

UNIVERSITÉ DE LILLE
ÉCOLE GRADUÉE BIOLOGIE SANTÉ DE LILLE (n°446)

Année : 2025

THÈSE D'UNIVERSITÉ

Spécialité : CNU 50-02 : Chirurgie Orthopédique et Traumatologique

**Conception et évaluation *in vitro* et *in vivo* de membranes
artificielles pour la chirurgie en un temps des pertes osseuses
critiques des membres**

Présentée et soutenue publiquement le 11 juin 2025 à 14 h
au Pôle Formation

Par Marc Saab

JURY

Pr FRICAIN Jean-Christophe	Université de Bordeaux	Président
Pr PICART Catherine	Université de Grenoble Alpes	Rapporteuse
Pr KLEIN Céline	Université Picardie Jules Vernes	Rapporteuse
Dr GINDRAUX Florelle	Université de Franche-Comté	Examinatrice
Pr MARTEL Bernard	Université de Lille	Invité
Pr BLANCHEMAIN Nicolas	Université de Lille	Invité
Dr CHAI Feng	Université de Lille	Directrice

Thèse d'université réalisée au sein de l'unité INSERM U1008 : Advanced Drug Delivery Systems and Biomaterials

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Table des matières

Résumé	6
Abstract	8
Liste des Tableaux	10
Liste des Figures.....	12
Abréviations	18
Remerciements	19
1. INTRODUCTION.....	20
2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	22
2.1. Histologie, cytologie et physiologie de l'os normal.....	22
2.1.1. Organisation de la matrice osseuse	22
2.1.2. Structure osseuse	24
2.1.3. Cellules osseuses	26
2.1.4. Physiologie du tissu osseux.....	27
2.1.5. Biomécanique du tissu osseux.....	29
2.2. Fractures osseuses : consolidation et moyens de prise en charge.	30
2.2.1. Biologie de la consolidation osseuse.....	31
2.2.2. Traitement des fractures	37
2.4. Prise en charge des pertes de substance en chirurgie orthopédique et traumatologique	42
2.4.1. Traitement chirurgical des pseudarthroses	42
2.4.2. Les greffes osseuses	45
2.4.3. La technique du transport osseux	51
2.4.4. La technique de la membrane induite (technique de Masquelet).....	52
2.4.4.1. Le concept de stratégie et de tactique du Professeur Alain-Charles Masquelet..	52
2.4.4.2. Description de la technique	53
2.4.4.3. Caractérisations de la membrane induite.....	55
2.4.4.4. Résultats cliniques et problématiques encourus de la technique.....	67
2.5. Les modèles animaux d'étude de la membrane induite et des stratégies de reconstruction osseuse.....	71
2.5.1. Les modèles animaux de petite taille	71
2.5.2. Les modèles animaux de grande taille	75
2.5.3. Résumé : choix du modèle <i>in vivo</i> d'étude de nos membranes artificielles.....	78
2.6. Objectifs de la thèse	88
3. CONCEPTION ET ÉVALUATION <i>IN VITRO</i> DES MEMBRANES ARTIFICIELLES	90
3.1. Introduction	90
3.1.1. Conception : cahier des charges des membranes artificielles	92

3.1.2. Élaboration des membranes artificielles par electrospinning.....	93
3.1.3. Résumé des travaux réalisés dans le cadre de la thèse de Hugo Bossut	94
3.2. Matériel et méthodes	100
3.2.1. Évaluation macroscopique de suturabilité des membranes artificielles.....	100
3.2.2. Test de perméabilité à l'albumine.....	100
3.2.3. Test d'adsorption-désorption	101
3.2.4. Évaluation de la cytotoxicité indirecte	102
3.2.5. Évaluation de la cytocompatibilité	103
3.2.6. Analyses statistiques.....	104
3.3. Résultats et discussion.....	104
3.3.1. Suturabilité des membranes artificielles	104
3.3.2. Évaluation de la perméabilité des membranes artificielles à l'albumine	105
3.3.3. Évaluation de la capacité d'adsorption-désorption des membranes artificielles..	107
3.3.4. Résumé des tests perméabilité et d'adsorption-désorption	107
3.3.5. Évaluation de la cytotoxicité par tests indirectes sur les cellules préostéoblastiques et angiogéniques	108
3.3.6. Évaluation de la cytocompatibilité sur les cellules préostéoblastiques et angiogéniques.....	110
3.3.7. Résumé : sélection des membranes artificielles pour évaluation <i>in vivo</i>	118
4. MISE EN PLACE D'UN MODÈLE <i>IN VIVO</i> DE DEFECT CRITIQUE FÉMORAL DE RAT ET ÉVALUATION <i>IN VIVO</i> DES MEMBRANES ARTIFICIELLES	120
4.1. Introduction	120
4.2. Matériel et méthodes	121
4.2.1. Protocole expérimental et conformité éthique.....	121
4.2.1.1. Mise en place du protocole éthique	121
4.2.1.2. Détermination du nombre d'animaux nécessaires	123
4.2.2. Mise en œuvre de la technique de membrane induite chez le rat.....	124
4.2.2.1. Procédure chirurgicale pour l'analyse de la membrane induite et la validation du modèle animal	124
4.2.2.2. Procédure chirurgicale pour l'évaluation et la comparaison de la consolidation osseuse entre la technique en 2 temps (TMI) et la technique en 1 temps (TMA).....	128
4.2.3. Analyse histologique des membranes induites des groupes TMI.....	131
4.2.4. Analyse radiologique et scanographique de la consolidation osseuse	134
4.2.5. Évaluation histologique de la consolidation après greffe osseuse en un ou deux temps	138
4.2.6. Statistiques	139
4.3. Résultats et discussion.....	140
4.3.1. Évaluation et adaptation du modèle de defect fémoral sur rat Sprague Dawley..	140
4.3.2. Résultats histologiques des membranes induites obtenues lors du 1 ^{er} temps de la	

technique	146
4.3.3. Résultats de l'analyse en immunofluorescence des MI du groupe contrôle	149
4.3.4. Résultats du modèle après réalisation du 2 ^e temps de la TMI du groupe contrôle et des groupes d'études TMA.....	154
4.3.5. Résultats radiologiques de la consolidation osseuse TMI <i>versus</i> TMA.....	157
4.3.6. Résultats histologiques de la consolidation des defects du groupe TMI.....	162
5. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS – PERSPECTIVES	166
6. BIBLIOGRAPHIE	173
ANNEXES	193

Résumé

Introduction : La technique de la membrane induite (TMI), initiée par Masquelet *et al.*, est considérée comme la référence en traitement des défauts osseux critiques. Cependant, elle nécessite plusieurs interventions chirurgicales, ce qui peut entraîner des taux de succès variables et est associée à des complications, notamment la résorption osseuse. Les objectifs majeurs de cette thèse étaient de concevoir des membranes artificielles (MA) permettant une greffe osseuse en un seul temps d'un défaut critique de membre, d'éprouver un modèle *in vivo* d'étude des défauts osseux critiques par comparaison de deux modes d'ostéosynthèse des défauts. La fiabilité clinique et radiographique des modèles ainsi que les caractéristiques de la membrane induite après implantation *in vivo* ont été comparées. Ce modèle a ensuite permis et de comparer la greffe osseuse du défaut par TMI en 2 temps et les MA. L'hypothèse principale était que ces MA autorisaient une greffe en un seul temps, avec un taux de consolidation radiologique égale ou même supérieur à une TMI.

Matériel et Méthode : Les MA étaient conçues par électrospinning du polyuréthane (PU) et/ou polyméthylméthacrylate (PMMA) et évaluées *in vitro*. Un modèle de défaut fémoral critique était réalisé sur des rats et 2 configurations d'ostéosynthèses étaient comparées par le biais d'analyses cliniques, radiographiques et histologiques. Puis, une greffe osseuse directe du défaut en un seul temps employant les MA était comparée à la TMI en 2 temps. Le critère de jugement principal était la comparaison de la consolidation radiologique à 8 et 12 semaines des défauts osseux entre le groupe contrôle et les groupes d'études (évaluation radiologique selon les scores de Guldberg et Lane-Sandhu, évaluation micro-scanographique selon le volume osseux (BV), volume de tissu (TV) et le ratio BV/TV).

Résultats : *In vitro*, le screening a permis d'isoler deux MA : une en PU à 100 % et l'autre à 50 % de PU/PMMA. Elles étaient constituées de nanofibres homogènes en microscopie électronique. Elles présentaient une surface hydrophobe (angle de contact moyen $110^\circ \pm 0,83^\circ$ et $130^\circ \pm 1,63^\circ$ respectivement, $p < 0,05$). Leur cytotoxicité était absente par méthode indirecte aux cellules MC3T3-E1 et HPMEC. Le modèle de défaut fémoral de rat validait la configuration d'ostéosynthèse par plaque de 1 mm d'épaisseur et 4 vis de 2 mm de diamètre. L'analyse *in vivo* de la consolidation radiographique à 8 semaines post-greffe retrouvait une consolidation supérieure des groupes d'études comparés au groupe contrôle sans différence statistiquement significative. Cette différence devenait significative à 12 semaines radiographiquement entre le groupe contrôle et le groupe MA en PU (score Guldberg $1,17 \pm 0,75$ et $1,89 \pm 0,33$, $p = 0,0276$; scores Lane-Sandhu $5,67 \pm 2,8$ et $9,3 \pm 0,5$, $p = 0,0193$) ainsi qu'à l'aide des analyses micro-CT :

(BV : $185,2 \pm 26,5 \text{ mm}^3$ vs $147,3 \pm 54,9 \text{ mm}^3$, $p=0,06$; TV : $284,8 \pm 48,3 \text{ mm}^3$ vs $212,4 \pm 90,7 \text{ mm}^3$, $p=0,036$). Cependant, le ratio BV/TV était similaire entre les 2 groupes ($65,3 \pm 3,0$ vs $70,8 \pm 6,1$, $p=0,22$).

Discussion et Conclusions : Les résultats principaux de cette thèse valident la conception de membranes artificielles électrofilées en PU \pm PMMA pour la greffe osseuse en un seul temps d'un defect fémoral critique sur modèle préclinique de rat sans engendrer de résorption osseuse. Ils soulignent le potentiel de ces MA pour simplifier la réparation des defects osseux, en réduisant la nécessité de requérir à de multiples interventions chirurgicales et en améliorant les résultats pour les patients. La fonctionnalisation de ces membranes permettrait une optimisation supplémentaire. Les travaux futurs devraient se concentrer sur l'optimisation de l'architecture des MA pour les rendre compatibles avec des modèles précliniques de plus grande taille de defects osseux critiques, ouvrant la voie à des applications translationnelles en médecine humaine.

Mots-clés : membrane induite ; régénération osseuse ; biomatériaux ; greffe osseuse ; membrane artificielle ; traumatologie osseuse

Abstract

Introduction: The Induced Membrane Technique (IMT), pioneered by Masquelet *et al.*, is considered the gold standard in treating critical bone defects. However, it requires multiple surgeries, which can have varying levels of success and is associated with complications, including bone resorption. The major objectives of this thesis were to design artificial membranes enabling one-step bone grafting of a critical limb defect, to validate an *in vivo* model for studying critical bone defects by comparing two types of osteosynthesis for these defects. The clinical and radiographic reliability of the models, as well as the characteristics of the induced membranes after *in vivo* implantation, were compared. This model then allowed for the comparison of bone grafting in the defect using the IMT (two stages) *versus* artificial membranes. The main hypothesis was that these artificial membranes would allow for one-step grafting with a higher rate of radiological consolidation compared to an induced membrane technique (IMT).

Materials and Methods: Artificial membranes were designed by electrospinning polyurethane (PU) and/or polymethyl methacrylate (PMMA) and evaluated *in vitro*. A critical femoral defect model was created in rats, and two osteosynthesis configurations were compared through clinical, radiographic, and histological analyses. Then, one-stage bone grafting of the defect using artificial membranes was compared to the classical two-step IMT. The primary endpoint was the comparison of radiological consolidation at 8 and 12 weeks between the control group and study groups (radiological assessment with Guldberg and Lane-Sandhu scores, micro-CT evaluating Bone Volume (BV), Tissue Volume (TV) and BV/TV ratio).

Results: *In vitro* screening isolated two artificial membranes: one made of 100% PU, and another composed of 50% PU/PMMA. They consisted of homogeneous nanofibers under electron microscopy and exhibited a hydrophobic surface (average water contact angle: $110^{\circ} \pm 0.83^{\circ}$ and $130^{\circ} \pm 1.63^{\circ}$, respectively, $p < 0.05$). Their cytotoxicity was absent according to the indirect method with MC3T3-E1 and HPMEC cells. The rat femoral defect model validated the osteosynthesis configuration using a 1 mm thick plate with four 2 mm diameter screws. *In vivo* radiographic analysis of consolidation at 8 weeks post-grafting showed superior consolidation in the study groups compared to the control group, though without significant differences. This difference became significant at 12 weeks between the control group and the polyurethane artificial membrane group (Guldberg score: 1.17 ± 0.75 vs. 1.89 ± 0.33 , $p = 0.0276$; Lane-Sandhu scores: 5.67 ± 2.8 vs. 9.3 ± 0.5 , $p = 0.0193$). Micro-CT analysis revealed that the PU group exhibited higher BV and TV compared to the control group (BV: $185.2 \pm 26.5 \text{ mm}^3$ vs. $147.3 \pm$

54.9 mm³, p=0.06; TV: 284.8 ± 48.3 mm³ vs. 212.4 ± 90.7 mm³, p=0.036). However, the BV/TV ratio remained similar between the two groups (65.3 ± 3.0 vs. 70.8 ± 6.1, p=0.22).

Discussion and Conclusions: The main results of this thesis demonstrated that electrospun PU and/or PMMA artificial membranes effectively support one-step bone grafting of critical femoral defects in a preclinical rat model, without causing bone resorption in the absence of an induced membrane. These membranes provide a promising alternative to the traditional two-stage IMT, reducing the need for multiple surgeries and improving bone consolidation. The functionalization of these membranes could represent an additional optimization strategy. Designing supportive architecture compatible with implantation in a large preclinical model could pave the way for the translational research application of these artificial membranes in *in vivo* models of large-scale critical bone defects.

Keywords: induced membrane, bone regeneration, bone graft, bone defect, artificial membrane, biomaterials.

Liste des Tableaux

Tableau 1. Propriétés et risques des différentes greffes osseuses, cartilagineuses, des substituts osseux et autres produits délivrés par une banque de tissus. (Source : *EMC P.-L. Docquier, T. Schubert*).

Tableau 2. Principaux substituts osseux phosphocalciques utilisés comme biomatériaux. (Source : *Ginebra et al. Bioceramics and bone healing. EFORT Open Rev. 2018 May 21;3(5):173-183. (48)*).

Tableau 3. Caractéristiques des modèles animaux et des études sur la régénération des defects segmentaires critiques des os longs.

Tableau 4. Résultats des essais d'électrospinning en fonction des ratios de polymères avec un ratio de solvant DMF/DMSO 50/50.

Tableau 5. Résultats des essais d'électrospinning en fonction des ratios de solvant.

Tableau 6. Diamètre des nanofibres des membranes artificielles élaborées à partir d'une solution de solvant DMF/DMSO 50/50.

Tableau 7. Hydrophilie de surface par technique de l'angle de contact de goutte des nanofibres des membranes artificielles élaborées à partir d'une solution de solvant DMF/DMSO 50/50.

Tableau 8. Comparaison des résultats aux essais de traction entre nos membranes artificielles et les données disponibles dans la littérature.

Tableau 9. Résultats des tests de perméabilité. Le calcul du ratio L/U (Lower/Upper) repose sur le ratio entre l'absorbance mesurée dans la chambre inférieure et celle de la chambre supérieure.

Tableau 10. Résultats du test d'adsorption-désorption.

Tableau 11. Score radiographique de Lane-Sandhu.

Tableau 12. Score histologique de Lane-Sandhu, d'après Meng *et al.*

Tableau 13. Comparaison du nombre d'échecs de stabilisation après TMI entre le groupe « plaques fines » et le groupe « plaques épaisses ».

Tableau 14. Résultats histomorphométriques comparant le groupe « plaques fines » et le groupe « plaques épaisses ».

Tableau 15. Évolution du poids des rats durant le suivi de l'étude. Poids exprimé en grammes.

Tableau 16. Résultats radiographiques de la consolidation à 8 semaines postopératoires.

Tableau 17. Résultats radiographiques à 12 semaines entre le groupe contrôle et le groupe PU100 %.

Tableau 18. Résultats scanographiques à 12 semaines entre le groupe contrôle et le groupe PU 100 %.

Liste des Figures

Figure 1. Les différents types de tissu osseux. Chaque os du squelette est composé de tissu osseux cortical et de tissu osseux trabéculaire. Les espaces entre les travées sont remplis par de la moelle hématopoïétique. 1. Tissu osseux trabéculaire ; 2. tissu osseux cortical ; 3. travées osseuses ; 4. espaces médullaires. (Source : EMC).

Figure 2. Composition de la matrice osseuse. La matrice organique du tissu osseux est composée principalement de fibrilles de collagène de type I, minéralisées par des cristaux d'hydroxyapatite faiblement cristalline et partiellement substituée. Des protéines non collagéniques, de l'eau et des lipides complètent cette matrice. 1. Fibrilles de collagène de type I ; 2. cristaux d'hydroxyapatite ; 3. molécule de collagène de type I. (Source : EMC).

Figure 3. Structure osseuse corticale et trabéculaire. (a) section à travers la tête fémorale montrant l'os cortical (C) et l'os spongieux (S) ; (b) vue élargie de l'os cortical en observation microscopique électronique révélant les ostéons (O), qui correspondent aux vaisseaux sanguins entourés d'os concentrique. (c) vue microscopique d'une travée osseuse spongieuse. La flèche en (b) et (c) montre une lacune ostéocytaire, là où des cellules osseuses préexistaient. (d) grossissement supérieur montrant l'organisation fibrillaire et lamellaire autour d'une lacune ostéocytaire (OC) visible en microscopie électronique à balayage (flèche blanche). Les lamelles sont formées d'un faisceau de fibrilles de collagène minéralisé. (Source Fratzl *et al.* Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nanocomposite in bone. Permission of use obtained without any modifications) (22).

Figure 4. Schéma des différentes séquences du remodelage osseux. (Source : EMC).

Figure 5. Schéma illustrant l'assemblage de fibrilles et de fibres de collagène et de cristaux minéraux osseux. Le motif périodique bien connu de 67 nm résulte de la présence de régions adjacentes de trous (40 nm) et de chevauchement (27 nm) des molécules assemblées. (From Rho *et al.* Mechanical properties and the hierarchical structure of bone) (23).

Figure 6. Diamond Concept de la consolidation des fractures (d'après Giannoudis *et al.*) (25).

Figure 7. Consolidation secondaire. (Source: Pfeiffenberger M, Damerou A, Lang AM, Buttgerit F, Hoff P, Gaber T. *Fracture healing research-shift towards in vitro modeling? Biomedicines* 2021;9(7):748.).

Figure 8. Consolidation osseuse primaire (corticale). (A) : 1, trait de fracture ; 2, coupe illustrée en B. (B) : 1, fracture ; 2, activité ostéoclastique ; 3, croissance vasculaire ; 4, trait de fracture ; 5, tissu ostéoïde ; 6, lamelle de l'os néoformé ; 7, ostéoblastes. Flèche : sens de progression du processus de consolidation. (Source EMC : *Biomécanique des os et application aux fractures.*)

Figure 9. Différence entre vis corticales et vis verrouillées en ostéosynthèse. Les vis conventionnelles dites « corticales » (à gauche) : avec la technique conventionnelle, le serrage des vis applique la plaque contre l'os. Le serrage des vis « colle » l'os à la face intérieure de la plaque. Les vis dites « verrouillées » (à droite) : les trous de la plaque et la tête de vis sont filetés. Lorsque la vis est serrée, le filetage de la tête s'engage dans le filetage de la plaque et bloque la vis sur la plaque sans comprimer la plaque contre l'os. Une fois la vis bloquée, la plaque ne peut plus se plaquer contre l'os d'où l'importance d'un positionnement optimal de la plaque avant

la mise en place des vis verrouillées. (Source : *AO Surgery reference*).

Figure 10. Principe de la décortication osseuse. (Source : *Judet R. Décortication ostéo-périostée. Actualité de Chirurgie Orthopédique de l'Hôpital Raymond Poincaré, Tome IV. Masson, Paris, 1965. Décortication ostéo-périostée de Robert Judet*).

Figure 11. Vue d'ensemble de la technique de membrane induite de Masquelet (TMIM) — étapes et possibles modifications. La TMIM est une procédure en deux étapes. Lors de la première, une chirurgie est réalisée pour retirer le tissu endommagé/altéré, fixer les moyens de stabilisation osseuse et implanter un espaceur en polyméthylméthacrylate (PMMA). Cette phase permet au corps de créer une membrane de réaction à corps étranger autour de l'espaceur, tout en pouvant être utilisée pour traiter des infections, effectuer des traitements post-réséction tumorale (chimiothérapie, par exemple), réparer des tissus mous ou transférer le patient dans un centre mieux équipé (d'un hôpital de campagne à un trauma center). Lors de la deuxième chirurgie, l'espaceur est retiré et la cavité formée est remplie de greffe osseuse morcelée. La guérison se poursuit au cours des mois suivants. Les deux étapes peuvent subir plusieurs modifications en fonction des conditions du patient et des préférences/expériences du chirurgien. À ce jour, il existe peu de preuves scientifiques solides pour étayer ces personnalisations dans le but d'optimiser les résultats individuels. (Source: *Alford AI, Nicolaou D, Hake M, McBride - Gagy S. Masquelet's Induced membrane technique: Review of current concepts and future directions. J Orthop Res. 2021;39:707-718.*) (3).

Figure 12. Techniques et groupes expérimentaux (A-D) dans l'étude de Klaue *et al.* (Source : *Klaue K, Knothe U, Anton C, Pfluger DH, Stoddart M, Masquelet AC, Perren SM. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep. Injury. 2009 Nov;40 Suppl 4:S95-102.*)(54).

Figure 13. Résultats des 4 groupes expérimentaux (A-D) dans l'étude de Klaue *et al.* (Source : *Klaue K, Knothe U, Anton C, Pfluger DH, Stoddart M, Masquelet AC, Perren SM. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep. Injury. 2009 Nov;40 Suppl 4:S95-102.*)(54).

Figure 14. Coloration H&E comparant les membranes prélevées au niveau des defects osseux (gauche) et dans des poches sous-cutanées (centre), 4 semaines après l'intervention. Le ciment PMMA est situé à droite de la membrane. Barres = 500 µm. Image de droite : localisation et expression du VEGF dans les membranes prélevées au niveau des defects osseux à 4 semaines après l'intervention. Barres = 100 µm. (Source : *Henrich D, Seebach C, Nau C, Basan S, Relja B, Wilhelm K, Schaible A, Frank J, Barker J, Marzi I. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. J Tissue Eng Regen Med. 2016 Oct;10(10):E382-E396.*) (57).

Figure 15. Images représentatives de la richesse en vascularisation de la membrane induite. a : L'image montre la membrane induite présentant une vascularisation abondante. b : Les résultats histologiques révèlent une formation riche en vaisseaux sanguins (coloration à l'hématoxyline-éosine). L'échelle indique 100 µm. (Source : *Niikura, T., Jimbo, N., Komatsu, M. et al. Histological analysis of induced membranes in patients whose bone defects were treated with the Masquelet technique to identify factors affecting the vascularity of induced membranes. J Orthop Surg Res 16, 248 (2021).*) (60).

Figure 16. Représentation schématique de l'activation et de la polarisation des macrophages.

Les macrophages classiquement polarisés (macrophages M1) sont activés par le LPS, l'IFN- γ et le TNF- α . Les macrophages M1 possèdent une forte activité microbicide, des fonctions immunostimulatrices et une cytotoxicité antitumorale. Les macrophages polarisés de manière alternative (macrophages M2) sont impliqués dans les processus anti-inflammatoires, la réparation tissulaire et la promotion tumorale. Les macrophages M2 se subdivisent en trois sous-types : M2a, M2b et M2c. Les interleukines IL-4 et IL-13 induisent systématiquement une polarisation en M2a. Les M2b sont activés par les complexes immuns (ICs), les récepteurs TLR ou l'IL-1ra. Enfin, les M2c sont polarisés par l'IL-10, le TGF- β ou les glucocorticoïdes. Chaque phénotype exprime un ensemble spécifique de cytokines, chimiokines et récepteurs. (Source : Navegantes, K.C., de Souza Gomes, R., Pereira, P.A.T. et al. *Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. J Transl Med* **15**, 36 (2017)). (64).

Figure 17. Évaluation de la répartition temporelle de la population macrophagique au cours de la consolidation d'une fracture par ostéotomie sur modèle murin. (Source : Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, et al (2018) *Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. Bone* **106**:78–89). (66).

Figure 18. Chronologie des événements conduisant au développement de la réaction à corps étranger suite à l'implantation d'un matériau dans l'organisme. La composition de la population cellulaire adhérant à la surface de l'implant évolue au fil du temps après l'implantation initiale. Les facteurs libérés par les cellules (indiqués en bleu) contribuent au recrutement d'autres cellules et à la progression de la réaction à corps étranger. ROS : espèces réactives de l'oxygène. (Source : Carnicer-Lombarte A, Chen ST, Malliaras GG, Barone DG. *Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics. Front Bioeng Biotechnol.* 2021, Apr 15;9:622524). (67).

Figure 19. Sous-types de polarisation des macrophages : différentes expressions de cytokines et fonctions des populations de macrophages *in vitro* et *in vivo*. (Source : Nikovics K, Durand M, Castellarin C, Burger J, Sicherre E, Collombet JM, Oger M, Holy X, Favier AL. *Macrophages Characterization in an Injured Bone Tissue. Biomedicines.* 2022 Jun 11;10(6):1385). (71).

Figure 20. Comportement mécanique du périoste ovin aux tests d'étirement sur fragment de périoste longitudinal (A) et circonférentiel (B) aux os longs. (Source : McBride *et al.*) (76).

Figure 21. Photographies opératoires d'un cas clinique de perte de substance osseuse humérale gauche, pris en charge dans le service d'orthopédie du CHU de Lille. Ce cas représente les problématiques rencontrées chez les patients atteints d'une perte de substance osseuse post-traumatique. Il s'agit d'un patient jeune, pris en charge pour fracture complexe humérale, initialement opérée par ostéosynthèse, ayant évolué en pseudarthrose. Plusieurs tentatives de cures de pseudarthroses ont été réalisées, mais se sont soldées par des échecs, rendant le prélèvement des crêtes iliaques impossible. Un 1^{er} temps de TMI est réalisé. (A) : Aspect après abord chirurgical latéral de l'humérus ; la MI est tenue par les pinces. (B) : Aspect après parage : le defect huméral dépasse 10 cm après excision des tissus osseux nécrotiques, la prise de greffon iliaque n'est plus possible chez ce patient devant les multiples chirurgies précédentes. (C) : La prise en charge consiste à prélever et impacter en bilboquet une fibula homolatérale au sein du defect. (D) : Montage final avec 2 plaques d'ostéosynthèse et la fibula en bilboquet dans la partie proximale et distale de l'humérus. Il ne persiste que la face médiale de la MI à la fin de l'intervention.

Figure 22. Structure d'un polyuréthane thermoplastique (Source BASF®).

Figure 23. Formule chimique du Polyméthylméthacrylate (PMMA).

Figure 24. Cahier des charges pour le développement d'une membrane artificielle de régénération osseuse.

Figure 25. Schéma du principe de l'électrospinning pour la fabrication des membranes artificielles.

Figure 26. Images MEB d'une MA en PU100 % (à gauche) et d'une MA en PU/PMMA 50/50 (v/v) (à droite) électrofilées avec un solvant DMF/DMSO 50/50 (v/v).

Figure 27. Schéma récapitulatif du test de perméabilité des membranes artificielles.

Figure 28. Membrane artificielle en PU100 % électrofilée à un ratio de solvant DMF/DMSO 50/50.

Figure 29. Suturabilité de membranes artificielles en PU électrofilée dans un solvant DMF/DMSO à un ratio de 50/50 (à gauche), et de membrane artificielle en PU électrofilée dans un ratio de solvant DMF80/DMSO20 (au centre et à droite). La variation des ratios de solvants influençait considérablement la manipulation des membranes artificielles.

Figure 30. Résultats de l'analyse de cytotoxicité sur cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 par la méthode indirecte pour les membranes électrofilées en PU100 % et PU/PMMA 50/50 avec un ratio de solvant de DMF/DMSO de 50/50.

Figure 31. Résultats de l'analyse de cytotoxicité sur cellules endothéliales HPMEC par la méthode indirecte pour les membranes électrofilées en PU100 % et PU/PMMA 50/50 avec un ratio de solvant de DMF/DMSO de 50/50.

Figure 32. Résultat du test de cytocompatibilité (viabilité cellulaire) sur cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 des MA en PU100 % et en PU/PMMA 50/50 à J3 et J6. * : $p < 0,05$ versus contrôle ; # : $p = 0,02365$ PU 100 *versus* PU/PMMA 50/50.

Figure 33. Résultat du test de cytocompatibilité (viabilité cellulaire) sur cellules endothéliales HPMEC des MA en PU100 % et en PU/PMMA 50/50 à J3 et J6. * : $p < 0,05$ versus contrôle ; # $p = 0,02365$ PU100 % versus PU/PMMA 50/50.

Figure 34. Résumé du processus décisionnel et sélection des membranes artificielles pour l'étude *in vivo*.

Figure 35. Schéma chronologique du protocole expérimental d'évaluation *in vivo* des membranes artificielles. TMI : Technique de la Membrane Induite ; TMA : Technique de la Membrane Artificielle.

Figure 36. Vue opératoire du positionnement et de la fixation d'une plaque de 0,6 mm d'épaisseur. Cette vue met en évidence la création du defect à l'aide d'une scie de Gigli. L'aide opératoire assure un contre-appui indispensable à l'aide d'un davier de Verbrugge.

Figure 37. Vues opératoires illustrant les étapes chirurgicales du positionnement d'une

plaque de 1 mm d'épaisseur dans le cadre de la technique de la membrane induite. (A) Exposition circonférentielle de la diaphyse fémorale avec un élévateur périostéal protégeant les structures médiales. (B) Fixation de la plaque à 4 trous et des 4 vis corticales. (C) Création du defect fémoral de 7 mm à l'aide d'une scie de Gigli. (D) Mise en place du ciment osseux avant la fermeture.

Figure 38. Prélèvement des MI autour de l'espaceur en PMMA : avant (à gauche) et après (à droite) le prélèvement.

Figure 39. Préparation de 2 vertèbres caudales : l'une fragmentée (à droite) et l'autre avant fragmentation (à gauche).

Figure 40. Deuxième temps de la TMI : à gauche, plaque en place avec greffe intégrée dans le defect, la membrane est tenue par 2 pinces ; à droite, membrane reposée sur la greffe avant fermeture.

Figure 41. Photographie peropératoire d'une TMA avec une MA en PU/PMMA 50/50 entourant la greffe osseuse située dans le defect.

Figure 42. Prélèvement du fémur après euthanasie et radiographies pour réalisation des analyses micro-scanographiques et histologiques, 12 semaines après le 2^e temps de TMI du groupe contrôle.

Figure 43. Defect osseux greffé, prélevé avec matériel d'ostéosynthèse retiré, pour analyse micro-scanographique. Le volume d'intérêt correspond à la zone située entre les 2 vis les plus proches du defect greffé.

Figure 44. Prélèvement d'un fémur du groupe PU100 %. À gauche, fémur en bloc avec visualisation de la plaque et de la membrane artificielle encore en place. À droite, fémur préparé après ablation de la plaque. La membrane artificielle est recouverte d'un fin tissu réactionnel, pouvant correspondre à une réaction à corps étranger (P = Proximal, D = Distal).

Figure 45. Évolution du poids des 9 rats du groupe « plaques fines » de la TMI.

Figure 46. Radiographies des fémurs du groupe « plaques fines », réalisée à 1 semaine postopératoire. À gauche : ostéosynthèse stable ; à droite : rupture de plaque.

Figure 47. Photographies peropératoires à 4 semaines, après le 1^{er} temps de TMI. (A) : vue peropératoire illustrant une membrane induite recouvrant entièrement le ciment en PMMA. (B) : vue peropératoire en cas d'échec de l'ostéosynthèse, avec un tissu pseudotumoral hyperprolifératif.

Figure 48. Radiographie de profil d'une plaque de 1 mm d'épaisseur et des vis de Ø 2 mm, réalisée à 1 semaine postopératoire.

Figure 49. Évaluation histologique avec coloration de Masson-Trichrome (A) d'une membrane induite bien organisée et (B) d'une prolifération fibroblastique trouvée en cas d'échec. *: zone de l'espaceur en PMMA.

Figure 50. Analyse en immunofluorescence des macrophages M1 et M2 au sein de la membrane induite de deux échantillons de notre étude. Les macrophages M1 présentaient une

fluorescence verte spécifique (CD68⁺), tandis que les macrophages M2 affichaient une double immunofluorescence verte et rouge (CD68⁺ et CD206⁺). Les cellules satellites exprimaient uniquement le marqueur CD206, avec une fluorescence rouge. * : zone du ciment en PMMA.

Figure 51. Immunomarquage du BMP-2 sur coupes histologiques de 2 membranes induites de notre étude. L'image en bas présente un grossissement plus important. * : zone de l'espaceur en PMMA.

Figure 52. Immunofluorescence CD31⁺ de deux membranes induites de notre étude. Les vaisseaux étaient répartis préférentiellement dans la couche externe de la MI. L'image à droite présente un grossissement plus important. * : zone de l'espaceur en PMMA.

Figure 53. Évolution du poids des rats pour la TMI en 2 temps. Poids exprimé en grammes. Parmi les 10 rats du groupe contrôle, 6 ont atteint la durée totale de l'étude (12 semaines après le 2^e temps).

Figure 54. Évolution du poids des rats pour le groupe PU100 %. Poids exprimé en grammes. Aucun rat n'a atteint de point limite durant toute la durée du suivi.

Figure 55. Évolution du poids des rats pour le groupe PU/PMMA 50/50. Poids exprimé en grammes. Aucun rat n'a atteint de point limite durant toute la durée du suivi. Graphique arrêté à 8 semaines postopératoires (données à 12 semaines non disponibles à la finalisation du manuscrit).

Figure 56. Radiographies à 8 semaines du groupe contrôle TMI. À gauche : bonne consolidation du fémur ; à droite : consolidation minimale avec risque de non-consolidation.

Figure 57. Radiographie de face de profil du fémur d'un rat du groupe TMA avec PU100 % à 8 semaines. Les radiographies révèlent une consolidation complète du defect.

Figure 58. Coupe micro-scanographique 2D (à gauche) et reconstruction 3D d'un defect du groupe PU100 % consolidé (à droite).

Figure 59. Coupes histologiques à grossissements croissants d'un defect du groupe contrôle en cours de consolidation à 12 semaines en coloration HE (A, B, C) et MT (D, E, F). À la jonction entre le defect et l'os natif, une intense activité ostéoblastique est observée, caractérisée par des cellules de forme cubique avec noyau central large (ostéoblastes, flèches blanches) en coloration HE. Des zones comportant du collagène minéralisé (rouge vif, étoiles blanches) sont visibles en coloration MT, particulièrement dans la zone transitionnelle entre la greffe et l'os natif. Ces zones sont associées à des larges zones en cours de remodelage ostéocondral.

Abréviations

Ac : Anti-corps

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

ES : Electrospinning

MA : Membrane Artificielle

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MI : Membrane Induite

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PU : Polyuréthane

PMMA : Polyméthylmethacrylate

SD : Sprague-Dawley

TMI : Technique de la membrane induite

TMA : Technique de la membrane artificielle

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

WCA : Water Contact Angle

Remerciements

Je remercie le CHU de Lille et notamment la Direction de la Recherche et le l'Innovation pour leur soutien financier via l'obtention du Fonds Émergence et Structuration des Activités de Recherches 2023. Ce soutien a été crucial et déterminant pour la mise en place de cette thématique de recherche et son aboutissement.

Je tiens à remercier la Plateforme Ressources Expérimentales, D.H.U.R.E, Université de Lille, pour leur soutien apporté lors des études animales. L'ensemble des personnes de cette équipe m'ont permis de réaliser la partie la plus importante de ce travail, avec bonne humeur, disponibilité et professionnalisme. Leurs précieux conseils et leur aide à chaque étape de ce travail m'ont permis de le mener à bien.

Je remercie également les Plateformes Lilloises en Biologie et Santé (PLBS) - UAR 2014 - US 41 pour leur soutien aux études histologiques ainsi que l'UR4490 MABLab (Marrow Adiposity and Bone Laboratory) pour leur aide et disponibilité pour les études micro-scanographiques.

Je remercie l'Unité Matériaux et Transformations (UMET) (CNRS UMR 8207) de l'Université de Lille pour leur soutien et leur aide dans l'élaboration et la caractérisation *in vitro* des membranes artificielles développées dans ce travail. Je vous remercie de m'avoir accueilli également en stage de Master 1 et Master 2, puis d'avoir participé à ce projet au cours de cette thèse.

Enfin, je remercie l'Unité INSERM U1008 ADDS (Advanced Drug Delivery Systems) pour leur accueil depuis ma première année de Master jusqu'à la fin de ce travail de thèse. J'espère poursuivre le développement de cette thématique de recherche passionnante qu'est la régénération osseuse. Chaque personne constituant cette équipe m'a permis de mettre une pierre à l'édifice de ce projet, à chaque étape le constituant. Sans elles, ce projet n'aurait pas pu aboutir et je voulais vous remercier vivement pour votre aide et votre soutien.

1. INTRODUCTION

En chirurgie orthopédique et traumatologique osseuse, l'une des problématiques les plus fréquemment rencontrées en pratique clinique est la gestion d'une perte de substance osseuse dite « critique ». Cette perte du stock osseux rompt la continuité du squelette osseux indispensable à la fonction d'un membre. Les situations cliniques exposant à cette problématique sont variées, mais le contexte post-traumatique est le plus fréquent (1–3). D'autres cas incluent les infections osseuses (4), les cancers osseux qui peuvent requérir une résection osseuse étendue pour assurer la guérison, et enfin les pathologies congénitales (pseudarthroses congénitales du tibia par exemple (5)). C'est aussi une problématique prévalente en chirurgie maxillo-faciale.

Actuellement, lorsque ces pertes de substances osseuses ne peuvent pas être traitées par une greffe osseuse isolée, plusieurs techniques peuvent être employées, comme les greffons vascularisés, la technique d'ostéogénèse par distraction et la technique de la membrane induite (TMI). C'est une technique chirurgicale en deux temps avec implantation initiale d'un ciment au sein du defect osseux, puis une greffe osseuse réalisée quelques semaines plus tard lors de l'ablation du ciment. Cette greffe est placée dans le defect fémoral, entourée d'une membrane de réaction à corps étranger, appelée « membrane induite » par le ciment.

Cette technique présente l'avantage d'être relativement simple comparée aux greffes microvascularisées ou aux techniques d'ostéogénèse par distraction. Elle est efficace dans la prise en charge des patients présentant une perte de substance osseuse critique, mais n'est pas exempte de défis en chirurgie orthopédique. Il s'agit d'un protocole en deux étapes espacées de plusieurs semaines (en moyenne 10,85 semaines pour Mi *et al.* (1)). La formation de la membrane induite prend du temps et sa qualité varie. Les récents résultats analysant les caractéristiques de la MI confirment bien qu'une réaction à corps étranger médiée par les macrophages et leur sécrétion de facteurs de croissance est capitale pour la formation de cette membrane.

En raison de l'environnement orthopédique et traumatologique, une grande précaution est nécessaire lors des manipulations de cette membrane. Ceci n'est pas toujours faisable, et certaines chirurgies complexes peuvent la rendre trop fragile pour assurer une réussite de la TMI. Il est donc crucial d'améliorer cette technique en la réduisant à une seule intervention chirurgicale et en garantissant une qualité constante de la membrane.

Ainsi l'un des objectifs majeurs de cette thèse est de concevoir des membranes artificielles

permettant une chirurgie en une seule étape, tout en maintenant la réaction à corps étranger et en assurant une maniabilité optimale en chirurgie. Le second objectif est d'établir un modèle de defect osseux critique fémoral chez le rat Sprague-Dawley dans notre unité de recherche pour évaluer la TMI et les membranes artificielles (MA). En effet, l'évaluation *in vivo* reste à l'heure actuelle un prérequis indispensable à toute étude préclinique en vue d'une éventuelle application sur un modèle de gros animal en cas de succès.

Pour valider ce modèle préclinique de TMI, un defect fémoral critique a été créé chez des rats, et deux configurations d'ostéosynthèses ont été comparées radiologiquement, cliniquement et histologiquement afin de sélectionner la configuration la plus performante en termes de stabilité fémorale et de qualité de la MI. L'hypothèse posée était que la stabilité fémorale influe directement sur la qualité de la MI, impactant ainsi le modèle animal. Une fois ce modèle animal validé, l'objectif suivant a été d'évaluer *in vivo* la consolidation de ce defect fémoral, qui correspondait ainsi au 3^e objectif majeur de cette thèse. Une technique en une seule étape utilisant des membranes artificielles (TMA) et une greffe osseuse directe du defect a été comparée à une TMI classique en deux temps. L'hypothèse principale de ce 3^e objectif était que les membranes artificielles permettraient une greffe en seule intervention avec un taux de consolidation radiologique égale ou supérieure à celui de la TMI. Les objectifs secondaires incluaient l'étude comparative des caractéristiques des membranes induites et des membranes artificielles après implantation *in vivo*, par des analyses histologiques, immunohistochimiques et d'immunofluorescence.

2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Histologie, cytologie et physiologie de l'os normal

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé constitué d'une matrice organique riche en collagène de type 1, minéralisé par du phosphate et du calcium. C'est un tissu en renouvellement permanent par les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes et les ostéoclastes spécialisés dans la résorption osseuse. Les os sont composés du tissu osseux (25 à 30 % de l'os) et de la moelle osseuse hématopoïétique. Ce même tissu osseux est organisé en une zone dense : la corticale osseuse et une zone centrale trabéculaire. La moelle osseuse est localisée au sein des travées osseuses.

2.1.1. Organisation de la matrice osseuse

Matrice organique

La matrice osseuse est une matrice organique extracellulaire contenant des protéines minéralisées par phosphate de calcium. Cette matrice organique représente 35-40 % de la matrice osseuse et est constituée majoritairement de collagène de type 1 (85 à 90 %). C'est le collagène qui donne au tissu osseux ses propriétés élastiques. D'autres protéines collagéniques sont présentes en quantité minime : collagène type III, V et X et permettent de réguler le diamètre des fibrilles de collagène de type I (Figures 1 et 2).

Les protéines non collagéniques (albumine, protéoglycanes, protéines glycosylées, facteurs de croissance comme le TGF- β , les BMP *etc.*) sont extrêmement variées, mais ont pour rôle d'organiser la matrice osseuse, et les interactions entre les différents composants cellulaires et minéraux (6). Certaines sont spécifiques du tissu osseux, comme l'ostéocalcine qui représente 20 % des protéines non collagéniques est dosable dans la circulation sanguine et présente un rythme circadien (pic nocturne). Son dosage permet d'analyser le niveau de remodelage osseux. Elle a de multiples rôles : augmentation de cellules β du pancréas, maintien de la masse musculaire, production de testostérone et régulation de la fertilité masculine. Elle participe à l'inhibition de la formation osseuse via une attraction des précurseurs des ostéoclastes. L'ostéonectine représente 20 % des protéines non collagéniques, mais n'est pas spécifique du tissu osseux. Elle est impliquée dans la mise en place du réseau fibrillaire du collagène et la minéralisation.

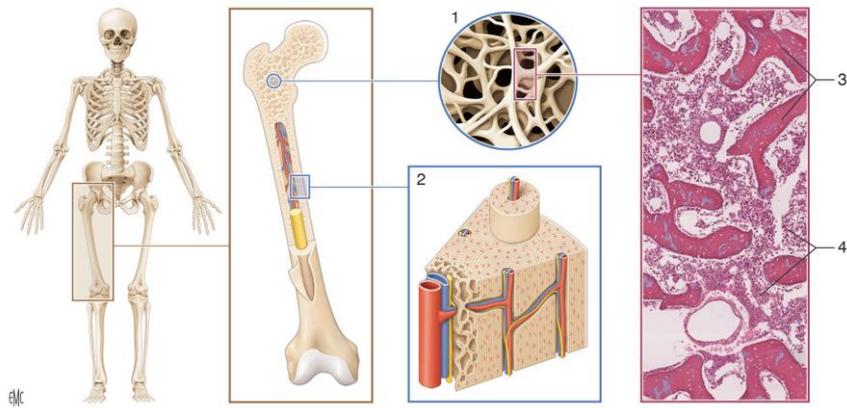


Figure 1. Les différents types de tissu osseux. Chaque os du squelette est composé de tissu osseux cortical et de tissu osseux trabéculaire. Les espaces entre les travées sont remplis par de la moelle hématopoïétique. 1. Tissu osseux trabéculaire ; 2. tissu osseux cortical ; 3. travées osseuses ; 4. espaces médullaires. (Source : EMC).

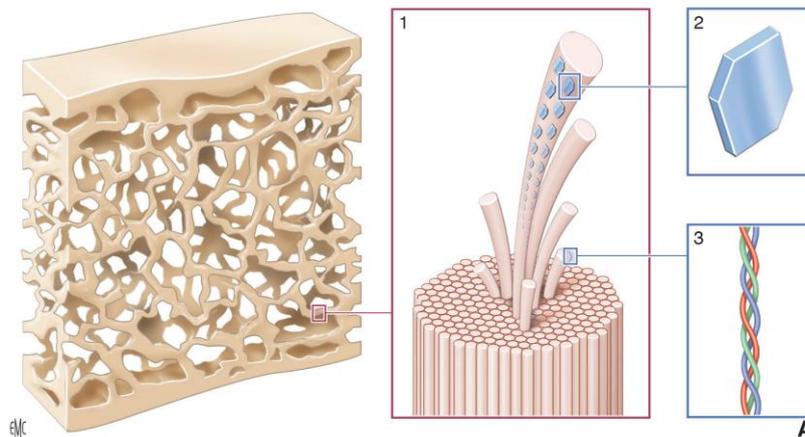


Figure 2. Composition de la matrice osseuse. La matrice organique du tissu osseux est composée principalement de fibrilles de collagène de type I, minéralisées par des cristaux d'hydroxyapatite faiblement cristalline et partiellement substituée. Des protéines non collagéniques, de l'eau et des lipides complètent cette matrice. 1. Fibres de collagène de type I ; 2. cristaux d'hydroxyapatite ; 3. molécule de collagène de type I. (Source : EMC).

Minéral osseux

Constitué d'hydroxyapatite $[Ca_{8,3}(PO_4)_{4,3}(CO_3)_x(HPO_4)_y(OH)_{0,3}]$ à 35-45 %, elle-même substituée par du carbonate (CO_3^{2-}) et hydrogénophosphate HPO_4^{2-} ou d'autres éléments plus rarement. Le rapport Ca/P est inférieur à 1,67. La fonction principale est bien sûr de renforcer la matrice collagénique et de servir de réservoir d'ions Ca^{2+} , PO_4^{3-} , et Mg^{2+} notamment.

Eau

Elle constitue 15 à 25 % du volume de la matrice osseuse et remplit les espaces libres entre la matrice organique et le minéral osseux. Cette eau peut se déplacer au sein de l'architecture osseuse en fonction des contraintes qui lui sont imposées.

2.1.2. Structure osseuse

La structure osseuse correspond à l'organisation et l'agencement des fibrilles de collagène de type 1 de la matrice organique. Deux organisations sont retrouvées (Figure 3) :

- l'organisation lamellaire où un ensemble de microfibrilles forment des lamelles orientées dans la même direction. Les lamelles sont donc superposées entre elles et l'organisation des microfibrilles au sein de chaque lamelle diffère d'une lamelle à l'autre (aspect stratifié), ce qui est visible en observation en lumière polarisée. Ceci confère un avantage mécanique en limitant la propagation des microfractures pouvant avoir lieu dans la matrice osseuse (os secondaire).
- l'organisation non lamellaire : ici il n'y a pas de formation de lamelles, les microfibrilles étant organisées aléatoirement. Elle est retrouvée lors du développement osseux fœtal normal, mais également dans les cals osseux des fractures (os primaire).

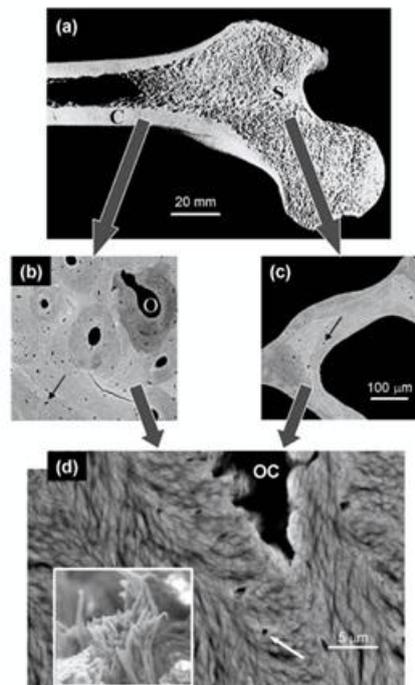


Figure 3. Structure osseuse corticale et trabéculaire. (a) section à travers la tête fémorale montrant l'os cortical (C) et l'os spongieux (S) ; (b) vue élargie de l'os cortical en observation microscopique électronique révélant les ostéons (O), qui correspondent aux vaisseaux sanguins entourés d'os concentrique. (c) vue microscopique d'une travée osseuse spongieuse. La flèche en (b) et (c) montre une lacune ostéocytaire, là où des cellules osseuses préexistaient. (d) grossissement supérieur montrant l'organisation fibrillaire et lamellaire autour d'une lacune ostéocytaire (OC) visible en microscopie électronique à balayage (flèche blanche). Les lamelles sont formées d'un faisceau de fibrilles de collagène minéralisé. (Source Fratzl *et al.* Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nanocomposite in bone. Permission of use obtained without any modifications) (22).

2.1.2.1. Architecture de l'os cortical

L'os cortical (80 % du squelette osseux adulte) est organisé en trois zones, d'externe en interne :

- Le tissu osseux périostique : les lamelles ont une organisation typique concentrique.
- Le tissu osseux haversien représentant la majorité de la corticale osseuse. L'organisation de ce tissu consiste en plusieurs unités de forme cylindriques de 200 à 300 μm de diamètre appelés ostéons. Ces ostéons sont une unité de 10 à 15 lamelles de 3 à 7 μm d'épaisseur chacune et sont également organisés en forme concentrique. Au centre de cette unité ostéonale est situé un canal appelé canal de Havers de 50 μm de diamètre. Ces canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux obliques de Volkmann. Ces canaux sont en fait constitués de tissu conjonctif lâche à la fois innervé et vascularisé et servent de point d'initiation du remodelage de l'ostéon. Par ailleurs, ces canaux de Volkmann se jettent dans la cavité médullaire via le tissu osseux endostéal. Chaque ostéon est considéré comme une unité indépendante des autres ostéons et sont séparés à leur périphérie par une ligne cimentante. Ces ostéons sont juxtaposés les uns à côté des autres et forment des colonnes, organisées en fonction des forces subies par l'os. Dans un os long, elles sont longitudinales au grand axe de l'os.
- Le tissu osseux endostéal est situé au centre de l'os au contact de la cavité médullaire. Dans ce tissu, les lamelles sont disposées concentriquement également, mais à la cavité médullaire. Elles se poursuivent par le tissu osseux trabéculaire.

2.1.2.2. Architecture de l'os trabéculaire

L'os trabéculaire prolonge le tissu endostéal et constitue 20 % du squelette osseux adulte. Ici, les lamelles ont une organisation en croissants (ou hémioostéons) disposés circulairement à la moelle osseuse. Ces unités trabéculaires sont aussi organisées indépendamment les unes des autres et séparées par une ligne cimentante entre elles. Elles forment des plaques connectées entre elles par des piliers, l'ensemble étant similaire à un échafaudage (7). Cette confluence d'unités trabéculaires appelées plaques sont résistantes mécaniquement et sont alignées sur les lignes de contraintes appliquées à l'os. Les piliers connectent les plaques entre elles et renforcent la cohésion. La moelle osseuse comble l'espace entre plaques et piliers. Cette architecture osseuse est localisée dans les épiphyses et métaphyses des os longs et dans les os courts, comme les corps vertébraux. Son organisation est anisotrope et permet une bonne résistance aux contraintes mécaniques auxquelles elle est soumise, notamment en compression.

2.1.3. Cellules osseuses

Les cellules constituant l'os sont responsables de la formation du tissu osseux : ostéoblastes et de la résorption osseuse : ostéoclastes.

2.1.3.1. *Les ostéoblastes*

Ils dérivent des cellules souches mésenchymateuses principalement, mais d'autres origines cellulaires ont été identifiées en fonction du stade et de la localisation du développement osseux (chondrocytes hypertrophiques, zone quiescente de la plaque de croissance) (8–14). C'est une cellule mononucléée cubique formant une nappe monocellulaire (4 à 6 % des cellules osseuses) dans les cavités creusées (ostéoplastes) par les ostéoclastes et formant une nouvelle matrice osseuse qui sera ensuite minéralisée. Ainsi, les ostéoblastes synthétisent les protéines collagéniques, mais aussi non collagéniques du tissu osseux qui seront ensuite minéralisées (par l'enzyme phosphatase alcaline à la surface des ostéoblastes). Ses organites intracellulaires sont très développés, confirmant son rôle de synthèse protéique intense. Son rôle principal est en effet d'élaborer la matrice organique et de débiter sa minéralisation. Les ostéoblastes deviennent soit des ostéocytes après avoir initié la minéralisation osseuse ou deviennent des cellules bordantes délimitant la zone entre l'os et la moelle osseuse. Leur prolifération et différenciation est majoritairement sous le contrôle du facteur transcriptionnel Runx2 (Runt-related transcription factor 2) qui joue un réel rôle de chef d'orchestre de la formation osseuse et dont l'activité est régulée par de nombreux autres facteurs afin d'assurer l'équilibre entre formation et résorption osseuse (15).

2.1.3.2. *Les ostéocytes*

Ce sont des cellules mononucléées à corps ovoïde de 30-40 µm de grand axe sur 10-15 µm de large. Elles représentent 90 % des cellules osseuses. Les organites intracellulaires sont moins développés que dans l'ostéoblaste. Ils sont situés dans des logettes dans la matrice osseuse appelées ostéoplastes. Ces cellules forment de nombreux prolongements cytoplasmiques permettant d'établir des jonctions communicantes avec des ostéocytes voisins, mais aussi avec les ostéoblastes. Ces nombreuses connexions intercellulaires leur confèrent un rôle de « mécanosenseurs », capables de transformer les stimuli mécaniques en signaux biologiques. Ils participent au remodelage osseux en sécrétant des facteurs de différenciation des ostéoblastes, mais aussi des facteurs influençant l'activité des ostéoclastes (RANKL, TNF α ; IL6 ...) (16).

2.1.3.3. Cellules bordantes

Elles correspondent à des ostéoblastes au repos et ont une forme aplatie, leur activité de synthèse protéique est très faible. Elles restent cependant connectées aux ostéocytes et ostéoblastes par des jonctions communicantes.

2.1.3.4. Ostéoclastes

C'est une cellule multinucléée et volumineuse (50 à 150 μm) de forme variable en fonction de sa localisation. Leur cytoplasme possède des lysosomes qui permettent de détecter ces cellules en immunohistochimie par la mise en évidence de l'enzyme lysosomale TRAP (Tartrate Resistant Acid Phosphatase). Son rôle principal est la résorption localisée du tissu osseux.

2.1.4. Physiologie du tissu osseux

L'os présente de multiples fonctions, dont certaines sont bien connues et d'autres beaucoup moins :

- Un rôle de protection des organes nobles (système nerveux central, poumons, cœur ...)
- Un rôle de locomotion à l'aide du système ostéo-articulaire et musculaire permise grâce à son organisation histologique
- Un rôle d'homéostasie phosphocalcique puisque le squelette est le principal réservoir de calcium et de phosphate du corps humain et mis à disposition en fonction des signaux métaboliques
- Contient la moelle osseuse, riche en cellules souches et responsables de l'hématopoïèse
- Un rôle endocrinien, beaucoup moins connu, mais sous une dépendance cérébrale et neurovasculaire interagissant avec les organes de la reproduction, mais aussi de la régulation de la satiété (pancréas)

2.1.4.1. Vascularisation et innervation du tissu osseux

Les gros vaisseaux sont surtout localisés dans le périoste et sont répartis dans l'os cortical et spongieux par des foramens permettant leur pénétration intraosseuse. Cette vascularisation utilise les canaux de Havers et de Volkmann. Ainsi, toute la structure osseuse adulte est vascularisée. De même, le tissu osseux est innervé notamment dans le périoste, la métaphyse et les épiphyses par des fibres sensibles et autonomes du système sympathique au contact des cellules osseuses (17).

2.1.4.2. Remodelage osseux normal

Le remodelage osseux a lieu afin de permettre la régulation du métabolisme phosphocalcique et l'adaptation aux contraintes mécaniques et aux signaux hormonaux. Ce remodelage osseux a lieu dans les unités cellulaires osseuses (ostéons) et comprend une phase de résorption d'une durée de 3 semaines environ, puis une phase de formation osseuse durant 3 à 4 mois. Ainsi, chez l'adulte, 5 à 10 % du squelette serait remplacé tous les ans, l'os spongieux serait renouvelé tous les 4 à 5 ans et l'ensemble de l'os cortical tous les 10 ans (18,19). Lors du remodelage, les cellules bordantes se rétractent, entraînant la dégradation de la matrice collagénique sous-jacente et attirant les préostéoclastes. Ces préostéoclastes fusionnent pour former les ostéoclastes qui vont dégrader la matrice osseuse, ce qui correspond à la phase de résorption qui aboutit à la formation d'une lacune. Puis les ostéoclastes sont remplacés par des cellules de type macrophagiques avec dépôt de la ligne cémentante au fond de la lacune qui va séparer l'os ancien de l'os en cours de renouvellement. Arrivent ensuite les ostéoblastes qui déposent le tissu osseux initialement non minéralisé, via leur activité de synthèse protéique intense. Puis ce tissu se minéralise. Ainsi l'os nouveau est formé et correspond à l'ostéon. Au total, ce cycle de remodelage dure 3 à 6 mois. L'accumulation d'hydroxyapatite correspond à la minéralisation secondaire, qui a lieu lors de la phase de quiescence (dernière phase du remodelage osseux) (Figure 4). L'initiation de ce remodelage est provoquée par les contraintes à la fois mécaniques, mais aussi par des facteurs hormonaux et se résume selon la loi de Wolff (1892) : l'os se forme et se résorbe en fonction des contraintes qu'il subit, impliquant de nombreux régulateurs et marqueurs biologiques (20,21).

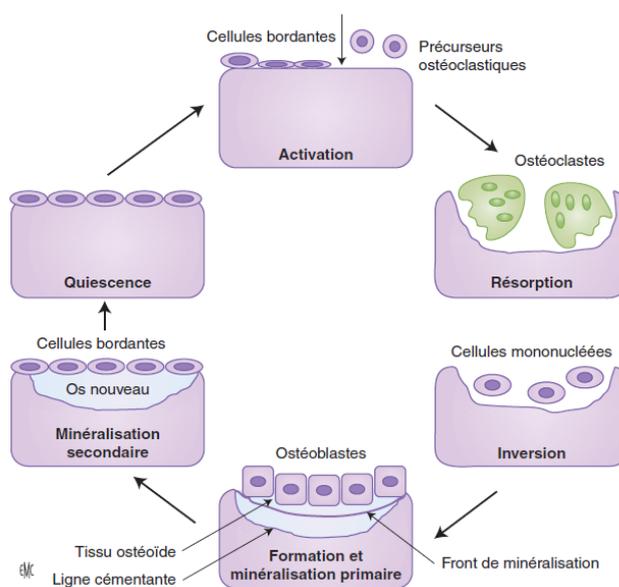


Figure 4. Schéma des différentes séquences du remodelage osseux. (Source : EMC).

2.1.5. Biomécanique du tissu osseux

L'os est un système capable de réparation, d'adaptation aux contraintes mécaniques et aux sollicitations hormonales grâce au remodelage osseux. La base de la constitution de l'os repose sur les monomères de collagènes (tropocollagène) qui se lient longitudinalement pour former des microfibrilles (1 nm de diamètre). Entre ces microfibrilles se fixent les cristaux d'hydroxyapatite en plaquettes de quelques nanomètres d'épaisseur, résultant en une fibrille minéralisée de collagène de 50 nm de diamètre (Figure 5). La plus grande dimension des cristaux est alignée avec l'axe des fibrilles de collagène. Ces fibrilles s'assemblent en faisceaux et 150 à 250 nm. Ces faisceaux ont une organisation anisotrope, permettant une plus grande résistance mécanique, car elle varie avec la direction appliquée à la contrainte (22,23). Ces fibres de collagène s'assemblent pour former des lamelles de 3 à 7 µm d'épaisseur qui sont organisés différemment en fonction de la localisation corticale (ostéons) ou spongieuse (hémiostéons).

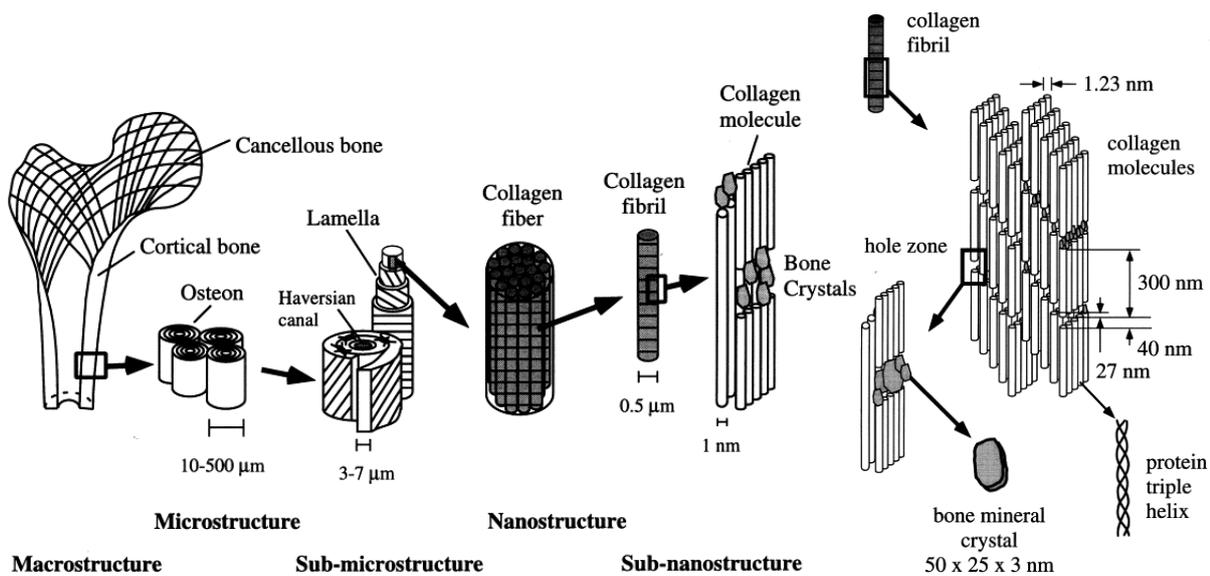


Figure 5. Schéma illustrant l'assemblage de fibrilles et de fibres de collagène et de cristaux minéraux osseux. Le motif périodique bien connu de 67 nm résulte de la présence de régions adjacentes de trous (40 nm) et de chevauchement (27 nm) des molécules assemblées. (From Rho *et al.* Mechanical properties and the hierarchical structure of bone) (23).

Pour déterminer les caractéristiques mécaniques de l'os, les principaux tests employés sont des essais de compression, de traction, de torsion ou de flexion permettant de déterminer un module d'Young, une déformation ou une contrainte à rupture et une limite d'élasticité (24). Lors d'un essai de type contrainte/déformation, l'os se déforme initialement de façon élastique. Si l'on

dépasse le seuil (en franchissant la limite d'élasticité), l'os va avoir un comportement plastique (non réversible) du fait de phénomènes d'endommagement micro-architecturaux. Cette déformation augmente de façon non linéaire jusqu'à la rupture. La vitesse de la contrainte appliquée a également son importance et induit une modification du comportement osseux. En effet, plus la vitesse de la contrainte est importante, plus l'os est rigide et peut être fragile à haute vitesse, par stockage d'une force plus importante avant rupture (comportement viscoélastique). À faible vitesse, une partie de l'énergie stockée est dissipée, entraînant moins de dommages osseux. Cela explique par exemple qu'en pratique clinique, un traumatisme à haute énergie induit une fracture dite comminutive ou « fracas osseux » en comparaison à des traumatismes à basse énergie responsable des fractures moins graves et ayant un trait de fracture relativement simple. Pour des contraintes en dessous du seuil d'élasticité, les répétitions anormales de ces contraintes peuvent aboutir à des fissurations qui se propagent jusqu'à la fracture (cas des fractures de fatigues des sportifs, par exemple). Les contraintes appliquées à trop haute fréquence ne permettent pas l'adaptation et la réparation par phénomène de remodelage.

2.2. Fractures osseuses : consolidation et moyens de prise en charge.

L'os est donc un tissu vivant dont les propriétés mécaniques sont issues d'une association entre sa macrostructure et sa microarchitecture. Comme vu précédemment, les contraintes qui lui sont appliquées entraînent une déformation élastique puis plastique avant rupture. Les caractéristiques de la contrainte appliquée, notamment sa force et sa vitesse vont influencer le comportement mécanique de l'os comme cela se traduit en pratique clinique. En effet, les fractures osseuses traduisent le dépassement du seuil de contrainte osseux. L'énergie du traumatisme va directement influencer le type de fracture (du trait simple à la fracture comminutive en plusieurs fragments). De même, l'état du stock osseux (patient jeune, âgé, présence d'une ostéoporose...) peut engendrer une fracture plus ou moins grave et complexe à prendre en charge. En cas de fracture, l'os possède la propriété de pouvoir consolider : plusieurs semaines voire plusieurs mois seront nécessaires pour obtenir une qualité mécanique suffisante, plusieurs années permettront d'obtenir une restitution anatomique de l'os. Cette consolidation permet de restaurer la continuité osseuse et va être étudiée ci-dessous.

2.2.1. Biologie de la consolidation osseuse

2.2.1.1. Consolidation des fractures : généralités

Le processus de consolidation a lieu instantanément après une fracture. Ce processus de réparation tissulaire aboutit dans la majorité des cas à la restitution *ad integrum* du segment osseux fracturé. La consolidation peut être mise en échec et aboutir à un retard de consolidation, voire une pseudarthrose qui peut nécessiter une intervention chirurgicale. Celle-ci est définie par l'absence de consolidation d'une fracture à 6 mois chez l'homme.

La consolidation requiert en effet plusieurs éléments importants pour aboutir à savoir la stabilité mécanique de la fracture et de sa fixation, l'environnement biologique, la vascularisation de la fracture et les comorbidités associées du patient. Ces éléments sont repris dans le Diamond Concept (Figure 6) développé par Giannoudis *et al.* (25). Ce concept montre l'importance des médiateurs ostéoinductifs : l'hématome fracturaire puisqu'il contient des plaquettes et des macrophages qui sécrètent des cytokines proinflammatoires permettant de débiter le processus de consolidation : interleukines 1, 6, 8, 10 et 12, TNF α , protéine C activée, protéine chimioattractive des monocytes (MCP), facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF), récepteur activateur du facteur nucléaire B ligand (RANKL) et ostéoprotégérine (OPG).

Nous retrouvons ici le rôle important des macrophages dans l'initiation de ce processus de consolidation et nous verrons ultérieurement leur importance récemment mise en évidence dans la consolidation des défauts osseux lors de l'utilisation de la technique de la membrane induite. D'autres facteurs participent également à ce processus, notamment les métalloprotéinases et des facteurs angiogéniques comme le VEGF.

Certains médiateurs participent à la différenciation ostéoblastique des cellules progénitrices notamment les cellules souches mésenchymateuses. Ces médiateurs sont notamment le PDGF, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), l'IGF et le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) qui comprend les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) 2, 4, 6 et 7. Ces médiateurs ont un effet direct sur les cellules ostéogéniques qui sont les cellules ostéoprogénitrices du périoste et les cellules souches mésenchymateuses.

Ce sont ces cellules qui, en proliférant et en se différenciant, vont aboutir à la formation du cal mou puis du cal dur. La matrice extracellulaire est également importante, puisqu'elle constitue un tissu de soutien et favorise la migration et l'adhésion des cellules ostéogéniques sur le site fracturaire. Les contraintes mécaniques appliquées à la fracture vont quant à elles influencer la

différenciation cellulaire (26). Enfin, pour obtenir une consolidation, une vascularisation convenable est essentielle, car elle permet d'apporter les médiateurs ostéo inductifs, mais aussi les cellules ostéogéniques.

Cliniquement, la remise en charge du patient joue un rôle majeur dans la consolidation. L'absence de contrainte est en effet non favorable à la consolidation. Si une fracture est stabilisée, l'application de contraintes de faible amplitude générant des micromouvements de manière cyclique entraîne une compression répétée de l'os fracturé permettant d'accélérer la consolidation osseuse (27).

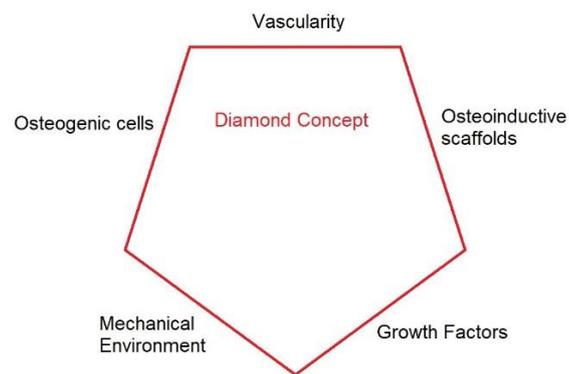


Figure 6. Diamond Concept de la consolidation des fractures. (d'après Giannoudis *et al.*) (25).

Deux types de consolidations sont possibles : la consolidation primaire (*per primam* ou ostéonale) et la consolidation secondaire (ou enchondrale). La survenue d'une fracture va initier une réponse titulaire dans la moelle osseuse à la fois dans la région corticale, mais aussi le périoste et les parties molles. Dans les heures suivant le traumatisme, la moelle osseuse se réorganise avec des zones de densité cellulaire variables. Les cellules ostéoprogénitrices de la moelle osseuse sont dans des zones à forte densité cellulaire qui sont les zones proches des extrémités fracturées. Ces cellules ostéoprogénitrices vont se différencier en ostéoblastes en 24h et commencer à former une matrice osseuse.

2.2.1.2. Consolidation enchondrale (ou secondaire)

C'est le type de consolidation le plus souvent retrouvé. Ce processus comporte 4 phases : une phase inflammatoire, puis la formation d'un cal mou, la formation d'un cal dur et enfin le remodelage osseux. Les phases aboutissant à la formation du cal mou et du cal dur sont des phases dites prolifératives de la cicatrisation osseuse.

Phase inflammatoire

C'est la première phase de la consolidation avec qui débute immédiatement après la fracture par la formation d'un hématome périfracturaire et d'un caillot riche en fibrine du fait des lésions microvasculaires locales. Dans la fracture existe une importante concentration de plaquettes, de monocytes, de polynucléaires neutrophiles qui affluent par l'intermédiaire de vaisseaux sanguins rompus. La rupture des vaisseaux sanguins périfracturaires va entraîner une hypoxie locale, une acidose et une nécrose des extrémités fracturées pouvant aller jusqu'à un centimètre de part et d'autre de la fracture.

Cette réaction inflammatoire locale permet le recrutement des précurseurs de l'ostéogenèse via une cascade enzymatique complexe mêlant à la fois facteurs de croissance et activité cellulaire des cellules immunitaires, comme des lymphocytes T et B, des cellules périphériques multinucléées, des monocytes et des MSC sont activées et recrutées dans le foyer de fracture via des voies autocrines et paracrines (relargage de cytokines comme IL-1, IL-6, TNF α).

L'activation du VEGF permet également de mettre en place la revascularisation à ce stade précoce de la consolidation. Ces cellules secrètent un nombre important de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α) stimulant les macrophages et les ostéoclastes qui auront pour but de réaliser une déterision des extrémités fracturées (ostéoclastes) et des débris présents dans l'hématome (macrophages).

De nombreux facteurs de croissance sont également libérés (Platelet-derived growth factor [PDGF], TGF- β 1, IGF, FGF, IGF, BMPs) et vont permettre de recruter ainsi que de faire proliférer et différencier les cellules ostéoprogénitrices provenant à la fois du périoste, mais aussi de la moelle osseuse. Cette phase inflammatoire dure environ 3 semaines.

Cal mou

À la suite de cette phase survient la phase de formation du cal osseux primaire autour des extrémités osseuses que l'on appelle cal mou. Cette phase va durer entre 3 et 4 semaines.

Le cal mou est formé de tissus osseux et conjonctifs non matures. Il va permettre de diminuer la mobilité du foyer de fracture. Une prolifération importante de fibroblastes, chondroblastes et préostéoblastes va avoir lieu produisant une matrice fibreuse puis fibrocartilagineuse très vascularisée et pontant le foyer de fracture, en association à une angiogenèse locale.

Cette matrice est ensuite ossifiée par métaplasie des chondroblastes. Ce tissu fibrocartilagineux n'est pas dur, mais sera progressivement remplacé par une matrice osseuse. Le cal mou peut se diviser en 2 parties : un cal interne et un cal externe. Le cal interne provient de la prolifération des cellules ostéoprogénitrices de la moelle osseuse. Le cal externe provient lui de la prolifération des cellules du périoste.

Le passage d'un tissu fibrocartilagineux à une matrice osseuse peut se faire à une vitesse variable en fonction de la stabilité de la fracture. Ce processus dure normalement jusqu'à la fin du premier mois.

Cal dur

Petit à petit ce tissu va se minéraliser, formant ainsi un cal dur (ossification enchondrale). Il y aura formation d'un tissu lamellaire non orienté à la suite de cette ossification. Cette succession de cal mou et de cal dur permet la consolidation avec formation d'un os qui n'est pas orienté comme l'est l'os non fracturé. Cette phase débute traditionnellement à la 4^e semaine et va durer entre 2 et 3 mois en fonction de l'âge. Dans cette phase, la matrice cartilagineuse est progressivement remplacée par une matrice osseuse lamellaire et non haversienne, qui va unir les extrémités fracturées et se minéraliser de proche en proche.

Remodelage

La dernière phase est la phase de remodelage qui va permettre de réadapter l'os aux contraintes habituelles qu'il subit et permet l'organisation en os lamellaire. Lors de cette phase, la structure osseuse haversienne est progressivement rétablie : l'os lamellaire qui est remis en charge va progressivement se transformer en os de type haversien, corticalisé et aux propriétés mécaniques identiques à celles d'un os normal (Figure 7).

Le canal médullaire sera progressivement reperméabilisé par les ostéoclastes et les corticales osseuses vont s'épaissir. Le cal osseux périphérique va s'amincir avec le temps. Cette phase va durer plusieurs mois, voire plusieurs années chez l'adulte. Elle permet de retrouver les caractéristiques morphologiques et mécaniques anatomiques de l'os. De la même manière, le volume du cal osseux diminue progressivement pour retrouver un volume similaire à l'os dans les suites des remaniements de la dernière phase de remodelage.

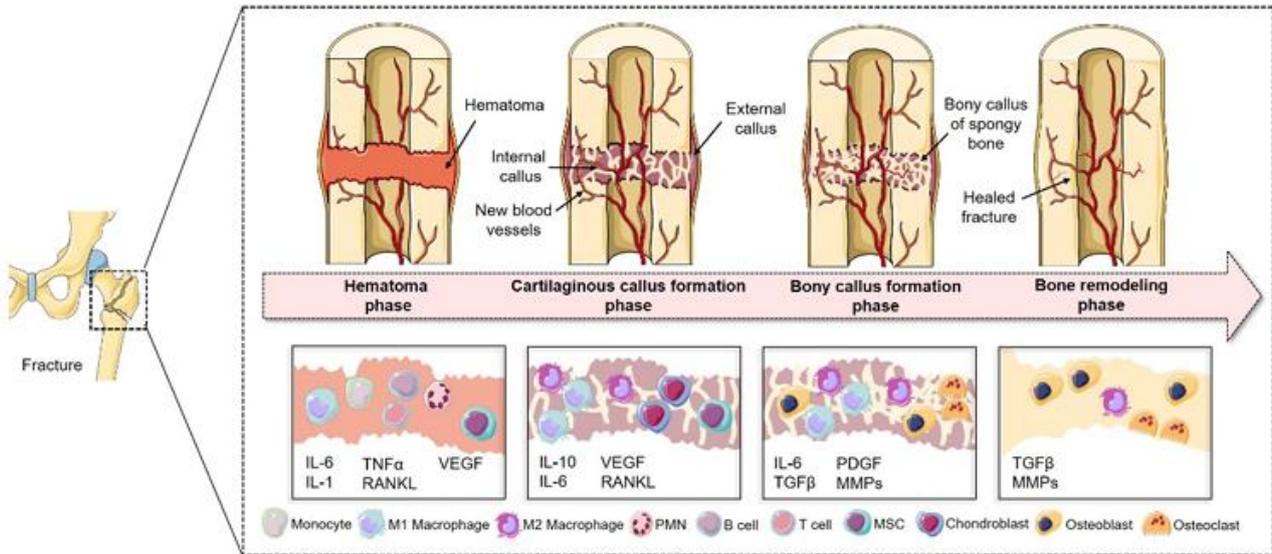


Figure 7. Consolidation secondaire. (Source : Pfeiffenberger M, Damerau A, Lang AM, Buttgerit F, Hoff P, Gaber T. Fracture healing research-shift towards in vitro modeling? *Biomedicines* 2021;9(7):748.).

2.2.1.3. Consolidation osseuse primaire (per primam ou ostéonale)

Une fracture peut aussi consolider *via* une consolidation dite primaire ou *per primam* (corticale, ou ostéonale) (Figure 8) où la réponse tissulaire des corticales osseuses aura pour objectif d'obtenir une union osseuse directe des 2 corticales sans formation de cal osseux périphérique. La consolidation primaire n'aboutit pas à la formation d'un cal osseux puisqu'elle engendre une consolidation directe par mise en contact anatomique des 2 extrémités osseuses. Elle nécessite une compression optimale et une stabilité maximale du foyer de fracture (28). Si cette stabilité est suffisante (par exemple en cas de stabilisation par plaque d'ostéosynthèse et de réduction anatomique de la fracture), la différenciation des cellules se fait rapidement vers des cellules osseuses sans passer par un stade fibrocartilagineux.

Il survient une union directe des extrémités osseuses par un os remodelé de type haversien (sans passage à la formation du cal mou qui va progressivement se transformer en matrice osseuse). Cependant, cette consolidation primaire n'est observée qu'en cas de réduction dite anatomique c'est-à-dire lors de la mise en compression des fragments osseux stabilisés par une fixation rigide.

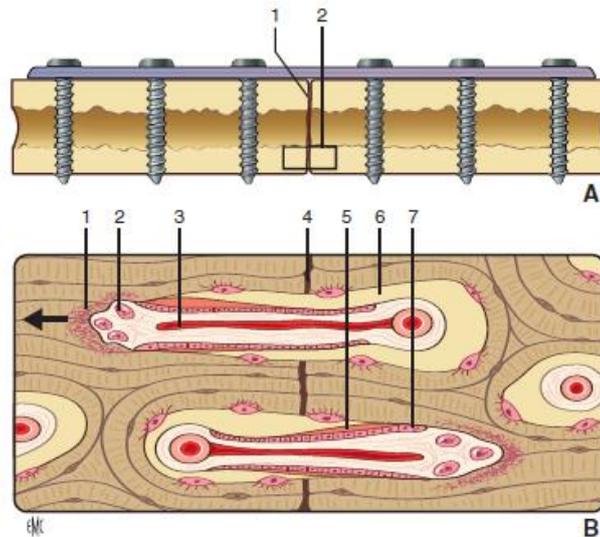


Figure 8. Consolidation osseuse primaire (corticale). (A) : 1, trait de fracture ; 2, coupe illustrée en B. (B) : 1, fracture ; 2, activité ostéoclastique ; 3, croissance vasculaire ; 4, trait de fracture ; 5, tissu ostéoïde ; 6, lamelle de l'os néoformé ; 7, ostéoblastes. Flèche : sens de progression du processus de consolidation. (Source EMC : *Biomécanique des os et application aux fractures.*).

2.2.1.4. Causes de retard de consolidation

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la survenue d'une pseudarthrose. Les premiers facteurs sont liés au patient et sont notamment l'âge et la présence d'une ostéoporose. D'autres comorbidités, comme la survenue de maladie immunitaire, des désordres métaboliques comme un diabète non équilibré et surtout le tabac sont des facteurs prouvés de pseudarthrose. D'autres facteurs sont liés à la fracture, comme les fractures ouvertes et/ou les fractures contaminées d'un point de vue septique. Les fractures comminutives, la perte de substance osseuse, les traumatismes des parties molles, l'association à des lésions nerveuses ou vasculaires sont tout autant de causes pouvant entraîner une pseudarthrose.

La chirurgie elle-même par l'implantation d'un matériel d'ostéosynthèse peut dévasculariser l'os au niveau du site fracturaire et peut retarder la consolidation. Également, la rigidité du montage peut influencer sur la consolidation. Une ostéosynthèse trop rigide entraîne un cal osseux de petit volume, ce qui peut limiter le remodelage osseux, voire entraîner une pseudarthrose dite atrophique. À l'inverse une ostéosynthèse présentant une rigidité non suffisante peut entraîner une hyper mobilité du foyer fracturaire ce qui peut engendrer la formation d'un cal osseux hypertrophique voire une pseudarthrose.

2.2.2. Traitement des fractures

Initialement le traitement des fractures était orthopédique par l'immobilisation de la fracture. Actuellement, les interventions chirurgicales ont permis d'optimiser la consolidation osseuse. L'objectif de tout traitement est d'éviter une pseudarthrose par mauvaise stabilisation osseuse et de restituer un alignement osseux anatomique (absence de cal vicieux). Le traitement comprend initialement une immobilisation provisoire de la fracture permettant de mobiliser le blessé et de gérer la douleur. Une fois l'état général du patient stabilisé, ce traitement provisoire doit être relayé par un traitement définitif dont le but est d'obtenir la consolidation de la fracture dans une position la plus anatomique possible.

L'objectif du traitement est d'éviter une immobilisation prolongée qui est source d'enraidissement des articulations et d'amyotrophie. En effet, il est nécessaire d'optimiser la mobilisation des articulations sus et sous-jacentes à la fracture, car cette mobilisation a un impact positif sur la consolidation, si tant est que la stabilisation de la fracture soit garantie par le traitement proposé (« mechanical environment du Diamond Concept de Giannoudis). C'est cet impératif qui a favorisé le développement de techniques chirurgicales d'ostéosynthèse.

2.2.2.1. Traitement orthopédique

Le premier et le plus ancien traitement des fractures était le traitement orthopédique. Il est actuellement utilisé pour les fractures peu ou pas déplacées. Le traitement orthopédique consiste en l'application d'un appareil d'immobilisation du membre afin de maintenir la réduction jusqu'à consolidation, associé parfois à la réduction de la fracture par des manœuvres externes. L'immobilisation du foyer reste imparfaite puisqu'il persiste une instabilité du foyer. Un cal osseux plutôt volumineux se forme, contenant le foyer de fracture. Ce cal osseux est stimulé par la micromobilité du foyer de fracture et se forme en environ 6 semaines.

Lorsque le foyer est stabilisé, le cal osseux on va se remodeler ainsi que les corticales. Lorsque le traitement orthopédique n'est pas envisageable, le traitement chirurgical doit être envisagé. Il permet d'éviter l'amyotrophie et l'enraidissement articulaire du fait de la mobilisation précoce qu'il autorise.

Le traitement chirurgical consiste en une ostéosynthèse qui peut être faite soit à foyer ouvert lorsque la technique consiste à aborder directement le foyer de fracture soit à foyer fermé lorsque le foyer de fracture n'est pas directement abordé. Le but de ces techniques est de restaurer l'anatomie par une réduction de la fracture et une stabilisation par un matériel d'ostéosynthèse adapté. Lorsque cela est possible, le premier objectif du traitement chirurgical

est la réduction anatomique du foyer de fracture. Plusieurs moyens d'ostéosynthèse sont utilisés et sont décrits ci-dessous. Le terme d'ostéosynthèse provient de Albin Lambotte (1866-1955) et il la définit en 1907 comme une intervention opératoire devant se faire sous « asepsie extrême » par « réduction mathématique absolue » contrôlée par la radiographie et la fixation d'une « solidité suffisante par elle-même pour maintenir les os dans leurs rapports normaux ». Il avait déjà dicté le principe « d'éviter par la mobilisation précoce les raideurs articulaires et les atrophies musculaires », préjudiciables au résultat fonctionnel final des patients.

2.2.2.2. Ostéosynthèse par haubanage

Cette technique est utilisée pour les fractures non comminutives, épiphysaires instables lorsque la traction musculaire est importante, comme pour l'olécrane ou la rotule. En dehors de ces 2 indications, cette méthode n'est quasiment jamais utilisée chez l'adulte. Le montage consiste à utiliser 2 broches introduites perpendiculairement aux traits de fracture. Ces broches sont ensuite unies par un fil métallique monté en 8. Ce montage dynamique permet de transférer les forces de traction en compression le long de l'axe des broches. Pour ces fractures, la mobilisation précoce est encouragée pour favoriser la consolidation.

2.2.2.3. Ostéosynthèse par vis

L'ostéosynthèse par vis isolée n'est pas la plus répandue, mais elle peut néanmoins être utilisée pour les fractures des extrémités osseuses (plateau tibial, condyle fémoral isolé, avulsion d'une tubérosité osseuse comme le trochiter...). Principalement associée à des plaques pour les ostéosyntheses des os longs, il est possible d'utiliser une vis interfragmentaire permettant de stabiliser le foyer fracturaire en compression puis de poursuivre l'ostéosynthèse par une plaque. Cela améliore la stabilité de la fixation. Cette vis compressive interfragmentaire est orientée perpendiculairement au trait de fracture pour obtenir une compression optimale (cas d'une fracture de la fibula distale, par exemple).

2.2.2.4. Ostéosynthèse par plaque

La plaque est l'un des moyens d'ostéosynthèse les plus utilisés, notamment pour les fractures articulaires métaphyso-épiphysaires mais aussi les fractures diaphysaires. Ces plaques permettent de stabiliser de manière fiable la fracture et peuvent permettre d'obtenir une consolidation de type primaire. Lors de l'utilisation des plaques habituelles (employant des vis corticales), après avoir méché l'os, les vis sont progressivement serrées entre la plaque et l'os.

Le point important de cette synthèse est de réduire la fracture de manière anatomique afin que les contraintes passent directement par l'os et non pas par la plaque, ce qui pourrait générer une fracture de la plaque.

Certaines plaques présentent même un design spécifique permettant d'appliquer une compression au foyer de fracture lors du vissage de la plaque. Les vis et les plaques restent indépendantes l'une de l'autre, elles ne sont pas bloquées dans la plaque. Cela permet de faire passer les contraintes au niveau de l'os et plus spécifiquement au foyer de fracture, d'où l'importance d'une réduction « anatomique » maximale pour favoriser une consolidation rapide, idéalement primaire (Figure 9).

L'élément le plus important pour la stabilité de la plaque concerne l'épaisseur de la plaque qui constitue le facteur fondamental de sa rigidité. En effet, doubler l'épaisseur d'une plaque a pour effet de multiplier par 8 sa rigidité. La mobilité dans le foyer des fractures est donc diminuée. La stabilité du montage dépend également de la capacité de la plaque à se fixer dans l'os et ceci dépend du nombre de vis fixant la plaque à l'os. Il est nécessaire de prendre en moyenne 7 corticales de chaque côté du foyer pour stabiliser le fémur et le tibia, 6 corticales pour l'humérus et 5 pour les 2 os de l'avant-bras. La localisation des vis est également un facteur important à prendre en compte : les vis situées à côté du foyer de fracture sont très sollicitées et celles sollicitées à l'extrémité des plaques le sont également du fait de la brutale répartition des charges entre l'os sain et l'os stabilisé par la plaque.

Un autre moyen pour stabiliser le foyer de fracture est d'utiliser des techniques mini-invasives, qui consistent à ne pas aborder la fracture, notamment lorsqu'elles sont comminutives, mais tout simplement en pontant cette fracture avec une stabilisation par des vis situées à distance (fixation à foyer fermé). Cela est à mettre en balance avec l'ostéosynthèse par clou centromédullaire que nous abordons ci-dessous.



Figure 9. Différence entre vis corticales et vis verrouillées en ostéosynthèse. Les vis conventionnelles dites « corticales » (à gauche) : avec la technique conventionnelle, le serrage des vis applique la plaque contre l'os. Le serrage des vis « colle » l'os à la face intérieure de la plaque. Les vis dites « verrouillées » (à droite) : les trous de la plaque et la tête de vis sont filetés. Lorsque la vis est serrée, le filetage de la tête s'engage dans le filetage de la plaque et bloque la vis sur la plaque sans comprimer la plaque contre l'os. Une fois la vis bloquée, la plaque ne peut plus se plaquer contre l'os d'où l'importance d'un positionnement optimal de la plaque avant la mise en place des vis verrouillées. (Source : *AO Surgery reference*).

Lorsque la fracture est comminutive, c'est-à-dire en plusieurs fragments, les ostéosynthèses par plaques ne permettent pas d'obtenir une réduction anatomique. Dans ces situations, les plaques d'ostéosynthèses peuvent employer des vis dites « verrouillées ». Les têtes de vis présentent elles-mêmes un filetage qui permet de solidariser la plaque avec les vis. Les contraintes ne passent plus par l'os, mais spécifiquement par le matériel d'ostéosynthèse.

En effet, les fractures comminutives ne permettent pas la mise en compression du foyer de fracture, puisque la réduction anatomique ne peut pas être obtenue. La consolidation n'est donc pas primaire, mais est cette fois secondaire. La formation d'une unité solidaire entre les vis et la plaque permettent la transmission des forces dans les implants et donc la formation du cal osseux dur.

2.2.2.5. Enclouage centromédullaire

L'enclouage centromédullaire verrouillé est un matériel intramédullaire permettant de stabiliser la fracture. Cette stabilisation est réalisée à foyer fermé par l'intermédiaire d'une trépanation d'une épiphyse proximale ou distale. À l'aide d'un guide et d'un contrôle fluoroscopique, la moelle osseuse est alésée et le clou centromédullaire est monté à travers la moelle. Puis celui-ci est verrouillé par l'intermédiaire d'une visée obtenue à l'aide de l'ancillaire ostéosynthèse ou bien par technique à main levée sous contrôle scopique.

Cette technique est très souvent utilisée dans les fractures diaphysaires des os longs et présente l'avantage principal de conserver l'hématome fracturaire (ostéosynthèse dite à foyer fermé). Le clou agit comme un tuteur endomédullaire des fractures diaphysaires et permet de rigidifier le foyer de fracture. Le contrôle de la réduction de la fracture se fait donc *via* une fluoroscopie peropératoire.

2.2.2.6. Fixateur externe

Le principe du fixateur externe consiste à réduire et fixer le foyer de fracture sans l'aborder ni modifier l'environnement biologique fracturaire. Il est surtout utilisé pour les fractures ouvertes comme moyen de stabilisation temporaire. Il permet d'éviter de mettre du matériel d'ostéosynthèse au contact du foyer avec un risque soit septique, soit de souffrance cutanée secondaire.

Plusieurs modèles de fixation externe existent de même que leur mode de fixation dans les corticales osseuses. Le type, le diamètre, la localisation des fiches dans l'os impacte la stabilité du montage de même que le nombre de plans stabilisés par le fixateur externe. Ces fiches sont

donc situées à distance du foyer de fracture et en peau saine pour limiter le risque infectieux. De même la stabilité du montage peut être influencée par le cadre de fixation. Plus ce cadre est proche de l'os plus le montage est rigide. Il est possible donc de stabiliser et de progressivement répartir les contraintes entre l'os et le cadre pour guider la consolidation osseuse.

2.2.2.7. Résumé : Stabilité et effet de l'ostéosynthèse pour l'obtention d'une consolidation

La stabilité de l'ostéosynthèse est primordiale pour assurer une consolidation de la fracture. La consolidation de l'os cortical est obtenue pour des mobilités du foyer de fracture très faibles, inférieure à 2 % de l'espace interfragmentaire : dans ce cas, il s'agit d'une consolidation primaire. Cette stabilité absolue est obtenue pour des fractures simples avec un espace interfragmentaire très faible. L'essentiel des contraintes est supporté par l'os et le matériel d'ostéosynthèse n'en supporte qu'une faible partie. C'est le frottement entre la plaque et l'os qui va favoriser les forces de compression et nécessite des vis de type « cortical » ayant donc une bonne tenue dans l'os. Si la mobilité est située entre 2 et 10 %, il s'agit d'une stabilité relative du foyer et la consolidation de type secondaire aura lieu. Le montage associera une plaque et des vis « verrouillées » ou bien un clou centromédullaire verrouillé, pour que l'essentiel des contraintes passe par les implants, le temps que le cal dur soit formé. Le système de fixation ne doit pas être trop rigide, car cela peut faire tendre vers un retard de consolidation, voire une pseudarthrose (dite atrophique). Au-delà de 10% de mobilité l'os ne consolide pas et la fracture évolue vers une pseudarthrose (dite hypertrophique) (29).

L'ostéosynthèse d'une fracture simple permet un affrontement osseux anatomique et donc une consolidation ostéonale per primam avec formation directe d'un os haversien. De même, l'ostéosynthèse à foyer ouvert engendre un abord du foyer de fracture et un déperiochage, qui réduit les possibilités de formation du cal périosté. De plus, l'hématome périfracturaire est évacué, excluant ainsi son pouvoir ostéoinducteur. Enfin, en pratique clinique, il peut exister un petit espace entre les fragments, ou bien une minime comminution engendrant des zones qui ne sont pas en contact direct « anatomique ». Même si une fracture présente une réduction macroscopiquement parfaite, la consolidation intervient en fait souvent par le biais des 2 mécanismes ci-dessus (ostéonale et enchondrale).

L'ostéosynthèse à foyer fermé a pour but de limiter la perturbation de ce processus de consolidation en préservant le périoste et l'hématome fracturaire. C'est le cas de l'enclouage centromédullaire verrouillé ou bien à moindre mesure de l'embrochage percutané. Néanmoins, la réduction se fait sous contrôle fluoroscopique et de manière indirecte et peut donc être plus difficile qu'en foyer ouvert. Du fait du respect du périoste et de l'hématome périfracturaire, le

processus de consolidation est similaire à celui d'un traitement orthopédique avec formation d'un cal osseux stabilisant le foyer des fractures.

Enfin, il est possible d'associer une subtilité supplémentaire à ces moyens d'ostéosynthèse : la fixation statique ou dynamique du moyen d'ostéosynthèse qui consiste à laisser persister ou non une mobilité à la fracture par le biais du montage, qui « guide » cette mobilité. L'objectif est d'augmenter la stimulation mécanique axiale de l'os, ce qui permettrait d'agir sur la consolidation. La fixation dynamique consiste notamment à permettre de dynamiser le montage en autorisant une sollicitation mécanique du foyer de fracture et peut être facilement utilisée lors des enclouages centromédullaires verrouillés notamment par l'utilisation d'orifice de verrouillage dynamique « oblongs » ou bien même par l'ablation des vis de verrouillage d'un des 2 côtés du foyer de fracture. Cette sollicitation du foyer permet éventuellement de redynamiser le processus de consolidation en stimulant le cal périosté.

2.4. Prise en charge des pertes de substance en chirurgie orthopédique et traumatologique

Lors de la prise en charge d'une fracture, nous avons vu que 2 types de consolidation étaient possibles. La consolidation primaire ou bien la consolidation secondaire qui aboutit à la formation d'un cal osseux. Nous avons également vu que, lorsque la consolidation n'était pas acquise par l'une ou l'autre voie, cela peut aboutir à une pseudarthrose. Dans certains traumatismes à haute énergie, la fracture engendre une perte de substance osseuse (ou defect osseux) qui ne pourra pas consolider, car ce defect osseux important ne permettra pas l'obtention d'un cal suffisant.

D'autres situations, comme les prises en charge en chirurgie tumorales ou infectieuses voire les pathologies congénitales peuvent être responsables d'un defect osseux nécessitant un apport d'os pour restituer la continuité osseuse. Le traitement des defects osseux reste l'un des principaux défis de la pratique clinique orthopédique. Plusieurs techniques sont cependant développées et utilisées pour reconstruire une perte de substance osseuse. Nous les analysons ci-dessous.

2.4.1. Traitement chirurgical des pseudarthroses

La circonstance la plus fréquente pour laquelle une perte de substance osseuse peut survenir est la non-consolidation d'une fracture, ou pseudarthrose qui peut se développer lorsque la mobilité interfragmentaire persiste et qu'il est confirmé que le traitement initial n'aboutira pas à la

consolidation de la fracture. Le traitement de la pseudarthrose induit lui-même un defect osseux en raison de la technique chirurgicale employée, nécessitant un apport osseux pour restaurer la continuité du segment osseux pseudarthrosé.

Une nouvelle prise en charge thérapeutique peut être envisagée et est chirurgicale dans la quasi-totalité des cas. Une pseudarthrose est en général définie par une absence de consolidation à 6 mois du traumatisme pour un os long. Les facteurs aboutissant à une pseudarthrose peuvent être d'origine mécanique ou biologique. Les pseudarthroses peuvent être hypertrophiques et sont définies par un élargissement des extrémités osseuses qui restent bien vascularisées. Dans ce contexte la pseudarthrose est dite serrée et est en général la conséquence d'un défaut mécanique du traitement initial (trop grande mobilité interfragmentaire). Elle nécessite en général un geste de stabilisation itératif.

Lorsque la pseudarthrose est dite atrophique, les extrémités osseuses sont rétrécies et elles sont en général mal vascularisées. Les fragments osseux sont sclérotiques. Elle est la conséquence d'un défaut biologique du traitement initial et requiert de stimuler le processus de consolidation à nouveau. Un des éléments pouvant engendrer une pseudarthrose est l'infection (pseudarthrose septique). En orthopédie, toute pseudarthrose est considérée comme septique jusqu'à preuve du contraire. Lors de la prise en charge thérapeutique, une origine septique est recherchée par réalisation de prélèvements osseux lors de la reprise chirurgicale, hormis lorsque le défaut de stabilisation mécanique initiale est évident.

2.4.4.1 Évaluation d'une pseudarthrose

Le diagnostic est en général évoqué par la persistance d'une mobilité du foyer de fracture signalée par le patient par des douleurs persistantes en regard du foyer de fracture. Radiologiquement, une solution de continuité sera visible sur les clichés. Ces clichés radiographiques permettent également de préciser le type de pseudarthrose. Le matériel d'ostéosynthèse peut également être évalué et peut être lui-même rompu, désolidarisé de l'os. D'autres éléments doivent être pris en compte, notamment l'examen du revêtement cutané, la cicatrice, la trophicité musculaire, l'évaluation du membre dans sa globalité notamment les amplitudes articulaires. L'état artériel, veineux, et l'absence de déficit neurologique doivent également être recherchés.

Les comorbidités du patient sont importantes à évaluer, notamment les maladies telles le diabète l'antécédent de cancer, le tabagisme qui est un facteur important de pseudarthrose (30,31). L'infection doit être recherchée au niveau du foyer de fracture notamment par l'examen local cutané. L'histoire de la prise en charge de la fracture, la présence de troubles de cicatrisation

comme l'apparition d'une fistule au niveau de la cicatrice, une cicatrice et une peau péri-cicatricielle rouge, chaude et douloureuse à la palpation sont des signes cliniques suspects.

2.4.4.2. Prise en charge chirurgicale de la pseudarthrose

Lors de la prise en charge chirurgicale de la pseudarthrose, le premier geste consiste à réaliser un parage du foyer de pseudarthrose. L'objectif est d'exciser tout le tissu fibreux incarcéré dans la zone non consolidée. Il ne doit pas être trop agressif au risque d'augmenter la dévascularisation locale, mais peut être nécessaire pour corriger des défauts de réduction importants. Le second élément consiste à reperméabiliser le canal médullaire. Tout os paraissant nécrotique et les séquestres osseux doivent être réséqués, notamment en contexte septique.

Une fois le foyer de pseudarthrose préparé, il est nécessaire de stimuler la consolidation afin de rétablir la continuité osseuse et d'obtenir un cal définitif. Le premier élément consiste à réaliser une décortication ostéomusculaire. Cette décortication permet de réaliser un manchonnage du foyer de pseudarthrose par un abord intracortical de l'os avec un ciseau à os (32,33). De fait, les fragments osseux vascularisés vont jouer un rôle d'ostéogénèse autour des foyers créés par le ciseau à l'os et va relancer théoriquement le processus de consolidation du foyer de pseudarthrose dans le même temps. Elle est pratiquée isolément dans les pseudarthroses hypertrophiques, mais doit être associée à une autogreffe spongieuse ou corticospongieuse lorsqu'il existe un defect osseux. Pour une décortication de qualité, il est nécessaire que l'abord du foyer de pseudarthrose se fasse d'emblée jusqu'à l'os en ne créant pas de décollement cutané ni de décollement périoste qui seront donc levés en monobloc avec un fragment cortical pour exposer le foyer de pseudarthrose dans sa totalité (Figure 10). La voie d'abord doit donc être relativement longue pour permettre une exposition suffisante pour permettre de lever les fragments ostéopériostés autour de la diaphyse.

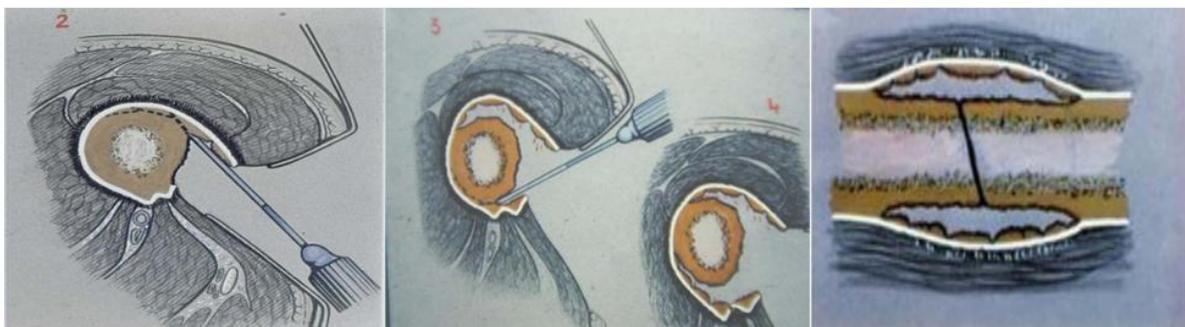


Figure 10. Principe de la décortication osseuse. (Source : Judet R. *Décortication ostéo-périostée. Actualité de Chirurgie Orthopédique de l'Hôpital Raymond Poincaré, Tome IV.* Masson, Paris, 1965. *Décortication ostéo-périostée de Robert Judet.*)

Une fois la décortication réalisée, d'autres gestes peuvent être nécessaires notamment une greffe osseuse. Cette greffe osseuse aura pour but d'amplifier la consolidation et de combler un defect osseux éventuel. La plupart des greffes osseuses sont des greffes osseuses autologues prélevées sur le patient. On distingue des greffons de type spongieux pur ou corticospongieux. Ces greffes osseuses autologues sont prélevées majoritairement sur l'os iliaque. Les sites de prélèvement sont soit la crête iliaque antérieure, soit la crête iliaque postérieure.

D'autres sites existent notamment le tibia, le radius distal, l'ulna proximal *etc.* Ces prélèvements d'os autologue sont tolérés par le patient, mais présentent des complications possibles, dont certaines sont graves, mais rares. Dans 10 à 20 % des cas, les patients peuvent présenter des douleurs persistantes au-delà de 3 mois après la chirurgie. À la suite de la décortication et de la prise de greffon autologue, le foyer de pseudarthrose doit être stabilisé par une ostéosynthèse fiable. Celle-ci peut être soit un enclouage centromédullaire, soit l'utilisation d'une plaque vissée, soit une fixation externe.

2.4.2. Les greffes osseuses

L'une des techniques employées pour combler un defect osseux est la greffe osseuse. La plupart des greffes osseuses sont autologues, mais d'autres possibilités existent et nous allons les décrire.

2.4.2.1. Définitions

Une greffe osseuse est le transfert de tissu osseux quel que soit son type vers un site présentant un defect osseux à combler. Nous parlons d'une autogreffe lorsque le donneur est le receveur lui-même ou bien d'une allogreffe si le donneur est un autre individu. La xénogreffe, plus rare, concerne un donneur d'une espèce différente de celle du receveur. L'autogreffe présente bien sûr l'avantage d'une absence de réaction immunitaire et l'absence de transmission de maladies. Ces greffes osseuses peuvent être vascularisées pédiculées si le pédicule nourricier reste en continuité ou bien libres si le pédicule nourricier doit être anastomosé au site receveur. Les greffes peuvent être corticales, spongieuses, corticospongieuses en fonction de la nature du defect. Les allogreffes osseuses sont en général des allogreffes de tissus massifs congelés permettant de reconstruire la totalité d'un segment osseux. Ces allogreffes permettent la reconstruction de perte de substance osseuse très large. D'autres types de greffes sont possibles, notamment des greffes par substitut osseux qui sont un biomatériau ou un produit dérivé de l'ingénierie osseuse tissulaire permettant de combler un defect osseux. Ils sont principalement formés de phosphates de calcium.

2.4.2.2. Propriétés biologiques des greffes osseuses (Tableau 1)

Capacité ostéogénique : Les greffes osseuses présentent une capacité ostéogénique lorsque les ostéoblastes greffés sont capables de former un os nouveau sur le site de defect osseux. Cette capacité est possible uniquement pour les autogreffes. C'est dans le tissu spongieux que cette capacité est la plus développée, car elle est riche en cellules souches de la moelle hématopoïétique.

Capacité d'ostéoconduction : On parle d'ostéoconduction du tissu greffé si sa surface et sa structure peuvent servir de support pour la migration de cellules osseuses provenant du site receveur. Cette propriété peut être retrouvée dans les substituts osseux phosphocalciques. Les cellules osseuses doivent pouvoir pénétrer en profondeur dans le matériau et celui-ci nécessite donc d'être poreux. Cette porosité doit être supérieure à 300 µm d'après Bignon *et al.* (34).

Capacité d'ostéoinduction : Un matériau est considéré comme ostéoinducteur quand il provoque la formation de tissu osseux après implantation dans un site extraosseux.

Tableau 1. Propriétés et risques des différentes greffes osseuses, cartilagineuses, des substituts osseux et autres produits délivrés par une banque de tissus. (Source : EMC P.-L. Docquier, T. Schubert).

	Capacité ostéogénique	Ostéoconduction	Ostéoinduction	Morbidité du site donneur	Réponse immunitaire	Transmission de maladies
Autogreffe	+	+	?	+++	-	-
Allogreffe	-	+	-	-	+	+
Xéno greffe	-	+	-	-	+	+
Substituts osseux	-	+	-	-	-	-
Cellules souches	-	+	-	-	-	-
Facteurs de croissance	-	-	+	-	-	-

2.4.2.3. Autogreffe osseuse

L'autogreffe spongieuse non vascularisée est la plus fréquente et le site de prélèvement le plus fréquent est la crête iliaque (antérieure ou postérieure). D'autres sites sont possibles pour prélever de l'os spongieux comme le radius distal, l'extrémité proximale de l'ulna, le tibia *etc.* Ces greffes sont non vascularisées. Une autre technique appelée RIA (Reamer, Irrigator, Aspirator) consiste à prélever le tissu spongieux provenant de la diaphyse fémorale à l'aide d'un

système qui fraise la diaphyse fémorale en recueillant le tissu spongieux. Les autogreffes peuvent également être vascularisées notamment la fibula vascularisée qui est la technique la plus répandue d'autogreffe vascularisée. Cette vascularisation doit être assurée sur le site receveur par la réalisation de microanastomose vasculaire.

2.4.2.4. Allogreffe osseuse

Une allogreffe osseuse correspond à l'utilisation d'un os provenant d'un individu de la même espèce. Celles-ci sont de plus en plus réalisées notamment pour traiter une perte de substance osseuse massive pour laquelle le patient donneur d'une autogreffe ne peut pas fournir autant de tissu autologue osseux. Ceci est dû à l'amélioration des techniques de conservation, de traitement et de l'amélioration des connaissances immunologiques. Elle présente l'avantage de diminuer les comorbidités induites par le prélèvement de tissu chez le patient donneur et diminue le temps opératoire. Des exigences de qualité et de sécurité ont été définies en 2004 par une directive européenne.

En effet, les allogreffes présentent le risque de pouvoir transmettre des maladies comme des virus, des bactéries et des prions (35–38). Ces allogreffes subissent une déprotéinisation partielle, une délipidation, une étape d'inactivation virale et enfin une stérilisation par irradiation gamma ou bêta à une dose moyenne de 25 à 32 kGy. Ces étapes rendent le risque de transmission de maladies virales quasi nul. Les sources d'allogreffe sont notamment la tête fémorale récupérée chez les patients opérés pour une prothèse de hanche ou bien via un don d'organes. Elle présente des propriétés d'ostéoconduction.

Les allogreffes peuvent être combinées aux autogreffes spongieuses pour faciliter la consolidation. Le principal problème de ces allogreffes est qu'elles ne sont pas vivantes et que la consolidation n'apparaîtra qu'à l'aide des cellules du receveur. L'allogreffe peut se fracturer du fait de la remise en charge cyclique. Une autre complication majeure est l'infection de l'allogreffe du fait de l'absence de vascularisation.

2.4.2.5. Xénogreffes

Une autre catégorie de substituts osseux est représentée par les xénogreffes qui correspondent à de l'os provenant d'un donneur d'une espèce différente de celle du receveur. Actuellement, les procédés de préparation de ces xénogreffes permettent d'en entrevoir leur utilisation en faisant disparaître toute antigénicité et en maintenant les qualités biologiques du tissu osseux ce qui n'était impossible par le passé (39).

La source principale des xéno greffes est bovine. Les traitements chimiques appliqués aux xéno greffes consistent à réaliser une déprotéinisation, une délipidation et enfin une inactivation virale et contre les prions. Une stérilisation finale par irradiation est réalisée à l'issue de ces traitements. Les xéno greffes conservent leur architecture osseuse, identique à celle de l'os spongieux humain.

2.4.2.6. Les substituts osseux et biomatériaux

Pour combler une perte de substance osseuse, il est possible d'utiliser des substituts osseux d'origine synthétique et/ou biologique. La définition d'un substitut osseux proposée par la Société Française de Recherche en Orthopédie - Traumatologie (SOFROT) est la suivante : « peut être considéré comme substitut osseux tout biomatériau ou produit d'ingénierie tissulaire d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique destiné à l'implantation chez l'homme dans la perspective d'une reconstitution du stock osseux par le renforcement d'une structure osseuse où le comblement d'une perte de substance osseuse d'origine traumatique ou orthopédique (40) ».

Une large gamme de substituts osseux existe, permettant de répondre à de nombreuses situations cliniques. Cependant, un substitut osseux unique ne peut pas répondre à toutes les indications. Ces substituts osseux obéissent à un cahier des charges strict, avec comme premier élément obligatoire leur biocompatibilité, leur dégradation plus ou moins rapide en fonction de l'indication, ainsi que leur résistance mécanique.

Matrices osseuses déminéralisées

Les matrices osseuses déminéralisées sont des substituts osseux provenant d'allogreffes, considérées comme telles. L'os subit une déminéralisation par une solution acide préservant les protéines non collagéniques notamment les facteurs de croissance. Ces substituts présentent donc une capacité ostéoinductrice démontrée chez l'animal (41). Cependant, la présence et le maintien des facteurs de croissance (TGF- β , FGF- α , IGF-1, PDGF, BMPs...) au sein de ces matrices osseuses déminéralisées sont variables en fonction des protocoles utilisés pour la déminéralisation (42,43).

Substituts osseux

Les substituts osseux de synthèse sont issus d'une synthèse chimique et ne présentent pas de risques microbiologiques. La première famille de ces substituts osseux de synthèse est représentée par les céramiques de phosphates de calcium. C'est la plus largement utilisée. Leur avantage est leur biocompatibilité et une absence de réaction immunologique vis-à-vis des corps étrangers. Toutes ces céramiques diffèrent par leur proportion entre calcium et phosphate (rapport Ca/P) (Tableau 2). Les principaux utilisés en application clinique sont les phosphates tricalciques (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ou l'hydroxyapatite (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), parfois même en association (44–47).

Tableau 2. Principaux substituts osseux phosphocalciques utilisés comme biomatériaux. (Source : Ginebra et al. *Bioceramics and bone healing. EFORT Open Rev.* 2018 May 21;3(5):173-183. (48)).

Ratio Ca/P	Nom	Symbole/Nom minéral	Formule Chimique	Solubilité*
0,5	Phosphate monocalcique monohydraté	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	~18
1,0	Phosphate dicalcique dihydraté	DCPD/brushite	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	~0,088
1,0	Phosphate dicalcique anhydre	DCPA/monetite	CaHPO_4	~0,048
1,3-2,5	Phosphate de calcium amorphe	ACP	$(\text{Ca}, \text{X})_x(\text{PO}_4, \text{Y})_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$ X = Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{2+} , Al^{3+} ; Y = $(\text{CO}_3)^{2-}$, $(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$	N.A.
1,33	Phosphate d'octacalcium	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	~0,0081
1,5-1,67	Hydroxyapatite précipitée†	PHA, CDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_6 \cdot x(\text{OH})_{2-x}$ $0 \leq x < 1$	~0,0094
1,5	α -Phosphate tricalcique	α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0,0025
1,5	β -Phosphate tricalcique	β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0,0005
1,67	Hydroxyapatite frittée	SHA/hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	~0,0003
2,0	Phosphate tétracalcique	TTCP/hilgenstockite	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	~0,0007

* Solubilité en g/L dans l'eau à 25°C

† lorsque $x > 0$, on parle d'hydroxyapatite déficiente en calcium, CDHA. Il est courant d'avoir $x = 1$, ce qui conduit à la composition $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$.

Leur élaboration comprend une étape de calcination à très haute température ainsi qu'une étape de frittage à plus de 1000°C permettant aux particules de fusionner et de rester soudées après refroidissement. Ces traitements ne permettent pas à ce stade l'incorporation de molécules

organiques avec une propriété biologique. La céramique formée présente des interstices entre les particules, qui déterminent sa microporosité. Ces conditions de fabrication influencent de manière importante sur les propriétés mécaniques, physiques et chimiques de ces céramiques. En effet, elles présentent également des macropores qui sont compris entre 100 et 600 μm . Ces macropores sont obtenus par l'ajout avant frittage d'agents dits porogènes qui, en disparaissant, laissent ces macropores en place. Le contrôle du diamètre des micropores, mais également des macropores et de leurs interconnexions est important pour permettre la réhabitation de la céramique par les processus de néoangiogenèse, la circulation des fluides de la matrice extracellulaire mais également pour l'ostéoconduction (49).

En effet, des pores de taille supérieure à 100 μm permettent l'envahissement cellulaire des cellules osseuses (50). Ces céramiques sont biodégradées et progressivement ostéointégrées. Ces phénomènes d'ostéointégration restent dépendants de plusieurs facteurs comme la composition même de la céramique, sa forme, sa porosité... Les fluides extracellulaires se chargent en ions calcium et phosphore et une précipitation forme des cristaux d'apatite biologique identique à ceux de la phase minérale de l'os organique. Ces cristaux vont s'unir aux protéines présentes et notamment au collagène de l'os. Les cellules géantes et les macrophages vont biodégrader la céramique, tandis que les ostéoclastes induiront une résorption similaire à l'os natif. La régénération osseuse va ensuite répondre à un mécanisme classique d'ostéointégration par « creeping substitution », formant un os lamellaire remplaçant progressivement le biomatériau. Pour les principales céramiques utilisées, ce processus prend plusieurs années.

En pratique clinique, ces céramiques sont relativement fragiles et cassantes. Aucune céramique phosphocalcique n'allie la résistance, la ductilité et de rigidité proche de celle de l'os cortical. Le site opératoire doit être exempt de processus infectieux actif. Le site opératoire doit également être bien vascularisé et l'ostéosynthèse doit être utilisée pour garantir une absence complète de micromobilité qui ne serait pas favorable à la biodégradation et au remplacement de la céramique. Les substituts osseux synthétiques peuvent aussi être sous forme de ciments phosphocalciques. Ceux-ci sont injectés soit sous forme liquide soit sous forme de pâte. Ce ciment est formé par le mélange d'une poudre de phosphate de calcium et de liquides composés d'acides inorganiques (phosphorique, sulfurique) ou organiques (lactique). Une fois mélangés, les phosphates de calcium précipitent en phosphate de calcium moins soluble, formant des cristaux qui fusionnent et solidifient le ciment. Ce processus ne crée que des micropores, sans macropores. Leur temps de prise est inférieur à une heure, mais leur résistance faible les rend adaptés aux pertes osseuses minimales. Leur dégradation se fait de la périphérie au centre du

ciment, très progressivement.

Certains substituts osseux proviennent d'origine animale, tels que le corail (carbonate de calcium), extrait de l'exosquelette d'invertébrés marins. La structure du corail varie considérablement, certains types possèdent une porosité similaire à celle de l'os spongieux, tandis que d'autres présentent une densité comparable à celle de l'os cortical. Cette diversité structurelle influence directement les caractéristiques mécaniques du corail. Celles-ci dépendent non seulement de la porosité, mais aussi de la taille des pores.

Les bioverres

Enfin, l'un des substituts osseux synthétiques utilisés est représenté par les bioverres. Les verres bioactifs sont composés principalement d'oxyde de silicium, de sodium, de calcium et de phosphore. Le premier bioverre bioactif a été développé par Larry Hench en 1971 (Bioverre 45S5) (51). Ils possèdent une excellente biocompatibilité et peuvent créer un lien chimique à l'interface entre le bioverre et l'os. En effet, ils ne provoquent pas la formation d'une encapsulation fibreuse à cette interface, ce qui permettrait une meilleure intégration du bioverre à l'os.

2.4.3. La technique du transport osseux

Le comblement d'une perte de substance osseuse massive peut être obtenu par un transfert osseux segmentaire, aussi appelé technique de « transport osseux » ou de « l'ascenseur ». La méthode d'Ilizarov (inventé en 1951 par Ilizarov (52)) repose sur l'ostéogenèse par distraction progressive d'un foyer de corticotomie ou de pseudarthrose à l'aide d'un fixateur externe. Actuellement, des clous centromédullaires sont utilisés. Cette technique est particulièrement utile pour les grandes pertes de substance osseuses diaphysaires traumatiques, tumorales, congénitales, ou voire l'inégalité de longueur des membres. En cas de perte de substance osseuse diaphysaire critique, la technique consiste à créer par une ostéotomie transversale en zone métaphysaire un 3^e fragment diaphysaire. Respectant l'apport vasculaire, ce fragment est transporté par distraction à l'aide d'un fixateur externe ou clou centromédullaire. Une régénération osseuse comble la perte pendant la distraction. Une fois la progression du cylindre osseux terminée, la compression favorise sa consolidation à l'extrémité distale. La distraction doit être progressive, environ 1 à 1,5 mm par jour, sinon un échec ischémique peut survenir (54), ainsi que des lésions nerveuses ou musculaires. Un mois est nécessaire pour un allongement d'un centimètre.

Les facteurs de risque d'échec incluent : un âge > 30 ans, une perte de substance > 4 cm, et tabagisme. Le problème principal de ce procédé demeure son impact sur le patient. En effet, l'utilisation d'un fixateur externe engendre des douleurs physiques voire psychiques, intolérance, risque d'infection, et encombrement. L'utilisation de clou centromédullaires a amélioré ces problèmes en réduisant l'encombrement et le risque d'infection. Cette technique est à comparer à la technique de la membrane induite qui a des indications similaires. Ces deux techniques sont souvent comparées dans la littérature.

Récemment, Allesina *et al.* ont comparé les résultats de ces deux techniques par une revue systématique avec méta-analyse, réunissant 6 études observationnelles et 364 patients (53). Bien qu'il s'agisse d'études observationnelles avec un risque de biais, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les 2 techniques. Une étude prospective randomisée comparait 13 patients (transport osseux) à 12 patients (TMI) pour une pseudarthrose septique de tibia de moins de 4 cm a trouvé des résultats fonctionnels et osseux similaires, bien que le transport osseux ait montré des résultats plus constants (12/13 patients consolidés contre 6/12 pour la TMI).

2.4.4. La technique de la membrane induite (technique de Masquelet)

2.4.4.1. Le concept de stratégie et de tactique du Professeur Alain-Charles Masquelet

Nous devons au Professeur Alain-Charles Masquelet l'application des notions de stratégie et de tactique appliquées à la chirurgie réparatrice d'un membre. Il résume ainsi ces 2 concepts : la stratégie est l'art de placer initialement ses troupes sur le champ de bataille quand la tactique est l'art de les faire manœuvrer. En cas de perte de substance d'un membre, les 3 structures à réparer sont l'enveloppe des parties molles périphériques, la charpente ostéoarticulaire, qui est le sujet principal de cette thèse, et le système d'animation des leviers et des articulations. Il s'agit d'une stratégie dénommée 3R : Réparation des parties molles, Reconstruction du squelette, Réanimation de la fonction. Tous les traumatismes des membres ne nécessitent pas l'application de chacun des 3R, bien souvent il s'agit de la prise en charge d'un seul ou de 2 de ces éléments de stratégie. Nous détaillons ici la prise en charge de la reconstruction du squelette.

Pour le Pr Masquelet, qui réalise une analogie entre un bateau et un corps humain, il assimile la charpente ostéoarticulaire à la quille d'un bateau qu'il compare au rachis, et les varangues et les couples au squelette osseux. Après avoir introduit le concept de stratégie et tactique en cas de perte de substance en traumatologie, le Pr Masquelet a également développé la technique de

la membrane induite. En chirurgie osseuse, l'un des principaux défis auxquels est confronté le praticien est la perte de substance osseuse. Dans ces situations, les chirurgiens doivent utiliser un arsenal varié et conséquent pour pallier cette perte de tissu osseux. Il est primordial d'obtenir une charpente osseuse continue permettant par la suite de restaurer la fonction. Ceci est principalement vrai en orthopédie traumatologie, où la non-restitution du segment osseux est préjudiciable à la restauration d'une fonction du membre considéré.

L'arsenal thérapeutique est vaste et repose majoritairement sur les autogreffes et allogreffes osseuses. L'ingénierie tissulaire avec le développement et l'utilisation croissante de substituts osseux, constitue également une approche prometteuse. Cependant, lorsque la perte osseuse est trop importante, l'apport direct de tissus osseux autologue ou de substituts peut se solder par un échec thérapeutique, entraînant absence de consolidation, résorption de la greffe ou fracture.

Dans ces cas, les greffes osseuses vascularisées (fibula vascularisée) et la technique du transport osseux peuvent être utilisées. Parmi les stratégies les plus fréquemment utilisées, la technique de la membrane induite, décrite en détail ci-dessous, occupe une place essentielle.

2.4.4.2. Description de la technique

Cette technique, développée il y a plus de 30 ans par le Professeur Masquelet, repose sur l'induction d'une membrane réactionnelle au contact du ciment chirurgical, formée en environ 6 à 8 semaines. Contrairement à une simple membrane ou un néopérioste, cette structure est vascularisée, sécrétrice de facteurs de croissance, et contient des cellules souches mésenchymateuses.

Cette technique est applicable dans toutes les situations de perte de substance osseuse critique en orthopédie, traumatologie, et chirurgie maxillo-faciale. Elle convient aux pertes de substance osseuses supérieures à 3 cm et peut aller jusqu'à 15 cm, voire plus chez l'enfant. Lorsque le defect osseux est inférieure à 3 cm, une greffe spongieuse ou corticospongieuse simple est généralement suffisante sans entraîner de résorption du greffon. Lorsque la perte dépasse 15 cm, d'autres techniques sont souvent privilégiées afin de limiter la morbidité liée au prélèvement de greffons autologues. Ces techniques incluent les allogreffes ou bien les greffes osseuses vascularisées, comme la fibula vascularisée.

Ces pertes de substances osseuses sont principalement post-traumatiques, résultant d'accidents à haute énergie. Elles peuvent également être post-infectieuses lorsqu'une résection osseuse étendue est nécessaire pour éradiquer une infection. Plus rarement, elles sont d'origine tumorale et congénitale, notamment en pédiatrie.

C'est une technique en 2 étapes :

1. **Première étape** : un parage chirurgical du site est réalisé afin d'éliminer tout envahissement fibroblastique, comme dans le traitement d'une pseudarthrose. Une entretoise en ciment PMMA (polyméthylmethacrylate) est ensuite placée au sein du defect. Il s'agit du ciment classiquement utilisé depuis 1962, en chirurgie orthopédique et traumatologique dans le scellement des prothèses articulaires de hanche, polymérisé en quelques minutes par réaction exothermique après mélange d'une poudre et d'un liquide. Son efficacité dans le scellement des prothèses articulaires est immédiate et permet une reprise de la fonction directement en postopératoire. Il peut également servir de matériau de comblement (tumeur, fracture ostéoporotique) ou de support de médicaments comme (ex. antibiotiques). Cette polymérisation dégage de la chaleur, ce qui accélère encore le processus. Idéalement, cette chaleur doit être inférieure à la température de coagulation des protéines (56°C) et de dégradation du collagène (70°C). Cette polymérisation libère des monomères cytotoxiques en culture cellulaire.

Le segment osseux est ensuite stabilisé par plaque et vis, fixateur externe ou clou centromédullaire (placé avant l'introduction du ciment). Un temps préalable de parage et de contrôle d'une infection active peut être requis avant d'initier cette technique. En effet, comme souligné par le Professeur Masquelet, la technique de membrane induite ne vise pas à contrôler une infection et doit être utilisée une fois celle-ci éradiquée. Puis au contact de ce ciment chirurgical, la membrane de réaction à corps étranger dite « membrane induite » se développe. Chez l'homme, la période de formation est de 6 à 8 semaines (Figure 11).

2. **Deuxième étape** : Après 6 à 8 semaines, la « membrane induite » est exposée chirurgicalement, incisée tout en étant préservée, puis le ciment est retiré. La zone defect est ensuite comblée par une greffe osseuse, généralement autologue, prélevée au niveau des crêtes iliaques antérieures et/ou postérieures en fonction de l'importance du déficit. En cas de perte de substance majeure, un mélange autogreffe et allogreffe peut être employé, mais avec une prédominance d'autogreffe pour optimiser la consolidation.

Chez l'homme, la consolidation se produit généralement entre 6 et 9 mois, voire plus. Contrairement aux greffes osseuses classiques, la consolidation peut être obtenue pour des pertes de substances étendues. Cela a conduit à de nombreuses recherches visant à mieux comprendre les mécanismes biologiques de la membrane induite et à confirmer son rôle clé dans la survie de la greffe.

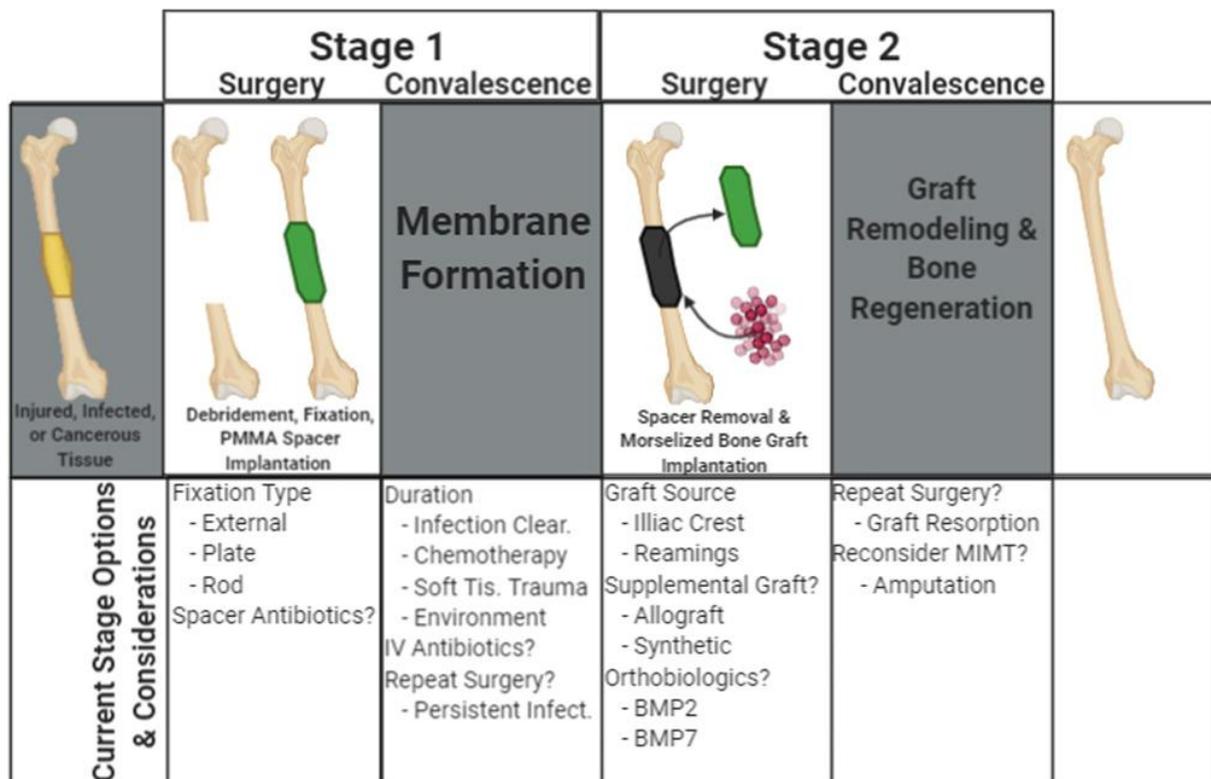


Figure 11. Vue d'ensemble de la technique de membrane induite de Masquelet (TMIM) — étapes et possibles modifications. La TMIM est une procédure en deux étapes. Lors de la première, une chirurgie est réalisée pour retirer le tissu endommagé/altéré, fixer les moyens de stabilisation osseuse et implanter un espaceur en polyméthylméthacrylate (PMMA). Cette phase permet au corps de créer une membrane de réaction à corps étranger autour de l'espaceur, tout en pouvant être utilisée pour traiter des infections, effectuer des traitements post-résection tumorale (chimiothérapie, par exemple), réparer des tissus mous ou transférer le patient dans un centre mieux équipé (d'un hôpital de campagne à un trauma center). Lors de la deuxième chirurgie, l'espaceur est retiré et la cavité formée est remplie de greffe osseuse morcelée. La guérison se poursuit au cours des mois suivants. Les deux étapes peuvent subir plusieurs modifications en fonction des conditions du patient et des préférences/expériences du chirurgien. À ce jour, il existe peu de preuves scientifiques solides pour étayer ces personnalisations dans le but d'optimiser les résultats individuels. (Source: Alford AI, Nicolaou D, Hake M, McBride - Gagy S. Masquelet's Induced membrane technique: Review of current concepts and future directions. *J Orthop Res.* 2021;39:707-718.) (3).

2.4.4.3. Caractérisations de la membrane induite

2.4.4.3.1. Rôle de la membrane induite

Le rôle de la membrane induite a été partiellement élucidé par plusieurs études, notamment celle de Klaue *et al.* de 2009 (54). Cette étude reposait sur l'analyse d'un modèle expérimental de defect osseux de 3 cm sur le fémur de moutons. Quatre groupes étaient formés et une 2^{de} étape réalisée à 4 semaines postopératoires (Figure 12). Un groupe comportait la TMI complète, l'autre groupe une greffe avec excision de la membrane induite, un autre groupe comportait

uniquement la membrane induite sans greffe et le dernier groupe comportait une excision de la membrane induite et une absence de greffe. Une analyse de la consolidation a été réalisée à 16 semaines entre ces 4 groupes par des moyens radiologiques, scanographiques et histomorphométriques. L'augmentation de l'aire de section osseuse sur site du defect était supérieure pour le groupe comportant la TMI complète en 2 temps (Figure 13). Les auteurs concluaient que la MI contribuait à une meilleure régénération osseuse avec un effet important et nécessaire de l'autogreffe associée.

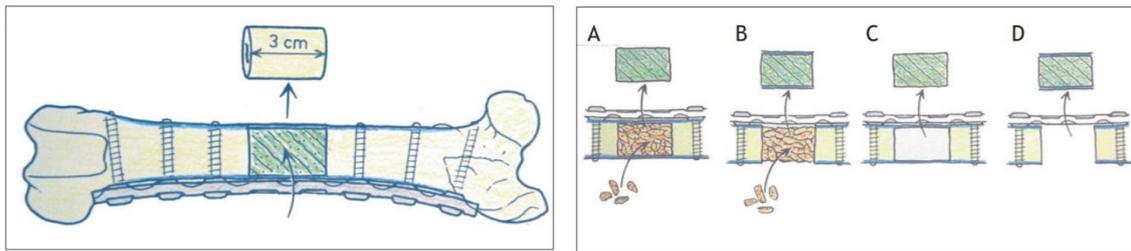


Figure 12. Techniques et groupes expérimentaux (A-D) dans l'étude de Klaue *et al.* (Source : Klaue K, Knothe U, Anton C, Pflugger DH, Stoddart M, Masquelet AC, Perren SM. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep. *Injury*. 2009 Nov;40 Suppl 4:S95-102.)(54).

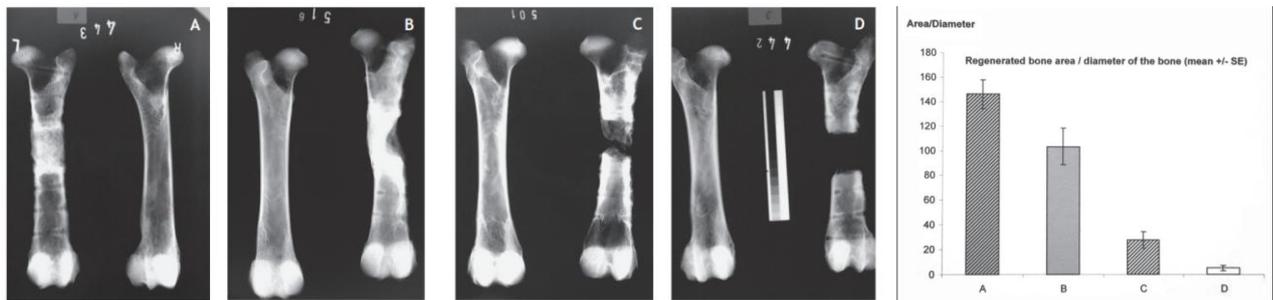


Figure 13. Résultats des 4 groupes (A-D) expérimentaux dans l'étude de Klaue *et al.* (Source : Klaue K, Knothe U, Anton C, Pflugger DH, Stoddart M, Masquelet AC, Perren SM. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep. *Injury*. 2009 Nov;40 Suppl 4:S95-102.)(54).

2.4.4.3.2. Nature de la membrane induite

La membrane induite présente également des caractéristiques histologiques et biochimiques spécifiques lui conférant cette capacité à autoriser la consolidation osseuse pour des defects massifs. L'étude de Pélissier *et al.* de 2004 a permis de mieux comprendre les constituants de cette membrane induite (55). Leur étude a consisté en l'insertion de cylindres de PMMA en sous-cutané chez des lapins, suivis d'une analyse à 2, 4, 6 et 8 semaines postopératoires. L'analyse microscopique révélait qu'à 2 semaines cette membrane présentait une face interne similaire à un épithélium pseudosynovial, tandis que la face externe comprenait des fibroblastes,

des myofibroblastes et une matrice collagénique. Des cellules géantes multinucléées étaient également présentes. Une vascularisation riche de capillaires parcourait la membrane induite, ce qui a été confirmé par une analyse spécifique d'immunofluorescence reconnaissant le VEGF. À 4 semaines, l'analyse révélait que le collagène était arrangé parallèlement à la surface de l'espaceur, puis la disposition devenait plus aléatoire en s'écartant de l'espaceur. Les capillaires et vaisseaux sanguins étaient de plus gros diamètre à la face externe de la membrane induite. L'analyse par extraction protéique révélait que des facteurs de croissance étaient présents dans la membrane induite notamment une haute concentration de VEGF, de TGF- β 1 et de BMP-2. Cette membrane induite était capable d'induire une prolifération cellulaire lorsque des fragments de celles-ci étaient ajoutés en milieu de culture de cellules souches mésenchymateuses humaines. Elle permettait également une différenciation ostéoblastique de ces cellules souches avec une forte présence d'activité PAL indiquant cette différenciation. L'expression génomique au sein de la membrane est en fait bien plus complexe et un modèle de defect fémoral de rats a permis d'isoler une augmentation d'expression de facteurs de croissance très divers notamment des BMPs, des Colony Stimulating Factor 1 (CSF-1), des FGF, des IGF, mais également des interleukines, des gènes codants pour l'expression de métalloprotéases (56).

Une analyse encore plus détaillée a pu être réalisée par Henrich *et al.* en 2016 et a permis de mieux caractériser la membrane induite sur le modèle de defect fémoral de rat (57). Dans ce modèle l'épaisseur de la membrane induite était 1055 μ m en moyenne à 4 semaines (Figure 14). L'intérêt de cette étude était de démontrer qu'il existait des différences en termes d'épaisseur de la membrane induite lorsque celle-ci était développée au niveau d'un defect osseux comparé à une implantation de ciment chirurgical en tissu sous-cutané. Cependant, l'organisation générale restait relativement similaire. La densité cellulaire des membranes induites autour des defects osseux était supérieure à celle des membranes induites en tissu sous-cutané.

Il était retrouvé des cellules souches mésenchymateuses dans les membranes induites au niveau d'un defect osseux, contrairement aux membranes induites en tissu sous-cutané. Les capacités ostéogéniques étaient également bien mises en évidence par la détection de marqueurs de différenciation ostéogénique tels que PAL et RUNX2. L'analyse en western-blot a confirmé la présence de BMP-2 et de TGF- β dans les membranes induites, mais aussi de facteurs de croissance de la vascularisation de type VEGF.

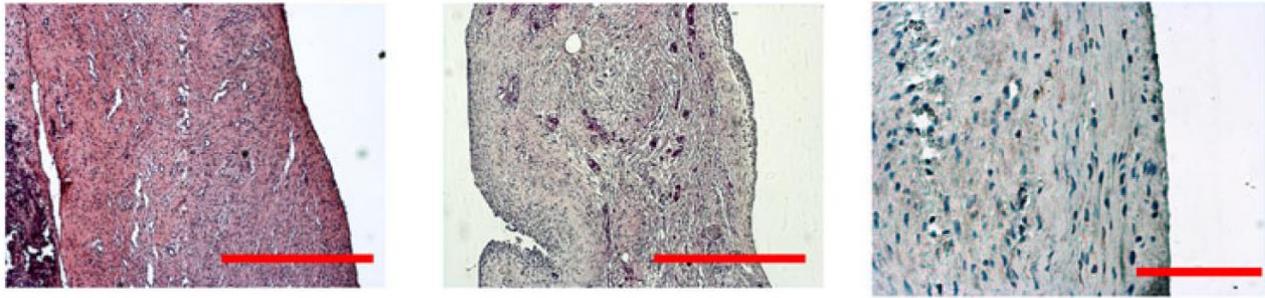


Figure 14. Coloration H&E comparant les membranes prélevées au niveau des defects osseux (gauche) et dans des poches sous-cutanées (centre), 4 semaines après l'intervention. Le ciment PMMA est situé à droite de la membrane. Barres = 500 µm. Image de droite : localisation et expression du VEGF dans les membranes prélevées au niveau des defects osseux à 4 semaines après l'intervention. Barres = 100 µm. (Source : *Henrich D, Seebach C, Nau C, Basan S, Relja B, Wilhelm K, Schaible A, Frank J, Barker J, Marzi I. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. J Tissue Eng Regen Med. 2016 Oct;10(10):E382-E396.*) (57).

Enfin, à côté des analyses confirmant les caractéristiques morphologiques de la membrane induite, sa composition cellulaire et l'expression de facteurs de croissance multiples, la différenciation ostéoblastique était bien mise en évidence. Néanmoins, les marqueurs de remodelage osseux n'étaient pas encore identifiés, notamment la présence d'ostéoclastes. C'est l'étude de Gouron *et al.* de 2017 sur un modèle de rat qui a pu confirmer que les cellules géantes multinucléées étaient positives aux marqueurs de différenciation ostéoclastique notamment au TRAP (58).

2.4.4.4.3. Analyses fondamentales chez l'homme

À côté des études analysant les caractéristiques et le rôle de la membrane induite *via* des modèles animaux, une étude fondamentale parue en 2013 a permis de mieux comprendre ses caractéristiques chez l'homme (59). Le rationnel de l'étude reposait sur le périoste. En effet, le périoste est important dans la formation et la régénération osseuse, car c'est un réservoir de cellules progénitrices ostéogéniques. Il s'agit d'un tissu très vascularisé et responsable de la formation de l'os cortical.

L'objectif de l'étude était d'analyser les éventuelles similitudes entre le périoste et la membrane induite. Il s'agissait d'une analyse capitale puisqu'elle reposait sur l'analyse de la membrane induite de 8 patients traités par cette technique. Une biopsie de la membrane induite et du périoste sain a été réalisée avec analyse histologique, de la composition cellulaire, et des facteurs de croissance exprimés. Une analyse de la capacité de différenciation des cellules a également été réalisée.

L'analyse morphologique confirmait une structure à deux faces avec une face externe riche en

fibroblastes et en collagène et une face interne contenant des précurseurs ostéogéniques. La membrane induite présentait une épaisseur médiane de 1422 μm (981-2126 μm), soit une épaisseur plus importante que le périoste (860 μm , extrêmes 468-1019 μm) ($p=0.032$).

Chez l'homme, la composition cellulaire entre MI et le périoste présentait des similitudes notamment la présence de vaisseaux sanguins (CD31⁺) et de péricytes (CD146⁺) en face externe, mais également de cellules souches mésenchymateuses en face interne (CD271⁺). La composition moléculaire était également similaire entre les deux tissus, avec présence de BMP-2, VEGF et SDF-1. Cependant, la quantité de cellules viables par gramme de tissu était différente entre la MI et le périoste. En effet, le nombre de cellules était 11 fois supérieur dans la MI comparé au périoste. Les cellules souches mésenchymateuses 15,5 fois supérieures, les péricytes 3 fois supérieurs, et enfin les lymphocytes 31 fois supérieurs dans la MI que dans le périoste.

Ce nombre important de lymphocytes dans la MI a fait l'objet d'études plus récentes permettant d'éclaircir leur rôle dans cette technique. Enfin, la confirmation que les cellules présentes étaient des cellules souches mésenchymateuses a été étudiée grâce à leur capacité de différenciation cellulaire : lorsqu'elles étaient mises en culture dans un milieu ostéogénique, elles induisaient d'une activité PAL caractéristique des ostéoblastes.

Ainsi, la membrane induite chez l'homme présentait des caractéristiques très proches de celles retrouvées dans les modèles animaux. Elle restait similaire, mais pas tout à fait identique au périoste. Sa richesse en cellules et en facteur de croissance en fait un tissu capital dans la régénération des pertes de substance osseuses.

De ces études fondamentales, il ressort qu'une MI sans greffe osseuse associée n'est pas efficace, une greffe osseuse isolée sans membrane induite se résorbe en cas de defect osseux trop important. L'un des points importants de cette membrane induite est qu'elle est vascularisée, avec un taux de $37,4 \pm 19,1$ vaisseaux sanguins/ mm^2 d'après l'étude de Niikura *et al.* (60), chez l'homme (36 patients) (Figure 15).

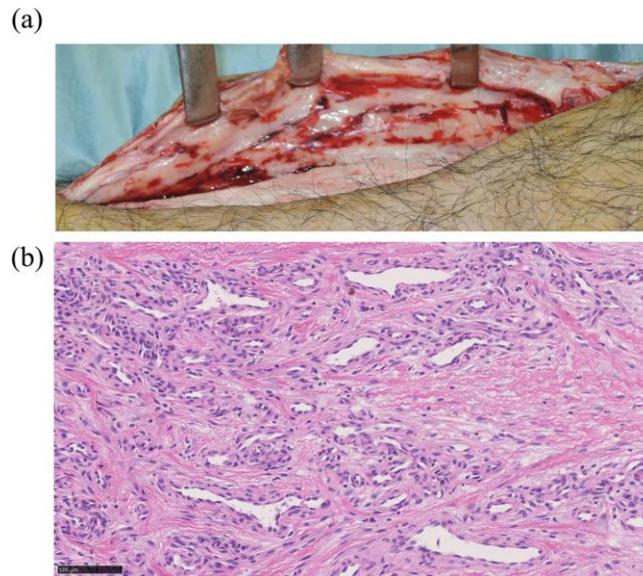


Figure 15. Images représentatives de la richesse en vascularisation de la membrane induite. a : L'image montre la membrane induite présentant une vascularisation abondante. b : Les résultats histologiques révèlent une formation riche en vaisseaux sanguins (coloration à l'hématoxyline-éosine). L'échelle indique 100 μ m. (Source : Niikura, T., Jimbo, N., Komatsu, M. et al. *Histological analysis of induced membranes in patients whose bone defects were treated with the Masquelet technique to identify factors affecting the vascularity of induced membranes. J Orthop Surg Res* **16**, 248 (2021)). (60).

Le dernier point souligné par plusieurs auteurs est la capacité de la MI à sécréter des facteurs de croissance en grande quantité et surtout le VEGF, le TGF- β 1, le BMP-2, ce qui permet d'expliquer ses capacités d'angiogenèse, son rôle dans de régulation des interactions entre ostéoclastes et ostéoblastes, et ses propriétés ostéoinductrices.

2.4.4.4.4. *Le rôle clé des macrophages récemment mis en évidence*

Nous avons pu voir que l'analyse de la membrane induite retrouvait un nombre très important de lymphocytes d'après l'étude de Cuthbert *et al.* (59). Les caractérisations préalables avaient cherché à comprendre la morphologie et les caractéristiques de la MI, mais elles n'avaient pas formellement analysé la composition de ces lymphocytes et notamment leur rôle.

En premier lieu, il était admis que la MI était une réaction à corps étranger en regard du PMMA et il était désormais nécessaire de comprendre comment cette réaction immunitaire entrainait en jeu dans sa formation. Plus récemment, des études se sont concentrées sur le rôle des macrophages dans la formation et les propriétés de la MI, un rôle qui pourrait avoir été sous-estimé jusqu'à présent (61).

En effet, tout matériel implanté dans le corps qui ne peut pas être dégradé sera enveloppé dans une « membrane à corps étranger » pour l'isoler (62,63). La compréhension et l'amélioration de l'interaction hôte-implant et, par conséquent, de la formation optimale de la MI pourraient

résider dans une meilleure orientation de la réponse macrophagique tissulaire.

Les macrophages sont constamment présents à l'interface hôte-implant et constituent la population cellulaire qui initie cette réaction à corps étrangers (64,65). De plus, les macrophages sécrètent une majorité de cytokines favorisant la prolifération, la migration et la différenciation des ostéoblastes, des cellules endothéliales et d'autres éléments constitutifs du tissu osseux, tout en stimulant l'angiogenèse et en contribuant au remodelage de la matrice tissulaire (Figures 16 et 17).

Les macrophages peuvent également stimuler directement la différenciation ostéogénique et la maturation des cellules précurseurs de l'os (66). La nature de cette sécrétion cytokinaire dépend du type de macrophages présents.

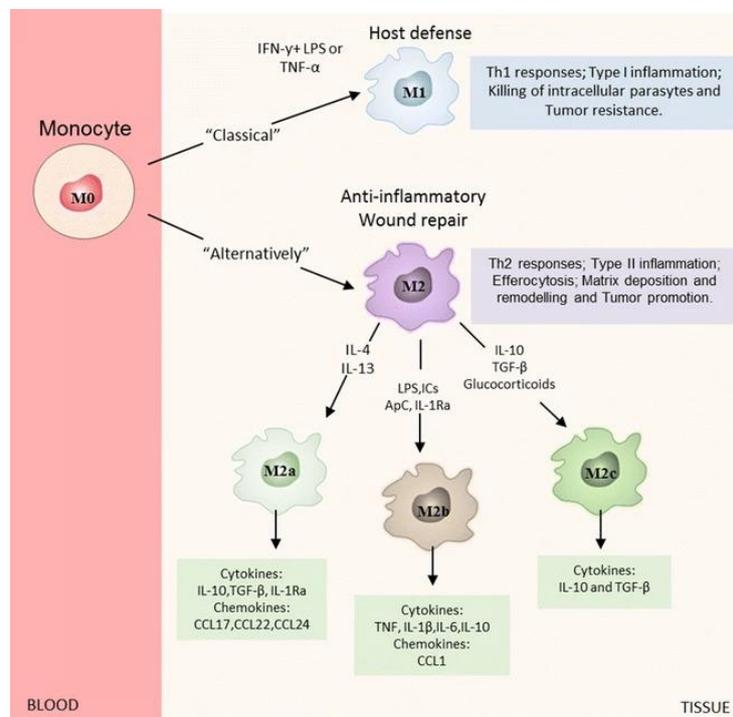


Figure 16. Représentation schématique de l'activation et de la polarisation des macrophages. Les macrophages classiquement polarisés (macrophages M1) sont activés par le LPS, l'IFN- γ et le TNF- α . Les macrophages M1 possèdent une forte activité microbicide, des fonctions immunostimulatrices et une cytotoxicité antitumorale. Les macrophages polarisés de manière alternative (macrophages M2) sont impliqués dans les processus anti-inflammatoires, la réparation tissulaire et la promotion tumorale. Les macrophages M2 se subdivisent en trois sous-types :M2a, M2b et M2c. Les interleukines IL-4 et IL-13 induisent systématiquement une polarisation en M2a. Les M2b sont activés par les complexes immuns (ICs), les récepteurs TLR ou l'IL-1ra. Enfin, les M2c sont polarisés par l'IL-10, le TGF- β ou les glucocorticoïdes. Chaque phénotype exprime un ensemble spécifique de cytokines, chimiokines et récepteurs. (Source : Navegantes, K.C., de Souza Gomes, R., Pereira, P.A.T. et al. *Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. J Transl Med* **15**, 36 (2017)). (64).

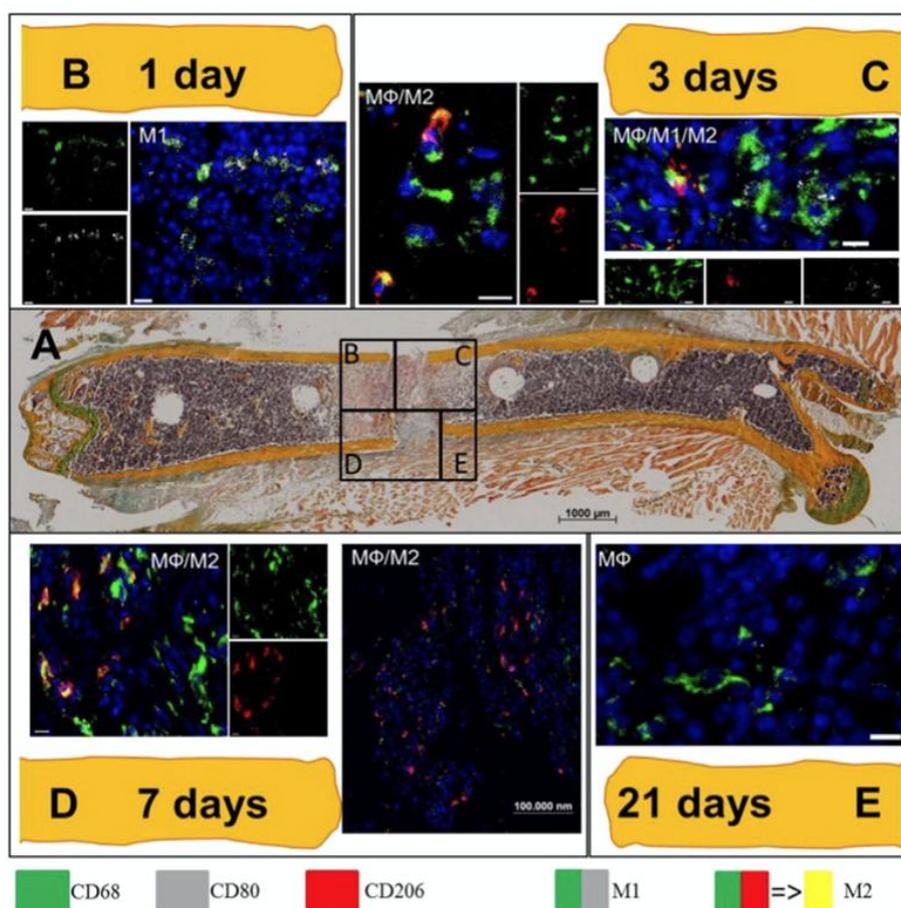


Figure 17. Évaluation de la répartition temporelle de la population macrophagique au cours de la consolidation d'une fracture par ostéotomie sur modèle murin. (Source : Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, et al (2018) *Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. Bone* 106:78–89). (66).

Cette étude a retrouvé que les macrophages M2 étaient clairement prédominants pendant la phase d'ossification. Par conséquent, l'amélioration du phénotype M2 dans les macrophages a été étudiée comme moyen de favoriser la cicatrisation osseuse, par une induction employant l'IL4 et IL13. Les données apportées par ces résultats confirment le rôle très important, non signalé jusqu'à présent des macrophages, dans l'ossification endochondrale et la nécessité d'un équilibre subtil dans la fonction des macrophages M1/M2, qui semble indispensable à la consolidation des fractures et à une régénération osseuse (66).

Au-delà de la présence des macrophages au cours d'une réaction à corps étranger et leur rôle dans la consolidation des fractures, plusieurs études récentes ont évalué l'origine des facteurs de croissance qui sont exprimés par cette membrane induite. Elles s'orientaient également vers la réaction macrophagique pour leur activité de sécrétion de cytokines. Le début de la réaction de formation de membrane induite est médié par des macrophages types M1 (pro-inflammatoires) puis la maturation s'orienterait progressivement vers l'augmentation des

macrophages M2 (anti-inflammatoires) (Figure 18).

Cependant une analyse des sous-types de macrophages M2 orienterait vers une plus grande proportion de sous-types M2b, ayant une sécrétion de facteurs de croissance également pro-inflammatoire (67).

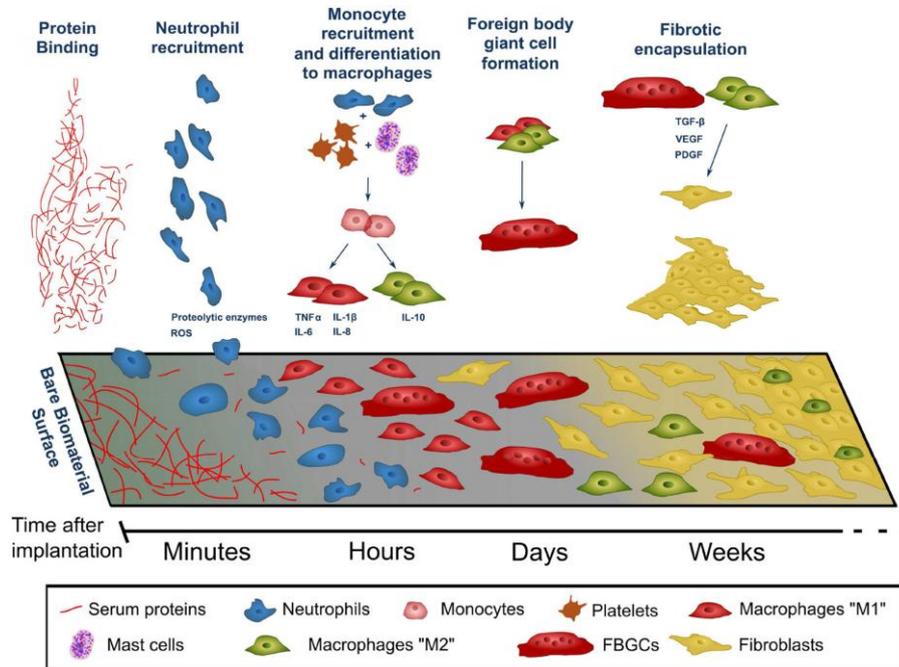


Figure 18. Chronologie des événements conduisant au développement de la réaction à corps étranger suite à l'implantation d'un matériau dans l'organisme. La composition de la population cellulaire adhérent à la surface de l'implant évolue au fil du temps après l'implantation initiale. Les facteurs libérés par les cellules (indiqués en bleu) contribuent au recrutement d'autres cellules et à la progression de la réaction à corps étranger. ROS : espèces réactives de l'oxygène. (Source : Carnicer-Lombarte A, Chen ST, Malliaras GG, Barone DG. *Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics*. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021, Apr 15;9:622524). (67).

Ainsi, la compréhension du type de recrutement macrophagique, mais également leur chronologie pourrait permettre d'optimiser la formation de la membrane induite. L'objectif *in fine* est de limiter les échecs de la TMI qui pourraient être liés à un défaut de recrutement macrophagique lors de la phase initiale de la réaction, ou bien un défaut de maturation de ces macrophages d'un type M1 pro-inflammatoire à un type M2 anti-inflammatoire.

En effet, il a déjà été démontré qu'un état inflammatoire prolongé pourrait retarder la consolidation osseuse en raison du défaut d'activation de macrophages M2, qui est nécessaire, car ils sécrètent des facteurs de croissance (par exemple PDGF ou VEGF) et des enzymes favorisant l'angiogenèse et la consolidation des fractures (68–70).

Plusieurs études avec une analyse *in vivo* ont été réalisées pour détecter quelle population de macrophages était représentée dans la MI. L'étude de Nikovics *et al.* a utilisé des analyses

spécifiques en complément de l'immunohistochimie habituelle (71). Sur des membranes induites de rats Sprague-Dawley, l'analyse immunohistochimique a recherché les cellules CD68⁺ et Iba-1⁺ (exprimées par M1 et M2) ainsi que les cellules CD163⁺ et CD206⁺ (exprimées par M2 uniquement) dans la zone du defect osseux et la zone de la membrane induite 3 semaines après la TMI.

Globalement, les deux populations étaient présentes, mais il y avait plus de macrophages M2 en face de la membrane induite. En outre, ils ont analysé les cytokines sécrétées et la présence de CD163⁺ pour détecter les sous-types de macrophages M2 présents. Ils ont constaté que les cytokines IL-1b et IL6 étaient les plus sécrétées, ce qui leur a permis de conclure que 68 % des cellules M2 étaient des cellules M2b (les seuls phénotypes à sécréter IL6 et IL-1B) (Figure 19).

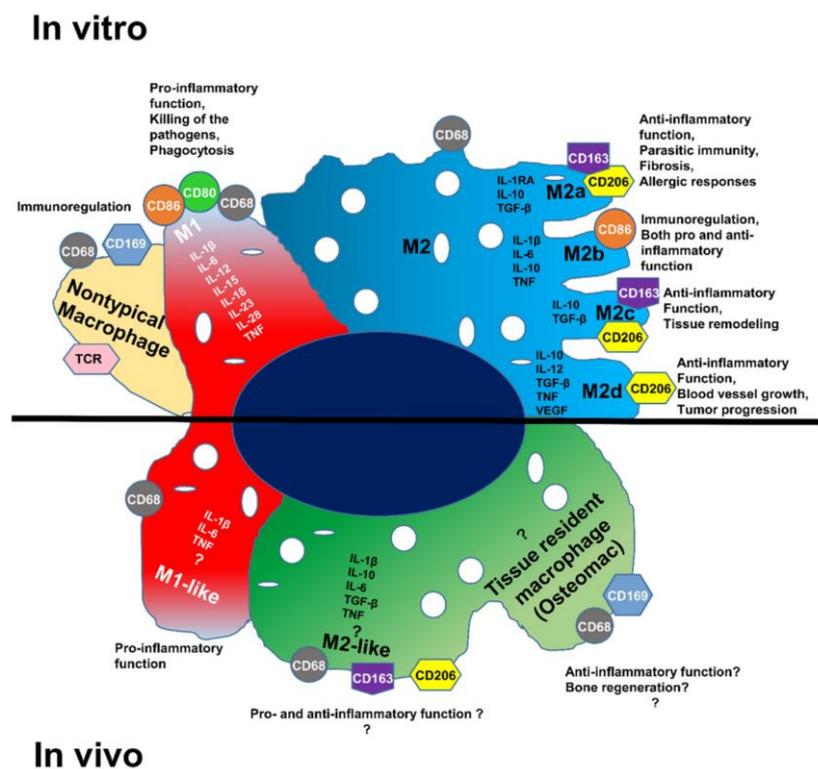


Figure 19. Sous-types de polarisation des macrophages ; différentes expressions de cytokines et fonctions des populations de macrophages *in vitro* et *in vivo*. (Source : Nikovics K, Durand M, Castellarin C, Burger J, Sicherre E, Collombet JM, Oger M, Holy X, Favier AL. *Macrophages Characterization in an Injured Bone Tissue. Biomedicines.* 2022 Jun 11;10(6):1385). (71).

L'étude de Durand *et al.* de 2022 sur rats Sprague-Dawley analysait les MI à 4 semaines de la technique. Ils comparaient le PMMA avec un autre matériau, le métakaolite (qui est une céramique). Une analyse immunohistochimique repérait le BMP-2, CD68 et CD206 avec pour supposition que CD68⁺ signifiait la présence de macrophages M1 et CD68⁺ et CD206⁺ signifiait la présence de macrophages M2. De plus ils retrouvaient les 2 populations, mais cette fois il y

avait plus de macrophages M1 (20 %) que de macrophages M2 (5 %). Ils concluaient que l'utilisation du seul marqueur CD68⁺ a pu augmenter le nombre de macrophages M1, car CD68 peut être exprimé par les cellules souches mésenchymateuses, les fibroblastes, les cellules endothéliales et tumorales *etc.* (72).

Enfin, l'étude de Kaneko *et al.* de 2024 comparait la réaction immunitaire en fonction du type de matériel utilisé pour la technique de MI (plaques, clou centromédullaire), à 4 semaines et sur des souris (73). L'analyse immunohistochimique recherchait CD68⁺ (considéré comme marqueurs de macrophages) et CD163⁺ (spécifique de M2). L'étude confirmait que pour la fixation par plaque, le nombre de cellules CD68⁺ était le plus important, de même que le nombre de cellules CD163⁺. Malheureusement, il n'y avait pas d'étude spécifique de M1 dans leur étude. Néanmoins, ils analysent les marqueurs à 1 semaine, 2 semaines et 4 semaines ce qui donnait une idée de la cinétique. On remarque qu'à 1 semaine, l'expression de CD68⁺ est très forte puis diminue à S2 et S4. L'expression de CD163 semble plus « constante » dans le temps. Si l'on part du principe que l'expression CD68⁺ représente en partie les cellules M1 (avec les autres) on peut penser qu'au début de la technique, il y a beaucoup de macrophages M1 (proinflammatoires), mais qu'ensuite il y a une modification du phénotype en M2 (anti-inflammatoire) avec le temps (c'est une explication également donnée par Durand *et al.* 2022), mais que ces cellules M2 expriment des cytokines également proinflammatoires, car elles seraient de type 2b (étude de Nikovics *et al.* 2022).

Ainsi, les points clés pour développer une membrane artificielle remplaçant la MI résident dans l'augmentation du recrutement des monocytes/macrophages au niveau du defect ; l'activation rapide des macrophages pro-inflammatoires M1 au stade initial de la réaction à corps étranger; la régulation et l'équilibrage de la transition des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire de type M2 afin d'améliorer la régénération osseuse et la consolidation de la greffe, notamment en empêchant la stagnation du phénotype inflammatoire M1.

2.4.4.4.5. Caractéristiques biomécaniques de la membrane induite

Les propriétés mécaniques de la MI sont peu étudiées dans la littérature. Certains auteurs ont comparé la MI au périoste, comme Cuthbert *et al.* (59) tout en soulignant les différences en termes de densité de population cellulaire. De fait, certains auteurs ont pu nommer la MI « périoste induit ». Nous avons brièvement analysé la littérature sur les propriétés mécaniques connues du périoste et de la MI pour tenter de développer une membrane artificielle (MA) pouvant partager leurs propriétés.

Bertam *et al.* reportaient déjà en 1998 une étude sur la tension et l'adhésion du périoste à l'os dans un modèle de tibia aviaire. Ils confirmaient que le périoste avait une réponse non linéaire à l'étirement et que cet étirement était fonction de l'intensité de la contrainte qui lui était appliquée (74).

Yiannakopoulos *et al.* affirmaient que le périoste était un véritable support mécanique des os longs avec une augmentation de la résistance des os longs au test de flexion en trois points, comparés à une ablation du périoste (modèle de rat Wistar) (75).

McBride *et al.* ont étudié un modèle ovin et analysaient des fragments de périoste longitudinaux et circonférentiels aux os longs. Dès l'ablation du périoste, ceux-ci se rétractaient de manière différente en fonction de l'orientation des fragments prélevés : de 33 à 47 % sur un fragment parallèle aux os longs, à 9-19 % sur un fragment perpendiculaire aux os longs. Cela confirmait donc que les fibres du périoste étaient orientées spécifiquement dans le sens des os longs, avec un comportement anisotrope, et que ce tissu était préstressé, étant donné la rétraction subie dès son ablation.

De même, aux tests d'étirement, le périoste « longitudinal » aux os longs avait une zone d'élasticité, puis une zone de transition avant d'avoir un comportement plus rigide (Figure 20). Le périoste prélevé perpendiculairement aux os longs n'avait qu'un comportement élastique (76).

Cela montre que le périoste présente des caractéristiques mécaniques spécifiques et que sa compréhension peut servir à la conception de membranes induites artificielles mimant ces propriétés.

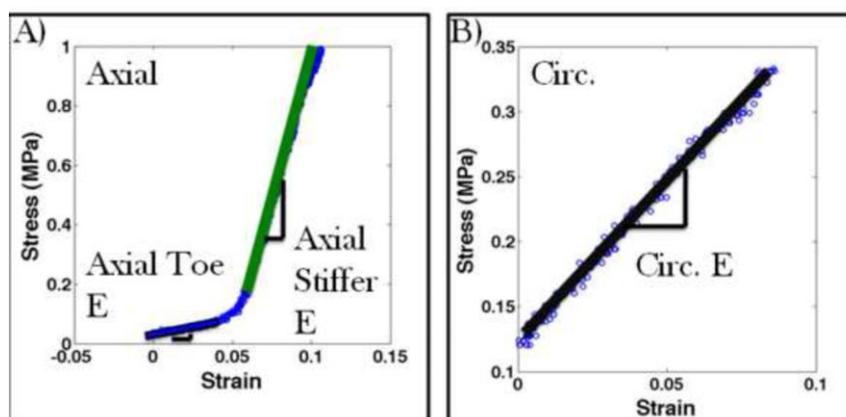


Figure 20. Comportement mécanique du périoste ovin aux tests d'étirement sur fragment de périoste longitudinal (A) et circonférentiel (B) aux os longs. (Source : McBride *et al.*) (76).

La publication de Evans *et al.* a permis de mieux comprendre cette fonction du périoste en y précisant ces composants histologiques : il présente en effet une structure composée d'une

couche fibreuse externe et d'une couche cambiale interne. La couche externe contient des fibroblastes, des fibres de collagène, des microvaisseaux, et surtout de l'élastine (77). Les fibres de collagène sont alignées axialement (78) et une forte densité d'élastine est retrouvée dans le périoste diaphysaire (79,80), ce qui confère probablement la résistance mécanique (structurale) du périoste, tout en participant à la résistance des os longs aux contraintes axiales (75,81).

Gaio *et al.* ont étudié la résistance de la MI prélevée sur un modèle de rat. Il s'agissait des seules données sur MI dans la littérature à notre connaissance. Le module d'Young retrouvé était entre 55 et 75 MPa en fonction du matériau ayant été testé pour induire une membrane (82). La contrainte maximale moyenne avant rupture était située entre 0,21 et 0,28 MPa et la déformation maximale de la MI était entre 1,5 et 2,9 %.

Les seules données humaines sont assez récentes et concernaient le périoste. Le module d'Young moyen était de 97,8 MPa et une contrainte avant rupture maximale de 9,8 MPa (83). Ces données pouvaient aider notre travail de thèse en gardant en tête qu'une MA devait au moins partager une partie de ces capacités, notamment une certaine élasticité et une contrainte relativement importante avant rupture.

Étant donné qu'un modèle animal de MI se concentre essentiellement sur des pertes de substance diaphysaire des os longs, nous avons opté pour le développement d'une MA élastique (pour partager l'élasticité due à l'élastine mise en évidence dans le périoste, même si ce tissu n'est pas la MI). D'un point de vue chirurgical, la manipulation d'une MA relativement élastique dans un milieu assez agressif (esquilles osseuses, matériel d'ostéosynthèse métallique type cerclages *etc.*) semblait être également un atout pour s'assurer de ne pas manipuler un matériau qui ne supporterait pas les contraintes opératoires et la manipulation chirurgicale dans des terrains exigeants.

2.4.4.4. Résultats cliniques et problématiques encourus de la technique

La technique de la membrane induite (TMI) a gagné en popularité dans la gestion des fractures non consolidées et des défauts osseux importants. Elle est moins compliquée à réaliser que d'autres techniques (telles que la greffe de fibula vascularisée ou le transport osseux) et le temps de consolidation n'est théoriquement pas affecté par la taille du défaut (82). Cependant, pour une faible proportion de patients, toutes ces techniques de reconstruction conventionnelles échouent. Cela peut être dû à l'insuffisance des sites donneurs disponibles pour une greffe osseuse étendue et aux limites pratiques observées avec des techniques complexes, telles que l'ostéogénèse par distraction (par exemple, longue phase de consolidation, inconfort du patient, douleurs, infections *etc.*) et la greffe osseuse (résorption osseuse, absence de consolidation,

fractures des allogreffes *etc.*).

Mi *et al.* ont réalisé une revue systématique de la littérature afin d'analyser les succès, mais aussi les échecs de la TMI (1). Ils ont pu inclure 41 études regroupant 677 patients âgés en moyenne de 40,2 ans et majoritairement des hommes. Le tibia était le site le plus fréquent (59,1 %), suivi du fémur (22,7 %). Les defects avaient une longueur moyenne de 6,32 cm (2-25 cm). Le délai entre la 1^{re} et 2^e étape de la TMI était de 10,85 semaines (4-25,7 semaines). D'emblée, nous pouvons souligner ce délai entre les 2 étapes pour un defect segmentaire concernant le membre inférieur dans pratiquement $\frac{3}{4}$ des cas. Entre les 2 étapes, les patients n'ont pas la possibilité de prendre appui sur le membre inférieur.

Si la stabilisation se fait au moyen d'une fixation externe, la mobilisation simple des articulations sus et sous-jacentes au defect peut être source d'inconfort voire de douleurs, limitant ainsi l'entretien des amplitudes articulaires et de la trophicité musculaire. Cela grève le résultat fonctionnel final des patients, d'autant plus que cela retarde le retour aux activités personnelles et professionnelles. En considérant la consolidation comme *outcome* principal, le taux de succès était de 88,82 %, puis de 92,35 % en comptant les opérations successives de gestion des complications. Le temps de consolidation après le 2^e temps était conséquent : 8,2 mois en moyenne (2,8-12 mois).

Enfin, le nombre de complications total était de 177 soit 26 % de la cohorte. Parmi elles, 6 refractures, 55 infections profondes, 61 (9 %) non-consolidations, 6 fractures d'implant et 20 (3 %) cals vicieux. Les auteurs se sont intéressés à comparer ce taux de succès et de complications à la principale alternative qu'est le transport osseux, sans retrouver de différences entre les 2 techniques (sauf pour le taux de refracture supérieur pour le transport osseux). La combinaison des échecs et complications qui peuvent être strictement corrélés à la TMI dépassait ainsi 10 %, ce qui peut paraître faible de prime abord, mais ces complications engendrent un coût socio-économique bien plus élevé pour ces patients.

La revue systématique de Morelli *et al.* datant de 2016 avait inclus des complications non liées strictement à la TMI (17 études, 427 patients) (84). Ils retrouvaient ainsi un taux de complications bien plus élevé, de 49,6 % (212 patients). L'échec de la TMI correspondait à 77 cas (18 %), soit bien plus que l'étude de Mi *et al.* De plus, ils ont pu établir un taux de raideurs articulaires de 15,2 % (65 cas) et un temps avant remise en charge après le 2^e temps qui était en moyenne de 5 mois.

Ces constatations confortaient l'importance de devoir optimiser la TMI qui restait une technique reproductible, ne nécessitant pas de moyens techniques onéreux (tels que les anastomoses microvasculaires, clous centromédullaires d'allongements...) par le biais d'une technique en

une seule étape si possible et utilisant des moyens d'ingénierie tissulaire ou le développement de biomatériaux permettant d'en accélérer les résultats.

Enfin, Mathieu *et al.* ont réalisé une analyse critique de la littérature sur la TMI et proposaient une classification des échecs : septiques, mécaniques et biologiques (2). Les échecs de causes septiques et mécaniques doivent être gérés par une technique rigoureuse du parage lors de la TMI, associée à une fixation la plus stable possible. Les échecs d'origine biologiques restaient plus complexes à gérer pour le praticien, en dehors des comorbidités du patient qui peuvent être améliorées (arrêt du tabagisme par exemple).

Elles sont liées à l'altération des propriétés ostéogéniques et angiogéniques des MI qui peuvent être dues à des patients « non-répondeurs » comme l'ont suggéré Durand *et al.* (85), ou bien des patients présentant une immunodépression d'ordre pharmacologique (consommation d'anti-inflammatoires) ou pathologique (maladies dysimmunitaires, inflammatoires *etc.*).

Ainsi, malgré les multiples applications cliniques de la TMI, certains aspects de la technique font l'objet d'un débat permanent, et beaucoup de ces questions sont difficiles à étudier cliniquement.

Le premier axe de discussion concerne la nécessité d'avoir recours à au moins 2 interventions pour pouvoir mener à bien cette technique. Nous avons déjà mentionné que cette double chirurgie engendre une réduction d'autonomie significative pour le patient (pendant plusieurs mois), le temps d'obtenir une MI apte au second temps de la technique.

Deuxièmement, la formation de la MI reste une réaction « à corps étranger » et cette réaction est dépendante de la réaction de chaque organisme à l'implantation du ciment en PMMA. Cependant, cette réaction n'est pas identique et certains individus semblent être « non-répondeurs » à cette technique, comme l'ont récemment publié Durand *et al.* (85).

Enfin, lorsque les patients sont confrontés à une perte de substance osseuse massive, l'un des problèmes devient l'obtention d'autogreffe en quantité suffisante pour combler cette perte de substance. Cette autogreffe massive peut être à l'origine d'une morbidité supplémentaire pour le patient, avec des complications souvent mineures (gêne ou douleur au site de prélèvement), mais aussi parfois majeures (fractures, lésions nerveuses, infection du site de prélèvement...). Morelli *et al.* ont retrouvé par exemple un taux de 5 % de morbidité du site donneur (Figure 21).

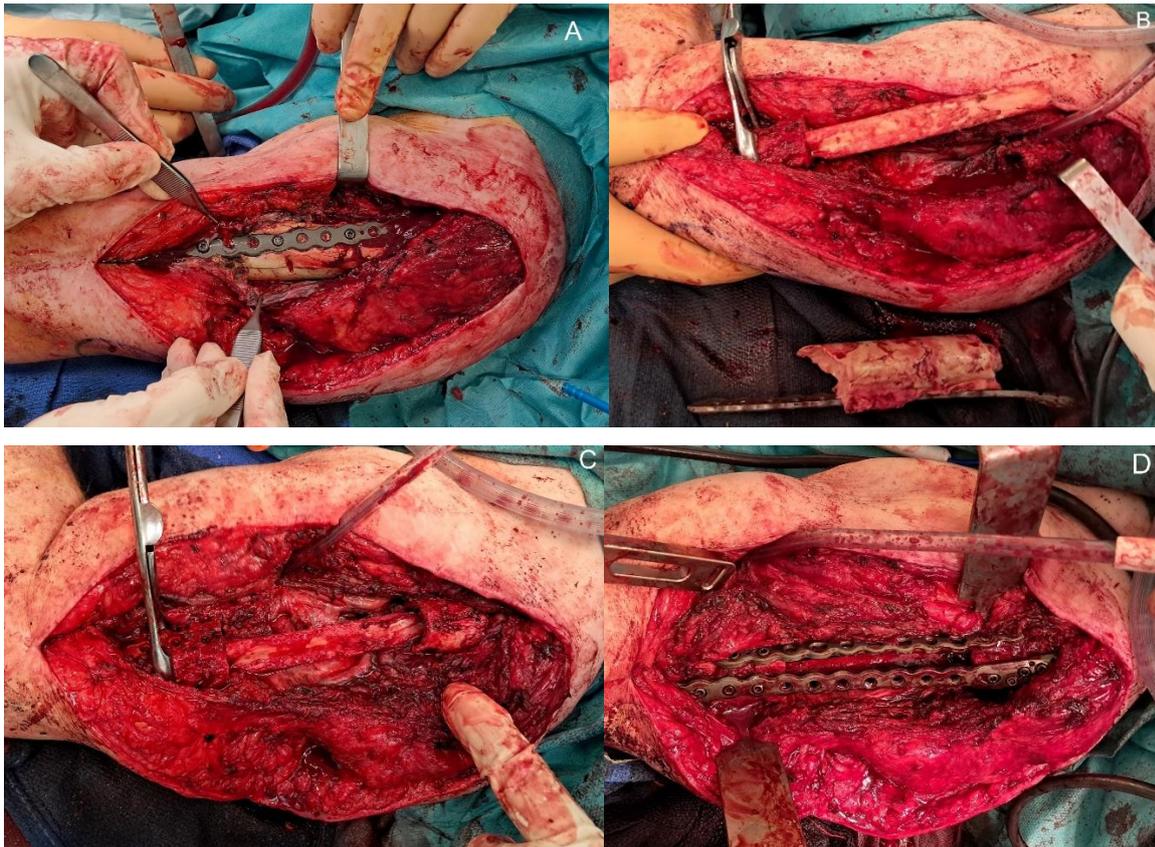


Figure 21. Photographies opératoires d'un cas clinique de perte de substance osseuse humérale gauche, pris en charge dans le service d'orthopédie du CHU de Lille. Ce cas représente les problématiques rencontrées chez les patients atteints d'une perte de substance osseuse post-traumatique. Il s'agit d'un patient jeune, pris en charge pour fracture complexe humérale, initialement opérée par ostéosynthèse, ayant évolué en pseudarthrose. Plusieurs tentatives de cures de pseudarthroses ont été réalisées, mais se sont soldées par des échecs, rendant le prélèvement des crêtes iliaques impossible. Un 1^{er} temps de TMI est réalisé. (A) : Aspect après abord chirurgical latéral de l'humérus ; la MI est tenue par les pinces. (B) : Aspect après parage : le defect huméral dépasse 10 cm après excision des tissus osseux nécrotiques, la prise de greffon iliaque n'est plus possible chez ce patient devant les multiples chirurgies précédentes. (C) : La prise en charge consiste à prélever et impacter en bilboquet une fibula homolatérale au sein du defect. (D) : Montage final avec 2 plaques d'ostéosynthèse et la fibula en bilboquet dans la partie proximale et distale de l'humérus. Il ne persiste que la face médiale de la MI à la fin de l'intervention.

C'est pourquoi plusieurs modèles animaux ont été développés pour répondre à ces problématiques afin de mieux caractériser la MI, de tester l'effet des variations de paramètres sur la formation de la membrane et la consolidation osseuse qui s'ensuit, élaborer et évaluer des membranes artificielles ou des scaffolds phosphocalciques ostéoconducteurs voire inducteurs (86).

C'est dans cette optique que cette thèse s'inscrit, en prenant la direction de développer des membranes artificielles autorisant un geste en un seul temps et permettant d'obtenir une consolidation plus rapide par le biais d'une évaluation *in vivo*.

La conception d'un modèle *in vivo* fiable et reproductible passe par une analyse complète de la littérature nous ayant permis d'évaluer nos membranes artificielles et cette revue de la littérature est présentée ci-dessous.

2.5. Les modèles animaux d'étude de la membrane induite et des stratégies de reconstruction osseuse

La complexité de la formation de la MI, et de la consolidation osseuse rend l'étape de l'évaluation *in vivo* incontournable dans l'étude de biomatériaux.

Dans cette thèse, une analyse complète de la littérature a été menée dans l'objectif de concevoir et d'éprouver un modèle animal compatible avec l'évaluation des membranes artificielles conçues et évaluées *in vitro*.

Les modèles animaux étudiant la MI, les MA et/ou des biomatériaux phosphocalciques sont répartis en modèles de petite taille et de grande taille. Le tableau 3 résume les caractéristiques des modèles animaux retrouvés dans la littérature étudiant la régénération des defects osseux segmentaires critiques des os longs (90 études), similaires aux applications de nos MA.

2.5.1. Les modèles animaux de petite taille

Les modèles de petits animaux, caractérisés par leur ratio coût-efficacité avantageux, leur plus grande faisabilité et leur acceptation éthique élevée, sont fréquemment utilisés, au moins initialement, en régénération osseuse.

Les modèles de defects osseux chez les petits animaux servent à l'évaluation initiale *in vivo* en recherche fondamentale ou lors des tests de screening des candidats biomatériaux afin de déterminer la nécessité de poursuivre les essais précliniques à l'échelle des grands animaux (87).

Cependant, ces modèles présentent certaines limitations, notamment un remodelage cortical et une formation d'ostéons secondaires plus limités ou plus rapides que chez l'humain, ainsi qu'une composition de l'os cortical (par exemple, hydroxyproline et teneur en protéines) différente de celle de l'homme (88).

Le succès de la réalisation des modèles de defect osseux segmentaire chez le petit animal joue un rôle essentiel dans les avancées de la recherche fondamentale et sur les applications cliniques en ingénierie du tissu osseux et comprend les lapins, les rats et les souris.

L'analyse de la littérature mettait en évidence que 60 des 90 études analysées (67 %) employaient ces petits animaux. Le modèle de rat était majoritaire (31 études) suivi du lapin (21 études) et enfin de souris (8 études).

2.5.1.1. Le modèle de rat

Ce modèle était le plus fréquemment utilisé dans les études précliniques sur la technique de la membrane induite (TMI), représentant à lui seul un tiers des études incluses dans cette revue de la littérature.

Parmi les espèces utilisées, le rat Sprague-Dawley est le modèle de référence, suivi par le rat Wistar. Le principal avantage du Sprague-Dawley réside dans son caractère non consanguin, ce qui permettait de répliquer la variabilité biologique observée chez l'humain et obtenir des résultats plus représentatifs. La quasi-totalité des études a été menée sur des rats mâles, à l'exception de 3 études (89–91).

L'âge moyen des rats était de 12 ± 4 semaines (extrêmes 7,5 – 24), ce qui correspondait à la maturité squelettique, un critère essentiel pour garantir la pertinence des résultats. Le modèle de defect le plus courant est le defect fémoral, employé dans la quasi-totalité des études (une seule étude s'étant focalisée sur le tibia (92)). L'ostéosynthèse la plus répandue repose sur une fixation rigide par plaque vissée, bien que certaines études aient expérimenté des alternatives comme le fixateur externe ou l'enclouage centromédullaire. La taille moyenne du defect fémoral était de $7,3 \pm 2,1$ mm, permettant d'établir un modèle de perte de substance osseuse critique.

Ce modèle a permis de détailler la formation de la MI et de sa composition aux niveaux tissulaire, cellulaire et génétique (57,93,94). Il a aussi servi de plateforme d'évaluation pour des stratégies innovantes, visant à remplacer la TMI en deux temps par une approche en un temps unique. Ces stratégies impliquent généralement des approches en un seul temps combinant une membrane artificielle à base de polymères naturels ou synthétiques, combinés à des matrices phosphocalciques (45,47,90,91,95–97), et/ou des facteurs de croissance (BMPs) (44,90,91,96–99). D'autres études ont évalué l'effet des antibiotiques sur la qualité de la MI (100,101).

Lorsque la membrane induite biologique était utilisée (comme contrôle ou sujet d'étude), la durée moyenne avant le 2^d temps chirurgical ou avant analyse de la MI était de $4,8 \pm 2,6$ semaines. Parmi les études incluses, 14 ont réalisé une analyse à 4 semaines, ce qui représente le délai le plus fréquemment observé. Le suivi moyen des animaux variait entre $4,97 \pm 3$ semaines et 10 ± 4 semaines, avec plusieurs études intégrant 2 à 3 points d'analyse pour affiner

la caractérisation des résultats.

Un atout majeur du modèle fémoral chez le rat est que la stabilisation du segment osseux est similaire à celle pratiquée en clinique humaine. Le fémur est systématiquement stabilisé par ostéosynthèse rigide, permettant la déambulation du rat tout en assurant des conditions optimales de consolidation osseuse. La petite taille du rat impose une contrainte technique, un defect de taille critique allant jusqu'à 10 mm reste réalisable, bien que la stabilité semblait plus précaire au-delà de cette limite, pouvant introduire une variabilité dans les résultats (102,103). L'utilisation d'une autogreffe prélevée aux dépens des vertèbres caudales du rat représente un autre avantage : cette technique est relativement aisée, bien tolérée, et permet de limiter l'usage d'allogreffes, moins courantes en clinique humaine. De plus, elle réduit le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation, en accord avec les principes éthiques des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement).

Ainsi, en raison de sa faisabilité, de sa robustesse et de sa pertinence expérimentale, le modèle du rat Sprague-Dawley est l'un des plus utilisés pour l'évaluation *in vivo* de régénération osseuse (104).

Cependant, les limites de ce modèle existent aussi. Comparés aux modèles animaux plus grands (lapin, chien, porc), les rongeurs possèdent des os longs plus petits, avec des corticales plus minces et fragiles. En outre, les rongeurs ne présentent pas de remodelage cortical de type haversien, contrairement aux animaux plus grands. Contrairement à l'os secondaire présent dans les corticales des os longs de l'homme adulte, les corticales des os longs des rongeurs sont principalement constituées d'os primaire (105). Enfin, la croissance osseuse chez les rats se poursuit beaucoup plus longtemps après la maturité sexuelle que chez l'homme (106).

Malgré ces limites structurelles, le modèle de rat reste le plus pertinent pour les études précliniques de la TMI en raison de sa standardisation, de sa facilité d'utilisation, de son faible coût et de son excellent niveau de reproductibilité. Il permet d'obtenir des résultats robustes et transposables tout en réduisant les contraintes éthiques et financières liées aux modèles plus grands.

2.5.1.2. Le modèle de souris

Les études retrouvées employaient des souris de type C57BL/6 (7/8 études) de sexe variable. Aucune étude n'évaluait la MI et leur objectif était plutôt d'évaluer plusieurs approches (polymères, matériaux phosphocalciques, injection de médicaments, transfert de gènes) en une stratégie en un seul temps. Ce modèle de rongeur est très peu utilisé, principalement du fait de la très petite taille des os longs.

Presque toutes les études réalisaient des défauts fémoraux de 4 mm (6/8 études) stabilisés par des aiguilles ou des broches centromédullaires. Comme pour le modèle de rat, le fémur de la souris est relativement facile d'accès sur le plan chirurgical, ce qui permet des interventions reproductibles, et il permet de créer des défauts segmentaires. Cependant la stabilisation de ce modèle semble relativement difficile (emploi d'aiguille ou de broches centromédullaires), ce qui peut rendre la synthèse instable ou difficile.

2.5.1.3. *Le modèle de lapin*

Le modèle de lapin était le 2^e modèle le plus fréquemment utilisé et 17/21 études utilisaient le lapin New Zealand. En effet, les lapins présentent l'avantage, par rapport aux modèles animaux de grande taille, d'atteindre la maturité squelettique à un âge relativement précoce et, par rapport aux rongeurs, de subir un remodelage ostéonal secondaire plus important (105). Cependant, le remodelage de l'os cortical est rapide chez les jeunes lapins, souvent utilisés dans les études, ce qui peut être moins représentatif de la consolidation de l'homme adulte (107). Le sexe des lapins était variable et plusieurs études ne rapportaient pas cette donnée.

Kawebulum *et al.* ont démontré que les lapins blancs New Zealand atteignent la maturité squelettique entre l'âge de 19 et 24 semaines sur la base de l'examen de la structure des tissus et de l'imagerie de l'extrémité inférieure des os de la cuisse, de l'extrémité supérieure du tibia (108). La moyenne d'âge retrouvée dans notre étude de la littérature était de 26 ± 12 semaines. Plusieurs études employaient des lapins plus jeunes, âgés de 12 à 16 semaines (109–111).

Ce modèle se distingue par la multiplicité des sites de défauts segmentaires réalisés pour analyser la régénération osseuse : ulna (8/21), radius (9/21), fémur (3/21) et tibia (1/21). Les chercheurs tendaient à réaliser un défaut segmentaire sur l'un ou l'autre des os de l'avant-bras, car il n'était ainsi pas nécessaire de stabiliser le défaut osseux, l'os adjacent servant de moyen de stabilisation. Cela permettait pour plusieurs études de réaliser une intervention bilatérale, diminuant ainsi le nombre d'animaux requis (110,112–115).

Bien que rendant l'intervention plus simple, ce modèle ne se rapprochait pas de la réalité clinique, car chez l'humain, une stabilisation était nécessaire pour espérer une consolidation en cas de greffe simple d'un défaut ou bien lors de l'utilisation de la TMI, même à l'avant-bras. De plus, Xie *et al.* ont démontré que l'absence de stabilisation du défaut entraînait une MI de moins bonne qualité histologiquement et en termes d'expression de facteurs de croissance (116). Dans cette optique de se rapprocher de la TMI chez l'homme, Shibahara *et al.* avaient systématiquement réalisé une ostéosynthèse du défaut segmentaire ulnaire de leur modèle (117). Un autre élément rapporté par El Backly *et al.* était que lors de la création d'un défaut radial ou

ulnaire, une ossification du foyer ostéotomisé pouvait avoir lieu à partir de l'os non opéré, formant ainsi une synostose radio-ulnaire. Ceci pouvant biaiser le résultat des études utilisant ce modèle, ils proposaient d'isoler le defect par l'ajout d'une membrane en e-PTFE (polytetrafluoroethylene) autour de l'os adjacent au defect (118).

Le defect segmentaire à l'avant-bras était de 15 mm pour le plus fréquent (10/17 études), avec une moyenne de $15,4 \pm 5,7$ mm. Ce modèle a été très souvent utilisé pour étudier une stratégie en 1 temps employant de multiples scaffolds phosphocalciques, céramiques (111,119), ou métalliques (alliage Mg-Zn (114), Mg-Sr (115)). L'adjonction de membranes artificielles en polymères synthétiques ou naturels était également retrouvée (PLA(113,120,121)).

L'analyse de la MI était plus rare, mais le temps de formation de la MI avant analyse était compris entre 2 et 8 semaines (avec parfois analyse à plusieurs points temporels) (110,113,116,119,122–125). Enfin, l'analyse de la consolidation osseuse avait lieu à plusieurs points temporels et était assez variable selon les études, comprise entre $5,4 \pm 3,3$ et $10,6 \pm 3,5$ semaines en moyenne pour les bornes inférieures et supérieures.

2.5.2. Les modèles animaux de grande taille

Lorsqu'il s'agit d'introduire une technique, un biomatériau ou un dispositif médical particulier dans le domaine clinique, notamment en ce qui concerne les defects osseux de taille critique, un modèle animal de grande taille est nécessaire pour démontrer une capacité de translation suffisante. Les grands animaux présentent des similitudes physiologiques avec les humains en termes de structure anatomique, de signes vitaux, de microarchitecture et de remodelage osseux ainsi que du processus de consolidation, ce qui explique leur sélection fréquente dans les dernières étapes de la recherche préclinique translationnelle (126).

Les modèles de grands animaux posent cependant plusieurs problèmes à l'expérimentation, tels que la nécessité de créer des environnements adaptés, l'investissement financier important qu'ils requièrent, ainsi que les difficultés liées à l'approbation éthique et morale de leur utilisation, qui sont souvent plus complexes par rapport aux modèles de plus petite taille. Néanmoins, ces animaux, tels que les moutons, les chèvres, les canidés, et les porcs, sont utilisés, car ils offrent des avantages indéniables pour évaluer la biocompatibilité et l'efficacité des biomatériaux dans des conditions proches de celles observées chez l'homme.

2.5.2.1. Le modèle de chien

Les chiens font preuve d'une grande capacité d'adaptation et d'une excellente résilience, ce qui les rend tout à fait adaptés à l'expérimentation animale. L'os canin et l'os humain présentent des

similitudes, notamment la formation d'ostéons secondaires, la fusion épiphysaire après la maturité, une activité comparable de remodelage intracortical (127) et une perte osseuse associée à l'âge (128). Les deux espèces ont également un poids et une densité osseuse similaires, ainsi qu'une composition des fractions organiques, inorganiques et de l'eau de l'os (127,129).

Cependant quelques différences sont à noter : la microstructure osseuse chez les chiens présente une architecture ostéonale existant dans la partie centrale de l'os cortical, avec de l'os lamellaire dans les zones endostéales et périostéales ce qui diffère des humains. Bien que le remodelage osseux se produise à un rythme plus rapide chez le chien que chez l'homme, la microstructure de type haversien de l'os cortical est similaire entre les 2 espèces et permet une proximité biomécanique intéressante en recherche préclinique (130).

Le beagle est l'espèce la plus souvent utilisée, mais le modèle de defect concernait à la fois le radius (131), l'ulna (132), le fémur (133) ou le tibia (134), avec ou sans fixation associée. La recherche sur le modèle de defect osseux segmentaire critiques des os longs du chien est relativement limitée, étant donné la grande difficulté d'acceptation sociale et éthique de l'utilisation de ces animaux à des fins scientifiques.

2.5.2.2. Le modèle de porc

Les modèles de porcs sont intéressants, car ils possèdent un os lamellaire de type haversien ainsi qu'un taux de remodelage osseux similaire aux humains. Ils possèdent une phase juvénile et une phase de maturation squelettique adulte également (135–137). Cependant, ils ont un os trabéculaire plus dense que l'humain (127). De plus, leur entretien exige un environnement adapté, incluant des soins et une alimentation spécifique, ce qui peut être très coûteux, de même que leur difficulté à être manipulés, avec un risque d'agression.

Les porcs sont généralement considérés comme indésirables pour la recherche orthopédique en raison de leur taux de croissance élevé et de leur poids corporel très important. Toutefois, le développement de porcs miniatures (minipigs) et de microporcs (micropigs) a permis de surmonter ce problème dans une certaine mesure (138). Les équipes impliquées dans la recherche sur les defects osseux segmentaires sur modèle de porc ont principalement exploré le tibia et le radius.

2.5.2.3. Le modèle de chèvre

Ce modèle est rarement utilisé en recherche orthopédique sur les defects osseux. Le poids, les dimensions des membres, la composition minérale et le remodelage osseux sont similaires à ceux des humains (129). Elles sont également tolérantes aux fluctuations de température, y

compris à des températures élevées, ce qui est un avantage par rapport aux moutons (139). Les modèles de defects osseux segmentaires chez les chèvres ont été créés principalement sur le tibia (140,141).

Toutefois, certaines limites de ce modèle animal existent, telles que l'hétérogénéité dans la microstructure osseuse du tibia par rapport à celle des humains (142), ainsi que des difficultés de manipulation et de la mobilité postopératoire des animaux. Les chèvres ont tendance à s'effrayer facilement, ce qui peut entraîner un risque accru de complications postopératoires (échec de l'ostéosynthèse).

De plus, les problèmes liés à leur manipulation postopératoire, associés à leur comportement potentiellement agressif (animal à cornes), font que le modèle de chèvre n'est pas idéal, notamment par rapport au modèle ovin, plus docile.

2.5.2.4. Le modèle de mouton

L'analyse de la littérature mettait en évidence que la grande majorité des études sur grand animal employait un modèle de mouton (24/30 études). Les moutons sont dociles (143), ce qui est un avantage comparativement aux autres modèles de grands animaux (porc, chèvre). Ils ont également une alimentation facile à gérer et présentent une macrostructure osseuse et une morphologie (poids, taille) similaire aux humains adultes, avec des os longs de dimensions similaires. Cette particularité permet l'utilisation d'implants orthopédiques humains (126), ce qui est intéressant d'un point de vue pratique et économique (129,144).

Chez le mouton, leur os est constitué principalement d'une structure osseuse de type primaire, alors que chez l'homme, la structure est essentiellement secondaire (145). Le remodelage osseux secondaire n'intervient pas avant un âge moyen de 7 à 9 ans chez les moutons (144). À l'âge de 3 à 4 ans, leur structure osseuse est plexiforme, composée d'un mélange d'os immature désorganisé et d'os lamellaires, avec des plexus vasculaires intercalés (146).

D'un point de vue biomécanique, les moutons adultes ont une densité osseuse trabéculaire plus élevée que les humains, ce qui leur confère une plus grande solidité osseuse (147). Pour Sparks *et al.*, les moutons âgés de 6-7 ans ou plus sont les plus proches des humains en termes de contenu minéral osseux, de macrostructure, de microstructure, de capacité de remodelage et de propriétés biomécaniques, ce qui en fait un modèle fiable pour l'étude des defects osseux (148). Enfin, les moutons subissent une perte osseuse saisonnière. Une étude menée en hiver, période où la formation osseuse est réduite, peut observer une perte puis une récupération spontanée de l'os (128).

L'espèce la plus souvent retrouvée dans les études est le mouton Merino. Onze études utilisaient

des brebis (plus dociles et moins sujettes aux variations hormonales des mâles), bien que le sexe ne soit pas toujours précisé (12/24 études). L'âge moyen était de $4,2 \pm 2,1$ ans, avec seulement 8 études utilisant des moutons de plus de 6 ans (126,149–155).

Le modèle de defect tibial était le plus fréquent (18 études, avec une taille de $30,2 \pm 7,5$ mm, allant de 18 à 50 mm). Les techniques de stabilisation utilisées incluent : plaque et vis (9 études), fixateur externe (5 études) et enclouage centromédullaire (4 études).

Le defect métatarsien a été étudié dans 5 études (taille de 20 ou 25 mm), avec une stabilisation exclusivement par plaques et vis. Enfin, une seule étude sur le fémur est retrouvée, un os plus difficile d'accès en raison de son insertion profonde dans la masse musculaire de la cuisse (156), bien qu'offrant un environnement biologique favorable à la consolidation osseuse.

De plus, le fémur ovin présente un cortex plus fin que celui du tibia, ce qui peut entraîner un taux de complication plus élevé, notamment des fractures secondaires à la création du defect et sa stabilisation (157). Le tibia, en revanche, est moins recouvert de tissus mous, ce qui facilite la création du defect.

Le métatarse, bien que plus court (13 à 16 cm contre 20 à 24 cm pour le tibia), impose des contraintes sur le type de fixation possible et présente un risque accru d'infections postopératoires, en raison de sa proximité immédiate avec les sabots souillés de l'animal.

Pour l'étude préclinique des defects osseux segmentaires sur grand animal, le mouton âgé de 6-7 ans, avec un defect tibial ou métatarsien, semble le plus approprié. Les temps de suivi pour atteindre la consolidation osseuse sont plus longs chez ces grands animaux, avec des périodes allant jusqu'à un an dans la littérature.

Pour ce modèle aussi, les biomatériaux étudiés incluent majoritairement des composites à bases de polymères synthétiques (PCL), associés à des matrices phosphocalciques (β TCP, HA). Certains travaux explorent également l'adjonction de facteurs de croissance (BMP, VEGF, PDGF), de cellules souches mésenchymateuses (BMSC, cellules de cordon ombilical) ou de PRP. Toutefois, les études ne permettent pas encore de conclure sur une supériorité claire d'une approche par rapport à une autre, ce qui justifie la poursuite des recherches pour affiner les stratégies de régénération osseuse.

2.5.3. Résumé : choix du modèle *in vivo* d'étude de nos membranes artificielles

À la lumière de cette analyse bibliographique, il apparaissait clairement que l'étape la plus fréquente d'étude *in vivo* sur cette thématique était l'étude d'un defect sur modèle animal de petite taille. Deux modèles étaient retrouvés, le modèle de lapin et le modèle de rat. Le modèle de rat restait le plus couramment utilisé. Il présentait l'avantage d'avoir une durée avant

consolidation d'un defect critique relativement courte, de l'ordre de 8 semaines en moyenne, pouvant atteindre 12 semaines. Il s'agit d'un animal facile à gérer, économiquement avantageux et moins fragile que le modèle de lapin. De plus, il est très résilient aux manipulations.

Le modèle de defect fémoral est similaire à ce qui est réalisé chez l'homme, avec la nécessité d'une fixation osseuse stable du fémur du rat. Cela impliquait une exigence technique dans la réalisation de ce modèle animal, car une défaillance de la fixation pouvait compromettre la consolidation, indépendamment des membranes artificielles ou de la TMI. Or, l'échec de stabilisation étant aussi une cause de défaillance de la TMI chez l'homme, cette technicité représentait un défi pour obtenir un modèle fiable, tout en permettant une meilleure transposabilité clinique.

A contrario, le modèle de lapin permettait de se dispenser de l'ostéosynthèse du defect du radius ou de l'ulna. Cependant, cette praticité éloignait du contexte clinique humain, d'autant que l'os adjacent au defect influençait sa consolidation, biaisant ainsi les résultats des analyses.

Nous avons ainsi privilégié le développement d'un modèle de defect fémoral de rat pour cette thèse et présenterons ses grands principes ainsi que ses résultats dans la 2^{de} partie de ce travail. Cette analyse de la littérature nous a également permis de sélectionner le type d'ostéosynthèse pour ce modèle. À cet effet, une analyse systématique de la littérature a été réalisée et publiée (158). Les résultats principaux de cette publication montraient que l'ostéosynthèse la plus fréquente était réalisée par plaque vissée. Nous avons donc opté pour ce type de stabilisation fémorale.

Enfin, concernant la durée de suivi des rats et des analyses de la consolidation du defect et de la membrane induite (histologiques et radiologiques), il apparaissait que les principaux points temporels d'analyse étaient : 4 semaines (notamment pour la membrane induite), 8 semaines et 12 semaines (pour l'analyse de la consolidation). Nous avons donc opté pour ces points temporels d'analyse, qui seront détaillés dans la 2e partie de cette thèse.

Tableau 3. Caractéristiques des modèles animaux et des études sur la régénération des défauts segmentaires critiques des os longs.

N°	Année / Auteur	Espèce	Sexe	Age (sem)	Poids (g)	N (/ group)	Defect location	Defect length (mm) / Fixation	Stratégie et Matériaux étudiés pour reconstruire le defect	IM analysis (yes/no)	IM formation (weeks)	Follow-up (min-max) (weeks)
1	2004 / Tiyyapatanaputi <i>et al.</i> (159)	Mice C57BL/6	NC	10	NC	108	Femur	4 mm / 22G needle	1-stage auto or allograft	NO	N/A	2-3-4-5
2	2005 / Koefoed <i>et al.</i> (160)	Mice C57BL/6	NC	8	NC	5/group	Femur	4 mm / 22G needle	1-stage auto or allograft ± gene transfer	NO	N/A	2-4-6
3	2007 / Reynolds <i>et al.</i> (161)	Mice C57BL/6	NC	8	NC	120 (15/ group / time point)	Femur	4 mm / K-wire	1-stage auto or allograft	NO	N/A	6-9-12-18
4	2008 / Yu <i>et al.</i> (162)	Mice BALB/c	Male	10-15	NC	24 (8/ group)	Femur	4 mm / 26G needle	1-stage PCL-HA scaffolds ± endothelial cells ± osteoblasts	NO	N/A	6
5	2011 / Jacobson <i>et al.</i> (163)	Mice C57BL/6	Female	8	NC	52 (13/group)	Femur	4 mm / K-wire	1-stage PLA ± PCL ± teriparatide	NO	N/A	9
6	2011 / Reynolds <i>et al.</i> (164)	Mice C57BL/6	Female	10	NC	72 (4-14 / group)	Femur	4 mm / K-Wire	1-stage allograft ± teriparatide	NO	N/A	4-6
7	2014 / Inzana <i>et al.</i> (165)	Mice BALB/cJ	Female	13-15	NC	20 (4 / group)	Femur	2 mm / Plate + screws	1-stage 3D printed collagen CP scaffolds <i>versus</i> allograft	NO	N/A	9
8	2020 / Wang <i>et al.</i> (166)	Mice C57BL/6	Female	8	20-25	30	Femur	3 mm / k-wire	1 st stage of IMT study	YES	4-6-8	2-4-6-8
9	2007 / Oest <i>et al.</i> (91)	Rat SD	Female	13	NC	28 (7+5+6)	Femur	8 mm / Plate + Screws	1-stage PLDL ± BMP-2 ± TGFβ3	NO	N/A	4-16
10	2007 / Chu <i>et al.</i> (99)	Rat Long Evans	Male	NC	450-550	22 (4 + 7/ group)	Femur	5 mm/ ECM	1 stage PPF/TCP + DCPD ± BMP-2	NO	N/A	6-15
11	2012 / Gruber <i>et al.</i> (167)	Rat SD	Male	NC	NC	8	Femur	5 mm/ ECM	1 stage IMT with PMMA	YES	4-16	4-16
12	2015 / Bosemark <i>et al.</i> (44)	Rat SD	Male	10	324	40 (10 / group)	Femur	6 mm / ECM	1 st Stage: IMT 2 nd Stage: CPM ± BMP-7 ± Biphosphonate	NO	4	4-15
13	2016 / Henrich <i>et al.</i> (57)	Rat SD	Male	8	300 - 230	21 (7 / group)	Femur	10 mm/ Plate + screws	1 st stage IMT with PMMA study	YES	2-4-6	2-4-6

14	2016 / Bouyer <i>et al.</i> (90)	Rat Wistar	Female	7.5-9.5	NC	56 (2, 3 or 8 / group)	Femur	6 mm / Plate + screws, + 4 cerclages	1-stage: artificial membrane (PLGA) + PLL/Hyaluronic + BMP-2	NO	N/A	0-8
15	2016 / Nau <i>et al.</i> (168)	Rat SD	Male	12	350-400	72 (18/group, 6 / time point)	Femur	10 mm/ Plate + screws	1 st stage: IMT with PMMA spacer (+ Gentamicin) ± Vancomycin ± Clindamycin ± PMMA High Viscosity	YES	2-4-6	2-6
16	2017 / Shah <i>et al.</i> (169)	Rat SD	Male	NC	275 - 325	32 (8/group)	Femur (infected with <i>S. Aureus</i>)	8 mm/ Plate + screws	PMMA + MMA + CMC + PLGA spacer ± clindamycin	YES	4	4
17	2017 / Gouron <i>et al.</i> (170)	Rats SD	Male	12	800	16+12 (4 + 3 /group)	Femur	8 mm/ Plate + screws	2 stage IMT with PMMA + Autograft (tail vertebrae)	YES	6	3-18
18	2018 / Ma <i>et al.</i> (171)	Rat SD	Male	NC	260-280	60 (20 / group, 5 / time point)	Femur	10 mm / Plate + screws	1-stage: Calcium-Sulfate spacer	YES	2-4-6-8	2-8
19	2019 / DeBaun <i>et al.</i> (45)	Rat SD	Male	11	NC	24 (8/group)	Femur	8 mm/ Plate PEEK + threaded pins	1-stage: Microporous PCL membrane ± 3D printed cylindrical PCL/BTCP spacer	NO	4 (for 2-stage group)	2-12
20	2018 / Nau <i>et al.</i> (46)	Rat SD	Male	20	350 - 400	96 (12 / group, 6 + 6)	Femur	10 mm/ Plate / screws screws	1 st stage: IMT with PMMA spacer 2 nd stage: Cancellous graft (donor rats) <i>versus</i> BTCP MSC + EPC BM-MNC (donor rats) ± IM removal	NO	3	8
21	2018 / Gaio <i>et al.</i> (82)	Rat SD	Male	10	NC	120 (30/ group)	Femur	6 mm/ External fixator	1 st stage: IMT with PMMA or Titanium spacer: smooth (1µm) <i>versus</i> rough (8µm) surfaces	YES	4	4
22	2018 / Sagardoy <i>et al.</i> (89)	Rat Wistar	Female	12	250	32 (8 / group)	Femur	6 mm/ Plate + Screws	1 st stage: Silicone spacer	YES	11	11
23	2018 / Tang <i>et al.</i> (172)	Rat SD	Male	NC	350	90	Femur	10 mm / Plate + screws	2 stage IMT with PMMA + Autograft (tail vertebrae)	YES	6	6-12
24	2019/ Shen <i>et al.</i> (92)	Rat SD	Male	20	380-420	54 (18 / group)	Tibia	4-6-8 mm / Plate + screws or external fixator	2 stage IMT with PMMA with Autograft (tail vertebrae) <i>versus</i> distraction osteogenesis	YES	4	8-14
25	2019 / Toth <i>et al.</i> (173)	Rat SD	Male	10	NC	126 (42 stage 1, 9-11 / group + 58 stage 1 + 2, 9-11 / group)	Femur	6 mm/ External Fixator	1 st stage: IMT with PMMA or Titanium spacer: smooth (1µm) or roughened (8µm) surface 2 nd stage: allograft	YES	4	4- 14

26	2020 / Gohel <i>et al.</i> (93)	Rat SD	Male	24	460-540	5	Femur	5 mm / Plate + screws	2 stage IMT with PMMA study	YES	4	4
27	2020 / Leiblein <i>et al.</i> (47)	Rat SD	Male	8-10	250-300	96 (6-10 animal/group)	Femur	10mm/ Plate + locking screws	1-stage: hADM + BTCP spacer ± BMC ± BTCP <i>versus</i> 2-stage: PMMA IM + BTCP ± BMC (from donor rats)	NO	3	8
28	2020 / Verboket <i>et al.</i> (95)	Rat SD	Male	8-10	250-320	15 (5 / group)	Femur	5-6mm / Plate + screws	1-stage: hADM + allograft	NO	3-4	8
29	2020 / Bilal <i>et al.</i> (98)	Rat SD	Male	NC	400 - 450	60 (20/ group)	Femur	5mm/ External fixator	1st stage: PMMA ± (EGF) injection into the defect site (1 / week for 3 weeks) <i>versus</i> PRP injection into the defect site (1/ week for 3 weeks) + 2 nd stage: Autograft (tail vertebrae)	YES	6	6-12
30	2020 / Roukoz <i>et al.</i> (174)	Rat Wistar	Male	12	NC	23 (5 + 18)	Femur (Infected SARM)	5-10 mm ECM	2-stage IMT with PMMA ± vancomycin ± gentamycin	YES	6-12	6 - 12
31	2021/ Zhang <i>et al.</i> (94)	Rat Wistar	Male	9	180-200	100 + 60 (SDF-1 KO)	Femur	10 / Plate + screws	1 st stage IMT with PMMA spacer 2 nd stage: autologous graft	YES	4	4
32	2021/ Fenelon <i>et al.</i> (96)	Rat SD	Male	10	NC	15 (6 / group, bilateral surgeries)	Femur	5mm/ Plate PEEK + screws + cerclage	1-stage: HAM + CPC spacer ± BMP-2 <i>Versus</i> 2-stage: PMMA IMT + CPC + BMP-2	NO	4	2-10
33	2022/ Li <i>et al.</i> (175)	Rat SD	Male	NC	280 - 305	48 (12 / group)	Femur	4mm/ Plate + screws	1 st stage: IMT with PMMA spacer ± feeding of TFRD: high / medium/ low dose 2 nd stage: autograft (tail vertebrae)	YES	4	4-16

34	2021/Mathieu <i>et al.</i> (176)	Rat SD	Male	8	200	50 (28 for stage 1, 22 for 2-Stage IMT study, 11 / group, 6 + 5)	Femur	6mm/ External fixator, Plate + screws for the 2 nd Stage	1 st stage: IMT with PMMA spacer <i>versus</i> Polypropylene syringes spacer 2 nd stage: allograft	YES	2-4-6-8	2-14
35	2022/ DeBaun <i>et al.</i> (97)	Rat SD	Male	10	NC	40 (8 / group)	Femur	8mm/ ECM	1-stage: Collagen sheet ± 3D printed PCL/BTCP spacer ± PLGA/BMP- 2 microspheres ± Gelatin + PDGF microspheres 2-stage IMT with PMMA spacer replaced with PCL/BTCP spacer	NO	4	1-12
36	2022/ Leiblein <i>et al.</i> (177)	Rat SD	Male	12	350 - 400	32 (8 / group)	Femur	10mm/ Plate + screws	2-stage: 3 different sizes Calcium Sulfate, Calcium Carbonate, Triglyceride, Gentamicin granules <i>versus</i> allograft	YES	3	8
37	2022 / Sun <i>et al.</i> (101)	Rat Fischer	Male	14 - 16	250 - 300	23 (7-8 / group)	Femur	5mm/ Plate + screws	1 st stage: IMT with PMMA ± low or high dose tobramycin and vancomycin 2 nd stage: allograft	NO	4	12
38	2022 / Verboket <i>et al.</i> (41)	Rat SD	Male	8-10	250 - 300	65 (13 / group) (5 + 8)	Femur	5mm/ Plate + screws	1 st stage: IMT with PMMA 2 nd stage: GDBM ± BMC or f- DBM ± BMC or allograft	NO	3-4	11-12
39	2022/ Ziroglu <i>et al.</i> (100)	Rat Wistar	Male	10 - 12	300 - 350	28 (7 / group)	Femur	10mm/ Plate + screws	1 st stage: IMT with PMMA ± Teicoplanin ± fusidic acid ± gentamicin	YES	4	4
40	2003 / Kokubo <i>et al.</i> (178)	Rabbit Japanese White	Male	16 - 20	NC	70 (30 + 40, 5 / group)	Ulnar	15 mm / No fixation	1-stage Gelatine sponge + PLGA ± BMP-2	NO	N/A	4-8-16
41	2006 / Komaki <i>et al.</i> (179)	Rabbit New Zealand	Female	NC	3300 - 3500	24 (6/group)	Tibia	5 mm Plate + screws + casting (4 wk)	1-stage β-TCP + Collagen ± FGF- 2	NO	N/A	12
42	2010 / Wang <i>et al.</i> (109)	Rabbit New Zealand	NC	12	2500- 3000	64	Femur (bilateral)	15 mm / Plate + screws	1-stage β-TCP + MSC ± vascular bundle	NO	N/A	2-12
43	2014 / Chen <i>et al.</i> (112)	Rabbit New Zealand	Male	20	3500 - 4000	48 (6/group)	Ulna (bilateral)	12 mm / No fixation	1-stage β-TCP + PLGA ± BMP ± Icaritin	NO	N/A	2-4-8
44	2015/Wang <i>et al.</i> (110)	Rabbit New Zealand	NC	12-16	2750	32	Radius (bilateral)	15 mm / No fixation	1 st stage IMT with PMMA study	YES	2-4-6-8	2-4-6-8

45	2015 / El Backly <i>et al.</i> (118)	Rabbit New Zealand	Male	NC	2500-2700	8 (2 / group)	Ulna	15 mm / No fixation	1-stage nanoHA+PU ± e-PTFE membrane ± PRP / BMSC membrane	NO	N/A	12-16
46	2017 / Galanis <i>et al.</i> (180)	Rabbit New Zealand	NC	NC	3300 - 3700	36 (12/ group)	Ulna	6-12 mm / No fixation	1-stage PRP ± DMB	NO	N/A	4-12
47	2018/ Tarchala <i>et al.</i> (113)	Rabbit New Zealand	Male	24	3500	10 (4+3+3)	Ulna (bilateral)	35 mm / No fixation	1-stage PTFE porous or nonporous + Autograft (defect morselized)	NO	4	6
48	2018 / Zhang <i>et al.</i> (114)	Rabbit New Zealand	Male and Female	24	2560	72 (18/ group)	Ulna (bilateral)	15 mm / No fixation	1-stage Mg-Zn-Ca scaffold	NO	N/A	4-8-12
49	2018/ Yilmaz <i>et al.</i> (125)	Rabbit	NC	NC	NC	24 (6/ group)	Radius	15 mm/ No fixation	1 st stage IMT + Concentrated Growth Factors	YES	3-6	3-6
50	2018 / Maiti <i>et al.</i> (181)	Rabbit New Zealand	Male	28-52	2780	36 (6/group)	Radius	15 mm / No fixation	1-stage HA/TCP scaffold + BMSC	NO	N/A	4-6-12
51	2019/ Wang <i>et al.</i> (115)	Rabbit New Zealand	Male and Female	20	2500 - 3000	12 (3/group)	Radius (bilateral)	15 mm	1-stage Mg-Sr Scaffold + 3 different coatings + Autograft (defect morselized)	NO	N/A	4
52	2019/ Meng <i>et al.</i> (124)	Rabbit New Zealand	Male	52	3500	28 (7/group)	Radius	15 mm	1 st stage IMT with PMMA 2 nd stage: A-CS hemihydrate ± autologous graft (iliac crest)	NO	6	4-8-12
53	2020 / Xie <i>et al.</i> (116)	Rabbit New Zealand	NC	24-28	2500 - 3000	36 (12/group)	Radius	9 mm / Plates + screws or No fixation	1 st stage IMT study	YES	4-6	4-6
54	2021 / Shibahara <i>et al.</i> (117)	Rabbit Japanese	Male	18	3000 - 3500	24 (8/group)	Ulna	10 - 15 - 20 mm / Plate + screws	1-stage honeycomb carbonate apatite scaffold	NO	N/A	4-12
55	2021 / Torbjörn <i>et al.</i> (182)	Rabbit White	Female	36-40	3900	20 (5/group)	Radius	20 mm / No fixation	1-stage CPC scaffold <i>versus</i> autologous graft (defect morselized)	NO	N/A	12
56	2022 Zalama <i>et al.</i> (183)	Rabbit New Zealand	Male	24	2500	30 (10/group)	Ulna	12 mm/	1-stage PRF ± Zn Oxide nanoparticles	NO	N/A	4-8-12
57	2021/ Eriksson <i>et al.</i> (119)	Rabbit New Zealand	Female	40-44	3300 - 3600	18 (3/group / time point)	Femur	10 mm / Plate + screws	1-stage S53P4 Bioglass scaffold	YES	2-4-8	2-4-8
58	2020/ Liu <i>et al.</i> (123)	Rabbit New Zealand	NC	24	2500	36 (9/group)	Radius	15 mm/ No fixation	1 st stage: IMT 2 nd stage :3D printed PLA-HA scaffold + BM <i>versus</i> autograft (iliac crest)	YES	4	8-12-16

59	2021/ Cho <i>et al.</i> (111)	Rabbit New Zealand	NC	12-16	3000 - 3500	14 (7 / group)	Femur	15 mm / Plate + screws	1 st stage IMT 2 nd stage: 3D printed CaO–SiO ₂ –P ₂ O ₅ –B ₂ O ₃ scaffold ± BMP-2	NO	N/A	8
60	2022/ Arican <i>et al.</i> (122)	Rabbit New Zealand	Male	NC	3500 - 4000	28 (7 / group)	Radius	15 mm / Plate + screws	2-stage IMT ± Concentrated Growth factors + Autograft (iliac crest)	NO	4	8-12
61	2002 / Gugala & Gogolewski (120)	Sheep Swiss mountain	NC	NC	NC	18 (3/group)	Tibia	40 mm / external Fixator	1-stage PLA membranes + autograft	NO	N/A	16
62	2003 / Bloemers <i>et al.</i> (184)	Sheep	Female	2 (years)	50 – 75 (kg)	28 (6-8 / group)	Tibia	30 mm / ECM	1-stage Calcium-Phosphate ceramic <i>versus</i> autograft	NO	N/A	12
63	2006 / Maissen <i>et al.</i> (121)	Sheep Weisses Alpen Schaf	NC	4-5 (years)	46-58 (kg)	14 (2-4 / group)	Tibia	18 mm / External fixator	1-stage PLA ± TGFβ3 + Autograft (iliac crest)	NO	N/A	4-8-12
64	2006/ Viateau <i>et al.</i> (185)	Sheep (Pré-Alpes)	Female	2 (years)	60 (kg)	11	Metatarses	25 mm / Plate + screws	2-stage IMT study with Autograft (iliac crest)	YES	6	36
65	2006 / Sarkar <i>et al.</i> (149)	Sheep Merino	Female	5.5-7.5 (years)	70-97 (kg)	16	Tibia	25 mm / ECM + plate	1-stage Collagen sponge ± PRP	NO	N/A	12
66	2007/ Viateau <i>et al.</i> (186)	Sheep (Pré-Alpes)	Female	2 (years)	NC	21 (4-6 / group)	Metatarses	25 mm / Plate + Screws	1 st stage: IMT 2 nd stage: Coral ± MSC Scaffolds <i>versus</i> Autograft (iliac crest)	NO	6	6-12-24-30-36
67	2009 / Schneiders <i>et al.</i> (187).	Sheep	Female	NC	75 (kg)	14 (7 / group)	Tibia	30 mm / ECM	1-stage HA-Collagen ± Chondroitine Sulfate	NO	N/A	1-4-8-12
68	2009/ Klaue <i>et al.</i> (54)	Sheep	NC	NC	NC	30 (4-6 / group)	Femur	30 mm / Plate + screws	2-stage IMT with Autograft (iliac crest)	YES	4	16
69	2010 / Niemeyer <i>et al.</i> (188)	Sheep Swiss Alpine	Female	3 (years)	65 (kg)	20 (5/ group)	Tibia	30 mm / Plate + screws	1-stage Collagen sponges + BMSC ± adipose stem cells (ASC) ± PRP	NO	N/A	26
70	2011 / Reichert <i>et al.</i> (150)	Sheep Merino	NC	7 (years)	45 (kgs)	12	Tibia	20 mm / Plate + screws	1-stage PDLLA-TCP-PCL <i>versus</i> mPCL-TCP scaffold	NO	N/A	12
71	2013 / Cipitria <i>et al.</i> (151)	Sheep Merino	NC	7-8 (years)	43.3 (kg)	24 (8/group)	Tibia	30 mm / Plate + screws	1-stage PCL-βTCP ± BMP-7 scaffold	NO	N/A	12
72	2013 / Berner <i>et al.</i> (152)	Sheep Merino	NC	6-7 (years)	45 (kg)	24 (6/group)	Tibia	30 mm / Plate + Screws	1-stage PCL-βTCP scaffold ± Auto- allogenic MSC	NO	N/A	6-12

73	2014/Christou <i>et al.</i> (153)	Sheep Crossbred	NC	5.6 (years)	55 (kg)	24 (8/group, 4 / time-point)	Tibia	50 mm / ECM	2-stage IMT with auto <i>versus</i> allograft	YES	4	6-12
74	2014 / Fernandes <i>et al.</i> (189)	Sheep	Female	2-2.5 (years)	36 (kg)	8 (4/ group)	Tibia	30 mm / External fixator	2-stage IMT with allograft ± BMSC	NO	N/A	6-10-14-18
75	2015 / Cipitria <i>et al.</i> (126)	Sheep Merino	NC	6-7 (years)	42.5 (kg)	7-8/group	Tibia	30 mm / Plate + screws	1-stage PCL-βTCP scaffold ± BMP-7	NO	N/A	12-52
76	2015 / Wieding <i>et al.</i> (190)	Sheep Deutsches Schwarzkopf	Female	3 (years)	68.1 (kg)	16 (4/group)	Metatarses	20 mm / Plate + screws	1-stage Ti6Al4V scaffolds	NO	N/A	12-24
77	2015 / Berner <i>et al.</i> (154)	Sheep Merino	Male	7-8 (years)	40-50 (kg)	24 (8/ group)	Tibia	30 mm / Plate + screws	1-stage PCL-HA scaffold ± BMSC ± autologous graft	NO	N/A	52
78	2016 / Kirby <i>et al.</i> (155)	Sheep Merino	NC	6-7 (years)	47 (kg)	15	Tibia	30 mm / Plate + screws	1-stage PCL scaffold + PLGA μ particles ± VEGF ± PDGF ± BMP-2	NO	N/A	36
79	2016 / Li <i>et al.</i> (191)	Sheep Merino	NC	3-4 (years)	52.8 (kg)	16 (8 / group)	Tibia	30 mm / Plate + screws	1-stage Baghdadite ± PCL ± nanoBioglass	NO	N/A	3-12-26
80	2018 / Pobloth <i>et al.</i> (192)	Sheep Merino	Female	2.5 (years)	74 (kg)	15 (6/group)	Tibia	40 mm / External fixator	1-stage PCL-βTCP scaffold ± autograft	NO	N/A	12
81	2019 / Filardo <i>et al.</i> (193)	Sheep Crossbred	NC	3 (years)	60 (kg)	15 (5/group)	Metatarses	20 mm / Plate + screws	1-stage silicon carbide scaffolds functionalized	NO	N/A	12
82	2019 / Li <i>et al.</i> (194)	Sheep Merino	NC	3-4 (years)	45.6 (kg)	28 (14/ group, 6-8 / time point)	Tibia	30 mm / Plate + screws	1-stage 3D printed Strontium-hardystonite-gahnite scaffold	NO	N/A	12-52
83	2019 / Herten <i>et al.</i> (195)	Sheep Bentheimer	Female	1-1.5 (years)	38 (kg)	6 (2/group)	Tibia	20 mm / External fixator	1-stage HA scaffold ± autologous umbilical cord cells	NO	N/A	36
84	2023 / Garot <i>et al.</i> (196)	Sheep Pré-Alpes	Female	3 (years)	63 (kg)	24	Metatarses	25 mm / Plate + screws + cerclages	1-stage 3D printed PLA scaffolds ± BMP-2	NO	N/A	4-8-12-16
85	2008 / Liu <i>et al.</i> (140)	Goat	NC	NC	22.3 (kg)	15 (3-6 / group)	Tibia	26 mm / External fixator	1-stage βTCP scaffold ± BMSC	NO	N/A	16-32
86	2017 / Luangphakdy <i>et al.</i> (141)	Goat	Female	5 (years)	50 (kg)	32 (8/group)	Tibia	50 mm / ECM	1 st stage of IMT with PMMA (smooth or textured) + Autologous graft (sternum)	NO	4	12

87	2003 / Hu <i>et al.</i> (131)	Dogs Beagle	NC	NC	10,4 - 14,2 (kg)	18 (6/group)	Radius	20 mm / No fixation	1-stage PLA-HA-Collagen Scaffold ± BMP	NO	N/A	4-8-12-24
88	2006 / Theyse <i>et al.</i> (132)	Dogs Labrador	Male and Female	32 (months)	31,1 (kg)	8 (4/group)	Ulna (bilateral)	20 mm / No fixation	1-stage defect + Growth Hormone administration	NO	N/A	6
89	2024 / Haam <i>et al.</i> (134)	Dogs Beagle	Male	2 (years)	10,3 (kg)	6 (2-4 / group)	Tibia	20 mm / Plate + screws	1-stage HA-Alumina scaffold	NO	N/A	0-2-4-6-8
90	2025 / Cheng <i>et al.</i>	Dogs Beagle	Male	1 (year)	10,8 (kg)	27 (9/group)	Femur	30 mm / ECM	1-stage 3D printed βTCP <i>versus</i> autograft (morselized defect)	NO	N/A	4-12-24

SD : Sprague-Dawley; IMT : Induced Membrane technique; BMP: Bone Morphogenetic Protein; (B-)TCP : (Beta-) Tricalcium Phosphate; CMC : carboxymethylcellulose; CPM : Calcium-Phosphate Matrix; DCPD : dicalcium phosphate dehydrate; ECM : Enclouage Centro-Médullaire; HA : Hydroxyapatite; PMMA : PolyMethylMethAcrylate; PLGA : PolyLactic-Co-Glycolic Acid; PLL : Poly-L-Lysin; PEEK : Poly-Ether-Ether-Ketone; PCL : PolyCaproLactone; LCP : Locking Compression Plate; hADM : Human Acellular Dermis Membrane; BMC : Bone marrow Mononuclear Cells; EGF : Epidermal Growth Factor; PPF : polypropylene fumarate; PRP : Platelet Rich Plasma; PRF : Platelet Rich Fibrin; TFRD : Total Flavonoids of Rhizoma Drynariae; PDGF : Platelet Derived Growth Factor: G or f – DBM : Granulous or Fibrous Demineralized Bone Matrix; SARM : Staphylococcus Aureus Methicillin – Resistant; UN : Unknown; N/A : not applicable

2.6. Objectifs de la thèse

La technique de la membrane induite, bien qu'efficace dans la prise en charge des pertes osseuses critiques, présente plusieurs défis en chirurgie orthopédique. Elle repose sur une prise en charge en 2 temps, espacés de plusieurs semaines (en moyenne 10,85 semaines pour Mi *et al.* (1)). Cependant, la formation de la membrane induite peut prendre du temps et sa qualité varie selon les cas.

Les récents résultats ont confirmé que la réaction à corps étranger, médiée par les macrophages et leur importante sécrétion de facteurs de croissance, est essentielle au processus de formation de cette membrane. Toutefois, cette TMI est utilisée en orthopédie et traumatologie, elle nécessite donc une manipulation minutieuse en peropératoire. Or, certaines chirurgies complexes peuvent fragiliser la MI au point de compromettre la réussite de la TMI.

Pour améliorer les résultats de cette approche, il est donc nécessaire de développer une solution permettant d'optimiser le protocole opératoire en le réduisant cette technique à un seul temps chirurgical, tout en garantissant une qualité optimale de la membrane.

Ainsi le **1^{er} objectif majeurs** de cette thèse était de concevoir des membranes artificielles visant à permettre une chirurgie en un temps, en maintenant une réaction à corps étranger tout en offrant une maniabilité adaptée au contexte chirurgical. Ces MA ont été conçues selon un cahier des charges précis et évaluées *in vitro*.

Le **2nd objectif majeur** de cette thèse était de mettre en place un modèle de defect osseux critique fémoral de rat Sprague-Dawley au sein de notre unité de recherche, afin d'évaluer la TMI. En effet, l'évaluation *in vivo* demeure un prérequis indispensable à toute étude préclinique, avec pour perspective un passage à un modèle sur gros animal en cas de résultats concluants.

Dans cette optique, un defect fémoral critique était créé chez les rats, et 2 configurations d'ostéosynthèses ont été comparées à l'aide d'analyses radiologique, clinique et histologique. L'objectif était d'identifier la configuration la plus performante en termes de stabilité fémorale et de qualité de la MI. L'hypothèse sous-jacente était que la stabilité fémorale influait directement sur la qualité de la MI, et par conséquent, sur la fiabilité du modèle animal.

Une fois ce modèle validé, le **3^e objectif au majeur** de cette thèse consistait à évaluer *in vivo* la consolidation de ce defect fémoral. Pour cela, une technique en 1 temps, reposant sur l'utilisation des membranes artificielles (TMA) associées à une greffe osseuse directe du defect, a été comparée à la TMI classique en 2 temps. L'hypothèse principale était que les membranes

artificielles permettraient une greffe en un temps avec un taux de consolidation radiologique égale ou supérieure à celui de la TMI conventionnelle.

Enfin, les objectifs secondaires incluaient l'étude et la comparaison des caractéristiques des membranes induites et des membranes artificielles après implantation *in vivo*, via des analyses histologiques, immunohistochimiques et d'immunofluorescence.

3. CONCEPTION ET ÉVALUATION *IN VITRO* DES MEMBRANES ARTIFICIELLES

3.1. Introduction

Malgré les avancées permises par la TMI, cette approche présente plusieurs limites. Elle repose sur un processus long, nécessitant une attente de 2 à 3 mois pour la formation de la membrane induite (MI) chez l'homme, ainsi que deux interventions chirurgicales distinctes (197). Cette contrainte retarde significativement la récupération fonctionnelle du patient, notamment la reprise d'appui lorsqu'il s'agit d'une reconstruction du membre inférieur.

Par ailleurs, la qualité de la membrane varie considérablement en fonction de plusieurs facteurs intrinsèques au patient (tel que l'âge, le tabagisme, et la présence de comorbidités). Dans certains cas, la MI est hélas quasi inexistante, friable ou trop fragile, ce qui compromet la réussite de la greffe osseuse (85). Une étude récente menée par Durand *et al.* a mis en évidence l'existence de patients "non-répondeurs", en analysant histologiquement des prélèvements de MI.

L'immobilisation prolongée du patient, en particulier la mise en décharge pendant plusieurs semaines, engendre des conséquences physiques sévères, notamment : amyotrophie et enraidissement articulaire ; hospitalisation prolongée (généralement supérieures à 48-72 h pour chaque intervention) ; retard au retour aux activités professionnelles et personnelles, impactant le coût socio-économique lié à la perte d'activité.

Face à ces limitations, cette première partie de la thèse avait pour objectifs :

1. Concevoir des membranes artificielles implantables, synthétiques, capables de : i) favoriser le développement cellulaire osseux au sein d'un defect ; ii) soutenir la vascularisation et la réponse immunitaire via la réaction à corps étranger qu'elles induisent ; iii) permettre la diffusion libre des facteurs de croissance du milieu extracellulaire vers le defect greffé, jouant ainsi un rôle de soutien passif à la greffe osseuse réalisée en un seul temps ; iv) servir de barrière à l'invasion fibroblastique ; v) offrir une maniabilité adaptée aux conditions chirurgicales orthopédiques et traumatologiques ; et vi) stimuler naturellement la formation d'une MI, en s'appuyant sur le principe selon lequel toute implantation de biomatériau induit une réaction à corps étranger.
2. Évaluer les propriétés macroscopiques des membranes artificielles.
3. Évaluer *in vitro* leurs propriétés biomécaniques et leur hydrophilie.

4. Évaluer *in vitro* leurs propriétés biologiques, notamment : structure microscopique, cytotoxicité (méthode indirecte) et cytocompatibilité, perméabilité aux facteurs de croissance, et capacité d'adsorption des protéines.

Cette approche vise à surmonter les principales limites de la TMI en développant une solution plus rapide, plus fiable et plus reproductible, permettant une reconstruction osseuse en un seul temps chirurgical.

Cette partie de la thèse a été menée en collaboration avec l'UMR CNRS 8207 - Unité Matériaux et Transformation (UMET). La conception des MA ainsi que l'établissement du cahier des charges ont été réalisés par moi-même (Marc Saab), incluant : la sélection des matériaux et la définition des techniques d'élaboration en fonction des critères prédéfinis.

L'élaboration expérimentale des MA que j'ai initié, a ensuite été relayée par Hugo Bossut, étudiant en thèse, au sein de l'UMET, qui a procédé à la fabrication, l'optimisation et la caractérisation des MA avant leur implantation *in vivo*.

Les différentes étapes menant à l'évaluation *in vivo* ont suivi un processus de validation en mode « GO-NO GO », basé sur les résultats des analyses physico-chimiques *in vitro* réalisées par Hugo Bossut. Ces analyses comprenaient : la caractérisation microscopique, l'évaluation de l'hydrophilie de surface, et les tests biomécaniques.

Ces aspects seront abordés brièvement ci-dessous afin de préciser la chronologie du développement des MA. L'ensemble des analyses physico-chimiques supplémentaires est détaillé dans la monographie de thèse d'Hugo Bossut.

Pour élaborer ces membranes, 2 polymères synthétiques ont été retenus : le polyuréthane (PU), déjà employé dans de nombreuses applications biomédicales et le PMMA, qui est le matériau déjà utilisé dans la technique de la membrane induite. Le polyuréthane est un polymère synthétique qui possède d'excellentes propriétés mécaniques, notamment un étirement élevé avant rupture et une grande résistance mécanique (198).

Le PU utilisé était l'Ellastolane[®] 1185 A (BASF[™], Lemförd, Allemagne) sous forme de granules de grade médical. Ce PU possède plusieurs qualités, notamment : résistance élevée à l'usure et à l'abrasion, haute résistance à la traction et excellente résistance à la déchirure, résistance élevée aux huiles, aux graisses, à l'oxygène et à l'ozone (Figure 22). Il peut être associé à d'autres biomatériaux synthétiques pour favoriser la biominéralisation, ainsi que l'adhésion et la prolifération cellulaire pour le développement de matériaux en ingénierie tissulaire osseuse (199).

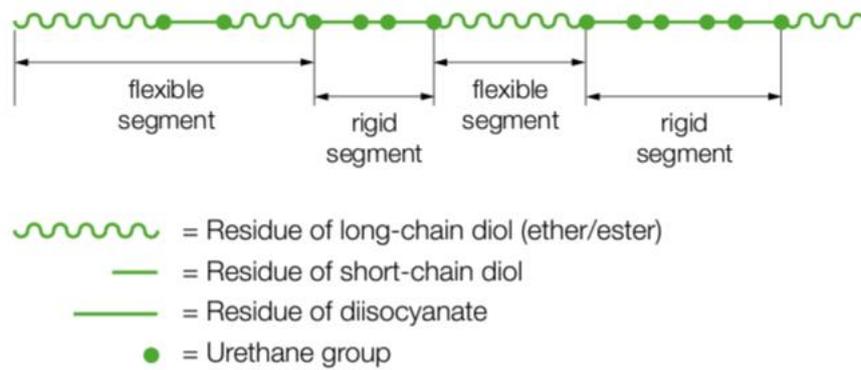


Figure 22. Structure d'un polyuréthane thermoplastique. (Source BASF®).

Le PMMA (poids moléculaire (Mw): 350 kDa) provenait de Sigma-Aldrich™ (Allemagne). Il s'agit aussi d'un polymère thermoplastique obtenu par polymérisation en chaîne du monomère méthacrylate de méthyle (MMA) (Figure 23).

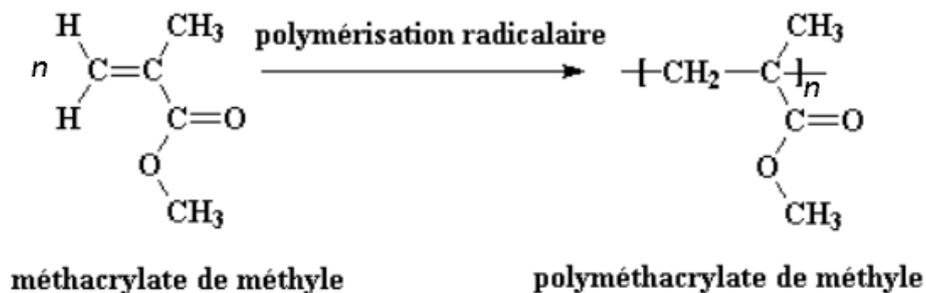


Figure 23. Formule chimique du Polyméthylméthacrylate (PMMA).

Associer les propriétés immunitaires liées à l'implantation du PMMA pour la formation de la MI, aux propriétés mécaniques du PU dans une membrane artificielle pourrait en effet permettre de concevoir une membrane artificielle autorisant une technique en un seul temps.

L'association de ces 2 polymères va reposer sur l'utilisation de la technique d'électrospinning. Pour constituer les solutions d'électrospinning, les solvants utilisés étaient le di-méthyl-formamide (DMF) et le Diméthylsulfoxyde (DSMO), de Sigma-Aldrich™ (Allemagne).

3.1.1. Conception : cahier des charges des membranes artificielles

Cette thèse a retenu une approche innovante visant à concevoir des membranes artificielles (MA) permettant la gestion des pertes de substances osseuses en un seul temps chirurgical. L'objectif principal était de limiter la résorption du greffon tout en favorisant la formation d'une membrane induite au contact des MA.

Un cahier des charges précis (Figure 24) a été établi autour des critères suivants :

- **Effet barrière** : empêcher l'invasion fibroblastique du site de greffe tout en permettant le libre passage des facteurs de croissance essentiels à la régénération osseuse.
- **Soutien vasculaire** : favoriser la formation d'un réseau vasculaire dense en périphérie et, idéalement, en son sein, pour assurer la nutrition du greffon et limiter sa résorption.
- **Applicabilité chirurgicale** : garantir une résistance mécanique adaptée aux manipulations en chirurgie orthopédique et traumatologique.
- **Comportement biomécanique** : se rapprocher des propriétés de la membrane induite et/ou du périoste, en s'appuyant sur données disponibles dans la littérature.

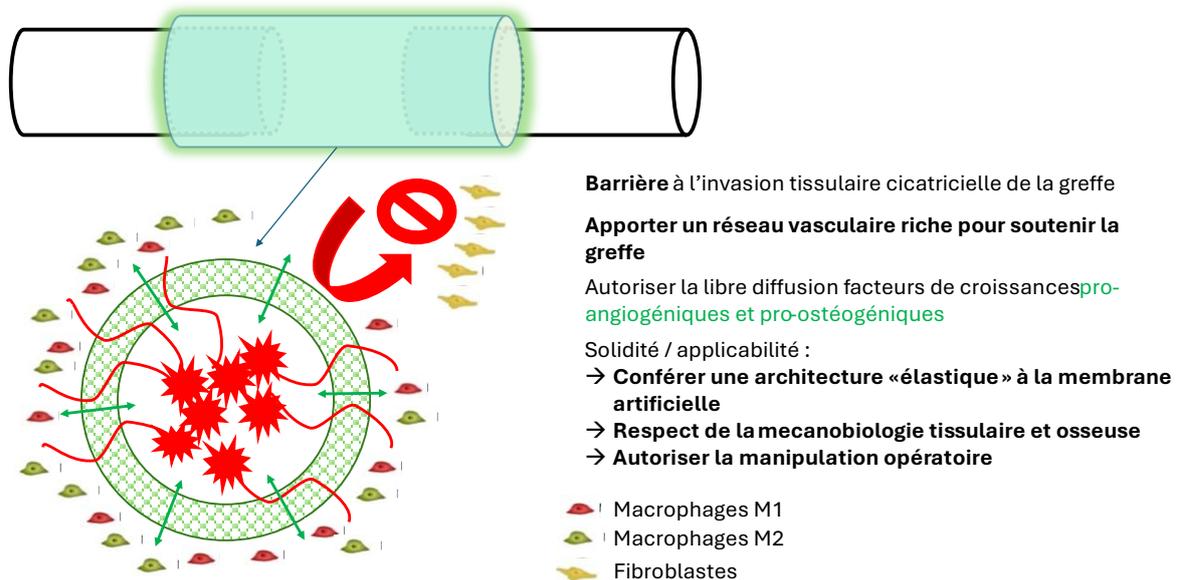


Figure 24. Cahier des charges pour le développement d'une membrane artificielle de régénération osseuse.

Une fois ce cahier des charges établi, l'élaboration des MA a suivi un processus décisionnel de type GO/NO-GO. Les résultats des différentes évaluations *in vitro* ont permis de sélectionner les MA répondant aux critères requis, leur permettant ainsi de poursuivre les processus d'évaluation *in vitro* mais aussi *in vivo*. À chaque étape, les modalités d'élaboration ont été ajustées afin de ne conserver que les MA conformes aux exigences définies.

3.1.2. Élaboration des membranes artificielles par electrospinning

L'electrospinning a été utilisé pour générer des nanofibres de polymères sélectionnés afin de concevoir des membranes artificielles (MA) mimant la matrice extracellulaire. Cette technique présente l'avantage d'offrir une surface de contact accrue pour les cellules, plusieurs sites

d'ancrage et des micropores favorisant le passage des facteurs de croissance tout en limitant l'invasion fibroblastique. L'élaboration des MA a impliqué l'optimisation des ratios PU/PMMA (50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 100/0 v/v), des solvants DMF/DMSO (50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 100/0 v/v) et des paramètres d'électrospinning à l'aide d'un dispositif semi-industriel (Fluidnatek® Le 500, Bioinicia™). Une concentration en polymères de 12 % (v/v) a été retenue pour assurer une viscosité adaptée à l'électrospinning et obtenir des nanofibres exploitables (Figure 25).

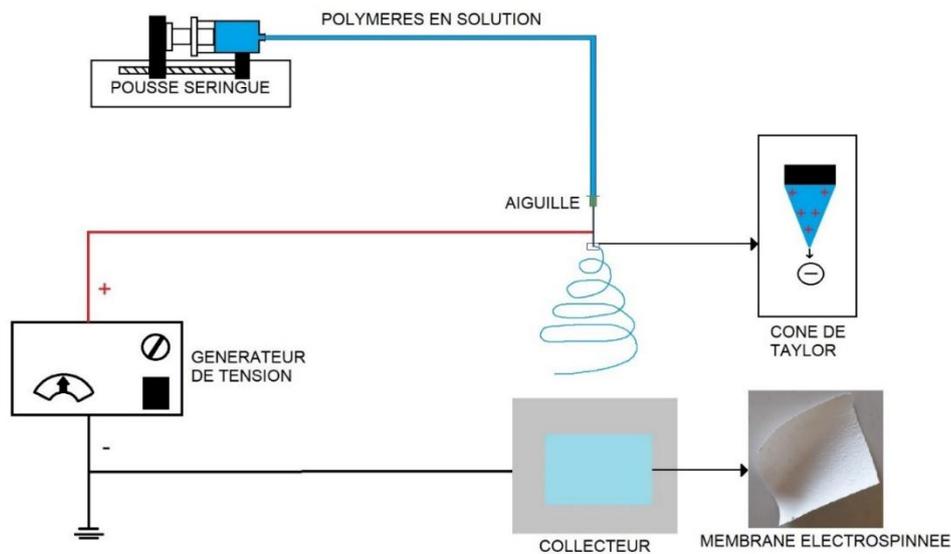


Figure 25. Schéma du principe de l'électrospinning pour la fabrication des membranes artificielles.

3.1.3. Résumé des travaux réalisés dans le cadre de la thèse de Hugo Bossut

Cette section résume les principales méthodes et résultats réalisés par Hugo Bossut et sont associés à leur analyse vis-à-vis de la littérature ayant abouti à l'orientation de l'élaboration des MA selon un modèle GO/NO-GO, pour ensuite réaliser les autres analyses *in vitro* et les implantations *in vivo*.

3.1.3.1. Évaluation de l'électrospinnabilité des membranes

Les paramètres d'électrospinning et environnementaux étaient les suivants : température $22 \pm 2^\circ\text{C}$, niveau d'humidité $33 \pm 10 \%$, tension de l'aiguille : 17 kV, tension du collecteur : 0 kV, débit d'injection de la solution : $0,2 \text{ ml.h}^{-1}$, distance entre l'aiguille et le collecteur : 20 cm, diamètre interne de l'aiguille : 0,723 mm 21G, durée de l'électrospinning : 24 heures. Dans un

premier temps, le ratio de solvant DMF/DMSO a été fixé à 50%.

Parmi les différents essais, nous avons conservé 4 membranes ayant pu être électrofilées de façon reproductible. En effet, en faisant varier les paramètres d'électrospinning, il n'a pas été possible de réaliser régulièrement des membranes de nanofibres avec les ratios PU/PMMA 90/10 et 80/20 (Tableau 4).

Tableau 4. Résultats des essais d'électrospinning en fonction des ratios de polymères avec un ratio de solvant DMF/DMSO 50/50.

PU100 %	PU/PMMA 90/10	PU/PMMA 80/20	PU/PMMA 70/30	PU/PMMA 60/40	PU/PMMA 50/50
Succès	Échec	Échec	Succès	Succès	Succès

L'échec a été conclu lorsque les MA n'étaient pas électrofilables de manière reproductible — notamment en raison d'une trop forte présence de gouttelettes, par exemple, de l'absence de MA sur le collecteur, ou encore de la formation de gouttes de polymère en surface.

Pour les 4 membranes maintenues, une optimisation du ratio des solvants a été réalisée. Toutes les MA étaient électrofilables, quel que soit les ratios de solvants (DMF/DMSO) testés de 100/0 à 50/50 (Tableau 5).

Tableau 5. Résultats des essais d'électrospinning en fonction des ratios de solvant.

DMF 100 %	DMF/DMSO 90/10	DMF/DMSO 80/20	DMF/DMSO 70/30	DMF/DMSO 60/40	DMF/DMSO 50/50
Succès	Succès	Succès	Succès	Succès	Succès

L'ensemble des ratios de solvant produisait des MA sur le collecteur d'électrospinning pour les ratios PU/PMMA 100/0, 70/30, 60/40 et 50/50. DMF : di-méthyl-formamide ; DMSO : Diméthylsulfoxyde.

3.1.3.2. Caractérisation microscopique électronique à balayage (MEB)

Une caractérisation morphologique par microscope électronique à balayage (MEB, FLEXSEM 1000[®], Hitachi[™], Japon) a été réalisée pour observer les nanofibres, réalisés avec différents ratios de solvants et de polymères autorisant la formation de membranes artificielles. Des MA de bonne qualité étaient retenues si l'observation MEB ne retrouvait pas de solvant en excès sur le collecteur d'électrospinning ou des gouttes de solvant sur la MA, une absence de perles sur les MA (*beads*) ou une absence de fonte des nanofibres. Pour chaque membrane, une centaine de fibres ont été mesurées au hasard (logiciel ImageJ[®]) pour obtenir la distribution, la

moyenne et l'écart-type du diamètre des nanofibres.

Cette analyse a permis de déterminer le diamètre moyen des nanofibres des 4 membranes retenues en fonction des ratios de solvant DMF/DMSO. Concernant les MA électrofilées avec un ratio de solvant DMF/DMSO 50/50, le diamètre moyen des nanofibres augmentait significativement avec le taux de PMMA, allant de 674 ± 84 nm pour le ratio 100/0 (100 % PU) à 3301 ± 376 nm pour le ratio PU/PMMA 60/40 ($p < 0,001$). Cependant, il n'y avait pas de différence entre les membranes PU/PMMA 70/30 et 50/50 ($p = 0,619$) (Tableau 6).

Tableau 6. Diamètre des nanofibres des membranes artificielles élaborées à partir d'une solution de solvant DMF/DMSO 50/50.

PU/PMMA ratio (v/v)	Diamètre des nanofibres (moyenne \pm écart-type) (nm)
50/50	2904 ± 311^{abc}
60/40	3301 ± 376^{ab}
70/30	2934 ± 504^a
100/0	674 ± 84

^a : $p < 0,001$ entre membranes en PU et toutes les membranes en PU/PMMA ^b : $p < 0,001$ entre membrane PU/PMMA 70/30 et membrane PU/PMMA 60/40 et 50/50. ^c : $p < 0,001$ entre membrane PU/PMMA 60/40 et 50/50.

En modifiant le ratio de solvant DMF/DMSO à 60/40 et 70/30, le diamètre des nanofibres diminuait pour arriver à 1000 nm en moyenne. Puis, au-delà de 70/30 DMF/DMSO, le diamètre des nanofibres ne variait plus ($p > 0,05$). Le diamètre moyen des nanofibres de nos MA en PU (électrofilées avec un ratio de solvant DMF/DMSO 50/50) était proche des valeurs récemment rapportées dans la littérature et pourrait favoriser la croissance et la prolifération des cellules, étant donné que le diamètre des fibres dans la matrice extracellulaire varie entre 50 et 500 nm (200,201).

Dans la littérature, le diamètre des nanofibres électrofilées pour favoriser la régénération osseuse variait cependant considérablement. En effet, les nanofibres de polycaprolactone (PCL) avaient un diamètre entre 300-400 nm (202–204). D'autres polymères avaient un diamètre de nanofibres plus proche de notre étude, comme les nanofibres de poly (acide lactique-co-glycolique) (PLGA) élaborées par Yu *et al.* pour remplacer l'espaceur en PMMA dans la TMI (allant de 40 à 430 nm) (205). Hu *et al.* ont obtenu des nanofibres plus fines avec des membranes de PLGA-Gélatine-Chitosan incorporant des microsphères de simvastatine (179 ± 25 nm) (206). Zhang *et al.* ont développé des membranes électrofilées en polycaprolactone qui avaient des nanofibres de diamètre beaucoup plus large (1614 ± 157 nm) que notre membrane artificielle en PU, ils ont constaté que l'ajout de whitlockite augmentait le diamètre moyen des nanofibres (jusqu'à 1818 ± 310 nm avec 15% de whitlockite) (207).

Généralement, l'ajout de composants minéraux augmente le diamètre des nanofibres (203,208,209). Nous n'avons pas ajouté de composant minéral, car cela nécessite des constructions complexes et des modifications de surface pour contrôler la libération d'ions et limiter l'effet négatif d'une libération excessive (202,210). Bien que l'ajout de PMMA ait également augmenté de manière significative le diamètre des nanofibres de nos membranes, nous l'avons choisi pour favoriser une "réaction à corps étranger" similaire à celle avec espaceur en PMMA (Figure 26).

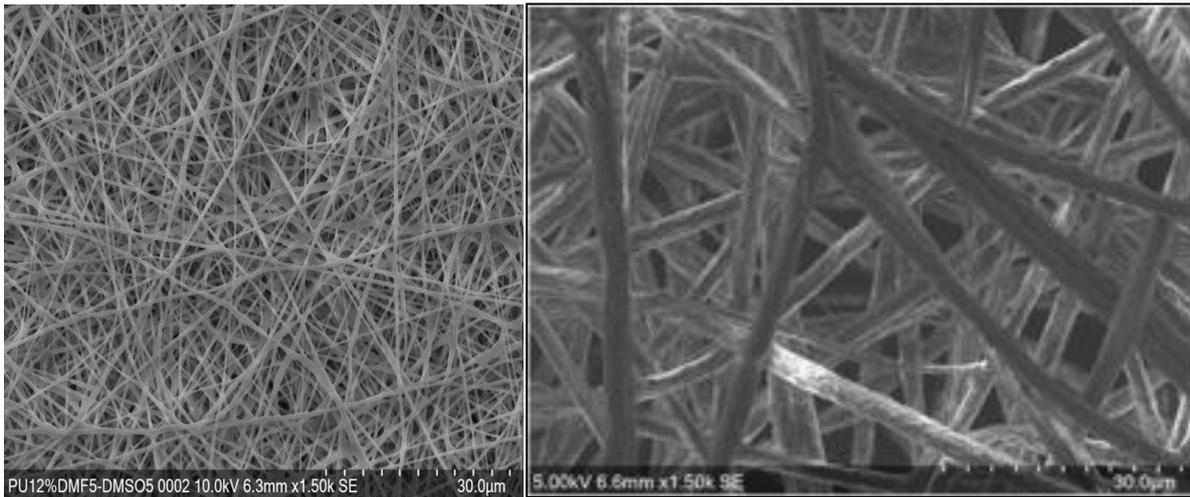


Figure 26. Images MEB d'une MA en PU100 % (à gauche) et d'une MA en PU/PMMA 50/50 (v/v) (à droite) électrofilées avec un solvant DMF/DMSO 50/50 (v/v).

3.1.3.3. Évaluation de l'hydrophilie de surface

L'évaluation de l'hydrophilie de surface a été réalisée par la mesure de l'angle de contact de l'eau sur la surface des MA à l'aide d'un système de test d'angle de contact (Drop Shape Analyser[®], Krüss[™], Allemagne). Les échantillons ont été découpés en carré de (3 × 3 cm²). L'angle de contact avec l'eau a été mesuré en ajoutant 2 µL de gouttelettes d'eau ultrapure à la surface des MA. Cinq zones ont été sélectionnées pour chaque échantillon, et les résultats sont rapportés sous forme de moyenne ± écart-type.

Une analyse de l'hydrophilie de surface par la méthode du Water Contact Angle (WCA) a été réalisée. Ce test montrait que le WCA se stabilisait au-delà du ratio DMF/DMSO de 70/30. De plus l'augmentation du taux de DMF augmentait le WCA, rendant donc les MA hydrophobes ce qui était en défaveur du maintien des ratios élevés en DMF pour la suite des analyses *in vitro*. Étant donné la variabilité du diamètre des nanofibres entre les 4 ratios de polymères retenus, ainsi que l'hydrophobie augmentant avec l'augmentation du DMF dans le ratio de solvant, nous avons sélectionné à ce stade le ratio de solvant DMF/DMSO 50/50 qui permettait d'avoir des

MA moins hydrophobes et plus manipulables macroscopiquement. Au total, nous disposions de 4 MA pour lesquelles effectuer la suite de nos analyses *in vitro*, à savoir :

- 4 ratios de polymères : PU100 %, PU/PMMA 50/50, PU/PMMA 60/40, PU/PMMA 70/30
- 1 ratio de solvant : DMF/DMSO 50/50.

Avec un ratio de solvant DMF/DMSO 50/50, l'angle de goutte moyen était de $110,67^\circ \pm 0,83^\circ$ pour la MA en PU et d'environ 130° dès lors que la MA comportait du PMMA. L'hydrophobicité du PMMA peut avoir contribué à l'augmentation du WCA, avec des différences qui sont restées significatives entre toutes les MA (tableau 7).

Il est intéressant de noter que Zhang *et al.* n'ont pas trouvé de différence dans le WCA avec l'ajout de whitlockite sur les membranes PCL (127°). Une autre étude combinant whitlockite et nanoparticules de tantale a également rapporté une surface hydrophobe (WCA 128° - 129°) (207,211). Nous avons donc conservé les MA les moins hydrophobes à l'aide du ratio de solvant le plus favorable (DMF/DMSO 50/50) bien que cela ne soit pas un élément bloquant dans la littérature.

Tableau 7. Hydrophilie de surface par technique de l'angle de contact de goutte des nanofibres des membranes artificielles élaborées à partir d'une solution de solvant DMF/DMSO 50/50.

PU/PMMA ratio (v/v)	WCA (moyenne \pm écart-type) ($^\circ$)
50/50	$130,33 \pm 1,63^{ab**c}$
60/40	$127,28 \pm 1,73^{ab}$
70/30	$136,32 \pm 3,98^{ab*}$
100/0	$110,67 \pm 0,83$

^a: $p < 0,001$ versus membranes en PU 100 %; ^b: $p < 0,001$ entre membranes 60/40 et PU100 %; ^{b*}: $p = 0,0044$ versus membrane PU/PMMA 60/40; ^{b**}: $p = 0,0209$ versus membranes PU/PMMA 50/50 ^c: $p = 0,0244$ versus membranes PU/PMMA 70/30.

3.1.3.4. Tests biomécaniques d'étirement

Des échantillons de membranes artificielles ont été préparées sous forme d'haltères de 30×4 mm. L'épaisseur de chaque membrane a été mesurée à l'aide d'un micromètre numérique. Les essais de traction ont été réalisés à l'aide d'un module extensomètre installé sur un rhéomètre HR10 (TA Instrument[®], Belgique) à température et humidité ambiantes. Les échantillons ont été étirés à une vitesse constante de $10 \mu\text{m}/\text{sec}$ jusqu'au point de rupture. En fonction des données obtenues, une courbe contrainte-déformation a été tracée. Les mesures ont été répétées pour 3 échantillons. Les essais ont été réalisés avec six échantillons pour chaque MA. La limite d'élasticité a été définie comme le point de la courbe où la pente changeait brusquement, et le module élastique a été calculé à l'aide de la formule $E = \sigma / \epsilon$, où E représente le module élastique

(module d'Young), σ représente la contrainte de traction à la limite d'élasticité, et ε représente la déformation à la limite d'élasticité.

Une fois que ces 4 membranes avaient été retenues, la suite des analyses a consisté à évaluer leur comportement biomécanique, qui devait se rapprocher d'une membrane induite naturelle, ou du périoste en fonction des données disponibles dans la littérature. Des essais de traction ont donc été réalisés pour différentes épaisseurs de MA et leurs résultats sont rapportés ci-dessous. Ces essais de traction ont été réalisés avec des MA électrofilées à l'aide d'un ratio de solvant DMF/DMSO 50/50 produisant les nanofibres les plus épaisses à une hydrophilie de surface minimale dans notre travail. Aucune cohérence n'était retrouvée entre l'épaisseur des membranes et leur résistance aux tests de traction qui avaient été préalablement réalisés pour des épaisseurs allant de 15 à 250 μm . Ainsi, nous avons maintenu l'épaisseur de 100 μm (soit 24 h d'electrospinning) pour l'élaboration de nos MA. Le tableau 8 reporte les résultats des tests de tractions.

Tableau 8. Comparaison des résultats aux essais de traction entre nos membranes artificielles et les données disponibles dans la littérature.

Échantillons	Module d'Young Moyen (MPa)	Contrainte maximale moyenne (MPa)	Déformation maximale moyenne (%)
PU100 %	3,2 \pm 0,1	/	/
PU-PMMA 70/30	70 \pm 20	3,0 \pm 0,9	34,9 \pm 7,3
PU-PMMA 60/40	120 \pm 30	4,2 \pm 1,1	16,3 \pm 5,5
PU-PMMA 50/50	130 \pm 20	3,8 \pm 0,7	12,0 \pm 6,4
Périoste humain (Manon <i>et al.</i> 2022) (83)	97,8 \pm 25,4	9,8 \pm 1,6	/
Fascia lata humain (Manon <i>et al.</i> 2022) (83)	1,5 \pm 0,4	96,8 \pm 3,2	/
Membrane induite de rat	PS = 75	PS = 0,28	1,5 - 2,9
Sprague Dawley	PR = 40	PR = 0,21	
Gaio <i>et al.</i> 2018 (82)*	TS = 74	TS = 0,3	
	TR = 55	TR = 0,26	

* variation de rugosité de surface des espaceurs PS : PMMA smooth ; PR : PMMA rough ; TS : Titanium smooth; TR : Titanium rough

Nous pouvons constater que les membranes artificielles avaient un module d'Young, qui augmentait avec l'augmentation du taux de PMMA, cependant le PU seul avait comportement différent, nettement plus élastique. En effet, il n'était pas obtenu de rupture aux tests de traction

sur les membranes en PU seul. Ces MA supportaient des contraintes à la rupture supérieures à celle de MI de rat Sprague Dawley dans l'étude de Gaio *et al.* de 2018, et approchaient celles du périoste humain (Manon *et al.* 2022) (83), bien qu'inférieures.

Enfin, leur déformation maximale était également supérieure aux MI de rat ce qui corroborait la facilité de manipulation chirurgicale, bien que ce résultat ne soit pas totalement transposable en chirurgie orthopédique humaine. Ces valeurs étaient pour la plupart similaires à la courbe contrainte-déformation du périoste de mouton analysée par McBride *et al.* (76). Le module d'Young des membranes PU/PMMA 70/30 et 60/40 était proche de celui du périoste humain ($97,8 \pm 25,4$ MPa) (83). Ces résultats montraient que la résistance maximale à la traction des membranes PU/PMMA atteignait une valeur maximale de $4,2 \pm 1,1$ MPa lorsque le rapport PU/PMMA était de 60/40, et un allongement maximal de $34,9 \pm 7,3$ % pour les membranes PU/PMMA 70/30.

Des échanges réguliers avec Hugo Bossut ont permis une évaluation continue des MA, conduisant à l'optimisation de plusieurs paramètres avant d'engager les analyses *in vitro* suivantes : tests de cytotoxicité et cytocompatibilité, étude de la perméabilité et analyse de l'adsorption des protéines. Ces dernières analyses *in vitro* sur les MA ayant été réalisées par moi-même au sein de l'unité INSERM U1008, ont validé la faisabilité de l'implantation *in vivo*, raison pour laquelle elles sont entièrement décrites ci-dessous.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Évaluation macroscopique de suturabilité des membranes artificielles

Une évaluation macroscopique de manipulabilité et de la suturabilité des membranes a été réalisée afin de garantir leur compatibilité avec une utilisation *in vivo* et en contexte chirurgical orthopédique et traumatologique. Les membranes électrofilées, découpées en carrés de 3×3 cm, étaient enroulées en un cylindre, imbibées de sérum physiologique (pour mimer le milieu chirurgical), puis suturées avec du fil résorbable 4-0 (OPTIME® 4/0, Péters Surgical™). Une membrane était considérée comme non suturable en cas de section ou d'arrachement au serrage du point de suture.

3.2.2. Test de perméabilité à l'albumine

Nous avons cherché à déterminer si ces MA étaient perméables aux facteurs de croissance en réalisant un test évaluant leur perméabilité à l'albumine (Mw : environ 65 kDa). En effet, la perméabilité des membranes doit permettre de favoriser la communication entre le milieu où

réside le defect et les facteurs de croissance par leur libre passage, afin d'éviter la résorption de la greffe, mais aussi d'empêcher l'invasion tissulaire fibroblastique, source de non-consolidation.

Cette évaluation a été réalisée en évaluant la perméabilité de nos membranes à l'albumine, montées sur un insert (Cellcrown® 24 NX, Scaffoldex™, Finlande). Ce dispositif permet de séparer deux « chambres », où la communication de liquide ne peut s'effectuer que par la membrane artificielle (Figure 27).

Dans la chambre inférieure, 750 μ L de solution de NaCl à 0,9 % sont placés, et dans la chambre supérieure 150 μ L de Bovine Serum Albumine (BSA) (2 g/L) sont ajoutés. Après avoir placé le dispositif dans un incubateur à 37°C, le passage d'albumine de la chambre supérieure à la chambre inférieure est mesuré à différents temps par prélèvement de 10 μ L dans chaque chambre et dépôt dans une plaque à 96 puits.

La concentration d'albumine dans chaque chambre supérieure et inférieure est mesurée par une méthode colorimétrique (*BiCinchoninic acid Assay, BCA de Pierce*) permettant le dosage des protéines : un volume de 200 μ L de réactif est ajouté dans chaque puits, suivi d'une incubation à 37°C pendant 20 minutes par spectrophotométrie (absorption optique maximale à 562 nm), celui-ci étant proportionnelle à la quantité d'albumine présente. Ainsi, plus la concentration d'albumine est élevée dans la chambre inférieure, plus la membrane artificielle est considérée comme perméable à celle-ci.

Les mesures ont été effectuées à $t = 2, 4, 8$ et 24 heures et l'essai de perméabilité a été reproduit sur trois MA différentes pour chaque ratio PU/PMMA inclus dans cette analyse.

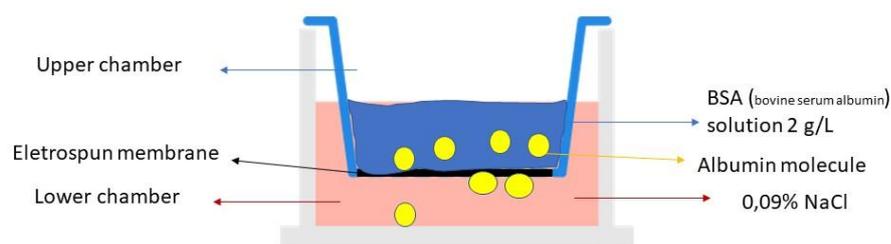


Figure 27. Schéma récapitulant le test de perméabilité des membranes artificielles.

3.2.3. Test d'adsorption-désorption

Pour réaliser ce test, les membranes ayant servi au test de perméabilités ont été rincées avec du phosphate-buffered saline (PBS) puis placées dans une plaque à 24 puits. Les protéines sont détachées par immersion dans une solution de SDS (sodium dodecyl sulfate) à 1 %, 500 μ L par

puits. Après immersion à température ambiante pendant 1h, les concentrations d'albumine dans les solutions ont été mesurées une nouvelle fois par un test BCA comme décrit ci-dessus.

3.2.4. Évaluation de la cytotoxicité indirecte

Les MA que nous souhaitons concevoir ont pour objectif de se substituer à la membrane induite, au moins durant les premières semaines, et de permettre une greffe osseuse en un temps. Or, la TMI repose sur une réaction complexe impliquant à la fois une réponse immunitaire « à corps étranger », une hypervascularisation locale et une stimulation de l'ostéogenèse sur un organisme vivant. Dans la MI, on retrouve des éléments cellulaires de ces trois lignées (immunitaire, vasculaire et osseuse) et plusieurs facteurs de croissance correspondantes.

À ce jour, aucun modèle *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico* ne permet de reproduire tous les éléments et étapes simultanément menant à la formation de la MI, ce qui limite l'exhaustivité de l'analyse *in vitro*. Néanmoins, avant réalisation des études sur animal, des analyses *in vitro* de cytotoxicité par la méthode indirecte et de cytocompatibilité présentées dans la prochaine section par la méthode directe, sur les lignées ostéogéniques et angiogéniques, ont été menées sur les MA. L'objectif était de vérifier, pour chaque lignée, l'absence de cytotoxicité susceptible de limiter l'implantation chez l'animal.

Les cellules utilisées provenaient de la lignée cellulaire préostéoblastique MC3T3-E1 (ATCC[®] CRL-2593[™]), immortalisée et établie à partir de tissus crâniens de *Mus musculus* (souris), et des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC, C-12281, Promocell[™] GmbH). Nous avons utilisé un milieu alpha-MEM (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific[™], USA), supplémenté avec 10 % v/v de sérum bovin fœtal (FBS, Gibco[®] ThermoFischer Scientific, USA), et de la gentamicine à 50 µg/mL. (Panpharma[™]) pour la culture des cellules préostéoblastique MC3T3-E1, et un milieu de culture Endothelial Cell Growth Medium MV (Promocell[™] GmbH, Heidelberg, Germany) supplémenté avec Endothelial Cell Growth SupplementMix (Promocell[™] GmbH, Heidelberg, Germany), de la streptomycine (0,1 g/L) et de la pénicilline (100 IU/mL) pour la culture des cellules microvasculaires pulmonaires humaines HPMEC. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un incubateur CO₂ (Sanyo[™], MCO-17AIC[®]) avec une atmosphère 5 % CO₂/ 95 % d'air, ainsi qu'une humidité relative de 100 %.

Les tests *in vitro* de cytotoxicité ont été réalisés selon la norme ISO10993-5, qui définit un seuil minimal de viabilité cellulaire de 70 %. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 4 × 10³ cellules par puits dans une plaque de 96 puits (Falcon[®], Merck[™], Darmstadt, Allemagne),

puis cultivées pendant 24 h, jusqu'à ce qu'elles atteignent environ 60 % de confluence. Des échantillons rectangulaires des MA ($3 \times 3 \times 100 \mu\text{m}$), ont été préparés, puis rincé avec 2 mL de milieu sans sérum pendant 5 min.

Pour l'extraction, les MA ont été immergées dans un milieu de culture complet dans un volume approprié ($6 \text{ cm}^2/\text{mL}$), pendant 24 h à 37°C et sous agitation de 80 rpm.

Après 24 h, les extraits ont été recueillis. Le milieu de culture des plaques de 96 puits a été entièrement remplacé par $100 \mu\text{L}$ /puits d'extraits non dilués (100 %), et les cellules ont été exposées aux extraits pendant 24 h sous une atmosphère contenant 5 % de CO_2 et 100 % d'humidité (Sanyo™, MCO-17AIC®). Le contrôle (négatif) correspondait à un milieu de culture complet ne contenant pas de membranes artificielles.

L'activité métabolique cellulaire a été mesurée par le test AlamarBlue®, en utilisant une solution d'AlamarBlue® (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA) diluée au 1/10 dans le milieu de culture complet. Les cellules ont été incubées pendant 2 heures, l'intensité de la fluorescence a été mesurée sur $150 \mu\text{L}$ de milieu par puits pour à une excitation de 560 nm/émission de 590 nm, sur un lecteur de plaque multipuits spectrophotométrique (CLARIOstar®, BMG Labtech™, Ortenberg, Allemagne).

Le signal de fluorescence a été corrigé en soustrayant celui de la solution témoin (solution d'AlamarBlue® à 10 % dans le milieu de culture complet). Les données ont ensuite été normalisées sur contrôle négatif pour exprimer un pourcentage représentant le "taux de survie".

3.2.5. Évaluation de la cytocompatibilité

Pour cette évaluation de la cytocompatibilité, des échantillons sous forme de pastilles de 15 mm de diamètre ont été stérilisés par rayonnement gamma puis placés dans une plaque à 24 puits (Costar®, Starlab™, France). Ils ont été stabilisés au fond des puits par des anneaux en Viton® (Radiospare™), pour prévenir le flottement des échantillons et empêcher la prolifération cellulaire sur leur face inférieure.

Les cellules MC3T3-E1 et HPMEC ont été placés dans les puits contenant les échantillons et dans les puits contrôles positifs (tissue culture polystyrènes, TCPS) avec une densité de 10 000 cellules/cm². Les cellules ont été cultivées pendant 3 et 6 jours sans renouvellement du milieu de culture et pour chacune de ces échéances, un test de viabilité cellulaire a été effectué en remplaçant le milieu de culture par $1000 \mu\text{L}$ de milieu de culture contenant 10 % d'AlamarBlue®, incubé ensuite pendant 2 h à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO_2 et 100 % d'humidité.

Puis, l'activité fluorimétrique a été mesurée à sur $150 \mu\text{L}$ de milieu par puits pour à une

excitation de 560 nm/émission de 590 nm, sur un lecteur de plaque multipuits spectrophotométrique. La solution témoin (solution d'AlamarBlue® à 10 %, dans le milieu de culture complet) a été soustraite de chaque échantillon, et les données d'intensité de fluorescence ont été normalisées par rapport au contrôle positif (TCPS) afin d'obtenir un pourcentage représentant le "taux de survie".

3.2.6. Analyses statistiques

Les données qualitatives sont présentées sous forme de nombres et de pourcentages. Les variables quantitatives sont présentées sous forme de moyennes et d'écart-types. Elles ont été arrondies à l'entier le plus proche. La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Les paramètres qualitatifs ont été comparés à l'aide du test de Chi-Deux ou du test exact de Fischer.

Les données quantitatives ont été comparées à l'aide des tests non paramétriques de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis lorsqu'il y avait plus de 2 groupes comparés. Les analyses de corrélation ont été réalisées à l'aide du test de Spearman pour les variables quantitatives (BiostatGV, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique affiliée à l'Université Sorbonne, Paris). Le seuil de significativité (α) a été fixé à 5 %.

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Sutureabilité des membranes artificielles

Les résultats ont révélé que les membranes constituées uniquement de PMMA ou avec un ratio PU/PMMA < 1 étaient trop friables et cassantes, se déchirant au passage du fil de suture et s'effondrant après immersion. Un ratio PU/PMMA > 1 s'est avéré nécessaire pour assurer leur bonne manipulabilité. Par ailleurs, l'utilisation du DMF comme solvant principal réduisait la sutureabilité, tandis qu'un équilibre DMF/DMSO améliorait la résistance des membranes (Figures 28 et 29).

Les membranes obtenues présentaient une épaisseur moyenne de 100 μm après 24 heures d'electrospinning. Xu *et al.* ont utilisé un mesh en zinc additionné d'une double couche de PCL/Chitosan et ont obtenu une membrane de 109 μm d'épaisseur (205). Tripathi *et al.* ont également fabriqué une membrane tricouche PCL/Gélatine/Bêta-TCP de 100 μm d'épaisseur en combinant les techniques d'electrospinning et de moulage (206). Ainsi, une épaisseur de 100 μm semblait être admise dans la littérature pour l'élaboration des MA et a été retenue pour la

suite des évaluations.



Figure 28. Membrane artificielle en PU100 % électrofilée à un ratio de solvant DMF/DMSO 50/50.



Figure 29. Sutureabilité de membranes artificielles en PU électrofilée dans un solvant DMF/DMSO à un ratio de 50/50 (à gauche), et de membrane artificielle en PU électrofilée dans un ratio de solvant DMF80/DMSO20 (au centre et à droite). La variation des ratios de solvants influençait considérablement la manipulation des membranes artificielles.

3.3.2. Évaluation de la perméabilité des membranes artificielles à l'albumine

Les résultats ci-dessous reportent les résultats des tests de perméabilité des 4 membranes artificielles analysées (Tableau 9). À T=24 h, 2/4 membranes testées présentaient une perméabilité très satisfaisante, avec un ratio proche de 1 entre les 2 chambres. La membrane en PU/PMMA 50/50 présentait un ratio plus faible à 0,53.

De façon assez surprenante, la membrane avec un ratio de polymère PU/PMMA 70/30 est restée non perméable à l'albumine. Plusieurs hypothèses ont été émises, comme la conformation des

polymères ou bien leur disposition les uns par rapport aux autres. Le diamètre des nanofibres a aussi été proposé, cependant les nanofibres de PU sont les plus fines et seraient donc les plus étanches au vu d'un electrospinning aux paramètres calibrés.

Enfin, la polarité des polymères a été évoquée, le PU étant le plus polaire et ayant permis d'obtenir des membranes plus perméables. La dernière hypothèse était l'adsorption de l'albumine dans les membranes qui se retrouvait donc piégée et ne passait plus dans la chambre inférieure. Cette hypothèse a été testée par un test d'adsorption-désorption.

Tableau 9. Résultats des tests de perméabilité. Le calcul du ratio L/U (Lower/Upper) repose sur le ratio entre l'absorbance mesurée dans la chambre inférieure et celle de la chambre supérieure.

MA par essai (N = 3)	T = 2 h	T = 4 h	T = 8 h	T = 24 h	Ratio L/U à T = 24 h
PU100 % Upper Chamber	0,413 ± 0,008	0,337 ± 0,019	NC	0,096 ± 0,002	0,979
PU100 % Lower Chamber	0,021 ± 0,009	0,047 ± 0,006	NC	0,094 ± 0,001	
PU/PMMA 50/50 Upper Chamber	0,662 ± 0,019	0,630 ± 0,019	0,659 ± 0,009	0,167 ± 0,014	0,53
PU/PMMA 50/50 Lower Chamber	-0,003 ± 0,001	-0,002 ± 0,001	0,024 ± 0,012	0,088 ± 0,004	
PU/PMMA 60/40 Upper Chamber	0,641 ± 0,007	0,483 ± 0,036	0,300 ± 0,021	0,115 ± 0,008	0,922
PU/PMMA 60/40 Lower Chamber	-0,002± 0,0001	0,011 ± 0,003	0,102 ± 0,013	0,106 ± 0,020	
PU/PMMA 70/30 Upper Chamber	0,537 ± 0,005	0,538 ± 0,052	NC	0,564 ± 0,028	0,0053
PU/PMMA 70/30 Lower Chamber	0 ± 0,0009	-0,001± 0,0009	NC	-0,003± 0,0019	

3.3.3. Évaluation de la capacité d'adsorption-désorption des membranes artificielles

Cette analyse a été réalisée afin de rechercher si les membranes artificielles piègeaient l'albumine lors du test de perméabilité, en l'empêchant de passer dans la chambre inférieure (Tableau 10).

De façon intéressante, la membrane en PU, qui semblait être la plus perméable à l'albumine, s'est avérée être celle qui avait le plus adsorbé l'albumine. La différence entre les 4 MA n'était pas significative ($p > 0,05$).

Tableau 10. Résultats du test d'adsorption-désorption.

Solvant DMF/DMSO 50/50	Absorbance	Rappel : le ratio L/U à T = 24 h, qui reflète la perméabilité des MA
PU100 %	0,049 ± 0,008	0,979
PU/PMMA 50/50	0,015 ± 0,005	0,53
PU/PMMA 60/40	0,012 ± 0,009	0,922
PU/PMMA 70/30	0,014 ± 0,007	0,0053

Un test de corrélation de Spearman entre perméabilité (ratio L/U) et absorbance était également non significatif ($p=0,35$), ce qui confirmait les résultats de ce tableau. L'hypothèse de l'adsorption des protéines ne permettait pas de statuer sur les causes de fluctuation de cette non-perméabilité pour nos membranes.

3.3.4. Résumé des tests perméabilité et d'adsorption-désorption

Au total, à l'issue de l'ensemble de ces analyses *in vitro* préalables aux analyses sur cellules, nous avons convenu de réaliser des membranes avec une épaisseur de 100 μm , offrant un compromis optimal entre le temps d'électrospinning (24 h), la facilité de manipulation et les propriétés mécaniques compatibles avec les résultats de la littérature.

Nous avons priorisé les membranes artificielles obtenues avec un ratio de solvant DMF/DMSO 50/50, les moins hydrophobes, pour les tests biologiques suivants. Deux types de MA ont été sélectionnés :

- Les MA en PU à 100 %, qui présentaient une bonne perméabilité, une manipulation chirurgicale relativement aisée, et des nanofibres de plus petit diamètre, bien que leur comportement mécanique diffère de celui de la MI et du périoste.

- Les MA en PU/PMMA 50/50, plus hydrophobe et moins perméables, mais dont les propriétés mécaniques se rapprochaient davantage de la MI de rat et du périoste humain, avec un module d'Young élevé et une déformation maximale relativement réduite.

Ces deux types de membranes, aux caractéristiques complémentaires, ont été retenues pour les analyses ultérieures de cytotoxicité indirecte et de cytocompatibilité directe *in vitro*, puis pour l'étude *in vivo* ci-dessous.

3.3.5. Évaluation de la cytotoxicité par tests indirectes sur les cellules préostéoblastiques et angiogéniques

Aucune cytotoxicité par la méthode indirecte n'a été retrouvée sur les cellules préostéoblastiques MC3T3-E1 et angiogéniques HPMEC avec les MA en PU à 100 % et PU/PMMA 50/50 électrofilées avec un ratio de solvant de DMF/DMSO de 50/50 (Figures 30 et 31). Ces résultats ont ainsi validé la non-cytotoxicité de ces MA, permettant d'approfondir leur évaluation en termes de cytocompatibilité.

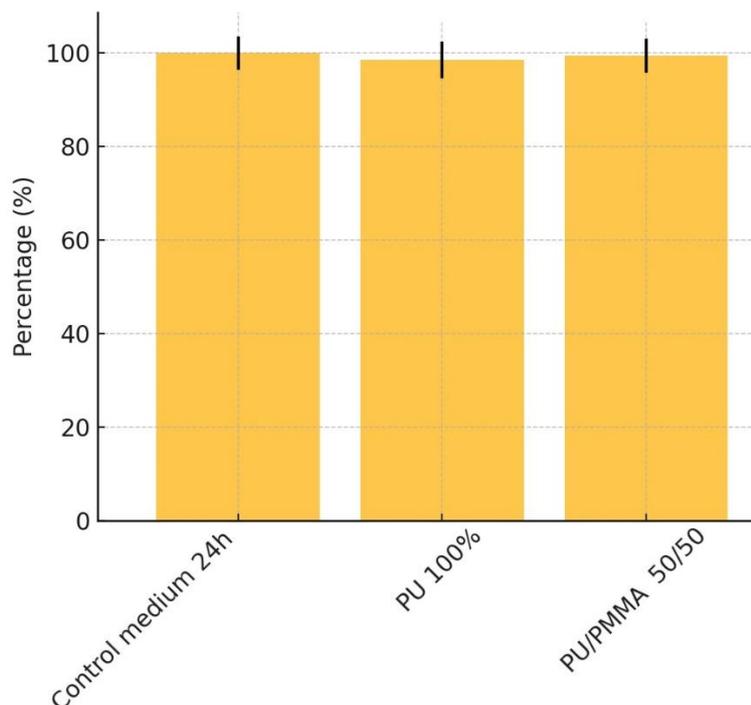


Figure 30. Résultats de l'analyse de cytotoxicité sur cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 par la méthode indirecte pour les membranes électrofilées en PU100 % et PU/PMMA 50/50 avec un ratio de solvant de DMF/DMSO de 50/50.

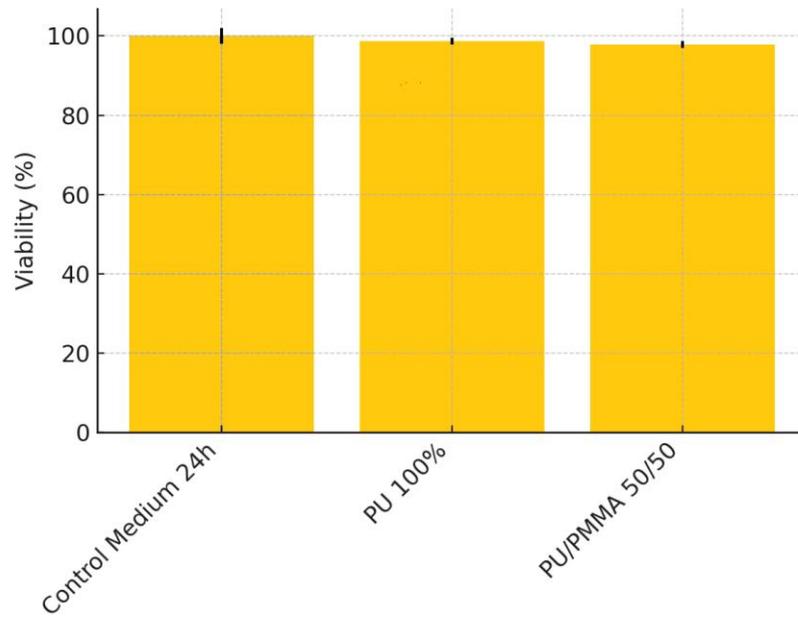


Figure 31. Résultats de l'analyse de cytotoxicité sur cellules endothéliales HPMEC par la méthode indirecte pour les membranes électrofilées en PU100 % et PU/PMMA 50/50 avec un ratio de solvant de DMF/DMSO de 50/50.

3.3.6. Évaluation de la cytocompatibilité sur les cellules préostéoblastiques et angiogéniques

Les analyses de cytocompatibilité ont mis en évidence une viabilité à J3 et J6 aux cellules MC3T3-E1 (Figure 32) et HPMEC (Figures 33) inférieure à 80 % ($p < 0,05$ versus contrôle). Toutefois, les membranes en PU/PMMA 50/50 présentaient une viabilité significativement supérieure à J3 et J6 par rapport aux membranes en PU seul pour les deux lignées cellulaires ($p = 0,02365$).

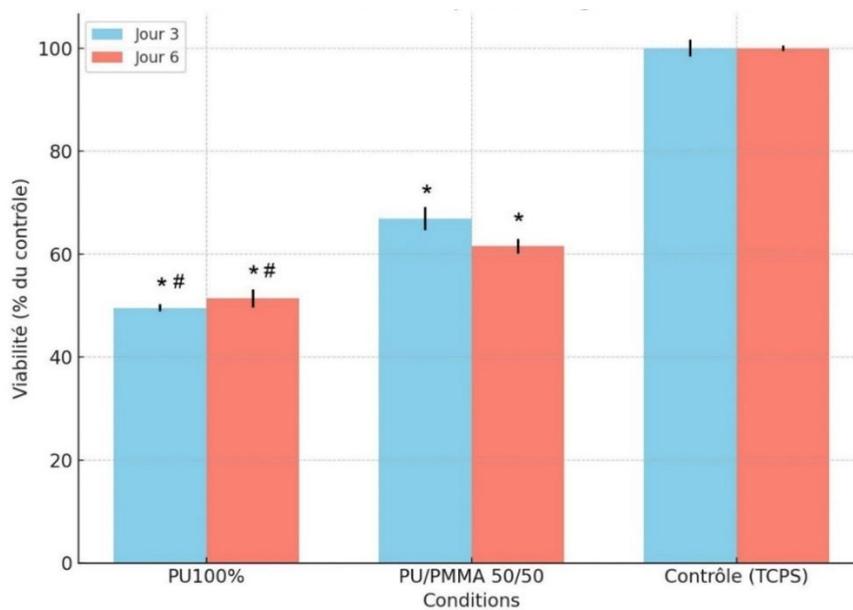


Figure 32. Résultat du test de cytocompatibilité (viabilité cellulaire) sur cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 des MA en PU100 % et en PU/PMMA 50/50 à J3 et J6. * : $p < 0,05$ versus contrôle ; # : $p = 0,02365$ PU 100 versus PU/PMMA 50/50.

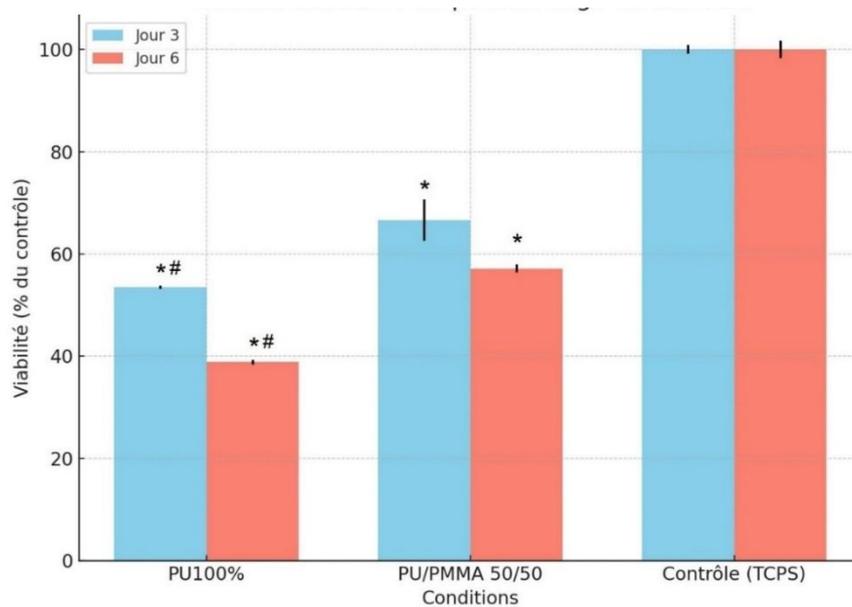


Figure 33. Résultat du test de cytocompatibilité (viabilité cellulaire) sur cellules endothéliales HPMEC des MA en PU100 % et en PU/PMMA 50/50 à J3 et J6. * : $p < 0,05$ versus contrôle ; # $p = 0,02365$ PU100 % versus PU/PMMA 50/50.

Ce résultat semblait paradoxal au regard des analyses préliminaires. En effet, les membranes en PU, avec une hydrophobie de surface plus faible (110° contre 130° pour les MA en PU/PMMA 50/50). Cependant, cette différence d'hydrophobie ne pouvait à elle seule expliquer les variations observées. L'absence de stimulation mécanique empêchait également d'évaluer l'influence des propriétés mécaniques des membranes sur ces résultats.

L'hypothèse la plus plausible pourrait être le diamètre des nanofibres des MA. Celles des MA en PU étaient en diamètre moyen de 674 nm, contre 2904 nm pour les MA en PU/PMMA 50/50 ($p < 0,05$). Un diamètre plus important (de l'ordre de 3 μm) semble avoir favorisé l'adhésion cellulaire, ce qui expliquerait la viabilité des cellules significativement supérieure sur ces membranes.

Ces observations sont cohérentes avec d'autres études. Mahmoud *et al.* ont montré qu'une membrane artificielle électrofilée à base de β -TCP-gélatine méthacryloyl/PCL favorisait l'adhésion et de la prolifération des BMSC alvéolaires. Avec un angle de contact inférieur à 90° des nanofibres de 2230 à 6410 nm, la prolifération cellulaire était en augmentation continue entre J1 à J7. Cela suggère que des nanofibres épaisses et hydrophiles pourraient améliorer la cytocompatibilité *in vitro* (209). De même, Tripathi *et al.* ont développé une MA tricouche complexe d'alginate-gélatine/PCL-gélatine- β -TCP et ont obtenu une cytocompatibilité supérieure à 80 % au test MTT avec les cellules MC3T3-E1 et les fibroblastes L929, à J3 et J7, avec un angle de contact compris de 60° à 100° (en fonction des constructions) (212).

Pour améliorer l'interaction cellules-membrane, Meng *et al.* ont incorporé des nanoparticules de calcium-phosphate amorphe (aCP) dans des membranes de poly (L-lactic acid) (PLLA) électrofilées (208). En exposant ces nanoparticules via un traitement à l'acétone, ils ont augmenté la porosité de la MA et obtenu des nanofibres de 1525 nm (plus du double de nos MA en PU). Bien que l'angle de contact de leur MA était de 105,8° et donc similaire à l'hydrophobie de nos MA en PU, la prolifération cellulaire était évaluée sur les cellules Saos-2 (sarcoma osteogenic cells-2) et montrait une augmentation progressive de la prolifération cellulaire sur leur MA. Les résultats étaient meilleurs pour les MA en PLLA-aCP que pour celle en PLLA seules, suggérant un effet bioactif de l'aCP.

Cela mettait donc en évidence qu'une hydrophobie des MA n'était pas un élément limitant dans la littérature, puisque les MA en PLLA de leur étude avaient un angle de contact de 138,2°. Cependant, des nanofibres de diamètre de l'ordre du micromètre pourraient optimiser l'adhésion cellulaire. La fonctionnalisation par un élément phosphocalcique serait un élément supplémentaire favorisant l'adhésion cellulaire en améliorant l'hydrophilie de surface.

En effet, Wang *et al.* ont exploré une biominéralisation de MA constituée de PLA et de Zeolitic imidazolate (ZIF-8) (composé de Zinc et de 2-methylimidazole) dans un Simulated Body Fluid (SBF). Après 14 jours d'immersion dans une solution de SBF, l'angle de contact des MA, diminuait passant de 134,2° à 80,4°, bien que les nanofibres soient inférieures à 500 nm en moyenne. Cette modification améliorait significativement la cytocompatibilité, avec une absorbance trois fois supérieure pour les MA minéralisées comparées aux non minéralisées (213).

Ainsi, bien que le diamètre des nanofibres puisse expliquer en partie la différence de cytocompatibilité entre nos deux MA, d'autres facteurs, tels que la fonctionnalisation avec des éléments phosphocalciques, pourraient également améliorer l'adhésion et la prolifération cellulaire. Une stratégie de minéralisation, soit intégrée dès la fabrication, soit réalisée ultérieurement par immersion en SBF comme proposé par Wang *et al.* (213), pourrait constituer une voie d'optimisation pertinente.

L'étude de Wang *et al.* visait également à analyser la capacité de leur MA à induire une polarisation des macrophages en phénotype M2 (anti-inflammatoire), ainsi qu'à stimuler l'angiogenèse. Ils ont utilisé une analyse RT-PCR pour mesurer l'expression des marqueurs CD206 et VEGF sur la lignée cellules RAW264.7 (macrophages murins tumoraux). Les résultats ont montré une expression significativement plus élevée de ces marqueurs dans les MA minéralisées, ce qui renforce l'intérêt de fonctionnaliser nos MA pour améliorer la polarisation macrophagique M2 et favoriser l'angiogenèse après implantation *in vivo*. Ces deux

facteurs sont essentiels pour limiter l'inflammation excessive et favoriser la vascularisation de la greffe osseuse, réduisant ainsi le risque de résorption.

Xu *et al.* ont adopté une approche similaire en électrofilant une solution de PCL/Chitosan sur un support mesh métallique en zinc. L'avantage du zinc, selon les auteurs, résidait dans la capacité de l'ion Zn^{2+} à promouvoir la minéralisation de la matrice osseuse et ses propriétés anti-inflammatoires, à la condition qu'il ne soit pas libéré de manière contrôlée et non excessive. Leur procédé visait à contrôler la libération excessive du zinc, réduisant ainsi son effet potentiellement toxique sur la prolifération cellulaire. Cependant, une cytotoxicité indirecte a été observée sur les cellules MC3T3-E1, nécessitant une dilution du milieu d'extraction pour atténuer les effets négatifs du zinc (202).

D'autres matériaux bioactifs ont été testés en electrospinning, notamment les bioverres (214) et le magnésium (207). Elkhoully *et al.* ont étudié l'electrospinning d'une solution à base de PCL/Gélatine et de bioverre (Bioglass 45S5). Plusieurs configurations ont été comparées, notamment des constructions mono- ou doubles couches, avec des nanofibres d'un diamètre moyen de 565 nm. Les études de cytotoxicité indirectes ont été menées sur cellules MRC-5 (fibroblastes pulmonaires humains normaux), ce qui diffère de nos modèles, mais les résultats ont confirmé que l'adjonction de Bioverre 45S5 ne compromet pas la viabilité cellulaire, ce qui en fait une alternative intéressante au zinc pour stimuler la biominéralisation (214).

Zhang *et al.* ont exploré l'electrospinning du PCL associé à la whitlockite ($Ca_{18}Mg_2(HPO_4)_2(PO_4)_{12}$), un phosphate de calcium contenant du magnésium. L'analyse de cytocompatibilité sur BMSC de rats Sprague Dawley (méthode CCK-8) a confirmé une bonne cytocompatibilité et une prolifération cellulaire stable de 1 à 5 jours (207).

Certains auteurs proposaient même d'incorporer une molécule bioactive directement dans les MA, comme la tétraméthylpyrazine, ajoutée à une MA en PCL/Gélatine (204). Les nanofibres obtenues mesuraient de 390 nm de diamètre moyen et présentaient un angle de contact de moins de 90° , ce qui les rendait nettement plus hydrophiles que nos MA. La culture cellulaire était réalisée sur cellules D1 de souris (Bone Marrow Progenitor Cell Line) et une augmentation progressive de la fluorescence était effectivement obtenue de J1 à J5, supérieure pour le groupe de MA avec incorporation de tétraméthylpyrazine.

Dans la littérature, aucune étude ne mentionne l'association du PU et du PMMA pour développer des membranes artificielles dédiées à la régénération osseuse. Cependant, plusieurs équipes ont exploré le PU fonctionnalisé soit par l'adjonction des molécules bioactives, soit par une minéralisation (199,215–217). Par exemple, Zhang *et al.* ont développé une MA en PU biodégradable par electrospinning incorporant du FGF-2. Ce facteur de croissance joue un rôle

clé dans l'activation macrophagique et la stimulation des fibroblastes et des cellules endothéliales. L'avantage de leur approche résidait dans l'emploi d'un électrospinning par émulsion, évitant l'emploi de solvants organiques et favorisant une meilleure répartition du FGF-2. Le PU était formé à l'aide de PCL et de isophorone diisocyanate.

Ce choix est notable, car le PU de notre étude n'était pas résorbable, contrairement aux tendances actuelles dans la littérature visant à favoriser la résorption des MA *in vivo*. La majorité des études sur les MA en PU concernent des membranes pour guider la régénération osseuse dans un contexte de perte de substance localisée, notamment en pathologie dentaire, où une membrane non résorbable doit souvent être retirée une fois la reconstruction osseuse achevée. En orthopédie – traumatologie, cette contrainte est moins présente, sauf en cas de reprises chirurgicales liées à une infection.

Les nanofibres obtenues par Zhang *et al.* présentaient un diamètre comparable à celui de nos MA (entre 683 nm et 856 nm, sauf dans une configuration à 1329 nm). Puisqu'il s'agissait aussi du même type de polymères, nous pouvons comparer les résultats de leur test d'étirement aux nôtres. Le module d'Young de nos MA en PU était inférieur aux 6 configurations de Zhang *et al.*, dont les valeurs variaient entre 15 à 95 MPa -- des valeurs proches de celles de nos MA en PU/PMMA 70/30. De plus, leurs membranes présentaient une élongation avant rupture de 100 % à plus de 400 %, suggérant une souplesse compatible avec une application chirurgicale.

Malheureusement, leur étude ne comportait pas une analyse de l'hydrophilie de surface, mais incluait une analyse de cytocompatibilité qui confirmait une bonne viabilité cellulaire des cellules BMSC de rat (test CCK-8) de J1 à J7. Notamment, la présence de FGF-2 renforçait cette viabilité, avec une absence de différence significative avec le contrôle à J7, contrairement aux MA sans FGF-2 (215).

Trois autres études ont privilégié l'adjonction d'un composant inorganique au PU, notamment le dioxyde de titane (TiO₂) (199) et l'hydroxyapatite (216,217). Dans l'étude de Zhu *et al.*, les MA ont été électrofilées à partir d'une solution de PU et de nanoparticules de TiO₂ (nTiO₂) et présentaient une épaisseur de 100 µm, comparables à celle de nos MA. Ils ont observé des nanofibres d'un diamètre inférieur à 1000 nm, mais avec une agrégation de nTiO₂. Pour pallier ce problème, ils ont utilisé un composé associant l'acide diméthylolpropionique (DMPA) au nTiO₂ grâce aux groupements hydroxyl du DMPA. Cette modification technique souligne la difficulté d'incorporer des particules inorganiques dans une solution d'électrospinning tout en assurant une répartition homogène des nanoparticules dans la membrane électrofilée. Grâce à cette optimisation, ils ont obtenu un module d'Young entre 40 et 50 MPa, nettement supérieur à celui de nos MA en PU seul. La cytocompatibilité a été évaluée sur des cellules BMSC de rats,

avec une prolifération cellulaire continue entre J1 et J7.

Mi *et al.* (221) ont exploré l'incorporation de micro- ou nanoparticules d'hydroxyapatite (HAp) dans des PU durs (Tecophilic®) et mous (Carbothane®) commercialisés. Le procédé consiste simplement à mélanger les poudres d'HAp dans du DMF, puis associée à l'un ou l'autre des PU étudiés avant electrospinning. Ils ont ainsi obtenu des membranes homogènes, sans « perles », et plus lisses avec le TPU mou. Un point notable est que les microparticules d'HAp restaient exposées à la surface de membrane, tandis que les nanoparticules d'HAp étaient encapsulées dans les nanofibres de PU.

Les MA de cette étude présentaient des nanofibres de l'ordre de 420-440 nm pour le TPU dur et de 620-690 nm pour le TPU mou, sans réelle incidence de l'intégration d'HAp sur ce diamètre. L'analyse de l'hydrophilie par angle de contact retrouvait une importante différence entre le TPU mou (très hydrophile avec un WCA de 0° à 17,9°) et le TPU dur (WCA > 120°), du fait des groupes hydrophiles plus importants dans le TPU mou. Ce résultat nous amène donc à comprendre que le type du PU influencerait directement l'hydrophilie de surface de la membrane électrofilée. De plus, l'ajout de micro- ou nanoparticule d'HAp n'avait pas d'influence significative sur le WCA de leur membrane, bien que les particules d'HAp permettent habituellement d'améliorer l'hydrophilie de surface des polymères hydrophobes.

Mécaniquement, les MA en TPU mou présentaient un très faible module d'Young (> 0,05 MPa) et une contrainte maximale de 200 à 350 %, à l'inverse des MA en TPU dur. Notre MA en PU à 100 % était donc relativement proche du comportement mécanique des TPU mou de leur étude, indépendamment de l'ajout de l'HAp. En revanche, l'augmentation du module d'Young et une contrainte maximale à l'étirement entre 40 % et 75 %, associé à une hydrophobie de surface rapprochent les MA en TPU dur des caractéristiques *in vitro* de nos MA en PU/PMMA. Quelles conséquences ont eu ces différences sur la cytocompatibilité et l'activité cellulaires des membranes artificielles développées par Mi *et al.* ? Ces analyses cellulaires ont été effectuées sur des MSC humaines et ont montré que, malgré cette hydrophobie de surface des membranes en TPU dur, les cellules se développaient significativement plus ($p < 0,05$) que sur les membranes en TPU mou avec une quantité d'ADN en nanogramme à J14 (test Pico Green) 2 fois supérieur aux MA en TPU mou.

Les auteurs notaient cependant que la surface des MA en TPU mou était plus lisse que celles en TPU dur, ce qui a pu également impacter sur le comportement cellulaire. Enfin, il n'existait pas de réelle différence sur la différenciation des MSC en ostéoblastes dans leur étude, avec une activité phosphatase alcaline non significativement différente entre les MA en TPU mou ou dur isolées comparées aux membranes fonctionnalisées par micro- ou nanoHAp. Ainsi,

l'adjonction d'HAp, avec une absence d'effet sur l'hydrophilie de surface, ne permettait pas d'améliorer particulièrement la viabilité cellulaire ou la différenciation de MSC de MA en PU *in vitro* (217).

Tetteh *et al.* utilisaient également des PU associées à des micro- ou nano particules de HAp, diluées dans des solutions variables de DMF/THF (tetrahydrofurane). Les nanofibres avaient un diamètre allant de 1560 à 2950 nm avec une augmentation du module d'Young maximale avec les microparticules d'HAp. Cependant, ces différences ne semblaient également pas influencer la cytocompatibilité aux cellules MLO-A5 (lignée murine postostéoblastique et préostéocyte) et aux cellules progénitrices mésenchymateuses embryonniques humaines, qui progressaient jusqu'à J28.

En ce qui concerne le PMMA, l'électrospinning de ce polymère était moins souvent retrouvé pour des applications de régénération osseuse (218,219). L'étude de Ura *et al.* (223) s'intéressait à l'intégration cellulaire de cellules MG63 (human-like osteoblast-like cell line) sur des membranes artificielles en PMMA faites de nanofibres électrofilées, de microfibrilles, mais également sous forme de film ou de rubans. Ils retrouvaient que la rugosité de surface était de 0,26 μm pour les films contre 7,03 μm pour les microfibrilles et 1,2 μm pour les nanofibres. Les nanofibres avaient un diamètre moyen de 340 nm. Ces MA étaient hydrophobes avec un angle de contact moyen de 116°. Les microfibrilles, de diamètre moyen 3590 nm, étaient encore plus hydrophobes (139,9°). Le diamètre de leurs microfibrilles de PMMA ainsi que leur angle de contact étaient donc similaires à nos MA composites en PU/PMMA.

La mise en culture des cellules MG63 était réalisée et analysée à J1 et J3. Ils retrouvaient qu'à J3, les cellules s'étaient fortement étalées en surface de nanofibres et présentaient des filopodes de faible longueur. Cela était dû à la faible porosité des nanofibres qui ne laissait que peu d'espace pour s'ancrer dans la profondeur de la membrane. En revanche, les membranes en microfibrilles présentaient des cellules avec des filopodes significativement plus longues, pouvant s'ancrer dans la profondeur de la membrane pour former des ponts entre les microfibrilles, où l'espace était plus important.

Ces résultats confortaient nos résultats avec des MA en PU/PMMA, significativement plus hydrophobes et aux nanofibres de plus grand diamètre, mais pouvant offrir de meilleures capacités d'ancrage cellulaire. N'ayant pas analysé la rugosité de surface de nos MA, nous ne pouvons pas conclure sur une différence sur ce point, bien que les constatations de l'étude de Ura *et al.* suggèrerait une plus grande rugosité de surface de nos MA en PU/PMMA *versus* PU seul.

Son *et al.* (219) ont évalué plusieurs ratios de PMMA et de PCL, électrofilés avec du DSMO

comme solvant. Ils retrouvaient également des fibres de diamètre oscillant entre 2000 nm et 2500 nm pour un angle de contact entre 110° et 95°, diminuant avec l'augmentation du taux de PMMA, ce qui était à l'opposé des constatations de notre travail. Cependant, l'analyse de cytotoxicité indirecte aux cellules MG-63 montrait une viabilité au-delà de 80 % à J1, identique à nos résultats.

Enfin, la fonctionnalisation des nanofibres de PMMA électrofilées, par un composé inorganique comme le bioverre ou l'HAp sous forme de nanoparticules, a récemment été aussi publié. Ceci souligne l'intérêt de ce polymère dans l'élaboration de stratégies de régénération osseuse s'appuyant sur des biomatériaux électrofilés similaires à ceux développés dans notre travail.

Álvarez-Carrasco *et al.* (220) ont opté pour l'évaluation de plusieurs ratios de PLA et de PMMA électrofilés et fonctionnalisés par 10 % de nanobioverre, avec pour solvant du DMF et du chloroforme. Des fibres de diamètre de l'ordre du micromètre étaient générées et restaient globalement hydrophobes au test du water contact angle. Le module d'Young des différentes MA générées était supérieur à nos MA en PU seul, mais inférieure à celles en PU/PMMA, conformément à une plus grande déformation maximale avant rupture dans leur étude (75 à 130 %). L'adjonction de bioverre réduisait significativement l'étirement maximal avant rupture. La minéralisation *in vitro* par immersion dans du SBF était bien retrouvée avec un ratio Ca/P entre 1,87 et 2,06 pour les MA fonctionnalisées par du bioverre. Cela n'était pas le cas pour leur MA non fonctionnalisées (aucune minéralisation jusqu'à J21). La viabilité cellulaire sur cellules HBOF 1,19 (fetal human osteoblast-based cell line) était supérieure à 80 %. Ce résultat intéressant orienterait l'optimisation future des MA de notre travail.

Zaszczyńska *et al.* (221) ont développé une MA à base de PMMA électrofilé à l'aide de DMF, associé à de l'HAp sous forme de nanoparticules. Les nanofibres produites étaient finalement d'un diamètre similaire à nos membranes en PU (entre 550 et 730 nm). Cela souligne le faible effet de l'ajout de nanoHAp sur le diamètre des nanofibres. Conformément aux autres études et à nos résultats, le WCA moyen était de 130° sans nanoHAp et 125° avec une faible amélioration de l'hydrophilie de surface avec ajout de composés inorganiques aux MA. Malheureusement, cette étude n'a pas réalisé d'analyse biomécanique par test d'étirement. Dans notre travail, l'élaboration de nanofibres de PMMA uniquement ou bien dans une solution avec un ratio de PMMA supérieur au PU restait possible. Cependant, la manipulation macroscopique retrouvait des MA difficilement manipulables qui se déchiraient facilement. Cela rendait impossible leur utilisation sur terrain chirurgical à notre sens et pourrait expliquer que ces tests n'aient pas été réalisés dans l'étude de Zaszczyńska *et al.* Il restait intéressant de noter que la viabilité cellulaire aux cellules MG-63 était de plus de 80 % avec ou sans nanoHAp.

Ainsi, la littérature exploitait également le PMMA seul ou en adjonction à d'autres. Leur fonctionnalisation reposait effectivement majoritairement sur des composés inorganiques qui modifiaient en général l'hydrophobie de surface en la réduisant. Les membranes générées présentaient cependant une cytocompatibilité supérieure à nos résultats malgré des données *in vitro* globalement semblables à nos MA.

3.3.7. Résumé : sélection des membranes artificielles pour évaluation *in vivo*

Au vu de ces résultats *in vitro*, nous avons conclu qu'il était nécessaire de réaliser l'implantation *in vivo* des MA en PU à 100 % et en PU/PMMA 50/50 dans une stratégie en 1 temps de reconstruction d'un defect fémoral de rat. Le diagramme de flux ci-dessous (Figure 34) résume les étapes du processus de sélection des membranes qui ont été utilisées pour les évaluations *in vivo*. La partie suivante de la thèse décrit donc la mise en place de ce modèle animal et l'évaluation *in vivo* des résultats de l'implantation de nos membranes artificielles.

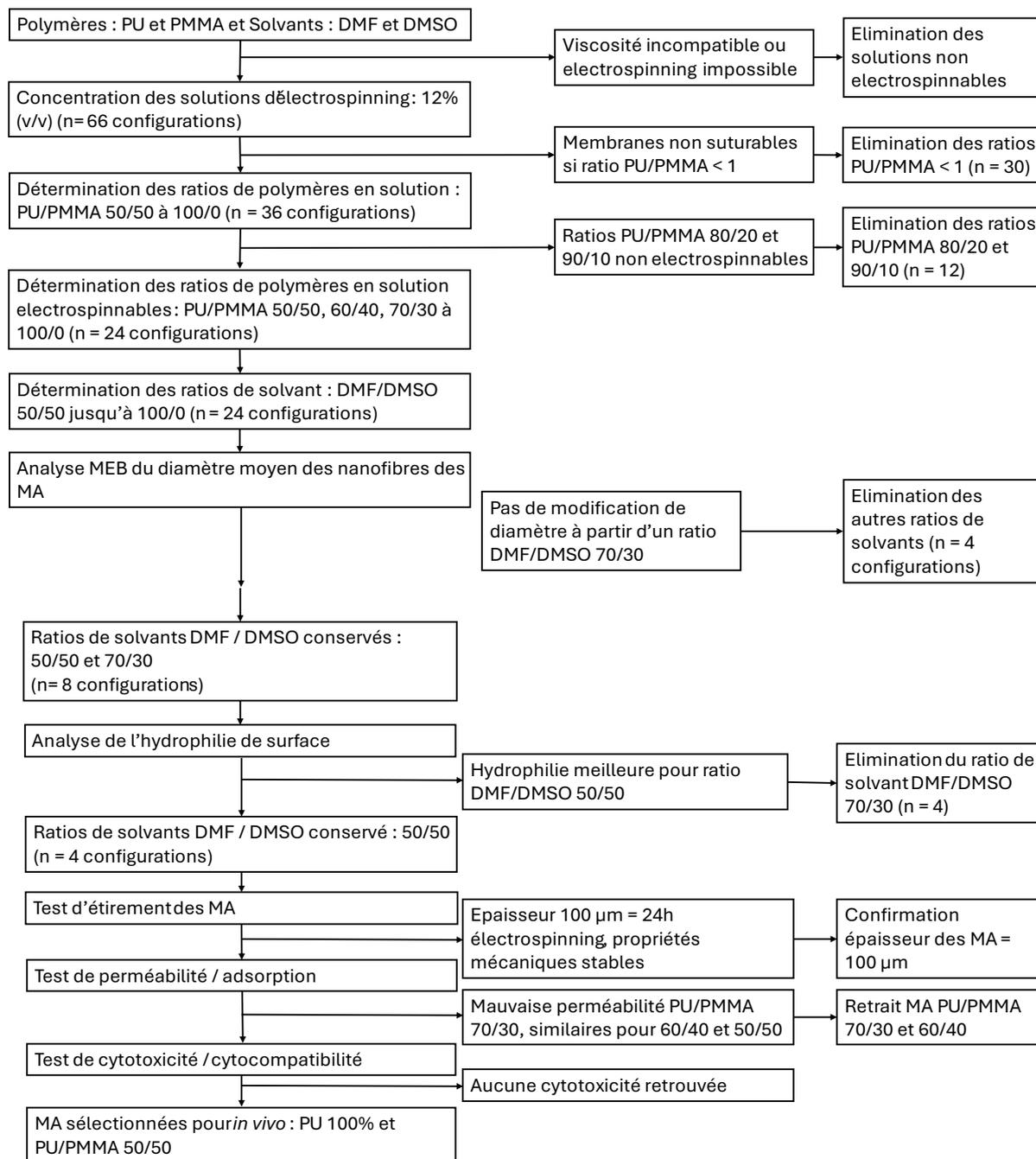


Figure 34. Le diagramme de flux du processus décisionnel résumant la sélection des membranes artificielles pour l'étude *in vivo*.

4. MISE EN PLACE D'UN MODÈLE *IN VIVO* DE DEFECT CRITIQUE FÉMORAL DE RAT ET ÉVALUATION *IN VIVO* DES MEMBRANES ARTIFICIELLES

4.1. Introduction

Simultanément à la conception, l'élaboration et l'évaluation *in vitro* des MA, ce travail de thèse avait pour objectif de concevoir et d'éprouver un protocole de recherche animale permettant l'évaluation *in vivo* des MA (protocole APAFIS 46969).

Une revue systématique approfondie de la littérature a été effectuée et publiée afin de mettre en place le modèle animal d'évaluation des membranes conçues ainsi que du groupe contrôle (158). Les modèles animaux de défauts osseux critiques sont largement utilisés pour comprendre et améliorer les mécanismes biologiques et cellulaires très complexes qui conduisent à la formation des MI et pour tester l'efficacité des biomatériaux ou des techniques d'ingénierie du tissu osseux.

La réalisation des défauts critiques fémoraux *in vivo* chez le rat est le modèle le plus fréquemment étudié dans ce domaine (86). Par rapport à des modèles animaux plus grands, l'élevage et les procédures chirurgicales chez les rats sont plus rapides, plus faciles et plus rentables. Comparé au tibia, la forme cylindrique du fémur permet une ostéosynthèse plus sûre et une meilleure couverture des tissus mous (222,223). La fixation par plaque et vis est la méthode d'ostéosynthèse fémorale la plus fréquente (158).

Le premier objectif de cette partie de thèse était de mettre en place et d'éprouver un modèle de defect osseux critique fémoral chez le rat Sprague-Dawley au sein de notre unité de recherche. L'objectif était de pouvoir, à terme, implanter nos MA associées à une greffe osseuse en un seul temps et de comparer les résultats histologiques et radiologiques obtenus avec ceux d'une TMI classique en 2 temps. L'évaluation *in vivo* reste à l'heure actuelle indispensable à toute étude préclinique visant le passage à un modèle sur gros animal en cas de succès.

Pour éprouver ce modèle préclinique, un defect fémoral critique était créé sur les rats et 2 configurations d'ostéosyntheses étaient comparées radiologiquement, cliniquement et histologiquement (en utilisant des méthodes histologiques, immunohistochimiques et d'immunofluorescence) afin de sélectionner la configuration la plus performante en termes de stabilité fémorale et de qualité de la membrane induite générée.

Une fois ce modèle validé, ce travail de thèse avait pour second objectif d'évaluer *in vivo* la consolidation du defect fémoral via une technique en 1 temps employant les membranes artificielles (TMA) préalablement validées *in vitro* et une greffe osseuse directe du defect. Cette technique était comparée à une TMI classique en deux temps.

L'hypothèse principale était que ces membranes artificielles permettaient une greffe en un temps avec un taux de consolidation radiologique supérieure à une TMI en 2 temps. Les objectifs secondaires étaient d'analyser les membranes artificielles après implantation *in vivo* ainsi que la réaction à corps étranger à leur contact et la consolidation des defects osseux par le biais d'analyses histologiques.

4.2. Matériel et méthodes

4.2.1. Protocole expérimental et conformité éthique

4.2.1.1. Mise en place du protocole éthique

Ce modèle animal impliquait l'utilisation de rats Sprague Dawley âgés de 10 semaines. Toutes les procédures expérimentales sur les animaux ont été réalisées dans l'animalerie de l'Université de Lille (accord F59-35010) conformément aux réglementations européennes en vigueur concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (directive 2010/63/UE). Les protocoles et les procédures chirurgicales ont été évalués et approuvés par le ministère français de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation et le Comité d'éthique pour l'expérimentation animale (Projet APAFIS No. 46969). L'étude *in vivo* s'est déroulée en plusieurs étapes :

- Étape 1 – Mise en place du modèle TMI : création du defect et formation de la membrane induite

La première étape a consisté à réaliser la TMI chez le rat en créant une perte de substance osseuse fémorale critique associée à la mise en place de ciment orthopédique et d'une ostéosynthèse stable par plaque vissée. Cette étape constitue le groupe contrôle de l'étude, pour laquelle la membrane induite se formera en 4 semaines, correspondant à ce qui est actuellement réalisé chez l'homme, lorsqu'une technique de membrane induite est indiquée.

À l'issue du premier temps, les MI ont été prélevées et analysées histologiquement. Cette étape préliminaire était essentielle puisque ce travail de thèse avait pour objectif d'implanter ce modèle animal au sein du laboratoire. Elle a ainsi permis de l'éprouver et de l'optimiser par un contrôle régulier des animaux, de leur tolérance à la procédure (224) ainsi que par un suivi radiologique durant les 4 semaines suivant ce 1^{er} temps.

Pour cette étape, deux configurations d'ostéosynthèse par plaque et vis ont été comparées : un groupe de rats avait une plaque de 1 mm d'épaisseur et des vis de 2 mm de diamètre ; l'autre groupe avait une plaque de 0,6 mm d'épaisseur et des vis de 1,5 mm de diamètre. À l'issue de cette comparaison, le modèle présentant la configuration la plus performante en termes de fiabilité du montage, de stabilité fémorale, et de caractéristiques histologiques et radiologiques a été retenu pour la suite de l'étude.

- Étape 2 – Analyse de la consolidation fémorale après greffe osseuse

L'étape suivante a consisté à analyser la capacité de consolidation du fémur après greffe osseuse. Elle correspond à la TMI en 2 temps réalisée chez l'homme. Au cours de cette étape, le groupe contrôle aura une technique de membrane induite classique en 2 temps, séparés de 4 semaines avec greffe osseuse autologue corticospongieuse prélevée sur des vertèbres caudales du rat. La consolidation radiologique des defects fémoraux a été évaluée à 8 semaines (analyse radiographique) puis à 12 semaines postopératoires (analyses radiographiques et scanographique) après le 2^d temps opératoire.

- Étape 3 – Évaluation des membranes artificielles en un temps

Enfin, l'étude visait à évaluer la capacité des membranes artificielles à permettre la consolidation du defect osseux en un seul temps. Les groupes d'étude suivaient un protocole identique à celui du groupe contrôle, à l'exception de ciment qui n'était pas utilisé pour combler le defect fémoral.

À la place, le defect osseux fémoral était entouré de la membrane artificielle, et les rats bénéficiaient d'une seule chirurgie comportant l'ostéosynthèse, la greffe osseuse et l'implantation de la membrane en un seul temps.

La consolidation fémorale était également analysée à 8 semaines (analyse radiographique) ainsi qu'à 12 semaines postopératoires (analyses radiographique et scanographique) (Figure 38).

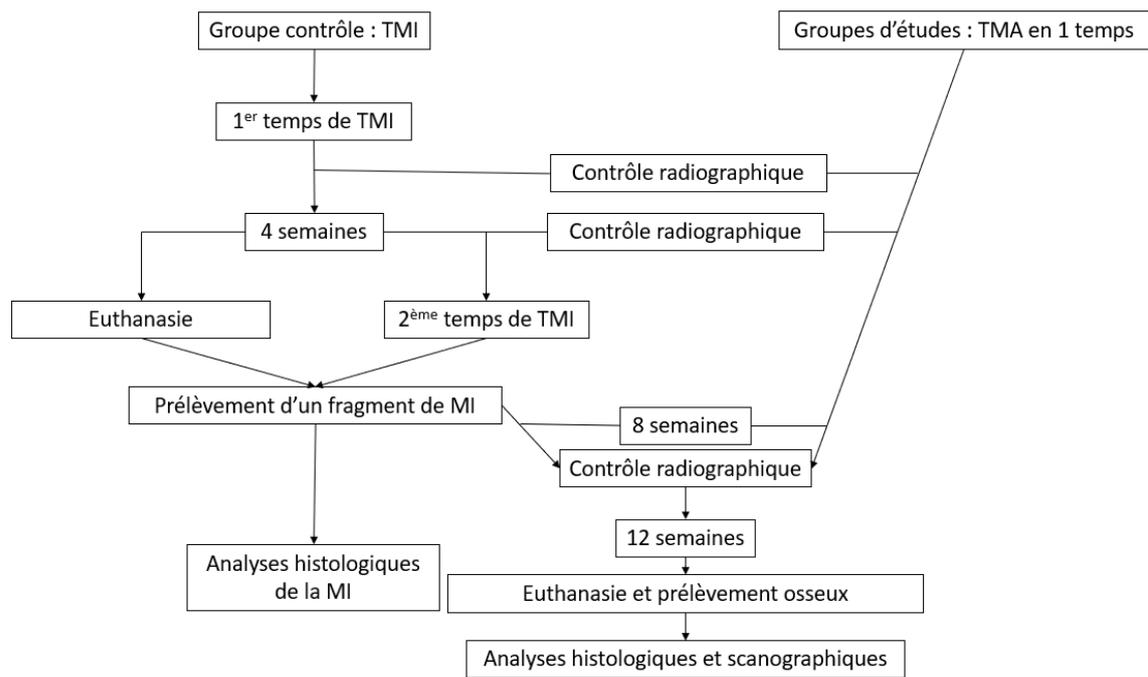


Figure 35. Schéma chronologique du protocole expérimental d'évaluation *in vivo* des membranes artificielles. TMI : Technique de la Membrane Induite ; TMA : Technique de la Membrane Artificielle.

4.2.1.2. Détermination du nombre d'animaux nécessaires

Le nombre de rats par groupe a été déterminé selon les principes des 3R (Replacement, Reduction, and Refinement) (225). Cette détermination reposait sur des études antérieures réalisées sur le même modèle animal, qui présentaient une analyse de puissance *a priori*.

Celles-ci étaient basées sur des variables histologiques quantitatives avec un écart-type regroupé de 25 % et une puissance de 80 % (47,177). Le niveau de différence estimé était de 45 %, et la taille de l'échantillon requise se situait entre 8 et 10 par groupe. Une taille d'effet élevée a été proposée par Ziroglu *et al.* (f de Cohen = 0,60), qui ont déterminé *a priori* 7 animaux par groupe (100).

L'étude de Xie *et al.* sur la comparaison entre la fixation par plaque et l'absence de fixation des defects du radius chez le lapin était plus proche des comparaisons effectuées sur la fiabilité de notre modèle, puisqu'elle comportait une analyse biomécanique de résistance des fixations des defects. Chaque groupe comprenait 6 lapins et une force de compression maximale moyenne de 110 Newtons contre 32 Newtons ($p < 0,05$). La taille de l'effet était importante (supérieure à 2) (116).

L'analyse de puissance *a priori* de notre étude a été basée sur ces études antérieures et a été réalisée à l'aide du programme G-Power version 3.1.9.7, en s'appuyant sur ces données issues

de la littérature.

L'étude de la fiabilité du modèle, par la comparaison du nombre d'échecs entre les 2 types d'ostéosynthèse (plaques de 0,6 mm *versus* 1 mm d'épaisseur), a été réalisée à l'aide d'un test exact de Fisher. Pour une puissance de 0,80, une valeur alpha de 0,05 et une taille d'effet de 1, le nombre d'animaux nécessaires était de 8 par groupe.

Pour tenir compte du risque de complications, un groupe (plaque de 1 mm d'épaisseur avec vis de $\Theta 2$ mm appelé « plaques épaisses ») comptait 10 rats et le second groupe (plaque de 0,6 mm d'épaisseur avec vis de $\Theta 1,5$ mm, appelé « plaques fines ») comptait 9 rats.

Enfin, le nombre de rats ayant eu une TMA était de 10 par groupe également. Cette répartition permettait donc de tester à la fois la fiabilité du modèle entre 2 types de plaques, mais également le critère de jugement principal, à savoir la consolidation du defect fémoral entre le groupe contrôle TMI et les 2 groupes d'études de TMA.

4.2.2. Mise en œuvre de la technique de membrane induite chez le rat

4.2.2.1. Procédure chirurgicale pour l'analyse de la membrane induite et la validation du modèle animal

Réalisation du modèle de defect fémoral chez le rat

Pour réaliser cette étape, un modèle de defect fémoral de rat a été mis en place sur 19 rats Sprague-Dawley mâles (Janvier Labs™, Le Genest-Saint-Isle, France), âgés de 10 semaines et pesant 450-500 grammes. Ces 19 rats constituaient le groupe « contrôle » de notre protocole de recherche, réparti en 2 sous-groupes comme décrits ci-dessous. Un vingtième rat avait été employé au préalable pour réaliser une étude de faisabilité technique du defect fémoral et vérifier la bonne tolérance de la procédure à 24h postopératoires.

Les rats ont été hébergés séparément dans un environnement à température contrôlée (21°C), alternant 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité, avec une circulation d'air adéquate, et ont reçu de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Les rats ont été acclimatés pendant au moins 7 jours avant toute intervention.

Toutes les interventions chirurgicales ont été réalisées dans des conditions d'asepsie chirurgicales strictes. L'anesthésie générale a été induite dans une chambre délivrant un mélange gazeux isoflurane/O₂ à 4-5 %, et elle a été maintenue avec un mélange gazeux isoflurane/O₂ à 1,5-2,5 % avec un masque de ventilation adapté. Chaque animal a reçu une injection intramusculaire de chlorhydrate de buprénorphine (0,05 mg/kg) en préopératoire.

Les rats ont été placés en décubitus latéral gauche. Le membre inférieur droit de chaque rat a été rasé et badigeonné deux fois avec une solution de chlorhexidine. Le fémur droit a été exposé par une voie d'abord latérale. Une incision longitudinale a été pratiquée le long du fémur pour exposer le fascia lata. Ensuite, l'espace entre le vaste latéral et le biceps fémoral a été développé. Une plaque d'ostéosynthèse a été placée sur la face antérolatérale du fémur exposé. Deux types d'ostéosynthèse (MODUS[®], Medartis[™], Suisse) ont été réalisés :

- les 9 premiers rats (groupe « plaques fines ») avaient eu des plaques en titane à 6 trous de 0,6 mm d'épaisseur (30 mm de longueur) et 4 vis corticales (2 pour les trous proximaux et 2 pour les trous distaux) de 1,5 mm de diamètre (7 mm de longueur) ;

- les 10 rats suivants (groupe « plaques épaisses ») avaient été stabilisés par des plaques en titane à 4 trous de 1 millimètre d'épaisseur (29 mm de longueur) et 4 vis corticales (2 pour les trous proximaux et 2 pour les trous distaux) de 2 mm de diamètre (7 mm de longueur).

Après vérification du positionnement, des trous bicorticaux ont été forés et la plaque a été fixée par les vis.

Ensuite, le defect fémoral de 7 mm a été créé dans la diaphyse du fémur sous la plaque à l'aide d'une scie de Gigli (Figure 36). Un rinçage abondant du site opératoire au sérum physiologique était réalisé à cette étape afin d'éliminer les différents débris osseux et métalliques éventuellement présents.

Le ciment PMMA (Palacos[®] R + G, Heraeus Medical[™]) a été mélangé selon le protocole du fabricant et a été moulé dans le defect fémoral, de façon plus large que le diamètre fémoral et dépassant les moignons fémoraux distaux et proximaux (Figure 37).

Après polymérisation complète du ciment, le site opératoire a été irrigué au sérum physiologique stérile et l'incision a été refermée en deux plans (musculaire et sous-cutanée) au Vicryl[®] 4-0 (Ethicon[™], Johnson & Johnson[™], Somerville, NJ). Enfin, une colle biologique (Dermabond[®], Ethicon[™], Johnson & Johnson[™]) a été appliquée sur l'incision cutanée fermée.



Figure 36. Vue peropératoire du positionnement et de la fixation d'une plaque de 0,6 mm d'épaisseur. Cette vue met en évidence la création du defect à l'aide d'une scie de Gigli. L'aide opératoire assure un contre-appui indispensable à l'aide d'un davier de Verbrugge.

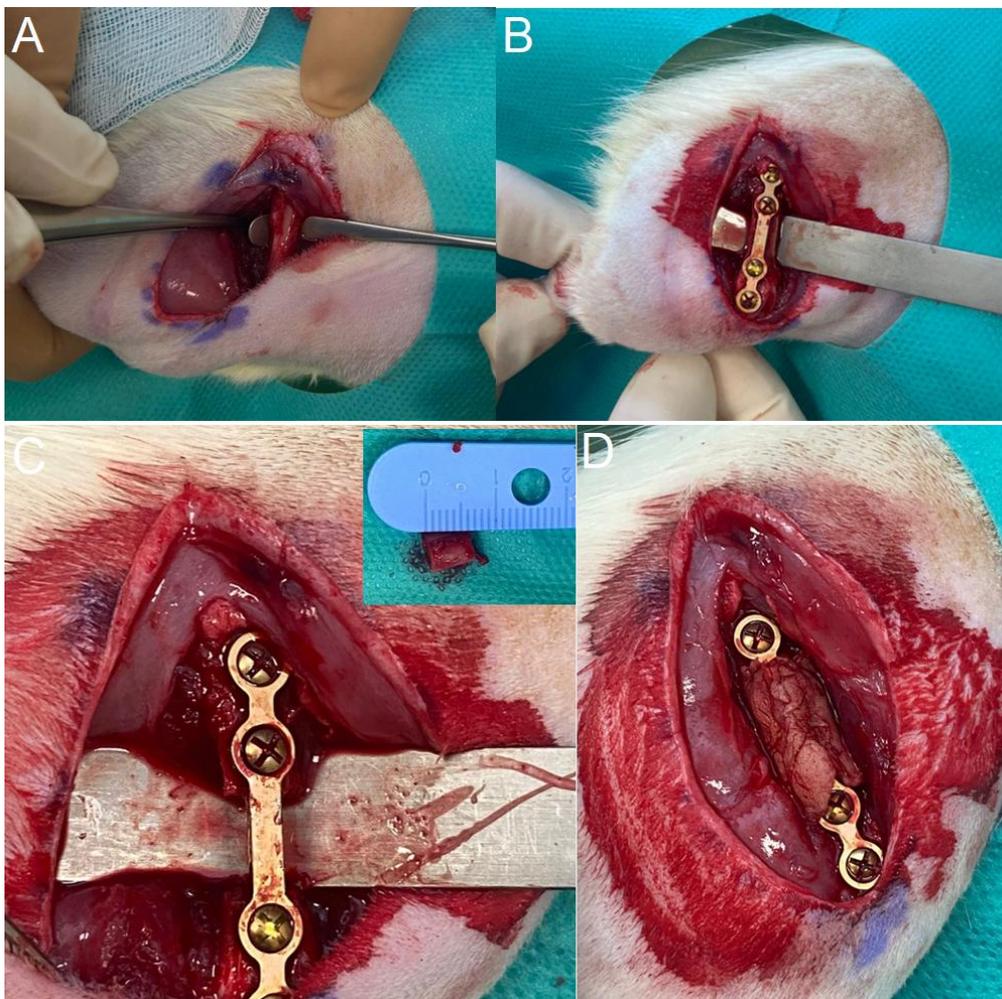


Figure 37. Vues peropératoires illustrant les étapes chirurgicales du positionnement d'une plaque de 1 mm d'épaisseur dans le cadre de la technique de la membrane induite. (A) Exposition circonférentielle de la diaphyse fémorale avec un élévateur périostéal protégeant les structures médiales. (B) Fixation de la plaque à 4 trous et des 4 vis corticales. (C) Création du defect fémoral de 7 mm à l'aide d'une scie de Gigli. (D) Mis en place du ciment osseux avant la fermeture.

Suivi postopératoire et points limites

Après l'intervention chirurgicale, les rats ont repris l'appui immédiatement sur le membre inférieur droit. L'analgésie consistait en une injection sous-cutanée de chlorhydrate de buprénorphine (0,05 mg/kg) et de méloxicam (2 mg/kg) deux fois par jour pendant une durée de 3 à 7 jours.

Les rats ont été surveillés quotidiennement pendant la période postopératoire pour détecter les signes de douleur, les complications et l'atteinte d'un point limite. Plusieurs points limites étaient surveillés, notamment :

- **Poids** : les rats ont été pesés deux fois par semaine pendant la première semaine postopératoire et une fois par semaine par la suite, jusqu'à obtenir un poids au moins supérieur au poids préopératoire. Une perte de poids rapide (20 %) dans la semaine postopératoire était définie comme point limite.

- **État comportemental et physiologique** : posture (voussure du dos), abaissement des oreilles, enfoncement des yeux (contraction orbitaire), manque de toilettage. Utilisation de l'échelle d'évaluation des expressions faciales du rat édité par NC3Rs (2011) (224): évaluation quotidienne postopératoire. Une altération de l'état comportemental de l'animal au-delà de 3 jours consécutifs et malgré une antalgie préventive adaptée à la sévérité de la procédure était définie comme point limite.

- **Cicatrisation** : désunion importante, écoulement purulent, saignement : surveillance quotidienne jusqu'à obtention d'une cicatrisation complète, une anomalie cicatricielle non gérable chirurgicalement constituait un point limite.

- **Prise alimentaire et hydrique** : vérification de la prise alimentaire (en grammes) et hydrique (en mL) quotidiennement : une absence d'alimentation ou une restriction hydrique (comparée avec la quantité donnée quotidiennement) constituait un point limite.

Fin de suivi et prélèvements

À l'issue de la quatrième semaine postopératoire, les 9 rats du groupe « plaque fine » ont été euthanasiés sous anesthésie générale (mélange gazeux isoflurane/O₂ 5 %) avec une injection intracardiaque de pentobarbital (500 mg/kg) (DOLETHAL[®], Vetoquinol[™], Lure, France).

Les 10 rats du groupe « plaques épaisses » ont eu un 2^e temps de TMI avec autogreffe osseuse prélevée aux dépens d'une à 2 vertèbres caudales. Pour ces 19 rats, un fragment de MI a été prélevé pour analyses histologiques décrites ci-après (Figure 38).



Figure 38. Prélèvement des MI autour de l'espaceur en PMMA : avant (à gauche) et après (à droite) le prélèvement.

4.2.2.2. Procédure chirurgicale pour l'évaluation et la comparaison de la consolidation osseuse entre la technique en 2 temps (TMI) et la technique en 1 temps (TMA)

La comparaison de la consolidation osseuse était réalisée sur trois groupes expérimentaux comprenant chacun 10 rats, soit un total de 30 rats, qui étaient opérés et stabilisés par une plaque de 1 mm d'épaisseur (plaques « épaisses ») et 4 vis de 2 mm de diamètre :

- Groupe TMI (groupe « contrôle ») : 10 rats ayant bénéficié d'une TMI en 2 temps,
- Groupe TMA - PU100 % : 10 rats opérés avec une TMA utilisant une membrane en polyuréthane (PU) 100 %,
- Groupe TMA - PU/PMMA 50/50 : 10 rats opérés avec une TMA utilisant une membrane en PU/PMMA 50/50.

Procédure chirurgicale du groupe contrôle (TMI en 2 temps)

Concernant le groupe « contrôle » TMI, il s'agissait des 10 rats du groupe « plaques épaisses », opérés au premier temps avec mise en place de l'espaceur en PMMA. Après un délai de 4 semaines, ces 10 rats ont bénéficié du second temps chirurgical.

Lors de cette intervention, une autogreffe corticospongieuse a été réalisée par prélèvement de 1 à 2 vertèbres caudales. Ce prélèvement était effectué après amputation des 2/3 distaux de la queue du rat (Figure 39). Une incision longitudinale permettait d'exposer les vertèbres caudales, qui étaient ensuite fragmentées manuellement avant d'être greffées dans le defect fémoral.

L'abord chirurgical reprenait l'incision initiale du 1^{er} temps de TMI. La membrane induite était exposée et puis incisée longitudinalement. Le ciment PMMA était extrait avec précaution afin de préserver l'intégrité de la membrane. La greffe osseuse était alors placée dans le defect fémoral, puis la membrane induite était refermée par repositionnement sur la greffe (Figure 40). Ainsi, pour le groupe contrôle TMI, la chirurgie était réalisée en 2 temps, conformément à la technique de Masquelet, afin de permettre la formation préalable d'une membrane induite

autour de l'espaceur avant l'étape de greffe osseuse (4 semaines postopératoire).



Figure 39. Préparation de 2 vertèbres caudales : l'une fragmentée (à droite) et l'autre avant fragmentation (à gauche).



Figure 40. Deuxième temps de la TMI : à gauche, plaque en place avec la greffe intégrée au sein du defect, la membrane est maintenue par 2 pinces ; à droite, membrane repositionnée sur la greffe avant fermeture.

Procédure chirurgicale des groupes expérimentaux (TMA en 1 temps)

Pour les deux groupes expérimentaux ayant bénéficié d'une TMA avec les membranes en PU 100 % et PU/PMMA 50/50, 10 rats par groupes étaient opérés. Les modalités de prise en charge chirurgicales étaient identiques au groupe contrôle ayant eu la TMI en 2 temps à l'exception des points suivants :

- Tous les rats ont été stabilisés avec des plaques en titane à 4 trous de 1 mm d'épaisseur et 29 mm de longueur et 4 vis corticales (2 pour les trous proximaux et 2 pour les trous distaux) de 2 mm de diamètre et 8 mm de longueur. Ce choix résultait des conclusions issues de la

comparaison entre les 2 types de plaques utilisées dans la phase initiale de l'étude.

- Contrairement au groupe contrôle, la TMA était réalisée en 1 seul temps comportant le prélèvement de la greffe, la réalisation du defect fémoral, le positionnement de la MA et la mise en place de la greffe à l'intérieur du defect dans le même temps opératoire. Une fois la greffe positionnée dans le defect, la MA était rabattue sur la plaque et fixée par 2 points de Vicryl™ 4/0 (Figure 41).

- Avant leur implantation, les MA étaient stérilisées par irradiation Gamma (40 kGy) au sein de l'entreprise COUSIN SURGERY®.

- Une antibioprofylaxie par sulfadiazine/triméthoprime (Diatrim™ 200 mg/mL + 40 mg/mL, SC) était administrée en préopératoire immédiat, pour prévenir le risque d'infection du site opératoire.

- Le monitoring postopératoire était identique à celui du groupe contrôle pour ces 2 groupes ayant bénéficié d'une TMA.



Figure 41. Photographie peropératoire d'une TMA avec une MA en PU/PMMA 50/50 entourant la greffe osseuse située dans le defect.

Suivi postopératoire et analyses

Ces 30 rats ont été suivis pendant 3 mois après l'intervention chirurgicale. Une analyse radiographique a été réalisée à 4 semaines, 8 semaines et 12 semaines postopératoires afin de : vérifier l'absence de déplacement du matériel d'ostéosynthèse ; ainsi que de monitorer la consolidation osseuse, avec des évaluations spécifiques à 8 semaines puis à 12 semaines.

À 12 semaines postopératoires, tous les rats ont été euthanasiés, permettant ainsi l'extraction des fémurs pour analyse scanographique et histologique des defects fémoraux.

4.2.3. Analyse histologique des membranes induites des groupes TMI

L'analyse histologique des membranes induites (MI) du groupe contrôle a été réalisée afin d'évaluer leur structure, leur composition et leur organisation cellulaire. Cette étude comprenait :

1. Une analyse histologique et histomorphométrique, permettant de mesurer l'épaisseur des MI et d'analyser leur composition tissulaire.
2. Une analyse en immunofluorescence, visant à caractériser certaines populations cellulaires et l'activité biologique de la MI.

4.2.3.1. Collecte et préparation des échantillons

Après l'euthanasie (n=9, groupe « plaques fines ») ou durant la chirurgie du deuxième temps de la TMI chez les rats (n=10, groupe « plaques épaisses ») du groupe contrôle, un échantillon de la membrane induite par rat a été prélevé (Figure 38). Cet échantillon a été fixé dans du formol tamponné neutre à 10 % pendant 24 - 36 heures, en attente de l'analyse histologique.

Brièvement, les échantillons de MI ont été déshydratés dans une série graduelle d'alcool, puis inclus en paraffine et coupés en sections de 5 µm à l'aide d'un microtome (Leica™ RM2245). Les coupes ont ensuite été déparaffinées dans du toluène et ont été colorées avec : une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) pour détecter les types de cellules et une coloration au Masson-Trichrome (MT) pour analyser les composants extracellulaires.

4.2.3.2. Analyses histologiques et histomorphométriques

Les analyses histologiques comportaient une histomorphométrie avec coloration Hématoxyline Eosine et une coloration Masson-Trichrome. L'objectif de cette analyse était de quantifier l'épaisseur de la MI et d'étudier sa composition cellulaire et matricielle.

Les coupes ont été examinées à l'aide d'un scanner de lames (Zeiss™ Axioscan® Z1). Les analyses histomorphométriques ont été réalisées sur une lame par animal. L'épaisseur des MI a été mesurée (en µm) à l'aide du logiciel Zen® Blue édition (Zeiss™, Oberkochen, Allemagne). Trois mesures ont été effectuées sur trois zones différentes de chaque lame. Une valeur moyenne a été calculée par animal, puis comparée entre les groupes.

Concernant l'analyse qualitative, les colorations Masson-Trichrome ont permis d'étudier les composants cellulaires présents dans la MI, la structure de la matrice extracellulaire, et l'organisation tissulaire générale de la MI. Ces analyses ont été effectuées sur l'ensemble des lames de chaque rat.

Dans les cas où l'ostéosynthèse a échoué, les tissus retrouvés à la place de la MI ont été prélevés et analysés histologiquement. Une comparaison avec une MI macroscopiquement saine a été

réalisée pour identifier d'éventuelles différences structurales ou cellulaires pouvant expliquer ces échecs.

4.2.3.3. Analyses en immunofluorescence

Les analyses en immunofluorescence avaient pour but de caractériser certaines populations cellulaires spécifiques et d'évaluer l'activité biologique de la MI.

Ces analyses en immunofluorescence (IHC) ont été utilisées pour analyser :

- **La densité cellulaire** (nombre de cellules par mm²) par le marquage des noyaux cellulaires au DAPI
- **La vascularisation** (nombre de vaisseaux par mm²) par le marquage des cellules endothéliales avec un Ac anti-CD31
- **L'activité ostéoblastique** par le marquage des ostéoblastes avec un Ac anti-BMP-2
- **L'infiltrat macrophagique**
 - CD68⁺ : macrophages sous-type M1 (pro-inflammatoires)
 - CD68⁺ et CD206⁺ : macrophages sous-types M2 (anti-inflammatoires)

Protocole et analyse des données

1. Préparation des lames et acquisition des images

Les lames étaient préparées pour les analyses IHC avec marquage pour BMP-2, CD31 et CD68/CD206. Pour l'analyse de la densité cellulaire, les noyaux des cellules ont été révélés avec le DAPI. Les sections ont été scannées intégralement avec un scanner de lames Zeiss™ Axioscan® Z1 et analysées à l'aide du logiciel Zen® Blue Édition. Pour chaque analyse, 3 régions d'intérêt (ROI) ont été sélectionnées et dessinées manuellement : une moyenne et un écart-type ont été calculés pour chaque paramètre, une cartographie de la coupe histologique a été réalisée. Les ROI ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel Fiji (226).

2. Immunofluorescence : CD31 et CD68/CD206

Les lames ont d'abord été déparaffinées par des bains successifs de xylène et d'éthanol, puis rincées à l'eau distillée. Un démasquage antigénique des lames a été réalisé en utilisant un tampon citrate pour les Ac BMP-2 et CD68/206, ou Tris-EDTA pour l'Ac CD31, suivi d'un passage dans une decloaking chamber (Biocare Medical®). Après cela, les lames ont été rincées dans du PBS.

Les tissus étaient ensuite perméabilisés en réalisant des bains de PBS avec Triton à 0,2 % (ou 0,05 - 0,1 % pour BMP-2) à température ambiante pendant 20 min, sous agitation douce. Pour les analyses en immunofluorescence (CD31 et CD68/206), un blocage des sites antigéniques non spécifiques a été réalisé avec du sérum normal de chèvre à 10 % (CD68/206) ou du BSA 2 % (CD31), pendant 45 minutes en chambre humide.

Les sections ont été ensuite incubées avec les anticorps primaires spécifiques : **CD31** (Anticorps Rabbit anti-Rat CD31 (ref : ab182981, Abcam™) à 1 µg/mL, Isotype contrôle : Monoclonal Rabbit IgG (ref : ab172730, Abcam™) à 1 µg/mL), **CD68** (Anticorps Monoclonal Mouse anti-CD68, MCA341R BioRad™ et Anticorps contrôle isotype Mouse (ab18447 Abcam™)), et **CD206** (Anticorps Polyclonal Rabbit anti-CD206 (ab64693 Abcam™)), à des dilutions respectives de 1/1000 pour le CD206, 1/100 pour le CD68 et 1/1000 pour le CD31, le tout en utilisant un tampon de dilution composé du sérum normal de chèvre à 1 % pour le CD68/206 et de BSA à 1 % pour le CD31. Les anticorps ont été incubés toute la nuit à 4°C. Les lames ont été rincées au PBS, Triton 0,05 %, BSA 1 % sous agitation douce. L'incubation avec les anticorps secondaires (Anticorps anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 568 (10032302 Thermo Fisher™ et Anticorps anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488 (ab150117 Abcam™, à une dilution de 1/1000) avait ensuite lieu pendant 30 min à température ambiante en chambre humide et à l'abri de la lumière.

Une contre-coloration DAPI (D1306, Thermo Fisher™) a été réalisée pour révéler les noyaux, suivie de rinçages courts (5 min) dans du PBS. Les lames ont été enfin montées pour observation microscopique. Les sections ayant servi à détecter les vaisseaux CD31⁺ ont été visualisées par fluorescence verte, les macrophages M1 ont été visualisés par une fluorescence verte (CD68⁺), et les macrophages M2 une fluorescence verte et rouge (CD68⁺ et CD206⁺). Les cellules satellites, marquées par CD206⁺, ont présenté une fluorescence rouge. Un seuil de détection positif a été défini pour chaque analyse, pour réalisation du comptage d'éléments cellulaires (noyaux, cellules macrophages M1, M2 et des cellules satellites) en utilisant le logiciel Fiji pour déterminer ce seuil de détection positif (CD68, CD206, CD31) autour de chaque noyau détecté avec le DAPI.

3. Immunohistochimie du BMP2

Pour les sections de BMP-2, un blocage des peroxydases endogènes était réalisé par immersion des lames dans une solution de H₂O₂ à 3 %, suivi d'un rinçage au PBS. Ensuite, les sites de fixations non spécifiques ont été bloqués avec du BSA à 3 % en chambre humide. L'anticorps

primaire (Anticorps polyclonal anti-BMP2 NBP1-19751 Novus™) a été appliqué à une dilution de 1/200, et les lames ont été incubées toute la nuit, en chambre humide à 4°C. Après rinçage, les lames ont été incubées avec l'anticorps secondaire (ImPRESS® Goat anti-Rabbit IgG Polymer kit MP-7451 Vector Laboratories™) pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante.

La révélation du BMP-2 a été réalisée avec un kit spécifique à base de 3,3'-diaminobenzidine (DAB), réactif de l'HRP (horseradish peroxidase) (DAB SK-4100 Vector Laboratories™). La contre-coloration finale a été réalisée avec l'hématoxyline (réf. 1.09253.0500 Merck™). Les lames ont été enfin déshydratées avec bains graduels d'éthanol et de xylène, puis montées avec un produit de montage Vectamount® (réf. 45000, Vector Laboratories™). Le taux d'immunomarquage du BMP-2 positif a été calculé en pourcentage de la surface positive, et cette analyse a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji.

4.2.4. Analyse radiologique et scanographique de la consolidation osseuse

4.2.4.1. Évaluation radiographique

Tous les rats ont été soumis à des contrôles radiographiques, réalisés sous anesthésie générale, pour vérifier la stabilité de l'ostéosynthèse et la consolidation osseuse. Les radiographies étaient prises en incidences antéropostérieure et latérale du fémur en utilisant un appareil BV Vectra® (Philips™, Amsterdam, Pays-Bas). Les examens avaient pour but de vérifier l'absence de déplacements fémoraux, de fracture fémorale autour d'une vis, de rupture de plaque, de descellement de vis, ainsi que pour observer l'évolution de la consolidation.

Pour les 9 rats ayant subi uniquement le 1^{er} temps de la TMI et les 10 rats du groupe contrôle avec « plaques épaisses » (ayant subi la technique de TMI en 2 temps), un suivi radiographique était effectué à 1 semaine et 4 semaines postopératoires. Ensuite, pour les 10 rats du groupe contrôle, un suivi radiographique a été réalisé à 8 et 12 semaines postopératoire (après le 2^e temps de la chirurgie).

En revanche, pour les rats ayant reçu une technique en 1 temps avec les MA, un contrôle radiographique a eu lieu à 4, 8 semaines et 12 semaines après la TMA. Après ces derniers contrôles, l'euthanasie des rats a été réalisée, suivie de l'extraction des fémurs (Figure 42) pour analyse micro-scanographique, puis histologiques comme détaillé plus haut.



Figure 42. Prélèvement du fémur après euthanasie et radiographies pour réalisation des analyses micro-scanographiques et histologiques, 12 semaines après le 2^e temps de TMI du groupe contrôle.

Les radiographies ont été évaluées à l'aide du système d'évaluation de Lane-Sandhu (Tableau 11) pour comparer la consolidation radiographique à 8 semaines et 12 semaines postopératoires entre les 3 groupes (124). Une évaluation supplémentaire, selon le score de Guldberg *et al.*, a permis de classer la consolidation de manière suivante (227) : (0) consolidation inférieure à 50 % du defect; (1) consolidation supérieure à 50 % du defect mais encore incomplète; (2) consolidation complète du defect.

Tableau 11. Score radiographique de Lane-Sandhu.

Catégorie	Standard	Scores
Cal osseux	Pas de cal osseux	0
	Cal osseux occupant 25 % du defect	1
	Cal osseux occupant 50 % du defect	2
	Cal osseux occupant 75 % du defect	3
	Cal osseux occupant 100 % du defect	4
Ligne de fracture	Claire	0
	Plutôt nette	1
	Incomplète	2
	Quasiment disparue	3
	Complètement disparue	4
Remodelage osseux	Absence de remodelage osseux	0
	Remodelage du canal médullaire	2
	Remodelage complet du cortex	4

4.2.4.2. Évaluation micro-scanographique

L'analyse micro-scanographique (μ CT) a été utilisée pour quantifier la régénération osseuse 12 semaines après le 2^e temps de la TMI et après la TMA. Après euthanasie des rats, les fémurs opérés ont été prélevés pour l'analyse. La zone de defect a été prélevée par une recoupe du fémur à la scie oscillante après ablation du matériel d'ostéosynthèse (Figure 43). Cette recoupe était réalisée en regard des vis les plus proches du defect, à la fois en proximal et en distal, pour s'assurer que l'intégralité du defect était incluse dans l'analyse.



Figure 43. Defect osseux greffé, prélevé avec matériel d'ostéosynthèse retiré, pour analyse micro-scanographique. Le volume d'intérêt correspond à la zone située entre les 2 vis les plus proches du defect greffé.

Le matériel d'ostéosynthèse était retiré pour faciliter l'analyse scanographique. Concernant les groupes d'étude de la TMA, les fémurs ont été prélevés de la même manière, avec une section de la MA en regard de la plaque pour la retirer sans difficulté. Une attention particulière a été portée pour éviter toute lésion de la MA autour du defect greffé ainsi que les tissus périphériques de la MA (Figure 44). Par ailleurs, une analyse histologique a été effectuée pour vérifier la présence d'une réaction à corps étranger autour de la membrane artificielle.



Figure 44. Prélèvement d'un fémur du groupe PU100 %. À gauche, fémur en bloc avec visualisation de la plaque et de la membrane artificielle encore en place. À droite, fémur préparé avec ablation de la plaque. La membrane artificielle est recouverte d'un fin tissu réactionnel pouvant correspondre à une réaction à corps étranger (P = Proximal, D = Distal).

Les fémurs ont été et fixés par immersion dans du formol tamponné au phosphate à 10 % pendant 24-36 h avant qu'ils soient prêts pour l'analyse. L'acquisition microtomodensitométrique (μ TDM) a été réalisée à l'aide du Skyscan[®] 1172 (Bruker microCT[™], Kontich, Belgique) avec les paramètres suivants : tension de 100 kV, courant de 100 μ A, rotation de l'image à 0,1500, taille du pixel à 13,32 μ m, et un temps d'acquisition de 20min par fenêtre. Les coupes multiplanaires ont été reconstruites à l'aide du logiciel NRecon[®] (Bruker micro-CT[™], Kontich, Belgique). Le volume d'intérêt a été défini comme la zone située entre les 2 vis les plus proches du defect greffé. Les données recueillies dans ce volume d'intérêt comprenaient le volume de tissu du defect (TV en mm^3) et le volume osseux (BV en mm^3), permettant ainsi le calcul du rapport de volume osseux (BV/TV, en %).

4.2.5. Évaluation histologique de la consolidation après greffe osseuse en un ou deux temps

L'évaluation histologique de la consolidation osseuse a été après l'euthanasie des rats, 12 semaines postopératoires, et après l'analyse scanographique des échantillons.

Dans le groupe contrôle, les échantillons ont été fixés dans du formol pendant 24-36 heures avant d'être soumis à un processus de décalcification. Cette étape a été réalisée à l'aide d'une solution d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA, VWR, Pennsylvanie, États-Unis) à 15 %, renouvelée toutes les 48 heures pendant 3 semaines, jusqu'à obtention d'une décalcification complète. Les échantillons ont été ensuite inclus en paraffine, puis coupés en sections de 3 à 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome. Les coupes obtenues ont été déposées sur lames de verres, séchées, puis colorées par d'hématoxyline-éosine et Masson-Trichrome.

Pour les échantillons issus des groupes TMA, une approche différente a été adoptée afin d'accélérer le processus d'analyse histologique. Plutôt que d'être décalcifiés, les échantillons prélevés ont été immergés dans de l'éthanol à 70 %, puis envoyés au laboratoire LLS Rowiak LaserLabSolutions® (Hannovre, Allemagne) pour la réalisation de coupes histologiques avec des échantillons sans décalcification. Ces échantillons ont été déshydratés dans des solutions d'alcool de concentrations croissantes avant d'être inclus dans du PMMA. Une fois polymérisés, les blocs de PMMA ont été découpés à l'aide d'un microtome laser (TissueSurgeon™, LLS Rowiak®, Hannovre, Allemagne), permettant d'obtenir des coupes de 10 µm d'épaisseur. Ces coupes ont ensuite été colorées par l'association d'hématoxyline-éosine et Masson-Trichrome comme pour les échantillons du groupe contrôle.

L'adoption de cette méthode alternative a été motivée par la durée prolongée du processus de décalcification à l'EDTA, permettant ainsi une analyse histologique plus rapide et efficace. L'ensemble des coupes a été examiné afin d'analyser qualitativement le defect fémoral, ses composants extracellulaires, ainsi que les types de cellules présentes. Une évaluation histologique des defects était réalisée en s'appuyant sur le score de Lane-Sandhu, issu de l'article de Meng *et al.* de 2019 (124) (Tableau 12).

Tableau 12. Score histologique de Lane-Sandhu, d'après Meng *et al.* (124)

Category	Standard	Scores
Union	No sign of union	0
	Fibrous union	1
	Osteochondral union	2
	Bone union	3
	Complete reorganization	4
Spongiosa	No sign of cellular activity	0
	Early bone formation	1
	Active new bone formation	2
	Reorganized spongiosa formation	3
	Complete reorganized spongiosa	4
Cortex	Absence of cortex	0
	Early detection	1
	Initiation of formation	2
	Reorganization in majority	3
	Complete organization	4

4.2.6. Statistiques

Les données qualitatives sont présentées sous forme de nombres et de pourcentages. Les variables quantitatives sont présentées sous forme de moyennes et d'écart-types. Elles ont été arrondies à l'entier le plus proche. La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

Les paramètres qualitatifs ont été comparés à l'aide d'un test de Chi-Deux ou un test exact de Fischer en cas de non-applicabilité du test de Chi-Deux.

Les données quantitatives ont été comparées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis (distribution non normale). En cas d'analyses statistiques comportant plus de 2 groupes, une analyse post-hoc avec comparaison par paires était réalisée en cas de différence statistiquement significative sur le test de Kruskal-Wallis par le biais d'un test post-hoc de Dunn par paires.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de **BiostatGV** (Institut Pierre Louis d'Épidémiologie et de Santé Publique, Université Sorbonne, Paris). Le seuil de significativité (α) a été fixé à 5 % ($\alpha = 0,05$).

4.3. Résultats et discussion

4.3.1. Évaluation et adaptation du modèle de defect fémoral sur rat Sprague Dawley

Pour la réalisation du modèle de defect fémoral chez le rat Sprague Dawley, les 9 rats du groupe « plaque fine », ayant subi le 1^{er} temps de TMI, ont survécu les 4 semaines requises pour l'élaboration de ce groupe contrôle.

Les poids des rats ont évolué de 478 ± 12 g en préopératoire à 541 ± 23 g après 4 semaines, juste avant euthanasie. Une perte de poids transitoire a été observée au cours des 2 premières semaines, sans toutefois atteindre le seuil critique « point limite » défini par le protocole de recherche. Par la suite, les rats ont récupéré et dépassé leur poids initial le poids préopératoire (Figure 45).

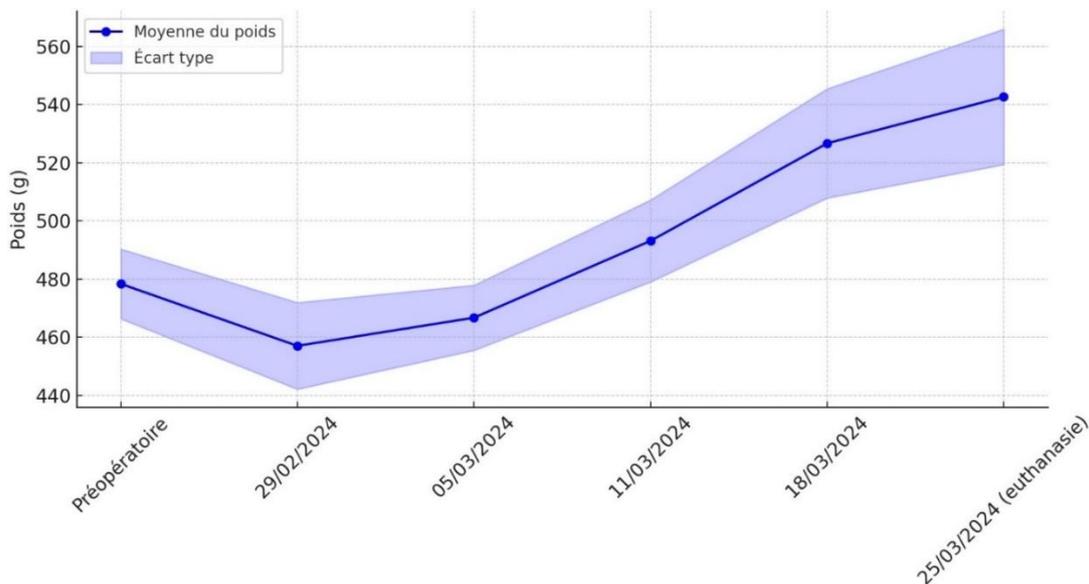


Figure 45. Évolution du poids des 9 rats du groupe « plaques fines » de la TMI.

Les analyses radiographiques ont été donc réalisées à 1 semaine et à 4 semaines postopératoires pour ce groupe.

À 1 semaine postopératoire, une instabilité du defect a été observée chez 3 rats sur 9, avec 2 ruptures de plaques et un déplacement du fémur distal dû à perte de fixation des vis (Figure 46). À 4 semaines, une rupture de plaque supplémentaire a été constatée chez un rat supplémentaire. Toutefois, aucun rat n'a dû être euthanasié prématurément, car tous ont continué à prendre du poids et n'ont montré aucun signe de douleur ou de souffrance pendant la période postopératoire.

5/9 rats : plaque ok



4/9 rats : fracture de plaque ou déplacement



Figure 46. Radiographies des fémurs du groupe « plaques fines », réalisée à 1 semaine postopératoire. À gauche : ostéosynthèse stable ; à droite : rupture de plaque. Après l'euthanasie, l'analyse macroscopique peropératoire a révélé que les membranes induites recouvraient l'espaceur en PMMA lorsqu'aucun échec de l'ostéosynthèse n'était observé. L'observation macroscopique peropératoire a confirmé les résultats radiologiques des échecs. En effet, en cas d'échec de l'ostéosynthèse, on observait une prolifération de tissu fibreux avec un aspect pseudo-tumoral compartimenté au contenant séro-hématique (Figure 47). Toutefois, ces cas d'échec ont été exclus de l'analyse histomorphométrique.

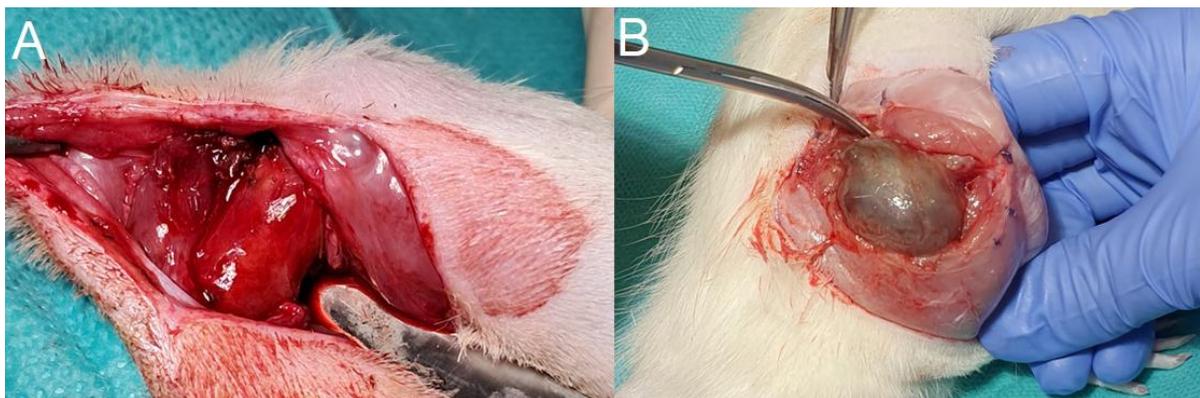


Figure 47. Photographies peropératoires à 4 semaines, après le 1^{er} temps de TMI. (A) : vue peropératoire illustrant une membrane induite recouvrant entièrement le ciment en PMMA. (B) : vue peropératoire en cas d'échec de l'ostéosynthèse, montrant un tissu pseudotumoral hyperprolifératif.

Pour la réalisation de la TMI en 2 temps (groupe contrôle PMMA, 10 rats), des plaques plus épaisses (1 mm) et des vis de plus gros diamètre (2 mm) ont donc été utilisées (groupe « plaques épaisses »). Pour ce groupe aussi, le poids a progressé entre préopératoire (486 ± 14 g) et à 4 semaines postopératoires (556 ± 20 g) sans atteindre de poids limite. Il n'y avait pas de différences entre les poids pré- et postopératoires entre ces 2 groupes (respectivement $p = 0,446$ et $0,470$). Cette fois, après le 1^{er} temps de TMI, aucun déplacement ou rupture de matériel n'a eu lieu et les 10 rats ont également bien toléré la procédure (Figure 48). La comparaison du taux d'échec de la procédure à 4 semaines entre les 2 groupes a montré une différence significative ($p=0,03$) (Tableau 13).

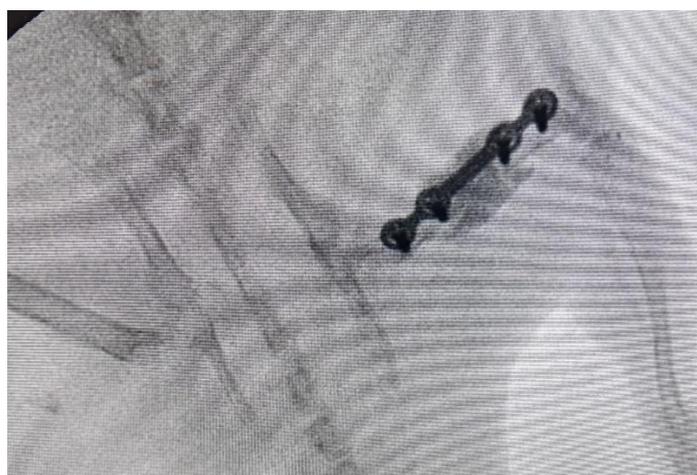


Figure 48. Radiographie de profil d'une plaque de 1 mm d'épaisseur et des vis de Ø 2 mm, réalisée à 1 semaine postopératoire.

Tableau 13. Comparaison du taux d'échec de stabilisation après TMI entre le groupe « plaques fines » et le groupe « plaques épaisses ».

Évaluation Radiographique	Groupe « plaques épaisses » (N=10)	Groupe « plaques fines » (N=9)	p
Échecs à 1 semaine* N (%)	0/10 (0 %)	3/9 (33,3 %) : 2 ruptures de plaques 1 déplacement du fémur distal dû à la perte de tenue de la vis	0,087
Échecs à 4 semaines* N (%)	0/10 (0 %)	1/9 (11,1 %) : 1 rupture de plaque	
Nombre total d'échecs à 4 semaines N (%)	0/10 (0 %)	4/9 (44,4 %)	0,03

*L'échec a été considéré en cas de déplacement fémoral, de fracture fémorale autour d'une vis, de rupture de la plaque, de perte de tenue de la vis.

Ces échecs et nos résultats pour des défauts fémoraux de 7 mm chez le rat Sprague Dawley nous ont amenés à analyser la littérature plus profondément pour optimiser notre modèle animal. Pour les défauts fémoraux inférieurs à 5 - 6 mm, presque aucun échec d'ostéosynthèse n'a été rapporté (96,101). Verboket *et al.* n'ont signalé aucun échec pour des défauts fémoraux de 5-6 mm chez 15 rats Sprague-Dawley âgés de 8 à 10 semaines (95). Cependant, une autre étude du même auteur a fait état d'échecs après TMI en deux étapes (3/65 rats, 4,6 %) pour un défaut de longueur identique (41).

Des taux d'échecs similaires ou plus importants ont été signalés lorsque les défauts fémoraux étaient de 10 mm. Nau *et al.* ont rapporté 3 cas de descellement de plaques sur 72 (4,2 %) (168) et Leiblein *et al.* ont rapporté 8 cas de descellement de vis sur 96 rats (8,3 %) (47). Ces défauts fémoraux étaient plus longs que ceux créés dans notre étude (7 mm), mais nous avons rapporté un taux plus élevé d'échecs dus aux implants (4/9 rats) pour des plaques de 0,6 mm d'épaisseur. Dans l'industrie, les plaques associées à des vis de 1,5 mm de diamètre ont une épaisseur variable allant de 0,6 à 1,3 mm et sont couramment utilisées chez l'homme pour la chirurgie de la main et la chirurgie maxillo-faciale. La plupart des études sur des modèles de défauts fémoraux chez le rat ont utilisé des plaques avec des vis de 1,5 mm de diamètre et dérivées de l'ostéosynthèse de la main humaine, sans indiquer leur épaisseur qui peut varier entre 0,6 et 1,3 mm (41,46,47,158,168).

Les plaques fines pourraient présenter des avantages, car elles sont plus légères que les plaques épaisses et elles pourraient réduire le *stress shielding* sur le fémur. En outre, elles pourraient réduire l'irritation des tissus mous et des muscles, améliorant ainsi le contrôle de la douleur et la locomotion naturelle du rat.

Au-delà des vis et de leur tenue dans l'os, l'épaisseur des plaques d'ostéosynthèse reste le paramètre le plus influent sur la résistance à la flexion (228). Cependant, aucune étude *in vivo* n'avait comparé des plaques de différentes épaisseurs, qui sont soumises à une remise en charge immédiate et donc à des contraintes de flexion continues dans un modèle de défaut fémoral chez le rat.

Une étude biomécanique sur la fixation interne des fractures condyliennes mandibulaires a montré que, dans un modèle à éléments finis, la fixation était plus stable avec une plaque de 2,0 mm d'épaisseur qu'avec 3 types de plaques de 1,5 mm (229). Dans une autre étude biomécanique sur les substituts osseux, Watrous *et al.* ont constaté que les plaques avec des vis de 1,5 mm étaient moins rigides que les plaques avec des vis de 2,0 mm dans un modèle de fracture de 1 mm (230). Cependant, ces résultats n'étaient pas directement extrapolables à un modèle *in vivo* de défaut fémoral de rat, bien qu'ils pouvaient suggérer l'importance de

l'épaisseur des plaques pour la stabilité d'une ostéosynthèse. Notre étude permettait d'analyser de manière plus approfondie l'impact de l'épaisseur des plaques, en utilisant un modèle vivant soumis aux contraintes physiologiques de l'appui répété, contrairement à ces études.

Nos résultats questionnaient donc la fiabilité de la stabilisation de défauts fémoraux critiques avec des plaques de moins de 1 mm d'épaisseur et des vis de 1,5 mm de diamètre sans aboutir à une défaillance du matériel. Néanmoins, les échecs d'ostéosynthèse observés dans notre étude pourraient être attribués au poids des rats utilisés.

En effet, leur poids (450 g à l'âge de 10 semaines) était supérieur à ceux rapportés dans la littérature (entre 250 et 450 g) (46,168). Cette différence pourrait au moins en partie expliquer le taux plus élevé de rupture du matériel chez les rats plus lourds. Nous aurions pu réduire la longueur du défaut fémoral comme dans les études précédentes (95,96,98,101), ce qui aurait pu exposer l'ostéosynthèse à des contraintes moindres.

Cependant, un défaut de taille critique est, par définition, « la plus petite lésion intraosseuse qui ne peut pas consolider spontanément tout au long de la vie de l'animal » (231). Garcia *et al.* ayant analysé les modèles de défaut osseux chez les rats et les souris avaient déjà constaté que la littérature ne définissait pas spécifiquement quelle était la taille du défaut pouvant être considéré comme « critique » et oscillait entre 2 et 8 mm (222).

Pour s'assurer de rester compatible avec cette définition, il était recommandé que la longueur du défaut dépasse 1,5 à 3,0 fois le diamètre de l'os (129,232). Un fémur mature de rat Sprague-Dawley a un diamètre médian de 4,5 mm et une longueur de 35 mm. Un défaut fémoral de taille critique devrait donc correspondre à 6,75 - 13,5 mm. Nous avons choisi un défaut fémoral de 7 mm, car il correspondait à 20 % de la longueur du fémur et était compatible avec la définition de défaut osseux critique chez le rat (233).

Ces données, associées à nos résultats, suggéraient que l'utilisation de plaques de 1 mm d'épaisseur avec des vis de 2 mm de diamètre dans un modèle de défaut fémoral chez le rat pourrait améliorer la stabilité de la fixation fémorale, et permettrait la déambulation sans provoquer de défaillance de l'implant tout en respectant la définition d'un défaut osseux de taille critique.

Une telle optimisation des moyens d'ostéosynthèse appliqués pourrait réduire le nombre de rats requis pour les études précliniques sur la TMI en cohérence avec la stratégie des 3R pour l'utilisation des modèles animaux à des fins scientifiques.

En outre, dans les études portant sur la consolidation des défauts fémoraux employant des biomatériaux ou de l'ingénierie des tissus osseux, une ostéosynthèse plus stable pourrait améliorer les résultats en diminuant leur variabilité. En effet, la stabilité d'une ostéosynthèse

semblait également influencer la consolidation des fractures dans les modèles précliniques (234,235).

Kammerer *et al.* ont également récemment rapporté que la consolidation osseuse variait de manière significative entre des défauts fémoraux de 5 mm et de 10 mm (90 % contre 60 %, $p < 0,05$) chez des rats SD âgés de 8 à 10 semaines et pesant 250 à 320 g. Le taux de consolidation du groupe présentant un défaut fémoral de 10 mm variait de 35 à 82 %, soit la plus grande variabilité rapportée dans leur étude (102). Ce résultat récent soutient l'hypothèse selon laquelle la stabilité mécanique du défaut, plus difficile à obtenir lorsqu'il est de 10 mm *versus* 5 mm, pourrait avoir un impact majeur sur le résultat des études visant à optimiser la technique de la membrane induite dans les modèles précliniques, puisque l'instabilité mécanique engendrait une consolidation osseuse plus imprévisible.

Des études cliniques chez l'homme confirmaient aussi largement l'importance de la stabilité mécanique pour le succès de la technique de la membrane induite. Giannoudis *et al.* ont établi le "Diamond Concept", comprenant 4 facteurs majeurs contribuant à la consolidation osseuse. La stabilité mécanique est l'un de ces facteurs clés. La stabilisation mécanique de l'os permet la formation d'un cal de haute qualité qui absorbera progressivement les contraintes mécaniques (25).

L'importance de cette stabilité mécanique est également cruciale dans la technique de la membrane induite, car elle semble être liée au succès de cette technique pour plusieurs auteurs. Dans une revue systématique de la littérature, Aurégan *et al.* ont étudié le taux de réussite et les facteurs de risque d'échec de cette technique chez les enfants. Dans leur étude, ils ont constaté que l'ostéosynthèse instable représentait 72 % (sur 19 cas) des échecs, contre 16 % des succès (sur 50 cas) (236).

Chez l'adulte, Choufani *et al.* ont analysé les résultats de la technique dans un contexte militaire, sur des défauts osseux moyens de 4,3 cm (extrêmes 2-10 cm) chez 16 patients. Ils ont constaté que l'échec de la technique était lié à une stabilité mécanique insuffisante chez 4 des 8 patients (50 %) (237). L'étude de Mathieu *et al.* a même proposé une optimisation mécanique en renforçant le spacer par une armature centromédullaire, ce qui a permis d'obtenir 7 succès sur 8 cas de défauts osseux complexes (238). D'autres auteurs ont confirmé la nécessité d'une stabilité mécanique maximale dans cette technique, notamment Siboni *et al.* sur 19 cas de défauts osseux tibiaux critiques, et Wang *et al.* sur 32 patients atteints d'ostéomyélite post-traumatique (4,239).

Enfin, Wu *et al.* ont analysé les facteurs influençant le succès de cette technique à l'aide d'une revue de la littérature et ont constaté que l'environnement mécanique local jouait un rôle

important tout au long de la technique, en affectant la qualité de la membrane induite formée autour du ciment PMMA (240).

Nos résultats comportaient cependant des limites. Les contraintes biomécaniques diffèrent entre les modèles animaux et humains ; cependant, les mécanismes de stabilisation et leur impact sur la consolidation restent comparables, ce qui justifie l'utilisation du modèle du rat pour ces études précliniques. Nous implémentions et éprouvions ce modèle afin de le valider pour tester des biomatériaux agissant sur la régénération osseuse. Premièrement, le nombre de rats inclus restait relativement faible, mais il correspondait à la taille moyenne des groupes dans les modèles précliniques de rats avec élaboration de defects fémoraux et était basé sur un calcul *a priori* de la taille de l'échantillon requise.

Ce faible nombre d'animaux aurait pu conduire à un manque de puissance statistique, mais le principal résultat de cette étude a atteint une signification statistique à 4 semaines. Cette étude n'a pas inclus d'autres méthodes d'ostéosynthèse également utilisées, telles que les clous centromédullaires (97,98) ou les fixateurs externes (173,176), car l'ostéosynthèse par plaque/vis était la plus fréquente dans ce modèle préclinique (158).

La période de suivi était courte, mais elle correspondait à la durée moyenne du 1^{er} temps de TMI dans les modèles de defects fémoraux de rat. La création et la stabilisation des defects fémoraux dans ce modèle peuvent être difficiles et introduire des biais. Cependant, toutes les procédures ont été effectuées par les mêmes opérateurs.

Ainsi, cette partie du travail de thèse confirmait le modèle de defect fémoral critique (7 mm) pour étudier la technique de la membrane induite, avec utilisation de plaques de stabilisation fémorale d'une épaisseur de 1 mm et quatre vis (de 2 mm de diamètre) pour assurer une fixation stable sans défaillance de l'implant. En revanche, des plaques plus fines (<1 mm) combinées à des vis de plus petit diamètre (1,5 mm) entraînaient un taux élevé d'échec par défaillance des implants.

4.3.2. Résultats histologiques des membranes induites obtenues lors du 1^{er} temps de la technique

Cette analyse histologique a consisté à comparer les résultats histologiques entre les 2 groupes de rats précédents. Dans tous les cas où l'ostéosynthèse avait réussi, l'analyse histologique qualitative a révélé que les membranes induites étaient typiquement organisées en 2 couches :

- **la couche interne** (en contact avec l'espaceur) était riche en cellules, présentant une morphologie ronde, avec un noyau volumineux et dense, évoquant des macrophages ;
- **la couche externe** était riche en collagène, structurée parallèlement à l'espaceur en PMMA

et traversée par des vaisseaux sanguins.

À l'inverse, l'analyse histologique en cas d'échec de la stabilisation fémorale a révélé un tissu prolifératif, et complètement désorganisé, sans distinction claire entre différentes couches. De plus, le collagène et les vaisseaux sanguins apparaissaient entremêlés, tandis que les fibroblastes allongés et fusiformes dominaient la population cellulaire, avec des noyaux moins denses (Figure 49).

Ainsi, la réaction à corps étranger au ciment en PMMA ne constituait pas le seul facteur lié à la qualité de formation de la MI. Cette observation illustre de manière extrême l'impact d'une instabilité fémorale sur la formation de la MI.

Cependant, il nous semblait pertinent d'inclure cette illustration au sein de ce travail de thèse, car cela n'était pas retrouvé, à notre connaissance, dans la littérature alors que des cas d'échec étaient documentés.

Ces résultats histologiques renforcent l'importance de la stabilité de l'ostéosynthèse pour évaluer des biomatériaux et des approches d'ingénierie tissulaire pour la régénération osseuse. Il est également envisageable qu'entre une ostéosynthèse assurant une MI de qualité et un échec complet, il existe un continuum où une stabilisation insuffisante entraîne la formation de MI d'une qualité intermédiaire, potentiellement sous-optimale.

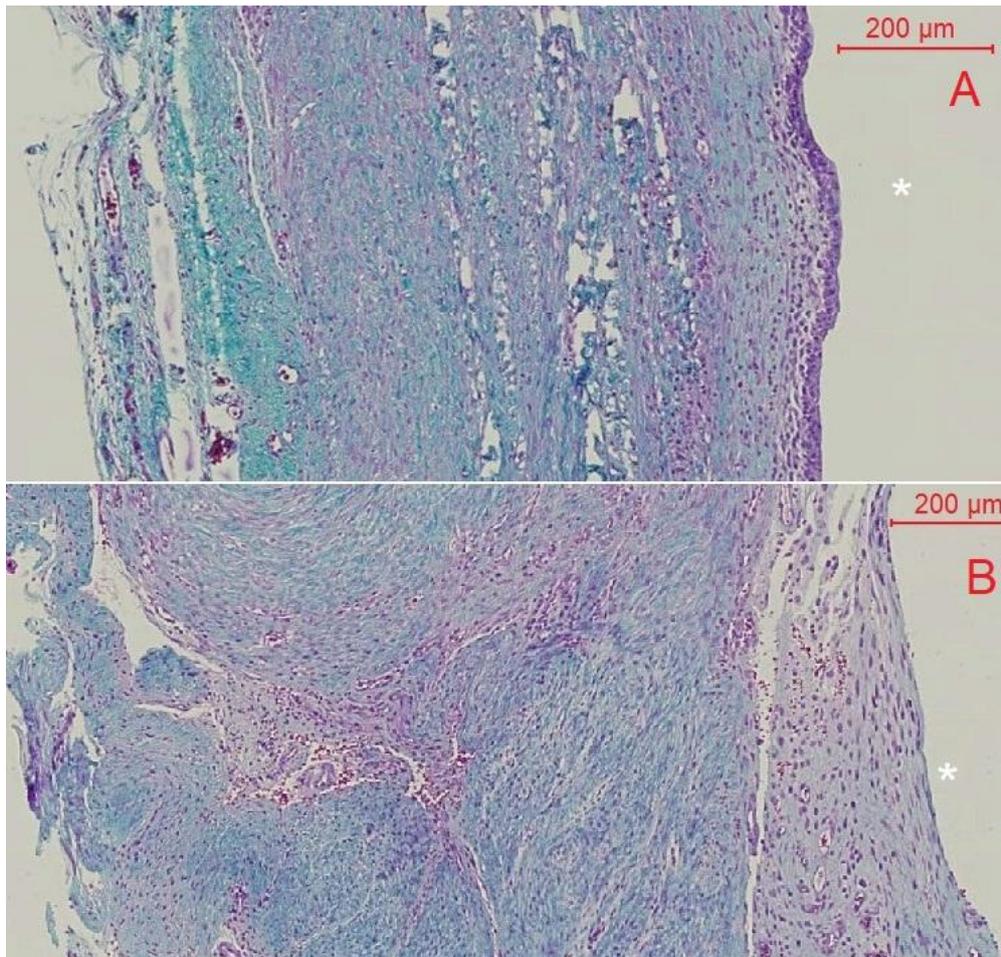


Figure 49. Évaluation histologique avec coloration Masson-Trichrome : (A) d'une membrane induite bien organisée ; (B) d'une prolifération fibroblastique observée en cas d'échec. *: Zone de l'espaceur en PMMA.

Nous avons souhaité comparer les résultats histomorphométriques entre les 2 groupes de rats SD stabilisés par 2 configurations de plaques et vis différentes afin de ne pas méconnaître une différence histologique. En effet, l'une des hypothèses de ce travail était que la qualité de la membrane induite générée dépendait de la stabilité de l'ostéosynthèse initiale. Cette qualité pouvait être évaluée d'un point de vue histologique et histomorphométrique comme réalisé dans l'étude de Xie *et al.* (116). Cette analyse a porté uniquement sur les MI des cas d'ostéosynthèse réussie (soit 15/19 rats).

L'épaisseur moyenne de la MI du groupe « plaque épaisse » ($735 \pm 44 \mu\text{m}$) n'a pas montré de différence statistique ($p=0,4$) avec celle du groupe « plaque fine » ($979 \pm 165 \mu\text{m}$). En revanche, la densité cellulaire dans la MI était significativement plus élevée ($p=0,0195$) pour le groupe « plaque épaisse » (Tableau 14).

Cette différence pourrait être attribuée à l'épaisseur légèrement réduite de la MI dans le groupe « plaque épaisse » par rapport au groupe « plaque fine », bien que cette variation ne soit pas

significative. Toutefois, ce résultat est cohérent avec l'étude de Xie *et al.*, qui a constaté une prolifération cellulaire plus élevée par mesure immunohistochimique des cellules Ki67-positives dans le cas de la stabilisation de la plaque (33 %) par rapport à l'absence de stabilisation (20 %), dans un modèle de defect osseux du radius de lapin (116).

Ainsi, une prolifération cellulaire accrue pouvait donc également expliquer cette différence entre nos 2 groupes, renforçant la pertinence de notre modèle avec stabilisation maximale du defect fémoral (plaques 1 mm / vis Ø 2 mm).

Nos résultats étaient similaires à ceux de Mathieu *et al.* (4923 - 4933 cellules/mm²), mais inférieurs à la densité cellulaire rapportée par Toth *et al.* (5310 - 6300 cellules/mm²). Ces études ont utilisé un modèle de defect fémoral de rat de 6 mm stabilisé par un fixateur externe (173,176), ce qui pourrait expliquer les faibles différences avec notre étude, bien que la qualité de la prolifération cellulaire pour former la MI puisse reposer sur d'autres facteurs plus complexes que la stabilisation maximale du defect.

Tableau 14. Résultats histomorphométriques comparant le groupe « plaques fines » et le groupe « plaques épaisses ».

Histomorphometrie	Groupe « plaques épaisses » (N=10)	Groupe « plaques fines » (N=5)	p
Épaisseur Membrane Induite (µm) (Moyenne ± écart-type)	734,9 ± 44,3	978,9 ± 164,9	0,4
Densité cellulaire (N/mm ²) (Moyenne ± écart-type)	4996 ± 716	3500 ± 728	0,0195

4.3.3. Résultats de l'analyse en immunofluorescence des MI du groupe contrôle

4.3.3.1. Densité cellulaire et analyse de l'immunofluorescence macrophagique

La quantification des noyaux colorés au DAPI en immunofluorescence était de 3045 ± 712/mm² pour le groupe « plaques fines » et 3516 ± 1033/mm² pour le groupe « plaques épaisses », sans différence significative (p = 0,178). Ce nombre était inférieur à celui rapporté par Durand *et al.*, qui retrouvaient entre 4531 ± 32 et 5882 ± 695 noyaux/mm² selon que la MI était induite par le PMMA ou la métakaolite sur un modèle de defect fémoral de rat stabilisé par fixateur externe (72), mais supérieurs à ceux rapportés par Toth *et al.* et Mathieu *et al.* (173,176).

L'analyse par immunofluorescence a également permis d'étudier les populations macrophagiques, en distinguant les sous-types M1 (pro-inflammatoire) et M2 (anti-inflammatoire) (Figure 50).

- Les macrophages M1 présentait une fluorescence verte unique (CD68⁺).
- Les macrophages M2 présentait une double immunofluorescence verte et rouge (CD68⁺ et CD206⁺).
- Les cellules satellites n'exprimaient que CD206, (fluorescence rouge).

L'analyse qualitative a été effectuée sur les MI des groupes contrôles. Conformément aux observations d'autres auteurs, nous avons retrouvé une population cellulaire macrophagique qui semblait par ailleurs se répartir en fonction de leur proximité avec le PMMA.

- La densité macrophagique était élevée à proximité du ciment en PMMA, avec une présence marquée des macrophages M1 et M2 à 4 semaines.
- Un nombre relativement important de cellules CD206⁺ (fluorescence rouge) était également observé sur toute l'épaisseur de la membrane.

Ces macrophages semblent jouer un rôle clé, récemment mis en avant, dans la compréhension du mécanisme de formation et de régulation des MI. Leur expression de facteurs de croissance a également été rapportée dans la littérature (71–73).

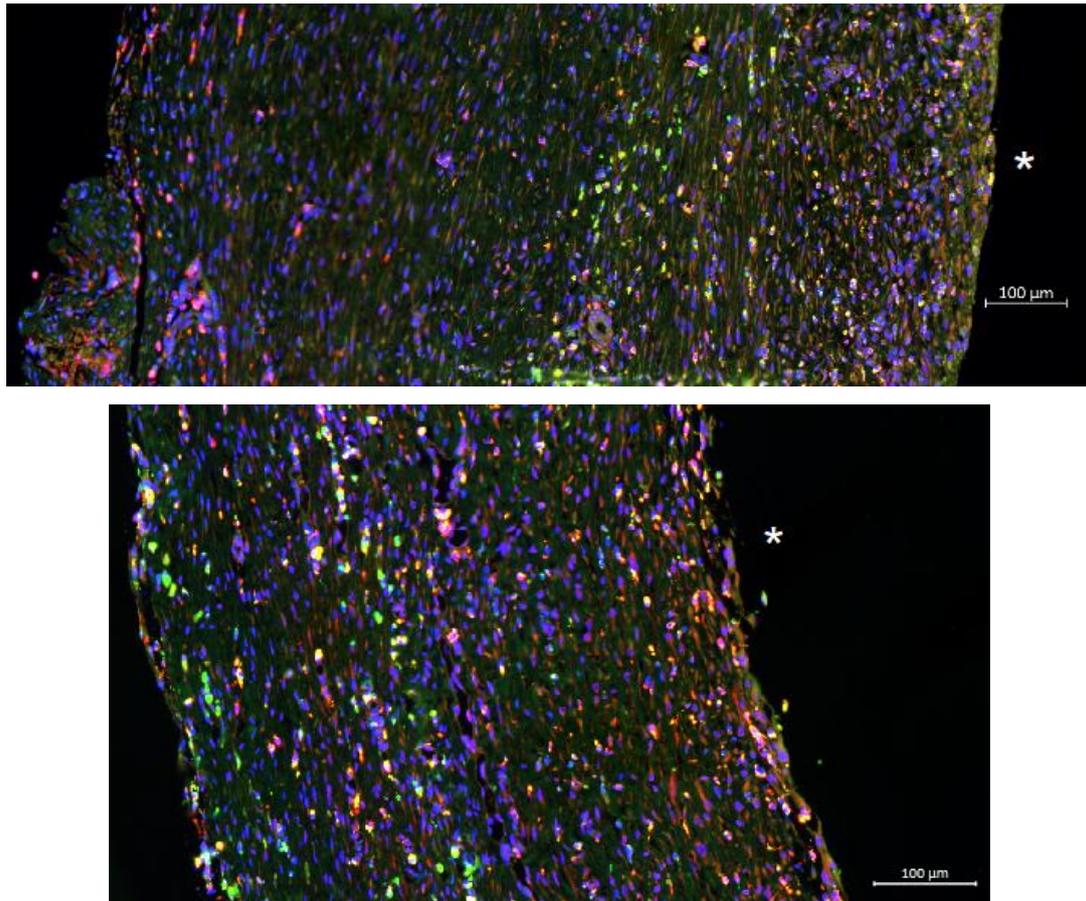


Figure 50. Analyse en immunofluorescence des macrophages M1 et M2 au sein de la membrane induite de deux échantillons de notre étude. Les macrophages M1 présentaient une fluorescence verte spécifique (CD68⁺), tandis que les macrophages M2 affichaient une double immunofluorescence verte et rouge (CD68⁺ et CD206⁺). Les cellules satellites exprimaient uniquement le marqueur CD206, avec une fluorescence rouge. * : zone du ciment en PMMA.

4.3.3.2. Expression de BMP-2

Nous avons également recherché l'expression au sein des MI du facteur de croissance pro-ostéogénique BMP-2 par immunohistochimie. Nous pouvons constater effectivement une expression homogène du BMP-2 dans les MI. Cependant, cette expression semblait plus intense en regard du ciment PMMA, notamment dans la couche interne de la MI (Figure 51). Cela correspond à la localisation préférentielle des macrophages également, soulignant encore une fois leur rôle crucial dans la sécrétion de ces facteurs de croissance lors de la formation de la MI.

Le ratio de surface positive au BMP-2 pour le groupe « plaques fines » était de 21,4 % ± 11,8 % et pour groupe « plaques épaisses » de 19,5 % ± 17,6 % (p=0,1), ce qui était similaire aux valeurs reportées par Durand *et al.* (25,25 % ± 4,83 %), mais inférieurs à celles obtenues dans leur étude pour les MI formées par la métakaolite (48,41 % ± 7,11 %, p=0,021) (72).

D'autres auteurs ont également cherché à analyser et tenté d'améliorer l'expression de BMP-2 en optimisant l'espaceur, comme Ma *et al.*, qui utilisaient un espaceur en calcium sulfate comparé au PMMA. Entre 2 et 8 semaines, ils ne retrouvaient pas de différences significatives du taux de BMP-2 par analyse RT-PCR entre leurs 2 groupes (171). Sagardoy *et al.* ont comparé le PMMA à un espaceur en silicone avec une absence de différence d'expression du BMP-2 en immunohistochimie à un délai de 11 semaines post-implantation (89). Il en a été de même pour Toth *et al.* en utilisant un espaceur en titane, ainsi que Mathieu *et al.*, qui utilisaient un espaceur en polypropylène (173,176).

Ainsi, quelle que soit la nature du matériau utilisé comme espaceur, et en tenant compte de la variabilité des matériaux dans la littérature, il ne semble pas que ceux-ci influent de manière importante sur l'expression de ce facteur de croissance dans la MI.

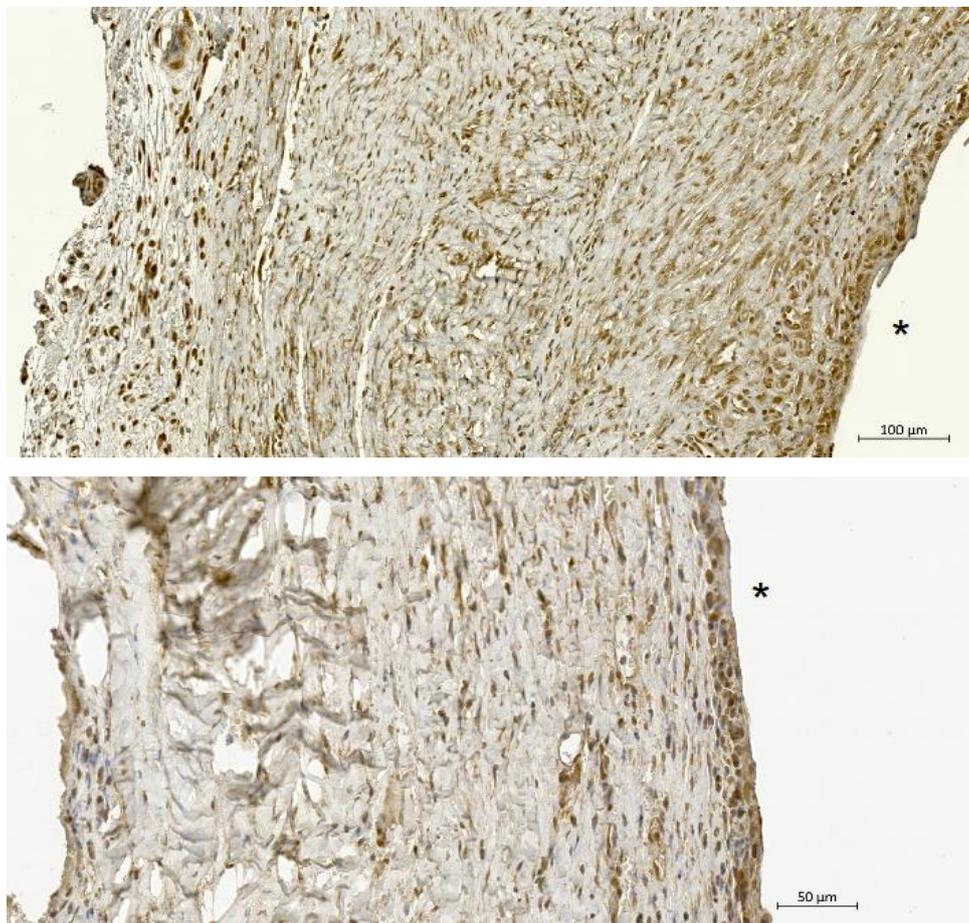


Figure 51. Immunomarkage du BMP-2 sur coupes histologiques de 2 membranes induites de notre étude. L'image en bas présente un grossissement plus important. * : zone de l'espaceur en PMMA.

4.3.3.4. Nombre de vaisseaux (par CD31⁺)

L'analyse en immunofluorescence a permis d'isoler les vaisseaux présents au sein de la membrane induite des groupes ayant subi une TMI. Comme pour le BMP-2, une répartition des vaisseaux pouvait être mise en évidence (Figure 52). Ceux-ci semblaient, logiquement, plus fréquents dans la couche externe de la MI et avaient un diamètre plus large comparé à la couche interne. Le nombre de vaisseaux par mm² du groupe « plaques fines » était de 221 ± 58, tandis que dans le groupe « plaques épaisses », il était de 400 ± 206 (p<0,0001).

Cette différence significative pouvait en partie s'expliquer par une plus grande stabilité du montage dans le groupe « plaques épaisses » ayant favorisé le développement cellulaire, mais l'écart-type dans ce groupe était relativement important, avec des différences dans le développement des vaisseaux entre les différentes MI de ce groupe.

L'importance de la vascularisation pour limiter la résorption du greffon a également été soulignée dans la littérature avec plusieurs études l'analysant, selon différents procédés et rendant la comparaison avec nos résultats assez complexe.

Concernant le PMMA, Nau *et al.* ont analysé l'influence de la viscosité du ciment et son contenu en antibiotique (gentamycine, clindamycine, vancomycine) sur la vascularisation (vaisseaux CD31⁺). Ils retrouvaient que le PMMA + gentamycine (identique à celui utilisé dans notre étude) présentait un nombre de vaisseaux / champ supérieur aux autres compositions et au PMMA à haute viscosité à 4 semaines, avec également un plus grand nombre de monocytes (CD14⁺) à 6 semaines (168).

Sagardoy *et al.* ne retrouvaient pas de différences du nombre de vaisseaux CD31⁺ à 11 semaines entre les MI par le PMMA *versus* le silicone (N = 8×10⁻⁰⁵/μm²). Avec 80 vaisseaux par mm², leur résultat était inférieur au notre mais il est possible qu'à un délai plus tardif la prolifération vasculaire soit inférieure (89).

En effet, Bilal *et al.* retrouvaient un nombre de cellules CD31⁺ par mm² supérieurs à 6 semaines et 12 semaines de l'implantation d'un espaceur en PMMA dans un defect fémoral de rat. Leur étude évaluait l'effet de l'administration de facteurs de croissance spécifiques pour optimiser la formation de la MI (Epidermal Growth Factor ou Platelet Rich Plasma). À 6 semaines, ils retrouvaient entre 125 et 151 vaisseaux CD31⁺/mm² (supérieurs au PMMA seul) et à 12 semaines entre 99 et 138 vaisseaux/mm². Cela confirmait la décroissance progressive de la prolifération vasculaire dans le temps, probablement sous l'effet de la diminution des facteurs de croissance. Ces résultats sont cependant inférieurs aux nôtres, ce qui peut s'expliquer par une différence dans le seuillage pour la détection des cellules CD31⁺ dans notre étude.

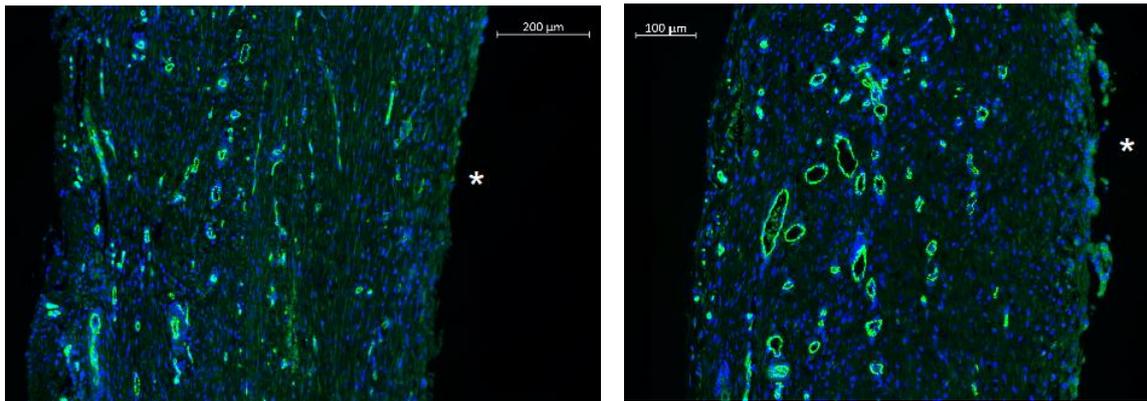


Figure 52. Immunofluorescence CD31⁺ de deux membranes induites de notre étude. Les vaisseaux étaient répartis préférentiellement dans la couche externe de la MI. L'image à droite présente un grossissement plus important. * : zone de l'espaceur en PMMA.

4.3.4. Résultats du modèle après réalisation du 2^e temps de la TMI du groupe contrôle et des groupes d'études TMA

À l'issue des résultats de la comparaison des 2 groupes de rats en termes de faillite radiologique et macroscopique des stabilisations fémorales, ainsi que des résultats histologiques, le 2^e temps de la TMI a été réalisé avec la configuration « plaques 1 mm / vis Ø 2 mm », qui a donc constitué notre groupe contrôle. Comme nous l'avons observé, ce groupe n'avait eu aucune complication à l'issue du 1^{er} temps de la TMI. Cependant, c'est lors du suivi après le 2^e temps que plusieurs complications ont eu lieu, avec notamment un rat décédé et un rat euthanasié après avoir franchi le point limite de poids dans les 2 semaines suivant le 2^e temps.

Une analyse après euthanasie retrouvait un liquide purulent le long des fémurs opérés, avec une hypothèse septique comme en 1^{re} explication pour ces échecs. Au cours du 1^{er} mois suivant le 2^e temps, 2 autres rats ont présenté une fistulisation au niveau de la cicatrice, l'un d'entre eux ayant expulsé du matériel, bien qu'aucun des rats ne perdait de poids lors du suivi (Figure 53). Cette évolution constituant un point limite, ces rats ont été euthanasiés.

Au total, 6/10 rats ont subi une analyse radiologique de la consolidation à 8 et 12 semaines dans ce groupe contrôle.

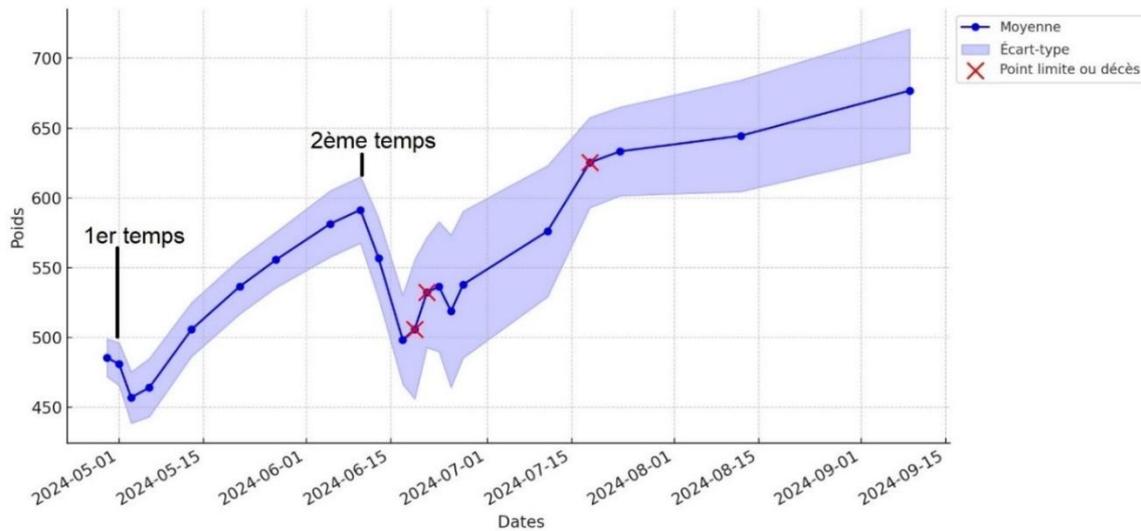


Figure 53. Évolution du poids des rats pour la TMI en 2 temps. Poids exprimé en grammes. Parmi les 10 rats du groupe contrôle, 6 ont atteint la durée totale de l'étude (12 semaines après le 2^e temps).

Concernant les groupes d'études (20 rats), le groupe TMA avec les membranes artificielles en PU100 % a présenté un décès peropératoire, dû à une cause anesthésique. Les 9 autres rats ont bien toléré la procédure. Suivant la chirurgie, ces rats ont retrouvé une courbe de poids ascendante en quelques jours. Il en était de même pour le groupe de 10 rats ayant eu une membrane en PU/PMMA 50/50, qui n'a présenté ni décès ni complications durant la période de suivi (Figures 54 et 55).

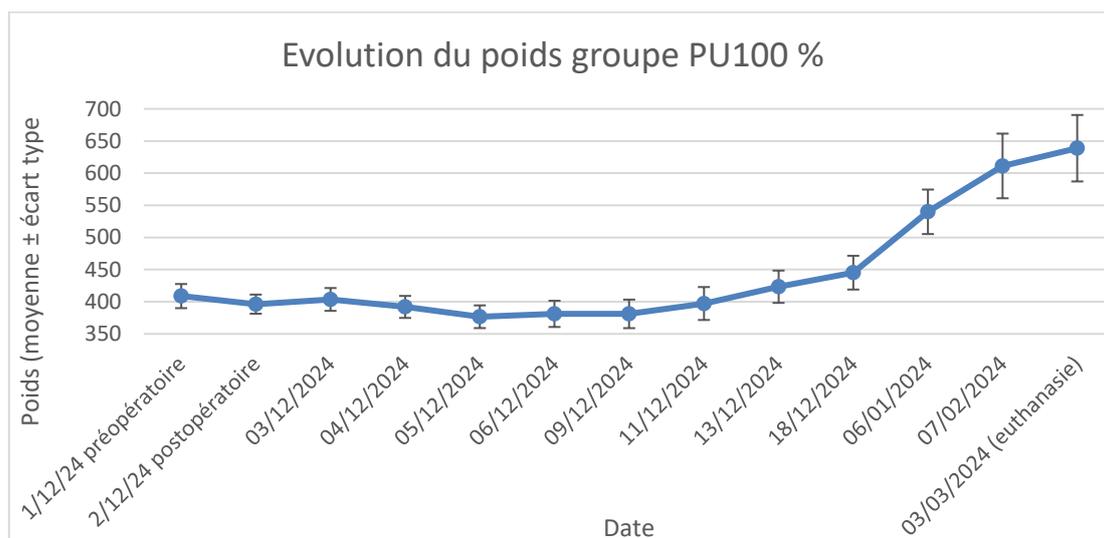


Figure 54. Évolution du poids des rats pour le groupe PU100 %. Poids exprimé en grammes. Aucun rat n'a atteint de point limite durant toute la durée du suivi.

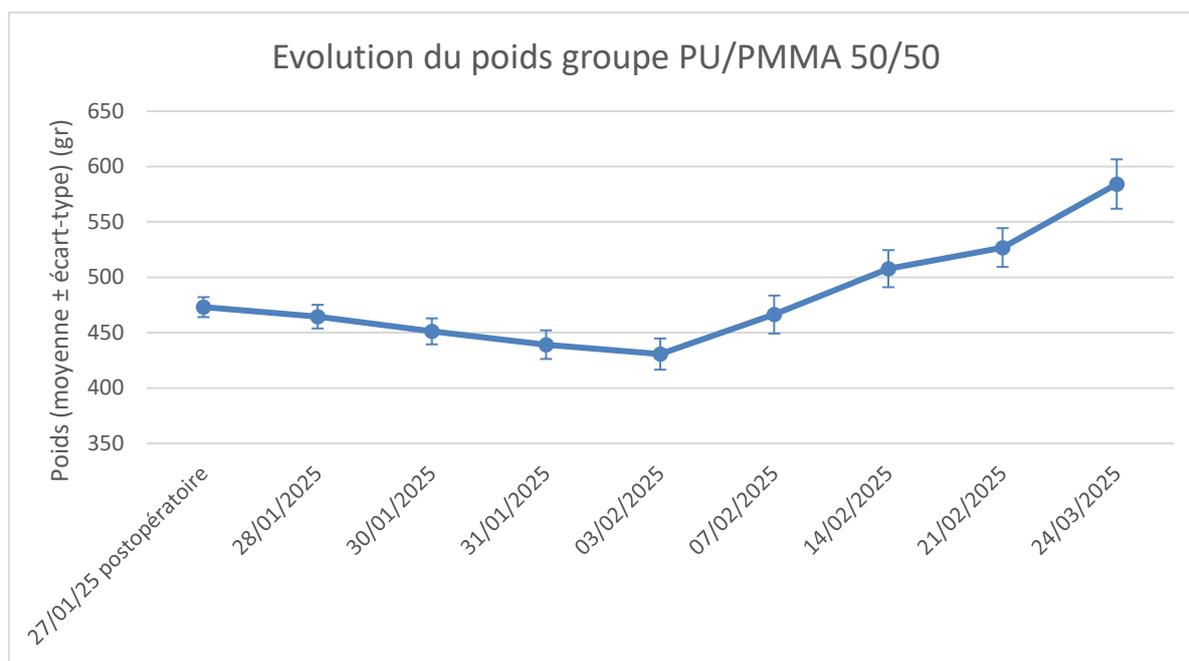


Figure 55. Évolution du poids des rats pour le groupe PU/PMMA 50/50. Poids exprimé en grammes. Aucun rat n'a atteint de point limite durant toute la durée du suivi. Graphique arrêté à 8 semaines postopératoires (données à 12 semaines non disponibles à la finalisation du manuscrit).

Les poids différaient entre les 3 groupes de l'étude en préopératoire, avec des rats moins lourds dans le groupe PU100 % comparé au contrôle et au groupe PU/PMMA 50/50 (Tableau 15). Cependant, bien que cette différence soit significative, elle ne semblait pas expliquer les complications postopératoires du groupe contrôle. En effet, le 1^{er} temps de la TMI a été bien toléré sans aucun décès ni complication par les 10 rats du groupe contrôle. Les complications survenues étaient plutôt d'ordre septique après analyse macroscopique après euthanasie. De plus, il n'y avait pas de différences de poids préopératoire entre le groupe contrôle et le groupe PU/PMMA 50/50, alors que les 10 rats du groupe PU/PMMA 50/50 avaient bien toléré la procédure.

Tableau 15. Évolution du poids des rats durant le suivi de l'étude. Poids exprimé en grammes.

Groupe	Contrôle (n = 6)	PU100 % (n=9)	PU/PMMA 50/50 (n=10)	p
Préopératoire	486 ± 14	408 ± 19	473 ± 9	0,00012*
8 semaines post-greffe osseuse	625 ± 32	611 ± 50	584 ± 22	0,148
12 semaines post-greffe osseuse	677 ± 44	639 ± 52	NC**	0,37***

* : Le test post-hoc de Dunn retrouvait une différence entre le groupe PU100 % et le groupe contrôle ($p < 0,00001$) ainsi que le groupe PU/PMMA 50/50 ($p < 0,001$). Pas de différence entre les groupes contrôle et PU/PMMA 50/50 ($p = 0,2327$). ** : NC à la finalisation du manuscrit. *** : comparaison entre groupe contrôle et groupe PU100 %.

4.3.5. Résultats radiologiques de la consolidation osseuse TMI *versus* TMA

4.3.5.1. Résultats radiographiques

À 8 semaines, sur les 6 rats du groupe contrôle, 2 présentaient une consolidation acquise du fémur, tandis que 4 présentaient un cal plus ou moins avancé, mais non complet (Figure 56). Pour 2 rats, un déplacement du matériel était observé malgré la formation d'un pont osseux, et 1 rat avait une rupture de plaque. De plus, deux fémurs présentaient un cal vicieux avec une incurvation dans le plan latéromédial, soulignant les contraintes appliquées à ces fémurs. Ces déformations sont similaires à ce qui était observé pour les rats qui ont eu un 1^{er} temps de TMI uniquement. Cela est d'autant plus pertinent que la littérature utilise souvent des plaques et des vis de diamètre 1,5 mm, alors que le poids de nos rats était de pratiquement le double (poids à 8 semaines des 6 rats du groupe TMI 2 temps = 625 ± 32 g) de celui rapporté dans la littérature.

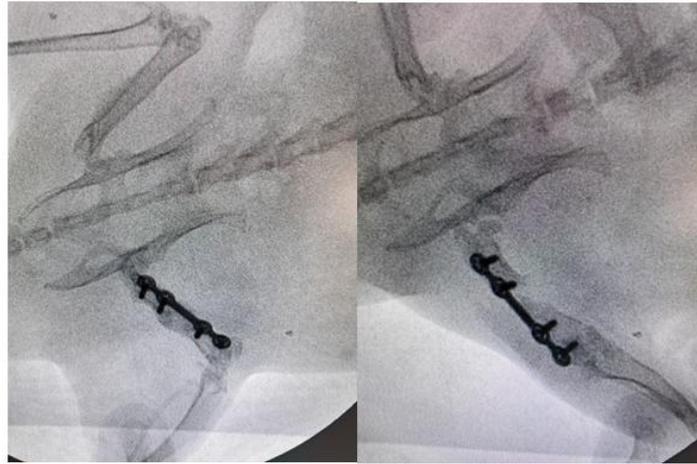


Figure 56. Radiographies à 8 semaines du groupe contrôle TMI. À gauche : bonne consolidation du fémur ; à droite : consolidation minimale avec risque de non-consolidation.

Concernant les groupes PU100 % et PU/PMMA 50/50, aucun bris de matériel n'a été retrouvé à 8 semaines. L'analyse radiographique a montré un score de Guldberg *et al.* de $1,56 \pm 0,5$ et $1,33 \pm 0,5$ respectivement, soit un score légèrement supérieur au groupe contrôle ($1,33 \pm 0,8$), notamment pour le groupe PU 100%, mais sans différence significative ($p=0,587$). De même, le score de Lane-Sandhu était plus élevé dans les groupes avec MA, mais les comparaisons restaient non significatives ($p=0,327$) (Tableau 16). Cette absence de différence significative pourrait s'expliquer en partie par un manque de puissance statistique, notamment lié au fait que le groupe contrôle ne comportait que 6 rats au lieu de 10.

Néanmoins, nous pouvons suggérer que la technique en 1 temps avec nos TMA n'a pas induit de résorption de greffon pour un defect fémoral critique de 7 mm sans membrane induite à ce délai (Figure 57). Ce résultat était donc très encourageant quant au succès potentiel de cette approche chirurgicale en 1 temps.

Tableau 16. Résultats radiographiques de la consolidation à 8 semaines postopératoires.

	TMI (n = 6)	TMA PU 100 % (n= 9)	TMA PU/PMMA 50/50 (n = 10)	p
Consolidation (0 à 2) (Moyenne ± écart-type)	$1,33 \pm 0,8$	$1,56 \pm 0,5$	$1,33 \pm 0,5$	0,587
Lane-Sandhu Score (/12) (Moyenne ± écart-type)	$7,3 \pm 3,5$	$9 \pm 2,2$	$7,6 \pm 1,58$	0,327

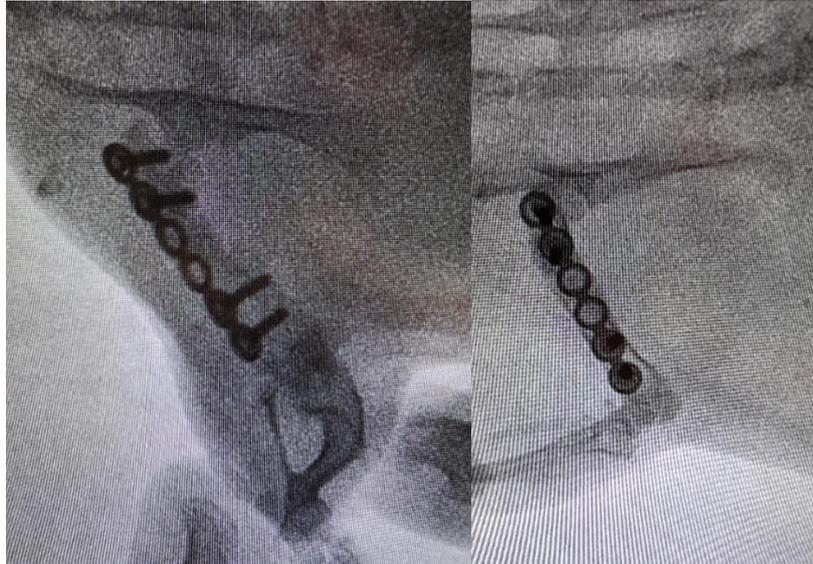


Figure 57. Radiographie de face et de profil du fémur d'un rat du groupe TMA avec PU100 % à 8 semaines postopératoires. Les radiographies révèlent une consolidation complète du defect.

Une seconde analyse radiographique a été réalisée à 12 semaines, après l'euthanasie des 3 groupes.

- Pour le groupe TMI, les résultats montraient 2/6 consolidations complètes, 3 consolidations partielles (dont une avec plaque cassée et une avec cal vicieux), et 1/6 non-consolidation. Ces 3 dernières situations avaient déjà été envisagées à la 8^e semaine. L'analyse à 12 semaines était cependant plus péjorative, avec un score de Guldberg et de Lane-Sandhu inférieurs à ceux de la 8^e semaine. Cette diminution pourrait être attribuée à une résorption du greffon entre ces 2 points temporels, notamment en raison de la constatation radiographique de bris de plaque.

- Pour le groupe PU100 %, les résultats radiographiques à 12 semaines retrouvaient une consolidation complète pour 8/9 rats, avec un seul rat présentant un interligne proximal visible à ce stade. Aucun bris de matériel n'a été observé dans ce groupe. De plus, le score de Guldberg a progressé, passant de $1,56 \pm 0,5$ à $1,89 \pm 0,33$; et le score de Lane-Sandhu a également montré une légèrement amélioration, avec une réduction de l'écart-type de ce score à 12 semaines comparé à la 8^e semaine. Ainsi, le cal osseux a continué de s'organiser davantage en un mois dans le groupe MA en PU à 100 %, sans résorption du greffon, contrairement au groupe contrôle, dont les scores se sont détériorés au fil du temps. En conséquence, la comparaison des scores radiographiques à 12 semaines montrait une différence significative, avec une supériorité du groupe PU100 % par rapport au groupe contrôle (Tableau 17).

- Pour le groupe PU/PMMA 50/50, les résultats radiographiques à 12 semaines n'étaient pas encore disponibles lors de la finalisation de ce manuscrit. Une comparaison ultérieure des résultats radiographiques entre ces deux groupes d'étude permettra de mieux évaluer leur

efficacité respective, tant par rapport au groupe contrôle que dans la comparaison directe entre PU100 % et PU/PMMA 50/50.

Tableau 17. Résultats radiographiques à 12 semaines comparant groupe contrôle et groupe PU100 %.

	TMI (n = 6)	TMA PU100 % (n= 9)	p
Consolidation (0 à 2) (Moyenne ± écart-type)	1,17 ± 0,75	1,89 ± 0,33	0,0276
Lane-Sandhu Score (/12) (Moyenne ± écart-type)	5,67 ± 2,8	9,33 ± 0,5	0,0193

4.3.5.2. Résultats scanographiques

Après analyse radiographique, les fémurs ont été donc prélevés pour analyse micro-CT à 12 semaines. Cependant, les résultats scanographiques pour les MA en PU/PMMA n'étaient pas disponibles lors de la finalisation du manuscrit. Une comparaison ultérieure permettra donc de statuer sur la supériorité éventuelle de l'une et/ou l'autre des MA comparé au groupe contrôle. La comparaison entre TMI et TMA en PU retrouvait un volume de tissu total et un volume osseux significativement supérieurs dans le groupe TMA en PU par rapport au groupe TMI (Tableau 18). Cependant, le ratio BV/TV n'était pas différent significativement entre les 2 groupes.

L'analyse de ces résultats suggérait, comme cela avait été pressenti lors des analyses radiologiques, que le groupe TMA en PU n'avait pas induit de résorption du greffon et présentait une quantité de tissus préservée au sein du defect supérieure à celle du groupe contrôle (Figure 58).

La radiographie montrait une plus grande opacité de ce tissu comblant le defect, comparé à l'analyse de la densité osseuse en micro-CT. Cela expliquait les scores radiologiques plus élevés dans le groupe TMA en PU, malgré un ratio BV/TV similaire entre les 2 groupes.

Ces résultats suggèrent également que la MA a permis un cloisonnement efficace de la greffe à l'intérieur du defect, tout en autorisant sa consolidation et son remodelage. En revanche, elle ne semble pas avoir accéléré la minéralisation du defect, ce qui aurait dû se traduire par un ratio BV/TV plus grand à 12 semaines.

Tableau 18. Résultats scanographiques à 12 semaines comparant le groupe contrôle et le groupe PU100 %.

	TMI (n = 6)	TMA PU 100 % (n= 9)	p
Tissue Volume (TV) (mm³) Moyenne ± ET	212,4 ± 90,7	284,8 ± 48,3	0,036
Volume Osseux (BV) (mm³) Moyenne ± ET	147,3 ± 54,9	185,2 ± 26,5	0,06
Ratio Os/Tissu (BV/TV) (%) Moyenne ± ET	70,8 ± 6,1	65,3 ± 3,0	0,22

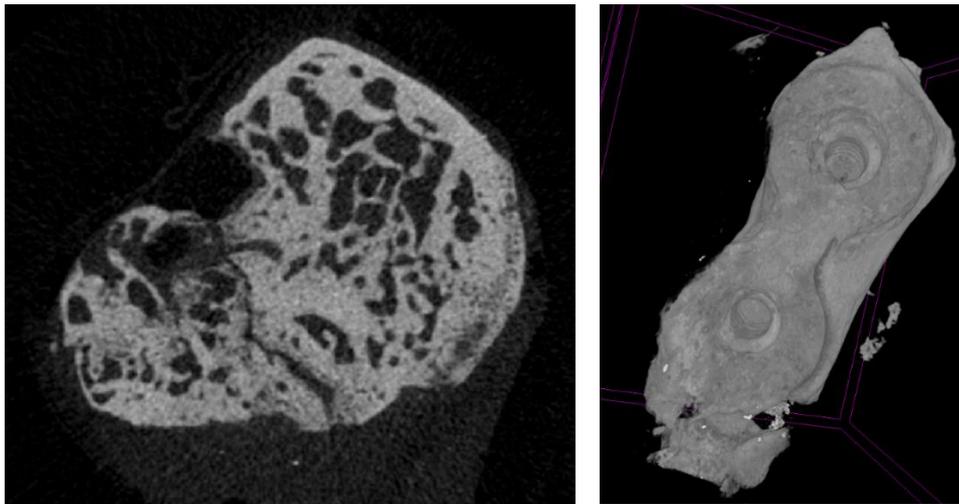


Figure 58. Coupe micro-scanographique 2D (à gauche) et reconstruction 3D d'un defect du groupe PU100 % consolidé (à droite).

Ces résultats doivent être mis en perspective avec les résultats de modèles *in vivo* similaires au notre, étudiant l'optimisation de la consolidation des defects osseux critiques. Certains auteurs cherchaient notamment à optimiser une technique en 2 temps, comme Bosemark *et al.* Leur modèle consistait à placer au sein du defect (6 mm, stabilisé par ostéosynthèse endomédullaire) non pas de la greffe osseuse, mais un *scaffold* en TCP + HAp, fonctionnalisé par de la BMP-7 et/ou des bisphosphonates.

Radiographiquement, ils retrouvaient une absence de consolidation pour le *scaffold* seul à 11 semaines post 2^e temps, tandis que la consolidation était obtenue dans 7 à 10 cas sur 10 pour les groupes ayant reçu un *scaffold* fonctionnalisé (44).

Leurs résultats illustraient bien le caractère uniquement ostéoconducteur d'un *scaffold* seul, soulignant la difficulté d'obtenir une consolidation sans ajout de facteurs ostéoinducteurs. Ainsi, il semblait difficile d'éviter le recours à une greffe osseuse pour consolider un defect osseux, même en présence d'une membrane induite, comme cela avait déjà été évoqué par l'étude de Klaue *et al.* (54).

Un autre résultat de leur étude corroborait cette hypothèse : leur analyse micro-CT de la consolidation. Ils retrouvaient en effet un ratio BV/TV de 55 % au maximum qui, bien que supérieur au *scaffold* seul dans leur étude (49%), restait inférieur au ratio de notre groupe contrôle (71 %). Cela suggère que la membrane induite joue un rôle clé dans la consolidation, mais qu'elle n'est pas obtenue aisément sans une greffe osseuse.

En effet, Toth *et al.* ont également observé la formation d'une MI en utilisant un espaceur en titane lors du 1^{er} temps, suivi du comblement du defect par une allogreffe (173). Néanmoins, leur étude montrait une consolidation plus fréquente dans leur modèle avec l'espaceur en PMMA, notamment lorsqu'il présentait une topographie de surface lisse (rugosité de 1 μm). Cependant, la rugosité et le type d'espaceur n'avaient pas induit de modification significative des paramètres micro-CT (BV, TV, BV/TV, densité minérale osseuse), ce qui illustre le fait que d'autres facteurs biologiques et mécaniques entraînent en jeu.

Ces mêmes conclusions sont retrouvées dans l'étude de Mathieu *et al.*, qui ont comparé la consolidation en 2 temps (par allogreffe) avec une MI générée par un espaceur en PMMA ou en polypropylène. Leur analyse micro-CT ne montrait aucune différence significative, entre ces deux matériaux concernant les paramètres étudiés (176).

Enfin, Verboket *et al.* ont comparé une TMI classique en 2 temps avec une approche dans laquelle la greffe osseuse était remplacée par une matrice osseuse déminéralisée, seule ou associée à des cellules souches mésenchymateuses. À 8 semaines après le 2^e temps, ils ne retrouvaient pas de différence significative sur le ratio BV/TV entre les groupes comparés. Cependant, le meilleur ratio BV/TV était celui du groupe de la TMI classique en 2 temps (78 %), un résultat similaire, voire légèrement supérieur, à notre groupe contrôle à un délai plus précoce (41).

4.3.6. Résultats histologiques de la consolidation des defects du groupe TMI

L'analyse histologique a permis d'évaluer les consolidations des defects pour le groupe contrôle. Cette analyse a été réalisée par coloration HE et Masson-Trichrome (MT) et a pu être réalisée sur les 6 rats du groupe contrôle.

Les coupes histologiques des rats appartenant aux groupes TMA n'étaient pas encore disponibles lors de la finalisation de ce manuscrit. Cela ne permettait donc pas encore la comparaison des scores histologiques entre le groupe contrôle et les groupes TMA. Cependant, une fois les données histologiques obtenues, il sera possible de comparer les consolidations entre ces groupes « membranes artificielles », ainsi que de les comparer aux résultats des consolidations du groupe contrôle, en complément des données radiologiques.

Concernant ce groupe contrôle, le score de Lane-Sandhu histologique moyen était de $5 \pm 2,8$ (extrêmes 0 – 8) sur un maximum de 12 points, indiquant une capacité de consolidation et de remodelage relativement faible à 12 semaines. Ces résultats sont en accord avec d'autres études sur la TMI :

- Fenelon *et al.* (96) ont utilisé un score histologique sur 10 pour comparer une TMI à une technique utilisant une membrane dérivée de tissu humain, seule ou associée à un *scaffold* en phosphate de calcium et \pm BMP-2. À 6 semaines postopératoires, leurs scores variaient de 4,7 à 7/10.

- Verboket *et al.* (41) ont utilisé un score de Han *et al.*(241), allant de 0 à 40 points, pour comparer quatre types de greffes dans une TMI. À 8 semaines, ils rapportaient des valeurs relativement moyennes (19 à 22). Leur évaluation consistait à comparer 4 types de greffes au cours d'une TMI.

Ces résultats corroboraient bien les analyses radiologiques et microscopiques de notre étude :

- Un rat ne présentant aucune consolidation histologique, avec persistance d'un espace de 5 mm entre les segments fémoraux distal et proximal.

- Trois autres rats présentaient une fusion complète du defect, bien que la composante osseuse était moins marquée. Certaines zones étaient inhomogènes, suggérant une consolidation ostéochondrale.

- Une proportion importante de fibres de collagène non minéralisées était observée en coloration Masson-Trichrome. Cependant, une coloration rouge vif (correspondant au collagène minéralisé) persistait dans ces échantillons.

L'organisation histologique ne montrait pas distinctement de corticale, mais des cellules ostéoblastiques volumineuses à noyaux clairs étaient constamment retrouvées en coloration hématoxyline-éosine au sein du defect en cours de consolidation, témoignant d'une activité soutenue de remodelage et de formation de tissu osseux.

Enfin, 2 échantillons présentaient un statut de consolidation avancé, avec un remodelage osseux spongieux important. Pour ces 2 cas :

- Le collagène minéralisé était réparti au sein du defect osseux.

- Une bordure périphérique de collagène minéralisé suggérait le début d'une formation corticale, bien qu'elle restait incomplète.

- L'activité de néoformation osseuse était intense, avec une forte présence d'ostéoblastes volumineux, à noyaux de grande taille (coloration hématoxyline éosine, Figure 59).

- En périphérie et dans les zones de remodelage cortical, les cellules paraissaient plus aplaties,

avec des noyaux moins volumineux, traduisant une diminution de l'activité de synthèse protéique et la présence d'ostéocytes.

Une fois disponibles, la comparaison des échantillons histologiques des groupes PU et PU/PMMA avec ceux du groupe contrôle permettra de déterminer si la TMA favorise une meilleure formation de tissu osseux et un remodelage plus rapide que la TMI.

La correspondance claire entre les observations radiologiques et histologiques du groupe contrôle permet à ce stade d'émettre l'hypothèse que les résultats histologiques des groupes TMA seront supérieurs au ceux du groupe contrôle.

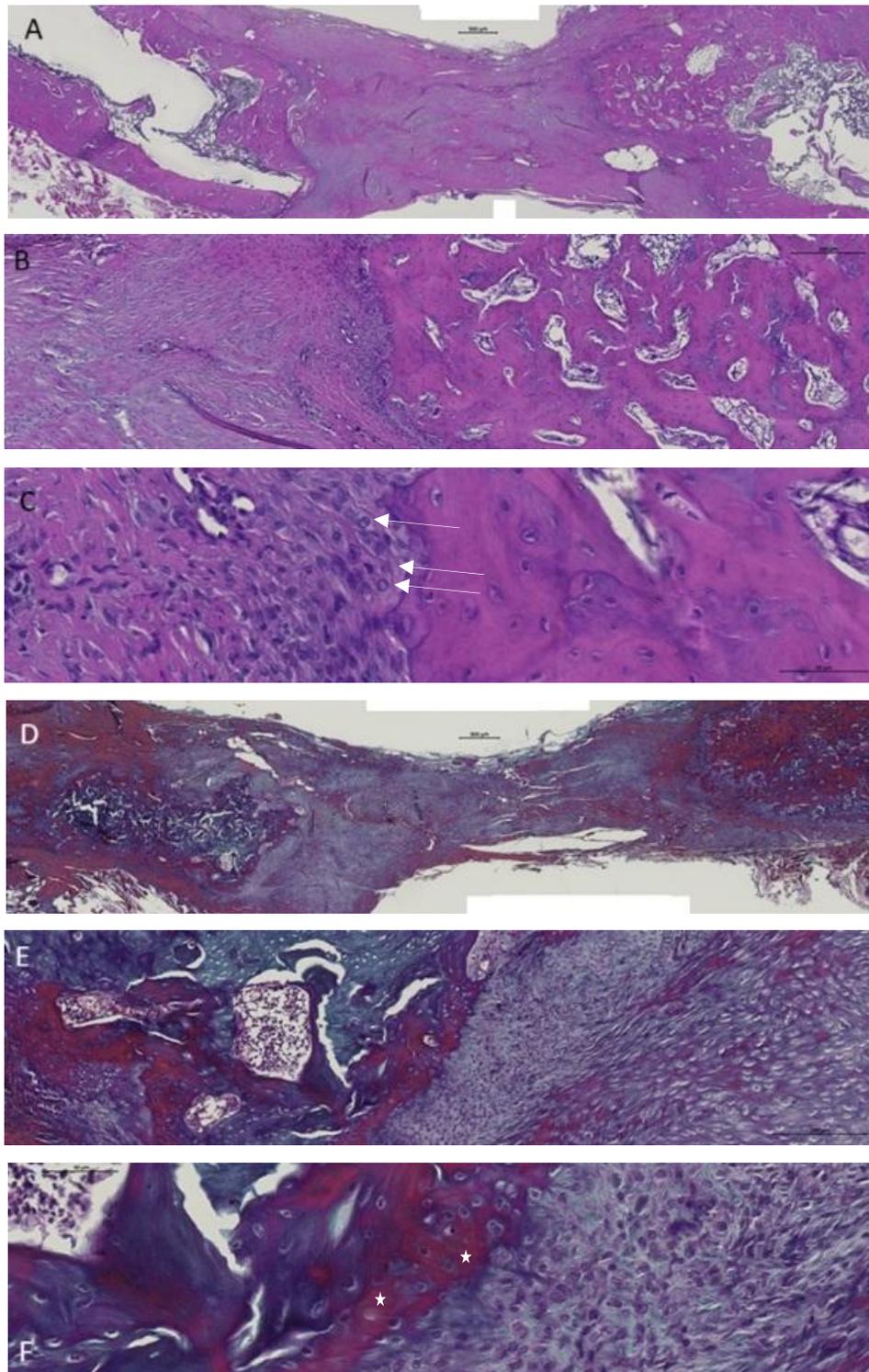


Figure 59. Coupes histologiques à grossissements croissants d'un defect du groupe contrôle en cours de consolidation à 12 semaines en coloration HE (A, B, C) et MT (D, E, F). À la jonction entre le defect et l'os natif, une intense activité ostéoblastique est observée, caractérisée par des cellules de forme cubique avec noyau central large (ostéoblastes, flèches blanches) en coloration HE. Des zones comportant du collagène minéralisé (rouge vif, étoiles blanches) sont visibles en coloration MT, particulièrement dans la zone transitionnelle entre la greffe et l'os natif. Ces zones sont associées à des larges zones en cours de remodelage ostéocondral.

5. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS – PERSPECTIVES

L'enjeu principal de ce travail de thèse était donc de répondre à une problématique importante et de plus en plus fréquente en orthopédie-traumatologie. La prise en charge des pertes de substance osseuse, provoquées majoritairement par des traumatismes à haute énergie, affecte l'ensemble de la population, quel que soit l'âge des patients. Par ailleurs, l'augmentation des activités à haute énergie dans une population de plus en plus âgée et/ou présentant des comorbidités associées en fait un défi de plus en plus difficile à relever pour le chirurgien orthopédiste traumatologue. D'autres problématiques peuvent s'y associer, notamment l'infection osseuse qui peut soit aggraver la perte de substance osseuse traumatique, soit constituer une infection osseuse primitive. Enfin, la prise en charge des pathologies osseuses tumorales ainsi que les cas de pseudarthrose congénitale en chirurgie orthopédique pédiatrique sont également concernées par ce défi.

La technique actuellement la plus simple dans sa réalisation est celle de la membrane induite, que l'on peut opposer aux techniques de transport osseux. Nous avons vu en introduction que ces 2 techniques avaient des résultats cliniques similaires. En pratique, la lourdeur de la technique de transport osseux rend cette option plutôt rédhitoire bien qu'actuellement l'utilisation de fixateurs externes ait été supplantée par celle de clous de transport, permettant d'optimiser le confort et de réduire la douleur des patients. La technique de la membrane induite reste donc bien plus accessible que les techniques plus complexes de greffes vascularisées, qui nécessitent une maîtrise des sutures microchirurgicales vasculaires, un savoir-faire que tous les chirurgiens orthopédistes ne possèdent pas. Cependant, cette approche (TMI) reste confrontée à l'impératif de réaliser plusieurs interventions, au minimum 2 (sans compter les éventuelles étapes préalables de parage osseux et/ou les « second look » pour les traumatismes les plus graves impliquant également des pertes de substances des parties molles).

Le principal objectif de cette thèse était donc de concevoir un dispositif médical permettant de s'affranchir de cette contrainte et de simplifier davantage cette technique en la résumant en un seul temps chirurgical. C'est dans cette optique que ce travail a consisté à développer des membranes artificielles permettant de réaliser une greffe en un temps au sein du defect osseux. Une validation clinique de cette approche représenterait non seulement un gain de temps considérable, mais également un bénéfice fonctionnel majeur pour le patient et un avantage économique substantiel pour la société. Ce gain serait de plusieurs semaines, voire plusieurs

mois, avant le retour à une autonomie satisfaisante. Les enjeux médico-économiques actuels, la nécessité de lutter contre la perte de l'autonomie et limiter les complications liées à l'immobilisation prolongée rendent impératif le développement de stratégies de prises en charge plus efficaces.

Lors de l'élaboration du cahier des charges de cette membrane artificielle, le premier élément clé était de concevoir un dispositif autorisant cette greffe en un temps. Une alternative aurait été de développer un *scaffold* qui remplacerait la greffe osseuse autologue. Cela aurait l'avantage de supprimer l'autogreffe, dont la morbidité n'est pas négligeable. Néanmoins, aucune des solutions explorées dans la littérature ne permet actuellement de remplacer les capacités ostéoinductrices d'une autogreffe tout en répondant aux critères d'un *scaffold* idéal. Les matériaux étudiés, principalement d'origine phosphocalcique, ne présentaient que des propriétés ostéoconductrices qui ne semblaient pas améliorer fondamentalement les résultats *in vivo* précliniques (242–244). Par conséquent, la conception d'une membrane artificielle laissant le defect osseux libre d'accueillir une greffe en un temps a été retenue comme la meilleure option.

La sélection des matériaux dans ce travail pourrait sembler contradictoire avec la littérature récente. En effet, nous avons fait le choix de polymères non résorbables (polyuréthane et polyméthylméthacrylate) pour réaliser ces membranes artificielles. Bien que l'utilisation de membranes artificielles en polymères non résorbables soit mentionnée dans la littérature, elles sont moins fréquemment reportées que celles utilisant des polymères résorbables, qu'ils soient synthétiques ou naturels. Ce choix s'explique notamment par la différence d'application clinique entre la chirurgie maxillo-faciale/dentaire et la chirurgie orthopédique et traumatologique. Dans ces deux premiers domaines, une membrane non résorbable doit être retirée une fois le defect osseux comblé. En revanche, dans notre domaine d'application, une telle extraction n'est pas systématiquement nécessaire, car ces membranes artificielles sont implantées en profondeur.

Plusieurs études ont évalué des matériaux non résorbables comme le polypropylène et le silicone (82,89,176), et nos résultats confirment que l'utilisation de membrane artificielle en polymère non résorbable n'entrave pas l'obtention d'une consolidation osseuse satisfaisante dans un modèle *in vivo* de defect fémoral critique de rat. Cependant, nous avons également observé que ces membranes doivent permettre une certaine communication entre le milieu extracellulaire et le defect. En effet, l'objectif de la membrane artificielle est double : éviter l'invasion fibroblastique du site de greffe, qui pourrait compromettre la consolidation, tout en

autorisant une certaine perméabilité pour la diffusion des facteurs de croissance nécessaires à la formation de tissus osseux, au remodelage et à la vascularisation de la greffe (245).

C'est face à cet impératif que les membranes artificielles ont été élaborées par technique d'electrospinning, un procédé permettant de mimer la matrice extracellulaire et d'assurer une perméabilité optimale. Bien que l'electrospinning du polyuréthane et du polyméthylméthacrylate soit décrit dans la littérature, leur utilisation combinée en tant que membranes artificielles de régénération osseuse en chirurgie orthopédique et traumatologique n'avait, à notre connaissance, jamais été rapportée.

Dans un contexte chirurgical traumatologique, l'utilisation d'une membrane artificielle qui se délèterait ou se déchirerait face à une esquille osseuse ou à la manipulation du chirurgien serait clairement rédhibitoire. L'utilisation du polyuréthane comme matériau de choix était liée à ses caractéristiques de résistance mécanique intéressantes, ce qui rendrait compatibles nos membranes artificielles avec ce terrain.

Le polyméthylméthacrylate a été sélectionné, car en tant qu'espaceur, ce matériau reste le matériau de choix utilisé en chirurgie orthopédique lors de l'utilisation de la TMI. De nombreuses études cherchent à en améliorer les propriétés, mais elles ne concluent qu'à des résultats peu ou irrégulièrement significatifs. Ce matériau pourrait présenter des propriétés immunologiques qui lui confèreraient la capacité à produire une MI de qualité bien qu'actuellement plusieurs auteurs ont démontré des caractéristiques similaires avec des espaceurs métalliques, ou en polymère synthétique.

Ainsi, la combinaison de ces 2 matériaux représentait une possibilité de tirer parti des propriétés biomécaniques du PU tout en bénéficiant des propriétés immunologiques du PMMA dans la conception d'une membrane artificielle. Nous avons donc opté pour l'élaboration de MA en PU seul, puis pour leur association au PMMA dans des ratios variables jusqu'à sélectionner un ratio de 50/50.

In vitro, nous avons pu montrer une absence de cytotoxicité des membranes par méthode indirecte sur les cellules préostéoblastiques et endothéliales. Comme dans la plupart des études de la littérature sur d'autres matériaux, la surface de ces membranes artificielles était hydrophobe sans que cela n'entrave la réalisation d'études *in vivo*. En effet, nos MA devaient agir en tant que barrière à l'invasion fibroblastique et non pas forcément favoriser l'adhésion cellulaire.

En revanche, la microporosité devait suffire à permettre la diffusion de facteurs de croissance

nécessaires à la stimulation de la greffe osseuse. Cette perméabilité a été confirmée pour les 2 membranes artificielles, avec la réalisation préalable d'un test spécifique utilisant l'albumine dans notre étude.

Biomécaniquement, l'addition de PMMA a permis de diminuer la composante élastique du polyuréthane et de rapprocher le comportement biomécanique de nos membranes artificielles de celui des MI naturelles, bien que les données de la littérature soient limitées. Enfin, l'alignement des nanofibres dans ces MA dans le sens longitudinal imiterait l'alignement des fibres du périoste naturel et conférerait aux MA une résistance supérieure, notamment face à la force de traction exercée parallèlement aux nanofibres (246,247).

In vivo, une revue systématique de la littérature a permis d'identifier un modèle de defect fémoral critique chez le rat Sprague-Dawley, le plus couramment utilisé. Nous avons ainsi confirmé que l'ostéosynthèse du defect fémoral devait être stable, surtout pour un defect critique, car ceci peut influencer directement sur l'issue des études *in vivo* comme c'est le cas pour la TMI chez l'homme.

Nous avons déterminé que, pour un defect critique de 7 millimètres, un montage associant une plaque d'un millimètre d'épaisseur et des vis d'ostéosynthèse de 2 mm de diamètre offrait un montage fiable. Il faut noter que le déterminant principal de la stabilité d'une ostéosynthèse demeure l'épaisseur de la plaque et que la plupart des études mentionnent l'utilisation de vis de 1,5 mm. L'utilisation de vis de ce diamètre pourrait également être suffisante.

Cette observation est importante, car la littérature ne précise pas l'épaisseur des plaques utilisées dans ces modèles, bien que le marché propose des plaques de différentes épaisseurs. Par ailleurs, notre modèle *in vivo* reproduisait bien les difficultés rencontrées en pratique clinique. En effet, les rats ayant subi une TMI en 2 temps ont présenté plusieurs complications, avec notamment l'atteinte de points limites, ce qui n'était pas le cas pour les groupes avec technique en un temps utilisant les membranes artificielles.

Grâce à ce modèle animal éprouvé, nous avons pu évaluer 2 membranes artificielles retenues à l'issue des analyses *in vitro*. Nos résultats montraient qu'une membrane artificielle en polyuréthane seule électrofilée suffisait pour induire une consolidation radiologiquement plus avancée qu'une technique classique de membrane induite.

Les résultats microscanographiques des analyses sur les membranes artificielles en polyuréthane et polyméthylméthacrylate devraient permettre de déterminer l'effet potentiellement bénéfique ou non de l'addition du PMMA à la consolidation. Actuellement, ces

membranes artificielles en polyuréthane montrent une augmentation de la quantité de tissu et d'os au sein du defect, comparé au groupe contrôle.

Cependant le ratio BV/TV reste identique à celui du groupe contrôle, soulignant que, bien que notre MA en PU permette de maintenir la consolidation en un seul temps chirurgical, une fonctionnalisation de ces membranes artificielles pourrait s'avérer utile pour accélérer la consolidation osseuse et le remodelage osseux.

Des biomatériaux biocompatibles et bioactifs font actuellement l'objet de nombreuses études. Parmi eux, les biocéramiques, notamment le Bioverre 45S5 développé par Larry Hench en 1969 (51). Après 40 ans d'études sur les biocéramiques actives, le Bioverre 45S5 semble posséder les meilleures propriétés biologiques, notamment en termes de liaison avec le tissu osseux (248). Il a été étudié dans de nombreuses formes, notamment sous forme de *scaffold* microporeux, mais également de particules ou granules pour combler un defect osseux. Ses capacités à promouvoir la croissance osseuse ont pu être démontrées dans plusieurs études, par exemple dans l'étude de Schepers *et al.* chez le chien (249) ou chez le mouton dans les travaux de Wang *Z et al.* (250).

Malgré ces études, l'élaboration d'une biocéramique poreuse comme *scaffold* reste un défi, car l'étape de frittage nécessaire à la fusion des particules tend à faire cristalliser la biocéramique (251,252), ce qui peut diminuer sa stabilité et sa bioactivité (248).

Ainsi, une piste serait d'électrofiler directement la solution composite PU \pm PMMA/Bioverre. Il s'agit d'un défi technique, car le risque de former des nanofibres discontinues, ou des perles (*beads*) en lieu et place d'une structure continue, modifierait la morphologie de la membrane. Cependant, pour Kim *et al.* (253), le procédé semble être réalisable lorsque des nanoparticules d'hydroxyapatite de 10 nm sont dispersées de manière homogène dans une solution de PLA, mais pas lorsque ces particules atteignent 100 nm de diamètre. L'utilisation de nanofibres contenant des nanocristaux d'hydroxyapatite est considérée comme une meilleure imitation de la structure du tissu osseux et a montré une meilleure activité ostéoblastique (254,255). Dans la même idée, l'utilisation de nanoparticules de bioverre pourrait permettre leur electrospinning direct.

D'autres méthodes moins complexes peuvent également être envisagées, comme le sprayage de particules de bioverre mises en suspension sur la MA, suivi d'un second electrospinning par-dessus le sprayage.

Cette étude présentait des limites. Le nombre de rats inclus *in vivo* était faible, mais il

correspondait à la taille moyenne des groupes dans les modèles précliniques de defects fémoraux. Cela aurait pu conduire à un manque de puissance statistique. Cependant, cette étude a pu démontrer la supériorité du mode ostéosynthèse par plaque de 1 mm d'épaisseur et vis de 2 mm de diamètre comparé à des plaques plus fines et des vis de moins grand diamètre. De plus, les scores radiographiques ainsi que les résultats microscanographiques étaient significativement supérieurs dans notre groupe membrane artificielle en PU par rapport au groupe contrôle.

Cette étude n'a pas testé d'autres méthodes d'ostéosynthèse également utilisées, telles que les clous intramédullaires (97,98) ou les fixateurs externes (173,176), car l'ostéosynthèse par plaque/vis était la plus fréquente dans ce modèle préclinique.

Une limite supplémentaire était l'absence d'utilisation de tests mécaniques de résistance du cal osseux lors de la consolidation. Cependant, il a été privilégié de réaliser une analyse histologique de la consolidation de ces defects plutôt qu'une analyse biomécanique. Nous avons pu obtenir des résultats histologiques du groupe contrôle confirmant un remodelage relativement lent et similaire aux résultats histologiques retrouvés dans la littérature.

Les perspectives de ce travail seront de confirmer l'amélioration de la consolidation et du remodelage osseux pour les groupes d'études comparés au groupe contrôle, et notamment d'évaluer si l'une des 2 membranes artificielles développées présentait des résultats histologiques supérieurs à l'autre.

De plus, il a été retrouvé macroscopiquement qu'en regard des membranes artificielles, une réaction à corps étranger avait également lieu et était visible lors de la phase d'extraction des defects.

L'un des points intéressants de l'utilisation d'un polymère non résorbable en tant que membrane artificielle est qu'il entraîne également une réaction à corps étranger comme pour toute implantation de matériel. Il sera intéressant d'évaluer histologiquement les caractéristiques de cette membrane de réaction à corps étranger apposée à nos membranes artificielles.

Cette membrane induite aurait pu se former, et les cellules macrophagiques sécrétrices de facteurs de croissance pourraient traverser la membrane artificielle grâce à sa perméabilité, et ainsi contribuer à la greffe réalisée en un temps, ce qui pourrait corroborer nos résultats radiologiques obtenus dans ce travail.

Enfin, l'utilisation d'une MA élaborée par electrospinning seul semblait complexe pour la transposition de ces recherches sur des modèles de gros animal. Une revue de la littérature a

permis d'isoler les caractéristiques de ce modèle et pourrait servir de base à des travaux futurs notamment en cas de validation de nos résultats histologiques et microscopographiques.

Cependant, il pourrait être nécessaire de concevoir une architecture de soutien à cette membrane artificielle, actuellement limitée à 100 µm d'épaisseur. Dans un modèle de gros animal, les défauts réalisés seraient de plusieurs centimètres (entre 3 et 6 pour le modèle ovin). Nos MA pourraient ne pas être manipulables en pratique.

Certains auteurs ont déjà opté pour l'élaboration d'une architecture de soutien par impression 3D (256–258). Par exemple, Bouyer *et al.* ont récemment développé un *scaffold* en polylactide (PLA) imprimé en 3D associée à un film de PLA + BMP-2. Ce biomatériau était capable d'induire *in vivo* une régénération osseuse de défaut mandibulaire (chez le miniporc), avec un contrôle de la délivrance de BMP-2 (259). Il pourrait être pertinent de réaliser une architecture de ce type et d'y électrofiler nos membranes.

Pour conclure, cette étude a démontré que les membranes artificielles électrofilées en PU ± PMMA permettait de réaliser une greffe osseuse en un seul temps d'un défaut fémoral critique chez le rat. Elles ont significativement amélioré la consolidation osseuse radiologique comparée à une technique de membrane induite classique. Ces résultats soulignent le potentiel des membranes à base de PU pour simplifier la réparation des défauts osseux, en réduisant la nécessité d'interventions chirurgicales multiples et en améliorant les résultats cliniques pour les patients.

Les travaux futurs devront confirmer ces résultats avec des échantillons de taille plus grande, des tests mécaniques et des comparaisons histologiques complémentaires. À moyen terme, l'optimisation de l'architecture des membranes artificielles grâce à l'impression 3D et l'exploration de formulations composites alternatives pourrait améliorer leur bioactivité et leur maniabilité en terrain chirurgical. Enfin, le passage à des modèles animaux de grande taille sera essentiel pour évaluer la transposabilité clinique de ces membranes.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Mi M, Papakostidis C, Wu X, Giannoudis PV. Mixed results with the Masquelet technique: A fact or a myth? *Injury*. févr 2020;51(2):132-5.
2. Mathieu L, Durand M, Collombet JM, de Rousiers A, de l'Escalopier N, Masquelet AC. Induced membrane technique: a critical literature analysis and proposal for a failure classification scheme. *Eur J Trauma Emerg Surg*. oct 2021;47(5):1373-80.
3. Alford AI, Nicolaou D, Hake M, McBride-Gagyi S. Masquelet's induced membrane technique: Review of current concepts and future directions. *Journal of Orthopaedic Research*. 2021;39(4):707-18.
4. Wang X, Luo F, Huang K, Xie Z. Induced membrane technique for the treatment of bone defects due to post-traumatic osteomyelitis. *Bone Joint Res*. mars 2016;5(3):101-5.
5. Klein C, Gindraux F, Masquelet AC, Mentaverri R, Gouron R. Questions about Using the Induced Membrane Technique to Manage Cases of Congenital Tibial Pseudarthrosis. *Cells*. 24 juill 2023;12(14):1918.
6. Boskey AL, Villarreal-Ramirez E. Intrinsically disordered proteins and biomineralization. *Matrix Biol*. 2016;52-54:43-59.
7. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest*. 1 oct 1983;72(4):1396-409.
8. Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KSE. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 août 2014;111(33):12097-102.
9. Yang G, Zhu L, Hou N, Lan Y, Wu XM, Zhou B, et al. Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell Res*. oct 2014;24(10):1266-9.
10. Mizuhashi K, Ono W, Matsushita Y, Sakagami N, Takahashi A, Saunders TL, et al. Resting zone of the growth plate houses a unique class of skeletal stem cells. *Nature*. nov 2018;563(7730):254-8.
11. Ono N, Balani DH, Kronenberg HM. Stem and progenitor cells in skeletal development. *Curr Top Dev Biol*. 2019;133:1-24.
12. Seike M, Omatsu Y, Watanabe H, Kondoh G, Nagasawa T. Stem cell niche-specific Ebf3 maintains the bone marrow cavity. *Genes Dev*. 1 mars 2018;32(5-6):359-72.
13. Greecic D, Pejda S, Matthews BG, Repic D, Wang L, Li H, et al. In vivo fate mapping identifies mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells*. févr 2012;30(2):187-96.
14. Matic I, Matthews BG, Wang X, Dymont NA, Worthley DL, Rowe DW, et al. Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells*. déc 2016;34(12):2930-42.

15. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 1 nov 2014;561:3-12.
16. O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone.* juin 2013;54(2):258-63.
17. Duncan CP, Shim SS. J. Edouard Samson Address: the autonomic nerve supply of bone. An experimental study of the intraosseous adrenergic nervi vasorum in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br.* août 1977;59(3):323-30.
18. Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocr Rev.* nov 1986;7(4):379-408.
19. Parfitt AM. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1982;4(1):1-6.
20. Chapurlat RD, Confavreux CB. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology (Oxford).* oct 2016;55(10):1714-25.
21. Das Gesetz der Transformation der Knochen [Internet]. 2010 [cité 29 déc 2024]. Disponible sur: <https://www.isbn.de/buch/9783868056488/das-gesetz-der-transformation-der-knochen>
22. Fratzl P, Gupta HS, Paschalis EP, Roschger P. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nanocomposite in bone. *J Mater Chem.* 14 juill 2004;14(14):2115-23.
23. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.* mars 1998;20(2):92-102.
24. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone.* 1993;14(4):595-608.
25. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* sept 2007;38 Suppl 4:S3-6.
26. Jagodzinski M, Krettek C. Effect of mechanical stability on fracture healing--an update. *Injury.* mars 2007;38 Suppl 1:S3-10.
27. White AA, Panjabi MM, Southwick WO. Effects of compression and cyclical loading on fracture healing--a quantitative biomechanical study. *J Biomech.* 1977;10(4):233-9.
28. Yamagiwa H, Endo N. [Bone fracture and the healing mechanisms. Histological aspect of fracture healing. Primary and secondary healing]. *Clin Calcium.* mai 2009;19(5):627-33.
29. Perren SM. Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin Orthop Relat Res.* 1979;(138):175-96.
30. Kwiatkowski TC, Hanley EN, Ramp WK. Cigarette smoking and its orthopedic consequences. *Am J Orthop (Belle Mead NJ).* sept 1996;25(9):590-7.

31. Perumal V, Roberts CS. (ii) Factors contributing to non-union of fractures. *Current Orthopaedics*. août 2007;21(4):258-61.
32. Judet PR, Patel A. Muscle pedicle bone grafting of long bones by osteoperiosteal decortication. *Clin Orthop Relat Res*. sept 1972;87:74-80.
33. Guyver P, Wakeling C, Naik K, Norton M. Judet osteoperiosteal decortication for treatment of non-union: the Cornwall experience. *Injury*. juill 2012;43(7):1187-92.
34. Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret JP, Chavassieux P, et al. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J Mater Sci Mater Med*. déc 2003;14(12):1089-97.
35. Delloye C. Tissue allografts and health risks. *Acta Orthop Belg*. 1994;60 Suppl 1:62-7.
36. Eastlund T. Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation. *Cell Tissue Bank*. 2006;7(3):147-66.
37. Schubert T, Bigaré E, Van Isacker T, Gigi J, Delloye C, Cornu O. Analysis of predisposing factors for contamination of bone and tendon allografts. *Cell Tissue Bank*. août 2012;13(3):421-9.
38. Ireland L, Spelman D. Bacterial contamination of tissue allografts - experiences of the donor tissue bank of Victoria. *Cell Tissue Bank*. 2005;6(3):181-9.
39. Chappard D, Fressonnet C, Genty C, Baslé MF, Rebel A. Fat in bone xenografts: importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials*. juin 1993;14(7):507-12.
40. Les substituts de l'os, du cartilage et du ménisque en 2011 - SOFROT [Internet]. [cité 12 janv 2025]. Disponible sur: <https://www.decite.fr/livres/les-substituts-de-l-os-du-cartilage-et-du-menisque-en-2011-9782878941418.html>
41. Verboket RD, Söhling N, Heilani M, Fremdling C, Schaible A, Schröder K, et al. The Induced Membrane Technique-The Filling Matters: Evaluation of Different Forms of Membrane Filling with and without Bone Marrow Mononuclear Cells (BMC) in Large Femoral Bone Defects in Rats. *Biomedicines*. 10 mars 2022;10(3):642.
42. Wildemann B, Kadow-Romacker A, Haas NP, Schmidmaier G. Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations. *J Biomed Mater Res A*. mai 2007;81(2):437-42.
43. Bae HW, Zhao L, Kanim LEA, Wong P, Delamarter RB, Dawson EG. Intervariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine (Phila Pa 1976)*. 20 mai 2006;31(12):1299-306; discussion 1307-1308.
44. Bosemark P, Perdikouri C, Pelkonen M, Isaksson H, Tägil M. The masquelet induced membrane technique with BMP and a synthetic scaffold can heal a rat femoral critical size defect. *J Orthop Res*. 2015;33(4):488-95.
45. DeBaun MR, Stahl AM, Daoud AI, Pan CC, Bishop JA, Gardner MJ, et al. Preclinical

- induced membrane model to evaluate synthetic implants for healing critical bone defects without autograft. *J Orthop Res.* 2019;37(1):60-8.
46. Nau C, Simon S, Schaible A, Seebach C, Schröder K, Marzi I, et al. Influence of the induced membrane filled with syngeneic bone and regenerative cells on bone healing in a critical size defect model of the rat's femur. *Injury.* oct 2018;49(10):1721-31.
 47. Leiblein M, Kolb T, Christian L, Schröder K, Yaman C, Schaible A, et al. Introduction of a New Surgical Method to Improve Bone Healing in a Large Bone Defect by Replacement of the Induced Membrane by a Human Decellularized Dermis Repopulated with Bone Marrow Mononuclear Cells in Rat. *Materials (Basel).* 9 juin 2020;13(11):2629.
 48. Ginebra MP, Espanol M, Maazouz Y, Bergez V, Pastorino D. Bioceramics and bone healing. *EFORT Open Rev.* mai 2018;3(5):173-83.
 49. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials.* juin 2006;27(17):3230-7.
 50. Galois L, Mainard D. Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: an experimental study. *Acta Orthop Belg.* déc 2004;70(6):598-603.
 51. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med.* nov 2006;17(11):967-78.
 52. Ilizarov GA, Ledyayev VI. The replacement of long tubular bone defects by lengthening distraction osteotomy of one of the fragments. 1969. *Clin Orthop Relat Res.* juill 1992;(280):7-10.
 53. Allesina L, Alessio-Mazzola M, Belluati A, Mosca S, Placella G, Salini V. Surgical treatment of critical size bone defects with Masquelet technique versus bone transport: a systematic review and meta-analysis of comparative studies. *Arch Orthop Trauma Surg.* déc 2023;143(12):7081-96.
 54. Klaue K, Knothe U, Anton C, Pflugger DH, Stoddart M, Masquelet AC, et al. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep. *Injury.* nov 2009;40 Suppl 4:S95-102.
 55. Pelissier PH, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Research.* 2004;22(1):73-9.
 56. Gruber HE, Gettys FK, Montijo HE, Starman JS, Bayoumi E, Nelson KJ, et al. Genomewide molecular and biologic characterization of biomembrane formation adjacent to a methacrylate spacer in the rat femoral segmental defect model. *J Orthop Trauma.* mai 2013;27(5):290-7.
 57. Henrich D, Seebach C, Nau C, Basan S, Relja B, Wilhelm K, et al. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016;10(10):E382-96.
 58. Gouron R, Petit L, Boudot C, Six I, Brazier M, Kamel S, et al. Osteoclasts and their precursors are present in the induced-membrane during bone reconstruction using the

- Masquelet technique. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(2):382-9.
59. 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.* déc 2013;57(2):484-92.
 60. Niikura T, Jimbo N, Komatsu M, Oe K, Fukui T, Matsumoto T, et al. Histological analysis of induced membranes in patients whose bone defects were treated with the Masquelet technique to identify factors affecting the vascularity of induced membranes. *J Orthop Surg Res.* 13 avr 2021;16(1):248.
 61. Ferraro NM, Dampier W, Weingarten MS, Spiller KL. Deconvolution of heterogeneous wound tissue samples into relative macrophage phenotype composition via models based on gene expression. *Integr Biol (Camb).* 18 avr 2017;9(4):328-38.
 62. Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials.* oct 2011;32(28):6692-709.
 63. Kenneth Ward W. A review of the foreign-body response to subcutaneously-implanted devices: the role of macrophages and cytokines in biofouling and fibrosis. *J Diabetes Sci Technol.* sept 2008;2(5):768-77.
 64. Navegantes KC, de Souza Gomes R, Pereira PAT, Czaikoski PG, Azevedo CHM, Monteiro MC. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *Journal of Translational Medicine.* 15 févr 2017;15(1):36.
 65. Kelly B, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.* juill 2015;25(7):771-84.
 66. Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, Dienelt A, Wendler S, Schell H, et al. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone.* janv 2018;106:78-89.
 67. Carnicer-Lombarte A, Chen ST, Malliaras GG, Barone DG. Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:622524.
 68. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 28 mai 2010;32(5):593-604.
 69. Löffler J, Sass FA, Filter S, Rose A, Ellinghaus A, Duda GN, et al. Compromised Bone Healing in Aged Rats Is Associated With Impaired M2 Macrophage Function. *Front Immunol [Internet].* 18 oct 2019 [cité 30 déc 2024];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.02443/full>
 70. Mahon OR, Browe DC, Gonzalez-Fernandez T, Pitacco P, Whelan IT, Von Euw S, et al. Nano-particle mediated M2 macrophage polarization enhances bone formation and MSC osteogenesis in an IL-10 dependent manner. *Biomaterials.* mai 2020;239:119833.
 71. Nikovics K, Durand M, Castellarin C, Burger J, Sicherre E, Collombet JM, et al.

- Macrophages Characterization in an Injured Bone Tissue. *Biomedicines*. 11 juin 2022;10(6):1385.
72. Durand M, Oger M, Nikovics K, Venant J, Guillope AC, Jouve E, et al. Influence of the Immune Microenvironment Provided by Implanted Biomaterials on the Biological Properties of Masquelet-Induced Membranes in Rats: Metakaolin as an Alternative Spacer. *Biomedicines*. 23 nov 2022;10(12):3017.
 73. Kaneko Y, Minehara H, Sonobe T, Kameda T, Sekiguchi M, Matsushita T, et al. Differences in macrophage expression in induced membranes by fixation method - Masquelet technique using a mouse's femur critical-sized bone defect model. *Injury*. juin 2024;55(6):111135.
 74. Bertram JEA, Polevoy Y, Cullinane DM. Mechanics of Avian Fibrous Periosteum: Tensile and Adhesion Properties During Growth. *Bone*. 1 juin 1998;22(6):669-75.
 75. Yiannakopoulos CK, Kanellopoulos AD, Trovas GP, Dontas IA, Lyritis GP. The biomechanical capacity of the periosteum in intact long bones. *Arch Orthop Trauma Surg*. janv 2008;128(1):117-20.
 76. McBride SH, Evans SF, Tate MLK. Anisotropic Mechanical Properties of Ovine Femoral Periosteum and the Effects of Cryopreservation. *J Biomech*. 7 juill 2011;44(10):1954-9.
 77. Ellender G, Feik SA, Carach BJ. Periosteal structure and development in a rat caudal vertebra. *J Anat*. juin 1988;158:173-87.
 78. Foolen J, van Donkelaar C, Nowlan N, Murphy P, Huiskes R, Ito K. Collagen orientation in periosteum and perichondrium is aligned with preferential directions of tissue growth. *J Orthop Res*. sept 2008;26(9):1263-8.
 79. Allen MR, Burr DB. Human femoral neck has less cellular periosteum, and more mineralized periosteum, than femoral diaphyseal bone. *Bone*. févr 2005;36(2):311-6.
 80. Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone*. nov 2004;35(5):1003-12.
 81. Evans SF, Chang H, Knothe Tate ML. Elucidating multiscale periosteal mechanobiology: a key to unlocking the smart properties and regenerative capacity of the periosteum? *Tissue Eng Part B Rev*. avr 2013;19(2):147-59.
 82. Gaio N, Martino A, Toth Z, Watson JT, Nicolaou D, McBride-Gagyi S. Masquelet technique: The effect of altering implant material and topography on membrane matrix composition, mechanical and barrier properties in a rat defect model. *J Biomech*. 2018;72((Gaio N.; Martino A.; Toth Z.; Watson J.T.; Nicolaou D.; McBride-Gagyi S., Sara.McBrideGagyi@health.slu.edu) Department of Orthopaedic Surgery, Saint Louis University School of Medicine, 1402 S. Grand Blvd, Schwitalla Hall M176, St. Louis, MO, United States):53-62.
 83. Manon J, Evrard R, Maistriaux L, Fievé L, Heller U, Magnin D, et al. Periosteum and fascia lata: Are they so different? *Front Bioeng Biotechnol*. 19 oct 2022;10:944828.
 84. Morelli I, Drago L, George DA, Gallazzi E, Scarponi S, Romanò CL. Masquelet technique: myth or reality? A systematic review and meta-analysis. *Injury*. 1 déc 2016;47:S68-76.

85. Durand M, Barbier L, Mathieu L, Poyot T, Demoures T, Souraud JB, et al. Towards Understanding Therapeutic Failures in Masquelet Surgery: First Evidence that Defective Induced Membrane Properties are Associated with Clinical Failures. *J Clin Med.* 6 févr 2020;9(2):450.
86. Sun H, Godbout C, Hali K, Momic J, Schemitsch EH, Nauth A. The induced membrane technique in animal models: a systematic review. *OTA Int.* mars 2022;5(1 Suppl):e176.
87. Berner A, Woodruff MA, Lam CXF, Arafat MT, Saifzadeh S, Steck R, et al. Effects of scaffold architecture on cranial bone healing. *Int J Oral Maxillofac Surg.* avr 2014;43(4):506-13.
88. Wancket LM. Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Vet Pathol.* sept 2015;52(5):842-50.
89. Sagardoy T, Ehret C, Bareille R, Benoit J, Amedee J, De Mones E. Influence of External Beam Radiotherapy on the Properties of Polymethyl Methacrylate-Versus Silicone-Induced Membranes in a Bilateral Segmental Bone Defect in Rats. *Tissue Eng Part A.* 2018;24(9-10):703-10.
90. Bouyer M, Guillot R, Lavaud J, Plettinx C, Olivier C, Curry V, et al. Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration. *Biomaterials.* 1 oct 2016;104:168-81.
91. Oest ME, Dupont KM, Kong HJ, Mooney DJ, Guldberg RE. Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects. *J Orthop Res.* juill 2007;25(7):941-50.
92. Shen Z, Lin H, Chen G, Zhang Y, Li Z, Li D, et al. Comparison between the induced membrane technique and distraction osteogenesis in treating segmental bone defects: An experimental study in a rat model. *PLoS One.* 20 déc 2019;14(12):e0226839.
93. 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.* oct 2020;38(10):2120-30.
94. Zhang H, Li X, Li J, Zhong L, Chen X, Chen S. SDF-1 mediates mesenchymal stem cell recruitment and migration via the SDF-1/CXCR4 axis in bone defect. *J Bone Miner Metab.* mars 2021;39(2):126-38.
95. Verboket RD, Leiblein M, Janko M, Schaible A, Brune JC, Schröder K, et al. From two stages to one: acceleration of the induced membrane (Masquelet) technique using human acellular dermis for the treatment of non-infectious large bone defects. *Eur J Trauma Emerg Surg.* avr 2020;46(2):317-27.
96. Fenelon M, Etchebarne M, Siadous R, Grémare A, Durand M, Sentilhes L, et al. Comparison of amniotic membrane versus the induced membrane for bone regeneration in long bone segmental defects using calcium phosphate cement loaded with BMP-2. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* mai 2021;124:112032.
97. DeBaun MR, Salazar BP, Bai Y, Gardner MJ, Yang YP, Pan CC, et al. A bioactive synthetic membrane improves bone healing in a preclinical nonunion model. *Injury.*

2022;53(4):1368-74.

98. Bilal Ö, Topak D, Kınaş M, Kurutaş EB, Kızıldağ B, Bahar AY. Epidermal growth factor or platelet-rich plasma combined with induced membrane technique in the treatment of segmental femur defects: an experimental study. *J Orthop Surg Res.* 11 déc 2020;15(1):601.
99. Chu TMG, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL. Segmental Bone Regeneration Using a Load Bearing Biodegradable Carrier of Bone Morphogenetic Protein-2. *Biomaterials.* janv 2007;28(3):459-67.
100. Ziroglu N, Koluman A, Kaleci B, Tanriverdi B, Tanriverdi G, Kural A, et al. The antibiotics supplemented bone cement improved the masquelet's induced membrane in a rat femur critical size defect model. *Injury.* févr 2023;54(2):329-38.
101. Sun H, Godbout C, Ryan G, Hoit G, Higgins J, Schemitsch EH, et al. The induced membrane technique: Optimization of bone grafting in a rat model of segmental bone defect. *Injury.* juin 2022;53(6):1848-53.
102. Kammerer A, Hartmann FA, Nau C, Leiblein M, Schaible A, Neijhoft J, et al. The Impact of Defect Size on Bone Healing in Critical-Size Bone Defects Investigated on a Rat Femur Defect Model Comparing Two Treatment Methods. *Bioengineering (Basel).* 19 mars 2024;11(3):287.
103. Saab M, Drucbert AS, Blanchemain N, Chai F. Comparison of two plates and screw osteosynthesis configurations in a rat model of critical sized femoral defects to reduce implant related failures. *Sci Rep.* 22 janv 2025;15(1):2796.
104. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.* janv 2011;45(1):14-24.
105. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* févr 2010;16(1):123-45.
106. Kilborn SH, Trudel G, Uthoff H. Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemp Top Lab Anim Sci.* sept 2002;41(5):21-6.
107. Petite H. *Experimental Animal Models for Tissue-Engineered Bone Regeneration.* In: *Engineered Bone.* CRC Press; 2005.
108. Kaweblum M, Aguilar MDC, Blancas E, Kaweblum J, Lehman WB, Grant AD, et al. Histological and radiographic determination of the age of physal closure of the distal femur, proximal tibia, and proximal fibula of the New Zealand white rabbit. *Journal of Orthopaedic Research.* 1994;12(5):747-9.
109. Wang L, Fan H, Zhang ZY, Lou AJ, Pei GX, Jiang S, et al. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized β -tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* déc 2010;31(36):9452-61.
110. Wang X, Wei F, Luo F, Huang K, Xie Z. Induction of granulation tissue for the secretion

- of growth factors and the promotion of bone defect repair. *J Orthop Surg Res.* 17 sept 2015;10:147.
111. Cho JW, Kim BS, Yeo DH, Lim EJ, Sakong S, Lim J, et al. 3D-printed, bioactive ceramic scaffold with rhBMP-2 in treating critical femoral bone defects in rabbits using the induced membrane technique. *J Orthop Res.* déc 2021;39(12):2671-80.
 112. Chen S hui, Zheng L zhen, Xie X hui, Wang X luan, Lai Y xiao, Chen S kui, et al. Comparative study of poly (lactic-co-glycolic acid)/tricalcium phosphate scaffolds incorporated or coated with osteogenic growth factors for enhancement of bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Translation.* 1 avr 2014;2(2):91-104.
 113. Tarchala M, Engel V, Barralet J, Harvey EJ. A pilot study: Alternative biomaterials in critical sized bone defect treatment. *Injury.* mars 2018;49(3):523-31.
 114. Zhang N, Zhao D, Liu N, Wu Y, Yang J, Wang Y, et al. Assessment of the degradation rates and effectiveness of different coated Mg-Zn-Ca alloy scaffolds for in vivo repair of critical-size bone defects. *J Mater Sci: Mater Med.* 17 août 2018;29(9):138.
 115. Wang W, Nune KC, Tan L, Zhang N, Dong J, Yan J, et al. Bone regeneration of hollow tubular magnesium-strontium scaffolds in critical-size segmental defects: Effect of surface coatings. *Materials Science and Engineering: C.* 1 juill 2019;100:297-307.
 116. Xie J, Liu D, Wang H, Long H, Zhu Y, Hu Y, et al. Effects of topical mechanical stability on the formation of Masquelet membrane in a rabbit radial defect model. *Sci Rep.* 3 nov 2020;10(1):18939.
 117. Shibahara K, Hayashi K, Nakashima Y, Ishikawa K. Honeycomb Scaffold-Guided Bone Reconstruction of Critical-Sized Defects in Rabbit Ulnar Shafts. *ACS Appl Bio Mater.* 20 sept 2021;4(9):6821-31.
 118. El Backly RM, Chiapale D, Muraglia A, Tromba G, Ottonello C, Santolini F, et al. A Modified Rabbit Ulna Defect Model for Evaluating Periosteal Substitutes in Bone Engineering: A Pilot Study. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 6 janv 2015 [cité 25 janv 2025];2. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2014.00080/full>
 119. Eriksson E, Björkenheim R, Strömberg G, Ainola M, Uppstu P, Aalto-Setälä L, et al. S53P4 bioactive glass scaffolds induce BMP expression and integrative bone formation in a critical-sized diaphysis defect treated with a single-staged induced membrane technique. *Acta Biomater.* mai 2021;126:463-76.
 120. Gugala Z, Gogolewski S. Healing of critical-size segmental bone defects in the sheep tibiae using bioresorbable polylactide membranes. *Injury.* août 2002;33 Suppl 2:B71-76.
 121. Maissen O, Eckhardt C, Gogolewski S, Glatt M, Arvinte T, Steiner A, et al. Mechanical and radiological assessment of the influence of rhTGFbeta-3 on bone regeneration in a segmental defect in the ovine tibia: pilot study. *J Orthop Res.* août 2006;24(8):1670-8.
 122. Arıcan G, Özmeriç A, Fırat A, Kaymaz F, Ocak M, Çelik HH, et al. Micro-ct findings of concentrated growth factors (cgf) on bone healing in masquelet's technique-an experimental study in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg.* janv 2022;142(1):83-90.

123. Liu Z, Ge Y, Zhang L, Wang Y, Guo C, Feng K, et al. The effect of induced membranes combined with enhanced bone marrow and 3D PLA-HA on repairing long bone defects in vivo. *J Tissue Eng Regen Med.* oct 2020;14(10):1403-14.
124. Meng ZL, Wu ZQ, Shen BX, Li HB, Bian YY, Zeng DL, et al. Reconstruction of large segmental bone defects in rabbit using the Masquelet technique with α -calcium sulfate hemihydrate. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research.* 26 juin 2019;14(1):192.
125. Yılmaz O, Özmeriç A, Alemdaroğlu KB, Celepli P, Hücümenoğlu S, Şahin Ö. Effects of concentrated growth factors (CGF) on the quality of the induced membrane in Masquelet's technique - An experimental study in rabbits. *Injury.* août 2018;49(8):1497-503.
126. Cipitria A, Wagermaier W, Zaslansky P, Schell H, Reichert JC, Fratzl P, et al. BMP delivery complements the guiding effect of scaffold architecture without altering bone microstructure in critical-sized long bone defects: A multiscale analysis. *Acta Biomaterialia.* 1 sept 2015;23:282-94.
127. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology.* févr 1998;139(2):663-70.
128. Bonucci E, Ballanti P. Osteoporosis-bone remodeling and animal models. *Toxicol Pathol.* août 2014;42(6):957-69.
129. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschlegler ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials.* avr 2009;30(12):2149-63.
130. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng.* 1998;8(1):1-9.
131. Hu Y, Zhang C, Zhang S, Xiong Z, Xu J. Development of a porous poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite/collagen scaffold as a BMP delivery system and its use in healing canine segmental bone defect. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2003;67A(2):591-8.
132. Theyse LFH, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, van Doorn J, Dhert WJA, Hazewinkel H a. W. Growth hormone stimulates bone healing in a critical-sized bone defect model. *Clin Orthop Relat Res.* mai 2006;446:259-67.
133. Cheng K, Peng Y, Diao J, Zhu H, Lu Q, Zhao N, et al. Personalizing β -TCP porous scaffolds to promote osteogenesis: a study of segmental femoral defects in beagle models. *Biomed Mater.* déc 2024;20(1):015023.
134. Haam DW, Bae CS, Kim JM, Hann SY, Yim CMR, Moon HS, et al. Reconstruction of Segmental Bone Defect in Canine Tibia Model Utilizing Bi-Phasic Scaffold: Pilot Study. *Int J Mol Sci.* 23 avr 2024;25(9):4604.
135. Mosekilde L, Kragstrup J, Richards A. Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs. *Calcif Tissue Int.* nov 1987;40(6):318-22.

136. Reichert JC, Cipitria A, Epari DR, Saifzadeh S, Krishnakanth P, Berner A, et al. A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones. *Sci Transl Med.* 4 juill 2012;4(141):141ra93.
137. An YH, Friedman RJ. Animal Selections in Orthopaedic Research. In: *Animal Models in Orthopaedic Research.* CRC Press; 1998.
138. Riegger C, Kröpil P, Jungbluth P, Lanzman RS, Miese FR, Hakimi AR, et al. Quantitative assessment of bone defect healing by multidetector CT in a pig model. *Skeletal Radiol.* mai 2012;41(5):531-7.
139. Leung KS, Siu WS, Cheung NM, Lui PY, Chow DH, James A, et al. Goats as an osteopenic animal model. *J Bone Miner Res.* déc 2001;16(12):2348-55.
140. Liu G, Zhao L, Zhang W, Cui L, Liu W, Cao Y. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med.* juin 2008;19(6):2367-76.
141. Luangphakdy V, Elizabeth Pluhar G, PiuZZi NS, D'Alleyrand JC, Carlson CS, Bechtold JE, et al. The Effect of Surgical Technique and Spacer Texture on Bone Regeneration: A Caprine Study Using the Masquelet Technique. *Clin Orthop Relat Res.* oct 2017;475(10):2575-85.
142. Qin L, Mak AT, Cheng CW, Hung LK, Chan KM. Histomorphological study on pattern of fluid movement in cortical bone in goats. *Anat Rec.* 1 août 1999;255(4):380-7.
143. Turner AS. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater.* 22 juin 2001;1:66-81.
144. Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone.* avr 1995;16(4 Suppl):277S-284S.
145. Eitel F, Klapp F, Jacobson W, Schweiberer L. Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology. *Arch Orthop Trauma Surg* (1978). 1981;99(1):59-64.
146. Liebschner MAK. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials.* avr 2004;25(9):1697-714.
147. Nafei A, Danielsen CC, Linde F, Hvid I. Properties of growing trabecular ovine bone. Part I: mechanical and physical properties. *J Bone Joint Surg Br.* août 2000;82(6):910-20.
148. Sparks DS, Saifzadeh S, Savi FM, Dlaska CE, Berner A, Henkel J, et al. A preclinical large-animal model for the assessment of critical-size load-bearing bone defect reconstruction. *Nat Protoc.* mars 2020;15(3):877-924.
149. Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials.* mars 2006;27(9):1817-23.
150. Reichert JC, Wullschleger ME, Cipitria A, Lienau J, Cheng TK, Schütz MA, et al.

- Custom-made composite scaffolds for segmental defect repair in long bones. *Int Orthop*. août 2011;35(8):1229-36.
151. Cipitria A, Reichert JC, Epari DR, Saifzadeh S, Berner A, Schell H, et al. Polycaprolactone scaffold and reduced rhBMP-7 dose for the regeneration of critical-sized defects in sheep tibiae. *Biomaterials*. déc 2013;34(38):9960-8.
 152. Berner A, Reichert JC, Woodruff MA, Saifzadeh S, Morris AJ, Epari DR, et al. Autologous vs. allogenic mesenchymal progenitor cells for the reconstruction of critical sized segmental tibial bone defects in aged sheep. *Acta Biomater*. août 2013;9(8):7874-84.
 153. 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*. 2 déc 2014;9(12):e114122.
 154. Berner A, Henkel J, Woodruff MA, Steck R, Nerlich M, Schuetz MA, et al. Delayed minimally invasive injection of allogenic bone marrow stromal cell sheets regenerates large bone defects in an ovine preclinical animal model. *Stem Cells Transl Med*. mai 2015;4(5):503-12.
 155. Kirby GTS, White LJ, Steck R, Berner A, Bogoevski K, Qutachi O, et al. Microparticles for Sustained Growth Factor Delivery in the Regeneration of Critically-Sized Segmental Tibial Bone Defects. *Materials (Basel)*. 31 mars 2016;9(4):259.
 156. Lutton C, Sugiyama S, Wullschlegler ME, Williams R, Campbell JH, Crawford R, et al. Transplanted abdominal granulation tissue induced bone formation--an in vivo study in sheep. *Connect Tissue Res*. 2009;50(4):256-62.
 157. Croker SL, Reed W, Donlon D. Comparative cortical bone thickness between the long bones of humans and five common non-human mammal taxa. *Forensic Sci Int*. mars 2016;260:104.e1-104.e17.
 158. Saab M, Zobrist C, Blanchemain N, Martel B, Chai F. Systematic literature review of in vivo rat femoral defect models using biomaterials to improve the induced membrane technique: a comprehensive analysis. *EFORT Open Rev*. 1 févr 2024;9(2):138-45.
 159. Tiyapatanaputi P, Rubery PT, Carmouche J, Schwarz EM, O'keefe RJ, Zhang X. A novel murine segmental femoral graft model. *J Orthop Res*. nov 2004;22(6):1254-60.
 160. Koefoed M, Ito H, Gromov K, Reynolds DG, Awad HA, Rubery PT, et al. Biological effects of rAAV-caAlk2 coating on structural allograft healing. *Mol Ther*. août 2005;12(2):212-8.
 161. Reynolds DG, Hock C, Shaikh S, Jacobson J, Zhang X, Rubery PT, et al. Micro-computed tomography prediction of biomechanical strength in murine structural bone grafts. *J Biomech*. 2007;40(14):3178-86.
 162. Yu H, Vandevord PJ, Gong W, Wu B, Song Z, Matthew HW, et al. Promotion of osteogenesis in tissue-engineered bone by pre-seeding endothelial progenitor cells-derived endothelial cells. *J Orthop Res*. août 2008;26(8):1147-52.
 163. Jacobson JA, Yanoso-Scholl L, Reynolds DG, Dadali T, Bradica G, Bukata S, et al.

- Teriparatide Therapy and Beta-Tricalcium Phosphate Enhance Scaffold Reconstruction of Mouse Femoral Defects. *Tissue Eng Part A*. févr 2011;17(3-4):389-98.
164. Reynolds DG, Takahata M, Lerner AL, O’Keefe RJ, Schwarz EM, Awad HA. Teriparatide Therapy Enhances Devitalized Femoral Allograft Osseointegration and Biomechanics in a Murine Model. *Bone*. 1 mars 2011;48(3):562-70.
165. Inzana JA, Olvera D, Fuller SM, Kelly JP, Graeve OA, Schwarz EM, et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 1 avr 2014;35(13):4026-34.
166. Wang W, Zuo R, Long H, Wang Y, Zhang Y, Sun C, et al. Advances in the Masquelet technique: Myeloid-derived suppressor cells promote angiogenesis in PMMA-induced membranes. *Acta Biomater*. mai 2020;108:223-36.
167. Gruber HE, Riley FE, Hoelscher GL, Bayoumi EM, Ingram JA, Ramp WK, et al. Osteogenic and chondrogenic potential of biomembrane cells from the PMMA-segmental defect rat model. *J Orthop Res*. août 2012;30(8):1198-212.
168. Nau C, Seebach C, Trumm A, Schaible A, Konradowitz K, Meier S, et al. Alteration of Masquelet’s induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat’s femur. *Injury*. févr 2016;47(2):325-34.
169. Shah SR, Smith BT, Tataro AM, Molina ER, Lee EJ, Piepergerdes TC, et al. Effects of Local Antibiotic Delivery from Porous Space Maintainers on Infection Clearance and Induction of an Osteogenic Membrane in an Infected Bone Defect. *Tissue Eng Part A*. févr 2017;23(3-4):91-100.
170. Gouron R, Petit L, Boudot C, Six I, Brazier M, Kamel S, et al. Osteoclasts and their precursors are present in the induced-membrane during bone reconstruction using the Masquelet technique. *J Tissue Eng Regen Med*. févr 2017;11(2):382-9.
171. Ma Y fei, Jiang N, Zhang X, Qin C he, Wang L, Hu Y jun, et al. Calcium sulfate induced versus PMMA-induced membrane in a critical-sized femoral defect in a rat model. *Sci Rep*. 12 janv 2018;8(1):637.
172. Tang Q, Jin H, Tong M, Zheng G, Xie Z, Tang S, et al. Inhibition of Dll4/Notch1 pathway promotes angiogenesis of Masquelet’s induced membrane in rats. *Exp Mol Med*. avr 2018;50(4):1-15.
173. Toth Z, Roi M, Evans E, Watson JT, Nicolaou D, McBride-Gagy S. Masquelet Technique: Effects of Spacer Material and Micro-topography on Factor Expression and Bone Regeneration. *Ann Biomed Eng*. 2019;47(1):174-89.
174. Roukoz S, El Khoury G, Saghini E, Saliba I, Khazzaka A, Rizkallah M. Does the induced membrane have antibacterial properties? An experimental rat model of a chronic infected nonunion. *Int Orthop*. févr 2020;44(2):391-8.
175. Li S, Li Y, Jiang Z, Hu C, Gao Y, Zhou Q. Efficacy of total flavonoids of *Rhizoma drynariae* on the blood vessels and the bone graft in the induced membrane. *Phytomedicine*. 1 mai 2022;99:153995.

176. Mathieu L, Murison JC, de Rousiers A, de l'Escalopier N, Lutomski D, Collombet JM, et al. The Masquelet Technique: Can Disposable Polypropylene Syringes be an Alternative to Standard PMMA Spacers? A Rat Bone Defect Model. *Clin Orthop Relat Res.* 1 déc 2021;479(12):2737-51.
177. Leiblein M, Winkenbach A, Koch E, Schaible A, Büchner H, Marzi I, et al. Impact of scaffold granule size use in Masquelet technique on periosteal reaction: a study in rat femur critical size bone defect model. *Eur J Trauma Emerg Surg.* févr 2022;48(1):679-87.
178. Kokubo S, Fujimoto R, Yokota S, Fukushima S, Nozaki K, Takahashi K, et al. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a novel biodegradable carrier in a rabbit ulnar defect model. *Biomaterials.* 1 avr 2003;24(9):1643-51.
179. Komaki H, Tanaka T, Chazono M, Kikuchi T. Repair of segmental bone defects in rabbit tibiae using a complex of β -tricalcium phosphate, type I collagen, and fibroblast growth factor-2. *Biomaterials.* 1 oct 2006;27(29):5118-26.
180. Galanis V, Fiska A, Kapetanakis S, Kazakos K, Demetriou T. Effect of platelet-rich plasma combined with demineralised bone matrix on bone healing in rabbit ulnar defects. *smedj.* sept 2017;58(9):551-6.
181. Maiti SK, Shivakumar MU, Mohan D, Kumar N, Singh KP. Mesenchymal Stem Cells of Different Origin-Seeded Bioceramic Construct in Regeneration of Bone Defect in Rabbit. *Tissue Eng Regen Med.* 1 août 2018;15(4):477-92.
182. Torbjörn M, Amela T, Andreas T, Stina E, Cecilia L, Caroline ÖM, et al. Guided bone tissue regeneration using a hollow calcium phosphate based implant in a critical size rabbit radius defect. *Biomed Mater.* mars 2021;16(3):035018.
183. Zalama E, Karrouf G, Rizk A, Salama B, Samy A. Does zinc oxide nanoparticles potentiate the regenerative effect of platelet-rich fibrin in healing of critical bone defect in rabbits? *BMC Vet Res.* 2 avr 2022;18(1):130.
184. Bloemers FW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Haarman HJTM. Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 15 août 2003;66(2):526-31.
185. Viateau V, Guillemin G, Calando Y, Logeart D, Oudina K, Sedel L, et al. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model. *Vet Surg.* juill 2006;35(5):445-52.
186. Viateau V, Guillemin G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res.* juin 2007;25(6):741-9.
187. Schneiders W, Reinstorf A, Biewener A, Serra A, Grass R, Kinscher M, et al. In vivo effects of modification of hydroxyapatite/collagen composites with and without chondroitin sulphate on bone remodeling in the sheep tibia. *J Orthop Res.* janv 2009;27(1):15-21.
188. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone

- regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*. mai 2010;31(13):3572-9.
189. Fernandes MBC, Guimarães JAM, Casado PL, Cavalcanti A dos S, Gonçalves NN, Ambrósio CE, et al. The effect of bone allografts combined with bone marrow stromal cells on the healing of segmental bone defects in a sheep model. *BMC Veterinary Research*. 5 févr 2014;10(1):36.
 190. Wieding J, Lindner T, Bergschmidt P, Bader R. Biomechanical stability of novel mechanically adapted open-porous titanium scaffolds in metatarsal bone defects of sheep. *Biomaterials*. avr 2015;46:35-47.
 191. Li JJ, Roohani-Esfahani SI, Dunstan CR, Quach T, Steck R, Saifzadeh S, et al. Efficacy of novel synthetic bone substitutes in the reconstruction of large segmental bone defects in sheep tibiae. *Biomed Mater*. févr 2016;11(1):015016.
 192. Pobloth AM, Schell H, Petersen A, Beierlein K, Kleber C, Schmidt-Bleek K, et al. Tubular open-porous β -tricalcium phosphate polycaprolactone scaffolds as guiding structure for segmental bone defect regeneration in a novel sheep model. *J Tissue Eng Regen Med*. avr 2018;12(4):897-911.
 193. Filardo G, Roffi A, Fey T, Fini M, Giavaresi G, Marcacci M, et al. Vegetable hierarchical structures as template for bone regeneration: New bio-ceramization process for the development of a bone scaffold applied to an experimental sheep model. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2020;108(3):600-11.
 194. Li JJ, Dunstan CR, Entezari A, Li Q, Steck R, Saifzadeh S, et al. A Novel Bone Substitute with High Bioactivity, Strength, and Porosity for Repairing Large and Load-Bearing Bone Defects. *Adv Healthc Mater*. avr 2019;8(8):e1801298.
 195. Herten M, Zilkens C, Thorey F, Tassemeier T, Lensing-Höhn S, Fischer JC, et al. Biomechanical Stability and Osteogenesis in a Tibial Bone Defect Treated by Autologous Ovine Cord Blood Cells—A Pilot Study. *Molecules*. 15 janv 2019;24(2):295.
 196. Garot C, Schoffit S, Monfoulet C, Machillot P, Deroy C, Roques S, et al. 3D-Printed Osteoinductive Polymeric Scaffolds with Optimized Architecture to Repair a Sheep Metatarsal Critical-Size Bone Defect. *Adv Healthc Mater*. déc 2023;12(30):e2301692.
 197. Masquelet AC. The induced membrane technique. *Orthop Traumatol Surg Res*. sept 2020;106(5):785-7.
 198. Jiang S, Duan G, Zussman E, Greiner A, Agarwal S. Highly Flexible and Tough Concentric Triaxial Polystyrene Fibers. *ACS Appl Mater Interfaces*. 23 avr 2014;6(8):5918-23.
 199. Zhu Q, Li X, Fan Z, Xu Y, Niu H, Li C, et al. Biomimetic polyurethane/TiO₂ nanocomposite scaffolds capable of promoting biomineralization and mesenchymal stem cell proliferation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 1 avr 2018;85:79-87.
 200. Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol*. sept 1972;54(3):626-37.

201. Riesle J, Hollander AP, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Collagen in tissue-engineered cartilage: types, structure, and crosslinks. *J Cell Biochem.* 1 déc 1998;71(3):313-27.
202. Xu W, Gao X, Zhang M, Jiang Z, Xu X, Huang L, et al. Electrospun polycaprolactone-chitosan nanofibers on a zinc mesh as biodegradable guided bone-regeneration membranes with enhanced mechanical, antibacterial, and osteogenic properties for alveolar bone-repair applications. *Acta Biomater.* 1 oct 2024;187:434-50.
203. Deng X, Yu C, Zhang X, Tang X, Guo Q, Fu M, et al. A chitosan-coated PCL/nano-hydroxyapatite aerogel integrated with a nanofiber membrane for providing antibacterial activity and guiding bone regeneration. *Nanoscale.* 23 mai 2024;16(20):9861-74.
204. Wu X, Ni S, Dai T, Li J, Shao F, Liu C, et al. Biom mineralized tetramethylpyrazine-loaded PCL/gelatin nanofibrous membrane promotes vascularization and bone regeneration of rat cranium defects. *Journal of Nanobiotechnology.* 14 nov 2023;21(1):423.
205. Yu YH, Wu RC, Lee D, Chen CK, Liu SJ. Artificial Membrane Induced by Novel Biodegradable Nanofibers in the Masquelet Procedure for Treatment of Segmental Bone Defects. *Journal of Nanomaterials.* 2018;2018(1):8246571.
206. Hu X, He Y, Tong Y, Sun N, Ma G, Liu H, et al. Fabrication and characterization of a multi-functional GBR membrane of gelatin-chitosan for osteogenesis and angiogenesis. *Int J Biol Macromol.* mai 2024;266(Pt 2):130978.
207. Zhang X, Liu W, Liu J, Hu Y, Dai H. Poly- ϵ -caprolactone/Whitlockite Electrospun Bionic Membrane with an Osteogenic-Angiogenic Coupling Effect for Periosteal Regeneration. *ACS Biomater Sci Eng.* 12 juill 2021;7(7):3321-31.
208. Meng C, Liu X, Li J. Hierarchical porous PLLA/ACP fibrous membrane towards bone tissue scaffold. *J Mech Behav Biomed Mater.* avr 2024;152:106455.
209. Mahmoud AH, Han Y, Dal-Fabbro R, Daghery A, Xu J, Kaigler D, et al. Nanoscale β -TCP-Laden GelMA/PCL Composite Membrane for Guided Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 12 juill 2023;15(27):32121-35.
210. Yuan W, Xia D, Wu S, Zheng Y, Guan Z, Rau JV. A review on current research status of the surface modification of Zn-based biodegradable metals. *Bioactive Materials.* 1 janv 2022;7:192-216.
211. Zhang K, Hu H, Sun Y, Nan J, Liu W, Lei P, et al. The bio-functionalized membrane loaded with Ta/WH nanoparticles promote bone regeneration through neurovascular coupling. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 1 oct 2023;230:113506.
212. Tripathi G, Ho VH, Jung HI, Lee BT. Physico-mechanical and in-vivo evaluations of tri-layered alginate-gelatin/polycaprolactone-gelatin- β -TCP membranes for guided bone regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed.* janv 2023;34(1):18-34.
213. Wang B, Xie X, Jiang W, Zhan Y, Zhang Y, Guo Y, et al. Osteoinductive micro-nano guided bone regeneration membrane for in situ bone defect repair. *Stem Cell Research & Therapy.* 7 mai 2024;15(1):135.

214. Elkhoully H, Mamdouh W, El-Korashy DI. Electrospun nano-fibrous bilayer scaffold prepared from polycaprolactone/gelatin and bioactive glass for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 28 août 2021;32(9):111.
215. Zhang C, Wang J, Xie Y, Wang L, Yang L, Yu J, et al. Development of FGF-2-loaded electrospun waterborne polyurethane fibrous membranes for bone regeneration. *Regen Biomater.* 1 févr 2021;8(1):rbaa046.
216. Tetteh G, Khan AS, Delaine-Smith RM, Reilly GC, Rehman IU. Electrospun polyurethane/hydroxyapatite bioactive scaffolds for bone tissue engineering: the role of solvent and hydroxyapatite particles. *J Mech Behav Biomed Mater.* nov 2014;39:95-110.
217. Mi HY, Palumbo S, Jing X, Turng LS, Li WJ, Peng XF. Thermoplastic polyurethane/hydroxyapatite electrospun scaffolds for bone tissue engineering: effects of polymer properties and particle size. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* oct 2014;102(7):1434-44.
218. Ura DP, Karbowniczek JE, Szewczyk PK, Metwally S, Kopyściański M, Stachewicz U. Cell Integration with Electrospun PMMA Nanofibers, Microfibers, Ribbons, and Films: A Microscopy Study. *Bioengineering (Basel).* 9 mai 2019;6(2):41.
219. Son SR, Linh NTB, Yang HM, Lee BT. In vitro and in vivo evaluation of electrospun PCL/PMMA fibrous scaffolds for bone regeneration. *Sci Technol Adv Mater.* févr 2013;14(1):015009.
220. Álvarez-Carrasco F, Varela P, Sarabia-Vallejos MA, García-Herrera C, Saavedra M, Zapata PA, et al. Development of Bioactive Hybrid Poly(lactic acid)/Poly(methyl methacrylate) (PLA/PMMA) Electrospun Fibers Functionalized with Bioglass Nanoparticles for Bone Tissue Engineering Applications. *IJMS.* 21 juin 2024;25(13):6843.
221. Zaszczynska A, Kołbuk D, Gradys A, Sajkiewicz P. Development of Poly(methyl methacrylate)/nano-hydroxyapatite (PMMA/nHA) Nanofibers for Tissue Engineering Regeneration Using an Electrospinning Technique. *Polymers.* 16 févr 2024;16(4):531.
222. Garcia P, Histing T, Holstein JH, Klein M, Laschke MW, Matthys R, et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *Eur Cell Mater.* 16 juill 2013;26:1-12; discussion 12-14.
223. Klein C, Monet M, Barbier V, Vanlaeys A, Masquelet AC, Gouron R, et al. The Masquelet technique: Current concepts, animal models, and perspectives. *J Tissue Eng Regen Med.* sept 2020;14(9):1349-59.
224. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain.* 29 juill 2011;7:55.
225. Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals (Basel).* 30 sept 2019;9(10):754.
226. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* juill 2012;9(7):671-5.

227. Shekaran A, García JR, Clark AY, Kavanaugh TE, Lin AS, Guldberg RE, et al. Bone regeneration using an alpha 2 beta 1 integrin-specific hydrogel as a BMP-2 delivery vehicle. *Biomaterials*. juill 2014;35(21):5453-61.
228. Gueorguiev B, Lenz M. Why and how do locking plates fail? *Injury*. juin 2018;49 Suppl 1:S56-60.
229. Aquilina P, Parr WCH, Chamoli U, Wroe S, Clausen P. A Biomechanical Comparison of Three 1.5-mm Plate and Screw Configurations and a Single 2.0-mm Plate for Internal Fixation of a Mandibular Condylar Fracture. *Craniofac Trauma Reconstr*. sept 2014;7(3):218-23.
230. Watrous GK, Moens NMM, Runciman J, Gibson TWG. Biomechanical Properties of the 1.5 mm Locking Compression Plate: Comparison with the 1.5 and 2.0 mm Straight Plates in Compression and Torsion. *Vet Comp Orthop Traumatol*. nov 2018;31(6):438-44.
231. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. janv 1990;1(1):60-8.
232. Lindsey RW, Gugala Z, Milne E, Sun M, Gannon FH, Latta LL. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res*. juill 2006;24(7):1438-53.
233. Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (I): Comparative anatomical study on rats' femur. *Biomed Tech (Berl)*. avr 2005;50(4):107-10.
234. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, et al. Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res*. sept 2009;27(9):1152-6.
235. Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res*. mai 2005;23(3):639-45.
236. Aurégan JC, Bégué T, Rigoulot G, Glorion C, Pannier S. Success rate and risk factors of failure of the induced membrane technique in children: a systematic review. *Injury*. déc 2016;47 Suppl 6:S62-7.
237. Choufani C, Demoures T, de l'Escalopier N, Chapon MP, Barbier O, Mathieu L. Application of the Masquelet technique in austere environments: experience from a French forward surgical unit deployed in Chad. *Eur J Trauma Emerg Surg*. févr 2022;48(1):593-9.
238. Mathieu L, Tossou-Odjo L, de l'Escalopier N, Demoures T, Baus A, Brachet M, et al. Induced membrane technique with sequential internal fixation: use of a reinforced spacer for reconstruction of infected bone defects. *Int Orthop*. sept 2020;44(9):1647-53.
239. Siboni R, Joseph E, Blasco L, Barbe C, Bajolet O, Diallo S, et al. Management of septic non-union of the tibia by the induced membrane technique. What factors could improve results? *Orthop Traumatol Surg Res*. oct 2018;104(6):911-5.
240. Wu JH, Bao QW, Wang SK, Zhou PY, Xu SG. Mechanisms of the Masquelet technique

- to promote bone defect repair and its influencing factors. *Chin J Traumatol.* 25 avr 2024;S1008-1275(24)00054-3.
241. Han Z, Bhavsar M, Leppik L, Oliveira KMC, Barker JH. Histological Scoring Method to Assess Bone Healing in Critical Size Bone Defect Models. *Tissue Engineering Part C: Methods.* mai 2018;24(5):272-9.
 242. Riestler O, Borgolte M, Csuk R, Deigner HP. Challenges in Bone Tissue Regeneration: Stem Cell Therapy, Biofunctionality and Antimicrobial Properties of Novel Materials and Its Evolution. *Int J Mol Sci.* 27 déc 2020;22(1):192.
 243. Pereira HF, Cengiz IF, Silva FS, Reis RL, Oliveira JM. Scaffolds and coatings for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med.* 2 mars 2020;31(3):27.
 244. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials.* 1 oct 2018;180:143-62.
 245. Yin S, Zhang W, Zhang Z, Jiang X. Recent Advances in Scaffold Design and Material for Vascularized Tissue-Engineered Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater.* mai 2019;8(10):e1801433.
 246. Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Fabrication of uniaxially aligned 3D electrospun scaffolds for neural regeneration. *Biomed Mater.* avr 2011;6(2):025004.
 247. Shin SH, Purevdorj O, Castano O, Planell JA, Kim HW. A short review: Recent advances in electrospinning for bone tissue regeneration. *J Tissue Eng [Internet].* 4 avr 2012 [cité 15 août 2019];3(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3324843/>
 248. Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* sept 2015;23 Suppl:S53-82.
 249. Schepers EJ, Ducheyne P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J Oral Rehabil.* mars 1997;24(3):171-81.
 250. Wang Z, Lu B, Chen L, Chang J. Evaluation of an osteostimulative putty in the sheep spine. *J Mater Sci Mater Med.* janv 2011;22(1):185-91.
 251. Chen QZ, Thompson ID, Boccaccini AR. 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* avr 2006;27(11):2414-25.
 252. Sola A, Bellucci D, Raucci MG, Zeppetelli S, Ambrosio L, Cannillo V. Heat treatment of Na₂O-CaO-P₂O₅-SiO₂ bioactive glasses: densification processes and postsintering bioactivity. *J Biomed Mater Res A.* févr 2012;100(2):305-22.
 253. Kim HW, Lee HH, Knowles JC. Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 1 déc 2006;79(3):643-9.
 254. Kim HW, Lee HH, Chun GS. Bioactivity and osteoblast responses of novel biomedical

- nanocomposites of bioactive glass nanofiber filled poly(lactic acid). *J Biomed Mater Res A*. 1 juin 2008;85(3):651-63.
255. Song JH, Kim HE, Kim HW. Electrospun fibrous web of collagen-apatite precipitated nanocomposite for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. août 2008;19(8):2925-32.
256. Chou YC, Lee D, Chang TM, Hsu YH, Yu YH, Chan EC, et al. Combination of a biodegradable three-dimensional (3D) – printed cage for mechanical support and nanofibrous membranes for sustainable release of antimicrobial agents for treating the femoral metaphyseal comminuted fracture. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 1 août 2017;72:209-18.
257. Ghosh A, Orasugh JT, Ray SS, Chattopadhyay D. Integration of 3D Printing-Coelectrospinning: Concept Shifting in Biomedical Applications. *ACS Omega*. 8 août 2023;8(31):28002-25.
258. Liu X, Chen M, Luo J, Zhao H, Zhou X, Gu Q, et al. Immunopolarization-regulated 3D printed-electrospun fibrous scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 1 sept 2021;276:121037.
259. Bouyer M, Garot C, Machillot P, Vollaire J, Fitzpatrick V, Morand S, et al. 3D-printed scaffold combined to 2D osteoinductive coatings to repair a critical-size mandibular bone defect. *Materials Today Bio*. 1 juin 2021;11:100113.

ANNEXES

Annexe 1 : Publication acceptée Arthroscopy (Abstract)

doi: 10.1016/j.arthro.2022.05.011.

Systematic Review

Osteoinductive Bone Morphogenic Protein, Collagen Scaffold, Calcium Phosphate Cement, and Magnesium-Based Fixation Enhance Anterior Cruciate Ligament Tendon Graft to Bone Healing In Animal Models: A Systematic Review



Marc Saab, M.D., Feng Hildebrand, Ph.D., Bernard Martel, Ph.D., and
Nicolas Blanchemain, Ph.D.

Purpose: To perform a systematic literature review to analyze the results of the in vivo animal models and strategies that use osteoinductive materials to enhance the tendon graft–bone interface for anterior cruciate ligament reconstruction (ACLR). **Methods:** Following the Preferred Reporting Items for Systemic Reviews and Meta-Analysis guidelines, the PubMed, Embase, and Web of Science databases were searched. The inclusion criteria were studies of in vivo animal models of ACLR using a material to enhance tendon graft–bone interface healing and reporting at least the histologic results at the interface, along with radiologic and biomechanical data. Studies without control group or with another tendon–bone healing model were excluded. Methodologic quality was assessed with the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments I guidelines. **Results:** Twenty-seven studies met the inclusion criteria. Rabbit was the main animal model of ACLR, along with sheep and dog models. ACLR procedures varied widely between studies. The main promising strategies and materials were wrapping the material around the graft, with a collagen scaffold loaded with an osteoinductive molecule (mostly bone morphogenetic proteins). The second strategy consisted of injecting the material at the tendon–bone interface; calcium phosphate cement or a derivative were the most used materials. Finally, using osteoinductive fixation devices was the third strategy; magnesium-based interference screws seemed to show most favorable results. **Conclusions:** The studies retained had major methodologic flaws that limit the scope of these conclusions. However, based on histologic, biomechanical, and radiologic analyses, the most promising materials were a collagen scaffold loaded with an osteoinductive molecule and wrapped around the graft, calcium phosphate cement injected in the bone tunnel, and a magnesium-based fixation device. **Clinical Relevance:** In vivo animal models have identified several promising strategies and materials to optimize the tendon–bone interface after ACLR, but standardized and reproducible assessments are needed before these strategies can be adopted clinically.



TRAUMA

Systematic literature review of *in vivo* rat femoral defect models using biomaterials to improve the induced membrane technique: a comprehensive analysis

Marc Saab^{1,2}, Cédric Zobrist³, Nicolas Blanchemain², Bernard Martel³ and Feng Chai²

¹CHU Lille, Orthopaedic and Traumatology Department, Hôpital Roger Salengro, Lille, France

²University of Lille, INSERM, CHU Lille, U1008 – Advanced Drug Delivery Systems and Biomaterials, Lille, France

³University of Lille, CNRS, INRAE, Centrale Lille, UMR 8207 – UMET – Unité Matériaux et Transformations, Lille, France

Correspondence should be addressed to M Saab Email marc.saab@outlook.com

- **Purpose:** The aim of this study was to conduct a systematic literature review analyzing the results of *in vivo* rat femoral defect models using biomaterials for improving the induced membrane technique (IMT).
- **Methods:** Following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses guidelines, the PubMed, Embase, and Web of Science databases were searched. Inclusion criteria were studies reporting results of the IMT in *in vivo* rat femoral critical-sized defect models using a biomaterial possibly combined with molecules. Methodologic quality was assessed with the Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments guidelines.
- **Results:** Twenty studies met the inclusion criteria. Femoral stabilization with plate and screws was the most frequent. Histologic, biomechanical, and/or radiologic analyses were performed. In two-stage strategies, the PMMA spacer could be associated with bioactive molecules to enhance IM growth factor expression and improve bone formation. Modulating the roughness of spacers could increase IM thickness and accelerate its formation. In one-stage strategies, human tissue-derived membranes combined with bone grafting achieved bone formation comparable to a standard IMT. All calcium phosphate grafts seemed to require a functionalization with growth factors or bone marrow mononuclear cells to improve outcomes compared with non-functionalized grafts.
- **Conclusion:** This systematic review described the main parameters of the *in vivo* rat femoral defect models using biomaterials to improve the induced membrane technique. Although the studies included had several methodological limitations that may limit the scope of these conclusions, one- and two-stage strategies reported promising results with biomaterials to improve the IMT.

Keywords: induced membrane technique; PMMA; calcium phosphate spacer; artificial membrane; polymers; human tissue-derived membranes; femoral defect; bone defect





OPEN **Comparison of two plates and screw osteosynthesis configurations in a rat model of critical sized femoral defects to reduce implant related failures**

Marc Saab^{1,2}, Anne-Sophie Drucbert², Nicolas Blanchemain² & Feng Chai²

This study aimed to compare the failure rates of two different sizes of plates and screws to stabilize critical-sized (7 mm) femoral defects in male Sprague–Dawley rats (aged 10 weeks). Femoral defects were stabilized with either a 4-hole plate (length 29 mm, thickness 1 mm, 10 rats, Group 1) and 4 cortical screws (diameter 2 mm) or with a 6-hole plate (length 30 mm, thickness 0.6 mm, 9 rats, Group 2) and 4 cortical screws (diameter 1.5 mm). A polymethylmethacrylate spacer was inserted into the defects to reproduce the first stage of the induced membrane technique. Radiographic evaluations, macroscopic and histologic assessments of the induced membranes were conducted at 1 week and 4 weeks. No implant failure occurred in Group 1 whereas in Group 2, 4/9 (44.4%) implant failures occurred during the follow-up ($p = 0.03$). On histomorphometry, cell density was higher in Group 1 (4996 ± 716 cells/mm²) than in Group 2 (3500 ± 728 cells/mm²) ($p = 0.0195$) but the membrane thickness in Group 1 (735 ± 44 μ m) was non-significantly lower than in Group 2 (979 ± 165 μ m) ($p = 0.4$). This study suggests that, in rat models of critical-sized femoral defects (7 mm) to study the induced membrane technique, fixation plates with a thickness of 1 mm and four screws (2 mm in diameter) provide stable fixation without implant failure. In contrast, thinner plates (< 1 mm) combined with screws of smaller diameter (1.5 mm) result in a high rate of implant failure.

Keywords Rat model, Femoral defects, Induced membrane technique, Masquelet technique

Annexe 4 : Financement Émergence (30 000 €)



**Direction de la Recherche
et de l'Innovation**

Lille, le 30 janvier 2024

Docteur Marc SAAB
Hôpital Roger Salengro
Service Orthopédie 1 -traumatologie

**Objet : Sélection des projets soumis à l'Appel à projets 2023
du Fonds hospitalier d'aide à l'émergence et à la structuration
des activités et équipes de recherche**

Brigitte COURTOIS
Directrice
03.20.44.67.37

Pr Dominique DEPLANQUE
Coordonnateur médical en
matière de recherche clinique
03.20.44.41.45

Benoît DERVAUX
Coordonnateur Innovation
03.20.44.69.59

recherche@chru-lille.fr

N/Réf. : BC/PT/BL

Affaire suivie par :
Pascal THYOT et Bernadette
LUCAS
Cellule Projets - Pôle Partenariats

Docteur,

Je vous remercie de votre proposition de projet intitulée « Evaluation in vivo de membranes de régénération osseuse dans les pertes de substances critiques des membres » soumise à l'appel à projets 2023 « Fonds hospitalier d'aide à l'émergence et à la structuration des activités et équipes de recherche ».

Les propositions ont été évaluées selon les critères figurant dans l'appel à projets et sélectionnées par le Comité d'évaluation présidé par le Professeur Frédéric GOTTRAND, Vice-Président du Directoire chargé de la Recherche, et composé de représentants de la communauté scientifique et médicale du CHU, membres du Cors² et de représentants de la Direction de la Recherche et de l'Innovation.

A la suite de la concertation en Directoire en date du 09 janvier 2024 et sur avis du Comité d'évaluation réuni le 05 octobre 2023, j'ai le plaisir de vous informer que votre projet a été retenu.

Il est par ailleurs rappelé au porteur de projet les dispositions suivantes :

- la mise en œuvre du projet doit intervenir dans un délai de 6 mois à compter de la présente notification ;
- les dépenses prévisionnelles doivent être conformes aux dispositions figurant dans l'appel à projets ;
- l'avancée du projet doit être fournie en temps voulu aux membres du Comité d'évaluation et de suivi ;

Je vous remercie, de votre collaboration et vous prie d'agréer, Docteur, l'assurance de mes salutations les meilleures.

Frédéric GOTTRAND
Vice-Président Recherche du Directoire

Brigitte COURTOIS

Copie à : Professeur Frédéric GOTTRAND, Professeur Bernard CORTET, Madame Hélène AVISSE, Professeur Florence PASQUIER

Annexe 5 : Accord APAFIS


**MINISTÈRE
DE L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE**

*Liberté
Égalité
Fraternité*

Service de la performance, du financement et de la contractualisation avec les organismes de recherche

Département des pratiques de recherche réglementées

Cellule Animaux utilisés à des Fins Scientifiques - AFIS

Affaire suivie par : V. Delassault et V. Gomez

Tél : 01 55 55 97 27 / 77 58

Mél : autorisation-projet@recherche.gouv.fr

1, rue Descartes
75231 Paris SP 05

**Direction générale
de la recherche et de l'innovation**

Paris, le 4 avril 2024

Autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

1. référencé sous le numéro APAFIS #46969-2024030917477513 v3
2. ayant pour titre : Evaluation in vivo de membranes de régénération osseuse dans les pertes de substances critiques des membres
3. déposé par l'établissement utilisateur : Plateforme de ressources expérimentales, campus hospitalo-universitaire, Université de Lille - Droit et Santé, numéro d'agrément F5935010, dont le responsable est Monsieur Régis BORDET
4. et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale et de la conformité à l'autorisation est assurée par : Monsieur Marc SAAB, Madame FENG CHAI,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'établissement, pour une durée de 5 ans à compter de la présente notification.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le comité d'éthique en expérimentation animale n°075 et a reçu un avis favorable.

Ce projet fera l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective. Il vous appartiendra de prendre contact directement avec le comité d'éthique.

Ce projet comprend une **dérogation relative aux conditions d'hébergement et d'entretien** des animaux (article R.214-95). Les responsables de sa mise en œuvre doivent solliciter un avis de la structure en charge du bien-être des animaux pour **optimiser l'enrichissement de leur hébergement**.

Pour la ministre et par délégation
le chef du département des pratiques
de recherche réglementées



Laurent PINON

Annexe 6 : Résumé et abstract grand public

Résumé :

Développement de membranes artificielles pour favoriser la guérison des os endommagés

Les pertes osseuses causées par un traumatisme, une infection ou un cancer peuvent être difficiles à soigner, en particulier lorsqu'il s'agit de grosses lésions. Cette étude se concentre sur la création de membranes artificielles afin d'améliorer la greffe osseuse et d'accélérer la guérison des os. Nous avons conçu ces membranes spéciales grâce à une technique appelée *electrospinning*, en utilisant du polyuréthane et du polyméthylméthacrylate. Ces membranes ont été testées sur des modèles animaux pour comparer leur efficacité avec une méthode traditionnelle en deux étapes. Les résultats ont montré qu'une procédure en une seule étape avec ces membranes artificielles permettait une guérison osseuse plus rapide et de meilleure qualité, sans avoir besoin de passer par deux étapes. Cette innovation pourrait rendre les traitements plus simples et aider les patients à récupérer plus rapidement. Des recherches futures viseront à améliorer encore ces membranes pour un usage médical.

Abstract:

Development of artificial membranes to help heal severe bone defects

Bone defects caused by injury or disease can be challenging to treat, especially when the damage is extensive. This research focuses on developing artificial membranes to improve bone grafting and speed up the healing process. We created these special membranes, using a technique called *electrospinning*, made from polyurethane and polymethyl methacrylate. These membranes were tested on animals to compare their effectiveness with a standard two-step procedure. The results showed that using artificial membranes in a single-step procedure could lead to quicker and better bone healing over time, without the need of a 2-stage procedure. This innovation could simplify treatments and help patients recover more quickly from severe bone defects. Future studies will look in ways to further improve these membranes for use in medicine.

Nom : SAAB

Prénom : Marc

Date de Soutenance : 11/06/2025 à 14h00

Titre de la Thèse : Conception et évaluation *in vitro* et *in vivo* de membranes artificielles pour la chirurgie en un temps des pertes osseuses critiques des membres

Cadre de classement : Thèse d'Université – Lille - EGBSL

Spécialité : CNU 50-02 : Chirurgie Orthopédique et Traumatologique

Mots-clés : membrane induite ; régénération osseuse ; biomatériaux ; greffe osseuse ; membrane artificielle ; traumatologie osseuse

Introduction : La technique de la membrane induite (TMI), initiée par Masquelet *et al.*, est considérée comme la référence en traitement des défauts osseux critiques. Cependant, elle nécessite plusieurs interventions chirurgicales, ce qui peut entraîner des taux de succès variables et est associée à des complications, notamment la résorption osseuse. Les objectifs majeurs de cette thèse étaient de concevoir des membranes artificielles (MA) permettant une greffe osseuse en un seul temps d'un défaut critique de membre, d'éprouver un modèle *in vivo* d'étude des défauts osseux critiques par comparaison de deux modes d'ostéosynthèse des défauts. La fiabilité clinique et radiographique des modèles ainsi que les caractéristiques de la membrane induite après implantation *in vivo* ont été comparées. Ce modèle a ensuite permis de comparer la greffe osseuse du défaut par TMI en 2 temps et les MA. L'hypothèse principale était que ces MA autorisaient une greffe en un seul temps, avec un taux de consolidation radiologique égale ou même supérieur à une TMI.

Matériel et Méthode : Les MA étaient conçues par électrospinning du polyuréthane (PU) et/ou polyméthylméthacrylate (PMMA) et évaluées *in vitro*. Un modèle de défaut fémoral critique était réalisé sur des rats et 2 configurations d'ostéosyntheses étaient comparées par le biais d'analyses cliniques, radiographiques et histologiques. Puis, une greffe osseuse directe du défaut en un seul temps employant les MA était comparée à la TMI en 2 temps. Le critère de jugement principal était la comparaison de la consolidation radiologique à 8 et 12 semaines des défauts osseux entre le groupe contrôle et les groupes d'études (évaluation radiologique selon les scores de Guldberg et Lane-Sandhu, évaluation micro-scanographique selon le volume osseux (BV), volume de tissu (TV) et le ratio BV/TV).

Résultats : *In vitro*, le screening a permis d'isoler deux MA : une en PU à 100 % et l'autre à 50 % de PU/PMMA. Elles étaient constituées de nanofibres homogènes en microscopie électronique. Elles présentaient une surface hydrophobe (angle de contact moyen $110^\circ \pm 0,83^\circ$ et $130^\circ \pm 1,63^\circ$ respectivement, $p < 0,05$). Leur cytotoxicité était absente par méthode indirecte aux cellules MC3T3-E1 et HPMEC. Le modèle de défaut fémoral de rat validait la configuration d'ostéosynthèse par plaque de 1 mm d'épaisseur et 4 vis de 2 mm de diamètre. L'analyse *in vivo* de la consolidation radiographique à 8 semaines post-greffe retrouvait une consolidation supérieure des groupes d'études comparés au groupe contrôle sans différence statistiquement significative. Cette différence devenait significative à 12 semaines radiographiquement entre le groupe contrôle et le groupe MA en PU (score Guldberg $1,17 \pm 0,75$ et $1,89 \pm 0,33$, $p = 0,0276$; scores Lane-Sandhu $5,67 \pm 2,8$ et $9,3 \pm 0,5$, $p = 0,0193$) ainsi qu'à l'aide des analyses micro-CT : (BV : $185,2 \pm 26,5 \text{ mm}^3$ vs $147,3 \pm 54,9 \text{ mm}^3$, $p = 0,06$; TV : $284,8 \pm 48,3 \text{ mm}^3$ vs $212,4 \pm 90,7 \text{ mm}^3$, $p = 0,036$). Cependant, le ratio BV/TV était similaire entre les 2 groupes ($65,3 \pm 3,0$ vs $70,8 \pm 6,1$, $p = 0,22$).

Discussion et Conclusions : Les résultats principaux de cette thèse valident la conception de membranes artificielles électrofilées en PU \pm PMMA pour la greffe osseuse en un seul temps d'un défaut fémoral critique sur modèle préclinique de rat sans engendrer de résorption osseuse. Ils soulignent le potentiel de ces MA pour simplifier la réparation des défauts osseux, en réduisant la nécessité de requérir à de multiples interventions chirurgicales et en améliorant les résultats pour les patients. La fonctionnalisation de ces membranes permettrait une optimisation supplémentaire. Les travaux futurs devraient se concentrer sur l'optimisation de l'architecture des MA pour les rendre compatibles avec des modèles précliniques de plus grande taille de défauts osseux critiques, ouvrant la voie à des applications translationnelles en médecine humaine.

Composition du Jury :

Président : Pr Jean-Christophe FRICAIN

Assesseurs :

Pr Catherine PICART

Pr Céline KLEIN

Dr Florelle GINDRAUX

Pr Bernard MARTEL

Pr Nicolas BLANCHEMAIN

Dr Feng CHAI (Directrice)