18.40	22.44	19.80	21.92	21.57	21.32	20.91
100 µm / 1050°C	25.13	18.37	19.42	21.05	20.15	21.63	20.96
50 µm / 1120°C	10.10	7.68	12.51	11.32	9.03	8.97	9.94

Tableau 4. Porosité ouverte des matrices

Les données sont exprimées en pourcentage de porosité ouverte des matrices

2.2 Contrôle de la précision d'impression des pièces

Si l'on considère notre premier test sur des cubes de 5 mm d'arête, nos résultats démontrent la précision de notre technique d'impression, mais exposent également ses limites.

En effet, les dimensions des arêtes sont très proches de nos attentes. Sur les axes X et Y, le delta entre le modèle virtuel et les pièces imprimées était au maximum de 0,03 mm. La résolution sur l'axe Y est légèrement plus faible en raison de la technique d'impression, avec une variation maximale de 0,07 mm par rapport au modèle numérique.

Arêtes	Cube A	Cube B
Moyenne X	4.980	4.970
Déviati on standard X	0.008	0.007
Moyenne Y	4.970	4.980
Déviati on standard Y	0.019	0.008
Moyenne Z	4.930	4.960
Déviati on standard Z	0.033	0.008

Tableau 5. Données du premier test d'évaluation de la précision d'impression, étude des arêtes.

Les dimensions moyennes (X/Y/Z) sont exprimées en millimètres.

Le second test confirme ces résultats, avec une variation maximale par rapport au modèle numérique de 0,06 mm pour le cube de 5 mm et de 0,07 mm pour le cube de 10 mm Ces données ont été résumées dans les tableaux 5 et 6.

Arêtes	Cube 5 mm	Cube 10 mm
Moyenne X	4.980	9.980
Déviati on standard X	0.004	0.010
Moyenne Y	4.980	9.980
Déviati on standard Y	0.005	0.004
Moyenne Z	4.960	9.970
Déviati on standard Z	0.009	0.032

Tableau 6. Données du second test d'évaluation de la précision d'impression, étude des arêtes.

Les dimensions moyennes (X/Y/Z) sont exprimées en millimètres.

A l'inverse, l'étude des dimensions des fenêtres montre les limites de la technique par DLP. En effet, nous avons observé une diminution maximale de dimension des fenêtres de 0,16 mm pour les cubes de 5 mm (fenêtres de 1 mm) et de 0,21 mm pour les cubes de 10 mm (fenêtres de 2 mm), tous deux dans l'axe Z. Ces résultats ont été résumés dans les tableaux 7 et 8, et la figure 53 rapporte l'évaluation visuelle de la déviation des matrices avec une tolérance de 75 micromètres.

Fenêtres	Cube A	Cube B
Moyenne X	0.890	0.890
Déviati on standard X	0.008	0.010
Moyenne Y	0.900	0.890
Déviati on standard Y	0.008	0.030
Moyenne Z	0.860	0.860
Déviati on standard Z	0.009	0.015

Tableau 7. Données du premier test d'évaluation de la précision d'impression, étude des fenêtres.

Les dimensions moyennes (X/Y/Z) sont exprimées en millimètres.

Fenêtres	Cube 5 mm	Cube 10 mm
Moyenne X	0.890	1.890
Déviati on standard X	0.010	0.007
Moyenne Y	0.900	1.820
Déviati on standard Y	0.017	0.022
Moyenne Z	0.870	1.790
Déviati on standard Z	0.011	0.046

Tableau 8. Données du second test d'évaluation de la précision d'impression, étude des fenêtres.

Les dimensions moyennes (X/Y/Z) sont exprimées en millimètres.

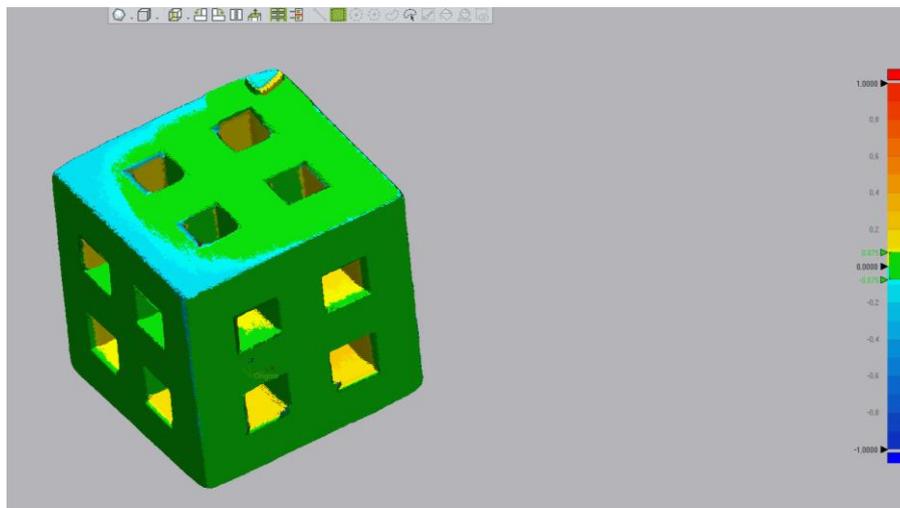


Figure 53. Comparaison d'un cube de 5 millimètres acquis par micro-CT scan avec la planification 3D. Le vert représente les points dont la tolérance est inférieure à 75 microns.

2.3 Relargage des ions calcium

L'étude de la libération des ions calcium en milieu aqueux a permis d'observer un impact direct de la température de frittage. Comme attendu, l'augmentation de la température de frittage induit une baisse de la libération de calcium. Pour tous les échantillons, la libération maximale de calcium dans le milieu se produit au cours des 12 premières heures. Elle diminue progressivement puis se stabilise sans atteindre une phase de plateau.

Après 6 jours dans l'eau pure, l'étude des échantillons rincés pendant 5 minutes met en évidence que la libération maximale de calcium a été atteinte avec l'échantillon fritté à 1000°C et était de 10,67 mg/l, alors qu'elle était de 7,73 mg/l pour l'échantillon à 1050°C et seulement de 6,3 mg pour l'échantillon à 1100°C.

Il faut également noter que le rinçage des différents échantillons réduit la libération de calcium dans le milieu pendant toute la durée du test. Cependant, l'impact maximal a été observé avec la température de frittage la plus basse et a été réduit à 1050°C et 1100°C.

Nos données sont résumées dans le tableau 9 et la figure 54.

Paramètres des matrices	3 heures	6 heures	12 heures	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	5 jours	6 jours
1000°C/5 minutes	2.50	3.60	5.35	6.24	7.15	8.86	9.01	9.89	10.67
1000°C/60 minutes	2.40	3.50	4.84	5.72	6.31	6.75	7.23	7.74	8.19
1050°C/5 minutes	0.95	2.20	3.01	4.09	4.97	5.80	6.52	7.15	7.73
1050°C/60 minutes	0.94	2.20	2.97	3.70	4.60	5.35	6.05	6.72	7.32
1100°C/5 minutes	0.90	1.60	2.52	3.60	4.47	5.14	5.70	6.28	6.30
1100°C/60 minutes	0.86	1.56	2.48	3.19	3.85	4.35	4.80	5.30	5.73

Tableau 9. Relargage des ions calcium en fonction des températures de frittage et de la durée de rinçage des matrices

Les données sont exprimées en milligrammes de calcium par litre

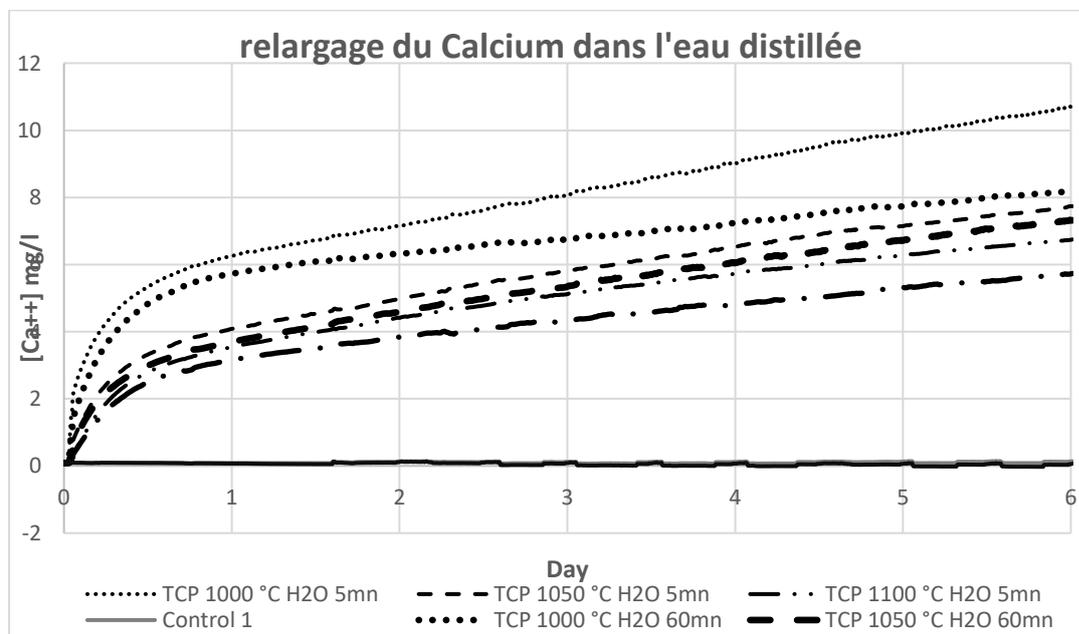


Figure 54. Relargage des ions calcium dans l'eau distillée.

Les données sont exprimées en milligrammes par litre.

3 Évaluation de la biocompatibilité de la technique d'impression

3.1 Étude de l'impact de la température de frittage et de la technique de mise en forme

Les résultats de ce test sur les ostéoblastes comparant les matrices coulées et imprimées démontrent que notre technique d'impression n'a pas d'incidence majeure sur la prolifération des cellules. En effet, pour les deux températures de frittage testées les résultats sur les matrices imprimées et coulées sont comparables.

Nous avons également constaté une amélioration de la prolifération des cellules corrélée à une température de frittage plus élevée. Enfin, nous avons également observé qu'à 6 jours, les ostéoblastes semblent bénéficier de la culture sur des matrices frittées à 1100°C avec des résultats se rapprochant, voir dépassant le groupe témoin.

Les résultats de notre premier test sur les ostéoblastes comparant les matrices moulées et imprimées sont résumés dans la figure 55. Lors de celui-ci, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les cultures sur matrices coulées et imprimées. Le facteur le plus influent était la température de frittage, et nous avons constaté une amélioration de la prolifération des cellules corrélée avec l'augmentation de la température de frittage. Par ailleurs, nous avons également noté une amélioration de la prolifération des ostéoblastes sur les matrices en fonction de la durée de culture, et de meilleurs résultats sur les matrices frittées à 1100°C avec une prolifération se rapprochant, voir dépassant celle du groupe témoin.

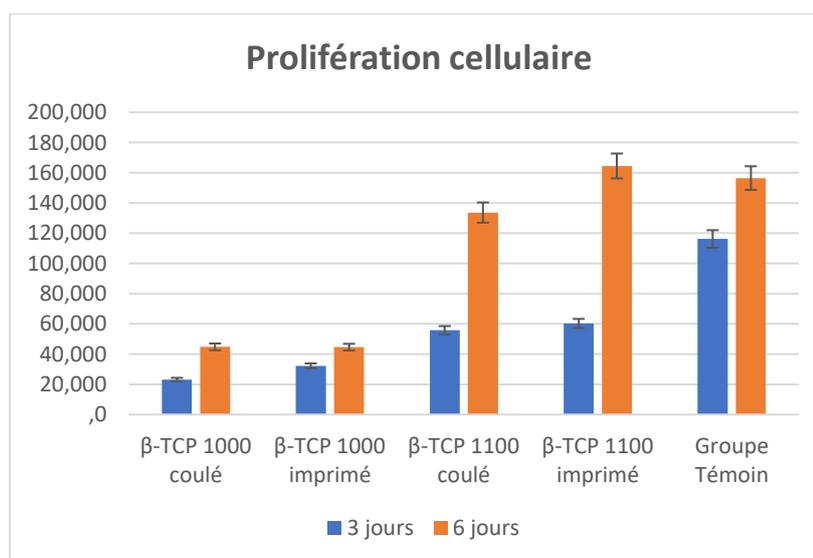


Figure 55. Comparaison de la prolifération cellulaire in vitro à 3 et 6 jours sur matrices coulées et imprimées à 1050°C et 1100°C.

3.2 Impact du rinçage des matrices

Lors de ce test, nous avons observé qu'un temps de rinçage des matrices d'une heure semble conduire à une augmentation de la prolifération des ostéoblastes en comparaison à notre protocole de rinçage standard de 5 minutes. Cela semble cohérent avec les résultats observés lors des tests de relargage ionique.

Concernant le remplacement du milieu de culture, nos résultats semblent montrer qu'un remplacement précoce du milieu semble préjudiciable. En effet, on note une diminution de prolifération cellulaire dans le groupe « fond de boîte » avec remplacement en comparaison du témoin à 3 jours. Toutefois, après quelques jours de culture, le remplacement du milieu de culture apparaît bénéfique comme illustré dans la figure 56.

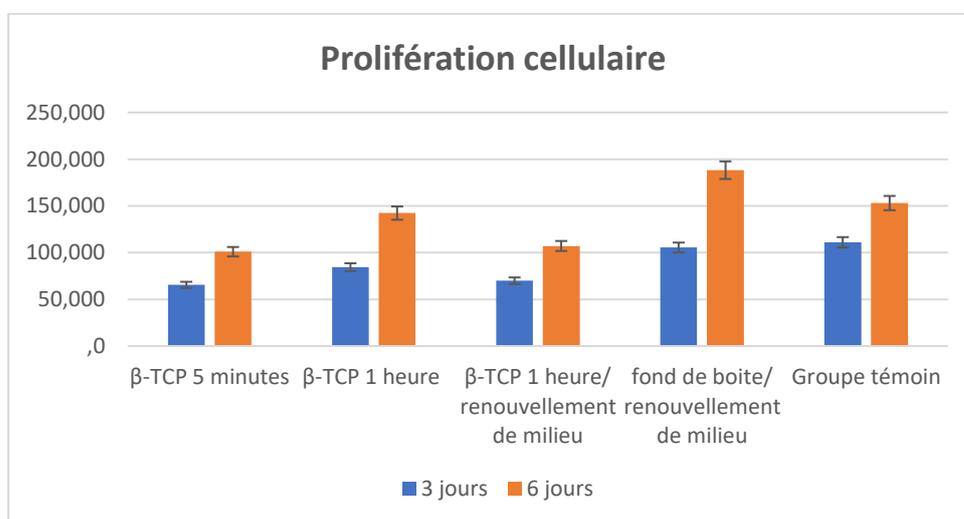


Figure 56. Evaluation de l'impact sur la prolifération cellulaire du rinçage des matrices et du renouvellement du milieu de culture.

Ces résultats nous ont amenés à faire évoluer notre protocole vers un rinçage systématique des matrices à l'eau ultrapure pendant 3 phases de 2 heures avec agitation à 37°C et agitation à 80 rpm avant stérilisation à 170°C. D'autre part, pour les cultures de plus de trois jours, nous avons décidé de réaliser des renouvellements quotidiens de milieu de culture à partir du troisième jour.

4 Étude qualitative de dépôts protéiques sur matrices phosphocalciques

Durant ces tests, nos pastilles témoins ont montré l'absence de marquage des matrices non imprégnées.

L'accroche du film protéique sur les matrices est quant à elle très rapide. En effet, aucune différence n'a été mise en évidence entre un temps de séchage de 5 ou 15 minutes et dans les deux cas, on aboutit à un dépôt protéique.

Comme attendu, le principal élément influençant l'accroche protéique est la température de frittage et la modulation de la microporosité qu'elle induit. En effet, on observe une imprégnation en profondeur de matrice frittées à 1050°C avec une accroche importante du film protéique. À l'inverse les pastilles frittées à 1100°C présentent un aspect de film protéique sans imprégnation en profondeur (figure 57).

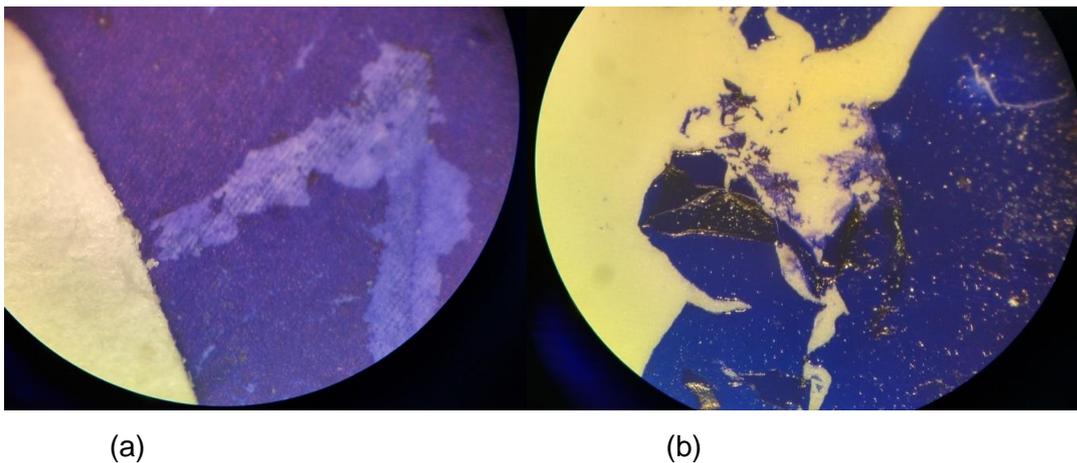


Figure 57. Observation au microscope optique du film protéique marqué. On note un film homogène sur la pastille frittée à 1050°C (a), alors qu'à 1100°C (b), en comparaison le film semble emballer les matrices et ne pas réellement y adhérer. Celui-ci est friable et se fragmente laissant apparaître la matrice sous-jacente sans marquage.

(grossissement x10)

Ces observations ont été reproduites sur des matrices tubulaires, prototypes de nos matrices de cultures en flux. Dans ce cas, le sérum a été introduit dans les matrices avant qu'elles ne soient séchées, puis marquées comme précédemment décrit (figures 58 et 59).

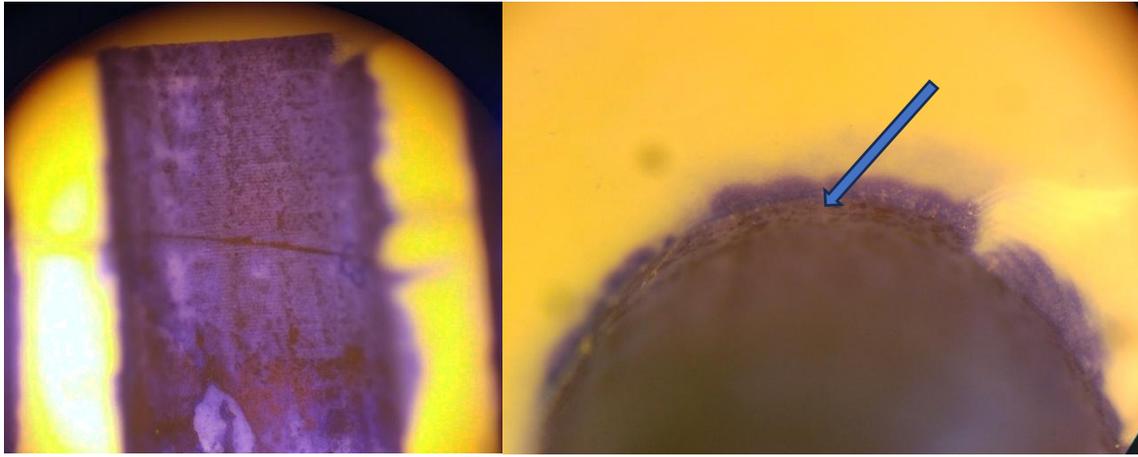


Figure 58. Film sur matrices frittées à 1050°C. On observe aisément en microscopie optique la présence d'un marquage qui s'étend au sein des premières couches de leurs parois intérieures. (grossissement x10)

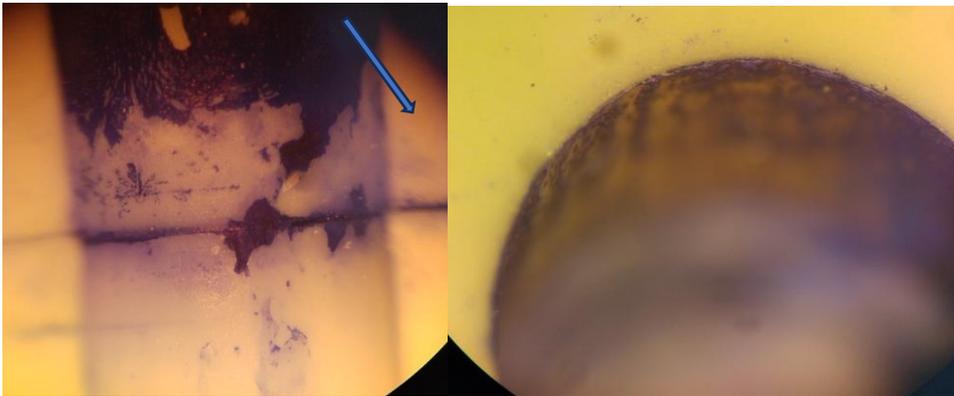


Figure 59. Film sur matrices frittées à 1100°C. On observe en microscopie optique un effritement du film protéique marqué qui ne pénètre pas au sein des matrices. (grossissement x10)

5 Étude de l'impact d'un dépôt de plasma riche en plaquettes activées (PRPaC) sur la prolifération d'HUVECs

Lors de cet essai, nous avons observé l'impact positif du dépôt de PRPaC pour la culture d'HUVECS (figure 60). En effet, en comparant le groupe « témoin » et le groupe « fond de puits avec dépôt », on applinote une nette amélioration de la prolifération cellulaire liée au dépôt protéique.

Par ailleurs, en comparant les groupes où la culture est réalisée en présence d'une pastille de β -TCP, on note une large amélioration de la prolifération des HUVECs, qui est concordante avec les observations en microscopie optique (figure 61). On passe globalement d'une prolifération équivalente à 20-30% du groupe témoin à une prolifération d'environ 75 à 80%. On note enfin une faible amélioration de la prolifération cellulaire liée à la réalisation d'un multidépôt de PRPaC sur les pastilles. Ces différents éléments nous ont amenés à confirmer l'utilisation d'un dépôt mono couche de PRPaC lors de nos essais futurs de culture d'HUVECs sur matrices de β -TCP.

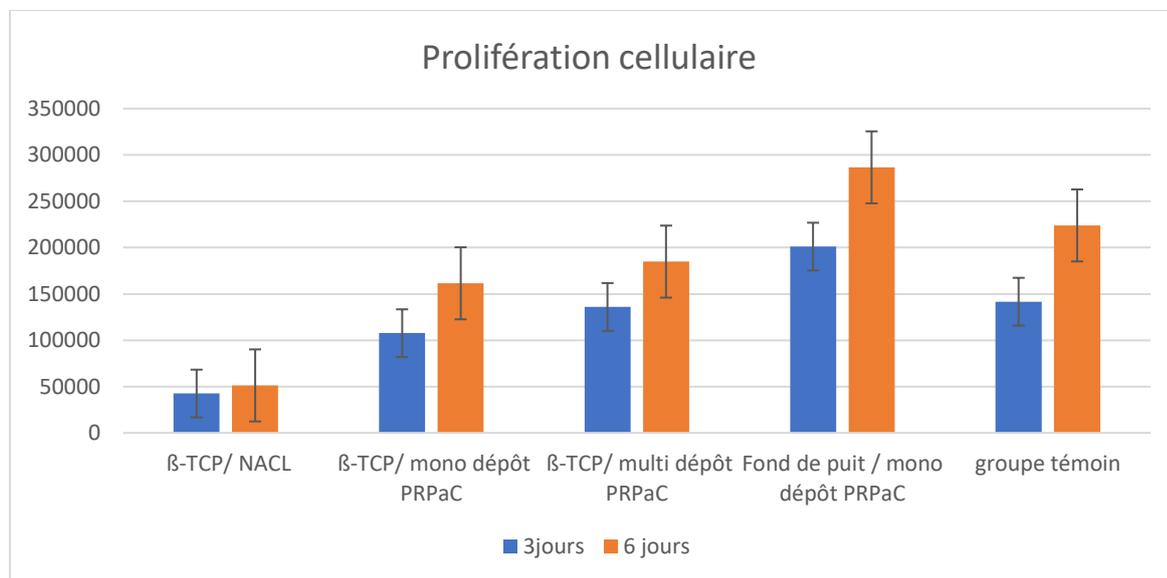
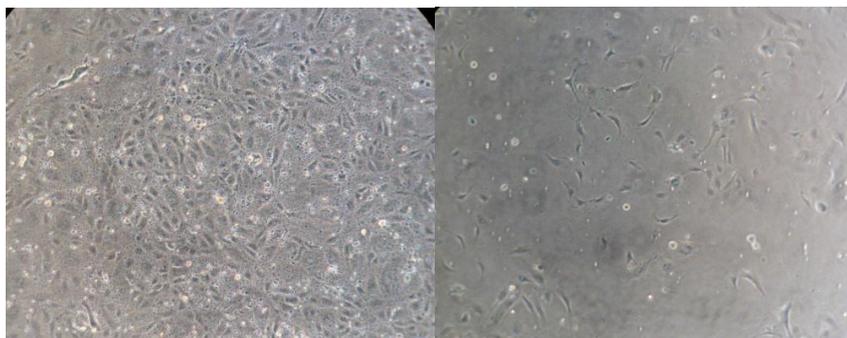


Figure 60. Evaluation de l'impact d'un dépôt de PRPaC sur la culture d'HUVECs in vitro à 3 jours et 6 jours.



(a)

(b)

Figure 61. Confluence des HUVECS en microscopie optique sur pastilles de β -TCP avec dépôt monocouche de PRPaC (a) et sans dépôt à 3 jours. (grossissement x100)

6 Étude en microscopie confocale de la culture d'HUVECs sur matrices de β -TCP

Lors de ces essais, nous avons observé une augmentation progressive de la confluence des HUVECs sur les pastilles disposant d'un dépôt de PRPaC (figure 62). A l'inverse, on note la diminution progressive des cellules visibles sur les échantillons ne disposant pas d'un dépôt protéique (figure 63). L'étude des pastilles sans culture d'HUVECs confirme quant 'à elles l'absence de fluorescence en microscopie confocale de nos échantillons de β -TCP et la présence d'une fluorescence du dépôt de PRPaC liée à la présence de débris plaquettaires (figure 64).

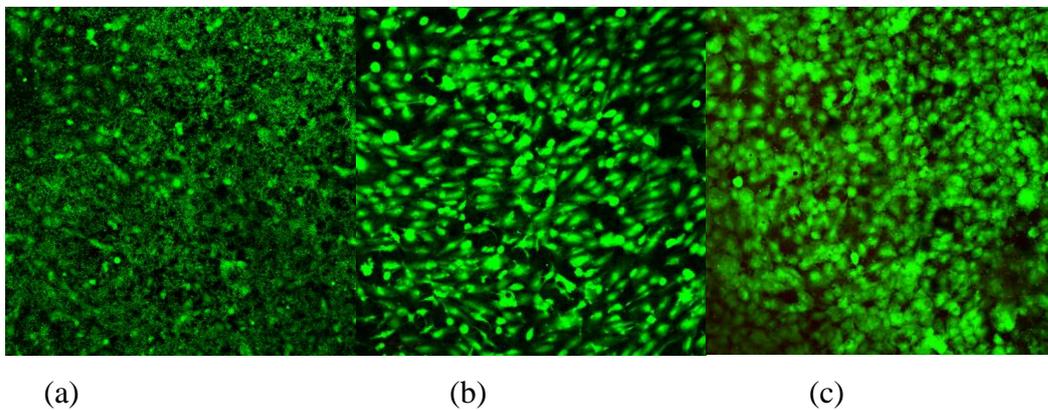


Figure 62. Confluence des HUVECS en microscopie confocale sur pastilles de β -TCP avec dépôt monocouche de PRPaC.à 4heures (a), 24 heures (b) et 72 heures (c). (grossissement x100)

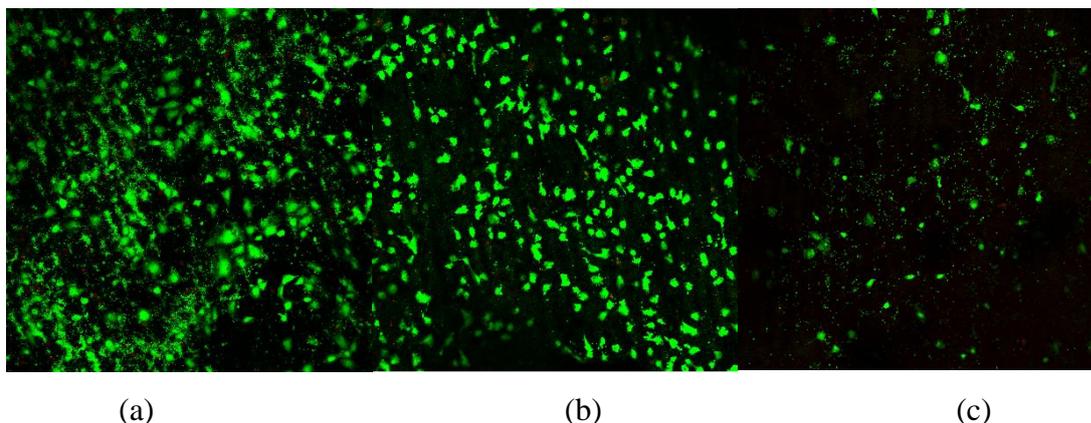


Figure 63. Confluence des HUVECS en microscopie confocale sur pastilles de β -TCP sans dépôt de PRPaC.à 4heures (a), 24 heures (b) et 72 heures (c). (grossissement x100)

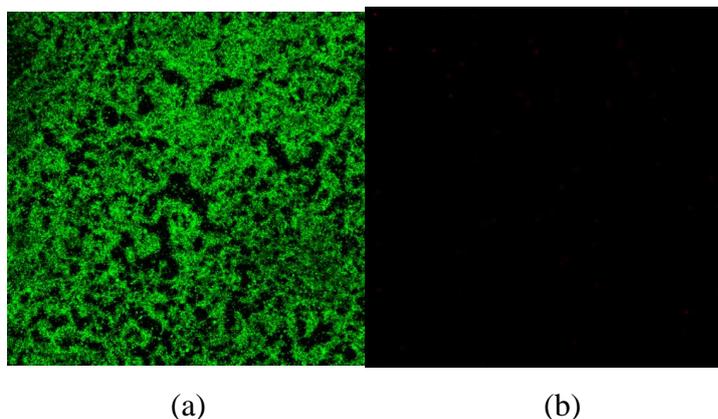


Figure 64. Aspect en microscopie confocale de matrices avec (a) et sans dépôt (b) de PRPaC après 4 heures. (Observation identiques à 24 et 72 heures). (grossissement x100)

La mesure de la prolifération cellulaire lors de cet essai, confirme nos précédentes observations. D'une part, la réalisation d'un dépôt de PRPaC permet la prolifération des HUVECs sur matrices de β -TCP (environ 82% du témoin) en restant inférieur à celle du groupe témoin. D'autre part, ce test confirme qu'un dépôt de PRPaC sur le fond de puits améliore la prolifération cellulaire en comparaison au groupe contrôle (figure 65). Notre technique de production permet donc de générer un PRPaC avec les propriétés attendues.

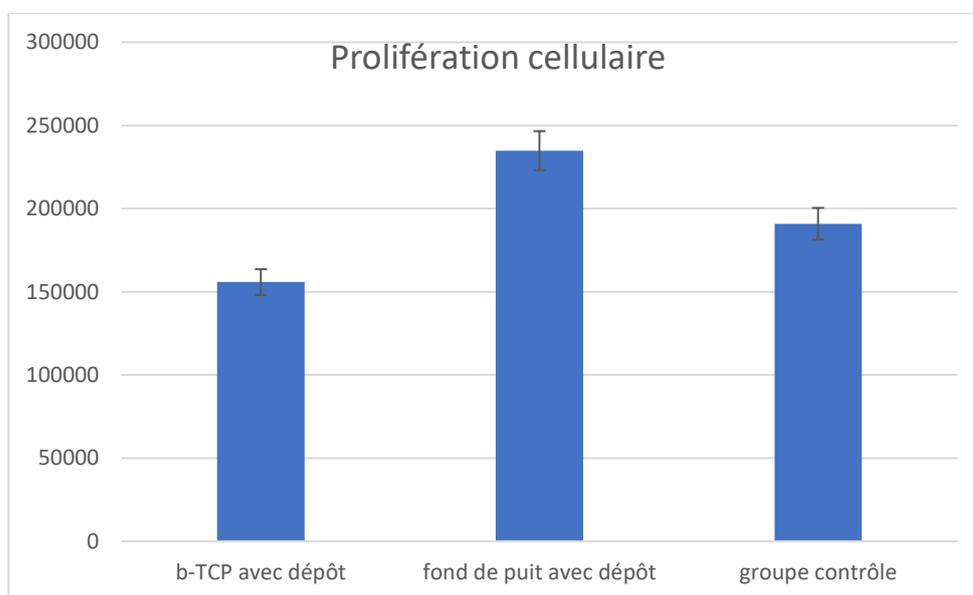


Figure 65. Evaluation de l'impact d'un dépôt de PRPaC sur la culture d'HUVECs in vitro après 3 jours de culture.

Chapitre 4 : Discussion

L'objectif de ce travail de recherche était de progresser dans le développement d'une matrice vascularisée pouvant à terme présenter une alternative à l'utilisation de lambeaux libres osseux.

Dans le corps humain, la croissance et la cicatrisation osseuse sont des processus lents, physiologiques, se déroulant dans des conditions adaptées (bonne vascularisation, homéostasie, absence d'infection etc.) et à température corporelle. Les ostéoblastes suivent la trame collagénique pour édifier les travées harvesiennes. Lorsque le volume osseux manquant est important, son remplacement par un volume équivalent est préférable (reconstruction) et nous en avons décrit les modalités (biomatériaux, os non vascularisé, os vascularisé). L'os vascularisé est la technique la plus fiable et la plus aboutie pour remplacer ce volume dans un temps restreint. Néanmoins, le prélèvement à distance est un frein (lourdeur de l'intervention et volume disponible) et nous en avons débattu sur le plan de la morbidité. L'idéal est donc de pouvoir détenir un volume de substitut osseux lui-même vascularisé. De nombreux verrous techniques sont présents pour mimer ce volume osseux : qualité de la trame phosphocalcique (impression, frittage), absence de trame collagénique, difficile contrôle du biomimétisme (porosité, microporosité, organisation spatiale, stabilité chimique de l'organisation phosphocalcique). Afin de surmonter ces imperfections, la production d'une trame phosphocalcique perfusable apparaît comme un accélérateur pour la production de ce volume osseux de remplacement. Le contrôle précis des paramètres de la structure permet d'ajuster au mieux l'hébergement et la mise en fonction de l'activité cellulaire qui permettra de pérenniser le volume osseux remplacé (composition, stabilité chimique, microarchitecture, adhésion protéique, perfusabilité etc.).

Toute la difficulté de ce travail réside dans la difficulté à définir ces périmètres. En effet, la production de la matrice doit tenir compte de paramètres très précis et répondre au cahier des charges idéal de biocompatibilité, résistance mécanique, absence de cytotoxicité et possibilité d'être perfusé par le flux sanguin du receveur, car passé un certain volume, la perfusion par imbibition et pénétration des vaisseaux (greffe non vascularisée) ne permet pas l'ostéointégration et l'ostéoinduction, mais la séquestration et la surinfection.

En accord avec les données de la littérature, les données obtenues dans cette étude confirment que les matrices β -TCP, produites à l'aide de notre technique de mise en forme par DLP, présentent des propriétés prometteuses pour l'ingénierie tissulaire osseuse (164). En effet, nous avons démontré que la pureté de la poudre β -TCP produite ainsi que les propriétés physico-chimiques et la biocompatibilité des matrices ne sont pas altérées par notre procédé d'impression. Nos données ont également confirmé que l'impression par DLP permet une impression reproductible et précise des matrices phosphocalciques. Notre technique de mise en forme semble donc être une base solide pour le développement de matrices phosphocalciques comportant des architectures complexes incorporant

différentes macroporosités contrôlées et un réseau microfluidique nécessaire pour produire des matrices pour la reconstruction osseuse à grand volume.

Par ailleurs, même s'il n'a pu être testé lors d'essais de culture dynamique, le développement de notre bioréacteur et ses caractéristiques devraient à terme s'avérer être un avantage non négligeable dans la réalisation d'essais de culture en flux lors de prochains travaux.

1 Apatites synthétiques en ingénierie tissulaire osseuse

Depuis des décennies, le β -TCP a démontré des propriétés de biocompatibilités et d'ostéoconductions permettant l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes.

Toutefois, bien que notre étude se soit concentrée sur le β -TCP, d'autres apatites synthétiques, telles que l'HA et le BCP, un mélange d'hydroxyapatite et de β -TCP, sont également étudiées du fait de leurs propriétés biologiques et mécaniques (165,166). En effet, toutes les apatites synthétiques présentent des propriétés d'adhésion et prolifération des ostéoblastes (ostéoconduction), stimulent la néoformation osseuse (ostéoinduction), mais présentent également les capacités de stimuler la croissance osseuse in vivo et de recruter des cellules souches de moelle osseuse. Toutefois, ces propriétés sont variables en fonction de la composition des apatites synthétiques et comprendre leurs propriétés physico-chimiques respectives est essentiel à l'optimisation de nos matrices phosphocalciques synthétiques (49).

1.1 Impact de la composition des matrices

À ce jour, l'hydroxyapatite du fait de sa composition proche des apatites biologiques, reste l'une des plus utilisées dans les procédures de reconstructions osseuses (167). Elle présente une grande stabilité en milieu aqueux qui est nécessaire à l'adhésion et la prolifération cellulaire. Toutefois, la contrepartie de cette bonne ostéoinduction est la faiblesse de ses propriétés d'ostéoinduction(168). Le β -TCP est également très populaire depuis de nombreuses années, en ingénierie et reconstruction osseuse. Comme l'HA il s'agit d'une apatite synthétique, mais qui à la différence de cette dernière est soluble en milieux aqueux et est dégradé de manière plus importante par les ostéoclastes (169,170). Il peut ainsi être résorbé en totalité au niveau du site reconstruit et possiblement remplacé par de l'os natif. Toutefois, si la résorption du -TCP est bénéfique pour ses capacités d'ostéoinduction, elle est en revanche préjudiciable à l'ostéoconduction, réduisant l'adhésion cellulaire, et la prolifération osseuse ainsi que la résistance mécanique du construit. Une matrice phosphocalcique idéale devrait donc permettre d'obtenir un compromis entre résorption et stabilité (38). Les « Biphasic Calcium Phosphates » comme leur nom l'indique sont composés de deux apatites synthétiques différentes en l'occurrence l'HA et le β -TCP. On parle de phosphates de calcium biphase, car les proportions d'HA

et de β -TCP qui rentrent dans leurs compositions sont très variables. Leur production est variable est peut-être le résultat d'un mélange de poudre d'HA et β -TCP ou d'une synthèse avec présence d'un mélange moléculaire des composants. Ce second type de production permet une répartition homogène des différents types de molécules avec comme impact une harmonisation des propriétés physico-chimiques au sein des matrices (171). Les propriétés physico-chimiques des BCP produits dépendent ainsi de la proportion l'HA et de β -TCP qui les composent, mais il est admis que leurs propriétés d'ostéoinduction sont supérieures à celles de l'hydroxyapatite et équivalentes ou supérieures à celles du β -TCP (48).

1.2 Impact des propriétés physiques des matrices

La microporosité des matrices, leurs surfaces spécifiques et donc leurs propriétés d'adsorption, en particulier, des protéines sont liées(172,173). Une augmentation de la microporosité induit une augmentation de l'adsorption de multiples protéines et des micropores de plus de 20 nm semblent essentiels à cette propriété(48,62). Ce point a été confirmé lors de notre travail qualitatif sur l'accroche protéique en fonction de la température de frittage. L'augmentation de la température de frittage induit une diminution de l'accroche protéique en lien avec la réduction de la microporosité des matrices.

Un autre élément influençant l'adsorption des matrices est la taille des grains et particules qui la composent. En effet, ceux-ci vont avoir un impact sur la rugosité des matrices. Les surfaces de ces dernières ne sont pas parfaitement planes, mais se constituent de pics et creux qui s'alternent. La rugosité se définit alors comme la distance en creux ou pics. Différentes études semblent démontrer qu'une faible taille de grain induit une importante nanorugosité qui entraîne une meilleure adsorption des protéines. Une dimension de moins de 100nm des grains et de la rugosité est bénéfique à l'adsorption protéique des matrices (174,175). Par ailleurs, la solubilité des matrices joue également un rôle essentiel dans leurs propriétés biologiques. Ainsi, il a été démontré lors d'essais de culture in vitro de cellules ostéoblastique MG-63 que l'HA permet une bonne adhésion cellulaire, mais qu'avec le temps et les remaniements de surface, cette adhésion décroît. Toutefois, la composition du milieu de culture est peu affectée et conduit à une bonne croissance cellulaire. Durant le même essai sur des matrices de β -TCP, les ostéoblastes ont montrés quant à eux, une moins bonne capacité à proliférer et se propager sur la surface de la matrice du fait de l'instabilité de la surface des matrices. De plus, le relargage ionique a conduit à des niveaux élevés de potassium, et bas de calcium et magnésium qui ont entraîné une cytolysse. Enfin, des matrices de BCP, ont montré des propriétés intermédiaires (176). Cette solubilité est toutefois variable et notre étude, confirme que la température de frittage apparait comme un élément essentiel dans la modulation de la vitesse de résorption des matrices. Comme nous l'avons observé, l'augmentation de la température de frittage conduit à une diminution de la microporosité des matrices ainsi que de leur solubilité. Nous n'avons pas d'outils directs pour contrôler la nanodimension de l'organisation de notre trame phosphocalcique comme le fait le dépôt progressif

des ostéoblastes, nous devons alors maîtriser les conséquences du choc thermique que constitue le frittage sur l'organisation chimique et biomimétique. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui rapportent la réduction de la microporosité, associée à une augmentation de la taille des grains et de leur surface spécifique (177,178). Par ailleurs, nous avons également observé qu'un changement de milieu de culture permet également d'améliorer la prolifération cellulaire en purgeant les relargages ioniques nocifs. De même, afin d'améliorer nos résultats de culture avec des températures de frittage inférieures, nous avons rincé nos matrices avant culture afin d'éliminer les particules les moins adhérentes et les plus réactives résultant de l'étape de frittage. Nos résultats ont montré une amélioration de la prolifération des cellules sur des matrices rincées de manière plus longue. Ceci est en accord avec notre étude de la libération d'ions calcium qui met en évidence une diminution de la libération liée à l'augmentation du temps de rinçage, mais également à la température de frittage, les matrices les plus réactives étant celles frittées à plus basse température.

À la vue de ces données nous pourrions conclure qu'une augmentation de la température de frittage est toujours bénéfique pour la culture d'ostéoblastes sur matrices de β -TCP. Toutefois, il faut nuancer ces résultats et rappeler que ces observations sont réalisées dans le cadre d'études in vitro qui sont loin de reproduire le modèle complexe d'une culture in vivo. En effet, si in vitro la stabilité des matrices de β -TCP concourt à une amélioration de leurs propriétés d'ostéoconduction in vivo, les matrices sont exposées à des systèmes beaucoup plus complexes comportant des propriétés d'auto-régulation et tamponnement des milieux ainsi que des interactions entre de multiples lignées cellulaires qui peuvent largement modifier les résultats de cultures. C'est pourquoi, malgré nos observations, nous avons choisi de porter notre attention sur des matrices de β -TCP frittées à 1050°C qui permettent une bonne accroche protéique nécessaire au coating que nous souhaitons mettre en place pour les cultures de cellules endothéliales.

Toutefois, les BCP, du fait de l'association d'HA et de β -TCP semblent également être un compromis intéressant à explorer pour de futurs essais de culture. En effet, comme nous l'avons vu, il présente des propriétés physico-chimiques alliant les avantages de matrices de β -TCP et d'HA. Ils nécessitent toutefois un travail bien plus complexe. En effet, du fait des proportions variables d'HA et de β -TCP qui les composent, le nombre de paramètres influençant leurs propriétés physico-chimiques s'avère largement augmenté. On peut ainsi citer, la réalisation d'un mélange homogène moléculaire lors de la synthèse ou un mélange de macromolécules, la variation des proportions d'HA et de β -TCP, la température de frittage, etc... De plus, du fait de l'utilisation de techniques d'impression pour la conception de matrices complexes, les propriétés des barbotines, telles que leur fluidité et la charge en apatites doivent être homogénéisées pour les rendre compatibles avec des techniques d'impression. Une trop grande ou trop faible viscosité va avoir un impact sur la pénétration de la lumière dans la barbotine, sa vitesse de relaxation, son étalement et bien d'autres paramètres. Afin d'obtenir le

contrôle de la composition biologique, mais également de la macro et microarchitecture des pièces produites des formulations spécifiques de liants polymères sont nécessaires (179–183).

Pour finir, l'ensemble de ces éléments démontrent que le contrôle de l'ensemble de la chaîne de production des matrices phosphocalciques est fondamental pour les applications biomédicales ultérieures et justifie le développement de notre propre processus de synthèse et mise en forme. Il en découle la complexité de la procédure avec une chaîne complète de contrôle allant de l'impression à la culture cellulaire en flux et passant par la caractérisation physico-chimique exhaustive. Ce procédé devrait faire appel à une organisation sous forme d'un « regeneration center » afin d'entretenir l'ensemble des différents éléments de la chaîne d'analyse en fonction des produits de l'impression.

2 Pureté des matrices produites par DLP et biocompatibilité :

À ce jour, l'impression par dépôt de fil fondu est la plus utilisée dans la mise en forme des matrices de biomatériaux (184). Elle présente toutefois un certain nombre de limites. Ainsi, les buses d'extrusion présentent un diamètre important et donc une faible résolution comprise classiquement entre 0,4 et 0,5 mm, et la vitesse de production de cette technique est limitée, car chacun des points à imprimer est produit individuellement (185).

La technique d'impression quant à elle utilise la polymérisation couche par couche, l'ensemble des points d'une même couche sont ainsi imprimés de manière simultanée ce qui est un important gain de temps en comparaison de l'impression par fil fondu. De même, en fonction de la taille des pièces à produire et de la surface d'impression, plusieurs matrices peuvent être produites simultanément.

Afin de produire des matrices phosphocalciques, l'impression par DLP utilise des barbotines composées de poudres phosphocalciques et de liants polymères. Jusqu'à récemment, ces techniques de production ne cherchaient pas à éliminer complètement les polymères au sein des matrices afin de maintenir leur intégrité structurelle. Notre étude est donc l'une des premières à rapporter la production de matrices phosphocalciques pures produites par impression en 3D (67,83,186). Ceci est rendu possible par notre technique de production qui combine les processus de déliantage et frittage en une seule étape. Le déliantage permet la destruction et l'élimination des composants biologiques présents dans les matrices, y compris les liants polymères alors que le frittage permet la densification de la matrice produite, rendant superflu le maintien d'un soutien par les polymères.

L'étude de la composition de nos matrices par diffraction des rayons X et spectroscopie infrarouge a mis en évidence de faibles traces de pyrophosphate et d'hydroxyapatite, confirmant ainsi la qualité de notre production de poudre de β -TCP, mais également des pièces imprimées. La recherche de polluants a permis de confirmer quant à elle que nos procédés de synthèse et d'impression n'ont pas introduit de polluants au sein de nos poudres et matrices. Lors de nos futurs essais, cette procédure

de caractérisation de nos poudres et matrice sera reproduite selon nos standards mis en place afin de garantir la qualité et l'homogénéité de nos productions.

L'étude de la microporosité ouverte a quant à elle confirmé l'absence d'impact de l'épaisseur des couches imprimées sur la microporosité, mais bien celle de la température de frittage. Une augmentation de celle-ci s'accompagne d'une réduction de la microporosité. De même, la micro- et macroporosité ouverte permet de faciliter l'élimination des composés organiques lors de la phase de déliantage. L'ensemble de ces éléments viennent ainsi tempérer nos résultats de culture in vitro qui montrent une amélioration de la prolifération cellulaire sur des matrices frittées à plus haute température et nous ont amenés à choisir une température de frittage de 1050°C pour la production de pièces β -TCP.

Enfin, les résultats de nos cultures d'ostéoblastes présentent des résultats très proches entre les matrices imprimées et coulées, ce qui démontre que notre technique d'impression n'altère pas les propriétés biologiques et la biocompatibilité de matrices produites.

Ainsi, l'ensemble de ces éléments démontrent la sécurité de l'efficacité de notre technique de mise en forme pour la production de matrices phosphocalciques mises en forme par impression 3D (187).

3 Utilisation du DLP pour les applications d'ingénierie tissulaire

Une des limites des techniques de mise en forme classiques est le contrôle des interconnexions de leurs macroporosités. En effet, elles aboutissent en la création d'une macroporosité présentant des interconnexions variables en dimensions et aléatoires dans leur répartition au sein des matrices (84).

Comme illustré par la figure 15, la technique de mise en forme que nous utilisons précédemment comportait des limites. En effet, on pouvait noter sur les pièces produites des gradients d'interconnexions et de retraits variables liés aux frottements des pièces du moule. De ce fait, la reproductibilité des caractéristiques des pièces était très difficile, voire quasi impossible à obtenir. De même, nous avons élaboré par cette même technique des cylindres à centre macroporeux et contours microporeux comme illustrés par la figure 19.



Figure 66. Matrices en fin de phase de déliantage. On note les fissures des parois microporeuses par lequel le polyméthacrylate de méthyle se déverse.

Toutefois, comme illustré par la figure 66, on note que ce design de pièce pourtant peu complexe entraîne des difficultés lors de la phase de déliantage. Ainsi, on note que malgré une montée en température plus douce et longue, l'élimination de l'édifice organique induit une fissuration des pièces au niveau des parois microporeuses. Des designs complexes tels que nous les avons élaborés par prototypage rapide lors de ce travail de thèse comme illustré en figures 36 et 38 nous semblent impossibles sans utilisation du prototypage rapide. Et il est à noter que ceux-ci ne sont encore qu'une ébauche des designs beaucoup plus complexes que nous envisageons pour le développement de réseaux microfluidiques et de matrices à macroporosités variables et contrôlées.

À l'inverse, comme nous l'avons expérimenté dans cette étude, l'utilisation du prototypage rapide et plus particulièrement du DLP permet un contrôle précis de la macroporosité des matrices produites, ainsi que de leur design (188).

Toutefois, le DLP présente également des contraintes spécifiques. En effet, il nécessite de trouver un compromis dans la composition des barbotines afin de permettre à la fois, une charge maximale en poudre phosphocalciques, mais également le maintien d'une fluidité compatible avec la technique d'impression (189). C'est pourquoi lors de ce travail, nous avons cherché à déterminer la précision de notre technique d'impression avec une charge en poudre de la barbotine de 68%. Celle-ci est équivalente aux charges en poudre utilisées lors des mises en forme par coulées, ce qui est supérieur à la plupart des autres techniques d'impression 3D par DLP.

Notre travail semble avoir mis en évidence le potentiel de notre technique de mise en forme en raison de sa simplicité de mise en œuvre, mais également de la précision et la reproductibilité des pièces produites. Un des avantages de l'utilisation du frittage dans notre processus est le retrait homogène des pièces vertes qui contribue à améliorer la précision de la mise en forme. Dans notre exemple précis, à 1050°C, le retrait entre les pièces vertes et frittées était de 21%. Le frittage permet donc un gain théorique de précision de 21% des pièces produites à l'aide de notre imprimante pour les paramètres fixés lors de cette étude. De plus, l'étude des dimensions des pièces produites à partir d'un même modèle tridimensionnel a montré des variations marginales de celles-ci sur un même axe.

De ce fait, la connaissance du retrait des pièces produites après frittage est un élément essentiel à prendre en compte dans cette technique de mise en forme. Tout comme la composition de la barbotine, le retrait va énormément varier en fonction de la composition des poudres phosphocalciques et de leur charge dans la barbotine. Cela aboutit à une grande variété de paramètres sur lesquelles influencer afin de moduler les propriétés physico-chimiques et donc biologiques des matrices phosphocalciques.

Cependant, nos données mettent également en évidence les limites de notre imprimante. Celles-ci sont probablement liées à la viscosité de notre barbotine, à sa vitesse de polymérisation et à la diffusion de la lumière projetée. Ce problème est amplifié au niveau des fenêtres des cubes imprimés du fait de leurs dimensions et de la nécessité d'imprimer une couche sans échafaudage sous-jacent. Ces données sont conformes à la littérature et des correctifs futurs pourraient nous permettre d'améliorer nos résultats (190). Ainsi, l'axe Z présente des déformations plus importantes que les axes X et Y qui

peuvent être compensées sur le modèle numérique. De plus une modification de la source lumineuse de l'imprimante pourrait également permettre une amélioration de sa résolution que nous évaluons actuellement à moins de 50 μm .

À ce jour, la plupart des applications cliniques impliquent l'utilisation de phosphates de calcium synthétiques sous forme de poudres ou de blocs préfabriqués afin de combler les pertes de substance osseuses. Une des limites de leur utilisation est leur absence d'adaptation précise à la perte de substance. En effet, celle-ci peut aboutir à une instabilité mécanique de la zone reconstruite qui est préjudiciable à sa colonisation vasculaire et induit un risque de pseudarthrose, d'infection et finalement d'échec de la reconstruction. L'impression de matrices phosphocalciques sur mesure pour les reconstructions osseuses présente ainsi un intérêt majeur dans ce contexte (37,66).

Un autre élément à prendre en compte dans les reconstructions osseuses est la grande variété des macroarchitectures osseuses comportant des macroporosités variables. Les pores de l'os trabéculaire présentent des dimensions comprises entre 200 et 700 μm et une porosité allant de 50 à 90 %, alors que l'os cortical présente quant à lui une porosité inférieure à 20 % et des pores s'échelonnant de 100 à 300 μm . De plus, une variation des dimensions des pores au sein des matrices semble être essentielle à leurs propriétés biologiques (38). Une étude utilisant une imprimante DLP afin de produire des matrices macroporeuses de BCP a étudiée l'impact de la variation de la dimension des pores de 0.8 à 1.4 mm sur la formation osseuse. Dans tous les cas, les auteurs ont observé une néoformation osseuse satisfaisante sans aucune variation significative après 8 semaines de culture (67). D'autres études ont quant à elles rapporté que les macropores d'un diamètre jusqu'à 140 μm ont un impact positif sur la néoformation osseuse et la densité capillaire. Les pores, d'un diamètre jusqu'à 100 μm sont quant à eux importants pour l'oxygénation osseuse et l'angiogenèse et les pores de moins de 1 μm jouent enfin un rôle important dans la bioactivité osseuse (60,72).

De plus, un paramètre supplémentaire à prendre en compte est la distance maximale entre les cellules et vaisseaux. En effet, les cellules doivent se trouver à moins de 200 μm d'un vaisseau afin d'échanger avec lui gaz, nutriments et déchets, afin d'éviter leur nécrose. Dans la plupart des protocoles d'ingénierie tissulaire, on s'appuie sur la vascularisation des tissus environnants afin de vasculariser les matrices ce qui limite leurs épaisseurs (191).

Les reconstructions osseuses de large volume doivent donc inclure une vascularisation propre, ce qui est le cas des lambeaux libres osseux (23). L'ingénierie osseuse de larges volumes à reconstruire doit ainsi mimer les propriétés de ces lambeaux libres, en incluant un réseau microfluidique au sein de la matrice visant à mimer un réseau vasculaire (192).

Ce verrou technique est identifié de longue date à la suite des essais d'applications, tels que des tests *in vitro* et cultures cellulaires sur biomatériaux afin de les transposer *in vivo* selon des volumes aux dimensions cliniques (193). L'utilisation de biomatériaux phosphocalciques pour combler des pertes de substances de faible épaisseur, dans des milieux parfaitement bien vascularisés et sans contrainte mécanique obtiennent d'excellents résultats (14) et permettent par exemple de réaliser des greffes en

cascade en minimisant la morbidité du site prélevé (13) en le reconstruisant par un biomatériau pour utiliser l'os prélevé sur un autre site avec des taux de succès bien supérieurs aux biomatériaux (8–12). De multiples stratégies de bio-impression ont donc été développées à cette fin, notamment la bio-impression par extrusion, l'impression par jet d'encre, le modelage par ondes acoustiques et la bio-impression par la photopolymérisation (194).

Cependant, lorsqu'il s'agit de biomatériaux phosphocalciques, la bio-impression n'est pas compatible avec le processus de frittage nécessaire à la densification des matrices. Une autre approche pour imiter une vascularisation fonctionnelle consiste à imprimer un réseau fluide dans les matrices et à cultiver ensuite des cellules endothéliales sur ses parois. Dans cette approche, la conception du réseau est essentielle pour réduire les zones hypoxiques à l'intérieur de la matrice, ainsi que pour contribuer à un écoulement fluide avec de faibles turbulences, réduisant ainsi la thrombogénèse(195). Compte tenu de ces différentes contraintes, l'impression DLP semble prometteuse pour produire des matrices phosphocalciques présentant à la fois une macroporosité contrôlée et un "arbre vasculaire" ce qui en fait pour nous un élément majeur dans l'avenir de l'ingénierie osseuse.

Lors de cette étude, nous avons décidé de ne pas étudier les propriétés mécaniques de nos matrices et en particulier leur résistance à la compression. Ce choix est motivé du fait des différents paramètres impactant cette résistance comprenant la température de frittage, la composition du matériau et sa macroarchitecture (67).

Étant donné la complexité et le nombre de paramètres à prendre en compte dans la production de ces matrices, il nous apparaît donc essentiel d'assurer un suivi complet et minutieux de toutes les étapes de leur production, de la synthèse des poudres au frittage final. Cela se reflète dans notre décision de consacrer une section de notre étude à la caractérisation de notre production pour confirmer que nous avons produit du β -TCP qui n'est pas altéré par notre technique d'impression et de mise en forme. De même, nos résultats démontrent que notre technique est efficace pour produire des matrices phosphocalciques précises et que le retrait des pièces vertes lié au frittage induit une augmentation de la résolution d'impression.

Ces résultats nous permettront de consacrer de futures études à l'exploration de matrices phosphocalciques complexes, avec un accent particulier sur le développement d'un réseau vasculaire fonctionnel. Bien entendu, de futurs travaux porteront également sur les propriétés mécaniques de nos matrices. En effet, ces propriétés mécaniques vont s'avérer essentielles lors d'applications in vivo. En effet, contrairement à l'os natif, les matrices artificielles possèdent une très faible élasticité. Cela conduit lors d'une mise en charge directe avec de l'os natif, à un front de remodelage de celui-ci comportant un risque de pseudarthrose lié aux trop grandes contraintes mécaniques qui lui sont imposées. De même, du fait de la très faible élasticité des céramiques, les matrices phosphocalciques risquent de se fissurer et rompre du fait de contraintes mécaniques en torsion ou en compression si leur densité n'est pas suffisante et nous pensons à l'utilisation d'armatures titane comme interface entre l'os et la céramique que nous utilisons déjà en pratique clinique pour les fractures ou les reconstructions.

On ne peut donc ignorer que le développement de designs de matrices permettant leurs applications cliniques pour des reconstructions de grands volumes, nécessitent la prise en compte de très nombreux paramètres. Ainsi, l'impression par DLP semble très prometteuse dans ce cadre, et il nous semble important de revenir sur les voies d'améliorations, mais également les limites de cette technique.

Le projecteur nous semble un premier point d'amélioration possible.

La résolution en x et y de notre impression est en effet liée à la résolution du projecteur. Ainsi, pour une même distance de projection, une image en 1080P sera composée de 1920X1080pixels et une image en 8K de 7680x4320 pixels, dans ce second cas, la surface des pixels sera donc réduite d'un facteur de 16 fois et la résolution d'impression à l'inverse multipliée par 4 en X et en Y pour une même surface projetée.

La distance de projection joue également un rôle majeur sur la taille des pixels. En effet, il s'agit d'une image projetée de manière conique et l'augmentation de la distance entre la lentille du projecteur et la surface de la barbotine induit une augmentation de la taille des pixels qui s'accroît plus on s'éloigne du centre de la projection.

Idéalement, la lentille du projecteur doit se trouver le plus proche possible de la couche d'impression afin d'obtenir la résolution la plus haute et limiter les déformations. L'impression des pièces selon la technique « bottom-up », dans laquelle la pièce est tractée depuis le fond de la cuve qui est constituée d'une surface transparente, facilite ce point. Concernant l'impression « top-down » telle que nous la pratiquons et qui consiste à progressivement immerger la pièce dans la cuve en réalisant la polymérisation au niveau de la surface de barbotine, on cherche également à rapprocher au maximum le projecteur de la surface de la barbotine, mais il faut éviter les projections lors des mouvements de la pièce qui pourrait atteindre la lentille et bloquer le flux lumineux entraînant un échec d'impression.

Ainsi, il nous est nécessaire lors du développement d'une plateforme d'impression telle que la nôtre, de définir un compromis entre dimensions des pièces et résolutions de celles-ci en X et Y. Une augmentation des dimensions en X et Y se traduisant par un recul du projecteur et donc une augmentation de la taille de chaque pixel projeté et in fine une baisse de la résolution d'impression. Une manière de contourner cette limite à l'heure actuelle est de positionner la pièce à imprimer avec son plus grand axe en Z. Toutefois, cela induit d'autres contraintes, ce qui nécessite une profondeur de cuve augmentée et surtout une augmentation du temps d'impression des pièces.

À l'heure actuelle les coûts des projecteurs très haute résolution limite leur adoption dans les imprimantes, mais leur utilisation permettra à terme de multiplier comme nous l'avons vu jusqu'à 4 fois la résolution de nos impressions (c'est-à-dire des pixels 16 fois plus petits, en l'état de l'art actuel), ce qui permettra plus de flexibilité sur nos compromis résolution/dimension.

Un autre élément pouvant être travaillé sur la source lumineuse et l'intensité de celle-ci. En effet, en augmentant celle-ci, on augmente la vitesse de polymérisation des résines photopolymérisables, ce

qui se traduira par une diminution du temps d'exposition de chaque couche et une augmentation de la vitesse d'impression.

Le second point pouvant être amélioré est la composition de nos barbotines.

En effet, afin de se rapprocher au mieux de propriétés mécaniques des os, nos barbotines doivent présenter une charge importante en céramique qui permettra la tenue de la pièce lors de la phase de déliantage puis sa bonne densification lors du frittage. La contrainte de cette charge importante est le maintien en suspension des poudres phosphocalciques dont la tendance naturelle est à la sédimentation. Ce maintien en suspension est essentiel, car il permet de maintenir au mieux la charge de poudre au niveau de la couche de polymérisation. Sans cela, on constaterait des différences de dimensions sur nos pièces après la fin de la phase de frittage avec des déformations importantes. À ce jour, les dimensions des pièces imprimées par notre matériel nous ont permis de ne pas connaître de déformation de celles-ci, du fait des temps d'impression limités. Toutefois, comme nous l'avons vu, une des méthodes pour augmenter la taille des pièces à imprimer en maintenant leur résolution en X et Y est d'orienter leur plus grand axe en Z. Toutefois, cela abouti à une augmentation du temps d'impression et un accroissement du risque d'inhomogénéité de densité des pièces. Afin de contrer cela, on peut mettre en place une agitation mécanique permettant l'homogénéisation de la barbotine, mais qui nécessite d'augmenter le temps de repos entre deux phases de polymérisation afin de permettre à la barbotine de se relaxer et présenter une surface plane exposée au projecteur.

De même, la composition des résines photopolymérisables est un élément central nécessaire au développement de nos techniques d'impression. En effet, les compositions des barbotines, leurs charges possibles en poudres phosphocalciques et leurs vitesses de polymérisation en sont dépendantes. Une des difficultés est la nécessité de développer des barbotines spécifiques pour chaque poudre phosphocalcique et en particulier le BCP. En effet, pour cette dernière famille d'apatites synthétiques, du fait de leur caractère biphasique, leurs propriétés physico-chimiques varient en fonction des pourcentages respectifs d'HA et β -TCP. Ainsi, pour chaque variation HA/ β -TCP, une formulation spécifique de barbotine doit être développée afin de maintenir au mieux sa charge en poudre phosphocalcique et ses qualités d'impression. Ainsi, explorer les propriétés physico-chimiques de matrices imprimées de BCP présentant des pourcentages variables d'HA et β -TCP nécessite un travail très chronophage concernant le développement de la mise en forme des matrices, mais également la vérification de la biocompatibilité du processus de mise en forme.

4 Utilisation du PRPaC comme interface de culture d'HUVECs sur matrices de β -TCP

Depuis plusieurs décennies, le PRP est utilisé dans des applications cliniques afin d'améliorer la cicatrisation tissulaire et en particulier osseuse ou encore l'angiogenèse locale en stimulant la prolifération des cellules endothéliales (149,196,197). De plus, le PRP présente plusieurs avantages en comparaison à l'administration de facteurs de croissance recombinants. D'une part, la libération progressive des différents facteurs de croissance aurait un effet positif sur la cicatrisation et l'organisation tissulaire. D'autre part le PRP présente une facilité de production et un coût de production contenu (141).

Ce sont les applications cliniques déjà décrites et les propriétés du PRP qui nous ont amenées à le considérer pour notre travail de recherche. En effet, l'ingénierie idéale de pièces osseuses de grande taille nécessite la création d'un réseau vasculaire préalable en leur sein. Dans l'approche que nous avons choisie, nous souhaitons imprimer des matrices phosphocalciques macroporeuses qui incorporent le squelette de ce réseau. Dans un premier temps, celui-ci sera préparé afin de permettre le développement de cellules endothéliales puis des ostéoblastes seront introduits au sein de la macroporosité afin de créer une matrice osseuse mimant l'os, et en particulier un lambeau libre osseux. Dans ce cadre, l'utilisation de cellules autologues du patient est idéale afin d'éviter les risques de rejet immun et de contamination infectieuse. Le PRP est connu comme une source importante de facteurs de croissance, toutefois, sa composition est inhomogène. En effet, de nombreux facteurs peuvent influencer sur sa composition, mais en particulier la technique de production et la composition du sang veineux qui va varier entre individus, mais également en fonction de l'hydratation, de prise médicamenteuse, d'épisode infectieux ou encore simplement du cycle nyctéméral (142,154,155). C'est pourquoi, lors de notre travail, nous avons choisi de nous baser pour la production de notre PRPaC, sur la technique décrite par Amable et al. (158). Cette étude a en effet portée sur l'optimisation de la production, mais également la quantification des cytokines et facteurs de croissance présents dans le PRP produit. Ainsi, les auteurs ont démontré une reproductibilité du PRP produit et de sa composition avec en particulier une grande pureté des plaquettes avec des très faibles taux de présence de leucocytes et hématies (<0.3%). De même, a été observé une grande concentration de PDGF, EGF, TGF, $TNF\alpha$, IFN, IL 4, IL8, IL13 et IL1.

Durant ce travail, nous avons pu confirmer l'effet positif du PRPaC produit par cette méthode sur la prolifération des HUVECs. De même, les observations en microscopie confocale ont confirmé la bonne adhésion du PRPaC sur les matrices de β -TCP frittées à 1050°C. Ces tests ont montré l'efficacité du dépôt de PRPaC afin d'améliorer la prolifération des cellules endothéliales sur nos matrices qui a été un point bloquant sur la production de matrices prévascularisées telle que nous l'imaginons.

Conclusion

L'ingénierie tissulaire osseuse est un vaste domaine où de nombreuses stratégies peuvent être développées. Pour notre part, nous avons décidé de nous focaliser sur une approche visant à reproduire l'avantage du lambeau libre osseux qui est sa vascularisation intégrée permettant le transplant et la survie de volume osseux importants.

Nos expériences passées et les données de la littérature nous ont amenés à conclure qu'afin de maîtriser les caractéristiques physico-chimiques, mais également architecturales de nos matrices, un contrôle de l'ensemble du processus de production s'étendant de la synthèse des poudres à leurs mises en forme finale est indispensable.

Nous avons donc développé notre technique de production et ce travail visait à valider la compatibilité de celle-ci avec des applications biologiques et cliniques, mais également à avancer sur la problématique de la culture des cellules endothéliales sur des matrices phosphocalciques qui est un enjeu majeur dans notre approche. Enfin, nous avons souhaité développer un réacteur de culture en flux qui nous permettra à l'avenir de réaliser des cultures dynamiques de cellules endothéliales. Cette étape nous paraît également indispensable au développement d'un « lambeau libre osseux artificiel », tel que nous l'envisageons.

Ainsi, l'analyse de nos résultats montrent, l'absence de contamination lors de ses différentes étapes et la biocompatibilité de notre technique de mise en forme incluant une imprimante DLP.

Lors de la production de matrice phosphocalcique, la phase de frittage apparaît comme essentielle. Ce traitement à haute température en détruisant les composés organiques qui peuvent être présents lors de la mise en forme permet l'utilisation de différentes techniques de fabrication additive. Par ailleurs, nos résultats mettent en évidence que lors de la mise en forme à l'aide de notre technique, l'épaisseur des couches, si elle peut influencer sur la macroarchitecture de la surface du matériau n'a qu'un effet négligeable sur la microporosité de celui-ci à l'inverse de la température de frittage qui reste centrale sur les propriétés physico-chimiques du matériau produit.

De même, lors des essais de cytocompatibilité sur cellules MC3T3-E1, c'est bien plus la température de frittage du matériau que la technique de mise en forme qui semble influencer sur la capacité des cellules à se fixer et à proliférer sur le matériau. En effet, une plus faible température de frittage est liée à une plus grande réactivité du matériau et une dégradation plus rapide de sa surface pouvant entraîner des relargages ioniques dans le milieu de culture qui peuvent être préjudiciables à la survie cellulaire in vitro.

Cet élément a été confirmé lors de nos essais d'optimisation de culture où l'introduction d'un nettoyage préalable des matrices a conduit à une amélioration sensible de la vitalité cellulaire, liée à une meilleure adhésion au support et prolifération cellulaire. Lors de cet essai, nous avons également mis en évidence qu'un remplacement trop rapide d'un milieu de culture peut s'avérer délétère sur la culture cellulaire en arrachant les cellules les moins bien fixées, mais est nécessaire afin d'éviter l'épuisement

du milieu. Cela s'est traduit sur les groupes en ayant bénéficié d'une large amélioration des résultats entre le 3^e et le 6^e jour de culture.

Les résultats d'étude qualitative de dépôt protéique sur matrice phosphocalcique ont quant à eux confirmé l'importance de la température de frittage sur la capacité à former un film protéique adhérent à la matrice. En effet, la plus grande porosité du β -TCP fritté à plus basse température augmente sa surface spécifique, et les anfractuosités sur sa surface permettent les dépôts protéiques.

Le PRPaC quant à lui, semble être une solution prometteuse pour la réalisation de cultures de cellules endothéliales sur matrices phosphocalciques. Les résultats récoltés sur les cultures de cellules endothéliales et par l'analyse en microscopie confocale ont confirmé la formation de ce film sur la surface des matrices.

Celui-ci permet d'améliorer la vitalité des HUVECs lorsque celles-ci sont cultivées sur une matrice de β -TCP sans association aux ostéoblastes et laissent entrevoir la possibilité de développement de « vaisseaux », à l'architecture contrôlée, développés au sein de matrices phosphocalciques. De même, la microscopie confocale semble être un outil de choix pour l'étude des interactions cellulaires dans ce contexte.

Ces résultats bien qu'encourageants, n'apparaissent que comme des résultats préliminaires à notre travail de recherche dont la finalité est le développement de matrices phosphocalciques prévascularisées.

En effet, le développement d'une vascularisation à l'architecture contrôlée, répartissant de manière idéale les flux vasculaires au sein de matrices phosphocalciques nécessite différentes étapes pour lesquelles nous nous sommes attachés à développer du matériel qui n'a pu à ce jour être mis en avant lors de ce travail. En effet, la réalisation de culture dynamique in vitro semble une étape incontournable afin d'atteindre cet objectif.

Cette focalisation sur l'importance de la vascularisation dans la reconstruction est motivée par les résultats cliniques des reconstructions par lambeaux libres, mais aussi le modèle embryonnaire qui met en évidence le développement du système cardiovasculaire dès les premiers centimètres de l'évolution, mais également les observations de calcification des pédicules de lambeaux libres dans des milieux hostiles ou inattendus (198,199). Le lien entre calcification et vascularisation est indéniable et central. Les essais de transfert de vaisseaux au sein de pièces osseuses macroscopiques s'avèrent concluants, mais nécessitent de sacrifier un pédicule et ne sont pas aussi fiables que les lambeaux libres osseux eux-mêmes (200).

C'est pourquoi, le développement d'un design de matrice permettant l'étude facilitée de l'organisation cellulaire dans ces conditions nous est apparu impératif de même que celui d'un bioréacteur permettant un contrôle très précis des paramètres de culture et leur enregistrement.

En effet, le flux vasculaire va appliquer des contraintes mécaniques sur nos cellules endothéliales et l'étude de leurs réactions face à celles-ci contribuera à l'amélioration progressive de nos paramètres de culture, de dépôt protéique et de micro et macroarchitecture des matrices phosphocalciques

utilisées. Notre réacteur en permettant d'appliquer des flux constants ou variables va nous permettre de simuler les contraintes de perfusions physiologiques et déterminer des paramètres de culture permettant l'adhésion des cellules endothéliales, mais également leur organisation tridimensionnelle. Dans ce cadre, nous travaillons à notre protocole de dépôt protéique dans des réseaux fluidiques de plus en plus complexes et ce travail de recherche était un impératif dans la conception de matrices phosphocalciques revascularisées telles que nous l'avons conceptualisé.

Références bibliographiques

1. Frost HM. The Laws of Bone Structure, by H. M. Frost [Internet]. (The Henry Ford Hospital surgical monographs). Available from: <https://books.google.fr/books?id=ABimwgEACAAJ>
2. Frost HM. In vivo osteocyte death. *J Bone Joint Surg Am.* 1960 Jan;42-A:138–43.
3. Cottrell JA, Turner JC, Arinzech TL, O'Connor JP. The Biology of Bone and Ligament Healing. *Foot Ankle Clin.* 2016 Dec;21(4):739–61.
4. Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone.* 2015 Jan;70:19–27.
5. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today.* 2003 Nov 1;8(21):980–9.
6. Nicoll SB. Materials for Bone Graft Substitutes and Osseous Tissue Regeneration. In: Burdick JA, Mauck RL, editors. *Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Review of the Past and Future Trends* [Internet]. Vienna: Springer; 2011 [cited 2022 May 18]. p. 343–62. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0385-2_12
7. RÉVISION DE CATÉGORIES HOMOGÈNES DE DISPOSITIFS MÉDICAUX. Substituts osseux. Rapport d'évaluation - PDF Free Download [Internet]. [cited 2022 May 18]. Available from: <https://docplayer.fr/6522768-Revision-de-categories-homogenes-de-dispositifs-medicaux-substituts-osseux-rapport-d-evaluation.html>
8. Ferri J, Dujoncquoy JP, Carneiro JM, Raoul G. Maxillary reconstruction to enable implant insertion: a retrospective study of 181 patients. *Head Face Med.* 2008 Dec 16;4:31.
9. Ferri J, Lauwers L, Jebblaoui Y, Genay A, Raoul G. Le Fort I osteotomy and calvarial bone grafting for dental implants. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 2010 Apr;111(2):63–7.
10. Depeyre A, Touzet-Roumazeille S, Lauwers L, Raoul G, Ferri J. Retrospective evaluation of 211 patients with maxillofacial reconstruction using parietal bone graft for implants insertion. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg.* 2016 Sep;44(9):1162–9.
11. Schlund M, Nicot R, Lauwers L, Raoul G, Ferri J. Le Fort 1 osteotomy and calvarial bone grafting for severely resorbed maxillae. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg.* 2016 Jul;44(7):859–67.
12. Laventure A, Raoul G, Nicot R, Ferri J, Lauwers L. Staged autogenous calvarial bone grafting and dental implants placement in the management of oligodontia: a retrospective study of 20 patients over a 12-year period. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2021 Nov;50(11):1511–20.
13. Touzet S, Ferri J, Wojcik T, Raoul G. Complications of calvarial bone harvesting for maxillofacial reconstructions. *J Craniofac Surg.* 2011 Jan;22(1):178–81.

14. Dengelehem C, Ferri J, Gosset P, Randoux O, Touzet S, Raoul G. Bicalcium phosphate filling-up after calvarial unicortical harvesting in maxillofacial surgery. *J Craniofac Surg*. 2011 Nov;22(6):2392–7.
15. Schmidt AH. Autologous bone graft: Is it still the gold standard? *Injury*. 2021 Jun;52 Suppl 2:S18–22.
16. Stevenson S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin Orthop*. 1998 Oct;(355 Suppl):S239-246.
17. Shafiei Z, Bigham AS, Dehghani SN, Nezhad ST. Fresh cortical autograft versus fresh cortical allograft effects on experimental bone healing in rabbits: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *Cell Tissue Bank*. 2009 Feb;10(1):19–26.
18. Amini Z, Lari R. A systematic review of decellularized allograft and xenograft-derived scaffolds in bone tissue regeneration. *Tissue Cell*. 2021 Apr;69:101494.
19. Bansal MR, Bhagat SB, Shukla DD. Bovine cancellous xenograft in the treatment of tibial plateau fractures in elderly patients. *Int Orthop*. 2009 Jun;33(3):779–84.
20. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop*. 1989 Jan;(238):249–81.
21. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop*. 1989 Feb;(239):263–85.
22. Wojcik T, Ferri J, Touzet S, Schouman T, Raoul G. Distraction osteogenesis versus fibula free flap for mandibular reconstruction after gunshot injury: socioeconomic and technical comparisons. *J Craniofac Surg*. 2011 May;22(3):876–82.
23. Hidalgo DA. Fibula free flap: a new method of mandible reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 1989 Jul;84(1):71–9.
24. Taqi M, Raju S. Fibula Free Flaps. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 May 18]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564337/>
25. Anthony J, Rawnsley J, Benhaim P, Ritter E, Sadowsky HS, Singer M. Donor Leg Morbidity and Function after Fibula Free Flap Mandible Reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 1995 Aug 1;96:146–52.
26. Goey RS, van Drunen B, van der Linden E, van Merkesteyn JPR. Fracture of the tibia after a fibula graft for mandibular reconstruction: A rare complication, report of a case. *Clin Case Rep*. 2021 May;9(5):e03987.

27. Momoh AO, Yu P, Skoracki RJ, Liu S, Feng L, Hanasono MM. A prospective cohort study of fibula free flap donor-site morbidity in 157 consecutive patients. *Plast Reconstr Surg.* 2011 Sep;128(3):714–20.
28. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363–408.
29. Kumar V, Ebenezer S, Thor A. Bone Augmentation Procedures in Implantology. In 2021. p. 407–26.
30. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001 Jan;2(1):81–94.
31. Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis.* 2017 Aug;20(3):291–302.
32. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology.* 2016 May;31(3):233–45.
33. Owen R, Reilly GC. In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6:134.
34. (PDF) The periosteum. Part 1: Anatomy, histology and molecular biology [Internet]. [cited 2022 May 16]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/5954096_The_periosteum_Part_1_Anatomy_histology_and_molecular_biology
35. Christen T, Krähenbühl SM, Müller CT, Durand S. Periosteal medial femoral condyle free flap for metacarpal nonunion. *Microsurgery.* 2022 Mar;42(3):226–30.
36. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Sep 1;78:1246–62.
37. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci.* 1991;15:1–201.
38. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev.* 2008 Nov;108(11):4742–53.
39. Lin FH, Liao CJ, Chen KS, Sun JS. Preparation of high-temperature stabilized beta-tricalcium phosphate by heating deficient hydroxyapatite with Na₄P₂O₇ x 10H₂O addition. *Biomaterials.* 1998 Jun;19(11–12):1101–7.
40. LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2003 Mar;14(3):201–9.

41. Koerten HK, van der Meulen J. Degradation of calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res.* 1999 Jan;44(1):78–86.
42. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res.* 1971;5(6):117–41.
43. Heughebaert M, LeGeros RZ, Gineste M, Guilhem A, Bonel G. Physicochemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in nonosseous sites. *J Biomed Mater Res.* 1988 Dec;22(3 Suppl):257–68.
44. Hench LL. Bioactive Ceramics: Theory and Clinical Applications. In: Andersson ÖH, Happonen RP, Yli-Urpo A, editors. *Bioceramics* [Internet]. Oxford: Pergamon; 1994 [cited 2022 May 13]. p. 3–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080421445500054>
45. Heymann D, Pradal G, Benahmed M. Cellular mechanisms of calcium phosphate ceramic degradation. *Histol Histopathol.* 1999 Jul;14(3):871–7.
46. Wang L, Nancollas GH. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chem Rev.* 2008 Nov;108(11):4628–69.
47. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965 Nov 12;150(3698):893–9.
48. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* 2013 Sep;9(9):8037–45.
49. Le Nihouannen D, Saffarzadeh A, Gauthier O, Moreau F, Pilet P, Spaethe R, et al. Bone tissue formation in sheep muscles induced by a biphasic calcium phosphate ceramic and fibrin glue composite. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Feb;19(2):667–75.
50. Chai YC, Carlier A, Bolander J, Roberts SJ, Geris L, Schrooten J, et al. Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies. *Acta Biomater.* 2012 Nov;8(11):3876–87.
51. Champion E. Sintering of calcium phosphate bioceramics. *Acta Biomater.* 2013 Apr;9(4):5855–75.
52. Zhou J, Zhang X, Chen J, Zeng S, De Groot K. High temperature characteristics of synthetic hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 1993 Jan 1;4(1):83–5.
53. Kasten P, Luginbühl R, van Griensven M, Barkhausen T, Krettek C, Bohner M, et al. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials.* 2003 Jul;24(15):2593–603.

54. Fariña NM, Guzón FM, Peña ML, Cantalapiedra AG. In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Apr;19(4):1565–73.
55. Komlev VS, Barinov SM. Porous hydroxyapatite ceramics of bi-modal pore size distribution. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Mar;13(3):295–9.
56. Matsushima A, Kotobuki N, Tadokoro M, Kawate K, Yajima H, Takakura Y, et al. In vivo osteogenic capability of human mesenchymal cells cultured on hydroxyapatite and on beta-tricalcium phosphate. *Artif Organs*. 2009 Jun;33(6):474–81.
57. Boukhechba F, Balaguer T, Michiels JF, Ackermann K, Quincey D, Bouler JM, et al. Human primary osteocyte differentiation in a 3D culture system. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2009 Nov;24(11):1927–35.
58. Jensen SS, Yeo A, Dard M, Hunziker E, Schenk R, Buser D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Dec;18(6):752–60.
59. Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, et al. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res*. 1999 Jul;46(1):103–11.
60. Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials*. 1998 Feb;19(1–3):133–9.
61. Huiskes R, Weinans H, van Rietbergen B. The relationship between stress shielding and bone resorption around total hip stems and the effects of flexible materials. *Clin Orthop*. 1992 Jan;(274):124–34.
62. Li X, van Blitterswijk CA, Feng Q, Cui F, Watari F. The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells in vitro. *Biomaterials*. 2008 Aug;29(23):3306–16.
63. Browaeys H, Bouvry P, De Bruyn H. A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2007 Sep;9(3):166–77.
64. Nam JW, Kim MY, Han SJ. Cranial bone regeneration according to different particle sizes and densities of demineralized dentin matrix in the rabbit model. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2016 Dec;38(1):27.
65. Lee EY, Kim ES, Kim KW. Vertical Augmentation of Maxillary Posterior Alveolar Ridge Using Allogenic Block Bone Graft and Simultaneous Maxillary Sinus Graft. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2014 Sep;36(5):224–9.

66. Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, de Bruijn JD. A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jul;78(1):139–47.
67. Lim HK, Hong SJ, Byeon SJ, Chung SM, On SW, Yang BE, et al. 3D-Printed Ceramic Bone Scaffolds with Variable Pore Architectures. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 22;21(18):E6942.
68. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 2007 Sep;38 Suppl 4:S3-6.
69. Peng Q, Tang Z, Liu O, Peng Z. Rapid prototyping-assisted maxillofacial reconstruction. *Ann Med*. 2015 May;47(3):186–208.
70. Macdonald HM, Nishiyama KK, Kang J, Hanley DA, Boyd SK. Age-related patterns of trabecular and cortical bone loss differ between sexes and skeletal sites: a population-based HR-pQCT study. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2011 Jan;26(1):50–62.
71. Wang L, Shi H, Chen Y, Xue J, Chen Y, Liao Y. Healing of acute alveolar bone dehiscence following treatment with porous biphasic calcium phosphate in beagle dogs. *Clin Oral Investig*. 2011 Dec;15(6):983–91.
72. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(27):5474–91.
73. Yang C. The effect of calcium phosphate implant coating on osteoconduction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Dec;92(6):606–9.
74. Passuti N, Delécrin J, Daculsi G. Experimental data regarding macroporous biphasic calcium phosphate ceramics. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 1997 May 1;7(2):79–84.
75. Klawitter JJ, Hulbert SF. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *J Biomed Mater Res*. 1971;5(6):161–229.
76. Zhu XD, Fan HS, Xiao YM, Li DX, Zhang HJ, Luxbacher T, et al. Effect of surface structure on protein adsorption to biphasic calcium-phosphate ceramics in vitro and in vivo. *Acta Biomater*. 2009 May;5(4):1311–8.
77. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3565–75.
78. Lan Levensgood SK, Polak SJ, Wheeler MB, Maki AJ, Clark SG, Jamison RD, et al. Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 2010 May;31(13):3552–63.

79. Chu TMG, Orton DG, Hollister SJ, Feinberg SE, Halloran JW. Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials*. 2002 Mar;23(5):1283–93.
80. Chia HN, Wu BM. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J Biol Eng*. 2015;9:4.
81. Moghadam MZ, Hassanajili S, Esmaeilzadeh F, Ayatollahi M, Ahmadi M. Formation of porous HPCL/LPCL/HA scaffolds with supercritical CO₂ gas foaming method. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017 May;69:115–27.
82. Aoki K, Saito N. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems for Bone Regeneration. *Pharmaceutics*. 2020 Jan 24;12(2):E95.
83. Zhang M, Lin R, Wang X, Xue J, Deng C, Feng C, et al. 3D printing of Haversian bone-mimicking scaffolds for multicellular delivery in bone regeneration. *Sci Adv*. 2020 Mar;6(12):eaaz6725.
84. Descamps M, Duhoo T, Monchau F, Lu J, Hardouin P, Hornez JC, et al. Manufacture of macroporous β -tricalcium phosphate bioceramics. *J Eur Ceram Soc*. 2008 Jan 1;28(1):149–57.
85. Haleem A, Javaid M. Polyether ether ketone (PEEK) and its 3D printed implants applications in medical field: An overview. *Clin Epidemiol Glob Health*. 2019 Dec 1;7(4):571–7.
86. Zarem HA. The microcirculatory events within full-thickness skin allografts (homografts) in mice. *Surgery*. 1969 Aug;66(2):392–7.
87. Orr AW, Elzie CA, Kucik DF, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci*. 2003 Jul 15;116(Pt 14):2917–27.
88. Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*. 1973 Oct 1;138(4):745–53.
89. Colton CK. Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant*. 1995 Aug;4(4):415–36.
90. Radisic M, Yang L, Boublik J, Cohen RJ, Langer R, Freed LE, et al. Medium perfusion enables engineering of compact and contractile cardiac tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Feb;286(2):H507-516.
91. Simunovic F, Finkenzeller G. Vascularization Strategies in Bone Tissue Engineering. *Cells*. 2021 Jul 11;10(7):1749.
92. Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, Yang YP, Gardner MJ. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur J Orthop Surg Traumatol Orthop Traumatol*. 2018 Apr;28(3):351–62.
93. Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop Clin North Am*. 2010 Jan;41(1):27–37; table of contents.

94. Liu H, Hu G, Shang P, Shen Y, Nie P, Peng L, et al. Histological characteristics of induced membranes in subcutaneous, intramuscular sites and bone defect. *Orthop Traumatol Surg Res OTSR*. 2013 Dec;99(8):959–64.
95. Cuthbert RJ, Churchman SM, Tan HB, McGonagle D, Jones E, Giannoudis PV. Induced periosteum a complex cellular scaffold for the treatment of large bone defects. *Bone*. 2013 Dec;57(2):484–92.
96. Gohel N, Senos R, Goldstein SA, Hankenson KD, Hake ME, Alford AI. Evaluation of global gene expression in regenerate tissues during Masquelet treatment. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2020 Oct;38(10):2120–30.
97. Gruber HE, Ode G, Hoelscher G, Ingram J, Bethea S, Bosse MJ. Osteogenic, stem cell and molecular characterisation of the human induced membrane from extremity bone defects. *Bone Jt Res*. 2016 Apr;5(4):106–15.
98. Christou C, Oliver RA, Yu Y, Walsh WR. The Masquelet technique for membrane induction and the healing of ovine critical sized segmental defects. *PloS One*. 2014;9(12):e114122.
99. Morelli I, Drago L, George DA, Gallazzi E, Scarponi S, Romanò CL. Masquelet technique: myth or reality? A systematic review and meta-analysis. *Injury*. 2016 Dec;47 Suppl 6:S68–76.
100. Kokemueller H, Spalthoff S, Nolff M, Tavassol F, Essig H, Stuehmer C, et al. Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Apr;39(4):379–87.
101. Akar B, Tatar AM, Sutradhar A, Hsiao HY, Miller M, Cheng MH, et al. Large Animal Models of an In Vivo Bioreactor for Engineering Vascularized Bone. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018 Aug;24(4):317–25.
102. Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Mar;38(3):201–9.
103. Warnke PH, Springer ING, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet Lond Engl*. 2004 Sep 28;364(9436):766–70.
104. Weigand A, Horch RE, Boos AM, Beier JP, Arkudas A. The Arteriovenous Loop: Engineering of Axially Vascularized Tissue. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur*. 2018;59(3–4):286–99.
105. Boos AM, Loew JS, Weigand A, Deschler G, Klumpp D, Arkudas A, et al. Engineering axially vascularized bone in the sheep arteriovenous-loop model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 Aug;7(8):654–64.

106. Arkudas A, Beier JP, Heidner K, Tjiawi J, Polykandriotis E, Srour S, et al. Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng.* 2007 Jul;13(7):1549–60.
107. Beier JP, Horch RE, Hess A, Arkudas A, Heinrich J, Loew J, et al. Axial vascularization of a large volume calcium phosphate ceramic bone substitute in the sheep AV loop model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010 Mar;4(3):216–23.
108. Horch RE, Beier JP, Kneser U, Arkudas A. Successful human long-term application of in situ bone tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2014 Jul;18(7):1478–85.
109. Kelpke SS, Zinn KR, Rue LW, Thompson JA. Site-specific delivery of acidic fibroblast growth factor stimulates angiogenic and osteogenic responses in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Nov 1;71(2):316–25.
110. Suárez-González D, Lee JS, Diggs A, Lu Y, Nemke B, Markel M, et al. Controlled multiple growth factor delivery from bone tissue engineering scaffolds via designed affinity. *Tissue Eng Part A.* 2014 Aug;20(15–16):2077–87.
111. Davies N, Dobner S, Bezuidenhout D, Schmidt C, Beck M, Zisch AH, et al. The dosage dependence of VEGF stimulation on scaffold neovascularisation. *Biomaterials.* 2008 Sep;29(26):3531–8.
112. Kuttappan S, Mathew D, Jo JI, Tanaka R, Menon D, Ishimoto T, et al. Dual release of growth factor from nanocomposite fibrous scaffold promotes vascularisation and bone regeneration in rat critical sized calvarial defect. *Acta Biomater.* 2018 Sep 15;78:36–47.
113. Liu Y, Chan JKY, Teoh SH. Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015 Feb;9(2):85–105.
114. Polymeri A, Giannobile WV, Kaigler D. Bone Marrow Stromal Stem Cells in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab.* 2016 Nov;48(11):700–13.
115. Colnot C. Cell sources for bone tissue engineering: insights from basic science. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011 Dec;17(6):449–57.
116. de Peppo GM, Marcos-Campos I, Kahler DJ, Alsalman D, Shang L, Vunjak-Novakovic G, et al. Engineering bone tissue substitutes from human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 21;110(21):8680–5.
117. Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res A.* 2014 Aug;102(8):2636–43.

118. Hauser S, Jung F, Pietzsch J. Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research. *Trends Biotechnol.* 2017 Mar;35(3):265–77.
119. Heo DN, Hospodiuk M, Ozbolat IT. Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2019 Sep 1;95:348–56.
120. Schmidt Y, Biniossek M, Stark GB, Finkenzeller G, Simunovic F. Osteoblastic alkaline phosphatase mRNA is stabilized by binding to vimentin intermediary filaments. *Biol Chem.* 2015 Mar;396(3):253–60.
121. Hager S, Lampert FM, Orimo H, Stark GB, Finkenzeller G. Up-regulation of alkaline phosphatase expression in human primary osteoblasts by cocultivation with primary endothelial cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mRNA stabilization. *Tissue Eng Part A.* 2009 Nov;15(11):3437–47.
122. Rhee S. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp Mol Med.* 2009 Dec;41(12):858–65.
123. Xu C, Zhang M, Huang Y, Ogale A, Fu J, Markwald RR. Study of droplet formation process during drop-on-demand inkjetting of living cell-laden bioink. *Langmuir ACS J Surf Colloids.* 2014 Aug 5;30(30):9130–8.
124. Malda J, Visser J, Melchels FP, Jüngst T, Hennink WE, Dhert WJA, et al. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Adv Mater Deerfield Beach Fla.* 2013 Sep 25;25(36):5011–28.
125. Naghieh S, Chen X. Printability-A key issue in extrusion-based bioprinting. *J Pharm Anal.* 2021 Oct;11(5):564–79.
126. Tröndle K, Koch F, Finkenzeller G, Stark GB, Zengerle R, Koltay P, et al. Bioprinting of high cell-density constructs leads to controlled lumen formation with self-assembly of endothelial cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019 Oct;13(10):1883–95.
127. Byambaa B, Annabi N, Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Jia W, et al. Bioprinted Osteogenic and Vasculogenic Patterns for Engineering 3D Bone Tissue. *Adv Healthc Mater.* 2017 Aug;6(16).
128. Negro A, Cherbuin T, Lutolf MP. 3D Inkjet Printing of Complex, Cell-Laden Hydrogel Structures. *Sci Rep.* 2018 Nov 20;8(1):17099.
129. Skylar-Scott MA, Uzel SGM, Nam LL, Ahrens JH, Truby RL, Damaraju S, et al. Biomufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels. *Sci Adv.* 2019 Sep;5(9):eaaw2459.

130. Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv Mater Deerfield Beach Fla.* 2014 May 21;26(19):3124–30.
131. Macaulay IC, Carr P, Gusnanto A, Ouwehand WH, Fitzgerald D, Watkins NA. Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3370–7.
132. Mazzocca AD, McCarthy MBR, Chowanec DM, Dugdale EM, Hansen D, Cote MP, et al. The positive effects of different platelet-rich plasma methods on human muscle, bone, and tendon cells. *Am J Sports Med.* 2012 Aug;40(8):1742–9.
133. Cho HS, Song IH, Park SY, Sung MC, Ahn MW, Song KE. Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich plasma and its influence on human mesenchymal stem cells. *Korean J Lab Med.* 2011 Jul;31(3):212–8.
134. Drengk A, Zapf A, Stürmer EK, Stürmer KM, Frosch KH. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2009;189(5):317–26.
135. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Apr;17(2):212–9.
136. Anitua E, Sánchez M, Zalduendo MM, de la Fuente M, Prado R, Orive G, et al. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif.* 2009 Apr;42(2):162–70.
137. Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Durán JA, Morales MC. In vitro effects of three blood derivatives on human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Aug 15;53(9):5571–8.
138. Markopoulou CE, Markopoulos P, Dereka XE, Pepelassi E, Vrotsos IA. Effect of homologous PRP on proliferation of human periodontally affected osteoblasts. In vitro preliminary study. Report of a case. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009 Sep;9(3):167–72.
139. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 May;14(5):403–12.
140. Chung R, Foster BK, Zannettino ACW, Xian CJ. Potential roles of growth factor PDGF-BB in the bony repair of injured growth plate. *Bone.* 2009 May;44(5):878–85.
141. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med.* 2009 Nov;37(11):2259–72.
142. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc.* 2012 Mar;28(3):429–39.

143. Knighton DR, Doucette M, Fiegel VD, Ciresi K, Butler E, Austin L. The use of platelet derived wound healing formula in human clinical trials. *Prog Clin Biol Res.* 1988;266:319–29.
144. Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schumerth S, Butler E, Cerra F. Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet.* 1990 Jan;170(1):56–60.
145. van Buul GM, Koevoet WLM, Kops N, Bos PK, Verhaar JAN, Weinans H, et al. Platelet-rich plasma releasate inhibits inflammatory processes in osteoarthritic chondrocytes. *Am J Sports Med.* 2011 Nov;39(11):2362–70.
146. Randelli P, Arrigoni P, Ragone V, Aliprandi A, Cabitza P. Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective RCT study, 2-year follow-up. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011 Jun;20(4):518–28.
147. Hurley ET, Shimozone Y, Hannon CP, Smyth NA, Murawski CD, Kennedy JG. Platelet-Rich Plasma Versus Corticosteroids for Plantar Fasciitis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Orthop J Sports Med.* 2020 Apr;8(4):2325967120915704.
148. Nagao RJ, Marcu R, Wang Y, Wang L, Arakawa C, DeForest C, et al. Transforming Endothelium with Platelet-Rich Plasma in Engineered Microvessels. *Adv Sci Weinh Baden-Wurt Ger.* 2019 Dec;6(24):1901725.
149. Yu T, Pan H, Hu Y, Tao H, Wang K, Zhang C. Autologous platelet-rich plasma induces bone formation of tissue-engineered bone with bone marrow mesenchymal stem cells on beta-tricalcium phosphate ceramics. *J Orthop Surg.* 2017 Nov 21;12(1):178.
150. Dohan Ehrenfest DM, Doglioli P, de Peppo GM, Del Corso M, Charrier JB. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol.* 2010 Mar;55(3):185–94.
151. Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009 Sep;15(3):431–5.
152. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004 Apr;34(4):665–71.
153. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg.* 2008 Nov;122(5):1352–60.
154. Skripchenko A, Kurtz J, Moroff G, Wagner SJ. Platelet products prepared by different methods of sedimentation undergo platelet activation differently during storage. *Transfusion (Paris).* 2008 Jul;48(7):1469–77.

155. Thibault L, Beauséjour A, de Grandmont MJ, Lemieux R, Leblanc JF. Characterization of blood components prepared from whole-blood donations after a 24-hour hold with the platelet-rich plasma method. *Transfusion (Paris)*. 2006 Aug;46(8):1292–9.
156. Redler LH, Thompson SA, Hsu SH, Ahmad CS, Levine WN. Platelet-rich plasma therapy: a systematic literature review and evidence for clinical use. *Phys Sportsmed*. 2011 Feb;39(1):42–51.
157. Araki J, Jona M, Eto H, Aoi N, Kato H, Suga H, et al. Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012 Mar;18(3):176–85.
158. Amable PR, Carias RBV, Teixeira MVT, da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJF, Granjeiro JM, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Jun 7;4(3):67.
159. Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Thomas P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials*. 2002 Feb;23(4):1065–72.
160. Destainville A, Champion E, Bernache-Assollant D, Laborde E. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. *Mater Chem Phys*. 2003 Apr 29;80(1):269–77.
161. AFNOR. Détermination qualitative et quantitative des phases étrangères présentes dans les poudres, dépôts et céramiques à base de phosphates de calcium, Désignation NFS94-067. AFNOR, Paris; 1993.
162. AFNOR. Détermination quantitative du rapport Ca/P de phosphates de calcium, NFS94-066. AFNOR, Paris; 1998.
163. Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Laval J. Determination of Calcium/Phosphorus Atomic Ratio of Calcium Phosphate Apatites Using X-Ray Diffractometry. *J Am Ceram Soc*. 2001 Feb 1;84:359–66.
164. Bohner M, Santoni BLG, Döbelin N. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater*. 2020 Sep 1;113:23–41.
165. Owen GR, Dard M, Larjava H. Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018;106(6):2493–512.
166. Mishchenko O, Yanovska A, Kosinov O, Maksymov D, Moskalenko R, Ramanavicius A, et al. Synthetic Calcium–Phosphate Materials for Bone Grafting. *Polymers*. 2023 Sep 19;15(18):3822.
167. Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs Off Jpn Soc Artif Organs*. 2005;8(3):131–6.

168. Ogata K, Imazato S, Ehara A, Ebisu S, Kinomoto Y, Nakano T, et al. Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Feb 1;72(2):127–35.
169. Ducheyne P, Radin S, King L. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution. *J Biomed Mater Res*. 1993 Jan;27(1):25–34.
170. Chen TM, Shih C, Lin TF, Lin FH. Reconstruction of calvarial bone defects using an osteoconductive material and post-implantation hyperbaric oxygen treatment. *Mater Sci Eng C*. 2004 Dec 1;24(6):855–60.
171. Ebrahimi M, Botelho MG, Dorozhkin SV. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Feb 1;71:1293–312.
172. Zhu XD, Zhang HJ, Fan HS, Li W, Zhang XD. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption. *Acta Biomater*. 2010 Apr;6(4):1536–41.
173. M T, V V, A P. The Impact of Hydroxyapatite Sintering Temperature on Its Microstructural, Mechanical, and Biological Properties. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Jul 3 [cited 2024 Jul 3];24(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36982158/>
174. dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K. Surface energy of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jun;19(6):2307–16.
175. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res*. 2000 Sep 5;51(3):475–83.
176. John A, Varma HK, Kumari TV. Surface reactivity of calcium phosphate based ceramics in a cell culture system. *J Biomater Appl*. 2003 Jul;18(1):63–78.
177. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3565–75.
178. Daculsi G, Jegoux F, Layrolle P. The Micro Macroporous Biphasic Calcium Phosphate Concept for Bone Reconstruction and Tissue Engineering. In: *Advanced Biomaterials* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2009 [cited 2022 Apr 6]. p. 101–41. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470891315.ch4>
179. Mitterramskogler G, Gmeiner R, Felzmann R, Gruber S, Hofstetter C, Stampfl J, et al. Light curing strategies for lithography-based additive manufacturing of customized ceramics. *Addit Manuf*. 2014 Oct 1;1–4:110–8.

180. Lithography-Based Additive Manufacturing of Cellular Ceramic Structures - Felzmann - 2012 - Advanced Engineering Materials - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2024 Feb 27]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adem.201200010>
181. Kim K, Yeatts A, Dean D, Fisher JP. Stereolithographic bone scaffold design parameters: osteogenic differentiation and signal expression. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Oct;16(5):523–39.
182. Zhou T, Zhang L, Yao Q, Ma Y, Hou C, Sun B, et al. SLA 3D printing of high quality spine shaped β -TCP bioceramics for the hard tissue repair applications. *Ceram Int.* 2020 Apr 15;46(6):7609–14.
183. Huang X, Dai H, Hu Y, Zhuang P, Shi Z, Ma Y. Development of a high solid loading β -TCP suspension with a low refractive index contrast for DLP -based ceramic stereolithography. *J Eur Ceram Soc.* 2021 Jun 1;41(6):3743–54.
184. Wu D, Spanou A, Diez-Escudero A, Persson C. 3D-printed PLA/HA composite structures as synthetic trabecular bone: A feasibility study using fused deposition modeling. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020 Mar;103:103608.
185. Schmidleithner C, Malferrari S, Palgrave R, Bomze D, Schwentenwein M, Kalaskar DM. Application of high resolution DLP stereolithography for fabrication of tricalcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomed Mater Bristol Engl.* 2019 Jun 19;14(4):045018.
186. Kim JW, Yang BE, Hong SJ, Choi HG, Byeon SJ, Lim HK, et al. Bone Regeneration Capability of 3D Printed Ceramic Scaffolds. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 8;21(14):4837.
187. Wojcik T, Chai F, Hornez V, Raoul G, Hornez JC. Engineering Precise Interconnected Porosity in β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) Matrices by Means of Top-Down Digital Light Processing. *Biomedicines.* 2024 Mar 26;12(4):736.
188. Liu Z, Liang H, Shi T, Xie D, Chen R, Han X, et al. Additive manufacturing of hydroxyapatite bone scaffolds via digital light processing and in vitro compatibility. *Ceram Int.* 2019 Jun 1;45(8):11079–86.
189. Additive Manufacturing of Dense Alumina Ceramics - Schwentenwein - 2015 - International Journal of Applied Ceramic Technology - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2024 Feb 25]. Available from: <https://ceramics.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijac.12319>
190. Li X, Zhang H, Shen Y, Xiong Y, Dong L, Zheng J, et al. Fabrication of porous β -TCP/58S bioglass scaffolds via top-down DLP printing with high solid loading ceramic-resin slurry. *Mater Chem Phys.* 2021 Jul 15;267:124587.
191. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):249–57.

192. Raoul G, Myon L, Chai F, Blanchemain N, Ferri J. [Engineering a bone free flap for maxillofacial reconstruction: technical restrictions]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2011 Sep;112(4):249–61.
193. Chai F, Raoul G, Wiss A, Ferri J, Hildebrand HF. [Bone substitutes: Classification and concerns]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2011 Sep;112(4):212–21.
194. de Silva L, Bernal PN, Rosenberg A, Malda J, Levato R, Gawlitta D. Biofabricating the vascular tree in engineered bone tissue. *Acta Biomater*. 2023 Jan 15;156:250–68.
195. Kang TY, Hong JM, Jung JW, Yoo JJ, Cho DW. Design and assessment of a microfluidic network system for oxygen transport in engineered tissue. *Langmuir ACS J Surf Colloids*. 2013 Jan 15;29(2):701–9.
196. Roy S, Driggs J, Elgharably H, Biswas S, Findley M, Khanna S, et al. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2011 Nov;19(6):753–66.
197. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Jun;13(7):1231–56.
198. Myon L, Ferri J, Genty M, Raoul G. Consequences of bony free flap's pedicle calcification after jaw reconstruction. *J Craniofac Surg*. 2012 May;23(3):872–7.
199. Barry F, Schlund M, Raoul G, Myon L, Ferri J, Nicot R. Classification of pedicle ossification after maxillofacial reconstruction with bony free flap: An observational study. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2022 Apr;123(2):228–32.
200. Schlund M, Nicot R, Depeyre A, Alkasbi J, Ferri J. Reconstruction of a Large Posttraumatic Mandibular Defect Using Bone Tissue Engineering With Fresh-Frozen Humeral Allograft Seeded With Autologous Bone Marrow Aspirate and Vascularized With a Radial Forearm Flap. *J Craniofac Surg*. 2019 Oct;30(7):2085–7.

Tables des Illustrations

1 Table des figures

Figure 1. étapes de la cicatrisation osseuse	3
Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. <i>Drug Discov Today</i> . 2003 Nov 1;8(21):980–9.	
Figure 2. Organisation de l'os cortical	9
Kumar V, Ebenezer S, Thor A. Bone Augmentation Procedures in Implantology. In 2021. p. 407–26.	
Figure 3. Etapes de l'ossification enchondrale	13
Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. <i>Angiogenesis</i> . 2017 Aug;20(3):291–302.	
Figure 4. Etapes de l'ossification membraneuse	13
Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. <i>Angiogenesis</i> . 2017 Aug;20(3):291–302.	
Figure 5. Etapes du remodelage osseux	15
Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. <i>Physiology (Bethesda)</i> . 2016 May;31(3):233–45.	
Figure 6. Etapes de l'angiogénèse	25
Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. <i>Bone</i> . 2015 Jan;70:19–27.	
Figure 7. Vascularisation périostée et endostée	26
(PDF) The periosteum. Part 1: Anatomy, histology and molecular biology [Internet]. [cited 2022 May 16]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/5954096_The_periosteum_Part_1_Anatomy_histology_and_molecular_biology	
Figure 8. Exemple d'interactions entre vascularisation endostée et périostée des os longs	28
Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. <i>Angiogenesis</i> . 2017 Aug;20(3):291–302.	
Figure 9. Schéma des propriétés des matrices pour l'ingénierie osseuse	32
Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. <i>Mater Sci Eng C Mater Biol Appl</i> . 2017 Sep 1;78:1246–62.	
Figure 10. Impact du rapport Ca/P sur la synthèse de poudres phosphocalciques de β -TCP et d'HA. .	35
Figure 11. Impact de la composition et de l'architecture des matrices phosphocalciques sur leurs propriétés biologiques	36
Figure 12. Isothermes de solubilité des phosphates de calcium à 37°C en fonction du pH	37
Combes C, Rey C. Techniques de l'Ingénieur. 2013 [cited 2024 Dec 11]. Biomatériaux à base de phosphates de calcium. Available from: https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/ceramiques-applications-42695210/biomateriaux-a-base-de-phosphates-de-calcium-n4950/	
Figure 13. Concept du diamant en ingénierie tissulaire osseuse	42
Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. <i>Injury</i> . 2007 Sep;38 Suppl 4:S3-6.	
Figure 14. Schéma d'une technique de mise en forme de matrices phosphocalciques par négatif de PMMA et coulée	44

Figure 15. Processus de mise en forme des édifices organiques par pressage à l'aide de billes de polyméthacrylate de méthyle.	45
Figure 16. Coulée de barbotine pour imprégnation du négatif de PPMA.....	46
Figure 17. Exemple de cycle thermique de déliantage	46
Figure 18. Exemple de cycle thermique de frittage	47
Figure 19. De gauche à droite, aspect d'une pièce à cru, d'une pièce après déliantage et d'une pièce après frittage.....	47
Figure 20. Evaluation au microscope électronique à balayage de la macroporosité ouverte	48
Figure 21. Phases de phosphates de calcium en fonction de la température de frittage	48
Figure 22. Diagramme de phase CaO–P ₂ O ₅ –H ₂ O	49
Riboud PV. Composition et stabilité des phases à structure d'apatite dans le système CaO-P ₂ O ₅ -Oxyde de fer-H ₂ O à haute température. Annales chimiques françaises. 1973;381–90.	
Figure 23 Schéma de mise en forme de matrice par congélation orientée.....	50
Deville S. Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues. Advanced Engineering Materials. 2008;10(3):155–69.	
Figure 24. Réacteur de synthèse par voie aqueuse de poudres phosphocalciques et pains de poudre... 63	
Figure 25. Spectre Infrarouge Théorique du β-TCP	66
Figure 26. Imprimante développée pour ce projet	68
Figure 27. Principe de l'impression descendante par DLP	68
Figure 28. Images d'une pièce imprimée au microscope électronique avec une résolution de 50 μm.. 69	
Figure 29. Exemple de courbe de déliantage et frittage en 1 étape.....	71
Figure 30. Modèle virtuel du cube avant surdimensionnement (a) et cube produit après frittage (B) .. 73	
Figure 31. Aspect après première étape de centrifugation mettant en évidence le culot érythrocytaire, le culot plaquettaire et le plasma concentré en plaquettes surnageant.	79
Figure 32. Culot plaquettaire et PPP après seconde étape de centrifugation	80
Figure 33. Culot plaquettaire et PRPaC produit après étape finale de centrifugation	80
Figure 34. Étude préliminaire de design externe de 2 modules de culture assemblés.....	86
Figure 35. Essai de clivage longitudinal sur module de culture imprimé en résine (a) et module de culture imprimé afin de réaliser des essais de clivage (b).....	86
Figure 36. Modèle numérique (a) et physique (b) du design « définitif » des matrices.	87
Figure 37. Montage du noyau du bioréacteur composé de 2 seringues de 5ml reliée par une tubulure silicone afin d'assurer son étanchéité.....	87
Figure 38. Démonstration de la technique de dépôt et du clivage de la matrice.....	87
Figure 39. Schéma du réacteur.....	88
Figure 40. Réacteur assemblé avec ses différents modules.	89

Figure 41. Prototypes ayant servi au développement du design des modules	89
Figure 42. Premier prototype du module (a) et module final avec sondes de températures ayant servies à la calibration (b).	91
Figure 43. Montage ayant servi à la calibration du module de chauffage et d'homogénéisation.....	91
Figure 44. Plateau de culture (a) et enceinte (b) du module de culture.	92
Figure 45. Module de culture avec sondes de températures ayant servies à la calibration.....	92
Figure 46. Exemple de graphique de suivi de température du flacon d'homogénéisation et du réacteur	93
Figure 47. Module d'injection du CO ₂ avec l'électrovanne à gauche, la pompe d'injection à droite et le capteur sur la partie basse de l'image	94
Figure 48. Interface « mode expert »	94
Figure 49. Interface « mode utilisateur »	95
Figure 50. Réacteur lors de l'essai de stérilité du montage.....	96
Figure 51. Spectre de diffraction des rayons X d'une matrice imprimée.....	97
Figure 52. Spectre infrarouge de la même matrice imprimée que dans la figure 51	98
Figure 53. Comparaison d'un cube de 5 millimètres acquis par micro-CT scan avec la planification 3D. Le vert représente les points dont la tolérance est inférieure à 75 microns.	102
Figure 54. Relargage des ions calcium dans l'eau distillée.	103
Figure 55. Comparaison de la prolifération cellulaire in vitro à 3 et 6 jours sur matrices coulées et imprimées à 1050°C et 1100°C.....	104
Figure 56. Evaluation de l'impact sur la prolifération cellulaire du rinçage des matrices et du renouvellement du milieu de culture.....	105
Figure 57. Observation au microscope optique du film protéique marqué.....	106
Figure 58. Film sur matrices frittées à 1050°C	107
Figure 59. Film sur matrices frittées à 1100°C	107
Figure 60. Evaluation de l'impact d'un dépôt de PRPaC sur la culture d'HUVECs in vitro à 3 jours et 6 jours.....	108
Figure 61. Confluence des HUVECS en microscopie optique sur pastilles de β -TCP.....	109
Figure 62. Confluence des HUVECS en microscopie confocale sur pastilles de β -TCP.....	110
Figure 63. Confluence des HUVECS en microscopie confocale sur pastilles de β -TCP.....	110
Figure 64. Aspect en microscopie confocale de matrices avec (a) et sans dépôt (b) de PRPaC.....	111
Figure 65. Evaluation de l'impact d'un dépôt de PRPaC sur la culture d'HUVECs in vitro après 3 jours de culture.	111
Figure 66. Matrices en fin de phase de déliantage	118

2 Table des tableaux

Tableau 1. Marqueurs de la différenciation ostéoblastique	38
Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. <i>Acta Biomater.</i> 2013 Sep;9(9):8037–45.	
Tableau 2. Stratégies de vascularisation en ingénierie tissulaire osseuse	55
Simunovic F, Finkenzeller G. Vascularization Strategies in Bone Tissue Engineering. <i>Cells.</i> 2021 Jul 11;10(7):1749.	
Tableau 3. Recherche de polluants ou d'oligo-éléments dans la poudre exprimée en mg/kg, avant et après le processus d'impression.....	99
Tableau 4. Porosité ouverte des matrices	100
Tableau 5. Données du premier test d'évaluation de la précision d'impression, étude des arêtes.	101
Tableau 6. Données du second test d'évaluation de la précision d'impression, étude des arêtes.....	101
Tableau 7. Données du premier test d'évaluation de la précision d'impression, étude des fenêtres. ...	101
Tableau 8. Données du second test d'évaluation de la précision d'impression, étude des fenêtres. ...	102
Tableau 9. Relargage des ions calcium en fonction des températures de frittage et de la durée de rinçage des matrices	103

Annexes

1 Liste des abréviations

α -TCP : phosphate tricalcique α

β -TCP : phosphate tricalcique β

μ l : microlitres

μ m : micromètres

$^{\circ}$ C : degrés Celsius

ABS : acrylonitrile butadiène styrène

ALP : phosphatase alcaline

ANG: angiopoïétine

AS : arsenic

A-TCP : phosphate tricalcique apatitique

Ba : baryum

BCP: phosphate de calcium biphasique, mélange d'HA et β -TCP

BMP: bone morphogenetic protein/ protéine morphogénétique osseuse

BSP : bone sialoprotein/ sialoprotéine osseuse

Ca: calcium

CAO : conception assistée par ordinateur

CaO : chaux

Cd : cadmium

Cl : chlore

CLIP: continuous light interface production /production d'interface en lumière continue

Cr : chrome

Cu : cuivre

DAO : dessin assisté par ordinateur

DLP : digital light processing /

DRX : diffraction à rayons X

EGF : epithelial growth factor / facteur de croissance de l'épithélium

F: fluor

FGF: fibroblast growth factor /facteur de croissance des fibroblastes

FT-IR : Spectrométrie infrarouge

g : grammes/accélération de la pesanteur

H₂O : eau

HA : hydroxyapatite

HAS: Haute Autorité de Santé

HB- EGF: heparin binding epidermal growth factor like / facteur de croissance épidermique similaire à l'héparine Hg : mercure

HUVECs : cellules endothéliales de veines de cordon ombilical humain

Il: interleukine

IGF: Insulin growth factor / facteur de croissance de l'insuline

K: potassium

KBr : bromure de potassium

kPa : kilo pascal

MAPC : multipotent adult progenitor cells / Cellules progénitrices adultes multipotentes

M-CSF: macrophage stimulating colony factor/ Facteur de stimulation des colonies de macrophages

Mg : magnésium

micro-CT : micro computed tomography/ micro-tomodensitométrie

ml : millilitres

mm : millimètres

Na: sodium
Ni: nickel
nm :nanomètres
NO: monoxyde d'azote
OCN :ostéocalcine
ODF: osteoclast differentiation factor / facteur de différenciation des ostéoclastes
OPG: ostéoprotégérine
OPN : ostéopontine
Pb: plomb
PDGF: platelet derived growth factor / facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEC : progéniteurs endothéliaux circulants
PEEK: polyetheretherketone
pH : potentiel hydrogène
PID : proportionnel/intégrale/dérivée
PLA : acide polylactique
PMMA : poly méthyl méthacrylate
PPP : plasma pauvre en plaquettes
PRP : plasma riche en plaquettes
PRPa : plasma riche en plaquettes activé
PRPaC : plasma riche en plaquettes activé centrifugé
PTH: hormone parathyroïdienne
p/v : poids/volume
RANK: receptor activator of nuclear factor Kappa B / activateur du récepteur du facteur nucléaire Kappa B
RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand / ligand de l' activateur du récepteur du facteur nucléaire Kappa B
rpm : rotations par minute
Sb : antimoine
Si: silicium
SLA: stereolithograph apparatus / matériel de stéréolithographie
SLS: selective laser sintering/ frittage sélectif par laser
TGF: transforming growth-factor / facteur de croissance transformant
TNF : tumor necrosis factor / facteur de nécrose tumorale
VEGF: vascular endothelial growth factor / facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
v/v : volume/volume



Article

Engineering Precise Interconnected Porosity in β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) Matrices by Means of Top-Down Digital Light Processing

Thomas Wojcik ^{1,*}, Feng Chai ², Vincent Hornez ³, Gwenael Raoul ¹ and Jean-Christophe Hornez ⁴

- ¹ Univ. Lille, CHU Lille, INSERM, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, U1008—Advanced Drug Delivery Systems, F-59000 Lille, France; gwenael.raoul@chu-lille.fr
² Univ. Lille, CHU Lille, INSERM, U1008, F-59000 Lille, France; feng.hildebrand@univ-lille.fr
³ CRYOCERAM, F-59144 Bry, France; cryoceram@gmail.com
⁴ Département Matériaux et Procédés (DMP), Laboratoire de Matériaux Céramiques et de Mathématiques (CERAMATHS), Université Polytechnique Hauts-de-France, F-59600 Maubeuge, France; jean-christophe.hornez@uphf.fr
* Correspondence: thomaswojcik4@gmail.com

Abstract: This study evaluated the biocompatibility and accuracy of 3D-printed β -tricalcium phosphate (β -TCP) pure ceramic scaffolds. A specific shaping process associating a digital light processing (DLP) 3D printer and a heat treatment was developed to produce pure β -TCP scaffolds leaving no polymer binder residue. The β -TCP was characterised using X-ray diffraction, infrared spectroscopy and the detection of pollutants. The open porosity of produced matrices and their resorption were studied by hydrostatic weighing and calcium release measures. The biocompatibility of the printed matrices was evaluated by mean of osteoblast cultures. Finally, macroporous cubic matrices were produced. They were scanned using a micro-Computed Tomography scanner (micro-CT scan) and compared to their numeric models. The results demonstrated that DLP 3D printing with heat treatment produces pure β -TCP matrices with enhanced biocompatibility. They also demonstrated the printing accuracy of our technique, associating top-down DLP with the sintering of green parts. Thus, this production process is promising and will enable us to explore complex phosphocalcic matrices with a special focus on the development of a functional vascular network.

Keywords: tissue engineering; 3D printing; tricalcium phosphate; digital light processing; ceramic scaffold



Citation: Wojcik, T.; Chai, F.; Hornez, V.; Raoul, G.; Hornez, J.-C. Engineering Precise Interconnected Porosity in β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) Matrices by Means of Top-Down Digital Light Processing. *Biomedicines* **2024**, *12*, 736. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12040736>

Academic Editors: Pritiprasanna Maity and M. R. Mozafari

Received: 7 February 2024

Revised: 6 March 2024

Accepted: 21 March 2024

Published: 26 March 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bone is a living tissue with its own regenerative properties, enabling it to constantly remodel and adapt. However, major traumas, tumours and aging may create circumstances in which a bone graft needs to be used to create appropriate conditions for bone reconstruction or healing and deal with large bone defects. Therefore, by the 2000s, bone grafting had become a common procedure, with over 2.2 million taking place worldwide each year in the late 2000s; in 2005 alone, these procedures are estimated to have cost over USD 2.5 billion [1]. To date, autologous bone grafts (including bone-free flaps) are the gold standard in managing bone defects and represent approximately 50% of all procedures undertaken. Autologous bone grafting provides the best osteoconduction and osteointegration properties because of the perfect match in the composition and architecture of phosphocalcic matrices but also because they carry osteogenic cells, osteoregulator factors and collagenic scaffolds. Autologous bone grafts, however, also present disadvantages such as morbidity of the donor site and the limited quantity of bone available [2–6]. As an alternative, allografts and xenografts can be used, which represent 25% of all bone graft procedures performed. In both cases, there is no limit on quantity and no donor site

morbidity. However, both possess fewer biological properties and can therefore induce immune responses and present a potential risk of infectious transmission [7–10].

For decades now, alternative materials have therefore been developed and studied by scientists, and these synthetic grafts now represent up to 25% of all materials used in grafts. These materials aim to reproduce the biological and mechanical properties of native bone in unlimited amounts, with no infectious risk and at a reasonable cost. One of the most popular families of material is the calcium phosphate synthetic apatites. These have been demonstrated to be highly biocompatible, osteoinductive and osteoconductive, even if they do not exhibit these properties at the same level as biological apatites [11,12]. Their properties are dependent on their synthesis procedures, purity and crystal size, as well as their macro- and micro-porosity [13]. The management of the processes involved in both synthesis and shaping is therefore essential in controlling the final properties of the produced matrices.

In this work, we focused on β -tricalcium phosphate (β -TCP), which is a resorbable calcium phosphate (CAP) that can be replaced by native bone [14]. However, β -TCP is currently grafted using powders or preformed graft blocks that do not perfectly match the bone defects in question and present uncontrolled porosity that may lead to unpredictable and non-reproducible results, with potential failure of the procedures. According to current research, the development of three-dimensional (3D) printed matrices can be a game-changer in bone reconstructions [15–22]. In fact, rapid prototyping procedures associating computer-assisted design (CAD) or the use of computed tomography (CT) scanners with precise 3D-printing techniques or additive manufacturing may allow for the production of matrices specific to individual patients. By controlling the macro-architecture of matrices to adapt their shapes precisely to the bone defects they are being used to treat and developing specific porosity that might vary within the same piece, we may be able to enhance bone reconstruction results compared to those of conventional shaping processes [23].

A number of approaches have been developed to produce complex ceramic matrices based on existing 3D-printing techniques [24]. One of the most promising techniques is digital light processing (DLP). DLP technology is very similar to stereolithography (SLA), working with the ultraviolet radiation (UV) photopolymerisation process. But the light source in DLP is more conventional than laser, and the light is applied to the entire surface of the slurry in a single pass, making it faster than SLA. Like SLA, once the exposure composed of phosphocalcic powder and light-curable resin has hardened, the build platform progressively prints the next layer of the structure vertically [25]. Two types of DLP printer are possible, each placing the light source in a different position; one places it above the slurry tank (top-down), while the other places it under the tank (bottom-up). But while DLP is promising, it also presents some constraints. Just as with conventional shaping, the slurry needs a sufficient solid loading of β -TCP to allow for good densification of pieces, preventing it from cracking and enabling it to withstand the required mechanical stresses. Furthermore, the DLP process prefers slurries with a low viscosity, allowing them to level themselves during printing [26].

Depending on the composition of the slurry, the curing speed and depth may affect printing accuracy as a result of light scattering and refraction [27]. Moreover, during the printing process, photopolymerisation results in the emission of heat that may deform the printed parts.

In this study, we produced β -TCP powder and controlled its composition, thus impacting the biological and mechanical properties of matrices. We decided to develop a top-down DLP printer using a custom slurry to obtain a solid loading identical to the conventional shaping technique (Figure 1).

Following the printing process, the green parts underwent a de-binding heat treatment to remove the resin before a sintering phase, which resulted in the densification of the parts and their final dimensions. The purpose of this preliminary heat treatment is to modulate the resorption of the β -TCP and, thus, its biological and mechanical properties. Due to the shrinkage of the parts, the printing resolution may be improved. However, the

shrinkage must be anticipated during their conceptions to obtain final parts with controlled dimensions. Additionally, the use of photopolymerizable resins may have a negative effect on cell growth and proliferation even if the sintering process is supposed to destroy every biological residue. That is why we also controlled the composition of printed matrices and searched residual pollutants to confirm their compatibility with future clinical applications.

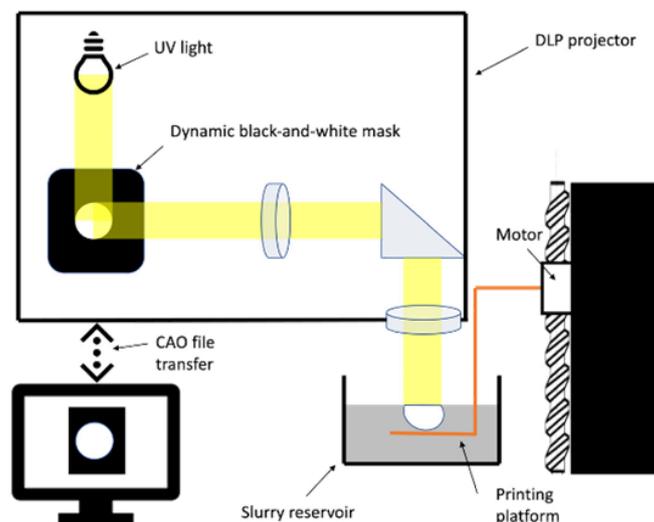


Figure 1. Top-down digital light processing principle.

The purpose of such shaping techniques including printing steps like DLP is to improve the properties of conventional shaped phosphocalcic matrices. Furthermore, it allows us to explore more complex domains of tissue engineering such as the development of perfusable intra-matrical vascular networks, which are essential for large bone reconstructions. However, preliminary studies are necessary to confirm the accuracy of the printer and the biocompatibility of the printed devices. We therefore focused our research on the following three points: the purity of the produced β -TCP, its biocompatibility and the accuracy of the printing technique.

2. Materials and Methods

2.1. β -TCP Powder Production

Calcium phosphate powders were prepared using an aqueous precipitation technique with a diammonium phosphate solution ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Carlo Erba, Val de Reuil, France) and a calcium nitrate solution ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Brenntag, Chassieu, France) [28,29]. To synthesise the β -TCP powders, we set the temperature to 30 °C and the pH to 6.4, enabling us to stabilise the TCP phase and avoid the formation of hydroxyapatite. The initial Ca/P molar ratio was 1.5, with an aging time of 20 h for the syntheses. After aging, the solutions were filtered, and the precipitates were dried at 70 °C. Powders were then calcined at 850 °C for 3 h with a speed rate of 5 °C/min. This process of calcination facilitates the transformation of the apatitic calcium phosphate phase into β -TCP, the elimination of residual nitrates and a reduction in the specific surface area, providing a more convenient value for the 3D-printing casting method. Following calcination, the powders were ground for 48 h to break up agglomerates formed during the thermal treatment and reduce the powder to its ultimate particle size. This grinding step was carried out by ball milling using a High-Density Polyethylene (HDPE) milling jar and yttrium-stabilised zirconia grinding media. The specific surface areas of the powders were recorded by the BET method (Micromeritics, Flow Sorb 3).

2.2. β -TCP Characterisation

During the synthesis and calcination phases, despite the strictest control of the various parameters, the synthesis of β -TCP may include molecules of hydroxyapatite and/or pyrophosphate calcium in variable quantities. Variations in these proportions have an impact on the biological and physical properties of the materials, especially on their mechanical strength. For characterisation, the calcined powder underwent a new calcination at 1000 °C for 15 h to increase the proportion of crystalline phases. We therefore used X-ray diffraction (XRD) and infrared spectrometry (FT-IR) to study the composition of our powder. However, the powder may contain other phases in quantities too small to be detected by X-rays. In this case, a negative phenolphthalein test indicates that the powder does not contain lime (CaO) traces [30]. Phenolphthalein is a coloured indicator that changes from colourless to pink for a pH greater than 8.2, allowing us to detect traces of CaO.

2.2.1. X-ray Diffraction

To study the potential impact of the DLP printing process on the purity of the β -TCP, three samples of both printed and casted matrices were crushed to obtain powders that were characterised using the same protocol.

Calcium/phosphate ratios (Ca/P ratios) were determined by powder X-ray diffraction analysis (Rigaku Miniflex, Neu-Isenburg, Germany) using the intensity ratio of lines HA (211) and ITCP (0210) according to the method of proportioned additions [31,32]. In this context, the lines of interest are (210) ($2\theta = 28.971^\circ$) or (211) ($2\theta = 31.772^\circ$) for HA and (0210) ($2\theta = 31.027^\circ$) for β -TCP. For proportions of HA less than 30%, however, line (210) is difficult to observe. In this case, we therefore prefer line (211), which remains exploitable for HA levels greater than 0.5%.

2.2.2. Infrared Spectroscopy

The presence of calcium pyrophosphate (CPP) ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), was controlled by infrared spectroscopy on a Fourier transform spectrometer (Jasco-FT/IR-460 Plus, Lisses, France).

Three samples of both printed and casted matrices were crushed to obtain powders that were characterised using the same protocol.

The infrared spectra were recorded in transmission by a Fourier transform spectrophotometer between 400 and 4000 cm^{-1} (Jasco FT/IR-460plus, Lisses, France) on pellets containing 298 mg of potassium bromide (KBr) and 2 mg of β -TCP powders. These measurements allowed us to determine the presence or absence of CPP in β -TCP by observing the characteristic CPP bands at 720 cm^{-1} and 1200 cm^{-1} .

The 757 cm^{-1} and 434 cm^{-1} bands, which indicate the presence of the α form of calcium pyrophosphate, or the 1210 cm^{-1} and 1185 cm^{-1} bands at 723 cm^{-1} and 454 cm^{-1} can also be studied (the latter are characteristic of the β form of calcium pyrophosphate). Thus, the absence of these different bands during the FT-IR analysis indicates undetectable CPP contamination of β -TCP production.

We employed infrared spectroscopy rather than using quantitative techniques such as EDS or WDS because infrared is the most sensitive method for detecting the presence of pyrophosphate in TCP using the absorption band at 721 cm^{-1} that is characteristic of the stretching vibration of the pyro group's P-O-P bond.

2.3. Searching for Pollutants or Trace Elements

To quantify the presence of heavy metals and trace elements, we conducted an analysis using inductively coupled plasma spectrometry. Samples were ionised using a plasma torch and produced ions that were then detected using mass spectrometry. Two samples were tested. The first was composed of powder sampled after the synthesis process, and the second was a printed tab.

This research was carried out by an external company (FILAB', Dijon, France), and the elements researched were mercury (Hg), arsenic (As), lead (Pb), cadmium (Cd), antimony (Sb), chromium (Cr), nickel (Ni), barium (Ba) and copper (Cu).

2.4. Scaffold Shaping

2.4.1. DLP Rapid Prototyping

Computer-Assisted Design Process

Considering our objectives, we decided to design a range of pieces. For the osteoblast culture, we designed non-micro-porous matrices comprising discs of 6 mm in diameter and 2 mm in thickness for introduction in 96-well plates. To study the accuracy of our printing technique, we designed two micro-porous cubes. The first had sides of 5 mm and four square windows on each side of 1 mm by 1 mm. The second of had sides of 10 mm and four square windows, each measuring 2 mm by 2 mm, on each side. All 3D models used in this study were produced using Windows 3D Builder[®] software (Version 5.2, Microsoft, Redmond, WA, USA) for STL files. To consider the shrinkage of samples during the sintering process, they were designed with oversized dimensions. The 3D models were then cut into series of 50-micrometre (μm)-thick layers using Creation Workshop[®] software (Version 1.0.0.75, freeware, Steve Hernandez). The files were then transmitted to the printer control software (Cryoberyl Software Version 1.2, Cryoceram, Bry, France) for production.

DLP Printing Technique

We opted for a top-down DLP printing technique and developed a printer accordingly. A DLP projector projects a black-and-white dynamic mask of ultraviolet light onto the slip surface to obtain a polymerisation corresponding to the slice of the object. The used slip combines photopolymerisable resins and a suspension of phosphocalcic powder, as described in Figure 1. The object being created rests on a motorised tray that is progressively immersed in the slip after each layer under the control of a stepper motor mounted on a high-precision linear guide. This controlled descent of the object allows for layers to be progressively added. A mechanical resolution of less than a micron could be obtained in the Z axis, and the DLP projector was able to provide dynamic masks with an XY-axis resolution of close to $40\ \mu\text{m}$. Our theoretical maximal layer/Z resolution was $50\ \mu\text{m}$ before sintering, as illustrated in Figure 2. The maximum printable dimensions are $95 \times 50 \times 150\ \text{mm}$.

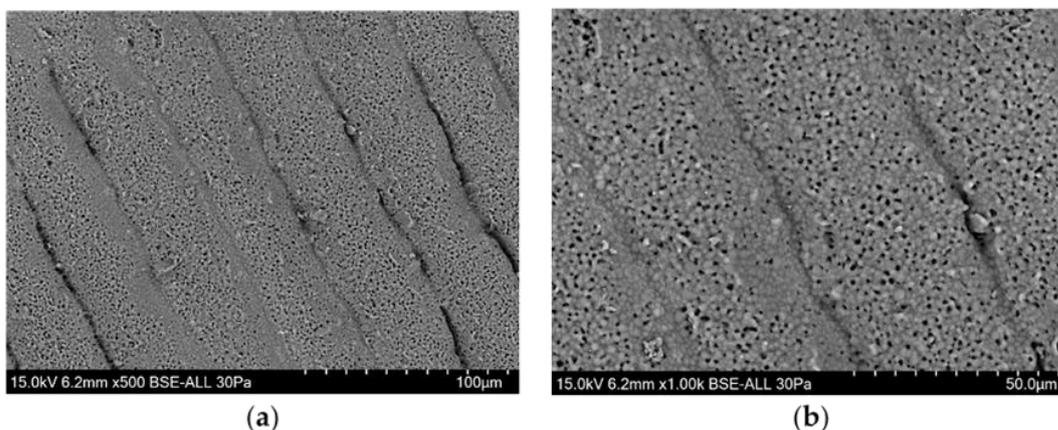


Figure 2. Scan of a printed part using an electron microscope with a resolution of $50\ \mu\text{m}$. We can see that at $500\times$ (a) and $100\times$ (b) magnifications, the layers are less than $50\ \mu\text{m}$ thick due to sintering at $1050\ ^\circ\text{C}$, but the matrices maintain a high level of open porosity.

The slip used in this technique is different from those used in conventional casting techniques. The β -TCP powders were incorporated into a photosensitive ($\lambda = 350\text{--}400\ \text{nm}$) acrylic resin (T4-CaP; CryoBeryl software, Bry, France) to obtain 68% (weight/weight) dry-matter-content slurries that were homogenised at 150 rpm by planetary milling for 30 min (PM100; Retsch, Haan, Germany).

As with conventional slips, the material loading rate has a direct impact on the density and micro-porosity of the final object. Furthermore, to maintain the flatness of the slip surface, no external scraping or levelling devices are used. Therefore, the suspension must have a low viscosity; this gives it a short relaxation time, creating a brief delay between the printing of two successive layers.

Once the layers to be printed had been entered into the printer's control software, the printer projected a dynamic mask onto the slurry with an exposure time of 6 s per layer. Between each exposure, the sample was immersed in the slip before rising to 50 μm from the surface to polymerise the next layer. A delay of 10 s was required between the printing of each layer to ensure the flatness of the slip surface.

2.4.2. Conventional Shaping Technique

To compare the safety of the printing technique, we shaped conventional matrices. The used β -TCP powder was the same as that employed in both printing and casting techniques. Scaffolds were prepared using a classical template-casting approach.

The β -TCP powder was suspended in a water solution with dispersant (Darvan C) and surfactant (B1001) to obtain 68% (weight/weight) dry-matter-content slurries homogenised at 150 rpm by planetary milling for 30 min (PM100; Retsch, Haan, Germany). The slurry was then cast in a plaster mould designed to obtain discs with diameters of 6 mm. The mould was then placed in heat chamber overnight (for 12 h) at 30 $^{\circ}\text{C}$.

2.5. De-Binding and Sintering

Once they had been shaped, the parts were carefully transferred into a high-temperature furnace (Ecotop 60, ROHDE, Prutting, Germany) to perform both the de-binding and final sintering of the scaffolds in a single step. During the first phase, the temperature was raised 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to a temperature of 600 $^{\circ}\text{C}$, which was then maintained for 1 h. This first phase of the temperature increase consisted of de-binding the parts and, thus, gradually eliminating the resins and organic compounds. The next phase increased the temperature at a rate of 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until the sintering temperature was reached and maintained for 3 h. Finally, the parts were brought back to room temperature according to a temperature descent curve of 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Sintering temperatures of 1000, 1050 and 1120 $^{\circ}\text{C}$ were chosen so that we could study the open micro-porosity and biological properties of the matrices.

2.6. Evaluation of Open Porosity of the Matrices

The porosities of the matrices were established by hydrostatic weighing. This method allows us to calculate the apparent density and open porosity of a sample by measuring its mass under different conditions.

To determinate their dry mass, the samples were dried in a heat chamber for 30 min at 150 $^{\circ}\text{C}$. They were then placed in a vacuum chamber to achieve a rough vacuum (<1 kPa). These conditions were maintained for a minimum of 30 min before breaking the vacuum and weighing the samples.

The wet mass of the samples was then measured once they had been transferred to a saturator on a support. A vacuum (<1 kPa) was applied for 1 h. When the discs were immersed in distilled water, the vacuum was broken. Once the samples had been completely immersed, the platform was shaken to eliminate the microbubbles coming from the degassing of the water, and they were kept immersed for at least 1 h. The vacuum was put back in place and then broken every 20 min for three cycles, leaving the samples immersed before they were weighed. Finally, the different dry and wet mass measurements were compared in order to determine the porosity of the samples.

Three types of matrices, each with six samples, were produced so that we could study the impact of the sintering temperature at 1050 and 1120 $^{\circ}\text{C}$ and printing thicknesses of 50 and 100 μm (group 1: 1050 $^{\circ}\text{C}$, 50 μm ; group 2: 1050 $^{\circ}\text{C}$, 100 μm ; group 3: 1120 $^{\circ}\text{C}$, 50 μm).

2.7. Evaluation of DLP Printing Accuracy

The sintering temperature plays a major role in the shrinkage of the produced parts, depending on their composition and production parameters. Preliminary tests were carried out to determine the shrinkage induced in our material at different temperatures. Once these data had been collected, we were able to determine that the printed parts needed to be oversized by 21% at 1050 °C to obtain the desired dimensions after sintering. In this study, to confirm the accuracy of our shaping process, we produced cubes with four windows on each side. A landmark was placed on the top of the cube to identify the X/Y/Z axes. We used the same slip as during our different printing tests.

In the first test, two cubes with sides of 5 mm, each with four windows of 1 mm by 1 mm, were printed and sintered at 1050 °C for measurement (Figure 3).

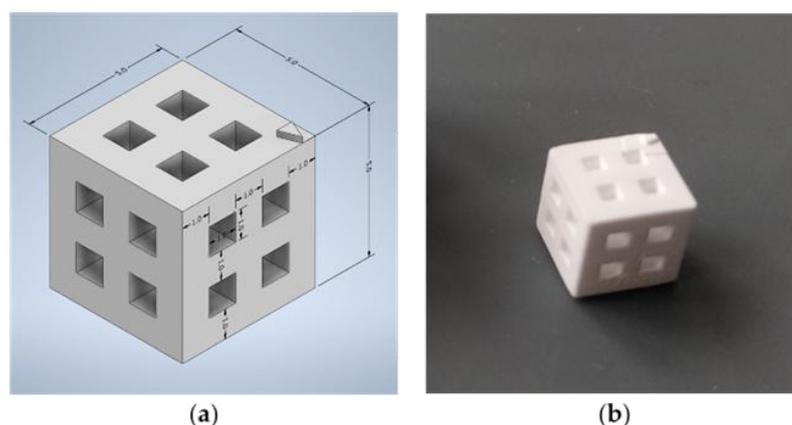


Figure 3. Virtual model of cube before oversizing process (a) and result after sintering (b).

We performed a second test using two different sets of cube dimensions to confirm our results and the potential impact of the dimensions on the accuracy of the technique. The first cube was identical to those we produced for the first test. The second cube was designed with 1 cm edges, each face having four 2 mm by 2 mm windows. Just as in the first test, the sintering temperature was set at 1050 °C.

We assessed the accuracy of printing using a micro-computed tomography scanner (micro-CT) (Bruker Skyscan 1172, Billerica, MA, USA) and measured it using Geomagic Control X[®] (Version 2023.1.0, 3dsystem, Rock Hill, SC, USA). The dimensions of the edges were measured using the average dimensions between all the points of a face and their orthogonal antagonists on the opposite face.

2.8. Measure for Releasing Calcium Ions

To study the ionic release of our material, we observed the conductimetry variation of distilled water, in which we immersed printed pellets that were 11.5 mm in diameter and 2.1 mm in thickness with a mass of 0.55 g. Pellets were printed according to our technique and then sintered. We studied the effects of three temperatures, namely 1000 °C, 1050 °C and 1100 °C, and sintered two pellets for each temperature. Finally, for each temperature, one pellet was washed for 5 min and the other for 1 h before being sterilized at 170 °C for 1 h. We developed a specific device to test eight samples in parallel, leaving the samples in pure water for 6 days. To convert these conductimetry results into a Ca²⁺ assay, we used an AQUION ICS900[®] (Thermo Fischer Scientific, MA, USA) ion-exchange chromatography system.

In summary, we studied ionic release according to the following parameters:

- β -TCP with 5 min wash and 1000 °C sintering;
- β -TCP with 1 h wash and 1000 °C sintering;
- β -TCP with 5 min wash and 1050 °C sintering;
- β -TCP with 1 h wash and 1050 °C sintering;
- β -TCP with 5 min wash and 1100 °C sintering;
- β -TCP with 1 h wash and 1100 °C sintering.

2.9. Cell Proliferation

2.9.1. Evaluation of Impacts of Sintering Temperatures and Shaping Techniques

To evaluate the biocompatibility of our technique, we decided to compare it to the classic casting technique. Thus, we printed β -TCP pellets and cast another series using β -TCP belonging to the same production. These pellets had a circular shape suitable for culture in 24-well plates. Two sintering temperatures were selected, namely 1000 °C and 1100 °C. The objective of these two temperatures was to study the impact of micro-porosity and matrix degradation on cell culture. Prior to culturing, the pellets were rinsed with pure water for 5 min before being sterilised at 170 °C for 1 h.

In addition, two durations of cultures were studied, with cell counts carried out at 3 and 6 days.

We formed the following groups, each containing six samples:

- β -TCP cast and sintered at 1000 °C;
- β -TCP printed and sintered at 1000 °C;
- β -TCP cast and sintered at 1100 °C;
- β -TCP printed and sintered at 1100 °C;
- MC3T3-E1 on well bottom (control group).

Cells selected for this test were MCT3T3-E1, an immortalised cell line derived from mouse calvaria osteoblast precursors.

Each well was inoculated with 8000 cells in suspension, and 900 μ L of specific culture medium was added to each well. Following this, the culture plate was incubated in an enclosure (CB 150/APT line/Binder, LabExchange, Paris, France) with the following parameters: temperature at 37 °C, atmosphere at 5% CO₂ and 100% water saturation.

The vitality of the cells was studied using a redox indicator, namely Alamar Blue. The culture media were cleaned from each well, then replaced with a culture medium containing 10% fluorescent Alamar[®] Blue dye (Interchim, Montluçon, France), before being re-incubated for 2 h. Alamar blue, or resorufin, is a blue reagent which, when reduced, transforms into resorufin, which has a highly fluorescent-pink colour. It is therefore used as a marker of cell viability by highlighting the presence of redox activity linked to the number of cells present and their mitochondrial activity.

The solutions were then transferred to 96-well plates (Nunc, Thermo Fischer Scientific, MA, USA), and the fluorescence absorption was measured by a fluorometer (TwinkleTM LB 970, Berthold Technologies, Bad Wilbad, Germany) at 530 nm for excitation and 590 nm for emission. This made it possible to assess the mitochondrial activity and, in turn, the vitality of the different groups.

The vitality rate of the cells in the different groups was calculated by realising the ratio between their absorbance and that of the control group.

2.9.2. Impact of Rinsing the Matrices

In order to improve our results, we modified our protocol to evaluate the impact of subjecting the matrices to a longer period of rinsing. Longer rinsing is supposed to eliminate the most unstable phases of the matrices and thus limit the release of ions during cell culturing, which can be detrimental to their survival. Similarly, daily renewal of the culture medium from the 24th hour of culturing was studied on cells cultured on a dish bottom and on matrices rinsed for 1 h.

We therefore cultured MC3T3-E1 cells on β -TCP matrices shaped by our printing technique and sintered at 1050 °C. The cell culture and vitality evaluation protocols were otherwise identical to the previous biocompatibility test.

We formed the following groups, each containing six samples:

- β -TCP with 5 min wash;
- β -TCP with 1 h wash;
- β -TCP with 1 h wash and daily medium change;
- MC3T3-E1 on well bottom with daily medium change;
- MC3T3-E1 on well bottom (control group).

3. Results

3.1. β -TCP Characterisation

3.1.1. X-ray Diffraction

During our analysis of both casted and printed matrices, we observed the same elements and similar graphs. Study of the X-ray diffraction graph shows the presence of a large peak of β -TCP, while those of hydroxyapatite and pyrophosphate are absent (using a 2 theta angle of 31.773°, XRD is the most sensitive method to detect the presence of traces of HA in TCP).

3.1.2. Infrared Spectroscopy

Furthermore, infrared spectroscopy graph analysis matches our X-ray analysis, and we observed the absence of characteristic pyrophosphate bands (using the absorption band at 721 cm^{-1} characteristic of the stretching vibration of the pyro group's P-O-P bond, infrared is the most sensitive method for detecting the presence of pyrophosphate in TCP).

Thus, we concluded that our powder production and our shaping techniques resulted in β -TCP matrices with negligible (possibly undetectable) traces (presence) of pyrophosphate and hydroxyapatite. Figures 4 and 5 provide examples of the X-ray and infrared graphs that we obtained using a printed matrix.

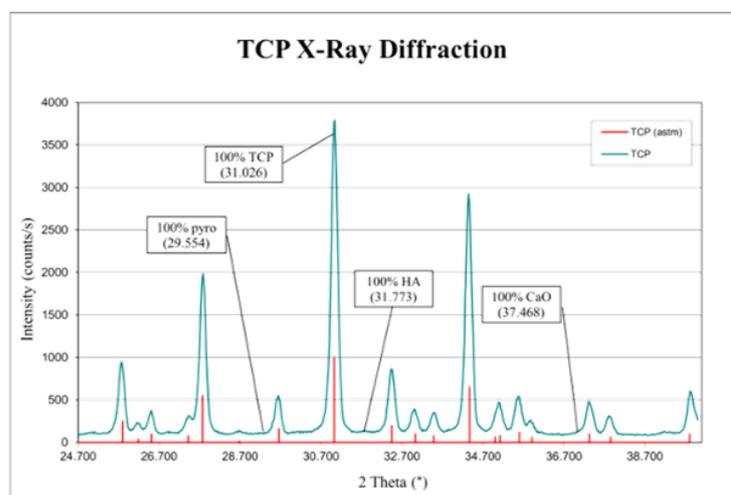


Figure 4. X-ray diffraction spectrum of a printed matrix. This illustrates the β -TCP and that no pyrophosphates, hydroxyapatite, or lime were detected.

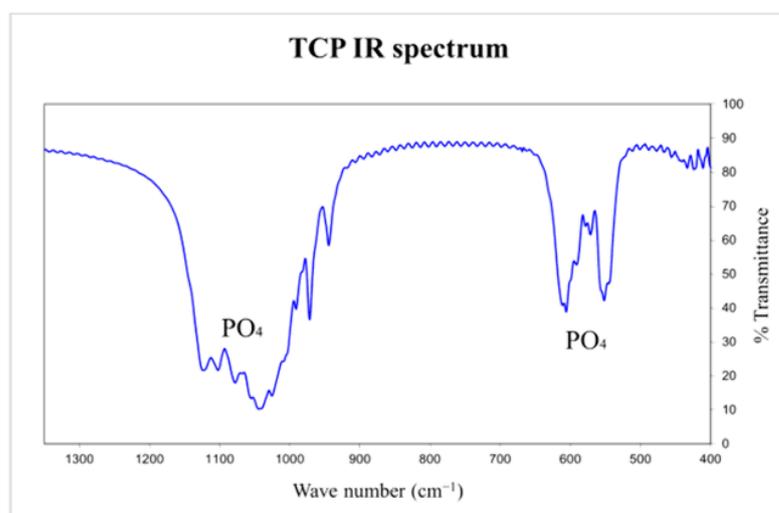


Figure 5. Infrared spectrum of the same printed matrix as in Figure 5, confirming that no pyrophosphate was detected.

3.2. Search for Pollutants or Trace Elements

The external research on pollutants in the powder is summarized in Table 1. They confirmed very few variations in material composition. All the tested high-risk contaminants were undetectable or showed very low levels, confirming the safety of our product for clinical use.

Table 1. Search for pollutants or trace elements in the powder before and after the printing process (expressed in mg/kg).

Element	Before Printing	After Printing
Mercury/Hg	<0.050	<0.050
Arsenic/As	<1.0	<1.0
Lead/Pb	<1.0	<1.0
Cadmium/Cd	<1.0	<1.0
Stibium/Sb	<1.0	<1.0
Chromium/Cr	<1.0	<1.0
Nickel/Ni	<1.0	<1.0
Barium/Ba	2.7	2.8
Copper/Cu	<0.050	<1.0

All data before and after printing report that undetectable or to low levels of contaminants were present. A value of <1.0 means that the device could not detect a quantity less than 1 milligrams per kilogram, which is well below the acceptable limit values.

3.3. Evaluation of Open Porosity of Matrices

While taking these measurements, we observed and confirmed that the porosity of the matrices was linked to their sintering temperatures and not to the thickness of the print. A higher temperature leads to a decrease in open porosity. In fact, although we observed variability between samples, their porosity was about 20% for a sintering temperature of 1050 °C and decreased to 9 to 10% for a sintering temperature of 1120 °C. At the opposite end of the spectrum, despite the variations in printing thickness, the open porosity remained stable for a constant sintering temperature. Data are summarized in Table 2.

Table 2. Evaluation of open porosity of matrices.

Matrix Production Parameters	1	2	3	4	5	6	Mean
50 μm /1050 $^{\circ}\text{C}$	18.40	22.44	19.80	21.92	21.57	21.32	20.91
100 μm /1050 $^{\circ}\text{C}$	25.13	18.37	19.42	21.05	20.15	21.63	20.96
50 μm /1120 $^{\circ}\text{C}$	10.10	7.68	12.51	11.32	9.03	8.97	9.94

Data are expressed in percentage of the open porosity of matrices.

3.4. Evaluation of DLP Printing Accuracy

The results of our first test on cubes with 5 mm edges confirmed the accuracy of our printing technique while simultaneously demonstrating its limitations.

In fact, the dimensions of the edges were very close to what we expected. On the X and Y axes, the delta between the virtual model and printed pieces was a maximum of 0.03 mm. The Y-axis resolution seems to be less obviously connected to the printing technique, with a maximum deviation of 0.07 mm from our plan.

The second test confirmed these results, with a maximum deviation of 0.06 mm from our plan for the 5 mm cube and 0.07 mm for the 10 mm cube. These data are summarized in Tables 3 and 4.

Table 3. Evaluation of DLP accuracy using cubes edges (first test).

Edges	Cube A	Cube B
Average x	4.980	4.970
Standard deviation X	0.008	0.007
Average y	4.970	4.980
Standard deviation Y	0.019	0.008
Average z	4.930	4.960
Standard deviation Z	0.033	0.008

Average dimensions (X/Y/Z) are expressed in millimetres.

Table 4. Evaluation of DLP accuracy using cubes edges (second test).

Edges	5 mm Cube	10 mm Cube
Average x	4.980	9.980
Standard deviation X	0.004	0.010
Average y	4.980	9.980
Standard deviation Y	0.005	0.004
Average z	4.960	9.970
Standard deviation Z	0.009	0.032

Average dimensions (X/Y/Z) are expressed in millimetres.

At the opposite end, the study of window dimensions showed the limits of the DLP technique. In fact, we observed a maximum decrease in window size of 0.16 mm for the 5 mm cube (1 mm windows) and 0.21 mm for 10 mm cube (2 mm windows), both on the Z axis. These results are summarized in Tables 5 and 6, and Figure 6 reports the visual evaluation of matrix deviation with a tolerance of 75 micrometres.

Table 5. Evaluation of DLP accuracy using cube windows (first test).

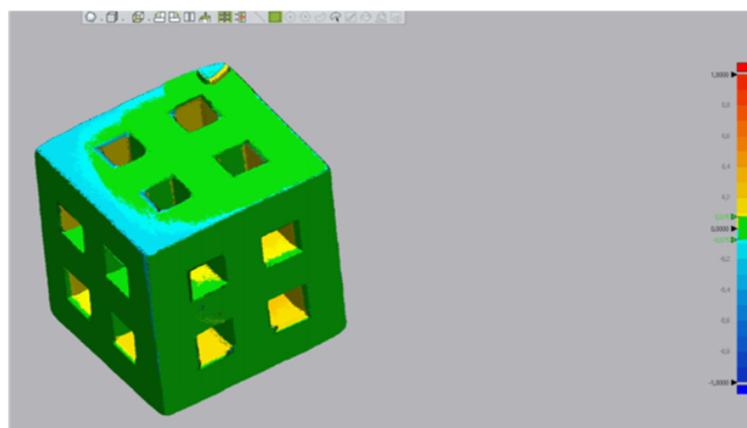
Windows	Cube A	Cube B
Average x	0.890	0.890
Standard deviation X	0.008	0.010
Average y	0.900	0.890
Standard deviation Y	0.008	0.030
Average z	0.860	0.860
Standard deviation Z	0.009	0.015

Average dimensions (X/Y/Z) are expressed in millimetres.

Table 6. Evaluation of DLP accuracy using cubes windows (second test).

Windows	5 mm Cube	10 mm Cube
Average x	0.890	1.890
Standard deviation X	0.010	0.007
Average y	0.900	1.820
Standard deviation Y	0.017	0.022
Average z	0.870	1.790
Standard deviation Z	0.011	0.046

Average dimensions (X/Y/Z) are expressed in millimetres.

**Figure 6.** Comparison of 5 mm cube acquired by micro-CT scan with 3D design. Green represents the points with a tolerance under 75 microns.

3.5. Release of Calcium Ions

We observed that the sintering temperature had a direct impact on the release of calcium ions. As expected, the increase in sintering temperature led to a drop in calcium release. For all samples, the maximum calcium release in the medium occurred within the first 12 h. This gradually decreased and stabilised without reaching a plateau phase.

After 6 days in pure water, considering the samples rinsed for 5 min, the maximum calcium release was reached with sample sintered at 1000 °C and was 10.67 mg/L, whereas it was 7.73 mg/L for the 1050 °C sample and only 6.3 mg for the 1100 °C sample.

It is also worth noting that rinsing the different samples reduced calcium release in the medium during the whole test. However, the maximum impact was observed with the lower sintering temperature and was reduced at 1050 °C and 1100 °C.

Our data are summarized in Table 7 and Figure 7.

Table 7. Calcium release depending on sintering temperature and rinsing of matrices.

Matrix Parameters	3 h	6 h	12 h	1 Day	2 Days	3 Days	4 Days	5 Days	6 Days
1000 °C/5 min	2.50	3.60	5.35	6.24	7.15	8.86	9.01	9.89	10.67
1000 °C/60 min	2.40	3.50	4.84	5.72	6.31	6.75	7.23	7.74	8.19
1050 °C/5 min	0.95	2.20	3.01	4.09	4.97	5.80	6.52	7.15	7.73
1050 °C/60 min	0.94	2.20	2.97	3.70	4.60	5.35	6.05	6.72	7.32
1100 °C/5 min	0.90	1.60	2.52	3.60	4.47	5.14	5.70	6.28	6.30
1100 °C/60 min	0.86	1.56	2.48	3.19	3.85	4.35	4.80	5.30	5.73

Data are expressed in milligrams of calcium per litre.

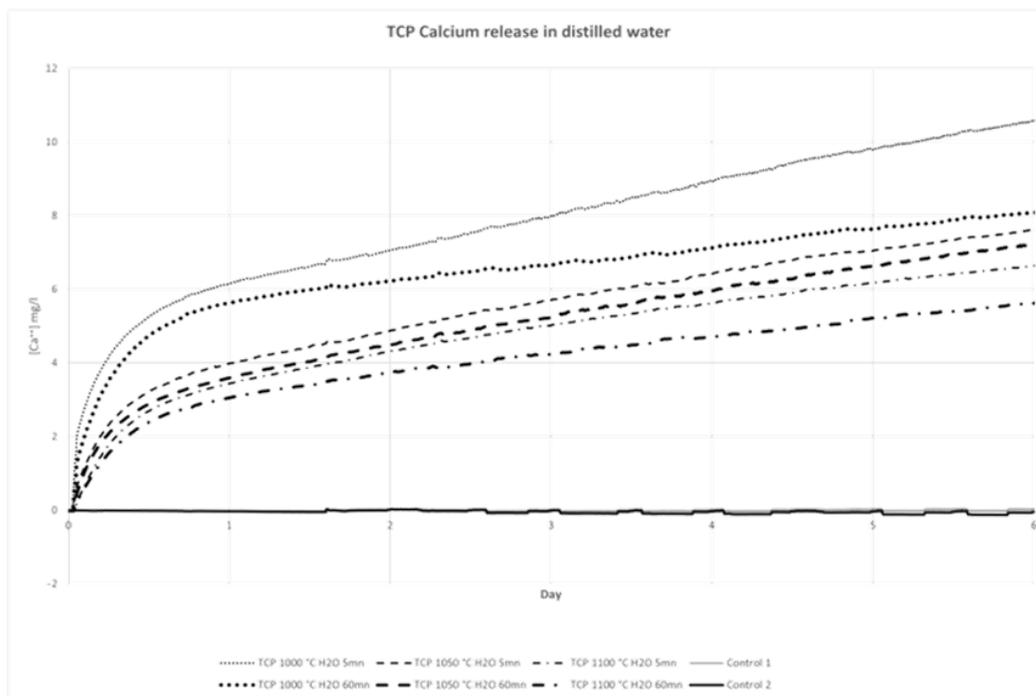


Figure 7. Calcium release in distilled water. Data are expressed in milligrams per litre.

3.6. Safety of Printing Technique: Cell Proliferation

The results of our first test on cells comparing casted and printed matrices for osteoblast cultures are summarized in Figure 8. We observed no significant differences between cultures on casted and printed matrices. The most influential factor was the sintering temperature, and we experienced an improvement in the proliferation of cells with higher sintering temperature. Finally, we also observed that osteoblasts improved their proliferation on matrices depending on the duration of culturing, with better results on matrices sintered at 1100 °C.

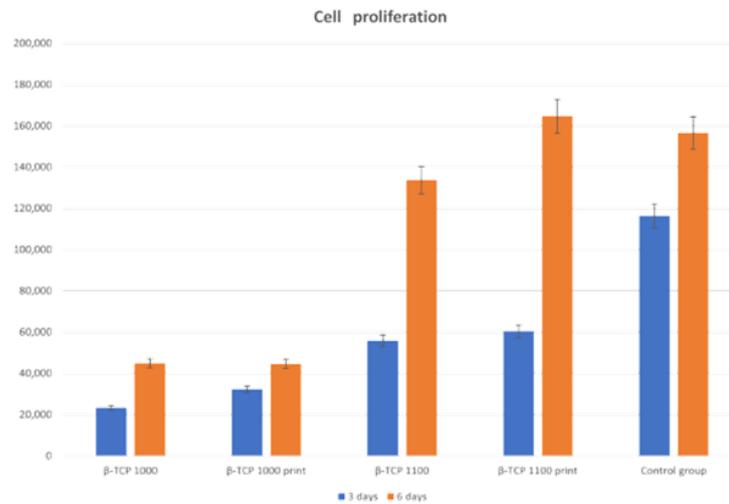


Figure 8. Comparison of cell proliferation after 3 and 6 days for in vitro cultures on cast and printed matrices at 1050 °C and 1100 °C.

Our second test demonstrated that matrices that had undergone 1 h of rinsing before culturing exhibited increased osteoblast proliferation compared to our standard 5 min rinsing protocol.

Considering the daily replacement of culture medium, we observed that a precocious replacement seems to be prejudicial for cells; after a few days, however, fresh culture medium appears to be beneficial, as we can see in Figure 9.

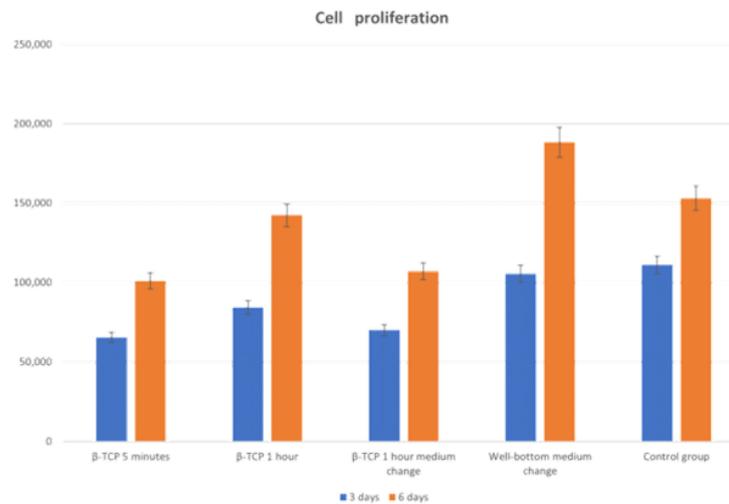


Figure 9. Evaluation of the effects of rinsing of matrices and changing of medium on cell proliferation on matrices sintered at 1050 °C.

4. Discussion

In our opinion, the data obtained in this study confirm that, as reported in the literature, the β-TCP matrices produced using our top-down DLP present promising properties for bone tissue engineering [33]. In fact, we demonstrated that the purity of β-TCP powder and the physico-chemical properties and biocompatibility of matrices are not altered by

our printing process [34]. Our data also confirmed that DLP allows for reproducible and precise printing of phosphocalcic scaffolds. Our shaping technique therefore appears to be a solid basis for the development of phosphocalcic matrices with complex architectures incorporating different controlled macro-porosities and the microfluidic network needed to produce matrices for large-volume bone reconstruction.

4.1. β -TCP as a Bone Reconstruction Material

For decades, hydroxyapatite (HA) and β -TCP have demonstrated biocompatible and osteoconductive properties by allowing the attachment, migration, proliferation and differentiation of osteoblasts. Their osteoinductive properties, however, vary depending on their composition, geometry, specific surface area, and macro- and micro-porosity [35]. Taking full control of matrix production from powder synthesis to final shaping is fundamental for further biomedical applications. This observation led us to develop our own product.

β -TCP has a less stable crystal structure than HA and is more degraded by osteoclasts [36]. HA presents minimal resorption, whereas β -TCP can be completely resorbed into the reconstructed site and replaced by native bone, depending on its resorption speed. In our study, we confirmed that the matrices we produced possess resorption properties that vary according to the sintering temperature.

Although the resorption of β -TCP is beneficial for osteoinduction, it is detrimental for the homing of cells, bone ingrowth and, therefore, osteoconduction. There must therefore be a compromise between resorption and stability of the scaffolds [37].

Calcium phosphate synthesis is not the unique parameter necessary for understanding biological properties. As we observed, an increase in the sintering temperature leads to a decrease in the micro-porosity of the matrices, as well as their resorption. This is in agreement with the findings of previous research that reported a reduction in micro-porosity associated with an increase in the grain size and the specific surface area [38,39]. Our first in vitro culture confirmed the biological impact of the sintering temperature, resulting in better cell proliferation associated with a higher sintering temperature.

We also tested the rinsing of our matrices to eliminate the non-adherent particles resulting from the sintering step. We observed a decrease in calcium release for all sintering temperatures. These results are in keeping with our second in vitro cultures, which achieved better results on rinsed matrices.

Studying the results of both culture tests, we can conclude that higher sintering temperatures are always beneficial for osteoblast cultures. That said, it is very difficult to directly transfer our in vitro observations to in vivo results. In vitro, the stability of β -TCP matrices is advantageous, improving the homing properties of their cells. However, these results may greatly differ from in vivo cultures, which are much more complex systems with autoregulation processes in which the osteoinductive properties of β -TCP cannot be ignored. That is why we focused our study on matrices sintered at 1050 °C, constituting a good compromise for future in vivo studies.

4.2. Purity and Biocompatibility of 3D-Printed Matrices

In most cases, Fused Deposition Modelling (FDM) is used to 3D print biomedical scaffolds [40]. The FDM technique does, however, present a number of limitations in terms of resolution; for example, its large nozzles (around 0.4–0.5 mm) and speed of production mean that each point of the printed matrix must be individually extruded. The DLP 3D-printing system, which uses layer-by-layer polymerisation, has the potential to produce at better speeds, and, depending on the size of the printing surface, multiple matrices can be produced simultaneously. Moreover, the resolution of FDM is not sufficiently high [41]. DLP mixes phosphocalcic powders with polymer binders. Until recently, production techniques did not attempt to completely remove polymers to maintain the structural integrity of the matrices. Our study is, therefore, one of the first to report the production of 3D-printed pure phosphocalcic matrices [19,42,43]. In fact, our production process

combines de-binding and sintering processes in a single step that allows for the destruction and removal of biological components present in matrices, including polymer binders.

Thus, X-ray diffraction and infrared spectroscopy confirmed the industrial quality of our production. Looking for pollutants confirmed that both our synthesis and printing processes are safe and did not introduce pollutants into the matrices. Study of the open micro-porosity also demonstrates that the proposed printing processes did not modify properties of the β -TCP. Open porosity is mandatory in completely removing polymers and providing easy revascularisation of the matrices. Finally, the results of our osteoblast culture did not significantly differ between printed and casted scaffolds, demonstrating that they have the same biological properties and confirming the biocompatibility of our printing technique.

In our opinion, these elements demonstrate the efficiency of our technique in producing biocompatible 3D-printed phosphocalcic matrices.

Even though our study focused on β -TCP, other calcium phosphate synthetic apatites, like HA and biphasic calcium phosphate (BCP), a mixture of hydroxyapatite and β -TCP, can also be considered because of their specific biological and mechanical properties [13,33]. However, depending on the synthetic calcium apatite composition, specific formulations of polymer binders are necessary if we want to obtain high-density matrices with optimised properties [44,45].

4.3. DLP Printing for Clinical Applications Related to Tissue Engineering

Rapid prototyping processes are of interest with regard to controlling the reproducible micro-porosity of matrices compared to conventional methods [23]. Indeed, conventional approaches result in variable and random interconnections due to the forming process. At the opposite end of the spectrum, as we experienced in our research, DLP enables us to produce reproducible matrices with controlled macro-porosity.

One of the difficulties involved in using DLP, however, finding a compromise between maximum powder loading and a viscosity compatible with the printing technique [46]. That is why in this article, we studied the accuracy of our printed devices with 68% solid loading, which is equivalent to conventional shaping and higher than most DLP printers.

In our opinion, our study confirmed the potential of our shaping process because of its simplicity and accuracy. One element to consider in our production technique is the sintering phase. This results in a homogeneous contraction of the green parts and, thus, improves the precision of part printing. The controls we tested by scanning different parts produced using the same 3D model showed marginal variations on the same axis. Determining the contraction of parts as a function of sintering temperature is therefore essential if we want to produce digital models of the parts to be printed. However, our data also expose the limits of our process, which are connected to the viscosity of our slurry, light scattering within the ceramic and printing speed. Those parameters are in keeping with the findings of the literature, and we can apply corrections in the future to improve these results [47]. Modulating the dimensions in the Z axis can therefore compensate for the deformation observed during our printing process. Furthermore, future modification of the light source during the printing process could also lead to an increase in our resolution, which we evaluated to be lower than 50 μ m.

At present, most clinical practice involves the use of synthetic calcium phosphates in the form of powders or prefabricated blocks to fill bone defects. These, however, cannot perfectly adapt to reconstruct the defect, thus leading to instability and failure. Indeed, biomechanical stability is one of the fundamental elements involved during the bone healing process, and DLP printing of a custom implantable scaffold is of a high level of interest [48,49].

Furthermore, DLP allows us to design matrices with controlled macro-porosity that can be modified to mimic the characteristics of native bone, which has variable macro-porosity. The pores of the trabecular bone range in size from 200 to 700 μ m and have a porosity ranging between 50 and 90%, whereas the cortical bone has less than 20% porosity

and a pore range of 1100 μm . Furthermore, it has been demonstrated that variations in pore size seem to be essential to the biological properties of matrices [37]. A study using DLP to produce macro-porous BCP matrices compared the impact of the size of macro-pores ranging from 0.8 to 1.4 mm on bone formation. The authors concluded that the formation of new bone was satisfying but that no significant variation was observed after 8 weeks of culturing [19]. Other studies have reported that macro-pores with a diameter of up to 140 μm increase new bone formation and capillary density, that pores of up to 100 μm are important for bone oxygenation and that angiogenesis and pores of less than 1 μm play an important role in bioactivity [50,51].

In light of the above, the high-precision 3D printing of phosphocalcic bone matrices using techniques including our own is key to the development of bone tissue engineering. Such techniques allow for the precise control of the scaffolds' architectures and optimise the physical and biological properties of scaffolds, enabling them to assume different shapes and have pores of a range of sizes.

Our study did not research the compressive strength of the matrices we produced. We arrived at this decision because the compressive strengths of phosphocalcic matrices increase with their sintering temperatures. In addition, the macro-porosity of the matrices and their various possible shapes have a direct impact on their mechanical strengths [19].

In tissue engineering, vascularisation is considered to be essential [52]. Most bone tissue engineering protocols use vascularisation brought by the surrounding tissues. Cells should be within 200 μm of a vessel in order to exchange oxygen and nutrients, thus theoretically limiting the size of functional bone scaffolds and preventing necrosis [53]. Large reconstructions also need to both mimic bone and incorporate the vascularisation or fluidic network to make them useful in clinical applications. Multiple bioprinting strategies have therefore been developed to this end, including extrusion-based bioprinting, inkjet printing, acoustic wave patterning and light-based bioprinting [54].

When it comes to phosphocalcic synthetic biomaterials, however, bioprinting is not compatible with the sintering process that is necessary for densification of the matrices. Another approach to mimic a functional vascularisation is to print a fluidic network into matrices and then culture endothelial cells on its walls. In that approach, the design of the network is essential to reduce the hypoxic areas inside matrix, as well as to contribute to a fluid flow with low turbulences, thus reducing thrombogenesis [55]. Given these various constraints, DLP printing appears promising for producing phosphocalcic matrices with both controlled macro-porosity and a "vascular tree". And this is precisely why we developed our shaping technique.

At present, the printing of phosphocalcic matrices is one of the most promising fields in bone tissue engineering. And given the accuracy of DLP, it could become the gold standard. However, printing is only one of the steps that can affect the biological and mechanical properties of matrices.

Given the complexity and number of parameters to be considered in producing these scaffolds, the complete, careful monitoring of all steps in the production of these matrices—from powder synthesis to final sintering—is essential. This is reflected in our decision to dedicate a section of our study to the characterisation of our production to confirm that we produced β -TCP and that our printing technique does not alter its properties.

We also studied the accuracy of our shaping technique using DLP. Our findings demonstrate that top-down DLP is an effective technique for producing precise phosphocalcic matrices and that the shrinkage of green parts linked to sintering is involved in increasing the printing resolution. These findings will enable us to devote future studies to exploring complex phosphocalcic matrices, with a special focus on the development of a functional vascular network.

Author Contributions: Conceptualization, T.W., J.-C.H. and G.R.; methodology, T.W., J.-C.H., F.C. and G.R.; software, V.H.; investigation, T.W., F.C., V.H.; data curation, T.W.; writing—original draft preparation, T.W.; writing—review and editing, T.W., J.-C.H., V.H., F.C. and G.R.; supervision, J.-C.H., F.C. and G.R.; project administration, T.W.; funding acquisition, T.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by “L’Union des Blessés de la Face et de la Tête” (grant number: No. 101-2019).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The authors confirm that the data can be obtained upon reasonable request to the corresponding author: thomaswojcik4@gmail.com.

Acknowledgments: The authors would like to thank “L’Union des Blessés de la Face et de la Tête” for funding this research project.

Conflicts of Interest: Author Vincent Hornez was employed by the company CRYOCERAM. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Giannoudis, P.V.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. Bone substitutes: An update. *Injury* **2005**, *36* (Suppl. S3), S20–S27. [[CrossRef](#)]
- Salawu, O.N.; Babalola, O.M.; Ahmed, B.A.; Ibraheem, G.H.; Kadir, D.M. Comparative Study of Proximal Tibia and Iliac Crest Bone Graft Donor Sites in Treatment of Orthopaedic Pathologies. *Malays. Orthop. J.* **2017**, *11*, 15–19. [[CrossRef](#)]
- Goey, R.-S.; van Druenen, B.; van der Linden, E.; van Merkesteyn, J.P.R. Fracture of the tibia after a fibula graft for mandibular reconstruction: A rare complication, report of a case. *Clin. Case Rep.* **2021**, *9*, e03987. [[CrossRef](#)]
- Banwart, J.C.; Asher, M.A.; Hassanein, R.S. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine* **1995**, *20*, 1055–1060. [[CrossRef](#)]
- Ebraheim, N.A.; Elgafy, H.; Xu, R. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: Techniques and complications. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2001**, *9*, 210–218. [[CrossRef](#)]
- Katz, M.S.; Ooms, M.; Heitzer, M.; Peters, F.; Winnand, P.; Kniha, K.; Möhlhenrich, S.C.; Hölzle, F.; Knobe, M.; Modabber, A. Postoperative Morbidity and Complications in Elderly Patients after Harvesting of Iliac Crest Bone Grafts. *Medicina* **2021**, *57*, 759. [[CrossRef](#)]
- Shafiei, Z.; Bigham, A.S.; Dehghani, S.N.; Nezhad, S.T. Fresh cortical autograft versus fresh cortical allograft effects on experimental bone healing in rabbits: Radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *Cell Tissue Bank.* **2009**, *10*, 19–26. [[CrossRef](#)]
- Shibuya, N.; Jupiter, D.C. Bone graft substitute: Allograft and xenograft. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* **2015**, *32*, 21–34. [[CrossRef](#)]
- Serrano, C.A.; Castellanos, P.; Botticelli, D. Use of Combination of Allografts and Xenografts for Alveolar Ridge Preservation Procedures: A Clinical and Histological Case Series. *Implant. Dent.* **2018**, *27*, 467–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Amini, Z.; Lari, R. A systematic review of decellularized allograft and xenograft-derived scaffolds in bone tissue regeneration. *Tissue Cell* **2021**, *69*, 101494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jarcho, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1981**, *158*, 259–278. [[CrossRef](#)]
- Wang, L.; Nancollas, G.H. Calcium orthophosphates: Crystallization and dissolution. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4628–4669. [[CrossRef](#)]
- Owen, G.R.; Dard, M.; Larjava, H. Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. *J. Biomed. Mater. Res. Part. B Appl. Biomater.* **2018**, *106*, 2493–2512. [[CrossRef](#)]
- Hernigou, P.; Dubory, A.; Pariat, J.; Potage, D.; Roubineau, F.; Jammal, S.; Flouzat Lachaniette, C.H. Beta-tricalcium phosphate for orthopedic reconstructions as an alternative to autogenous bone graft. *Morphologie* **2017**, *101*, 173–179. [[CrossRef](#)]
- Detsch, R.; Schaefer, S.; Deisinger, U.; Ziegler, G.; Seitz, H.; Leukers, B. In vitro: Osteoclastic activity studies on surfaces of 3D printed calcium phosphate scaffolds. *J. Biomater. Appl.* **2011**, *26*, 359–380. [[CrossRef](#)]
- Castilho, M.; Moseke, C.; Ewald, A.; Gbureck, U.; Groll, J.; Pires, I.; Tešmar, J.; Vorndran, E. Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects. *Biofabrication* **2014**, *6*, 015006. [[CrossRef](#)]
- Kang, H.-W.; Lee, S.J.; Ko, I.K.; Kengla, C.; Yoo, J.J.; Atala, A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 312–319. [[CrossRef](#)]
- Ma, H.; Feng, C.; Chang, J.; Wu, C. 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy. *Acta Biomater.* **2018**, *79*, 37–59. [[CrossRef](#)]
- Lim, H.-K.; Hong, S.-J.; Byeon, S.-J.; Chung, S.-M.; On, S.-W.; Yang, B.-E.; Lee, J.-H.; Byun, S.-H. 3D-Printed Ceramic Bone Scaffolds with Variable Pore Architectures. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Trombetta, R.; Inzana, J.A.; Schwarz, E.M.; Kates, S.L.; Awad, H.A. 3D Printing of Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery. *Ann. Biomed. Eng.* **2017**, *45*, 23–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Wen, Y.; Xun, S.; Haoye, M.; Baichuan, S.; Peng, C.; Xuejian, L.; Kaihong, Z.; Xuan, Y.; Jiang, P.; Shibi, L. 3D printed porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering: A review. *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 1690–1698. [CrossRef]
22. Zhu, W.; Ma, X.; Gou, M.; Mei, D.; Zhang, K.; Chen, S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *40*, 103–112. [CrossRef]
23. Liu, Z.; Liang, H.; Shi, T.; Xie, D.; Chen, R.; Han, X.; Shen, L.; Wang, C.; Tian, Z. Additive manufacturing of hydroxyapatite bone scaffolds via digital light processing and in vitro compatibility. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 11079–11086. [CrossRef]
24. Brachet, A.; Bežek, A.; Furtak, D.; Geworgian, Z.; Tulej, D.; Kulczycka, K.; Karpiński, R.; Maciejewski, M.; Baj, J. Application of 3D Printing in Bone Grafts. *Cells* **2023**, *12*, 859. [CrossRef]
25. Gong, J.; Qian, Y.; Lu, K.; Zhu, Z.; Siow, L.; Zhang, C.; Zhou, S.; Gu, T.; Yin, J.; Yu, M.; et al. Digital light processing (DLP) in tissue engineering: From promise to reality, and perspectives. *Biomed. Mater.* **2022**, *17*, 062004. [CrossRef]
26. Zhou, T.; Zhang, L.; Yao, Q.; Ma, Y.; Hou, C.; Sun, B.; Shao, C.; Gao, P.; Chen, H. SLA 3D printing of high quality spine shaped β -TCP bioceramics for the hard tissue repair applications. *Ceram. Int.* **2020**, *46*, 7609–7614. [CrossRef]
27. Huang, X.; Dai, H.; Hu, Y.; Zhuang, P.; Shi, Z.; Ma, Y. Development of a high solid loading β -TCP suspension with a low refractive index contrast for DLP-based ceramic stereolithography. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2021**, *41*, 3743–3754. [CrossRef]
28. Raynaud, S.; Champion, E.; Bernache-Assollant, D.; Thomas, P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1065–1072. [CrossRef]
29. Destainville, A.; Champion, E.; Bernache-Assollant, D.; Laborde, E. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. *Mater. Chem. Phys.* **2003**, *80*, 269–277. [CrossRef]
30. AFNOR. *Détermination Qualitative et Quantitative des Phases Étrangères Présentes Dans les Poudres, Dépôts et Céramiques à Base de Phosphates de Calcium, Désignation NFS94-067*; AFNOR: Paris, France, 1993.
31. AFNOR. *Détermination Quantitative du Rapport Ca/P de Phosphates de Calcium, NFS94-066*; AFNOR: Paris, France, 1998.
32. Raynaud, S.; Champion, E.; Bernache-Assollant, D.; Laval, J. Determination of Calcium/Phosphorus Atomic Ratio of Calcium Phosphate Apatites Using X-Ray Diffractometry. *J. Am. Ceram. Soc.* **2001**, *84*, 359–366. [CrossRef]
33. Mishchenko, O.; Yanovska, A.; Kosinov, O.; Maksymov, D.; Moskalenko, R.; Ramanavicius, A.; Pogorielov, M. Synthetic Calcium-Phosphate Materials for Bone Grafting. *Polymers* **2023**, *15*, 3822. [CrossRef]
34. Bohner, M.; Santoni, B.L.G.; Döbelin, N. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater.* **2020**, *113*, 23–41. [CrossRef]
35. Le Nihouannen, D.; Saffarzadeh, A.; Gauthier, O.; Moreau, F.; Pilet, P.; Spaethe, R.; Layrolle, P.; Daculsi, G. Bone tissue formation in sheep muscles induced by a biphasic calcium phosphate ceramic and fibrin glue composite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 667–675. [CrossRef]
36. Chen, T.M.; Shih, C.; Lin, T.F.; Lin, F.H. Reconstruction of calvarial bone defects using an osteoconductive material and post-implantation hyperbaric oxygen treatment. *Mater. Sci. Eng. C* **2004**, *24*, 855–860. [CrossRef]
37. LeGeros, R.Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4742–4753. [CrossRef]
38. Habibovic, P.; Yuan, H.; van der Valk, C.M.; Meijer, G.; van Blitterswijk, C.A.; de Groot, K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3565–3575. [CrossRef]
39. Daculsi, G.; Jegoux, F.; Layrolle, P. The Micro Macroporous Biphasic Calcium Phosphate Concept for Bone Reconstruction and Tissue Engineering. In *Advanced Biomaterials*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2009; pp. 101–141. Available online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470891315.ch4> (accessed on 6 April 2022).
40. Wu, D.; Spanou, A.; Diez-Escudero, A.; Persson, C. 3D-printed PLA/HA composite structures as synthetic trabecular bone: A feasibility study using fused deposition modeling. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2020**, *103*, 103608. [CrossRef]
41. Schmidleithner, C.; Malferrari, S.; Palgrave, R.; Bomze, D.; Schwentenwein, M.; Kalaskar, D.M. Application of high resolution DLP stereolithography for fabrication of tricalcium phosphate scaffolds for bone regeneration. *Biomed. Mater.* **2019**, *14*, 045018. [CrossRef]
42. Zhang, M.; Lin, R.; Wang, X.; Xue, J.; Deng, C.; Feng, C.; Zhuang, H.; Ma, J.; Qin, C.; Wan, L.; et al. 3D printing of Haversian bone-mimicking scaffolds for multicellular delivery in bone regeneration. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaaz6725. [CrossRef] [PubMed]
43. Kim, J.-W.; Yang, B.-E.; Hong, S.-J.; Choi, H.-G.; Byeon, S.-J.; Lim, H.-K.; Chung, S.-M.; Lee, J.-H.; Byun, S.-H. Bone Regeneration Capability of 3D Printed Ceramic Scaffolds. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4837. [CrossRef] [PubMed]
44. Mitteramskogler, G.; Gmeiner, R.; Felzmann, R.; Gruber, S.; Hofstetter, C.; Stampfl, J.; Ebert, J.; Wachter, W.; Laubersheimer, J. Light curing strategies for lithography-based additive manufacturing of customized ceramics. *Addit. Manuf.* **2014**, *1–4*, 110–118. [CrossRef]
45. Felzmann, R.; Gruber, S.; Mitteramskogler, G.; Tesavibul, P.; Boccaccini, A.R.; Liska, R.; Stampfl, J. Lithography-Based Additive Manufacturing of Cellular Ceramic Structures. *Adv. Eng. Materials.* **2012**, *14*, 1052–1058. Available online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adem.201200010> (accessed on 27 February 2024). [CrossRef]
46. Schwentenwein, M.; Homa, J. Additive Manufacturing of Dense Alumina Ceramics. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2015**, *12*, 1–7. Available online: <https://ceramics.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijac.12319> (accessed on 25 February 2024). [CrossRef]
47. Li, X.; Zhang, H.; Shen, Y.; Xiong, Y.; Dong, L.; Zheng, J.; Zhao, S. Fabrication of porous β -TCP/58S bioglass scaffolds via top-down DLP printing with high solid loading ceramic-resin slurry. *Mater. Chem. Phys.* **2021**, *267*, 124587. [CrossRef]
48. LeGeros, R.Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr. Oral. Sci.* **1991**, *15*, 1–201.

49. Yuan, H.; van Blitterswijk, C.A.; de Groot, K.; de Bruijn, J.D. A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *78*, 139–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5474–5491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Gauthier, O.; Bouler, J.M.; Aguado, E.; Pilet, P.; Daculsi, G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* **1998**, *19*, 133–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Giannoudis, P.V.; Einhorn, T.A.; Marsh, D. Fracture healing: The diamond concept. *Injury* **2007**, *38* (Suppl. S4), S3–S6. [[CrossRef](#)]
53. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **2000**, *407*, 249–257. [[CrossRef](#)]
54. De Silva, L.; Bernal, P.N.; Rosenberg, A.; Malda, J.; Levato, R.; Gawlitta, D. Biofabricating the vascular tree in engineered bone tissue. *Acta Biomater.* **2023**, *156*, 250–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kang, T.-Y.; Hong, J.M.; Jung, J.W.; Yoo, J.J.; Cho, D.-W. Design and assessment of a microfluidic network system for oxygen transport in engineered tissue. *Langmuir* **2013**, *29*, 701–709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

