

# Thèse de Doctorat

Lisa TERRANOVA

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université d'Angers  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire  
et de l'Université Catholique de Louvain*

**École doctorale :** *Biologie-Santé*

**Discipline :** *Biomolécules, pharmacologie, thérapeutiques  
Sciences biomédicales et pharmaceutiques*

**Spécialité :** *Biologie cellulaire*

**Unité de recherche :** *Groupe d'Etudes sur le Remodelage Osseux et les bioMatériaux (Angers)  
Pôle de Morphologie (UCL)*

**Soutenue le** 25/01/17

## Matrices tridimensionnelles pour la régénération osseuse

### JURY

**Rapporteurs :** **Martine COHEN-SOLAL**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Paris 7  
**Samir NAMOUR**, Professeur des Universités, Liège

**Examineurs :** **Véronique Préat**, Professeur, des Universités, Louvain-en-Woluwe  
**Véronique LARRETA-GARDE**, Professeur des Universités, Cergy-Pontoise  
**Franck BOURY**, Professeur des Universités, Angers  
**Pascal GUGGENBUHL**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Rennes

**Directeur de Thèse :** **Daniel CHAPPARD**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Angers

**Co-directeur de Thèse :** **Catherine BEHETS**, Professeur des Universités, Louvain-en-Woluwe

**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**  
**<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une thèse Nanofar, en cotutelle entre le laboratoire GEROM à l'université d'Angers (Groupe d'Etude sur le Remodelage Osseux et les bioMatériaux) et le laboratoire MORF (Pôle de Morphologie) à l'Université Catholique de Louvain. Ce travail a également été supporté par un des axes du labcom ANR NextBone.

NanoFar

European Doctorate in nanomedicine  
and pharmaceutical innovation



Education and Culture DG

ERASMUS MUNDUS



# REMERCIEMENTS

*A monsieur le Pr. Daniel Chappard*

Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de votre laboratoire. Vous avez toujours été disponible, n'hésitant pas à passer des heures pour faire le point sur mes travaux, partager vos connaissances scientifiques, et répondre à mes questions.

*A madame le Pr. Catherine Behets*

Je vous remercie profondément de m'avoir accueilli dans votre laboratoire pour ma dernière année de thèse. Vous avez partagé avec moi vos connaissances, répondu à mes interrogations. Vous avez toujours été là pour me rassurer et m'encourager dans les moments de doute.

*A madame le Pr. Martine Cohen-Solal et monsieur le Pr. Samir Namour*

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

*A monsieur le Pr. Frank Boury*

Je vous remercie de m'avoir permis de faire ma thèse au sein du programme Nanofar. Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté d'examiner mon travail.

*A madame le Pr. Véronique Larreta-Garde et monsieur le Pr. Pascal Guggenbuhl*

Je vous remercie profondément d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et d'avoir jugé mon travail lors des réunions de suivi. Merci encore d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

*A madame le Pr. Véronique Prétat, je vous remercie de présider mon jury de thèse.*

*A Hélène Libouban, je te remercie d'avoir partagé tes connaissances en culture cellulaire et pour le nanoCT.*

*A Romain Mallet, Guillaume Mabilieu, Florence Pascarretti, Rodolphe Perrot, je vous remercie vivement pour m'avoir apporté votre aide en microscopie et autres techniques d'analyses.*

*A Laurence Lechat, je te remercie pour ton aide. J'ai apprécié les conversations que nous avons pu avoir. Garde toujours ta bonne humeur.*

*A Chantal, d'avoir partagé plus qu'un bureau et pour notre amitié.*

*A Jérôme Duisit, je te remercie pour l'intérêt que tu as porté à ma thèse, d'avoir partagé ton expérience sur les biomatériaux et surtout pour l'expérimentation animale. Bonne chance pour la suite de ta thèse, tu fais un travail remarquable. Ça a été un plaisir de partager ton bureau ainsi qu'avec Adeline !*

*A Christine de Ville de Goyet et Marc de Bournonville, pour toutes les connaissances que vous avez partagées en histologie.*

*A Mickaël, Sébastien, Thomas, je vous remercie pour votre aide et vos conseils à l'animalerie et lors de mes premiers pas pour l'expérimentation animale.*

*A Bernard Caelen, pour ta bonne humeur et nos discussions.*

*A Michelle Cougnon et Walter Hudders, merci pour votre aide.*

*A Swann, tu as su me soutenir et me rassurer.*

*A Fanny, Julien, Anna, pour notre forte amitié, par-delà les frontières!*

*A ma famille, merci d'être là.*



# TABLE DES MATIERES

|                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>TABLE DES MATIERES .....</b>                             | <b>0</b>  |
| <b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>                         | <b>2</b>  |
| <b>TABLES DES ILLUSTRATIONS .....</b>                       | <b>4</b>  |
| <b>INTRODUCTION .....</b>                                   | <b>7</b>  |
| <b>1. Le tissu osseux.....</b>                              | <b>9</b>  |
| 1.1. Les différents types de cellules du tissu osseux ..... | 10        |
| 1.2. Le remodelage osseux.....                              | 13        |
| 1.3. Réparation spontanée .....                             | 14        |
| <b>2. Les biomatériaux.....</b>                             | <b>14</b> |
| 2.1 Les greffes osseuses biologiques.....                   | 16        |
| 2.2. Les biomatériaux synthétiques .....                    | 16        |
| <b>3. L'électrospinning.....</b>                            | <b>18</b> |
| <b>4. Le bêta tricalcium phosphate .....</b>                | <b>25</b> |
| <b>TRAVAUX PERSONNELS.....</b>                              | <b>29</b> |
| <b>ARTICLE 1 .....</b>                                      | <b>30</b> |
| <b>ARTICLE 2 .....</b>                                      | <b>39</b> |
| <b>ARTICLE 3 .....</b>                                      | <b>45</b> |
| <b>SYNTHESE ARTICLES 4 ET 5 .....</b>                       | <b>52</b> |
| <b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>            | <b>60</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>                    | <b>64</b> |

## LISTE DES ABREVIATIONS

|                                  |                                                                            |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b><math>\beta</math>-TCP</b>    | Bêta tricalcium phosphate                                                  |
| <b><math>\beta</math>-TCP-PS</b> | Fibres de PS enrichies avec du $\beta$ -TCP                                |
| <b>AlkP</b>                      | Phosphatase alcaline                                                       |
| <b>AuNPs</b>                     | Nanoparticules d'or                                                        |
| <b>Au-PS</b>                     | Fibres de PS enrichies avec des nanoparticules d'or                        |
| <b>BCP</b>                       | Biphasic calcium phosphate                                                 |
| <b>BMP</b>                       | Bone morphogenetic protein                                                 |
| <b>BMU</b>                       | Basic multicellular unit                                                   |
| <b>BSP</b>                       | Bone sialoprotein                                                          |
| <b>BSU</b>                       | Bone structure unit                                                        |
| <b>Ca/P</b>                      | Rapport phosphocalcique                                                    |
| <b>CSM</b>                       | Cellules souches mésenchymateuses                                          |
| <b>DMF</b>                       | N,N-diméthylformamide                                                      |
| <b>EDS</b>                       | Energy dispersive X-rays spectrometry                                      |
| <b>FGF</b>                       | Fibroblast Growth Factor                                                   |
| <b>FTIR</b>                      | Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier                          |
| <b>HA</b>                        | Hydroxyapatite                                                             |
| <b>hMSC</b>                      | human Mesenchymal Stem Cells                                               |
| <b>IGF</b>                       | Insulin-like Growth Factor                                                 |
| <b>M-CFS</b>                     | Macrophage-Colony Stimulating Factor                                       |
| <b>MEB</b>                       | Microscopie électronique à balayage                                        |
| <b>MEC</b>                       | Matrice extracellulaire                                                    |
| <b>MET</b>                       | Microscopie électronique à transmission                                    |
| <b>MicroCT</b>                   | Microtomographie computerisée                                              |
| <b>MSA</b>                       | Acide mercaptosuccinique                                                   |
| <b>NanoCT</b>                    | Nanocomputed tomography                                                    |
| <b>OPG</b>                       | Ostéoprotégérine                                                           |
| <b>OPN</b>                       | Ostéopontine                                                               |
| <b>PNC</b>                       | Protéine non-collagénique                                                  |
| <b>PS</b>                        | Polystyrène                                                                |
| <b>PTH</b>                       | Hormone parathyroïdienne                                                   |
| <b>RANK</b>                      | Récepteur Activateur de Nuclear transcription factor- $\kappa$ B           |
| <b>RANKL</b>                     | Ligand de Récepteur Activateur of Nuclear transcription factor- $\kappa$ B |
| <b>RGD</b>                       | Arginine-Glycine-Acide Aspartique                                          |
| <b>RX</b>                        | Rayons X                                                                   |

|                               |                                     |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| <b>TCP</b>                    | Tricalcium phosphate                |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | Transforming Growth Factor $\beta$  |
| <b>TRAcP</b>                  | Tartrate-resistant acid phosphatase |

# TABLES DES ILLUSTRATIONS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Composants de l'électrospinner : (A) schéma simplifié, (B) aiguille avec un jet de solution attiré vers le collecteur, (C) une membrane de polymère a été électrospinnée sous forme de bande autour du collecteur rotatif, (D) collecteur plat. ....                                                              | 20 |
| Figure 2 : Différentes phases du cône de Taylor, (A et B) forces viscoélastiques et tension de surface qui s'opposent à la déformation de la goutte, (C) étirement de la goutte, les forces dues au champ électrique surmontent la tension de surface de la solution (Elahi, Lu et al. 2013). ....                           | 21 |
| Figure 3 : Fibres de PS préparées à partir d'une concentration de 10% (w/v) dans le DMF, on peut noter la formation de « perles » au travers des fibres. ....                                                                                                                                                                | 24 |
| Figure 4 : Fibres de PS préparées à partir d'une solution de 30% (w/v) dans le DMF. ....                                                                                                                                                                                                                                     | 24 |
| Figure 5 : Synthèse de la poudre de $\beta$ -TCP, les réactifs de départ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et $\text{H}_3\text{PO}_4$ sont chauffés en présence d'ammoniaque (Document Kasios). ....                                                                                                                                | 26 |
| Figure 6 : A gauche : projection de la structure du $\beta$ -TCP (Yashima, Sakai et al. 2003), (a) unité hexagonale de $\beta$ -TCP, (b et c) configuration de $\text{CaO}$ et $\text{PO}_4$ ; à droite : structure cristalline rhomboédrique. ....                                                                          | 26 |
| Figure 7 : Coupe histologique d'os néoformé en contact direct avec la surface de $\beta$ -TCP (gris), on note la présence d'un alignement d'ostéoblastes (flèche). ....                                                                                                                                                      | 28 |
| Figure 8 : Variation du diamètre des fibres alignées de PS en fonction du débit de la solution (à gauche) et de la tension et la concentration de la solution (à droite). ....                                                                                                                                               | 34 |
| Figure 9 : Fibres de PS, (A) alignées et (B) aléatoires, colorées avec le Nile Red et observées en microscopie confocale. ....                                                                                                                                                                                               | 36 |
| Figure 10 : Culture de cellules MC3T3, (A) sur des fibres alignées et (B) sur des fibres aléatoires, observée après 28 jours en microscopie confocale après coloration des noyaux au DAPI. ....                                                                                                                              | 36 |
| Figure 11 : Différenciation de cellules MC3T3 sur les fibres de PS alignées de (A) 4,5 $\mu\text{m}$ et (B) 1,5 $\mu\text{m}$ et aléatoires de (C) 3,5 $\mu\text{m}$ et (D) 1 $\mu\text{m}$ . Les fibres ont été colorées avec le Nile Red, les noyaux avec le DAPI, et les nodules calcifiés avec la calcéine en vert. .... | 38 |
| Figure 12 : Création d'un défaut osseux dans l'os pariétal d'une souris grâce à une pièce à main, puis mise en place d'un disque de fibres de PS à la place du défaut. ....                                                                                                                                                  | 41 |
| Figure 13 : Défaut osseux dans l'os pariétal droit d'une souris, après implantation d'une membrane $\beta$ -TCP-PS et sacrifié après 6 semaines. (A) Reconstruction tridimensionnelle en microCT et tracé de la ROI puis (B) binarisation pour calculer l'os néoformé sous ImageJ. ....                                      | 42 |
| Figure 14 : Coupes histologiques de défauts greffés avec les membranes Au-PS après 9 semaines, colorées avec (A et B) le trichrome de Masson et (C et D) le rouge sirius, et analysées en lumière (C) transmise et (D) polarisée. Agrégats d'AuNPs (flèches), fibres de PS (têtes de flèche), os néoformé (NB). ....         | 43 |
| Figure 15 : Coupes histologiques de défauts greffés avec les membranes $\beta$ -TCP-PS après 9 semaines, colorées avec (A et B) le trichrome de Masson et (C and D) le rouge sirius, et analysées en lumière polarisée. Fibres de PS (flèches), os néoformé (NB). ....                                                       | 44 |

|                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 16 : Etapes de la préparation des granules de $\beta$ -TCP par la méthode des mousses de polyuréthane (Guillaume, Libouban et al. 2010).                                      | 47 |
| Figure 17 : Schéma simplifié du fonctionnement de la nanoCT.                                                                                                                         | 48 |
| Figure 18 : Vue de l'intérieur du nanoCT : la tige de verre avec le granule de $\beta$ -TCP est maintenue dans le mandrin, le tube cathodique est à droite et le détecteur à gauche. | 48 |
| Figure 19 : (A) Projection d'un granule de $\beta$ -TCP (collé sur une tige en verre) en nanoCT et (B) sa reconstruction 3D dans l'espace virtuel.                                   | 49 |
| Figure 20 : Copie d'écran du logiciel de reconstruction : (A, B, C) coupes bidimensionnelles des plans x, y et z et (D) la reconstruction tridimensionnelle correspondante.          | 50 |
| Figure 21 : Surface d'un granule de $\beta$ -TCP, on observe les grains élémentaires de $\beta$ -TCP frittés, sous forme de polygones et des micropores.                             | 51 |
| Figure 22 : Principe de l'algorithme de projection de vecteurs (Chappard and Stancu 2015).                                                                                           | 55 |
| Figure 23 : Reconstruction tridimensionnelle de l'empilement de granules de $\beta$ -TCP en microCT : (A) 10g et (B) 25g.                                                            | 55 |
| Figure 24 : Projections frontales des différents types de matériaux: (A) os haute densité, (B) os basse densité, (C) empilements de granules de 25g et (D) de granules de 12,5g.     | 56 |
| Figure 25 : Appareil de compression Instron, le poinçon écrase les granules empilés dans le support d'analyse.                                                                       | 57 |
| Figure 26 : A gauche, courbes de compression des différentes formulations de granules de $\beta$ -TCP. A droite, calcul de la raideur des différents granules.                       | 58 |

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

L'os est un tissu conjonctif hautement spécialisé, constitué de cellules dispersées dans une matrice extracellulaire abondante. Le tissu osseux se caractérise des autres tissus conjonctifs par la nature minérale de sa matrice extracellulaire, cette minéralisation confère à la matrice une rigidité permettant au squelette d'assurer une fonction mécanique en résistant aux contraintes physiques qui s'exercent sur l'organisme (forces musculaires, gravité). Le tissu osseux participe également au contrôle du métabolisme phosphocalcique en tant que réservoir en ions calcium et phosphate. De plus, il permet la protection des organes et abrite la moelle hématopoïétique. Le tissu osseux est une structure dynamique en perpétuel remaniement pour s'adapter aux contraintes et maintenir la masse osseuse constante. Cependant, il existe un certain nombre de cas pathologiques, comme les kystes osseux, l'exérèse de tumeurs osseuses ou l'absence de consolidation d'une fracture, qui peuvent entraîner une perte de substance importante. Les mécanismes de régénération peuvent être insuffisants voir absents pour de larges défauts osseux. La réparation doit être assistée, soit en stimulant la réparation naturelle soit en comblant le défaut osseux par des biomatériaux.

L'utilisation de matériaux débute loin derrière nous, avant la naissance de JC. Les Egyptiens ou les Hébreux, par exemple, essayaient déjà de combler les perforations dentaires avec des matières végétales (Fontaine, Amory et al. 2007). Des sutures vasculaires ont été effectuées par Galien chez les gladiateurs (Tremblay and Mantovani 2003) et les médecins chinois avaient mis au point des fils de sutures en soie. Mais la véritable avancée dans le domaine des matériaux est apparue dans les années 1960, quand Charnley, chirurgien orthopédiste, remplaça pour la première fois l'articulation de la hanche de patients par une prothèse (Charnley 1970). De nos jours, l'allongement de l'espérance de vie et la recherche d'une bonne qualité de vie ont conduit à un développement impressionnant des biomatériaux.

Dans le cas de pertes osseuses localisées dont la taille est trop importante pour engendrer une guérison spontanée, la reconstruction osseuse vise à restaurer le tissu osseux lésé grâce à des substituts. Il est nécessaire de produire un volume osseux en quantité. Les biomatériaux synthétiques sont développés pour répondre à cette demande. En site greffé, les biomatériaux doivent s'adapter à des processus biologiques et mécaniques complexes pour stimuler une réponse cellulaire idéale. Ils doivent donc mimer au mieux les caractéristiques du tissu osseux naturel pour favoriser sa régénération. La surface des matériaux peut être fonctionnalisée pour améliorer leur intégration.

Le travail présenté dans cette thèse porte sur l'étude de biomatériaux tridimensionnels et poreux pour la reconstruction osseuse. L'objectif est d'élaborer des biomatériaux biomimétiques à l'architecture contrôlée pour optimiser la réparation osseuse. Tout d'abord, des membranes fibreuses à base de polymère ont été développées par électrospinning. Nous avons ensuite cherché à fonctionnaliser les membranes avec une



céramique bioactive, le bêta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP). Par la suite, le  $\beta$ -TCP, sous la forme de granules, a également été précisément étudié. Différents types de membranes et de granules ont donc été analysés dans ce travail pour montrer l'influence de l'architecture des matériaux sur le comportement cellulaire et sur leur intégrité dans un environnement biologique.

La première partie de cette thèse rappelle l'organisation du tissu osseux et le processus de remodelage osseux. Nous nous sommes ensuite intéressés aux différents types de substituts osseux et aux conditions qu'ils doivent remplir. Les matériaux analysés dans cette thèse seront détaillés plus précisément.

La deuxième partie présentera les résultats sous la forme d'articles publiés.

Des matrices de fibres de polystyrène ont été développées par électrospinning. Elles ont été caractérisées par différentes méthodes d'imagerie et la dimension fractale a été calculée. La cytocompatibilité des membranes a été évaluée *in vitro*. Les membranes ont ensuite été enrichies avec des grains de  $\beta$ -TCP ou des nanoparticules d'or. La biocompatibilité et l'ostéoconduction ont été analysées *in vivo* en implantant les membranes dans un modèle de défaut osseux crânien chez la souris.

Pour finir, nous avons examiné l'architecture interne et externe de granules de  $\beta$ -TCP. Leur arrangement tridimensionnel a ensuite été analysé pour mieux optimiser leur utilisation en site greffé.

Enfin, la troisième partie exposera les conclusions et les perspectives de ce travail.



# 1. Le tissu osseux

Le squelette est composé d'environ 213 pièces osseuses mises en place chez l'embryon et le fœtus. Le tissu osseux qui apparaît en premier chez le fœtus est de type fibreux. On retrouve également l'os fibreux durant le processus de réparation osseuse faisant suite à une fracture, avant d'être remanié et remplacé par le tissu osseux lamellaire. On compte trois types de pièces squelettiques : les os longs (fémur, tibia, radius,...), les os courts (vertèbres) et les os plats (crâne, omoplates,...).

L'os cortical, relativement dense et uniforme (80% de la masse osseuse) se situe dans la diaphyse des os longs et dans les corticales des os plats. L'os cortical est constitué de la juxtaposition de structures cylindriques d'un diamètre de 200 à 300  $\mu\text{m}$  appelées systèmes de Havers ou ostéons, qui sont alignés dans l'axe de la diaphyse. Les ostéons sont constitués de fibrilles de collagène déposées en lamelles concentriques et parallèles ; au sein d'une lamelle les fibrilles forment des angles entre 0 et 90° avec les fibrilles des lamelles adjacentes, ce qui renforce la résistance mécanique (Marotti 1993). Entre les lamelles se situent les ostéoplastes qui renferment les ostéocytes. Les canaux de Havers (50 $\mu\text{m}$ ), contenant les vaisseaux sanguins et les nerfs, constituent la partie centrale des ostéons. Les vaisseaux sanguins empruntent les canaux de Havers et sont reliés entre eux par des canaux transversaux : les canaux de Volkmann. Les canaux représentent la macroporosité de l'os cortical associée à la microporosité du système lacuno-caniculaire.

L'os trabéculaire constitue les épiphyses et métaphyses des os longs, et la partie centrale des os plats et courts. C'est un tissu constitué de travées ramifiées et anastomosées entre lesquelles se trouvent les espaces médullaires contenant les vaisseaux sanguins et la moelle osseuse hématopoïétique. Les travées sont constituées de lamelles qui contiennent également les ostéocytes dans les ostéoplastes. L'architecture des travées est ajustée en présence des cellules, selon les forces qui s'exercent sur les os.

Le périoste est une membrane fibreuse qui constitue l'enveloppe externe des pièces squelettiques tandis que l'endoste représente la face interne des corticales et borde la cavité médullaire.

Le tissu osseux est composé d'une matrice extracellulaire (MEC), comprenant une phase organique protéique, une phase minérale, de l'eau (5 à 10%) et des cellules. La phase organique représente environ 25% de la matrice osseuse, elle est déposée sous forme de tissu ostéoïde par les ostéoblastes puis elle est minéralisée dans un second temps. La phase organique contient principalement des fibres de collagène de type I qui représente 90% des protéines de la matrice osseuse. La molécule de collagène I est une glycoprotéine fibreuse et rigide, qui est synthétisée par les cellules sous la forme d'un précurseur, le procollagène. Il est constitué de trois chaînes polypeptidiques (deux chaînes  $\alpha 1$  de type I et une chaîne  $\alpha 2$  de type I) associées en une triple hélice mesurant 300 nm de long et de 1.5 nm de diamètre. Chaque chaîne  $\alpha$  est composée d'un motif Gly-X-Y répété et de deux domaines globulaires terminaux, les propeptides N et C, situés aux extrémités. La position X est majoritairement occupée par la proline et la

lysine. Certains résidus proline et lysine sont hydroxylés par des hydroxylases en présence d'acide ascorbique sous la forme respective d'hydroxyproline et d'hydroxylysine. Les résidus d'hydroxylysines sont O-glycosylés. La présence des glycines permet l'association des trois chaînes  $\alpha$  en triple hélice, et les fonctions hydroxylées des hydroxyprolines forment des liaisons hydrogènes qui assurent sa stabilité. Les molécules de procollagène sont sécrétées hors de la cellule par exocytose. Leur relargage entraîne l'activation des peptidases qui vont cliver les propeptides N et C terminaux pour donner la molécule de collagène. L'assemblage des molécules de collagène en microfibrilles est stabilisé grâce à des liaisons croisées covalentes ou crosslinks entre les résidus lysine et hydroxylysine, sous l'action de la lysyl-oxydase, au niveau des télépeptides N et C (Van der Slot-Verhoeven, Van Dura et al. 2005). Les molécules de collagène sont associées avec un décalage de 67 nm, ce qui donne l'aspect de striation transverse des microfibrilles en microscopie (Saito and Marumo 2010). Le collagène confère à l'os son élasticité et sa résistance aux forces de traction et de torsion. Les microfibrilles alignées vont ensuite s'arranger en lamelles pour donner la texture lamellaire du tissu osseux.

La matrice collagénique ainsi formée est associée à des protéines non collagéniques (PNC), l'ostéocalcine, l'ostéonectine, l'ostéopontine, la bone sialoprotein (BSP), la thrombospondine, la fibronectine, et des protéoglycanes, ainsi qu'à des protéines plasmatiques et des facteurs de croissance. Les PNC sont synthétisées par les ostéoblastes principalement, mais aussi par certaines cellules de la moelle hématopoïétique. Le rôle des PNC n'est à ce jour pas encore totalement connu mais ces protéines participent à l'organisation macromoléculaire de la phase organique et aux relations entre les cellules et la matrice. Il semblerait également qu'elles jouent le rôle de régulateur de la formation de la phase minérale au sein des fibrilles de collagène.

La phase minérale est principalement composée de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) mais elle comporte également des carbonates, du magnésium, du fluor,... La minéralisation survient après la synthèse du tissu ostéoïde et s'organise autour des fibres de collagène : les cristaux d'hydroxyapatite sont disposés le long ou à l'intérieur des fibres de collagène, sous la forme de petites tablettes grossièrement hexagonales, denses aux électrons. Le nombre et la taille des cristaux vont continuer à croître. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  situés en surface des cristaux participent à des échanges rapides avec les liquides interstitiels et le sang, essentiels à l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme. La phase minérale apporte à l'os sa rigidité (Weiner, Traub et al. 1999)

## 1.1. Les différents types de cellules du tissu osseux

Les cellules osseuses trouvent leur origine principalement dans la moelle, qui produit deux grands types de cellules souches. Les cellules ostéoformatrices proviennent des cellules souches mésenchymateuses pluripotentes, essentiellement situées dans le stroma de la moelle osseuse mais également dans le périoste

(Owen and Friedenstein 1988). Les cellules ostéoclastiques dérivent des cellules souches hématopoïétiques (Suda, Takahashi et al. 1992), communes aux monocytes, aux granulocytes et aux cellules dendritiques. La différenciation ostéoblastique est sous le contrôle de multiples facteurs ; l'expression des facteurs de transcription Cbfa1/Runx2, ostérix (Otto, Thornell et al. 1997), et Msx2 (Dodig, Tadic et al. 1999) est essentielle pour la différenciation des cellules mésenchymateuses en précurseurs ostéoblastiques. Les pré-ostéoblastes sont des cellules de petite taille (10 à 20  $\mu\text{m}$ ) qui prolifèrent et commencent à exprimer des protéines comme le collagène I, la BSP, la phosphatase alcaline, l'ostéopontine, la fibronectine, et le TGF- $\beta$ . Le processus de différenciation ostéoblastique est en continu, avec le maintien de Cbfa1/Runx2, l'expression de Dlx5 et divers composants de la voie de signalisation Wnt. Dlx5 stimule l'expression de l'ostéocalcine (Ryoo, Hoffmann et al. 1997), protéine caractéristique de la différenciation terminale des ostéoblastes permettant la minéralisation de la MEC. La différenciation et le contrôle de la formation osseuse sont également régulés par des facteurs hormonaux (PTH, œstrogènes, glucocorticoïdes ou vitamine D) et des facteurs locaux (BMP, TGF- $\beta$ 1, IGF, FGF et la sclérostine). Ces derniers sont produits par les ostéoblastes et enfouis dans le tissu ostéoïde en formation pour être libérés lors de la résorption. Des PNC comme la fibronectine, l'ostéopontine sont également incorporées dans la matrice et permettent l'adhésion cellulaire.

Les ostéoblastes différenciés sont des cellules cubiques mononuclées de 20  $\mu\text{m}$ , disposées jointivement sur une surface osseuse corticale ou trabéculaire en voie de dépôt (Aubin 1998). Ces cellules matures sont polarisées : leur noyau est excentré au pôle non sécrétant de la cellule. La membrane plasmique des ostéoblastes se modifie au contact de l'os en développant des prolongements cytoplasmiques pouvant s'ancrer profondément entre les fibres de collagènes et le tissu ostéoïde. Les ostéoblastes communiquent entre eux et avec les ostéocytes proches de la surface grâce à des jonctions communicantes, les jonctions GAP. Chacune de ces jonctions crée un pore intercellulaire permettant le passage de signaux, de nutriments et de calcium. En fonction de l'activité de synthèse, les ostéoblastes peuvent présenter différents états métaboliques (Karsenty 2001).

Les ostéocytes proviennent de la différenciation terminale des ostéoblastes. Ils sont localisés et emmurés au sein des lacunes ostéocytaires ou ostéoplastes situées dans la matrice collagénique qui vient d'être déposée. Seulement 10% des ostéoblastes deviennent des ostéocytes qui représentent 90% des cellules du tissu osseux (Dallas and Bonewald 2010). Les ostéocytes sont reliés entre eux et aux cellules bordantes par de nombreux prolongements cytoplasmiques, qui se propagent à travers un réseau dense de canalicules. Ces prolongements permettent une communication entre les ostéocytes et les surfaces osseuses. De plus, ils augmentent la surface de contact des ostéocytes avec leur micro-environnement, ce qui les rend plus sensibles aux stimuli mécaniques et leur confère un rôle de mécano-récepteurs. Les stimuli mécaniques sont probablement transmis à l'ostéocyte via la variation de pression des fluides extracellulaires contenus dans ces canalicules. En effet, les ostéocytes participent de façon prépondérante à la réponse osseuse aux contraintes mécaniques (ex : micro-fracture) en maintenant un équilibre entre formation et résorption. Il semblerait aussi que l'apoptose des ostéocytes déclenche l'ancrage des



ostéoclastes sur les surfaces osseuses et ainsi la résorption. De plus, les ostéocytes expriment spécifiquement la sclérostine, qui est un inhibiteur de l'activité des ostéoblastes. Les ostéocytes sont probablement les cellules qui orientent dans l'espace l'activité des ostéoblastes, agencent et adaptent l'architecture osseuse afin de résister aux contraintes physiques soumises au tissu osseux (Webster, Schneider et al. 2013).

Les ostéoblastes peuvent progressivement s'aplatir et diminuer leur activité métabolique pour devenir des cellules bordantes (lining cells). Elles forment une couche cellulaire alignée le long des surfaces osseuses inactives (os quiescent). Les cellules bordantes ont un rôle important dans le cycle du remodelage osseux, elles constituent une réserve de cellules ostéoblastiques capables de se redifférencier en cellules ostéogéniques sous l'action de la PTH, par exemple. Enfin, elles jouent un rôle important dans la résorption osseuse car elles sont capables de se rétracter de la surface osseuse pour laisser place à une zone d'ancrage des ostéoclastes.

Les ostéoclastes matures sont des cellules géantes, d'environ 100  $\mu\text{m}$  de diamètre, multinucléés, ils contiennent jusqu'à 50 noyaux. L'ostéoclastogenèse est un processus contrôlé principalement par un système de trois facteurs : le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), le ligand RANKL du récepteur RANK (Receptor activator of nuclear factor  $\kappa\text{B}$  ligand), et l'OPG (ostéoprotégérine). RANKL est situé sur la membrane plasmique des ostéoblastes et des cellules stromales ou est libéré sous forme soluble par les ostéocytes. OPG, facteur soluble antagoniste de RANK, est sécrété par les ostéoblastes, les cellules stromales et les ostéocytes. Ces deux molécules sont en compétition pour se lier avec RANK, récepteur qui se trouve sur la membrane des précurseurs ostéoclastiques. Les ostéoblastes jouent un double rôle : RANKL stimule la différenciation en ostéoclastes tandis qu'OPG l'inhibe (Teitelbaum 2000). Le contact entre RANKL/RANK provoque la synthèse de M-CSF, un facteur de croissance. L'ostéoclastogenèse est initiée lorsque les cellules souches hématopoïétiques sont stimulées par M-CSF pour générer des cellules mononucléées circulantes qui vont proliférer. Ces cellules sont considérées comme les précurseurs des ostéoclastes (pré-ostéoclastes). Ces précurseurs sont attirés vers un site de résorption où ils vont fusionner entre eux et s'ancrer à la matrice osseuse pour se différencier en ostéoclastes immatures multinucléés, sous l'action continue de M-CSF et RANKL. L'ostéoclaste mature est une cellule polarisée. Au contact du tissu osseux, la membrane plasmique du pôle basal de la cellule est ondulée et constitue une zone plissée (ruffled border). La circonférence de celle-ci est ancrée à la matrice osseuse grâce aux intégrines  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  se liant à la vitronectine et l'ostéopontine, et  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  qui se fixe au collagène I, en formant un anneau d'actine. Ceci délimite un espace clos et hermétique, la chambre de résorption ou zone claire. Dans le compartiment intracytoplasmique, des ions  $\text{H}^+$  sont produits par l'activité d'une anhydrase carbonique de type II intracytoplasmique. Ils sont expulsés dans la chambre de résorption par une pompe à protons ATPasique à travers la bordure plissée pour permettre la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite, libérant ainsi la phase organique. L'acidification de ce compartiment provoque la libération par les ostéoclastes d'enzymes lysosomiales (métalloprotéases MMP-1, cathepsine K) pour dégrader le collagène en larges fragments. Les

fragments sont absorbés par endocytose et phagocytés. La TRAcP (tartrate-resistant acid phosphatase), une enzyme caractéristique de l'ostéoclaste, vient dégrader les fragments de collagène dans les phagosomes. Les produits de dégradation sont évacués par exocytose vers les espaces extracellulaires. La lacune de Howship correspond à la zone érodée, témoin de l'activité de résorption des ostéoclastes. Les facteurs circulants emprisonnés dans la matrice sont libérés dans le milieu extracellulaire pendant le processus de résorption et interviendront dans le remodelage.

## 1.2. Le remodelage osseux

Le remodelage permet à l'os de s'adapter aux contraintes extérieures, aux modifications métaboliques et hormonales en maintenant constant son équilibre phosphocalcique et la masse osseuse. Le remodelage met en scène une coopération cellulaire étroite entre les cellules ostéoformatrices et résorbantes au sein d'unités multicellulaires de remodelage (BMU, Basic multicellular unit) (Frost 1990).

Le cycle de remodelage osseux débute par une phase d'activation : les cellules bordantes sécrètent de la collagénase qui dissout la fine couche de collagène sur laquelle elles reposaient puis elles se rétractent afin de créer un accès pour les précurseurs ostéoclastiques, sous l'action de facteurs ostéorésorbants (PTH, vitamine D3, prostaglandine E2). Les facteurs ostéorésorbants augmentent la production de RANKL à la surface des cellules stromales et des ostéoblastes. En parallèle, ils diminuent la production d'OPG pour favoriser la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures. Au cours de la phase de résorption, les pré-ostéoclastes adhèrent à la surface osseuse et creusent des lacunes de Howship mesurant environ 40 µm de profondeur. Les ostéocytes pourraient interagir directement avec les cellules bordantes et les pré-ostéoclastes de la moelle osseuse via leur extensions cytoplasmiques afin d'activer le remodelage. L'augmentation de la quantité intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  provoque la dépolymérisation de l'anneau d'actine, ainsi les ostéoclastes se détachent et migrent. Des cellules mononucléées (macrophages) nettoient ensuite le fond de la lacune et meurent par apoptose. Cette étape est la phase d'inversion. Lors de la résorption de la matrice osseuse, les ostéoclastes libèrent des facteurs locaux: TGF- $\beta$ , IGF, BMP, précédemment sécrétés et enfouis dans la matrice sous forme inactive par les ostéoblastes. Ainsi, ces facteurs stimulent la différenciation des cellules stromales en ostéoblastes matures qui vont adhérer au site nouvellement érodé et commencer à former une nouvelle unité de structure osseuse (BSU, Bone Structural Unit). Le tissu ostéoïde est minéralisé grâce à la phosphatase alcaline sécrétée par les ostéoblastes, qui permet de concentrer localement les ions calcium et phosphate. Une fois la minéralisation achevée, les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes et tapissent la surface osseuse néoformée.

### 1.3. Réparation spontanée

Le tissu osseux est capable de se régénérer spontanément à la suite d'une fracture de taille limitée. Une fracture provoque une destruction tissulaire localisée et une rupture de la vascularisation, qui entraîne une hémorragie. Lors de la coagulation, un caillot se forme et les plaquettes attirent des macrophages et des granulocytes ; elles libèrent aussi des facteurs de croissance stimulant l'angiogenèse et les CSM. Les macrophages éliminent localement les débris cellulaires puis les ostéoclastes viennent éroder les surfaces osseuses du foyer de fracture. Les CSM vont former un tissu conjonctif néovascularisé, remplacé par la suite par un cal cartilagineux comblant le foyer de fracture. Parallèlement, les cellules ostéoprogénitrices prolifèrent et se différencient en ostéoblastes pour remplacer le cal cartilagineux par du tissu osseux, formant un cal osseux. Ce cal osseux est alors remanié par les ostéoclastes pour restaurer la continuité de l'os avant la fracture. Ce processus peut prendre de 6 à 12 semaines, selon le type d'os.

## 2. Les biomatériaux

La recherche sur les biomatériaux de comblement osseux a permis une grande avancée thérapeutique. Les projets focalisés sur les substituts osseux synthétiques sont très nombreux et concernent la chirurgie orthopédique, la neurochirurgie et la chirurgie maxillo-faciale. Une greffe osseuse consiste à combler un défaut osseux par un matériau de greffe d'origine biologique ou par un biomatériau d'origine naturel ou synthétique, en stimulant la cicatrisation osseuse et la revascularisation. Les biomatériaux permettent donc de recréer un volume osseux suffisant pour rétablir les fonctions du squelette et conserver son intégrité. Selon la définition des conférences de consensus de Chester (Williams 1987, Doherty, Williams et al. 1992), les biomatériaux sont décrits comme : « des matériaux non vivants, utilisés dans un dispositif médical et conçus pour interagir avec les systèmes biologiques pour évaluer, traiter ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps ». Les biomatériaux sont en contact intime avec les tissus et les fluides biologiques et sont soumis à de nombreuses contraintes (mécaniques, chimiques et biochimiques) ; ils doivent alors remplir un certain nombre de critères. La biocompatibilité est une caractéristique essentielle ; pendant longtemps, elle décrivait l'inertie d'un matériau, c'est-à-dire l'absence de réponse biologique de l'hôte. A présent, la biocompatibilité présume une réponse appropriée de l'hôte : elle est décrite comme la « capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique » (European Society for Biomaterials). La bioactivité est également une propriété majeure, elle définit l'interaction directe des biomatériaux avec les tissus biologiques, lorsque des réactions chimiques spécifiques se déroulent à l'interface implant-tissu hôte (exemple : la dégradation ou non par l'organisme). Enfin, la cytocompatibilité traduit le comportement cellulaire vis-à-vis des matériaux *in vitro*.



La régénération du tissu osseux grâce à des substituts nécessite qu'ils aient un cahier des charges bien défini, mais qui reste encore actuellement à compléter. Pour remplir au mieux leur rôle, les biomatériaux doivent mimer au plus près la MEC, qui est un « polymère » complexe (protéines fibreuses), pour procurer aux cellules un microenvironnement idéal leur permettant d'adhérer, de proliférer, de migrer et de se différencier. L'enjeu de la création d'un substitut osseux est de s'inspirer du vivant et de se rapprocher le plus possible de la nature, la texture, la structure, et la microarchitecture du tissu osseux. Les biomatériaux doivent être ostéoconducteurs, c'est-à-dire capables de recevoir la repousse osseuse, par invasion cellulaire et vasculaire à partir du tissu osseux hôte. Idéalement, pour favoriser le mécanisme de réparation osseuse, les biomatériaux devraient être en plus ostéoinducteurs, c'est-à-dire permettre le recrutement et l'activation des CSM de l'hôte pour se différencier en ostéoblastes. Ces propriétés doivent permettre l'ostéointégration des matériaux. Elle dépend des caractéristiques chimiques et physiques, de la composition, de l'état de surface et de l'architecture du matériau.

La porosité du matériau, à savoir la taille et l'interconnectivité des pores, influence fortement l'activité cellulaire et l'invasion vasculaire pour favoriser l'ostéoconduction. La porosité doit être contrôlée ; elle doit être suffisante pour permettre l'ostéoconduction tout en préservant les caractéristiques mécaniques du matériau et en garantissant son intégrité dans le site de greffe. En effet, un biomatériau doit présenter des propriétés mécaniques proches de celle de l'os en site greffé, notamment lorsque la charge du site est élevée, pour résister aux contraintes.

Les interactions entre la surface du biomatériau et les cellules osseuses jouent un rôle important dans la repousse osseuse. L'état de surface du biomatériau est directement impliqué dans l'adhésion cellulaire. Une fois le biomatériau implanté, les protéines contenues dans les fluides biologiques s'adsorbent à sa surface. Il s'établit un processus de reconnaissance moléculaire entre les intégrines portées par les cellules et une séquence Arg-Gly-Asp (RGD) portées par des protéines qui constituent la matrice (vitronectine, fibronectine). L'adhésion produit des signaux intracellulaires qui conduisent à une réorganisation du cytosquelette (étalement des cellules) et activent des facteurs qui régulent les gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation. Des états de surface rugueux augmentent le contact entre le biomatériau et les tissus avoisinants, et améliorent ainsi l'ostéointégration, par rapport à une surface lisse. Des études *in vivo* ont montré que la micro-rugosité de surface améliore la prolifération cellulaire et la différenciation des cellules en ostéoblastes matures (Buser, Schenk et al. 1991, Martin, Schwartz et al. 1995, Degasne, Basle et al. 1999). L'adhésion cellulaire sur un biomatériau dépend donc de sa nature physico-chimique ainsi que de son état de surface.

Il existe plusieurs types de matériaux de comblement osseux : les greffes osseuses biologiques et les biomatériaux naturels ou synthétiques. On estime que 2,2 millions de greffes osseuses sont réalisées chaque année dans le monde (Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005). Selon le domaine d'application, un large choix de matériaux est disponible ou en cours d'évaluation, avec différents paramètres tels que l'origine, la composition, l'architecture, la structure et les propriétés biomécaniques.



## 2.1 Les greffes osseuses biologiques

L'**autogreffe** consiste en un prélèvement de tissu osseux (os cortical et/ou trabéculaire) chez l'hôte lui-même, de la crête iliaque, du tibia, de la fibula, du menton ou des côtes. L'autogreffe est considérée comme le « gold standard » car elle réunit les conditions idéales. Elle est en effet biocompatible, ostéoconductrice et ostéoinductrice, grâce à la présence de cellules et autres facteurs ostéogéniques. Néanmoins, elle implique un second site chirurgical, ou site donneur, pouvant induire un risque d'infection, une morbidité et des douleurs chroniques.

L'**allogreffe** provient d'un donneur de même espèce et est disponible en plus grande quantité à partir de banque d'os, prélevée en général sur des rebuts chirurgicaux ou sur des cadavres. Cependant, les allogreffes présentent des limites dues au risque élevé de transmission virale, bactérienne et d'agents infectieux non conventionnels, ce qui nécessite des méthodes spécifiques de préparation et de conservation du greffon. Les greffons sont mis en quarantaine à -80°C (banque d'os) puis utilisés fraîchement congelés, lyophilisés, déminéralisés, ou encore irradiés par rayons gamma pour éliminer toutes les cellules vivantes. Ces techniques permettent d'éliminer les virus et bactéries, mais elles altèrent la qualité du greffon, et notamment les propriétés mécaniques, d'ostéoconduction, d'ostéoinduction.

Les **xénogreffes**, obtenues à partir d'autres espèces animales, représentent une alternative ; des greffons ont été préparés et commercialisés à partir d'os bovin, mais l'apparition de l'encéphalopathie bovine (transmission d'agent infectieux non conventionnels) a largement diminué l'utilisation de ces matériaux.

Pour pallier certaines difficultés de ces greffes biologiques, de nombreux matériaux de substituts osseux d'origine naturelle ou synthétique ont été développés.

## 2.2. Les biomatériaux synthétiques

Chaque catégorie de matériaux possède des propriétés spécifiques qui caractérisent la réponse aux sollicitations dans le site osseux.

**Les matériaux naturels** : le corail et la nacre sont les principaux matériaux d'origine naturelle utilisés comme substituts osseux. Ils sont biocompatibles et ostéoconducteurs, mais leurs propriétés mécaniques restent trop faibles pour une utilisation dans des sites en charge. Le corail, outre les considérations écologiques qui en font une ressource limitée, peut provoquer des réactions inflammatoires importantes.

Environ 60 % des substituts osseux contiennent des céramiques, qu'elles soient pures ou associées à d'autres matériaux. Les **biocéramiques** à base de phosphate de calcium, ou les **bioverres** sont des

matériaux inorganiques. Ils se présentent sous diverses formes : granules poreux, blocs poreux de différentes formes, lames denses, ciments injectables poreux ou pleins.

Les céramiques dérivent de l'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ ). Elles regroupent essentiellement l'hydroxyapatite (HA) -  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  -, les phosphates tricalciques (TCP) dont le  $\beta$ -TCP -  $Ca_3(PO_4)_2$  -, et les phosphates de calcium biphasés (BCP), qui sont des mélanges de HA et  $\beta$ -TCP en proportions variables. Les céramiques ont le grand avantage d'être biocompatibles, bioactives, ostéoconductrices et biodégradables, grâce à leur composition chimique similaire à celle de la phase minérale de l'os. L'hydroxyapatite synthétique appartient à la famille cristallographique des apatites et présente de très fortes similitudes avec l'HA naturel de l'os. Son rapport Ca/P équivaut à 1,67. Elle est très peu soluble et reste peu dégradée *in vivo*. Le  $\beta$ -TCP, dont le rapport Ca/P est voisin de 1,5 se présente sous la forme d'un cristal rhomboédrique. Sa résorption est beaucoup plus rapide que celle de l'HA *in vivo*. Cependant, le  $\beta$ -TCP est très friable et a une résistance limitée dans des sites en charge. L'association de l'HA avec le  $\beta$ -TCP pour composer les BCP permet de combiner les qualités mécaniques de l'HA et la meilleure résorption du  $\beta$ -TCP. Les propriétés des BCP dépendent donc de leur double composition. La résorption des céramiques est influencée par divers phénomènes : la biodégradation (altération physique influencée par la forme, la porosité et la cristallinité du matériau), la biodissolution (altération chimique influencée par la composition) et la biorésorption (acidification par l'activité cellulaire et phagocytaire) (Lu, Descamps et al. 2002).

Les bioverres sont majoritairement composés de silice. Néanmoins, ils sont susceptibles d'entraîner une haute concentration en silice dans l'organisme qui peut déclencher des maladies auto-immunes.

**Les polymères** : les polymères sont des macromolécules constituées d'unités fondamentales : les monomères. On distingue les polymères linéaires, ramifiés et réticulés, ainsi que les copolymères (d'autres monomères sont ajoutés durant la synthèse). Lors de la polymérisation, deux types de techniques très différentes sont utilisées. Lors de la polymérisation par étapes, la croissance de la chaîne se fait par une succession de réactions chimiques entre deux fonctions de n'importe quelles molécules (monomère, dimère, trimère, tétramère, ...). Toutes les molécules vont réagir, ainsi la concentration en monomère va diminuer rapidement dans le temps. La polycondensation et la polyaddition sont des types de polymérisations par étape. La polymérisation en chaîne permet de créer un centre actif initial unique (un radical, un ion, ou un complexe organométallique) formé par un initiateur. La chaîne croît par réaction successive de monomères avec la fonction chimique active qui se trouve en bout de chaîne. Les synthèses sont contrôlées pour obtenir une architecture, un poids moléculaire et des propriétés mécaniques du polymère désiré. Les polymères peuvent être d'origine naturelle (gélatine, collagène, acide hyaluronique) ou synthétique (PCL : poly (caprolactone), PLA : poly (acide lactique), PLGA : poly (acide lactique-co-acide glycolique), PMMA : poly (méthylméthacrylate)).

### 3. L'électrospinning

L'électrospinning est un procédé de fabrication reproductible de membranes de polymère composées de fibres de taille nano- et micrométrique. C'est une méthode en plein essor depuis une dizaine d'années dans différents secteurs (ingénierie tissulaire, filtration de liquide ou gaz...) alors qu'un premier brevet a été déposé en 1934 par Formhals (Formhals 1934).

Les membranes fibreuses électrofilées offrent le grand avantage de mimer la structure collagénique de la MEC. Elles présentent un rapport surface-volume important qui assure l'adhésion et la prolifération des cellules (Huang, Zhang et al. 2003, Kumbar, James et al. 2008). La porosité des membranes, ainsi que la taille des pores et l'interconnectivité entre les pores sont des paramètres qui influencent fortement l'activité cellulaire (Kumbar, James et al. 2008). Ils permettent l'infiltration des cellules et des facteurs de croissance, et favorise l'angiogenèse au sein de la membrane. La formation de vaisseaux sanguins dans un matériau implanté est essentielle à son intégration car ils doivent apporter aux cellules des nutriments et de l'oxygène (Rouwkema, Rivron et al. 2008). L'architecture d'un matériau peut profondément changer le taux de vascularisation. Des pores non interconnectés ou de taille trop faible, inhiberaient la migration cellulaire et la vascularisation (Yang, Leong et al. 2001, Karageorgiou and Kaplan 2005). Les pores des membranes sont définis comme les interstices entre les fibres. Il existe une relation entre la taille des pores des membranes et le diamètre des fibres (Eichhorn and Sampson 2005). L'augmentation du diamètre des fibres élargi les pores (Rnjak-Kovacina, Wise et al. 2011). Même si, historiquement, il a été établi que les membranes de nanofibres augmentaient l'adhésion et la prolifération cellulaire (Min, Lee et al. 2004, Mo, Xu et al. 2004), des études montrent maintenant l'intérêt de développer des membranes de microfibres pour garantir une meilleure ostéoconduction (Badami, Kreke et al. 2006, Balguid, Mol et al. 2008, Sisson, Zhang et al. 2010).

Des matrices fibreuses de polymères d'origine naturelle - le collagène (Shih, Chen et al. 2006), les fibres de soie (Jin, Chen et al. 2004), la chitine (Shin, Park et al. 2005) - ou synthétique - PCL (Yoshimoto, Shin et al. 2003, Kim, Yun et al. 2014), PLA (Badami, Kreke et al. 2006), PLGA ((Yu, Li et al. 2008) - peuvent être fabriquées en électrospinning. La surface des polymères synthétiques a l'avantage d'être modifiable facilement (Lim and Mao 2009). Elle peut être modifiée chimiquement ou physiquement (plasma) pour améliorer la biocompatibilité et l'ostéoconduction en site greffé. Pour la régénération osseuse, il est courant de recouvrir la surface des fibres avec des céramiques phosphocalcique comme l'hydroxyapatite (HA) ou le  $\beta$ -TCP. Les céramiques sont des matériaux inorganiques qui ont une forte capacité d'ostéoconduction car elles sont proches chimiquement de la phase minérale de l'os. L'ajout d'HA ou de  $\beta$ -TCP favoriserait la différenciation ostéoblastique des cellules comme il a été démontré *in vitro* (Wutticharoenmongkol, Pavasant et al. 2007, McCullen, Zhu et al. 2009, Lao, Wang et al. 2011) et *in vivo* (Montjovent, Mathieu et al. 2007, Shim, Moon et al. 2012).

### *Mode opératoire*

L'électrospinner est composé d'une seringue contenant la solution de polymère dont un débit constant est réglé par une pompe (Figure 1A). La solution de polymère est éjectée à l'extrémité d'une aiguille chargée positivement tandis que le collecteur qui reçoit le jet de solution est chargé négativement (Figure 1B). Un champ électrique à haute tension est appliqué entre l'aiguille et le collecteur. La surface de la goutte de polymère est ainsi chargée et subit des forces qui s'opposent : la force de Coulomb, liée à la force exercée par le champ électrostatique, d'une part et, d'autre part, les forces de résistance à la déformation, à savoir la force viscoélastique et à la tension de surface du fluide (Deitzel, Kleinmeyer et al. 2001). Une fois une tension critique atteinte, c'est-à-dire lorsque les forces électrostatiques extérieures surmontent les forces de tension de surface du fluide, les gouttes s'allongent et forment le cône de Taylor (Figure 2), d'où un jet liquide est éjecté et récolté sur le collecteur (Figures 1B et C). Durant le temps de vol entre l'aiguille et le collecteur, l'évaporation du solvant, qui doit être suffisamment volatile, permet de récolter sur le collecteur des fibres de polymères secs.



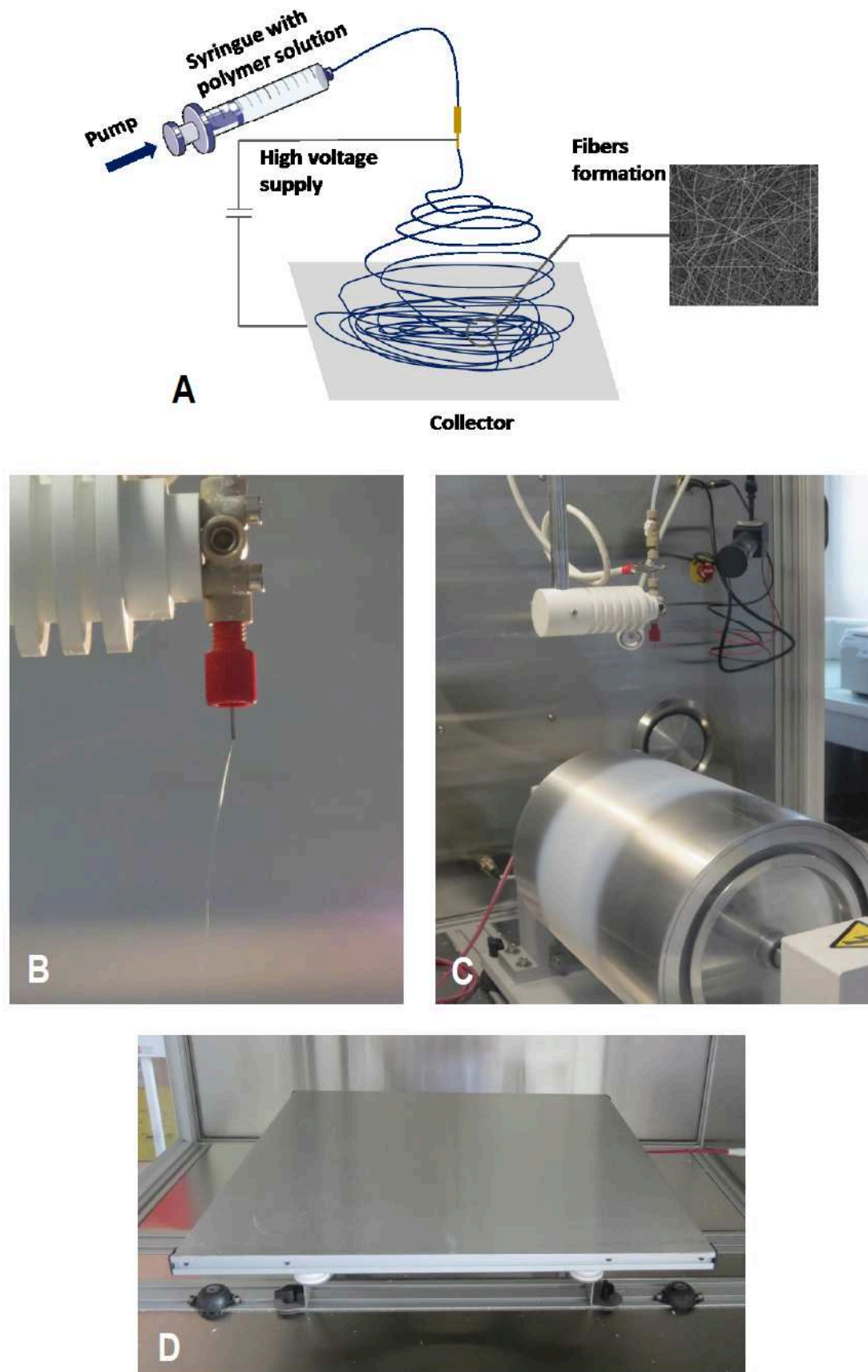


Figure 1 : Composants de l'électrospinner : (A) schéma simplifié, (B) aiguille avec un jet de solution attiré vers le collecteur, (C) une membrane de polymère a été électrospinnée sous forme de bande autour du collecteur rotatif, (D) collecteur plat.



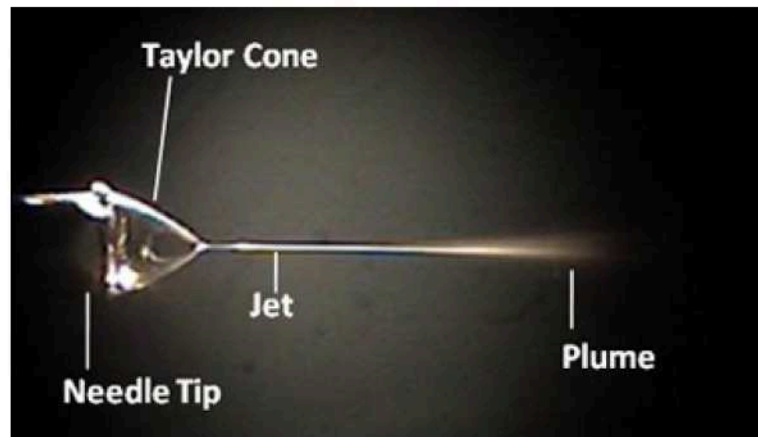
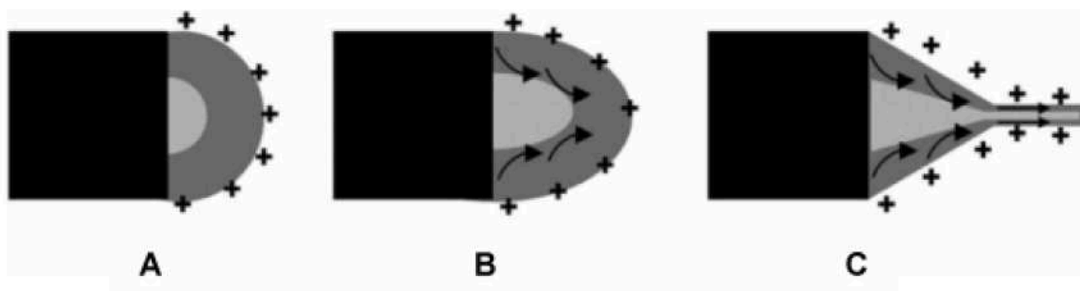


Figure 2 : Différentes phases du cône de Taylor, (A et B) forces viscoélastiques et tension de surface qui s'opposent à la déformation de la goutte, (C) étirement de la goutte, les forces dues au champ électrique surmontent la tension de surface de la solution (Elahi, Lu et al. 2013).

La morphologie des fibres, plus particulièrement leur taille et leur uniformité, dépendent de nombreux paramètres qui contrôlent le procédé d'électrospinning. Ces paramètres sont régis par différents types de forces (Jarusuwannapoom, Hongroijanawiwat et al. 2005), parmi lesquelles *les forces appliquées à la goutte de polymère chargée* :

- La **force de Coulomb**, responsable de l'étirement du jet jusqu'au collecteur de charge opposée.
- La **force électrostatique**, qui dépend de la charge appliquée et de la conductivité de la solution, et permet le transport du jet de solution chargé de l'aiguille jusqu'au collecteur.
- La **force viscoélastique**, dépendante du poids moléculaire du polymère, de la concentration et de la viscosité de la solution, elle empêche le jet chargé de s'étirer, la **tension de surface** agit également contre l'étirement de la surface du jet chargé.
- La **force gravitationnelle**, qui dépend de la densité de la solution.

*Les propriétés de la solution de polymère comprennent (Pham, Sharma et al. 2006):*

- Le **poids moléculaire** du polymère
- La **viscosité**, qui dépend de la **concentration en polymère**. C'est le déterminant le plus important de la taille et la morphologie des fibres ; si la concentration de la solution est trop faible, la formation de perles est observée (Figure 3). La présence de perles inhibe l'adhésion et la prolifération des cellules (Chen, Patra et al. 2007). Au contraire lorsque la concentration de la solution est suffisamment élevée, les fibres sont uniformes et leur diamètre plus élevé (Figure 4). La force viscoélastique augmente avec la viscosité, quand elle est élevée elle retient plus l'élongation du jet contre la force de Coulomb : les diamètres des fibres sont donc plus épais.
- La **conductivité** du solvant, permet aussi d'obtenir des fibres plus uniformes sans l'apparition de perles. La solution de polymère sera plus chargée avec une conductivité élevée, le jet de solution sera plus étiré
- La **tension surface**, le **moment dipolaire**, et la **constante diélectrique** du solvant : plus ces paramètres sont élevés, plus les fibres de polymère seront uniformes

Des variables contrôlées, intrinsèques à l'électrospinner, sont :

- Le **débit** de la solution : plus le débit imposé augmente, plus les fibres formées auront un diamètre important. Si le débit devient trop élevé, les fibres n'auront pas le temps de sécher par évaporation du solvant avant d'atteindre le collecteur et il y aura la formation de perles entre les fibres.
- Le **champ électrique**, le diamètre des fibres varient avec la tension appliquée à la solution (aiguille)
- La **distance** entre l'aiguille et le collecteur : une distance minimale est requise pour que les fibres aient le temps de sécher avant d'atteindre le collecteur
- Le **type de collecteur** : Le type de collecteur va moduler la disposition des fibres entre elles. Il existe plusieurs types de collecteurs différents. Dans ce travail, nous avons utilisé le collecteur rotatif qui, à haute vitesse de rotation (2400 rpm), forme des membranes de fibres alignées, et le collecteur plat qui permet la formation de fibres à disposition aléatoires (Figure 1D).

| Paramètres                                                   | Effets                                                  | Causes                                                   |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| ↑ Concentration de la solution                               | ↑ diamètre des fibres                                   | car ↑ la viscosité                                       |
| Tension électrique aiguille :<br>↑ 10 à 20 kV<br>↑ 20 à 25kV | diamètre des fibres varie :<br>↓ diamètre<br>↑ diamètre | ↑ force électrostatique                                  |
| ↑ Débit                                                      | ↑ diamètre des fibres                                   | si trop ↑ : formation de perles, le solvant ne sèche pas |
| ↑ Distance aiguille/collecteur                               | ↓ diamètre des fibres                                   | le jet s'étire +                                         |
| ↑ Conductivité de la solution                                | fibres + uniformes                                      | disparition des perles                                   |

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de l'influence des principaux paramètres en électrospinning sur le diamètre et la forme des fibres.

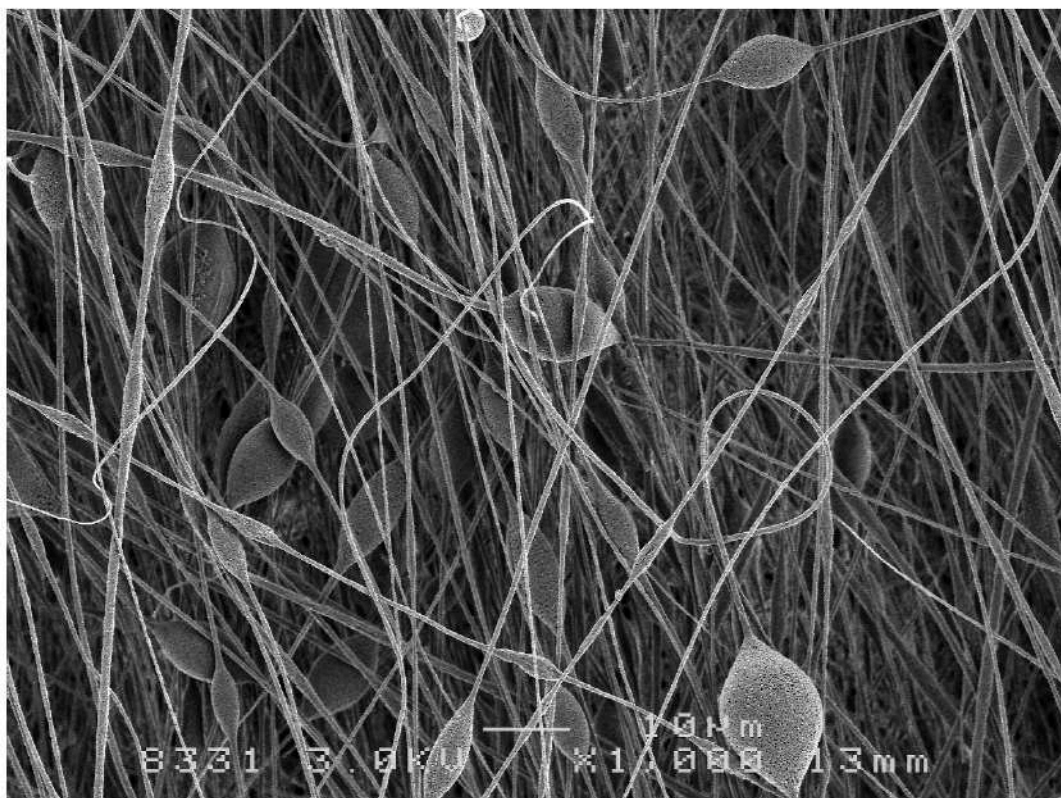


Figure 3 : Fibres de PS préparées à partir d'une concentration de 10% (w/v) dans le DMF, on peut noter la formation de « perles » au travers des fibres.

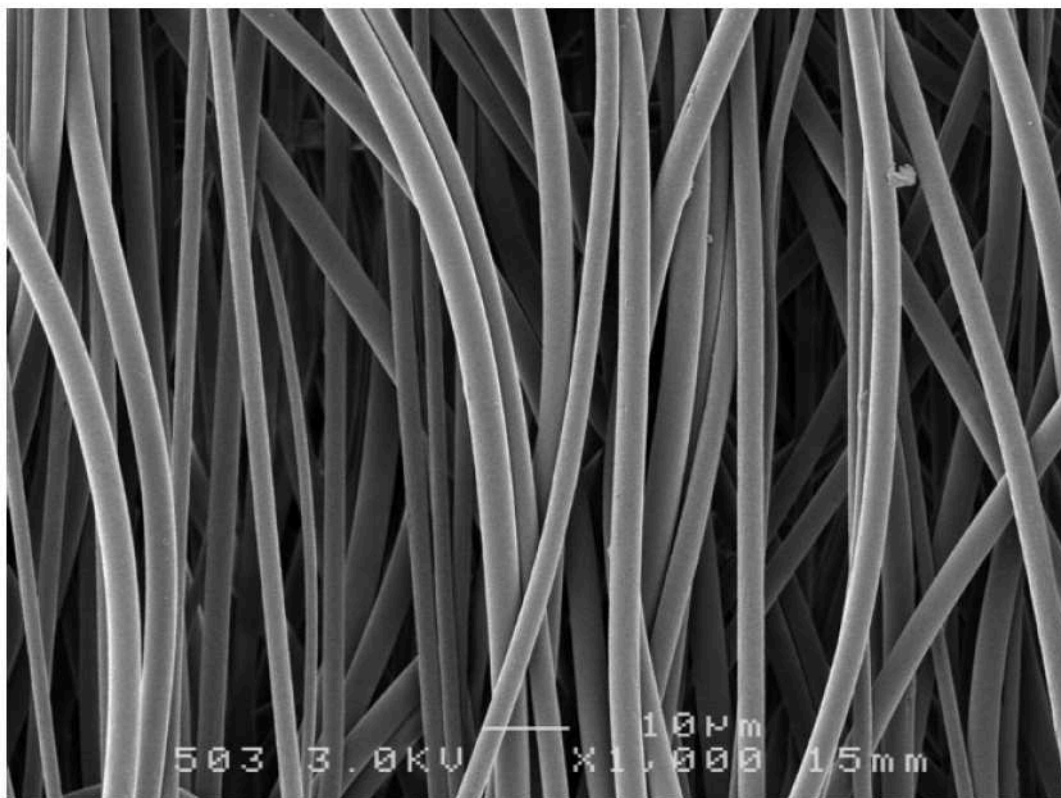


Figure 4 : Fibres de PS préparées à partir d'une solution de 30% (w/v) dans le DMF.



## 4. Le bêta tricalcium phosphate

Les phosphates tricalciques, de formule brute  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , sont des céramiques inorganiques anhydres. Il existe deux structures cristallines différentes de phosphate tricalcique : le  $\beta$ -TCP, qui est stable à 1125°C et l' $\alpha$ -TCP, stable entre 1125 et 1430°C. L' $\alpha$ -TCP est plus réactif en solution que le  $\beta$ -TCP et il s'hydrolyse facilement en un autre phosphate de calcium plus stable. L' $\alpha$ -TCP est plutôt utilisé dans les préparations des ciments osseux (Carrodegua and De Aza 2011). Le  $\beta$ -TCP est le phosphate tricalcique le plus largement étudié. Il constitue à l'heure actuelle un produit de substitution osseuse de choix dans des domaines tels que l'orthopédie, la chirurgie orale et maxillo-faciale, la chirurgie de la main et des vertèbres. Il peut être synthétisé suivant deux procédés différents. Il existe une voie de synthèse à l'état solide mais la méthode la plus conventionnelle est celle de la précipitation dans une solution aqueuse. Les réactifs de départ, le nitrate de calcium  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  et l'acide orthophosphorique  $\text{H}_3\text{PO}_4$  sont chauffés dans un milieu basique (ammoniacal) (Figure 5). Le pH de la réaction, la température et la stœchiométrie des réactifs doivent être parfaitement contrôlés lors de la synthèse. Le mélange est ensuite filtré, séché pour obtenir de la poudre de  $\beta$ -TCP. Industriellement, la poudre de  $\beta$ -TCP est façonnée sous forme de blocs poreux, lames denses ou granules poreux. La mise en forme est réalisée lors d'une étape de frittage entre 1100 et 1300°C. Les grains qui composent la poudre de  $\beta$ -TCP fusionnent par l'intermédiaire de joints de grains. Cette étape permet de définir la structure cristalline et l'architecture des différentes formes de  $\beta$ -TCP. Il a une structure cristalline rhomboédrique, qui a été illustrée à l'aide de la diffraction des rayons X (Dickens, Schroeder et al. 1974) et de la diffraction neutronique (Yashima, Sakai et al. 2003) (Figure 6).



Figure 5 : Synthèse de la poudre de  $\beta$ -TCP, les réactifs de départ  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  et  $\text{H}_3\text{PO}_4$  sont chauffés en présence d'ammoniaque (Document Kasios).

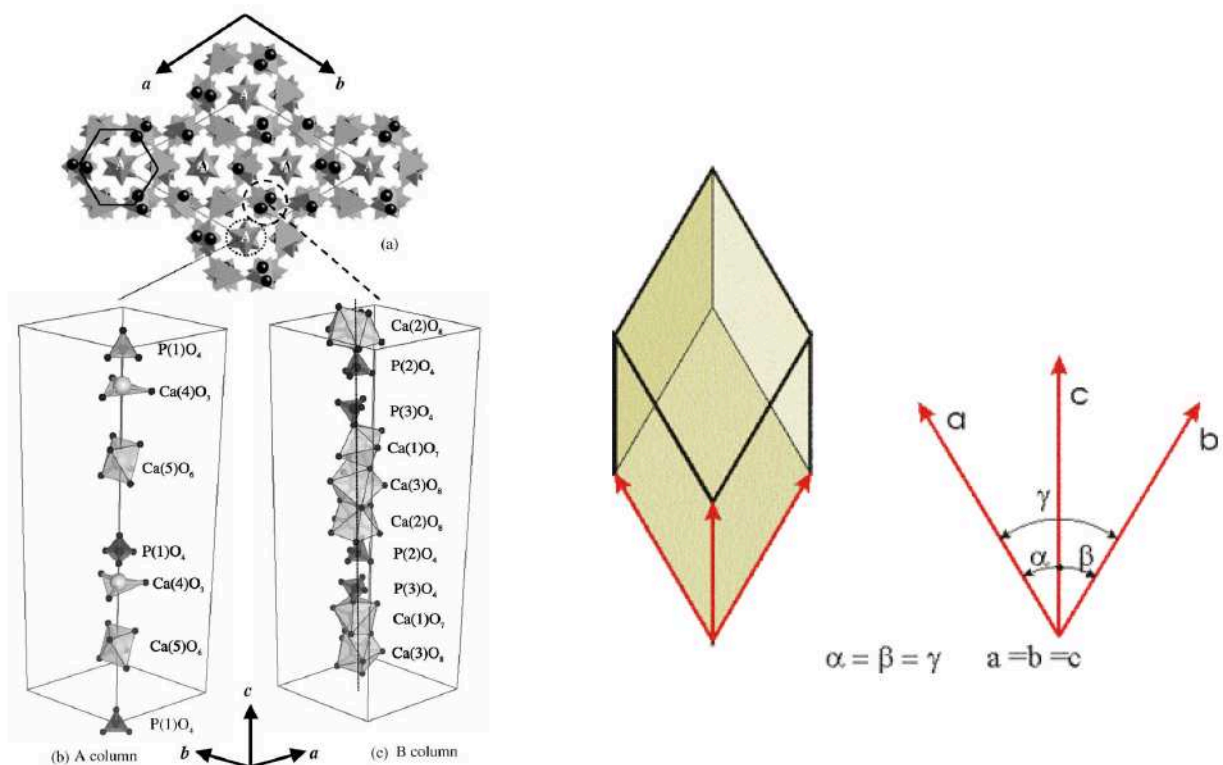


Figure 6 : A gauche : projection de la structure du  $\beta$ -TCP (Yashima, Sakai et al. 2003), (a) unité hexagonale de  $\beta$ -TCP, (b et c) configuration de  $\text{CaO}$  et  $\text{PO}_4$  ; à droite : structure cristalline rhomboédrique.

Le  $\beta$ -TCP a une composition chimique proche de celle de la phase minérale de l'os, ce qui lui confère un fort caractère biocompatible (Nery, Lynch et al. 1978, Koepp, Schorlemmer et al. 2003, Chappard, Guillaume et al. 2010).

La bioactivité du  $\beta$ -TCP est liée à sa solubilité, qui facilite sa biorésorption et sa biodégradabilité. La dissolution du  $\beta$ -TCP dans l'environnement biologique déclencherait la précipitation d'apatites biologiques. L'augmentation de la concentration locale en ions calcium et phosphate entraîne la formation de nouvelles phases phosphocalciques à la surface du matériau (Bagambisa, Joos et al. 1993). L'apatite nouvellement formée modifie l'activité cellulaire osseuse : les ostéoblastes prolifèrent et se différencient tandis que l'activité ostéoclastique diminue. Le  $\beta$ -TCP joue le rôle d'échafaudage : l'os néoformé s'ancre sur la surface du matériau pour se développer et le colonise de manière centripète. Le  $\beta$ -TCP est ostéoconducteur : il sert de guide à la repousse osseuse depuis les berges du défaut. De plus, il est parfaitement ostéointégré au tissu osseux (Chazono, Tanaka et al. 2004) (Figure 7). Le  $\beta$ -TCP est ensuite progressivement remplacé par le tissu osseux néoformé. La cinétique de résorption ne doit pas être trop rapide pour permettre le développement du tissu sans dégrader les caractéristiques mécaniques des céramiques. Les granules fortement poreux sont fragiles, leur utilisation est limitée dans les sites où la contrainte mécanique est élevée.

Si la composition du matériau est essentielle à sa bonne intégration dans le défaut osseux, ce n'est pas la seule variable. En effet, la taille et la forme du substitut modifient ses propriétés biologiques. Durant ce travail de recherche, nous nous sommes intéressés aux granules macroporeux. Les granules sont préférentiellement utilisés pour combler des cavités osseuses car ils peuvent se répartir de façon assez homogène au sein du défaut. Ils sont couramment utilisés en chirurgie odontologique et maxillo-faciale, par exemple dans le cas de soulèvement de sinus et de comblement alvéolaire lorsque des patients présentent une édentation partielle du maxillaire (Chappard, Guillaume et al. 2010). La taille, la forme, le nombre et l'interconnectivité des pores des granules peuvent être contrôlés durant le processus de fabrication. On estime que des macropores, de 100 à 600  $\mu\text{m}$  de diamètre, permettent une bonne ostéoconduction et ostéointégration du matériau. Une surface d'échange élevée entre la céramique et l'environnement biologique favorise la dissolution de la céramique et la colonisation osseuse et vasculaire. L'interconnexion des pores est également un facteur majeur qui permet la diffusion des fluides et la néovascularisation, nécessaires à l'acheminement des nutriments, de l'oxygène, de cellules ostéoprogénitrices et de facteurs de croissance jusqu'au centre du matériau.



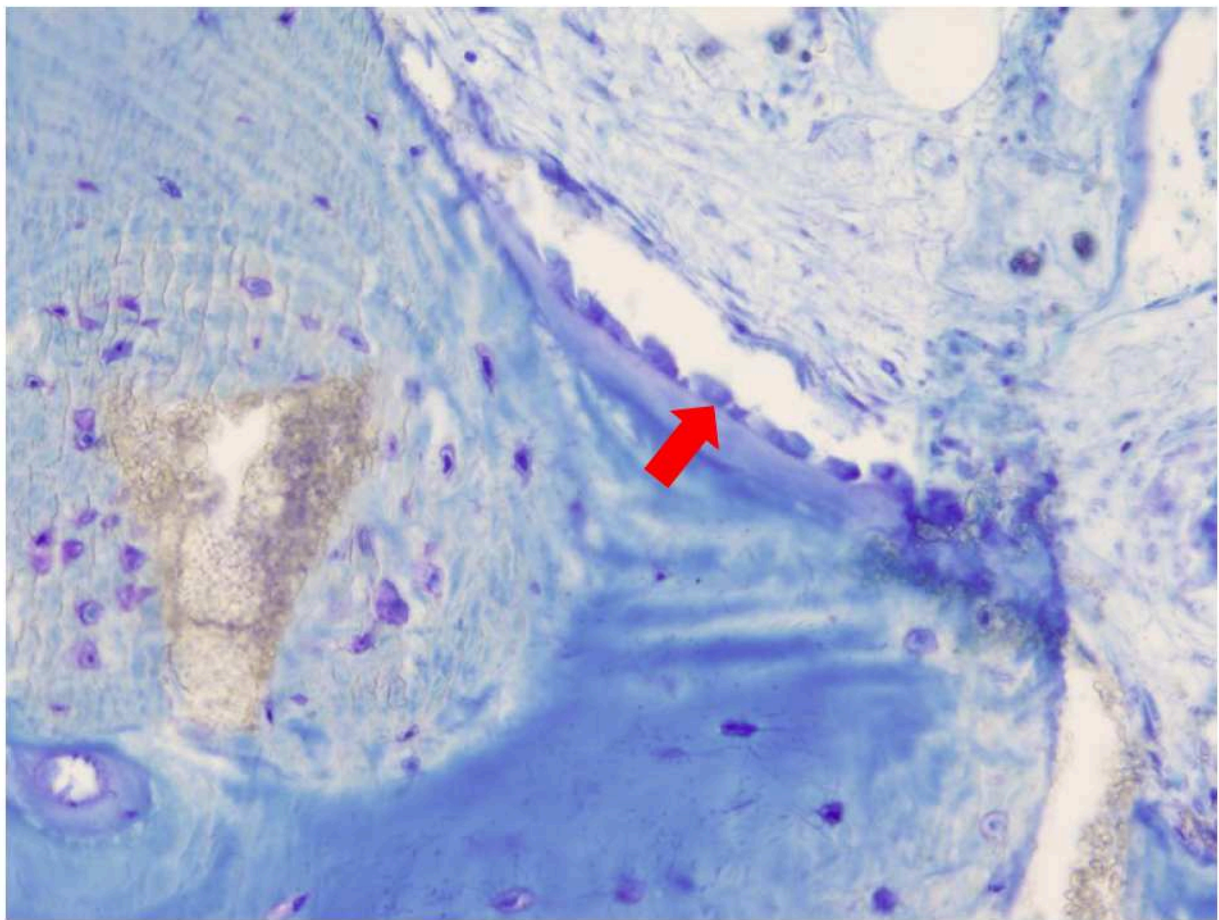


Figure 7 : Coupe histologique d'os néoformé en contact direct avec la surface de  $\beta$ -TCP (gris), on note la présence d'un alignement d'ostéoblastes (flèche).



# TRAVAUX PERSONNELS

## ARTICLE 1

### Polystyrene scaffolds based on microfibers as a bone substitute; development and in vitro study

Terranova L., Mallet R., Perrot R., Chappard D.

Acta Biomaterialia, 29 : 380-388, 2016

Facteur d'impact 2015: 6.008

L'os est un tissu spécialisé composé d'une phase minérale et d'une phase organique contenant principalement du collagène de type 1. Le collagène est présent dans les lamelles osseuses sous forme de faisceaux et de fibres, elles-mêmes composées de fibrilles à une échelle nanométrique. L'os a une capacité d'auto-régénération qui lui permet de s'adapter aux contraintes mécaniques extérieures et de maintenir sa masse constante. Malgré sa capacité de réparation, de larges défauts osseux de nature pathologiques ou post-traumatiques peuvent être observés sans déclencher de cicatrisation spontanée. Dans ces cas-là, il est nécessaire d'assister la réparation osseuse en greffant des matériaux de comblement.

Les polymères sont des matériaux dont la synthèse est maîtrisée pour obtenir une architecture spécifique avec un poids moléculaire donné. Leur état de surface peut être modifié pour améliorer leur capacité d'ostéointégration, par l'ajout de groupements chimiques, de particules, de facteurs ostéogéniques, ou l'augmentation de la rugosité. Les polymères sont donc modulables chimiquement, physiquement et biologiquement pour mimer la matrice osseuse à combler et réparer.

L'électrospinning est un procédé de développement de polymère sous la forme d'une matrice tridimensionnelle poreuse constituée de fibres, dont le diamètre peut varier du nanomètre au micromètre. Ces matrices combinent une large surface et des pores interconnectés pour favoriser l'infiltration et la prolifération cellulaire, ainsi que l'angiogenèse. Nous avons choisi ici de préparer des fibres à l'échelle micrométrique pour favoriser l'infiltration des cellules au sein de la matrice.

Le polystyrène (PS) est le polymère sélectionné pour cette étude du fait de sa biocompatibilité et cytocompatibilité : en effet, il est utilisé comme support de référence en culture cellulaire. Le PS est un matériau non-biodégradable ; cette particularité peut être intéressante pour combler de larges défauts osseux.

#### *Développement des fibres de PS*

Les paramètres idéaux pour la formation de matrices fibreuses de PS par électrospinning ont largement été décrits dans la littérature (Jarusuwannapoom, Hongroijanawiwat et al. 2005, Uyar and Besenbacher 2008). Le choix du solvant est un élément très important pour produire des fibres uniformes en grande quantité. La productivité des fibres, qui est considérée comme le nombre de fibres tissés par unité d'aire par unité de temps, augmente avec la constante diélectrique et le moment dipolaire du solvant. Le N,N-diméthylformamide (DMF) est le solvant répondant le mieux à ces critères ; il permet la plus haute productivité de fibres de PS avec des caractéristiques morphologiques optimales (Wannatong, Sirivat et al. 2004). Il a été montré que la gamme de concentrations idéales pour préparer les solutions de PS dans le DMF est de 20 à 30% (w/v). Une tension appliquée à la solution de 15 kV avec une distance de 10 cm entre l'aiguille et le collecteur donne de bons résultats pour obtenir des fibres uniformes et sans perles.

Les premiers travaux ont consisté à développer des matrices de fibres alignées et de fibres aléatoires en faisant varier la concentration de la solution, les tensions appliquées à l'aiguille et au collecteur, le débit de la solution, la distance entre l'aiguille et le collecteur et le type de collecteur. Les membranes ont été

caractérisées au MEB et les diamètres des fibres ont été mesurés à partir des images avec ImageJ (NIH), en prenant en compte quarante à cinquante fibres. Le tableau 2 regroupe les paramètres utilisés pour la synthèse des membranes.

Il n'a pas été possible de développer des membranes de fibres aléatoires avec un débit supérieur à 1,5 mL/h car les fibres devenaient irrégulières et agglomérées. De même, les fibres alignées perdaient leur uniformité au-dessus de 5 mL/h.



| Concentration<br>% (w/v) | Tension aiguille<br>(kV) | Tension collecteur<br>(kV) | Débit<br>(mL/h) | Distance<br>collecteur (cm) | Diamètre<br>moyen fibre<br>( $\mu\text{m}$ ) |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------------------|
| 20                       | 15                       | -3.5                       | 1,00            | 14,5                        | 1,5                                          |
| 20                       | 15                       | -3.5                       | 1,00            | 10                          | 1,6                                          |
| 20                       | 20                       | -9.8                       | 1,00            | 10                          | 1,6                                          |
| 20                       | 25                       | -8                         | 1,00            | 10                          | 3                                            |
| 20                       | 15                       | -3.5                       | <b>2,00</b>     | 10                          | 2.5                                          |
| 30                       | 15                       | -3.5                       | 1,00            | 10                          | 2                                            |
| 30                       | 20                       | -15                        | 1,00            | 10                          | 1,7                                          |
| 30                       | 25                       | -15                        | 1,00            | 10                          | 3,6                                          |
| 30                       | 15                       | -3.5                       | <b>2,00</b>     | 10                          | 3                                            |
| 30                       | 15                       | -3.5                       | <b>3.00</b>     | 10                          | 3,7                                          |
| 30                       | 15                       | 3.5                        | <b>4.00</b>     | 10                          | 4,2                                          |
| 30                       | 15                       | 3.5                        | <b>5.00</b>     | 10                          | 4,5                                          |
| 20                       | 15                       | -3,5                       | 1,00            | 14,5                        | 1,6                                          |
| 20                       | 15                       | -3,5                       | 1,00            | 20                          |                                              |
| 20                       | 20                       | -10                        | 1,00            | 20                          |                                              |
| 30                       | 15                       | -3,5                       | 1,00            | 10                          | 3                                            |
| 30                       | 20                       | -3                         | 1,00            | 10                          |                                              |
| 30                       | 25                       | -3                         | 1,00            | 10                          |                                              |
| 30                       | 25                       | -3                         | 1,5             | 10                          | 3,5                                          |

Tableau 2 : Paramètres utilisés pour développer les différentes membranes de fibres alignées (partie gris clair) et aléatoires (partie bleue) de PS par électrospinning et diamètres correspondants des fibres.

En faisant varier un paramètre à la fois, on remarque que le diamètre des fibres augmente avec le débit et la concentration de la solution (Figure 8). Le diamètre des fibres varie en fonction de la tension appliquée à l'aiguille, il est maximal pour une tension à 25 kV ; mais les fibres ne sont pas totalement uniformes à cette tension.

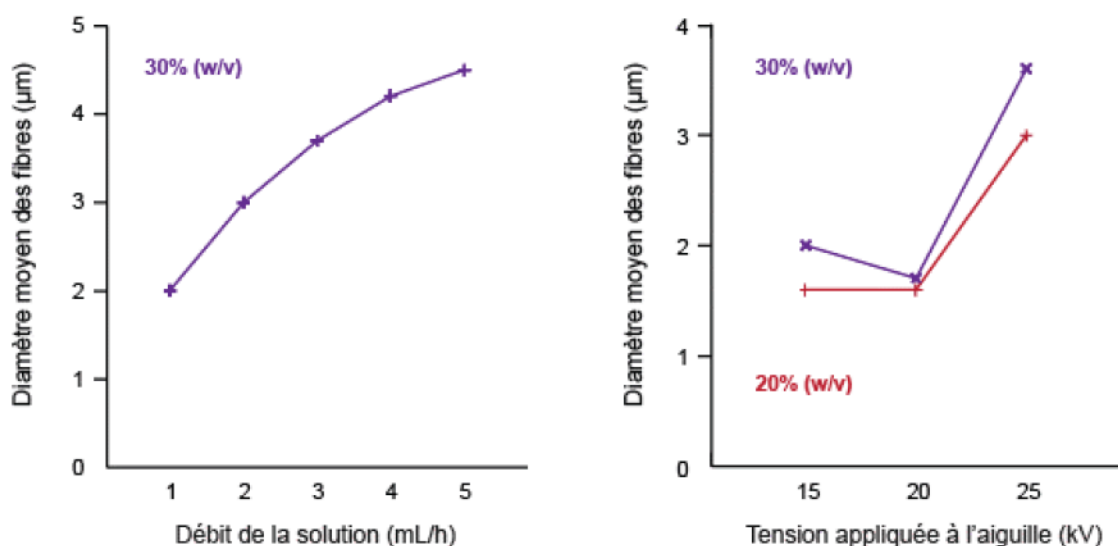


Figure 8 : Variation du diamètre des fibres alignées de PS en fonction du débit de la solution (à gauche) et de la tension et la concentration de la solution (à droite).

Parmi toutes ces membranes, quatre ont été sélectionnées pour le reste de l'étude : deux membranes de fibres alignées de 4,5 et 1,5 μm de diamètre et deux membranes de fibres aléatoires de diamètre de 3,5 et 1 μm.

#### *Analyse de l'arrangement spatial des fibres de PS*

Les membranes de fibres alignées et aléatoires ont été analysées en nanoCT et en géométrie fractale pour comparer leur arrangement spatial. La nanoCT permet une analyse morphologique de petits objets en reconstruisant de manière non destructive leurs structures tridimensionnelles à partir de radiographies bidimensionnelles. La géométrie fractale sert à décrire des objets irréguliers et complexes. La dimension fractale traduit la façon dont un ensemble fractal remplit l'espace à toutes les échelles. Le calcul des dimensions fractales ( $D_{sky}$ ,  $D_{cross}$ ,  $D_{||}$  et  $D_{-}$ ) des fibres alignées et aléatoires a permis de comparer leur arrangement dans l'espace. Les mesures sont effectuées à partir de 4 microphotographies moyennées par membrane. Les dimensions fractales des fibres aléatoires sont plus élevées, ce qui indique qu'elles ont une tendance à plus remplir l'espace à toutes les échelles.

### *Analyse de l'adhésion, de la prolifération et de la différenciation cellulaire*

Nous avons cherché à analyser les effets de l'orientation et du diamètre des fibres sur l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules. Le comportement cellulaire *in vitro* au contact des biomatériaux est un facteur clé à appréhender pour les optimiser. Pour ce faire, les membranes ont étéensemencées de cellules provenant d'une lignée pré-ostéoblastique murine (MC3T3).

La détermination de l'adhésion cellulaire est importante car la qualité de l'adhésion initiale des cellules (premier contact avec une nouvelle matrice) influence leur morphologie, leur prolifération et leur différenciation. Elle est mesurée après 1, 3, 6, 12 heures de culture, puis le nombre de cellules viables est analysé par un test MTT.

La prolifération cellulaire s'étudie sur des temps plus longs, 1, 3, et 7 jours, afin d'évaluer la multiplication des cellules et leur migration sur le matériau. Le nombre de cellules sur les membranes est également révélé par un test MTT. Le test MTT est basé sur la réaction des mitochondries des cellules métaboliquement actives avec un sel de tétrazolium (MTT, bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium). Le sel de tétrazolium est réduit en cristaux de formazan de couleur violette dans les mitochondries. Une fois les cristaux dissous, l'absorbance est mesurée à 570 nm avec un spectrophotomètre ; elle est proportionnelle au nombre de cellules viables.

La différenciation cellulaire est étudiée en cultivant des cellules MC3T3 dans des conditions de culture ostéogénique (milieu cellulaire  $\alpha$ MEM complémenté avec 10% SVF, 50 mg/mL d'acide ascorbique, 2.5 mM de dihydrogénophosphate de sodium, et 10 nM de dexaméthasone). Pour déterminer la maturité des ostéoblastes, l'activité de la phosphatase alcaline a été dosée à 14 et 28 jours. La phosphatase alcaline est une enzyme qui hydrolyse les esters phosphoriques (-P-O-P-) inhibiteurs de la minéralisation et favorise la concentration locale en ions phosphate. Des membranesensemencées ont été observées après 28 jours au MEB, en électrons secondaires et en électrons rétrodiffusés, couplé avec un EDS pour identifier les zones calcifiées. Ce deuxième mode a l'avantage de fournir un contraste chimique qui permet de mieux définir les différents éléments d'un échantillon. Enfin, des membranes ont également été observées en microscopie confocale. Les membranes ont été préalablement colorées en rouge avec le Nile Red pour les rendre fluorescentes (Figure 9). Le Nile Red est un colorant lipophile fluorescent soluble dans le DMF, il a été directement ajouté à la solution de polymère. Afin de vérifier la présence de nodules calcifiés, les membranes ont été colorées avec la calcéine qui donne une couleur verte aux structures calcifiées. Pour finir, les noyaux des cellules ont été colorés en bleu avec le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) (Figure 10). Grâce à cette coloration, la morphologie des noyaux des cellules peut être mesurée à l'aide de facteurs de forme.

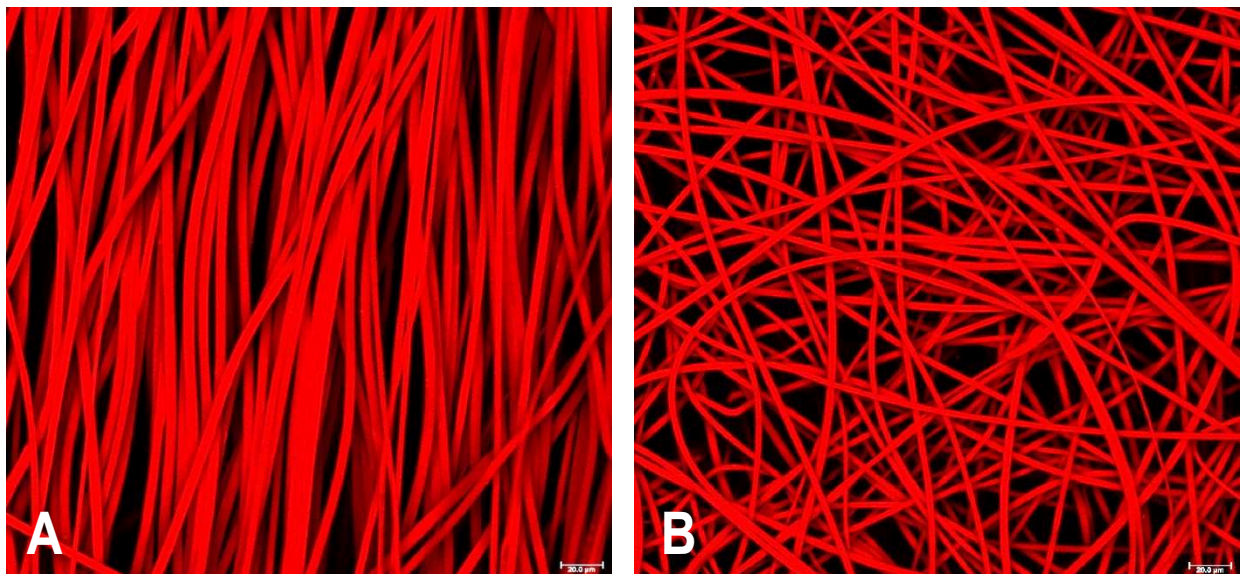


Figure 9 : Fibres de PS, (A) alignées et (B) aléatoires, colorées avec le Nile Red et observées en microscopie confocale.

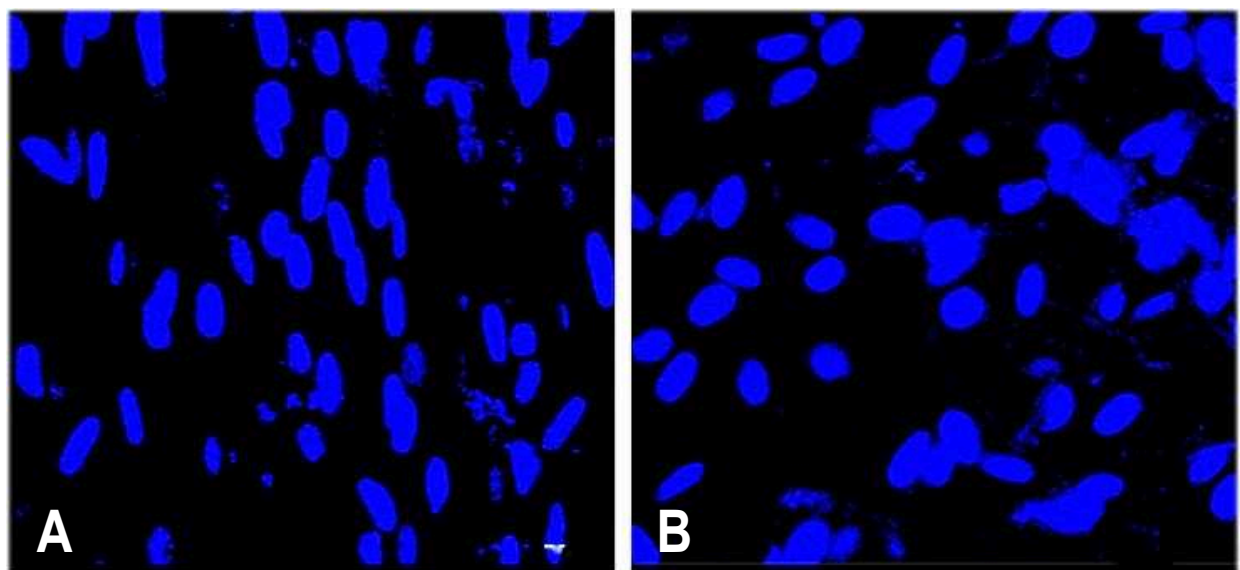


Figure 10 : Culture de cellules MC3T3, (A) sur des fibres alignées et (B) sur des fibres aléatoires, observée après 28 jours en microscopie confocale après coloration des noyaux au DAPI.



Durant les premières heures de culture, l'adhésion cellulaire est plus importante sur les fibres aléatoires de 3,5  $\mu\text{m}$  de diamètre, ces membranes semblant offrir une meilleure porosité pour l'infiltration des cellules et leur adhésion initiale. Après plusieurs jours, les cellules prolifèrent de manière similaire sur les deux membranes de fibres alignées et la membrane de fibres aléatoires de 3,5  $\mu\text{m}$ . Au contraire, la prolifération des cellules est plus limitée ( $p < 0,05$ ) sur les membranes de fibres aléatoires de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre. L'activité de la phosphatase alcaline diminue entre le 14<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour. La phase de minéralisation commence après 14 jours et la phosphatase alcaline diminue parallèlement tandis que d'autres facteurs sont par la suite synthétisés. Au 14<sup>ème</sup> jour, il n'y a pas de différence significative entre les deux membranes de fibres alignées et les membranes avec les fibres aléatoires de 3,5  $\mu\text{m}$ . L'activité de la phosphatase alcaline est beaucoup plus faible pour les membranes de fibres aléatoires de 1  $\mu\text{m}$ . A 28 jours, il n'y a aucune différence significative des taux de phosphatase alcaline entre chaque type de membrane.

Le MEB et la microscopie confocale permettent d'observer la morphologie des noyaux des ostéoblastes et les nodules calcifiés sur les fibres. En mode électrons secondaires, un tapis dense de cellules recouvre les fibres. Les cellules sont fixées sur les fibres en surface mais également plus en profondeur sur différentes couches de fibres. Sur les fibres alignées, les cellules sont préférentiellement alignées et étirées longitudinalement. Sur les fibres aléatoires, les cellules ne sont pas orientées. Les nodules calcifiés se présentent sous la forme de grains d'environ 1  $\mu\text{m}$  ou d'agrégats pouvant mesurer jusqu'à une cinquantaine de microns. Ces agrégats calcifiés sont observés en EDS pour confirmer leur composition en ions calcium et phosphate.

En microscopie confocale, les nodules calcifiés colorés avec la calcéine apparaissent sur toute la longueur des fibres (Figure 11). La coloration des noyaux par le DAPI permet de voir leur position sur les couches de fibres. Des cellules sont visibles à la surface des fibres mais également plus en profondeur sur les membranes de fibres alignées et aléatoires de plus grand diamètre. Cependant, sur les fibres aléatoires les plus fines, les cellules pénètrent moins en profondeur, ce qui expliquerait leur adhérence et leur prolifération plus faibles. Le calcul des facteurs de forme montre que les noyaux sont significativement plus allongés et orientés sur les fibres alignées.

Nous avons montré que la variation du diamètre et de l'orientation des fibres de membranes de polystyrène pouvait avoir une influence sur le comportement cellulaire. Durant les premières heures, l'adhésion cellulaire est plus importante sur les membranes de fibres aléatoires de plus grand diamètre qui offrent une porosité et des propriétés de surface adéquates. Les membranes de fibre alignées donnent de bons résultats en termes d'adhésion, de prolifération et de différenciation cellulaire. Nous avons pu finalement montrer que les membranes de fibres aléatoires de plus faible diamètre entraînaient moins d'adhésion, de prolifération et de différenciation des cellules.

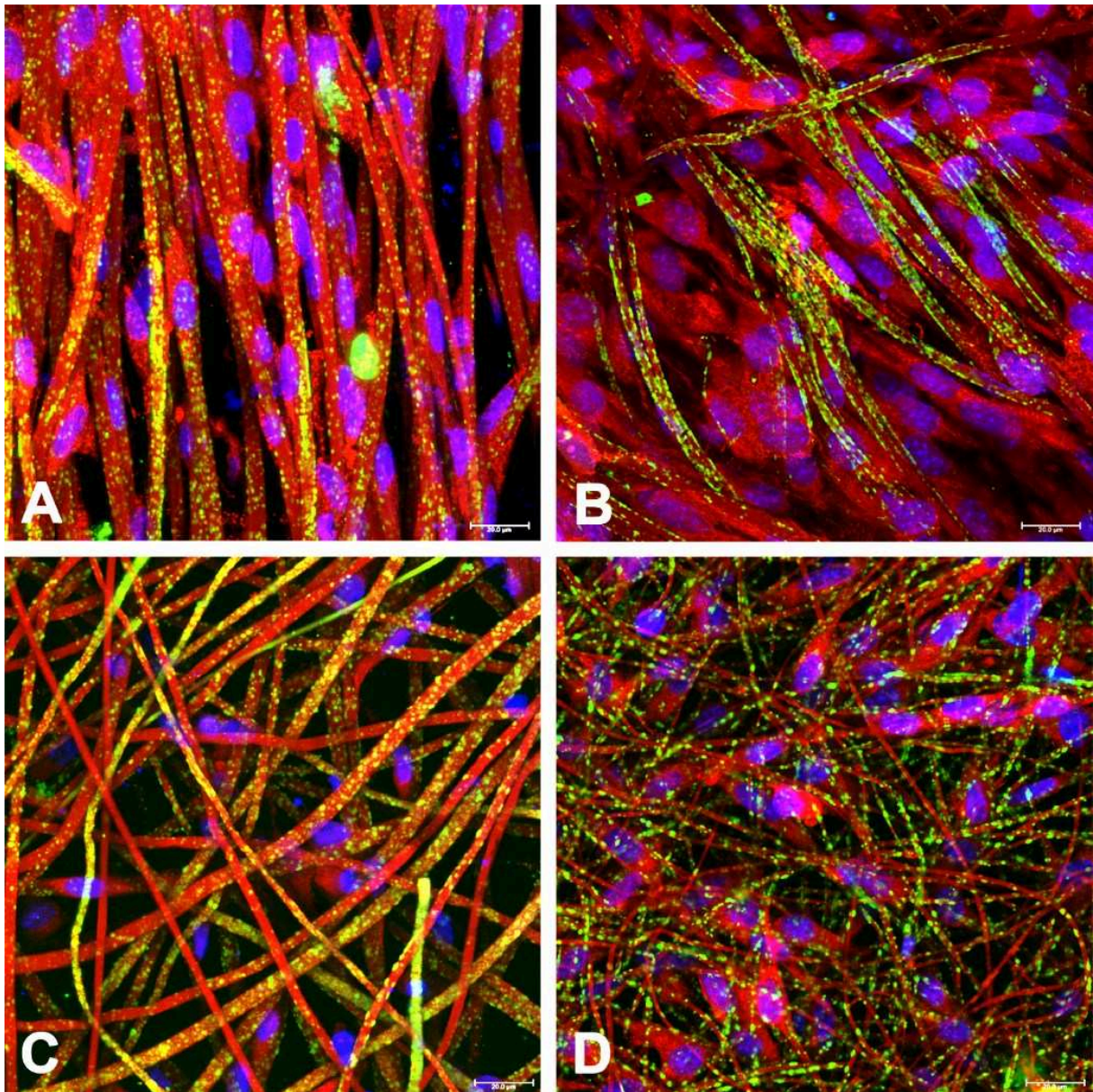
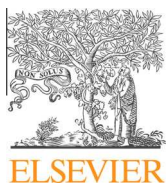


Figure 11 : Différenciation de cellules MC3T3 sur les fibres de PS alignées de (A) 4,5  $\mu\text{m}$  et (B) 1,5  $\mu\text{m}$  et aléatoires de (C) 3,5  $\mu\text{m}$  et (D) 1  $\mu\text{m}$ . Les fibres ont été colorées avec le Nile Red, les noyaux avec le DAPI, et les nodules calcifiés avec la calcéine en vert.





# Polystyrene scaffolds based on microfibers as a bone substitute; development and *in vitro* study



Lisa Terranova<sup>a</sup>, Romain Mallet<sup>a,b</sup>, Rodolphe Perrot<sup>b</sup>, Daniel Chappard<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> GEROM Groupe Etudes Remodelage Osseux et bioMatériaux – LHEA, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, LUNAM Université, 49933 Angers Cedex, France

<sup>b</sup> SCIAM, Service Commun d'Imagerie et Analyses Microscopiques, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, LUNAM Université, 49933 Angers Cedex, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 2 September 2015

Received in revised form 20 October 2015

Accepted 26 October 2015

Available online 27 October 2015

### Keywords:

Polystyrene

Electrospinning

Microfibers

Fibers orientation

Cell culture

## ABSTRACT

We created non-resorbable porous scaffolds of polystyrene by electrospinning usable as a bone grafting material. Aligned and random fibers were prepared with a diameter ranging from 1 to 4.5  $\mu\text{m}$ . Influence of microfiber diameter and alignment were determined by culturing MC3T3 osteoblast-like cells and evaluation of adherence, proliferation and differentiation at day 14 and 28 on the scaffolds. Scanning electron microscopy (SEM), nanocomputed tomography (nanoCT) and confocal microscopy were used to observe microfibers and morphology of cells seeded on the scaffolds. Nile Red was used to label the fibers, DAPI for nuclear staining and calcein for the calcium/phosphate deposits. MC3T3 were more adherent on the randomly distributed fibers having the highest diameter. MC3T3 proliferated equally on scaffolds made with aligned fibers but cell density was lower on random fibers with the smaller diameter. Alkaline phosphatase activity (a marker of osteoblastic differentiation) was not influenced by the fibers apart from on random fibers with the smallest diameter. Calcospherites also developed at the surface of the fibers in long term culture. Cytometric determination of the nuclei shape factors evidenced that cells were elongated along the main direction of fibers only on the aligned fibers. This study shows that porous scaffolds based on microfibers allow adhesion, spreading, orientation and proliferation of cells.

## Statement of Significance

We prepared polystyrene porous scaffolds composed of microfibers as a bone substitute by electrospinning. Polystyrene is a cytocompatible and non-resorbable polymer which can support osteoconduction. Scaffolds with different micro-diameters and orientation, (aligned and random) were seeded with osteoblast-like cells to evaluate cell adherence, proliferation and differentiation. Characterization of microfibers and cell morphology was done by scanning electron microscopy, nanocomputed tomography and confocal microscopy. We evidenced that initial adherence of cells was increased on randomly disposed fibers with a high diameter (3.5  $\mu\text{m}$ ). Cell proliferation and differentiation seems not to be influenced by fiber diameter and orientation, apart from random fibers of 1  $\mu\text{m}$  diameter which had a lower cell attachment. Morphometric analysis of cell nuclei showed that cells were stretched along the aligned fibers.

© 2015 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Bone is an organized and specialized connective tissue, composed of a mineral phase (hydroxyapatite) and an extracellular matrix (ECM) with type I collagen fibers. Bone is in constant

remodeling to maintain a sufficient bone mass, necessary to ensure mechanical functions and to protect organs. Despite of its ability to self-regenerate, pathologic or post-traumatic bone defects with a large size can be observed (bone cysts, osteolysis after total hip reconstruction, malignant osteolysis, neurosurgical defects...) and they have no tendency for spontaneous healing. Currently, synthetic biomaterials are a common alternative to limit allografts which lead to an increased morbidity [1,2]. In a previous study, it was shown that the use of a non-resorbable biomaterial with a high stiffness could be used to support osteoconduction [3,4].

\* Corresponding author at: GEROM – LHEA, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, LUNAM Université Nantes Angers Le Mans, CHU d'Angers, 49933 Angers Cedex, France.

E-mail address: [daniel.chappard@univ-angers.fr](mailto:daniel.chappard@univ-angers.fr) (D. Chappard).

**Table 1**

Parameters used for preparation of PS microfibers by electrospinning.

| Fibers           | Concentration % (w/v) | Flow rate (mL/h) | High voltage power supply (kV) | Distance needle/collector (cm) | Fiber diameter ( $\mu\text{m}$ ) |
|------------------|-----------------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| A <sub>1</sub> F | 30                    | 5.00             | 15                             | 10                             | 4.5                              |
| A <sub>2</sub> F | 20                    | 1.00             | 20                             | 20                             | 1.5                              |
| R <sub>1</sub> F | 30                    | 1.50             | 25                             | 10                             | 3.5                              |
| R <sub>2</sub> F | 20                    | 1.00             | 15                             | 20                             | 1                                |

Currently, electrospinning is a promising model to elaborate three-dimensional electrospun scaffolds to mimic the morphology and the structure of the ECM. Electrospinning is a simple and repeatable process available for a large range of materials to develop porous scaffolds with nano- or micro-scale fibers [5–7]. Fibrous scaffolds recapitulated the three-dimensional arrangement of stiff collagen fibrils in the ECM. Scaffolds offer a high surface area volume ratio support to ensure an abundant area for cell infiltration, spreading, proliferation and migration [8]. Size and alignment of the fibers may play a role in cells proliferation and differentiation as aligned fibers mimic collagen fibers [9,10]. Scaffolds with interconnected porosity also promote angiogenesis which stimulates bone regeneration. The vasculature transports oxygen, nutrients, and osteoprogenitor cells to the grafted site [11,12].

The aim of this study was to develop scaffolds of non-resorbable microfibers to promote osteoconduction. Effect of fiber diameter and alignment were investigated on cell adhesion, proliferation and differentiation under osteogenic conditions. Polystyrene (PS), a non-biodegradable and well-known cytocompatible polymer seems to be an interesting solution to generate scaffolds supporting bone regeneration in cases of large bone defects. It is largely used as an *in vitro* substrate for cell culture and polystyrene fibers have been found to promote cell proliferation [3,13]. Optimal parameters for electrospun scaffolds of PS have been described in literature [14–17]. Orientation, size and morphology of the fibers were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and nanocomputed tomography. Morphology of cells and nuclei were investigated by SEM and confocal microscopy. The effects of fiber orientation and size on cell differentiation were determined after one month by measuring alkaline phosphatase (ALP) assay and total protein in the cultures.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of PS microfibers

PS microfibers were prepared by the electrospinning method using an Electrospinner x.x.S/D-500 (YFlow, Malaga, Spain). The polymer solutions were prepared by dissolving PS (Mw = 350,000 g/mol, Sigma-Aldrich) in N,N-dimethylformamide (DMF, Sigma) and loaded into a 10 mL plastic syringe controlled by a pump at a given flow rate. A Teflon tube was connected from the syringe to a needle (inner diameter: 0.4 mm) disposed vertically. A high voltage power supply was applied to the solution to induce a charge on the surface of the polymer droplet at the tip of the needle. When a critical voltage is reached, the droplet elongates and a solution jet is ejected to a collector. Aligned fibers were produced with a drum collector with a rotation of 2400 rpm while the needle remained fixed. Random fibers were produced with a plate collector and the needle was allowed to move in the x–y directions above the plate collector. Four different types of fibers were prepared, two with aligned fibers (AFs) with two different diameters, and two with random fibers (RFs) with two different diameters. Concentration of the polymer solution, flow rate, high voltage power supply, distance between the needle and the collec-

tor, and the type of collector were adjusted to prepare the different types of fiber (Table 1).

### 2.2. Characterization of microfiber scaffolds

#### 2.2.1. Fractal dimension on microscopic images

The different types of scaffolds were imaged on a BX51 microscope (Olympus, France) and microphotographs were taken at a 100 $\times$  magnification. Fractal dimensions of the microfibers were determined on the thinner fibers with a texture analysis software to compare the spatial arrangement of aligned microfibers and random microfibers. Description of the algorithm was presented elsewhere [18]. Briefly, we measured the fractal dimension with the skyscrapers method ( $D_{\text{sky}}$ ) and dynamic blankets using two structuring elements gliding in the image: a cross and a vector. The fractal dimension obtained with the cross ( $D_+$ ) and those obtained with a horizontal ( $D_-$ ) or vertical ( $D_l$ ) vector were determined. A fractal is an object (curve, surface) with an irregular or fragmented structure (self similarity). Fractal dimensions reflect the way that a fractal system fills the space at all the scales. A fractal object tends to fill up its topological space and its dimension value is not an integer. For example, a complex curve will cover a large area of the plane with a topological dimension lying between 1 and 2. In the same way, a very rough surface will occupy a large volume with a dimension between 2 and 3 [19].

#### 2.2.2. SEM of microfibers

Surface morphology of the different fibers was determined by SEM on a JEOL 6301F (JEOL Paris, France). Microfibers were coated with a thin layer of platinum by sputtering with a high vacuum coater (Leica EM ECA600, Leica, France). Images were captured at a 3 kV acceleration voltage in the secondary electron mode and a working distance of 13 mm. The diameter of the fibers was measured from the SEM images using an image analysis software (ImageJ 1.49c, NIH) from at least 40 fibers.

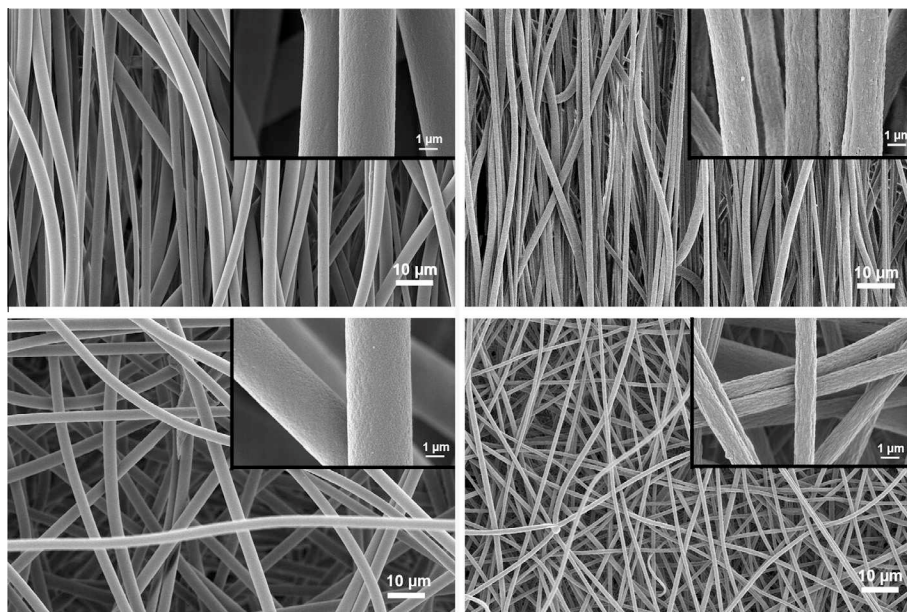
#### 2.2.3. Nanocomputed tomography (nanoCT)

The Phoenix Nanotom (Phoenix Technologies, General Electric, 69760 Limonest, France) was used to analyze the microfiber scaffolds. Fibers were stuck on a carbon rod (4 mm in diameter) with a water-based glue. Analyses were done at a 50 kV tension and a beam current of 250  $\mu\text{A}$ . The acquisition time for each image was 750 ms with an average of three images by projection. Rotation of the sample was set to 0.15°. Reconstruction was made with the DATOS software (Phoenix) from 2400 projection images obtained at a resolution of 2  $\mu\text{m}$  per pixel. Visualization of 3D models was done with the VGStudio Max software (Volume Graphic GmbH, Heidelberg, Germany; release 2.2); this software also provided cross sections of different visible plans (x, y, and z).

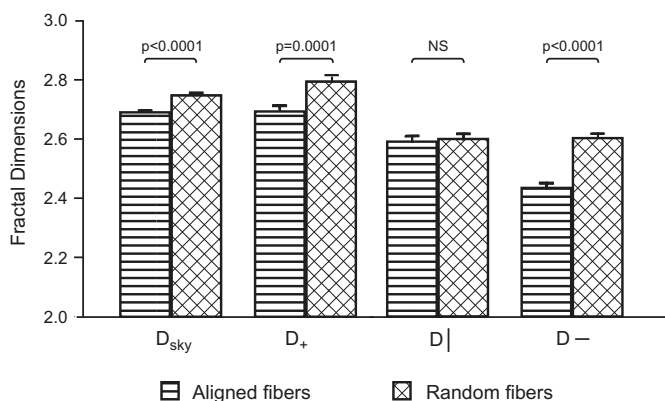
### 2.3. *In vitro* osteoblast culture and seeding

Mouse calvaria derived MC3T3 osteoprogenitor cell were cultured in  $\alpha\text{MEM}$  (minimum essential medium,  $\alpha$  modification) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin. The medium was replaced every 2 days and





**Fig. 1.** Polystyrene fibers prepared by electrospinning observed in SEM. Upper row, aligned fibers at a 30% PS concentration (left) and 20% PS concentration (right). Lower row: random fibers at a 30% PS concentration (left) and 20% PS concentration (right). In each image, the insert represents the surface roughness at a higher magnification.

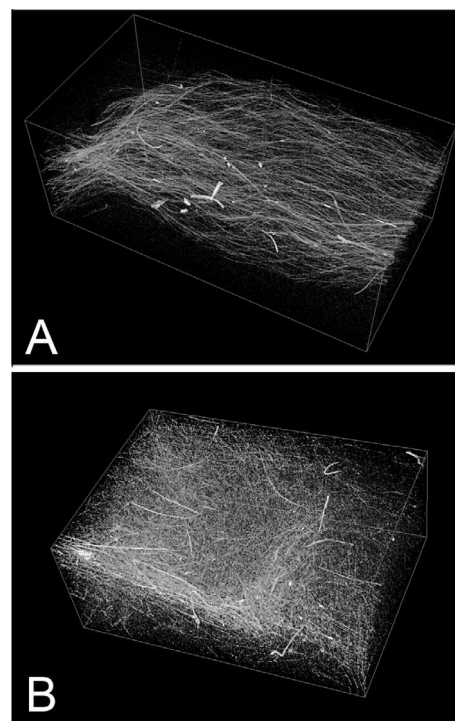


**Fig. 2.** Fractal dimensions ( $D_{sky}$ ,  $D_+$ ,  $D$ ,  $D_-$ ) of the microfibers were determined on the thinner aligned and random fibers.

the culture was maintained in a humidified atmosphere with 5%  $CO_2$  at 37 °C. The microfiber scaffolds were cut into circular disks with a punch (16 mm in diameter) and placed in 24 well tissue culture plates. Sterilization of the scaffolds was done in 70% ethanol during 3 h. They were then washed several times in sterile PBS and immersed in  $\alpha$ MEM.

### 2.3.1. Cell adhesion/proliferation

To evaluate cell adhesion, MC3T3 cells were seeded on the scaffolds at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL and cultured during 1, 3, 6, 12 h. Cell proliferation was studied by allowing MC3T3 at a concentration of  $2 \times 10^4$  cells/mL, to attach to the fibers and the cultures were stopped at 1, 3, and 7 days. The culture medium was refreshed every two days. At each time point, the number of viable and attached cells was determined by MTT assay. MTT assay is based on the reaction of mitochondria of the metabolically active cells with a tetrazolium salt (MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma–Aldrich). Cells were incubated with MTT solution at a concentration of 0.5 mg/mL in PBS for 3 h with 5%  $CO_2$  at 37 °C. Tetrazolium salt is reduced in purple formazan crystals which were then dissolved in acidified iso-

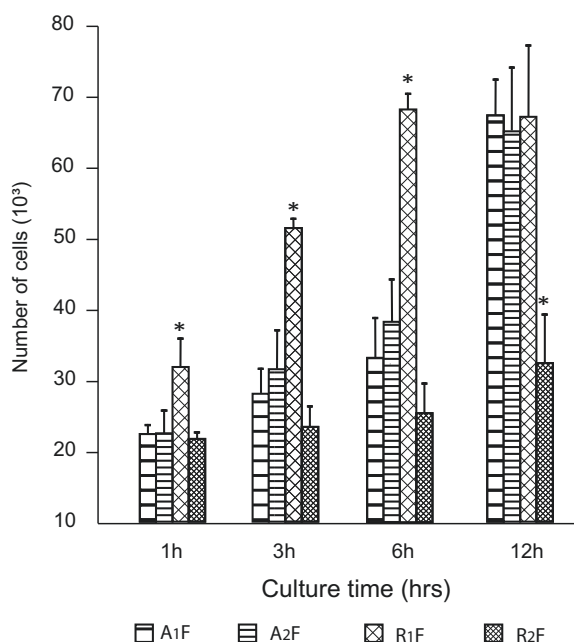


**Fig. 3.** Nanocomputed tomography of two types of PS fibers. (A) Aligned scaffold. (B) Random scaffold.

propanol. Supernatant was transferred in 96 well plates and absorbance was read at 570 nm with a spectrophotometric plate reader (Molecular Device, SpectraMax M2). Absorbance is proportional to the number of viable cells. Analysis was done in triplicate for each type of scaffold.

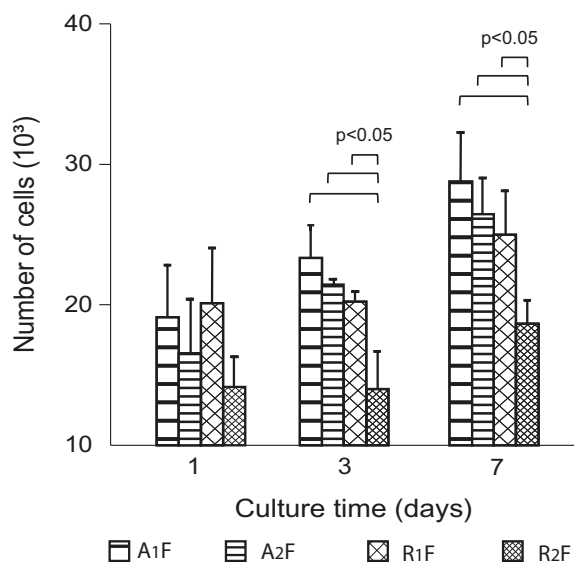
### 2.3.2. Cell differentiation

MC3T3 cells were seeded on the scaffolds at a concentration of  $5 \times 10^4$  cells/mL and maintained in an osteogenic medium ( $\alpha$ MEM

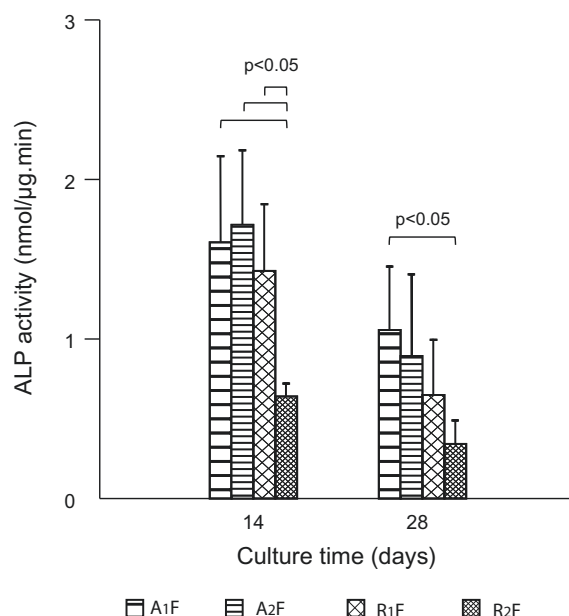


**Fig. 4.** Adhesion kinetics of MC3T3 osteoblast-like cells seeded on the two aligned scaffolds (A<sub>1</sub>F and A<sub>2</sub>F) and on the two random scaffolds (R<sub>1</sub>F and R<sub>2</sub>F), expressed in number of cells ( $\times 10^3$ ) at 1, 3, 6, and 12 h. The initial concentration of cells seeded was  $1 \times 10^5$  cells/mL. Mean for  $n = 3 \pm \text{SD}$ . \*Significant at  $p < 0.05$ .

supplemented with 10% FBS, 50 mg/mL ascorbic acid, 2.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 nM dexamethasone) for 28 days. The culture medium was refreshed every two days. At predetermined times of 1, 14 and 28 days, alkaline phosphatase (ALP) assay and total proteins were measured. ALP activity is an early indicator of osteoblastic phenotype and is involved in the mineralization of the ECM. The scaffolds were washed with PBS, and Igepal (Sigma–Aldrich) 0.2% in PBS was added for 30 min under rotation. The lysate was transferred in microcentrifuge caps and centrifuged at 3000 tour/min for 20 min; the supernatant was collected for the ALP dosage and the number of total proteins to normalize the measurement of



**Fig. 5.** Proliferation of MC3T3 cells cultured on the two aligned scaffolds (A<sub>1</sub>F and A<sub>2</sub>F) and on the two random scaffolds (R<sub>1</sub>F and R<sub>2</sub>F), expressed in number of cells ( $\times 10^3$ ) at 1, 3, and 7 days. The initial concentration of cells seeded was  $2 \times 10^4$  cells/mL. Mean for  $n = 3 \pm \text{SD}$ . \*Significant at  $p < 0.05$ .



**Fig. 6.** ALP activity of MC3T3 seeded on the scaffolds A<sub>1</sub>F, A<sub>2</sub>F, R<sub>1</sub>F and R<sub>2</sub>F after 14 and 28 days in osteogenic medium. The initial concentration was  $2 \times 10^4$  cells/mL. \*Significant at  $p < 0.05$ .

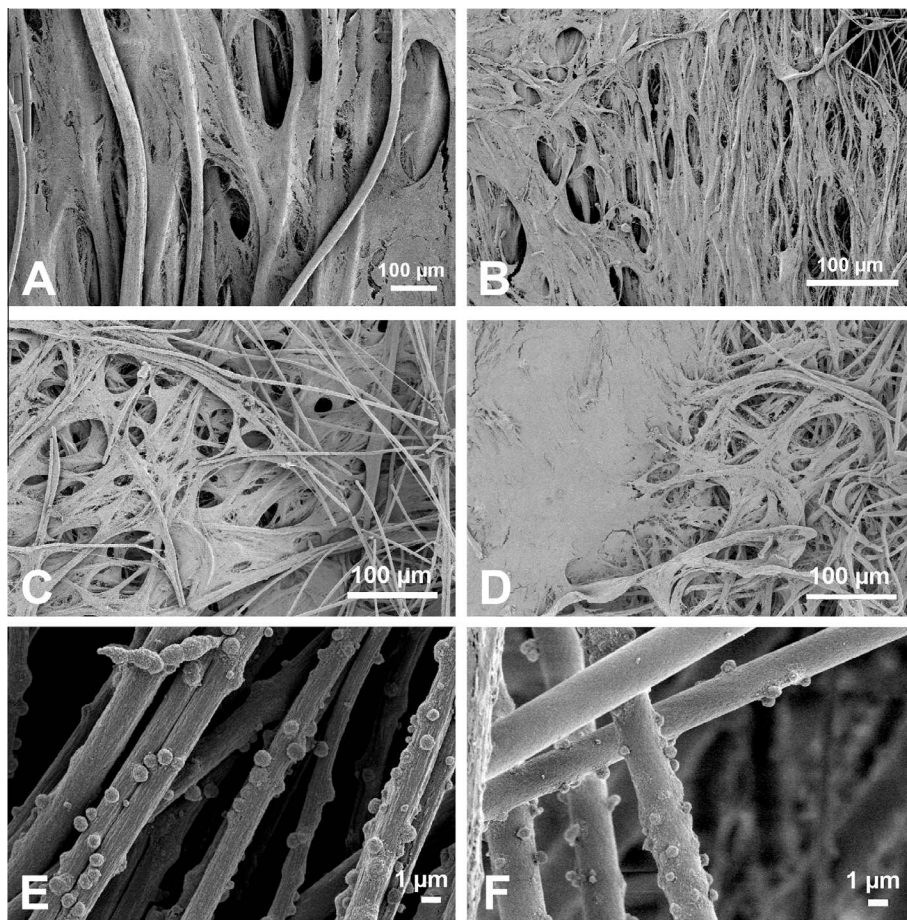
ALP activity. Total proteins were dosed with Pierce<sup>®</sup> BCA protein Assay Kit (Thermo Scientific). Microplate procedure was done by pipetting 25  $\mu\text{L}$  of lysed cells, and adding 200  $\mu\text{L}$  of a working solution (BCA reagent A:B (50:1)) per well for 30 min at 37 °C. Absorbance was measured at 562 nm. Analysis was done in triplicate for each type of scaffold. For the ALP activity dosage, 50  $\mu\text{L}$  of lysed cells was combined with 10  $\mu\text{L}$  of TRIS 50 mM with 0.1% BSA (Sigma), 4-methylumbelliferone (4-MU, Aldrich) at 100  $\mu\text{M}$ , and the substrate working solution (4-methyl-umbelliferyl phosphate – 4-MUP, Aldrich) at 200  $\mu\text{M}$  at 37 °C. One hundred  $\mu\text{L}$  of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.6 M was added to each well to stop the reaction of 4-MUP and to increase 4-MU fluorescence. Fluorescence was measured at an excitation of 360 nm, emission of 450 nm and cut off of 435 nm. Analysis was done in triplicate for each type of scaffold.

### 2.3.3. Analysis of cells deposited on the PS scaffolds

At day 28, cell morphology, and calcium salt deposition on fibers were characterized, using SEM and confocal microscopy. Seeded scaffolds were observed by secondary electron and backscattered electron technics on a SEM (EVO LS10, Carl Zeiss Ltd., Nanterre, France) coupled with an Energy Dispersive X-ray detector (EDX; INCA XMAX, Oxford Instruments, Oxford, UK) which identifies calcified areas and determine the Ca/P ratio. Scaffolds were washed in PBS and fixed with 2.5% glutaraldehyde solution in cacodylate buffer 0.1 M for 20 min at room temperature. Then, scaffolds were postfixed with osmium tetroxide for 45 min, and rinsed with distilled water. They were dehydrated with a gradient of ethanol and desiccated with hexamethyldisilazane before SEM analysis. Scaffolds were coated by sputtering with a thin layer of carbon.

To obtain fluorescence microfibers suitable for confocal microscopy, the dye Nile Red (Sigma, CAS 7385-67-3), was added to the polymer solution at a concentration of 5  $\mu\text{g/mL}$  to prepare random or aligned microfibers. Nile Red is a fluorescent lipophilic dye for fatty tissue, it is soluble in DMF and non-soluble in water. Fluorescent microfibers seeded with MC3T3 were observed by confocal microscopy on a Leica SP8 confocal microscope C equipped with 4 lasers. Microfiber scaffolds were stained with calcein (Sigma, CAS





**Fig. 7.** SEM images (secondary electrons) of a layer of cells cultured on the scaffolds after 28 days of culture in osteogenic medium, (A) A<sub>1</sub>F; (B) A<sub>2</sub>F; (C) R<sub>1</sub>F; (D) R<sub>2</sub>F. Note the development of calcified nodules (calcospherites) at the surface of the aligned (E) and random (F) fibers.

number 154071-48-4) at a concentration of 150 μg/mL during 30 min to stain calcified nodules with a green fluorescence. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) was added at a concentration of 2 μg/mL during 5 min to counterstain nuclei in blue. Images were taken at a magnification of 630×. Cytometric analysis of cell nuclei was done with ImageJ on the confocal images of cells cultured on the two types of scaffolds (on the DAPI planes). The area (*A*) and perimeter (*P*) of the nuclei were determined and several shape factors were derived [20]. A shape factor describes the shape of a particle. Circularity (*Circ*) was determined as:

$$\text{Circ} = \frac{4\pi A}{P^2}$$

a value of 1 indicates a perfect circle, and a value of 0 an infinitely elongated shape.

Feret's diameter (*D<sub>Feret</sub>*) is the longest distance between two parallel tangents to opposite sides of a particle.

Aspect ratio (*AR*) is defined as the ratio of the length of the major axis (the maximum distance between two points on the perimeter) and the minor axis (minimum distance between two points linked by a line crossing the center of mass of the particle).

$$\text{AR} = \frac{D_{\max}}{D_{\min}}$$

#### 2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was done with Systat 13 (Systat Inc., San José, CA). For each parameter, results are expressed as mean ± standard

deviation. Differences between the groups were sought with the Kruskal–Wallis non parametric analysis of variance followed by the Conover Inman Test for all pairwise comparisons. The comparison between two groups was done by the non-parametric Mann–Whitney *U* test. A difference was considered as significant when *p* < 0.05.

### 3. Results

#### 3.1. Characterization of fibers

Optimum electrospinning conditions were found in a preliminary study by changing the polymer concentration and the electrospinning parameters. The drum collector was used to its maximal rotation capacity to produce aligned fibers (at a lower rotation speed, fibers were only partially aligned). Aligned scaffolds were composed by a majority of fibers oriented along the rotational axis, although some fibers seem occasionally disoriented. Scaffolds formed a dense surface with a thickness of about 1.0 mm and a microporosity in the form of interconnected voids between the fibers. SEM showed that all fibers presented a rough surface. Aligned fibers had a diameter range of 1.5–4.5 μm, and random fibers have diameters range of 1–3.5 μm (Fig. 1).

Fractal dimensions for the thin aligned and random fibers appear Fig. 2. *D<sub>sky</sub>*, *D<sub>+</sub>* and *D<sub>−</sub>* were significantly higher for random fibers than for aligned fibers for *D<sub>sky</sub>* and *D<sub>−</sub>*, and for *D<sub>+</sub>*. Values of fractal dimensions confirm that random fibers were more

irregularly disposed in all space directions. For the largest fibers, results were similar (data not shown).

NanoCT analysis confirmed these observations and evidenced the orientation of fibers and the interconnected spaces in the scaffold (Fig. 3).

### 3.2. Cell adhesion study

The kinetics of MC3T3 adhesion on the membranes at 1, 3, 6 and 12 h after seeded is shown Fig. 4. Number of cells increased from 20% to 70% up to 12 h. After 1 h, 3 h and 6 h, the number of attached cells on R<sub>1</sub>F was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the number of cells attached to the other membranes, but after 6 h the number of attached cells was not increased. Between 6 and 12 h, the number of cells on A<sub>1</sub>F and A<sub>2</sub>F increased from 35% to 70% ( $p < 0.05$ ) compared with the initial number of cells. There was no significant difference between A<sub>1</sub>F, A<sub>2</sub>F and R<sub>1</sub>F at 12 h. The final number of cells adhered on R<sub>2</sub>F was lower, representing just over 30% of the initial number of cells.

### 3.3. Cell proliferation study

Fig. 5 shows the proliferation of MC3T3 on fibers at day 1, 3 and 7. The number of cells increased until day 7, demonstrating that proliferation occurred on all substrates. On day 1, there was no significant difference whatever the scaffold. At day 3 and 7, the cell

proliferation increased by 125% on A<sub>1</sub>F, A<sub>2</sub>F and R<sub>1</sub>F, whereas it was 80% on R<sub>2</sub>F ( $p < 0.05$ ).

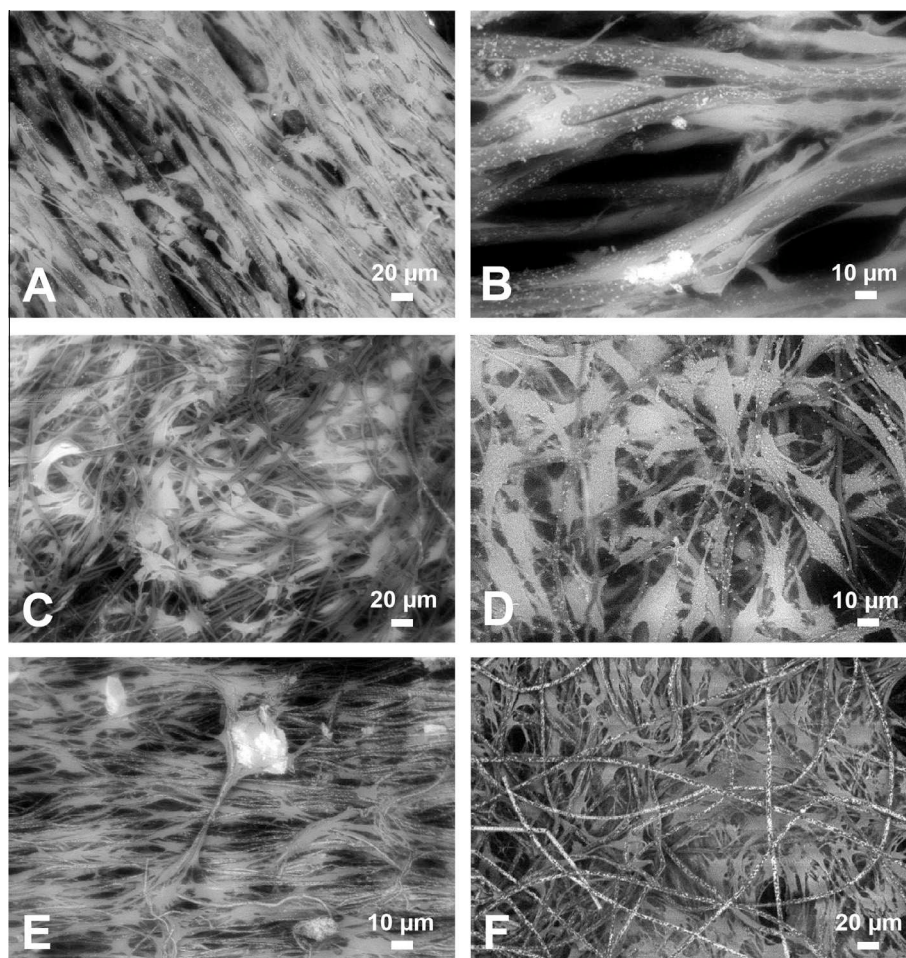
### 3.4. Cell differentiation study

#### 3.4.1. ALP activity

ALP activity was measured at days 14 and 28 as shown in Fig. 6. It decreased between day 14 and 28 of culture because the mineralization phase starts after 14 days and ALP activity decreased in parallel. On day 14, ALP activity was significantly lower on the R<sub>2</sub>F group ( $p < 0.05$ ) than all other types of fiber network. On day 28, there was significant difference between A<sub>1</sub>F and R<sub>2</sub>F; the ALP activity was above 1 nmol/μg min on A<sub>1</sub>F but below 1 nmol/μg min for the other scaffolds.

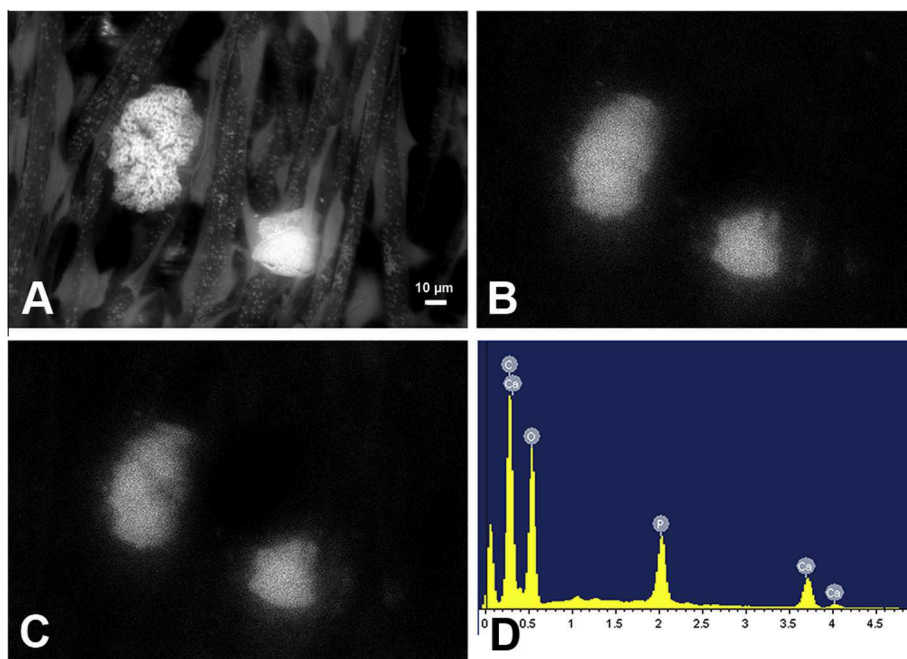
#### 3.4.2. SEM

In the secondary electron mode, a dense layer of cells covered the fibers (Fig. 7). Cells were also attached on the fibers situated on the deeper planes. Small calcified nodules (calcospherites) were found attached to the fibers and their diameter ranged between 0.8 and 1.5 μm (Fig. 7E and F). Nevertheless, this analytical mode does not allow a clear identification of the cell's shape. When scaffolds were observed by the backscattered electron mode, their shape was more easily defined (Fig. 8). On the aligned fibers, cells were preferentially aligned and stretched lengthwise following the fiber axis while, they were not oriented on the random fibers. On A<sub>1</sub>F, a cell entirely occupied the surface of a single fiber (Fig. 8A and B)

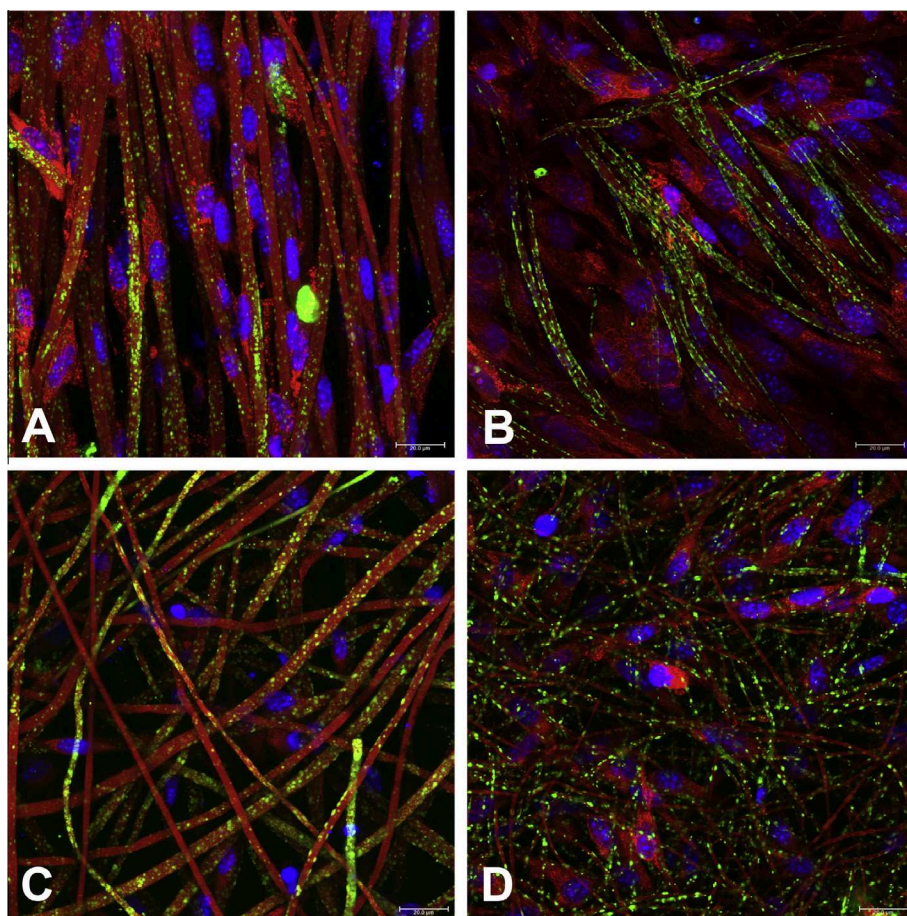


**Fig. 8.** SEM images (backscattered electrons) of cells cultured on the scaffolds after 28 days. Cells appear on light gray, fibers in dark gray and calcified nodules in white. (A and B) A<sub>1</sub>F; (C and D) R<sub>1</sub>F; (E) A<sub>2</sub>F; (F) R<sub>2</sub>F.





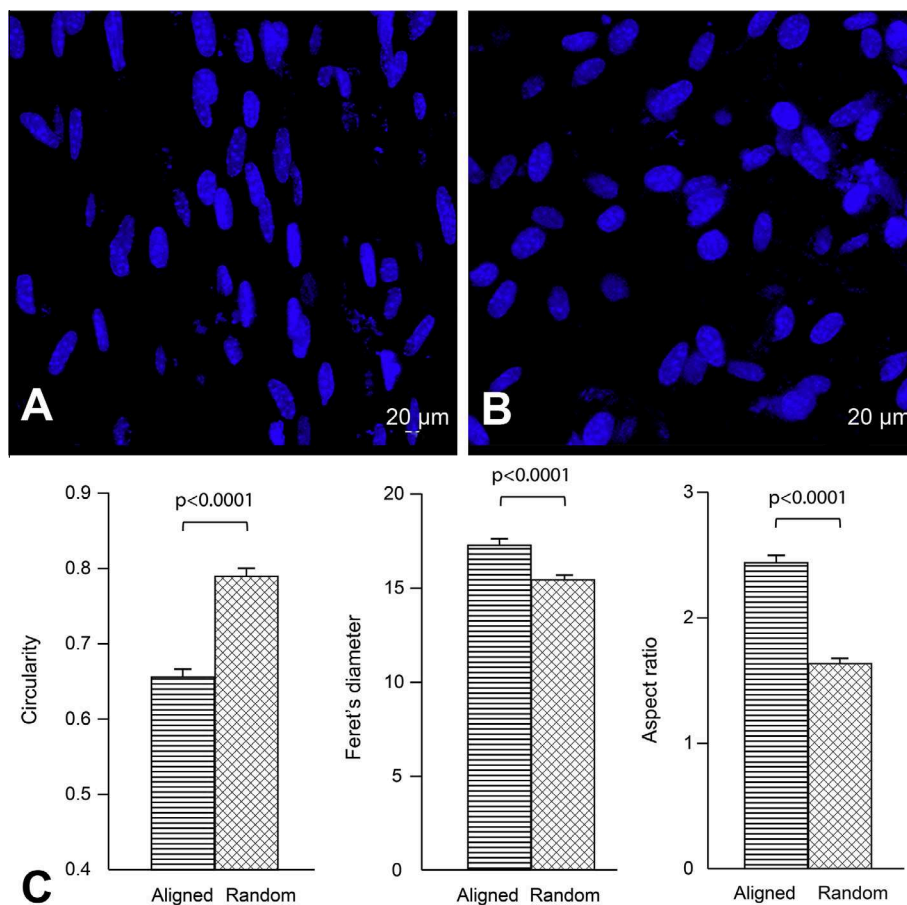
**Fig. 9.** (A) SEM image (backscattered electrons) of 2 calcospherites grown on PS fibers. EDX analysis with (B) calcium mapping, (C) phosphate mapping, (D) EDX spectrum with calcium and phosphate peaks.



**Fig. 10.** Confocal images of fibers labelled in red by Nile Red, nuclei stained in blue with DAPI and calcified nodules stained in green with calcein, after 28 days of culture in osteogenic medium (A) A<sub>1</sub>F; (B) A<sub>2</sub>F; (C) R<sub>1</sub>F; (D) R<sub>2</sub>F.

while on R<sub>1</sub>F fibers cells were spread over several fibers (Fig. 8C and D). Similar findings were observed on the A<sub>2</sub>F and R<sub>2</sub>F scaffolds (Fig. 8E and F). The spaces between each fiber and

their diameter determine pores available in the scaffolds available for colonization by other cells. Small calcospherites developed at the fiber surface (1 μm diameter) or as white aggregates (about



**Fig. 11.** Nuclei of MC3T3 cells stained with DAPI for the determination of shape factors; cells were seeded on aligned (A) and random fibers (B). Shape factors: circularity, Feret's diameter and aspect ratio of nuclei on aligned fibers and on random fibers.

several tens of microns). EDX analysis confirmed that they were composed of calcium and phosphorus (Ca/P ratio = 1.38) and maps of calcium and phosphate are illustrated on Fig. 9.

#### 3.4.3. Confocal microscopy

Fibers were containing Nile Red and appeared in red. Cell nuclei were stained in blue with DAPI and calcified nodules were labelled with calcein in green (Fig. 10). Cells nuclei were visible on the first layer of fibers but also in depth below the first fibers, especially for the scaffolds prepared with fibers having the larger diameter. Calcified nodules were fixed all along the fibers length.

Cytometric analysis evidenced an elongation of the nuclei along the axis of the fibers in the AF scaffolds. Fig. 11 shows nuclei stained with DAPI on aligned fibers (A) and random fibers (B). Circularity was significantly higher on random fibers ( $p < 0.0001$ ), Feret's diameter was significantly reduced on random fibers ( $p < 0.0001$ ) and aspect ratio was significantly higher on the aligned fibers ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 11C). Taken together, this evidenced that nuclei were rounder on the RF and elongated on the AF.

#### 4. Discussion

Electrospun fibers of PS were developed using several different parameters such as polymer concentration in the solution, flow rate of the solution, power supply applied, distance between the collector and the needle and the type of collector. The diameter, morphology and orientation of fibers were controlled by these parameters as previously described by others [14–17]. At lower concentrations (below 20%), fibers had not a regular diameter and beads occurred in the scaffold. During the preparation of AF

scaffolds, some fibers had an aberrant orientation at the top layer of the scaffold, this may be due to residual electrical charges on the collecting fibers. An electrically charged polymer jet can be created when the applied electrical force overcomes the surface tension of the polymer solution [10]. In the present study, we selected aligned fibers having a diameter range of 1.5–4.5 μm and random fibers with a diameter range of 1–3.5 μm. Fractal dimensions show that random fibers occupied more the space on a disordered way.

Electrospun scaffolds offer an ideal fibrillar porous structure for cell and osteoconduction. Badami et al., showed that density of MC3T3 osteoprogenitor cells, seeded on fibers diameters ranging from 0.14 to 2.1 μm, is increased on fibers with the largest diameter [9]. Serafim et al. [3], investigating porous scaffolds based on polystyrene microfibers (5–50 μm diameters), showed that cells adhere and proliferate on the fibers' surface. The use of PS scaffolds seems to be promising to prepare membranes and sheets for bone grafting. SEM and confocal images showed a dense layer of cells at the surface of the scaffolds and revealed that cells had also infiltrated more in depth the scaffolds.

Effects of fibers alignment and size were investigated for cell adhesion, proliferation and differentiation. Scaffolds of random fibers with the largest diameter were the most suitable for cell adhesion in short culture. These fibers had a higher interconnected porosity with different size and shape of pores compared with those with a lower diameter. Porosity seems to play a key role in adherence and infiltration of cells: aligned fibers creates inter-fiber longitudinal pores. By increasing the proximity between fibers with the use of thin fibers, porosity was reduced and fewer cells can penetrate into the scaffolds. In this study, aligned fibers



seemed to promote proliferation of cells independently of the fiber diameter but differences were not significant.

Cell proliferation on aligned fibers can be favored by their resemblance to the collagen fibers making up the natural bone matrix. In addition, the surface roughness of the fibers is a key factor in cell adherence and spreading [21]. ALP activity was found independent of the fiber diameter and of their arrangement. Calcospherites were present in all the scaffolds and their development is also favored by surface irregularity of the fibers allowing crystal nucleation. Calcospherites develop spontaneously at the fiber surface even in the absence of cell (data not shown); these experiments were done by immersing fibers in an osteogenic medium during 28 days, a time period sufficient to allow spontaneous secondary nucleation of hydroxyapatite crystals onto PS asperities. Yang et al., showed that neural differentiation was independent of the orientation on poly(L-lactic acid) fibers [10]. Ma et al., indicated that ALP activity of osteoblasts (derived from bone marrow stromal cells) was not different on aligned and random poly(L-lactic acid) fibers but they evidenced a more mineral deposits on the aligned fibers [22].

To determine how scaffolds affect cell morphology, nuclei were stained with DAPI. Circularity, Feret's diameter and aspect ratio of nuclei indicated that MC3T3 changed their original round shape to an elongated one, along the aligned fibers. It was reported that elongation of the cell was favored on aligned electrospun fibers of poly(L-lactic-co-epsilon-caprolactone) and poly(L-lactic acid) fibers [22–24].

## 5. Conclusion

Scaffolds of polystyrene fibers having different micron diameters and arrangement have been developed. Influence of diameter and arrangement of the fibers was studied by measuring cell adhesion, proliferation and differentiation. Cells adhesion was conditioned by the fiber disposition and inter-fiber porosity. During the first hours of culture, cells were more adherent on the random fibers with a large diameter; porosity of the scaffolds favored the initial adherence of the cell and their infiltration. However, cells seem to have a greater rate proliferation on aligned fibers with a large diameter. Fibers size and alignment have no influence on ALP activity. The surface roughness of the fibers also favor the development and growth of calcospherites, another factor favoring cell attachment [25]. The present study does not underestimate the potential of biodegradable ceramics or polymers in bone regeneration. However, in some clinical circumstances such as bone oncologic surgery, neurosurgery or dental implantology, the dogma of using resorbable materials can be overcome. It offers a different perspective by investigating a new strategy mainly based on non-resorbable polymers in large bone defects where osteoconduction needs a solid scaffold. Examples of non-resorbable polymers (Gore-tex membranes, poly(2-hydroxyl ethylmethacrylate) coated with calcium hydroxide) have provided successful results [26–28]. *In vivo* implantation of poly(styrene) scaffolds composed of microfibers are now under study in our laboratory.

## Conflict of interest

Authors have no conflict of interest.

## Acknowledgments

This work was made possible by grants from ANR, program Lab-Com “NextBone”. Miss L. Terranova received an Erasmus Mundus Ph.D. scholarship (program Nanofar).

## References

- [1] R. Dimitriou, G.I. Mataliotakis, A.G. Angoules, N.K. Kanakaris, P.V. Giannoudis, Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review, *Inj. Int. J. Care Inj.* 42 (2011) S3–S15.
- [2] E.M. Younger, M.W. Chapman, Morbidity at bone graft donor sites, *J. Orthop. Trauma* 3 (1989) 192–195.
- [3] A. Serafim, R. Mallet, F. Pascaretti-Grizon, I.C. Stancu, D. Chappard, Osteoblast-like cell behavior on porous scaffolds based on poly(styrene) fibers, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 609319.
- [4] C.B. Khatiwala, S.R. Peyton, A.J. Putnam, Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290 (2006) C1640–C1650.
- [5] J.H. Jang, O. Castano, H.W. Kim, Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 1065–1083.
- [6] Z.W. Ma, M. Kotaki, R. Inai, S. Ramakrishna, Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds, *Tissue Eng.* 11 (2005) 101–109.
- [7] Q.P. Pham, U. Sharma, A.G. Mikos, Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review, *Tissue Eng.* 12 (2006) 1197–1211.
- [8] M.P. Lutolf, J.A. Hubbell, Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 47–55.
- [9] A.S. Badami, M.R. Kreke, M.S. Thompson, J.S. Riffle, A.S. Goldstein, Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates, *Biomaterials* 27 (2006) 596–606.
- [10] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna, Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, *Biomaterials* 26 (2005) 2603–2610.
- [11] M.L. Brandi, P. Collin-Osdoby, Vascular biology and the skeleton, *J. Bone Miner. Res.* 21 (2006) 183–192.
- [12] S.H. Lim, H.Q. Mao, Electrospun scaffolds for stem cell engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 1084–1096.
- [13] S.C. Baker, N. Atkin, P.A. Gunning, N. Granville, K. Wilson, D. Wilson, et al., Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional *in vitro* biological studies, *Biomaterials* 27 (2006) 3136–3146.
- [14] L. Wannatong, A. Sirivat, P. Supaphol, Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene, *Polym. Int.* 53 (2004) 1851–1859.
- [15] T. Jarusuwanapoom, W. Hongrojanawiwat, S. Jitjaicham, L. Wannatong, M. Nithitanakul, C. Pattamaprom, et al., Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers, *Eur. Polym. J.* 41 (2005) 409–421.
- [16] C.L. Casper, J.S. Stephens, N.G. Tassi, D.B. Chase, J.F. Rabolt, Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process, *Macromolecules* 37 (2004) 573–578.
- [17] T. Uyar, F. Besenbacher, Electrospinning of uniform polystyrene fibers: the effect of solvent conductivity, *Polymer* 49 (2008) 5336–5343.
- [18] D. Chappard, I. Degasne, G. Huré, E. Legrand, M. Audran, M.F. Baslé, Image analysis measurements of roughness by texture and fractal analysis correlate with contact profilometry, *Biomaterials* 24 (2003) 1399–1407.
- [19] J.C. Russ, *Fractal Surfaces*, Springer Science & Business Media, 2013.
- [20] A.M. Bouwman, J.C. Bosma, P. Vonk, J.A. Wesselingh, H.W. Frijlink, Which shape factor(s) best describe granules?, *Powder Technol.* 146 (2004) 66–72.
- [21] I. Degasne, M.F. Baslé, V. Demais, G. Huré, M. Lesourd, B. Grolleau, et al., Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces, *Calcif. Tissue Int.* 64 (1999) 499–507.
- [22] J. Ma, X. He, E. Jabbari, Osteogenic differentiation of marrow stromal cells on random and aligned electrospun poly(L-lactide) nanofibers, *Ann. Biomed. Eng.* 39 (2011) 14–25.
- [23] C.A. Bashur, L.A. Dahlgren, A.S. Goldstein, Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes, *Biomaterials* 27 (2006) 5681–5688.
- [24] C.Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering, *Biomaterials* 25 (2004) 877–886.
- [25] R. Filmon, M.F. Baslé, H. Atmani, D. Chappard, Adherence of osteoblast-like cells on calcospherites developed on a biomaterial combining poly(2-hydroxyethyl) methacrylate and alkaline phosphatase, *Bone* 30 (2002) 152–158.
- [26] M. Sharawy, S. Tehemar, P. Hanes, Enhancement of osseointegration of implants placed into extraction sockets of healthy and periodontally diseased teeth by using PepGen p-15, GORETEX membrane, or combination, *J. Dent. Res.* 82 (2003) B179–B.
- [27] B.L. Eppley, Evaluation of HTR polymer as a craniomaxillofacial graft material, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 47 (1989) 132–133.
- [28] J. Barrientos, R. Alvarez, M.G. Cantera, A. Verrier, Reconstruction of a large osseous zygomatic defect with a computer-generated HTR<sup>®</sup> implant, *J. Cranio-Maxillo-Fac. Surg.* 34 (S1) (2006) 212.

## ARTICLE 2

Repair of calvarial bone defects in the mice using  
electrospun polystyrene scaffolds combined with  $\beta$ -TCP  
or gold nanoparticles

Terranova L., Dragusin D. M., Mallet R., Vasile E.,  
Stancu I. C., Catherine B., Chappard D.

Micron, 93 : 29-37, 2017

Facteur d'impact 2015 : 1.838



Les biomatériaux visent à remplacer un tissu lorsque les mécanismes de régénération sont insuffisants voire absents. De nombreux polymères synthétiques sous forme de matrices tridimensionnelles et poreuses sont développés et étudiés. Ils doivent répondre à des normes bien précises, telles que la biocompatibilité, la cytocompatibilité et l'ostéoconduction. Leur architecture, incluant notamment la porosité, et leur état de surface sont des facteurs influençant les processus cellulaires. Précédemment, des membranes fibreuses de polystyrène ont été développées et caractérisées par imagerie. Les membranes offrent une architecture poreuse et interconnectée avec une surface rugueuse. Leur biocompatibilité et leur cytocompatibilité ont été montrées *in vitro* par des analyses d'adhésion, de prolifération et de différenciation cellulaire.

Dans cette étude, des membranes de fibres alignées, de 4 µm de diamètre, sont enrichies de grains de  $\beta$ -TCP ou de nanoparticules d'or (AuNPS) afin d'améliorer leur biocompatibilité et leur potentiel ostéogénique. Les grains de  $\beta$ -TCP ont été ajoutés en amont dans la solution de polymère lors de l'électrospinning. Au contraire, les AuNPS ont été greffées sur les fibres puis stabilisées par un traitement à l'acide mercaptosuccinique (MSA). Des groupements carboxyles (-COOH) terminaux recouvrent les AuNPS. La surface des fibres est ainsi rendue nanostructurée et anionique afin d'induire la formation d'hydroxyapatite *in vivo*. Nous avons utilisé un modèle de défaut crânien circulaire de taille critique chez la souris pour évaluer la biocompatibilité et l'ostéoconduction des membranes *in vivo*.

#### *Caractérisation des fibres de PS enrichies avec du $\beta$ -TCP ( $\beta$ -TCP-PS) ou avec des AuNPS (Au-PS)*

Les fibres de PS,  $\beta$ -TCP-PS et Au-PS ont été caractérisées au MEB, en électrons secondaires ainsi qu'en électrons rétrodiffusés. Les fibres  $\beta$ -TCP-PS ont une surface rugueuse, avec des grains de  $\beta$ -TCP enchâssés dans les fibres. Les AuNPs sont réparties régulièrement sur la surface des fibres.

Les analyses en spectroscopie Raman et FTIR nous ont permis de vérifier la présence du  $\beta$ -TCP et des groupements terminaux -COOH immobilisant les AuNPs.

#### *Etude *in vitro* de la cytocompatibilité des membranes PS, $\beta$ -TCP-PS et Au-PS*

La prolifération cellulaire a été testée sur les trois différents types de membranes. Les membranes ont étéensemencées avec des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) pendant 1, 3, 7 jours. Le nombre de cellules viables a été révélé par un test MTT. Les résultats ont montré que l'incorporation de  $\beta$ -TCP dans les membranes augmente la prolifération cellulaire de manière significative, après 7 jours de culture. La bioactivité du  $\beta$ -TCP et la rugosité des fibres ont amélioré la cytocompatibilité des membranes  $\beta$ -TCP-PS.

#### *Analyse *in vivo* de la biocompatibilité et de l'ostéoconduction des membranes $\beta$ -TCP-PS et Au-PS dans un modèle de défaut crânien*

Les membranes  $\beta$ -TCP-PS et Au-PS ont été implantées dans un défaut osseux crânien de taille critique (4 mm) chez la souris. La peau du crâne, préalablement rasée et désinfectée, a été incisée de manière à découvrir l'os pariétal droit. Le défaut est réalisé à l'aide d'une pièce à main électrique équipée d'une fraise

boule de 1 mm de diamètre (Figure 12). Durant l'intervention, le crâne a été irrigué avec du sérum physiologique pour empêcher un échauffement excessif de la zone. La dure-mère a été gardée intacte autant que possible durant l'opération. Les membranes ont été découpées sous forme de disques puis positionnées dans le défaut créé (Figure 12). Ensuite, l'incision a été suturée. Après 6, 9 et 12 semaines, les souris ont été euthanasiées et les crânes ont été prélevés afin d'être analysés. Chaque groupe,  $\beta$ -TCP-PS, Au-PS et témoin (défaut sans matériau de comblement) compte 5 souris pour chaque temps expérimental.

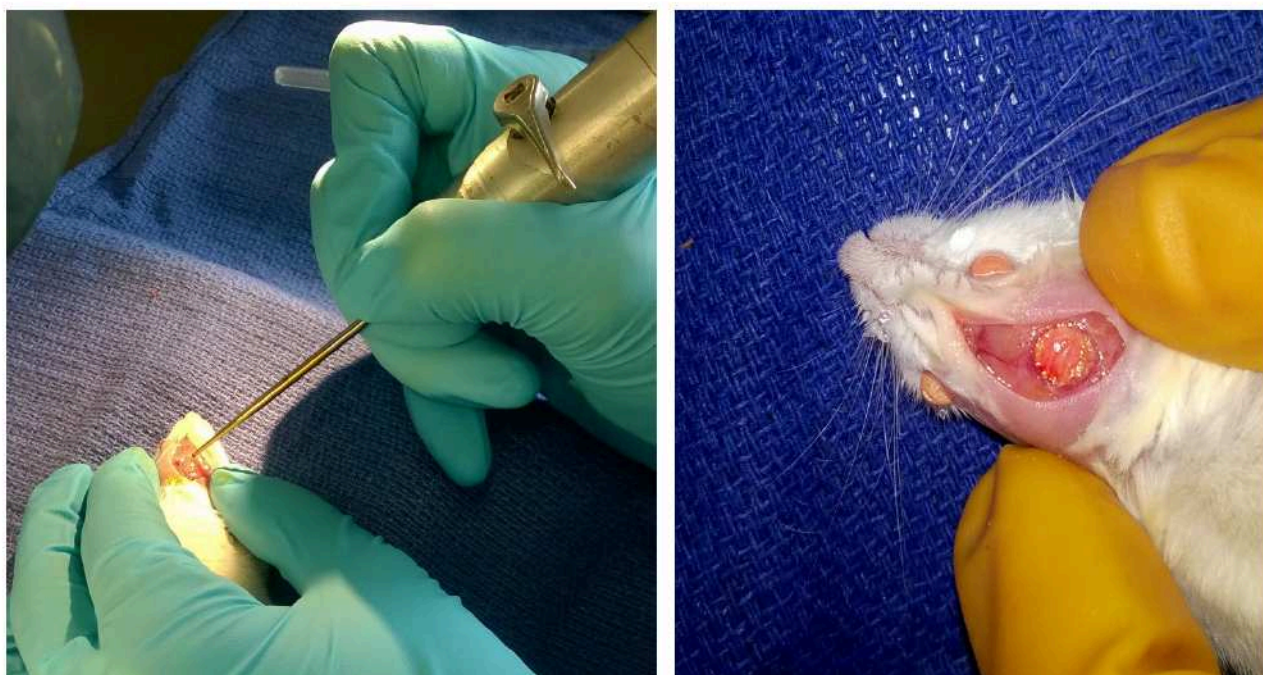


Figure 12 : Création d'un défaut osseux dans l'os pariétal d'une souris grâce à une pièce à main, puis mise en place d'un disque de fibres de PS à la place du défaut.

La microCT a permis l'analyse morphologique et quantitative de l'os nouvellement formé à partir des images de reconstruction tridimensionnelle des crânes. Ces images ont été analysées à l'aide d'imageJ (Figure 13). Une région d'intérêt (ROI) a été tracée autour du défaut initial puis l'image résultante est seuillée. L'aire de l'os nouvellement formé a été calculée par rapport à la surface totale de la ROI (BAR/TAR en %). L'environnement cellulaire et biologique a été évalué par histologie. Les crânes ont été décalcifiés puis inclus dans de la paraffine. Des coupes de 5  $\mu$ m ont été réalisées puis colorées au trichrome de Masson et au rouge sirius.



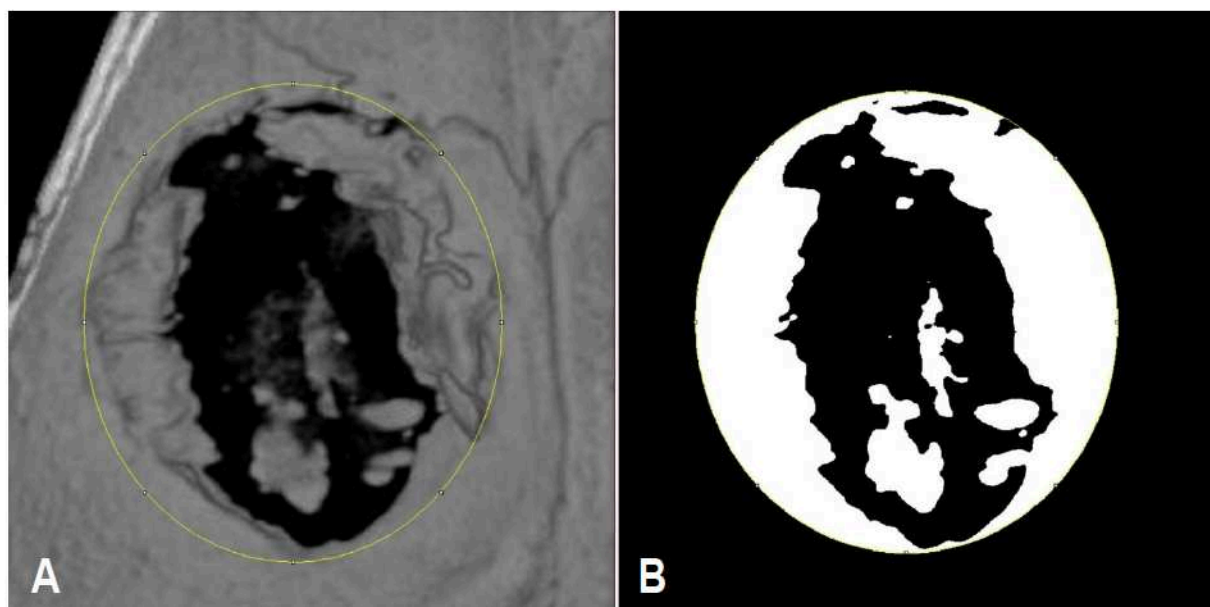


Figure 13 : Défaut osseux dans l'os pariétal droit d'une souris, après implantation d'une membrane  $\beta$ -TCP-PS et sacrifié après 6 semaines. (A) Reconstruction tridimensionnelle en microCT et tracé de la ROI puis (B) binarisation pour calculer l'os néoformé sous ImageJ.

Les résultats ont montré que la quantité d'os nouvellement formé est significativement plus importante dans les groupes de souris greffées avec le  $\beta$ -TCP-PS que pour les autres groupes. Les membranes Au-PS induisent une quantité d'os néoformé plus limitée. Le tissu osseux est apposé depuis les marges du défaut en direction du centre. Le  $\beta$ -TCP favorise l'ostéoconduction des membranes de PS.

Les coupes histologiques des groupes témoins montrent une fine couche de tissu conjonctif comblant le défaut. Les défauts greffés avec les membranes Au-PS (Figure 14) et  $\beta$ -TCP-PS (Figure 15) sont comblés par du tissu osseux néoformé à partir des marges du défaut et par un tissu conjonctif dense au centre du défaut. Les coupes colorées au rouge sirius, observées en lumière polarisée, révèlent la formation d'os lamellaire ou fibreux. Des fibres de PS sont enfermées dans le tissu osseux néoformé mais également dans le tissu conjonctif. De nombreux vaisseaux sanguins sont présents dans le tissu conjonctif. Aucune cellule inflammatoire ou géante n'est visible. Dans les défauts greffés avec les membranes Au-PS, une grande quantité des AuNPs initialement immobilisées sur les fibres ont migré ou ont été phagocytées.

Dans cette étude, nous avons montré que l'incorporation de grains de  $\beta$ -TCP a augmenté la cytocompatibilité des fibres de PS. La bioactivité du  $\beta$ -TCP et l'apparente rugosité de surface des fibres ont favorisé ce résultat. La biocompatibilité et l'ostéoconduction des membranes ont été testées *in vivo*. Les membranes  $\beta$ -TCP-PS favorisent la formation de tissu osseux néoformé par rapport aux membranes Au-PS et aux groupes témoins. Néanmoins, la réparation osseuse n'est pas complète. Les membranes semblent donc seulement biotolérées. Il n'y a pas de foyer inflammatoire ou de cellule géante, et les fibres sont incorporées dans le tissu conjonctif ou l'os nouvellement formé. Les nanoparticules d'or se sont détachées ou ont été phagocytées.

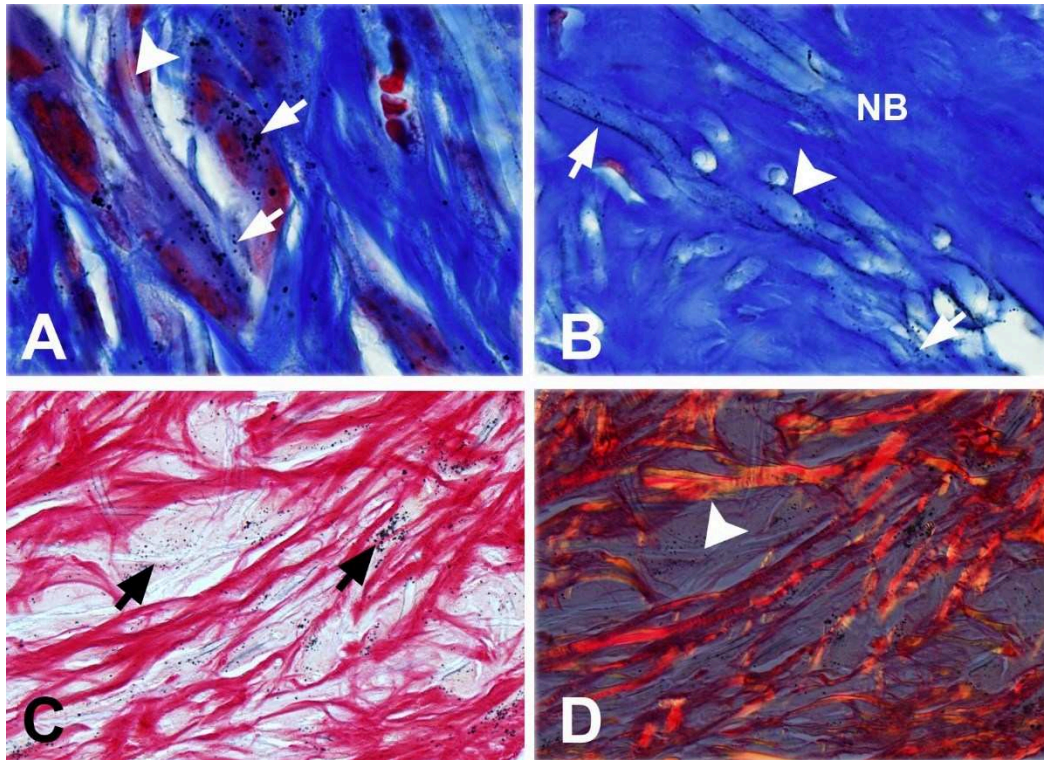


Figure 14 : Coupes histologiques de défauts greffés avec les membranes Au-PS après 9 semaines, colorées avec (A et B) le trichrome de Masson et (C et D) le rouge sirius, et analysées en lumière (C) transmise et (D) polarisée. Agrégats d'AuNPs (flèches), fibres de PS (têtes de flèche), os néoformé (NB).



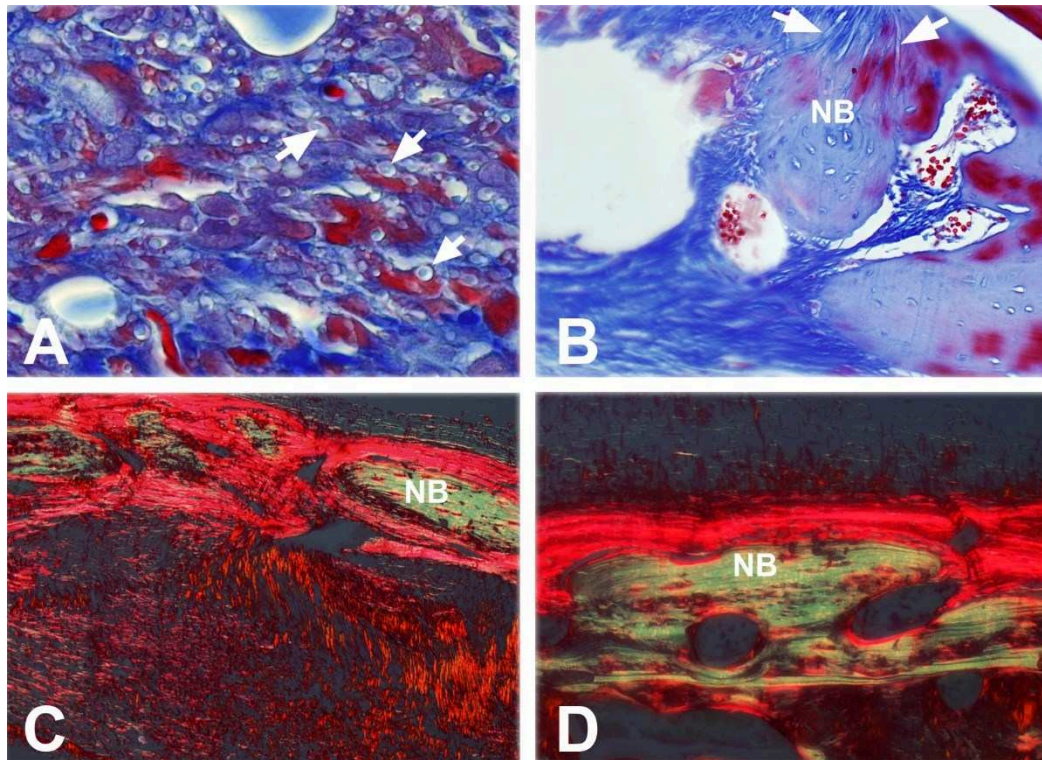


Figure 15 : Coupes histologiques de défauts greffés avec les membranes  $\beta$ -TCP-PS après 9 semaines, colorées avec (A et B) le trichrome de Masson et (C and D) le rouge sirius, et analysées en lumière polarisée. Fibres de PS (flèches), os néoformé (NB).



## Tutorial

# Repair of calvarial bone defects in mice using electrospun polystyrene scaffolds combined with $\beta$ -TCP or gold nanoparticles



Lisa Terranova<sup>a,c</sup>, Diana Maria Dragusin<sup>d</sup>, Romain Mallet<sup>a,b</sup>, Eugeniu Vasile<sup>e</sup>,  
Izabela-Cristina Stancu<sup>d</sup>, Catherine Behets<sup>c</sup>, Daniel Chappard<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> GEROM Groupe Etudes Remodelage Osseux et bioMatériaux – LabCom NextBone, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, Université d'Angers, 49933 Angers Cedex, France

<sup>b</sup> SCIAM, Service Commun d'Imagerie et Analyses Microscopiques, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, Université d'Angers, 49933, Angers Cedex, France

<sup>c</sup> Pôle de Morphologie, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université catholique de Louvain, 1200 Brussels, Belgium

<sup>d</sup> Advanced Polymer Materials Group, Faculty of Applied Chemistry and Materials Science, Faculty of Medical Engineering, University Politehnica of Bucharest, 1-7 Gh Polizu Street, Sector 1, 011061, Bucharest, Romania

<sup>e</sup> University Politehnica of Bucharest, Faculty of Applied Chemistry and Materials Science, Department of Science and Engineering of Oxide Materials and Nanomaterials, No. 1-7 Gh Polizu Street, 011061, Bucharest, Romania

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 October 2016

Received in revised form 4 November 2016

Accepted 4 November 2016

Available online 8 November 2016

## Keywords:

Polystyrene fibers

$\beta$ -TCP

Gold nanoparticles

Electrospinning

Cytocompatibility

Biocompatibility

## ABSTRACT

Non-biodegradable porous polystyrene (PS) scaffolds, composed of microfibers, have been prepared by electrospinning for the reconstruction of large bone defects. PS microfibers were prepared by incorporating  $\beta$ -TCP grains inside the polymer or grafting gold nanoparticles surface functionalized with mercaptosuccinic acid. Cytocompatibility of the three types of scaffolds (PS,  $\beta$ -TCP-PS and Au-PS) was studied by seeding human mesenchymal stem cells. Biocompatibility was evaluated by implanting  $\beta$ -TCP-PS and Au-PS scaffolds into a critical size (4 mm) calvarial defect in mice. Calvaria were taken 6, 9, and 12 weeks after implantation; newly formed bone and cellular response was analyzed by microcomputed tomography (microCT) and histology.

$\beta$ -TCP-PS scaffolds showed a significantly higher cell proliferation *in vitro* than on PS or Au-PS alone; clearly, the presence of  $\beta$ -TCP grains improved cytocompatibility. Biocompatibility study in the mouse calvaria model showed that  $\beta$ -TCP-PS scaffolds were significantly associated with more newly-formed bone than Au-PS. Bone developed by osteoconduction from the defect margins to the center. A dense fibrous connective tissue containing blood vessels was identified histologically in both types of scaffolds. There was no inflammatory foci nor giant cell in these areas. AuNPs aggregates were identified histologically in the fibrosis and also incorporated in the newly-formed bone matrix. Although the different types of PS microfibers appeared cytocompatible during the *in vitro* experiment, they appeared biotolerated *in vivo* since they induced a fibrotic reaction associated with newly formed bone.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:**  $\beta$ -TCP, beta tricalcium phosphate;  $\beta$ -TCP-PS, polystyrene scaffold blended with  $\beta$ -TCP; AuNPs, gold nanoparticles; Au-PS, polystyrene scaffold decorated with gold nanoparticles; BA/TAr, bone area/total area; DMF, N,N-dimethylformamide; EDS, energy X-ray dispersive spectroscopy; FTIR, fourier transform infrared spectroscopy; hMSC, human mesenchymal stem cells; MicroCT, X-ray microcomputed tomography; MSA, mercaptosuccinic acid; PS, polystyrene; SEM, scanning electron microscopy; UCL, Université Catholique de Louvain.

\* Corresponding author at: GEROM Groupe Etudes Remodelage Osseux et bioMatériaux – LabCom NextBone, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, Université d'Angers, 49933 ANGERS Cedex, France.

E-mail address: [daniel.chappard@univ-angers.fr](mailto:daniel.chappard@univ-angers.fr) (D. Chappard).

## 1. Introduction

Reconstruction of massive bone defects caused by diseases or traumas (bone cysts, osteolysis after total hip reconstruction, neurosurgical defects, tumor ablation) is a current challenge in orthopedic surgery, oral and maxillofacial surgery. Grafting autologous bone is widely used due to its excellent osteoconductive and mechanical properties (Dimitriou et al., 2011; Younger and Chapman, 1989). However, it requires an additional surgical site leading to an increased morbidity and is necessarily limited in volume. Synthetic osteoconductive materials are developed as an alternative and must fulfill well-defined specifications when in contact with biological tissues and fluids. Three dimensional (3D)

scaffolds of polymer have been proposed to repair a variety of large bone defects. Polymers are an interesting choice because their synthesis can be controlled and various methods have been developed to create 3D porous scaffolds with a controlled architecture. Electrospinning is a promising method to prepare polymer fibers and arrange them into porous 3D scaffolds. Electrospinning produces scaffolds of fibers with a diameter ranging from ten nanometers to a few micron (Ma et al., 2005). Such scaffolds mimic the morphology of the extracellular matrix (ECM), which supports cell proliferation. Scaffolds offer a large surface area per volume ratio to ensure cell infiltration, spreading, and proliferation. The interconnected porosity also promotes angiogenesis which is responsible for the transport of osteoprogenitor cells, oxygen, and nutrients to the grafted site (Brandi and Collin-Osdoby, 2006). Polystyrene (PS), a non-resorbable and cytocompatible polymer, was electrospun to produce microfibers. PS scaffolds seem a promising solution to support bone regeneration in cases of large size bone defect. We have previously shown that PS fibers promote cell proliferation and differentiation *in vitro* (Baker et al., 2006; Serafim et al., 2014; Terranova et al., 2016).

The aim of this study was to develop scaffolds of PS fibers alone or combined with an additional osteoconductive material: gold or beta tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP).  $\beta$ -TCP is a well-known biocompatible ceramic, its chemical composition and crystallinity are close to the mineral phase of bone and confer excellent osseointegration properties (Chappard et al., 2010).  $\beta$ -TCP incorporated in natural or synthetic polymers increases their biocompatibility (Lao et al., 2011; Park et al., 2016). Gold nanoparticles (AuNPs) show biocompatibility and non-cytotoxicity (Sperling et al., 2008). They present a particular interest for nanotechnology research in biology due to their small size, high surface-to-volume ratio, and an easy surface modification through various functional amine or thiol groups. AuNPs were proposed as a contrasting agent for *in vivo* X-ray tomography, drug and gene delivery and biosensing (Sperling et al., 2008). AuNPs provide the advantage to have antioxidant effects by inhibiting reactive oxygen species and reactive nitrite species (Shukla et al., 2005). For bone application, surfaces decorated with thiol functional groups may stimulate apatite formation *in vivo* (Vasile et al., 2012). Scaffolds of  $\beta$ -TCP-PS and Au-PS fibers were prepared and characterized by scanning electron microscopy (SEM). They were seeded with human mesenchymal stem cells (hMSC) to analyze cytocompatibility *in vitro*. Scaffolds of PS,  $\beta$ -TCP-PS and Au-PS were studied in the critical-size calvarial bone defect model in mice to evaluate the biocompatibility (An and Freidman, 1999). The healing of bone defect was evaluated by X-ray micro-computed tomography (microCT) and histology.

## 2. Material and methods

### 2.1. Preparation of PS scaffolds by electrospinning

#### 2.1.1. Preparation of PS scaffolds

Electrospinning conditions of PS scaffolds were determined in a previous study (Terranova et al., 2016). PS fibers were produced by electrospinning using an Electrospinner x.x.S/D-500 (YFlow, Malaga, Spain). The polymer solution was prepared at a concentration of 30% (w/v) in *N,N*-dimethylformamide (DMF, Sigma). The polymer solution was loaded into a 10 mL plastic syringe controlled by a pump at 5 mL/h. A Teflon tube was connected from the syringe to a needle (inner diameter: 0.6 mm) disposed vertically. A 15 kV high voltage power supply was applied to the solution to induce a charge on the surface of the polymer droplet at the tip of the needle. When a critical voltage is reached, the droplet elongates and a solution jet is ejected to a collector. The distance between the needle and the collector was maintained at 10 cm. Aligned fibers were

produced with a drum collector with a rotation of 2400 rpm. After one hour, a thin sheet of microfibers could be detached from the collector and used for further analysis.

#### 2.1.2. Preparation of Au-PS scaffolds

PS fibers were decorated with AuNPs from a modified protocol starting from chloroauric acid using a modified citrate reduction method (Storhoff et al., 1998). Briefly, 68  $\mu$ L 4 wt% gold(III) aqueous solution were added in a 50 mL flask placed on a magnetic stirrer. They were further diluted with 10 mL of a 50 v/v% EtOH aqueous solution. The resulting gold(III) solution was heated up to 70 °C using a water bath and a 12 cm<sup>2</sup> PS sheet was immersed into this solution while stirring. After 10 min, 1 mL of 1% trisodium citrate aqueous solution was added and stirring was continued for 6 h after the solution has turned deep violet. The gold-coated polymer microfibers were rinsed with a 50 v/v% ethanol aqueous solution. The microfibers were further immersed in 1 mM ethanolic solution of mercaptosuccinic acid (MSA), for 24 h at room temperature. Then, extensive washing with ethanol was performed to remove excess acid. At this step, the Au-PS fibers had a purple-violet color due to the presence of the AuNPs.

#### 2.1.3. Preparation of $\beta$ -TCP-PS scaffolds

PS microfibers containing  $\beta$ -TCP particles were prepared by electrospinning by adding  $\beta$ -TCP particles (Kasios, L'Union, France) (20% w/v) in the DMF. Sonication for 15 min ensured a homogeneous suspension. PS was then added at the same concentration than above. The solution was finally sonicated again for 30 min to disrupt possible agglomerates and electrospun as described above.

### 2.2. Characterization of the PS scaffolds

Surface morphology of the different fibers was determined by SEM on a JEOL 6301F (JEOL Paris, France) using the secondary electron mode. The backscattered electron mode was also used on a SEM (EVO LS10, Carl Zeiss Ltd., Nanterre, France) for  $\beta$ -TCP-PS. Au-PS were analyzed on a QUANTA INSPECT F SEM with 1.2 nm resolution. Microfibers were coated with a thin layer of carbon by sputtering with a high vacuum coater (Leica EM ECA600, Leica, France). Images were captured at 3 kV acceleration voltage in the secondary electron mode and a working distance of 13 mm. Energy X-ray dispersive spectrometry (EDS) was used to characterize the presence of calcium-phosphate on  $\beta$ -TCP-PS and gold on the Au-PS microfibers.

### 2.3. Surface characterization of Au-PS and $\beta$ -TCP-PS scaffolds

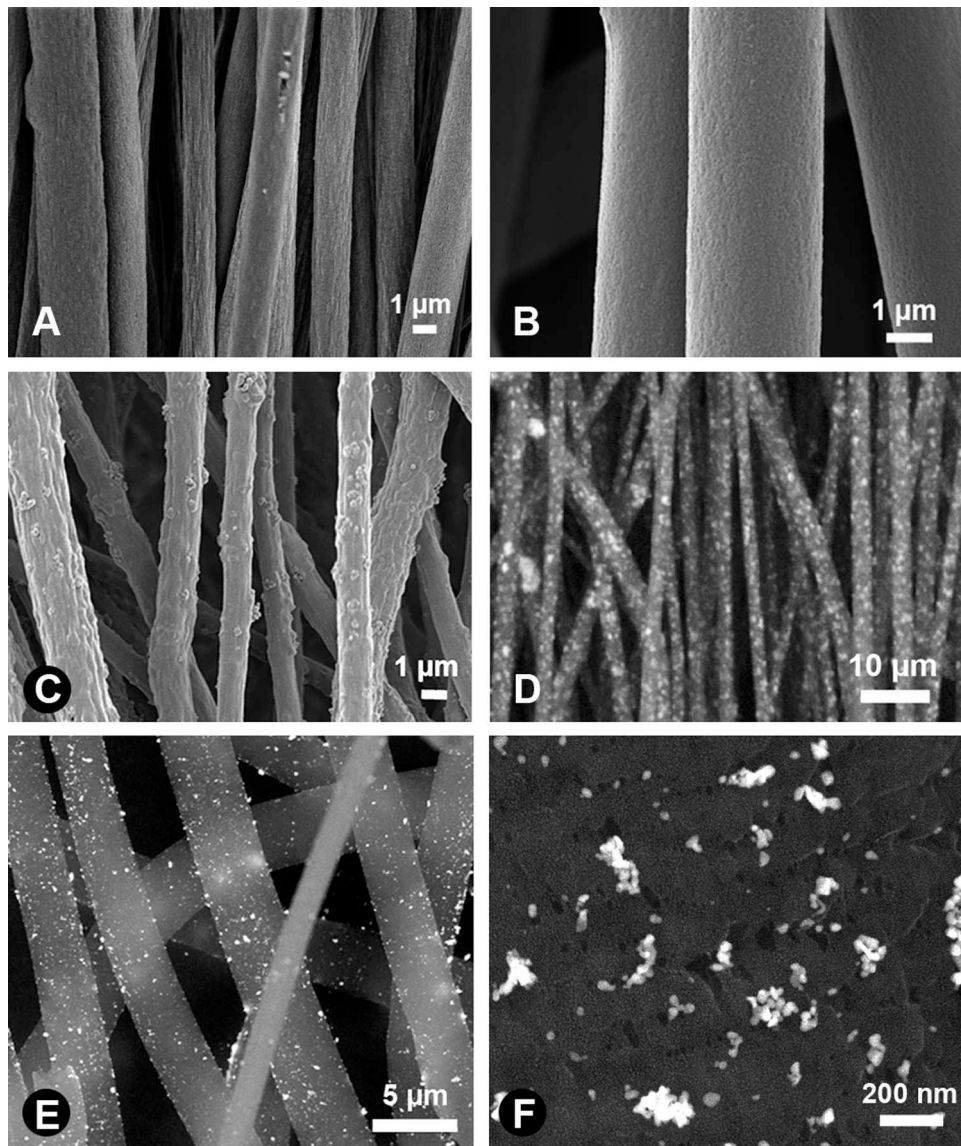
For the Au-PS fibers, attenuated total reflectance (ATR)/Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to identify the presence of the carboxyl-surface functionalization of the microfibers. FTIR was done using a Jasco 4200 spectrometer equipped with a Specac Golden Gate ATR device, at a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> and an accumulation of 100 spectra, in the 4000–600 cm<sup>-1</sup> wavenumber region.

Raman spectroscopy was used to characterize the presence of phosphate groups on the  $\beta$ -TCP-PS microfibers. Analysis were performed on a Senterra microscope with a 523 nm excitation laser wavelength, excitation power of 50 mW and 3–5 cm<sup>-1</sup> resolution. The OPUS 5.5 software (Bruker optic, Ettlingen) was used to collect the spectra. The final spectra were obtained by averaging five scans acquired during 40 s.

### 2.4. Culture of human mesenchymal stem cells

Human mesenchymal stem cells (hMSC) were obtained from Promocell and cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle





**Fig. 1.** The different polystyrene scaffolds of aligned fibers prepared by electrospinning and observed in SEM: (A and B) polystyrene scaffold, (C and D)  $\beta$ -TCP-PS scaffold, note the  $\beta$ -TCP grains embedded in fibers, (E and F) Au-PS, gold nanoparticles are affixed onto the surface of the fibers.

Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. The medium was replaced every 2 or 3 days and the culture was maintained in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The scaffolds were cut into circular disks (20 mm in diameter) and placed in 12 well tissue culture plates. The disks were sterilized in 70% ethanol during three hours. They were then washed several times in sterile PBS and immersed in DMEM for a night.

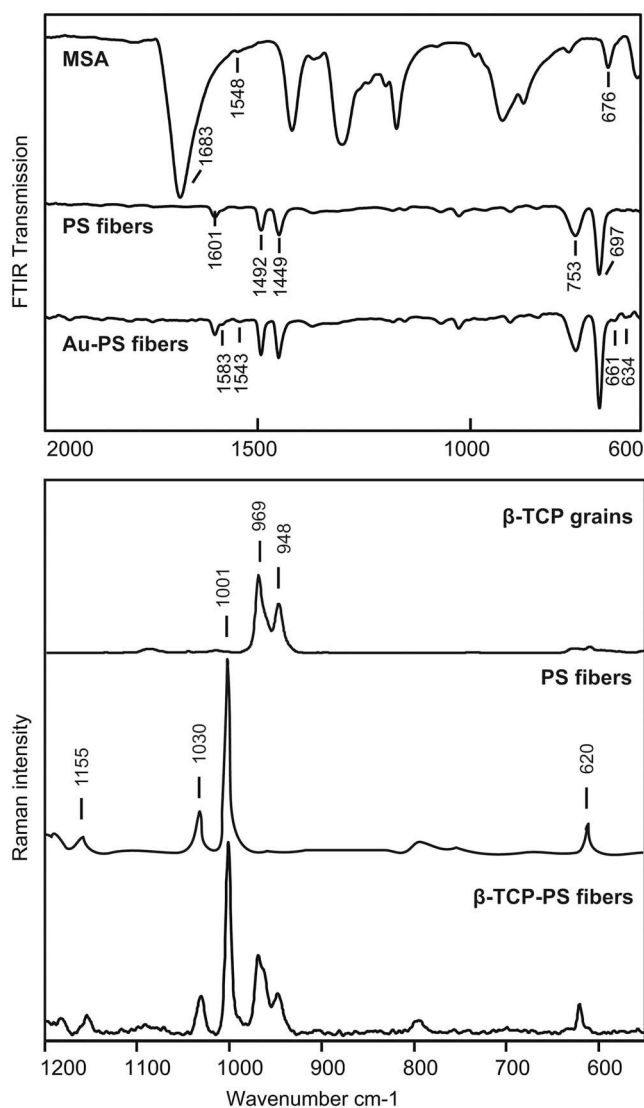
To evaluate cell proliferation, hMSC cells were seeded on the scaffolds at a concentration of  $2 \times 10^4$  cells/mL, and cultured during 1, 3, and 7 days. The culture medium was refreshed every two or three days. At each time point, the number of viable and attached cells was determined by MTT assay. MTT assay is based on the reaction of mitochondria of the metabolically active cells with a tetrazolium salt (MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Aldrich). Cells were incubated with MTT solution at a concentration of 0.5 mg/mL in PBS for 3 h with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Tetrazolium salt was reduced in purple formazan crystals which were then dissolved in acidified isopropanol. Supernatant was transferred in 96 well plates and absorbance was read at 570 nm with a spectrophotometric plate reader (Molecular

Device, SpectraMax M2). Absorbance is proportional to the number of viable cells. Analysis was done in triplicate for each type of scaffold.

## 2.5. In vivo implantation of scaffolds in calvarial bone defects

Forty five female NMRI mice (8–9 weeks of age) from the UCL animal facility were used as recipient. All animal experiments were performed in accordance with the Animal Care and Use Committee guidelines of the UCL (reference 2014/UCL/MD/021). Mice were anesthetized by an intraperitoneal injection (ketamine-xylazine). Skin was incised on the midline from the occipital to the frontal bone and the underlying periosteum was removed. A full-thickness calvarial defect (4 mm in diameter) in the non-suture right parietal bone was created under physiological saline irrigation with a round bur (1 mm in diameter) fixed in a dental handpiece (EM 2900, GD, Italy). The calvarial disks were carefully removed to keep the dura matter as intact as possible. Sterilized  $\beta$ -TCP-PS or Au-PS scaffolds (diameter 4 mm) were extensively rinsed in PBS and placed into the defect. In control mice, the defect was left unfilled. The skin was closed with a 4.0 polydioxanone suture (Ethicon). Mice were



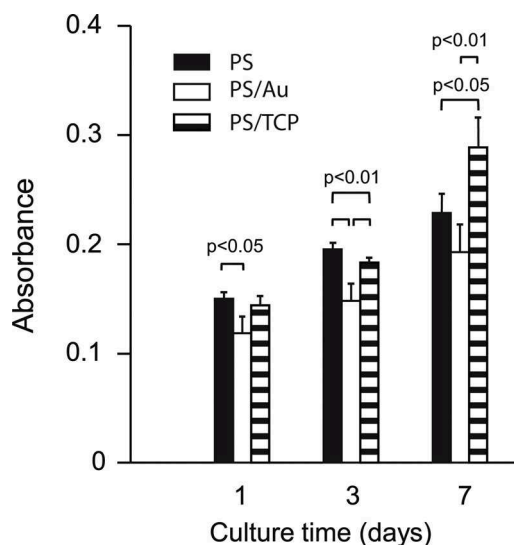


**Fig. 2.** FTIR and Raman spectra of Au-PS and  $\beta$ -TCP-PS fibers respectively. Upper panel: FTIR spectra of MSA and PS alone are figured. The spectrum of the Au-PS fibers shows characteristic peaks for both MSA and PS. Lower panel: Raman spectra of pure  $\beta$ -TCP grains and PS; the last spectrum reveals characteristic peaks of both  $\beta$ -TCP and PS in  $\beta$ -TCP-PS fibers.

euthanized by isoflurane inhalation after 6, 9 and 12 weeks. The head was taken and fixed in 10% buffered formalin. At each time, 5 implanted mice were compared with 5 control mice.

## 2.6. Microcomputed tomography

MicroCT analysis of the calvaria was performed at each time point with a Skyscan 1172 X-ray computed microtomograph (Bruker MicroCT, Kontich, Belgium). Each calvaria, still in the fixative to prevent desiccation, was scanned at 70 kV, 100  $\mu$ A and with a 0.5 mm aluminum filter. The pixel size was fixed at 10  $\mu$ m and a 0.25° rotation angle was applied at each step. For each bone, a stack of 2D-sections was obtained. The CTvox Software (Skyscan, release 3.2.0) was used for the reconstruction of the whole 3D models. New bone formation within the defect was measured from 3D reconstruction images using Image J on the inner side of the calvaria. A ROI was drawn around the initial defect, and the resulting image was thresholded. The fractional area (BAr/TAr, in%) was determined as the ratio between the ROI and the detected new



**Fig. 3.** Proliferation of hMSC cultured on the three different scaffolds: PS, Au-PS, and  $\beta$ -TCP-PS at 1, 3 and 7 days. The initial concentration of cells seeded was  $2 \times 10^4$  cells/mL. Results are expressed in absorbance. Mean for  $n=3 \pm$  SD, significant at  $p < 0.05$ .

bone; the nomenclature follows the recommendation of the ASBMR (Dempster et al., 2013).

## 2.7. Histological analysis

Calvaria were decalcified for two days in OsteoRAL (RAL diagnostics, Martignac, France), dehydrated in graded methanol solutions and embedded in paraffin using a Sakura Tissue Tek VIP 5 Tissue Processor. Serial 5  $\mu$ m-thick sections, were prepared and stained with Masson's trichrome and picosirius red.

## 2.8. Statistical analysis

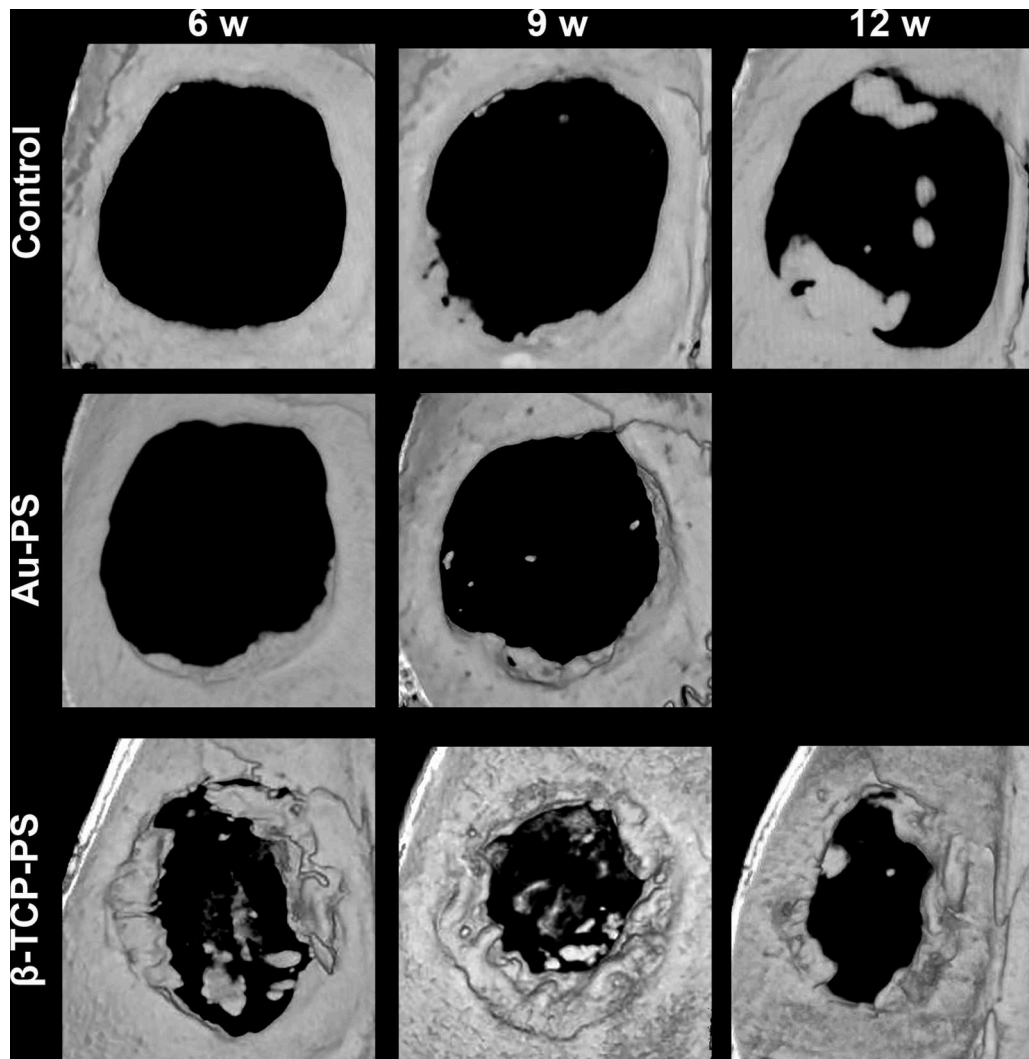
Statistical analysis was performed using the Systat statistical software release 13.0 (Systat Software Inc., San José, CA). All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Differences were analyzed by a non-parametric ANOVA (Kruskal-Wallis) followed by the Conover-Inman test for all pairwise comparisons. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

No complication occurred in the animals after the implantation surgery (such as hematoma, bleeding or hypertrophic scar). Unfortunately, three mice of the Au-PS group at 12 weeks died from an unrelated cause, making this group unsuitable for analysis.

### 3.1. Characterization of PS scaffolds by SEM

Scaffolds were composed of microfibers oriented in the same direction, although some fibers were incidentally disoriented (Fig. 1). Microporosity was in the form of interconnected voids between the fibers conditioned by the fibers diameter. Scaffolds measured 500  $\mu$ m in thickness and fibers had a mean diameter of 4  $\mu$ m.  $\beta$ -TCP-PS fibers exhibited a rough appearance with grains of  $\beta$ -TCP embedded in the polymer; numerous grains were exposed at the surface of the fibers. In the backscattered electron mode, the chemical contrast clearly identified all  $\beta$ -TCP grains which were regularly dispersed along the PS fibers. AuNPs were also clearly identified at the surface of the Au-PS microfibers. These latter



**Fig. 4.** Three-dimensional reconstruction of microCT analysis of a calvarial defect from each groups: control, Au-PS, and  $\beta$ -TCP-PS after 6, 9 and 12 weeks of implantation. Internal side of calvaria is presented to show the initial defect margin and newly formed bone. Results for Au-PS at 12 weeks are missing.

appeared regularly coated by the AuNPs which could easily be identified in the backscattered electron mode.

### 3.2. Surface characterization of Au-PS scaffolds

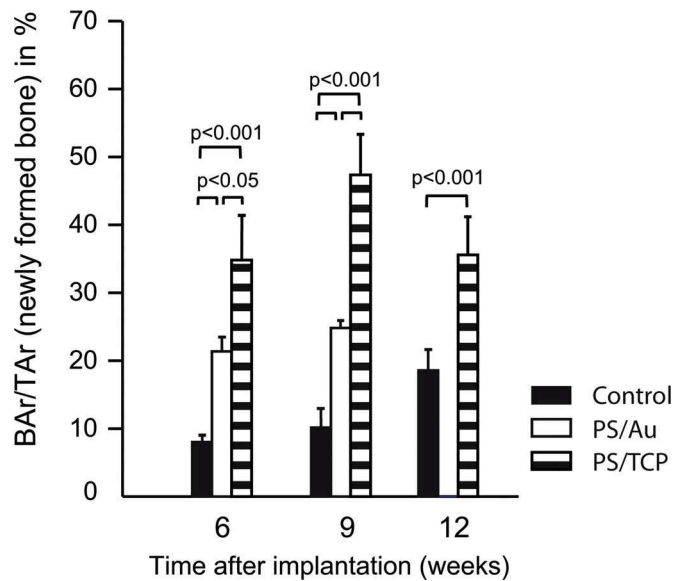
FTIR spectra (Fig. 2) evidenced the carboxyl-surface functionalization of AuNPs deposited on the fibers. The control samples MSA presented broad vibrations assigned to hydrogen bonded O–H combined with superimposed C–H stretching vibrations in the wavenumber interval  $3300\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$  (this part of the spectra was cut to concentrate on the  $2000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$  interval), carboxylate vibrations in the range  $1700\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$  and  $1500\text{--}1445\text{ cm}^{-1}$  and C–S stretch at  $676\text{ cm}^{-1}$ . The spectrum of Au-PS (PS coated with MSA-treated AuNPs) suggested the  $\text{--COOH}$ -functionalization of the nanoparticles present on the surface of the fibers. Different spectral modifications were noticed when compared to the two control materials. The main features of the PS substrate were maintained:  $1600\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$  aromatic C=C stretching bands, and a small new peak appearing at  $1543\text{ cm}^{-1}$  proved the immobilization of the alkanethiol, assigned to carboxylate vibration of carboxylic acid originated from MSA. Furthermore, a new peak at  $661\text{ cm}^{-1}$  is visible in the spectrum of Au-PS, and it is assigned to the C–S

stretch, proving the presence of the MSA residues on the surface of the AuNPs.

Raman spectra of  $\beta$ -TCP grains, PS fibers and  $\beta$ -TCP-PS fibers are shown in Fig. 2. The spectra of  $\beta$ -TCP grains exhibited the characteristic phosphate peaks at  $948$  and  $960\text{ cm}^{-1}$ . The spectra of PS fibers exhibited a peak related to aromatic ring deformation at  $621\text{ cm}^{-1}$ , two peaks related to CH deformation of mono-substituted aromatic ring at  $1000$  and  $1031\text{ cm}^{-1}$ . The peak at  $1155\text{ cm}^{-1}$  corresponded to the CC stretch of alkane. The peaks observed on the  $\beta$ -TCP-PS fibers spectra evidenced the major peaks of both components  $\beta$ -TCP and PS.

### 3.3. Cytocompatibility of the different types of fibers

Proliferation of hMSC on the different types of scaffolds at days 1, 3, and 7 is shown Fig. 3. The number of cells increased on all scaffolds from the first to the seventh day. At day 1, there was a significant reduction in the number of cells on Au-PS scaffolds compared to PS scaffolds. At day 3, cells proliferated significantly more on the PS scaffolds ( $p < 0.01$ ). At day 7, the number of cells was significantly higher on the  $\beta$ -TCP-PS scaffolds than on the PS ( $p < 0.05$ ) and Au-PS scaffolds ( $p < 0.01$ ). At each time point, cell proliferation appeared lower on the Au-PS scaffolds than on the other ones.



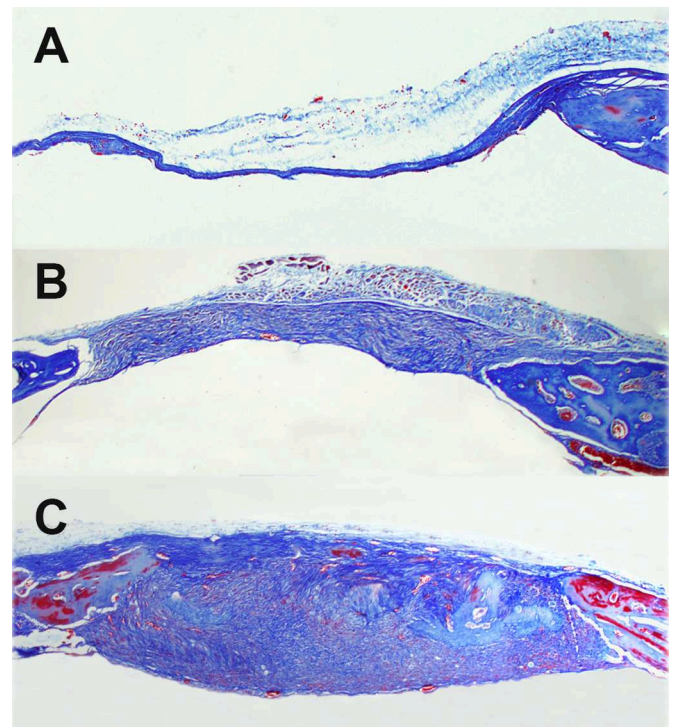
**Fig. 5.** Newly-formed bone surface filling the calvarial defect: BAR/TAr (%) measured on the microCT images at 6, 9 and 12 weeks after implantation.  $\beta$ -TCP-PS induced a significantly higher amount of newly-formed bone than Au-PS and control groups at each time point. Results for Au-PS at 12 weeks are missing.

#### 3.4. MicroCT analysis

MicroCT 3D analysis of the inner face of the calvaria allowed to identify the initial margins of the bone defect (Fig. 4). No abnormal bone resorption or remodeling was observed. Presence of newly-formed bone was observed in the defect and reflected the proportion of filling the drilled hole according to the type of scaffold. Values of BAR/TAr in the different groups are illustrated in Fig. 5. At any time point, the amount of newly-formed bone was significantly higher in the  $\beta$ -TCP-PS group. A limited bone formation occurred in the Au-PS group at 9 weeks. New bone appeared to be laid down from the margins of the calvarial defect in a centripetal way, suggesting an osteoconduction process (Fig. 4).

#### 3.5. Histology

The grafted areas were easily observed on coronal sections of the calvaria. Fig. 6 represents the histological aspects at low magnification observed in each group at 9 weeks. In the control group, the defect was filled by a thin layer of connective fibrous tissue, with no newly-formed bone even after 12 weeks. Calvarial defect filled with an Au-PS scaffold exhibited dense connective tissue. No inflammatory reaction was observed in contact with the biomaterial. Giant cells were never observed around the PS fibers. AuNPs were identified as black particles; they were observed immobilized along some PS fibers, but most of them were packed together in large aggregates in the fibrosis. Occasionally, packets of newly-formed bone were found to have encapsulated some Au aggregates inside the bone matrix (Fig. 7). In the calvaria grafted with  $\beta$ -TCP-PS, the defects were filled with dense fibrous connective tissue without inflammatory reaction nor giant cell in contact with the fibers. Numerous fibroblast nuclei were observed between the collagen fibers. Blood vessels were identified in the fibrotic areas which appeared composed of collagen fibers mixed with the  $\beta$ -TCP-PS fibers. New bone was observed extending from the margins of the defect and covering the surface of the fibrosis at each time of analysis. PS fibers were visible both in the fibrosis and in the newly-formed bone (Fig. 8). They appeared as unstained, non-birefringent ghost structures between the fibroblasts and the collagen fibers. Under polarized light, lamellar bone packed with areas of woven



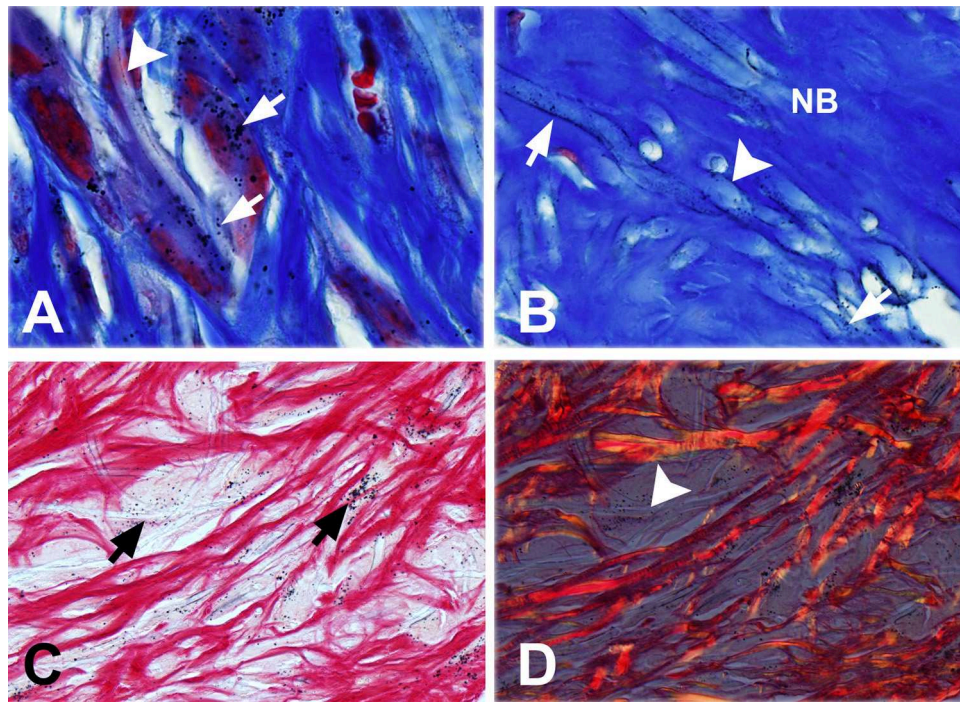
**Fig. 6.** Coronal section through calvarial defect at 9 weeks stained with Masson's trichrome: (A) control, (B) Au-PS and (C)  $\beta$ -TCP-PS groups. In the control group, the defect is filled with a thin layer of connective tissue while dense fibrous connective tissue is observed in the other groups. Areas with mineralized tissue are noticed into the defect for  $\beta$ -TCP-PS group. Magnification:  $\times 40$ .

bone was evidenced in the newly-formed bone areas.  $\beta$ -TCP granules could not be evidenced after the decalcification procedure.

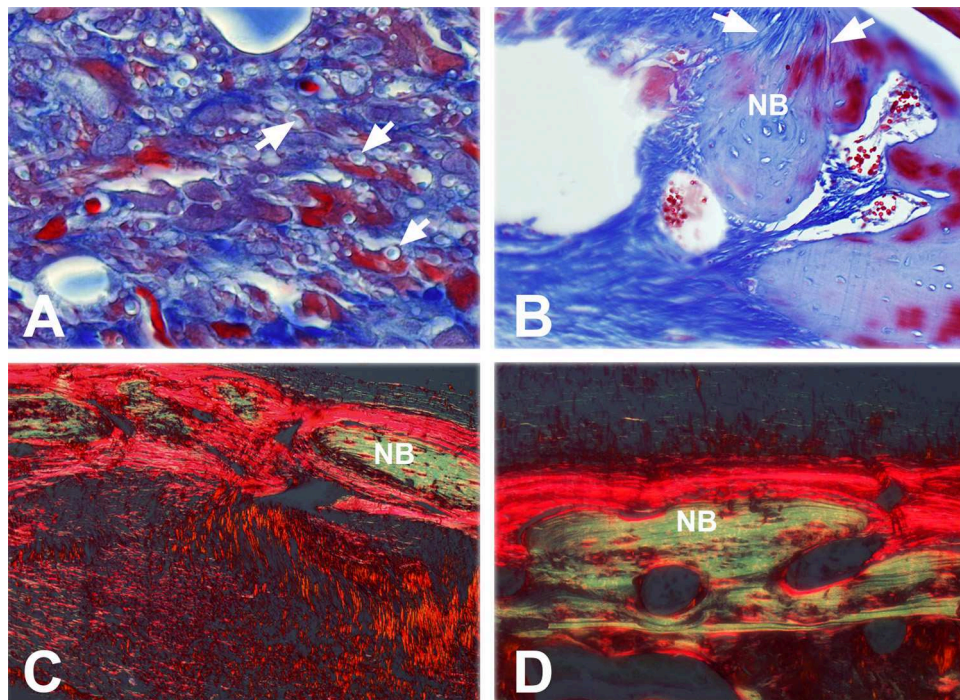
#### 4. Discussion

Design and fabrication of scaffolds which could ensure an optimal cell adhesion, spreading, proliferation and differentiation are a challenge for a bone substitute. Surface topography is a well-recognized key factor. Porosity, pore size and interconnected pores are important features which determine cell infiltration into scaffolds of electrospun fibers (Pham et al., 2006). Moreover, interconnected macro-pores are necessary to promote sufficient vascularization into the scaffold to diffuse oxygen, and to transport nutrients and cell progenitors in such scaffolds (Jang et al., 2009; Rouwkema et al., 2008). In this study, a critical-size calvarial defect model was used. It showed no tendency to spontaneous healing, as only a thin collagenous membrane was obtained covering the drilled area at all times of analysis. Two types of electrospun microfibers were used in the animal study in order to characterize their biocompatibility and osteogenic properties. Electrospinning produces well-controlled 3D PS scaffolds with  $4\text{ }\mu\text{m}$  aligned microfibers. Electrospinning conditions to obtain suitable PS fibers in the micrometer range were previously reported (Terranova et al., 2016). The flow rate and polymer concentration are recognized to have major influences on the morphology and diameter of the fibers (Lim and Mao, 2009). Microfibers were chosen because an increase in the fiber diameter produces enlarged pores. There is a significant relationship between the pore size of electrospun scaffolds and the diameter of the fibers (Eichhorn and Sampson, 2005). Several studies have shown that cell penetration into a scaffold increases with the fiber diameter (Balguid et al., 2008; Sisson et al., 2010). In an *in vitro* study, the density of





**Fig. 7.** Histological analysis of sections from the Au-PS group at 9 weeks: (A and B) were stained with Masson's trichrome and (C and D) were stained with picrosirius red and analyzed by transmitted (C) and polarized light (D). AuNPs aggregates (arrows) and PS fibers (arrowheads) are visible into the fibrous connective tissue and the newly-formed bone (NB). Magnification: (A and B)  $\times 1000$  and (C and D)  $\times 400$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 8.** Histological analysis of sections from the  $\beta$ -TCP-PS group at 9 weeks: (A and B) were stained with Masson's trichrome and (C and D) were stained with picrosirius red and analyzed under polarized light. PS fibers (arrows) were included into dense fibrous connective tissue and new bone (NB). Note the new lamellar bone visible in polarized light (C and D). Magnification: (A)  $\times 1000$ , (B and C)  $\times 200$ , (D)  $\times 400$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

MC3T3 cells was found higher on large diameter fibers ( $2.1 \mu\text{m}$ ) than thinner fibers ( $0.14 \mu\text{m}$ ) (Badami et al., 2006).

In our study, we developed PS scaffolds combined with AuNPs or  $\beta$ -TCP grains to increase osteogenesis and osteoconduction.

Calcium-phosphate grains blended with polymer scaffolds are recognized to improve *in vitro* cell proliferation and differentiation (Lao et al., 2011; McCullen et al., 2009; Wutticharoenmongkol et al., 2007). Similarly, it was shown that carboxylated-AuNPS coated on



polymer substrate promotes formation of hydroxyapatite (Vasile et al., 2012). AuNPs are non-cytotoxic for human cells (De Jong et al., 2008). We confirmed the presence of  $\beta$ -TCP grains at the surface of PS fibers by SEM and Raman microspectroscopy. Similarly, AuNPs were evidenced by SEM and their deposition at the surface of PS fibers was confirmed by FTIR. PS fibers blended with  $\beta$ -TCP had a rough surface, a well-recognized factor in cell adherence and spreading (Buser et al., 1991; Degasne et al., 1999). Au-PS fibers had a lower surface roughness in SEM.

In this study, proliferation was determined *in vitro* on PS,  $\beta$ -TCP-PS and Au-PS scaffolds to evaluate the cytocompatibility. Cell proliferation was significantly higher on the  $\beta$ -TCP-PS scaffold than on PS or Au-PS. The surface roughness and the bioactivity of  $\beta$ -TCP may account for the improved capacity of these scaffolds to favor cytocompatibility. In addition, vitronectin (a glycoprotein essential to the initial attachment of cells) is contained in FBS. It was found that vitronectin could adsorb to PS in variable amounts depending on the polymer surface (Steele et al., 1994). This can explain the differences in cell activity on the different scaffolds. Similarly, attachment of osteoblasts *in vitro* on hydroxyapatite-coated polystyrene disks was found to rely on vitronectin (Goldberg et al., 2010). Vitronectin is also found in sites of bone damage associated with a local hemorrhage, it could be an important factor for osseointegration of PS scaffolds.

MicroCT and histologic analysis are complementary methods to investigate cell response during the bone healing period after implantation. MicroCT allows a morphologic and quantitative analysis of the new bone formation while cellular environment can only be evaluated histologically. Au-PS scaffolds resulted in a limited bone formation at any time.  $\beta$ -TCP-PS scaffolds induced more new bone formation starting from the margins to the center of the defect, at each time point. It is likely that  $\beta$ -TCP has promoted osteoconductivity, as described in other *in vivo* studies of bone reconstruction obtained with the same animal model (Montjovent et al., 2007; Shim et al., 2012). On histological sections, defects grafted with Au-PS and  $\beta$ -TCP-PS were filled with a dense fibrous connective tissue incorporating the microfibers. New bone formation was observed under polarized light on picosirius red stained sections and revealed the formation of lamellar and woven bone. Numerous blood vessels were present into the fibrosis but no inflammatory foci were noted. PS fibers were embedded into the connective tissue or the newly formed bone. PS is not biodegradable and this may be of interest in some particular clinical cases such as oncology (Serafim et al., 2014). In defects grafted with an Au-PS scaffold, most AuNPs seemed to have been removed from the fibers and were accumulated into the connective tissue or the newly-formed bone. It was reported that AuNPs in contact with cells are absorbed by endocytosis and formed aggregates in macrophage lysosomes without eliciting an inflammatory reaction (Shukla et al., 2005).

PS is a well-known cytocompatible polymer. It is extensively used for *in vitro* studies as constituent of tissue culture plates or Petri's dishes. PS fibers have been found to promote *in vitro* cell proliferation (Serafim et al., 2014) and differentiation (Terranova et al., 2016) of osteoblast-like cells. In the present study, hMSC grew up from 1 to 7 days on the different types of scaffolds, confirming the excellent cytocompatibility of PS. However, the best results were obtained when a calcium/phosphate biomaterial was added. Therefore, we deliberately chose not to experiment the scaffolds made of PS fibers alone *in vivo*.

*In vivo*, the implanted PS fibers appeared biotolerated since they were incorporated into collagenous fibers and newly-formed bone (Donath et al., 1992; Heimke, 1990). Biotolerance is the first degree of biocompatibility and can be accompanied by a limited bone formation. No cluster of inflammatory and giant cells was noted and a direct contact of the fibroblasts with the fibers was evidenced

histologically. However, osseointegration of the different PS scaffolds was incomplete even after 12 weeks. Among the limitations of this study, the group of mice with Au-PS scaffold at 12 weeks could not be analyzed; however, the data obtained in cell culture and *in vivo* at 6 weeks indicate that the AuNPs did not contribute to any significant improvement of the scaffold.

## 5. Conclusion

In this study, PS scaffolds, combined with  $\beta$ -TCP grains or functionalized gold nanoparticles, were developed by electrospinning. We showed that incorporation of  $\beta$ -TCP increased cell proliferation *in vitro*. Bioactivity of  $\beta$ -TCP and the surface roughness of the  $\beta$ -TCP-PS fibers improved cytocompatibility. Biocompatibility and bone repair were studied after implantation of scaffolds into calvarial defects.  $\beta$ -TCP-PS showed a greater new bone formation than Au-PS but the healing of the defect remained incomplete. AuNPs detached from the fibers and accumulated into fibrous tissue and new bone. PS fibers were encapsulated into fibrosis without inflammatory and giant cells. This study stresses the differences that can be obtained with a biomaterial that is well cytocompatible *in vitro* but is only biotolerated *in vivo*.

## Conflict of interest

Authors have no conflict of interest.

## Acknowledgments

This work was made possible by grants from ANR, program LabCom "NextBone". The authors thank Kasios, 18 chemin de la Violette, 31240 L'Union – France for providing the  $\beta$ -TCP grains. Stancu, Dragusin and Vasile gratefully acknowledge the support from the project PNII PCCA 183/2012. The authors also thank Jérôme Duisit from Pôle de Morphologie at UCL for his advice and providing the human mesenchymal stem cells and Baptiste Arbez for his help with Raman analysis. L. Terranova received an Erasmus Mundus Ph.D. scholarship (program Nanofar).

## References

- An, Y.H., Freidman, R.J., 1999. Animal models of bone defect repair. In: An, Y.H., Freidman, R.J. (Eds.), *Animal Models in Orthopaedic Research*. CRC Press, Boca Raton, pp. 241–260.
- Badami, A.S., Kreke, M.R., Thompson, M.S., Riffle, J.S., Goldstein, A.S., 2006. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly (lactic acid) substrates. *Biomaterials* 27, 596–606.
- Baker, S.C., Atkin, N., Gunning, P.A., Granville, N., Wilson, K., Wilson, D., Southgate, J., 2006. Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional *in vitro* biological studies. *Biomaterials* 27, 3136–3146.
- Balguid, A., Mol, A., van Marion, M.H., Bank, R.A., Bouten, C.V., Baaijens, F.P., 2008. Tailoring fiber diameter in electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds for optimal cellular infiltration in cardiovascular tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* 15, 437–444.
- Brandi, M.L., Collin-Osdoby, P., 2006. Vascular biology and the skeleton. *J. Bone Miner. Res.* 21, 183–192.
- Buser, D., Schenk, R., Steinemann, S., Fiorellini, J., Fox, C., Stich, H., 1991. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 889–902.
- Chappard, D., Guillaume, B., Mallet, R., Pascaretti-Grizon, F., Baslé, M.F., Libouban, H., 2010. Sinus lift augmentation and beta-TCP: a microCT and histologic analysis on human bone biopsies. *Micron* 41, 321–326.
- De Jong, W.H., Hagens, W.I., Krystek, P., Burger, M.C., Sips, A.J., Geertsma, R.E., 2008. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 29, 1912–1919.
- Degasne, I., Baslé, M.F., Demais, V., Huré, G., Lesourd, M., Grolleau, B., Mercier, L., Chappard, D., 1999. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif. Tissue Int.* 64, 499–507.
- Dempster, D.W., Compston, J.E., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R., Parfitt, A.M., 2013. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update

- of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* 28, 2–17.
- Dimitriou, R., Mataliotakis, G.I., Angoules, A.G., Kanakaris, N.K., Giannoudis, P.V., 2011. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury* 42, S3–S15.
- Donath, K., Laaß, M., Günzl, H.-J., 1992. The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Arch. A* 420, 131–137.
- Eichhorn, S.J., Sampson, W.W., 2005. Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies. *J. R. Soc. Interface* 2, 309–318.
- Goldberg, A.J., Liu, Y., Advincula, M.C., Gronowicz, G., Habibovic, P., Kuhn, L.T., 2010. Fabrication and characterization of hydroxyapatite-coated polystyrene disks for use in osteoprogenitor cell culture. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 21, 1371–1387.
- Heimke, G., 1990. The aspects and modes of fixation of bone replacements. In: Heimke, G. (Ed.), *Osseo-Integrated Implants*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, pp. 1–29.
- Jang, J.-H., Castano, O., Kim, H.-W., 2009. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 1065–1083.
- Lao, L., Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, Y., Gao, C., 2011. Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22, 1873–1884.
- Lim, S.H., Mao, H.-Q., 2009. Electrospun scaffolds for stem cell engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 1084–1096.
- Ma, Z., Kotaki, M., Inai, R., Ramakrishna, S., 2005. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng.* 11, 101–109.
- McCullen, S., Zhu, Y., Bernacki, S., Narayan, R., Pourdeyhi, B., Gorga, R., Lobo, E., 2009. Electrospun composite poly (L-lactic acid)/tricalcium phosphate scaffolds induce proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomed. Mater.* 4, 035002.
- Montjovent, M.O., Mathieu, L., Schmoekel, H., Mark, S., Bourban, P.E., Zambelli, P.Y., Laurent-Applegate, L.A., Pioletti, D.P., 2007. Repair of critical size defects in the rat cranium using ceramic-reinforced PLA scaffolds obtained by supercritical gas foaming. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 83, 41–51.
- Park, H.J., Min, K.D., Lee, M.C., Kim, S.H., Lee, O.J., Ju, H.W., Moon, B.M., Lee, J.M., Park, Y.R., Kim, D.W., 2016. Fabrication of 3D porous SF/β-TCP hybrid scaffolds for bone tissue reconstruction. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 104, 1779–1787.
- Pham, Q.P., Sharma, U., Mikos, A.G., 2006. Electrospun poly (ε-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules* 7, 2796–2805.
- Rouwkmema, J., Rivron, N.C., van Blitterswijk, C.A., 2008. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 26, 434–441.
- Serafim, A., Mallet, R., Pascaretti-Grizon, F., Stancu, I.C., Chappard, D., 2014. Osteoblast-like cell behavior on porous scaffolds based on poly(styrene) fibers. *Biomed. Res. Int.* 2014, 609319.
- Shim, J.-H., Moon, T.-S., Yun, M.-J., Jeon, Y.-C., Jeong, C.-M., Cho, D.-W., Huh, J.-B., 2012. Stimulation of healing within a rabbit calvarial defect by a PCL/PLGA scaffold blended with TCP using solid freeform fabrication technology. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23, 2993–3002.
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R.R., Sastry, M., 2005. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir* 21, 10644–10654.
- Sisson, K., Zhang, C., Farach-Carson, M.C., Chase, D.B., Rabolt, J.F., 2010. Fiber diameters control osteoblastic cell migration and differentiation in electrospun gelatin. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 94, 1312–1320.
- Sperling, R.A., Gil, P.R., Zhang, F., Zanella, M., Parak, W.J., 2008. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 37, 1896–1908.
- Steele, J.G., McFarland, C., Dalton, B.A., Johnson, G., Evans, M.D., Rolfe Howlett, C., Underwood, P.A., 1994. Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 5, 245–257.
- Storhoff, J.J., Elghanian, R., Mucic, R.C., Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., 1998. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 1959–1964.
- Terranova, L., Mallet, R., Perrot, R., Chappard, D., 2016. Polystyrene scaffolds based on microfibers as a bone substitute; development and in vitro study. *Acta Biomater.* 29, 380–388.
- Vasile, E., Serafim, A., Dragusin, D.-M., Petrea, C., Iovu, H., Stancu, I.-C., 2012. Apatite formation on active nanostructured coating based on functionalized gold nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* 14, 1–14.
- Wutticharoenmongkol, P., Pavasant, P., Supaphol, P., 2007. Osteoblastic phenotype expression of MC3T3-E1 cultured on electrospun polycaprolactone fiber mats filled with hydroxyapatite nanoparticles. *Biomacromolecules* 8, 2602–2610.
- Younger, E.M., Chapman, M.W., 1989. Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma* 3, 192–195.

## ARTICLE 3

Analysis of  $\beta$ -tricalcium phosphate granules prepared with different formulations by nano-computed tomography and scanning electron microscopy

Terranova L., Libouban H., Mallet R., Chappard D.

Journal of Artificial Organs, 18(4) : 338-345, 2015

Facteur d'impact 2014: 0.962



Le  $\beta$ -TCP est un substitut osseux de choix grâce à sa composition physico-chimique, sa biocompatibilité et son ostéoconduction. Il a fait l'objet de nombreuses études (Eggli, Muller et al. 1988, McAndrew, Gorman et al. 1988, Chappard, Guillaume et al. 2010) et il est couramment utilisé depuis une quarantaine d'années en orthopédie et en chirurgie maxillo-faciale.

Dans cet article, nous avons étudié la morphologie de granules de  $\beta$ -TCP, préparés par la méthode des mousses de polyuréthane. Différentes formulations à base de  $\beta$ -TCP ont été utilisées pour produire une gamme de granules de forme et de porosité variées. Ce sont des paramètres clés à maîtriser car ils contrôlent l'ostéoconduction *in vivo*. La forme des granules va également conditionner leur empilement tridimensionnel dans la cavité osseuse à combler. Il est nécessaire de trouver un équilibre entre la porosité optimale pour assurer la colonisation cellulaire et vasculaire, et la quantité de matière idéale, résistante mécaniquement, pour permettre l'ostéogénèse.

Nous avons caractérisé l'architecture de différentes formulations de granules de  $\beta$ -TCP, en nanotomographie computerisée (nanoCT) et en microscopie électronique à balayage (MEB). La nanoCT permet de mettre en évidence l'architecture et les faces internes des différents types de granules. Le MEB permet d'observer précisément l'état de surface des granules. Des granules commerciaux de BCP sont également analysés pour comparer leur architecture et leur état de surface.

#### *Préparation des granules de $\beta$ -TCP*

Actuellement, les techniques de préparation des granules poreux de  $\beta$ -TCP permettent de contrôler la porosité globale et la taille moyenne des pores. La fabrication de granules de  $\beta$ -TCP pour la chirurgie maxillo-faciale est classiquement réalisée par la technologie des mousses de polyuréthane (Schwartzwalder, Somers et al. 1963). Les granules de  $\beta$ -TCP ont été préparés à partir de cubes de 1 g de mousse de polyuréthane par la société Kasios (L'Union, France) (Figures 16A et B). Des grains élémentaires de  $\beta$ -TCP sont mélangés à l'eau pour produire des barbotines. Pour cette étude, six types de barbotines ont été élaborés en mélangeant respectivement 10, 11, 15, 18, 21 et 25 g de grains à 100 mL d'eau distillée. Chaque barbotine imbibe le maillage d'une mousse de polyuréthane (C). Les mousses imprégnées de barbotines sont ensuite séchées dans un four à 800°C pour éliminer le polyuréthane par sublimation (D). Les blocs de  $\beta$ -TCP sont ensuite frittés à 1200°C. Ces étapes permettent de céramiser le  $\beta$ -TCP et de créer une porosité interne (i) dans les blocs. La macroporosité (m) du bloc de  $\beta$ -TCP correspond aux cavités qui proviennent de la répartition spatiale du matériau. Les blocs sont concassés pour former des granules de 1000-2000  $\mu$ m, laissant apparaître des surfaces concaves (sc) (F).

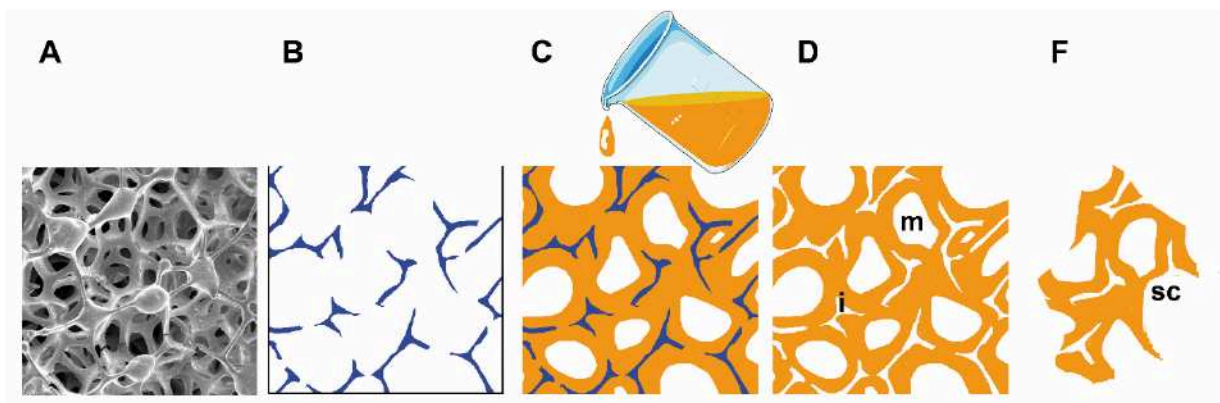


Figure 16 : Etapes de la préparation des granules de  $\beta$ -TCP par la méthode des mousses de polyuréthane (Guillaume, Libouban et al. 2010).

Les granules de BCP sont préparés avec la même technique d'imprégnation des mousses de polyuréthane. Les barbotines sont constituées d'un mélange de 75% de HA et 25% de  $\beta$ -TCP (fournis par Kasios).

#### *Analyse architecturale et de l'état de surface par nanoCT et MEB*

Pour analyser précisément l'architecture des granules ainsi que leur structure interne, la nanoCT est une méthode très intéressante car elle permet la reconstruction tridimensionnelle des échantillons. La nanoCT est une technique non destructive d'analyse par rayons X, elle est similaire aux tomographes utilisés en clinique humaine. Elle permet la reconstruction tridimensionnelle de la distribution de densité d'un matériau à partir d'images d'absorption des rayons X obtenues sous différentes incidences (Figures 17 et 18). L'absorption des rayons X par l'échantillon dépend de la microstructure locale de la zone traversée. L'échantillon est irradié par un tube cathodique à RX sous différents angles de  $0^\circ$  de  $360^\circ$  et les images d'absorption sont projetées sur un détecteur. Les grains de  $\beta$ -TCP ont été collés sur une baguette de verre de 2 mm de diamètre (stable thermiquement) pour pouvoir se rapprocher au maximum du tube à RX, ce qui permet de gagner en résolution lors de l'acquisition des images (Figure 19). La résolution maximale atteinte était de  $0,7 \mu\text{m}$  par pixel. La reconstruction des coupes à partir des images de projections a été réalisée pour visualiser les granules en 3D. Des coupes virtuelles au sein de la reconstruction tridimensionnelle des échantillons ont été faites en sélectionnant des plans virtuels.

Dans un second temps, les granules ont été analysés au MEB à différents grossissements (x40, x200, x2000, x5000, x10000) pour mieux observer leur état de surface.

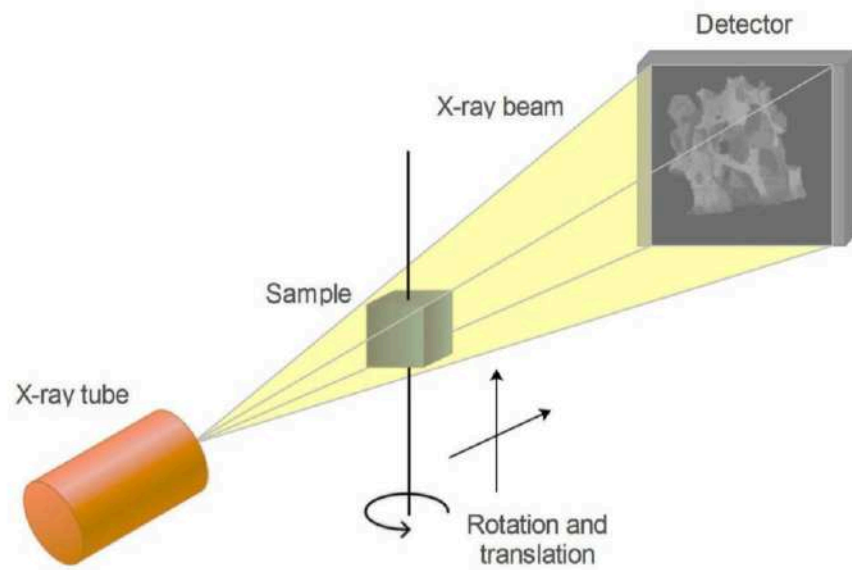


Figure 17 : Schéma simplifié du fonctionnement de la nanoCT.



Figure 18 : Vue de l'intérieur du nanoCT : la tige de verre avec le granule de  $\beta$ -TCP est maintenue dans le mandrin, le tube cathodique est à droite et le détecteur à gauche.



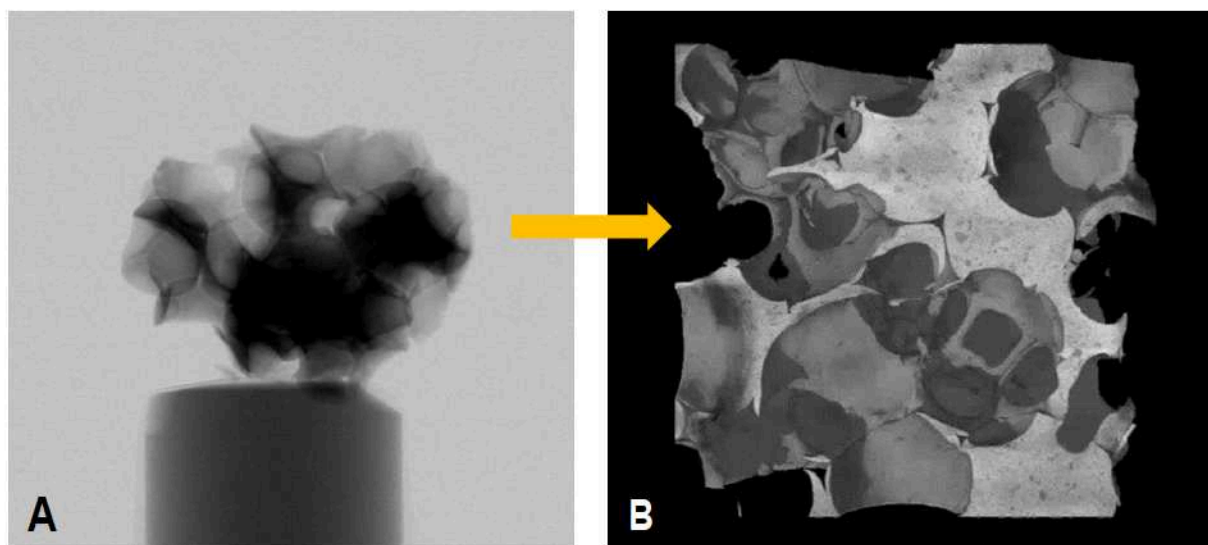


Figure 19 : (A) Projection d'un granule de  $\beta$ -TCP (collé sur une tige en verre) en nanoCT et (B) sa reconstruction 3D dans l'espace virtuel.

#### *Analyse des images bidimensionnelles et des reconstructions tridimensionnelles en nanoCT*

Les images bidimensionnelles montrent tous les plans de reconstruction de l'échantillon. Le logiciel VG Studio Max (version 2.1) donne trois coupes de plans différents ( $x$ ,  $y$  et  $z$ ) (Figure 20). Les reconstructions tridimensionnelles permettent de visualiser la structure globale des granules sous tous les angles par rotation dans l'espace virtuel.

Les granules contenant 10 et 11 g de  $\beta$ -TCP ont une forte macroporosité avec de larges pores interconnectés et une architecture qui semble très frêle. Au contraire, les granules de 21 et 25 g sont plus denses et compacts, ce qui est lié à la concentration plus élevée de  $\beta$ -TCP dans les barbotines, qui remplissent plus abondamment le maillage de la mousse sous forme de larges amas. Les granules de 15 et 18 g ont une macroporosité intermédiaire, avec quelques pores. La porosité interne due à la sublimation de la mousse de polyuréthane est présente sur les coupes internes de chaque granule car ils ont tous été préparés avec la même technologie. La mousse de polyuréthane apparaît comme un réseau de filaments interconnectés formant un ensemble des polyèdres poreux. Ainsi, après la sublimation, les nœuds de connexion des filaments apparaissent en négatif dans les granules sous forme de sections polygonales. On note également une hétérogénéité de la phase minérale interne de chaque granule sous la forme de grains ovoïdes compactés : ces grains apparaissent soit avec des degrés de minéralisation différents soit séparés les uns des autres par un fin interstice (création de nanopores). Les grains unitaires de  $\beta$ -TCP montrent une hétérogénéité de composition.

Les granules de BCP sont denses, ils montrent seulement quelques macropores. La porosité interne due à la sublimation de la mousse de polyuréthane est également présente. La phase minérale est très hétérogène, des amas de grains de  $\beta$ -TCP sont visibles au sein de l'HA en raison de la plus forte concentration en calcium.



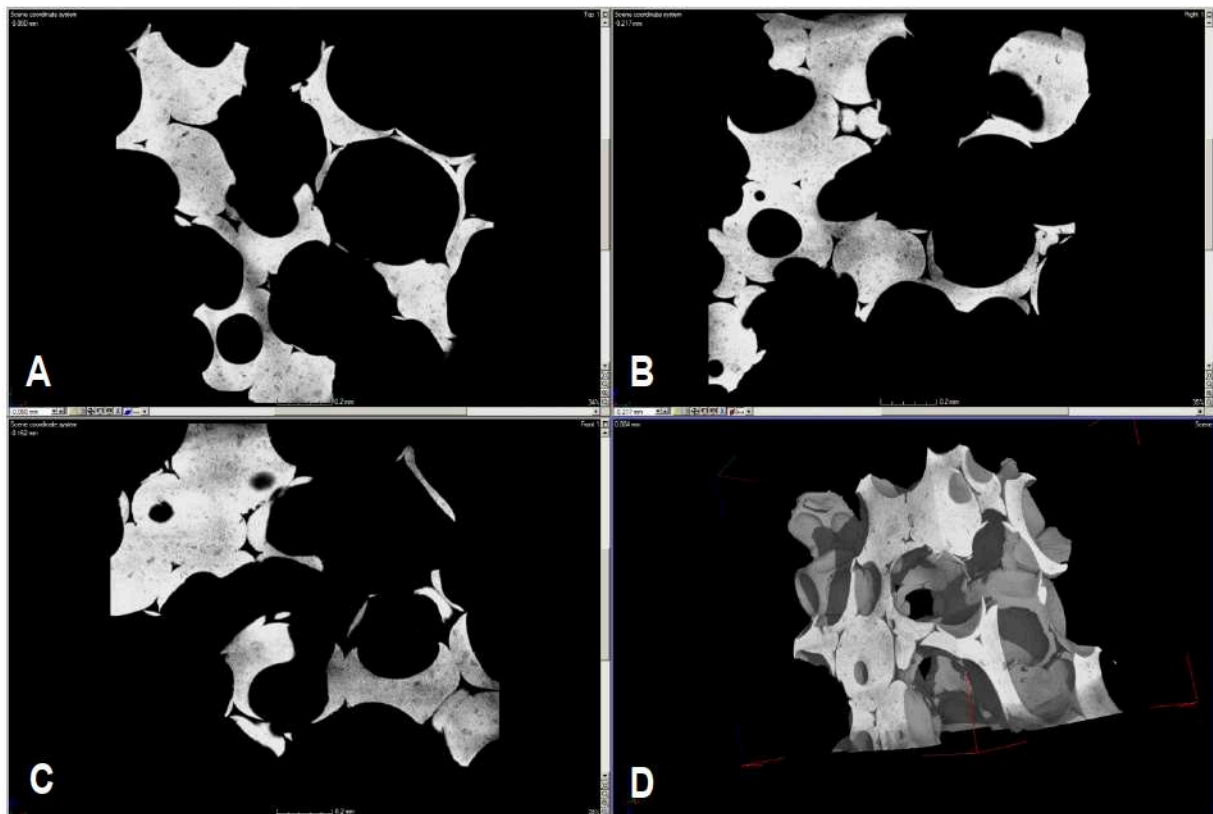


Figure 20 : Copie d'écran du logiciel de reconstruction : (A, B, C) coupes bidimensionnelles des plans x, y et z et (D) la reconstruction tridimensionnelle correspondante.

#### *Analyse de surface des granules en MEB*

La porosité due à la mousse de polyuréthane est observée sur les surfaces concassées des granules. A fort grossissement, la surface des granules est recouverte d'un pavage de polygones constitué de grains unitaires de  $\beta$ -TCP soudés (Figure 21). Des micropores affleurent à la surface des granules entre les grains soudés mais également à l'intérieur des granules, comme on peut le voir sur les faces brisées. La texture de surface correspond au frittage des grains unitaires de  $\beta$ -TCP, une coalescence incomplète de ces grains entraîne l'apparition de micropores.

La surface externe des granules de BCP est constituée de nombreux micropores. On observe seulement quelques plages de grains élémentaires de  $\beta$ -TCP soudés entre eux après l'étape de frittage.

Dans cette étude, nous avons étudié le  $\beta$ -TCP sous forme de granules préparés à partir de barbotines de formulations différentes : 10, 11, 15, 18, 21, et 25 g de poudre de  $\beta$ -TCP dans 100 mL d'eau. Les différents granules ont été analysés en nanoCT et en MEB. Ces techniques d'imagerie nous ont fournis des résultats complémentaires sur l'architecture, et sur l'état de surface externe et interne des granules. La macroporosité des granules varie avec la quantité de  $\beta$ -TCP dans les barbotines. L'hétérogénéité du degré de calcification interne a été mise en évidence pour la première fois. La surface des granules laisse

apparaître des micropores. La microporosité va permettre l'adsorption de protéines indispensables à l'adhésion puis à la prolifération et la différenciation cellulaire.

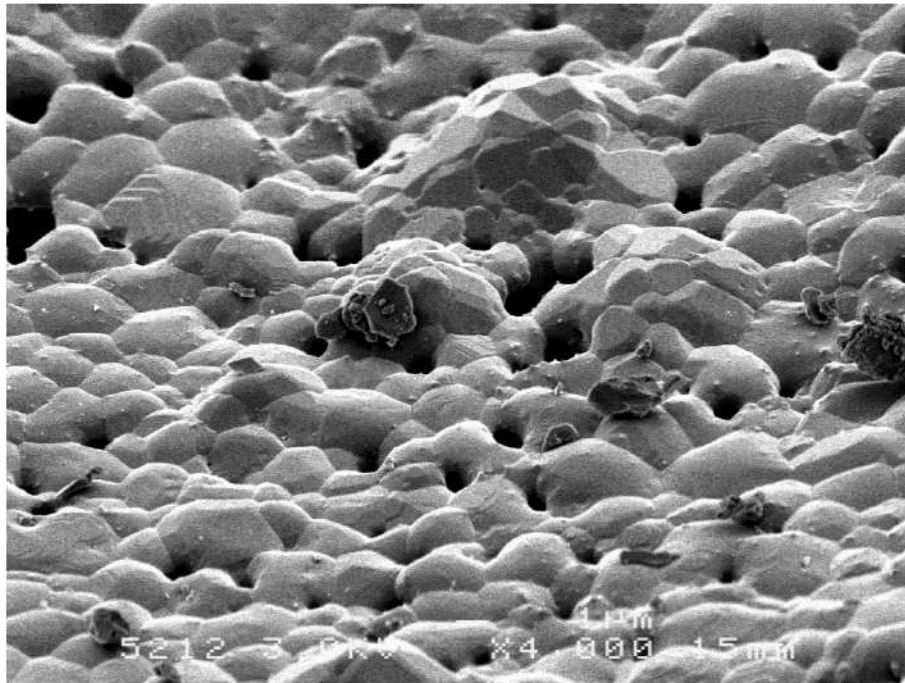


Figure 21 : Surface d'un granule de  $\beta$ -TCP, on observe les grains élémentaires de  $\beta$ -TCP frittés, sous forme de polygones et des micropores.

# Analysis of $\beta$ -tricalcium phosphate granules prepared with different formulations by nano-computed tomography and scanning electron microscopy

Lisa Terranova<sup>1</sup> · H       Libouban<sup>1</sup> · Romain Mallet<sup>1,2</sup> · Daniel Chappard<sup>1,2</sup>

Received: 14 January 2015 / Accepted: 15 April 2015  
  The Japanese Society for Artificial Organs 2015

**Abstract** Among biomaterials used for filling bone defects, beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) is suitable in non-bearing bones, particularly in dental implantology, oral and maxillofacial surgery. When  $\beta$ -TCP granules are placed in a bone defect, they occupy the void 3D volume. Little is known about the 3D arrangement of the granules, which depends on the nature and size of the granules. The aim of this study was to examine the 3D architecture of porous  $\beta$ -TCP granules. Granules were prepared with different concentrations of  $\beta$ -TCP powder in slurry (10, 11, 15, 18, 21, and 25 g of  $\beta$ -TCP powder in distilled water). Granules were prepared by the polyurethane foam method. They were analyzed by nano-computed tomography (nanoCT) and compared with scanning electron microscopy (SEM). Commercial granules of hydroxyapatite- $\beta$ -TCP prepared by the same methodology were also used. The outer and inner architectures of the granules were shown by nanoCT which evidenced macroporosity, internal porosity and microporosity between the sintered grains. Macroporosity was reduced at high concentration and conversely, numerous concave surfaces were observed. Internal porosity,

related to the sublimation of the polyurethane foam, was present in all the granules. Microporosity at the grain joints was evidenced by SEM and on 2D nanoCT sections. Granules presented a heterogeneous aspect due to the different mineralization degree of the sintered powder grains in the  $\beta$ -TCP granules; the difference between hydroxyapatite and  $\beta$ -TCP was also evidenced. NanoCT is an interesting method to analyze the fine morphology of biomaterials with a resolution close to synchrotron and better than microcomputed tomography.

**Keywords** NanoCT · Mineralization degree · Microarchitecture · Bone graft · Tricalcium phosphate

## Introduction

Calcium orthophosphates (CaP) are used as synthetic bone graft substitutes for bone as an alternative solution in lieu of autologous bone, long considered to be the gold standard [1]. Synthetic materials have the advantage of not requiring a second surgical site, thus avoiding infections and have a relatively low cost. Calcium orthophosphates are calcium salts derived from phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Tricalcium phosphates are the most investigated biomaterials because their chemical composition, close to the mineral phase of bone, confers an excellent biocompatibility. Among orthophosphates, hydroxyapatite [ $\text{HA}—\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] and anhydrous TCP [ $\alpha$ -TCP and  $\beta$ -TCP— $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] have been proposed as bone substitutes [2]. HA is the most stable under physiological conditions, its Ca/P ratio is equal to 1.67 like the mineral phase of bone, it is osteoconductive but slowly biodegradable.  $\alpha$ -TCP is the most hydrolysable and its use is favored in the preparation of bone cements [3].  $\beta$ -TCP is more stable, it has good osteoconductive

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10047-015-0838-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

  Daniel Chappard  
daniel.chappard@univ-angers.fr

- <sup>1</sup> GEROM Groupe Etudes Remodelage Osseux et BioMatériaux—LHEA, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, LUNAM Université, 49933 Angers Cedex, France
- <sup>2</sup> SCIAM, Service Commun d'Imagerie et Analyses Microscopiques, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, LUNAM Université, 49933 Angers Cedex, France



properties and a faster biodegradability than HA, making it a suitable synthetic bone substitute [4, 5].  $\beta$ -TCP has a Ca/P ratio of 1.5 and is in the form of a rhombohedral crystal. It can be obtained by two different synthetic routes. One way is a solid-state reaction at high temperature [6] and the most common method is a wet process followed by a heat treatment [7].  $\beta$ -TCP is usually used as a porous granules for oral and maxillofacial surgery, e.g., sinus lift augmentation or socket filling [8]. Biological properties (in particular osteoconductive properties) of  $\beta$ -TCP are conditioned by its specific composition, chemical properties and architectural properties (micro- and macroporosity) [9]. Bone colonization of a substitute biomaterial depends on its porosity, pores size, their distribution and interconnectivity [10]. These features determine the rate of bone ingrowth and allow the circulation and penetration of biological fluids and cell invasion throughout the material. Macroporosity with pore size between 100 and 600  $\mu\text{m}$  is conducive to vascular sprouts, osteoblasts and osteoclasts thus enabling bone remodeling to the core of the material.

In maxillofacial surgery,  $\beta$ -TCP granules are often used to fill a bone defect. There is a compromise to ensure a balance between the necessary amount of required material and the three-dimensional arrangement favoring colonization and vascularization of the pores in the graft site [11]. Size and porosity of the granules determine their spatial arrangement. These parameters are influenced by the mode of preparation of the granules.

The aim of this study was to characterize the nano-architecture of  $\beta$ -TCP granules prepared with different formulations. Nano-computed tomography was used to visualize the intimate architecture of these different types of granules. Scanning electron microscopy was done in parallel to explore the surface of the biomaterial granules. To validate the method, we have also analyzed the structure of a commercial composite biomaterial HA- $\beta$ -TCP by the same techniques.

## Materials and methods

### $\beta$ -TCP granules

$\beta$ -TCP granules used in this study were produced by the polyurethane foam technology [12, 13]. Briefly,  $\beta$ -TCP powder was mixed with distilled water to prepare six types of slurries with 10, 11, 15, 18, 21 and 25 g of powder per 100 ml of distilled water. Slurries were used to impregnate small cubes of polyurethane foam. The blocks impregnated with the slurry were then dried in an oven and heated at 800 °C to completely remove the organic polymer foam. Then the 3D scaffolds of  $\beta$ -TCP were sintered at 1200 °C; granules were obtained by crushing the blocks in an

alumina mortar and the 1000–2000  $\mu\text{m}$  fraction was collected by sieving. This size of granule is the most commonly used for maxillofacial surgery.

### HA- $\beta$ -TCP granules

Commercially available HA- $\beta$ -TCP granules, also produced by the foam technology, were obtained from Kasios (TCH<sup>®</sup> granules, Kasios, L'Union—France). TCH granules are prepared with 75 % HA and 25  $\beta$ -TCP in the slurry. Impregnation, drying and sintering of polyurethane foam were done as above.

### Nano-computed tomography (nanoCT)

The Phoenix Nanotom was used to analyze the granules (Phoenix Technologies, General Electric, 69760 Limonest, France). The  $\beta$ -TCP granules were stuck on a glass rod (2 mm in diameter) with Neo Entellan<sup>®</sup> (Merck), a mounting medium for microscopy composed of poly (methylmethacrylate) dissolved in xylene. Analyses were done at a tension of 50 kV and a beam current of 500  $\mu\text{A}$ . Acquisition time for each image was 750 ms with an average of 5 images by projection. Rotation of the sample was set to 1.95°. Reconstruction was made from 2400 images obtained at a resolution of 0.7  $\mu\text{m}$  per pixel. Reconstruction of 2D sections from projection images was done with the DATOS software (Phoenix). Visualization of 3D models was done with the VGStudio Max software (Volume Graphic GmbH, Heidelberg, Germany; release 2.2); this software also provided cross sections of different visible plans ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ) and 3D models. Virtual section within 3D models was done with a virtual plane. For each formulation of  $\beta$ -TCP, three granules were analyzed.

### SEM analysis

The surface morphology of the  $\beta$ -TCP granules was observed by scanning electron microscopy (JEOL 6301F, Paris, FRANCE). The  $\beta$ -TCP granules were glued on an aluminum stub with a double-sided carbon sellotape. They were gold-coated by sputtering with a MED 020 (Bal-Tec, Chatillon sur Cher, France). Images were captured at a 3 kV acceleration voltage in the secondary electron mode. For comparison, a piece of polyurethane foam used to prepare the granules was analyzed under the same conditions.

## Results

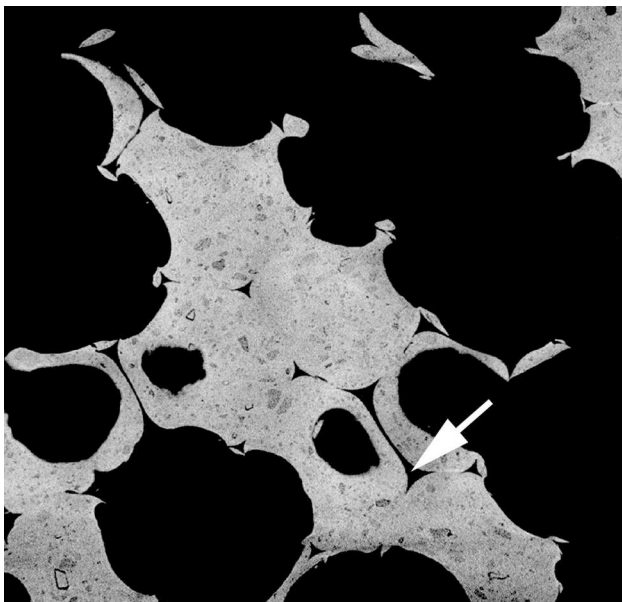
### 2D images

The 2D images allow visualization of the internal structure and boundaries of the biomaterials. Concave surfaces

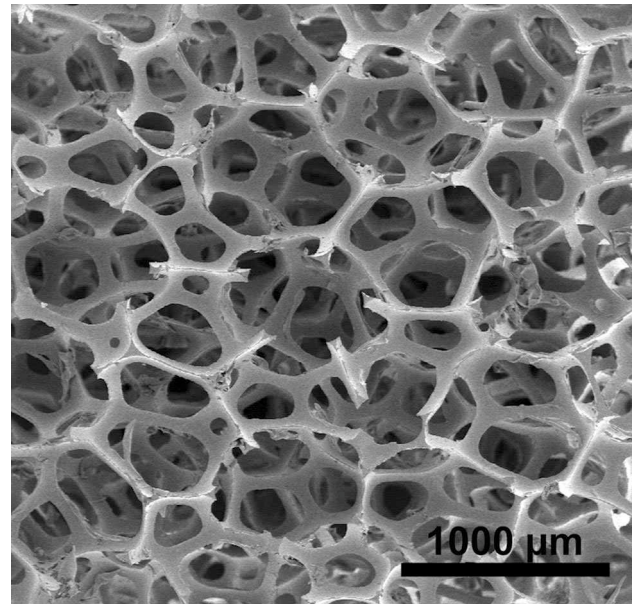
appeared clearly on the 2D cross sections together with inner macropores.  $\beta$ -TCP granules prepared with the highest amount of material in the slurry (21 and 25 g) appeared compact with a few macropores. The most porous granules were those prepared with the 10 and 11 g concentrations. After removal of the polyurethane foam, a remaining inner porosity was still observed on 2D cross sections of each type of  $\beta$ -TCP granules (Fig. 1). It is composed of thin channels corresponding to the foam walls. A polygonal void (usually triangular with concave edges) is obtained when the uniting walls of polyurethane are connected (Fig. 2; supplementary video material 1).

A marked heterogeneity was also noticed in the mineral phase present in all granules: compacted ovoid grains were visible on the cross sections of the granules, either with different gray levels, or separated from the others by micropores.

By comparison, TCH<sup>®</sup> granules appeared as dense as the 25 g  $\beta$ -TCP granules with few internal macropores. The internal porosity due to removal of the polyurethane foam was shown in all granules. The mineral phase was heterogeneous; accumulation of large  $\beta$ -TCP grains was clearly visible and scattered throughout the surface section of the granules (Fig. 3a). They appeared in light gray on the 2D nanoCT sections due to a higher radio-opacity than HA which occupies the greater fraction of the section (with a salt-and-pepper appearance).



**Fig. 1** 2D cross section of a 18 g  $\beta$ -TCP granule imaged by nano-computed tomography. The inner porosity is due to the removal of the polyurethane foam (arrow)



**Fig. 2** Scanning electron microscopic analysis of the polyurethane foam. The scaffold is composed of thin trabeculae connected by nodes. The scaffold is composed by cells with a *tetraikadehedron* shape

### 3D models

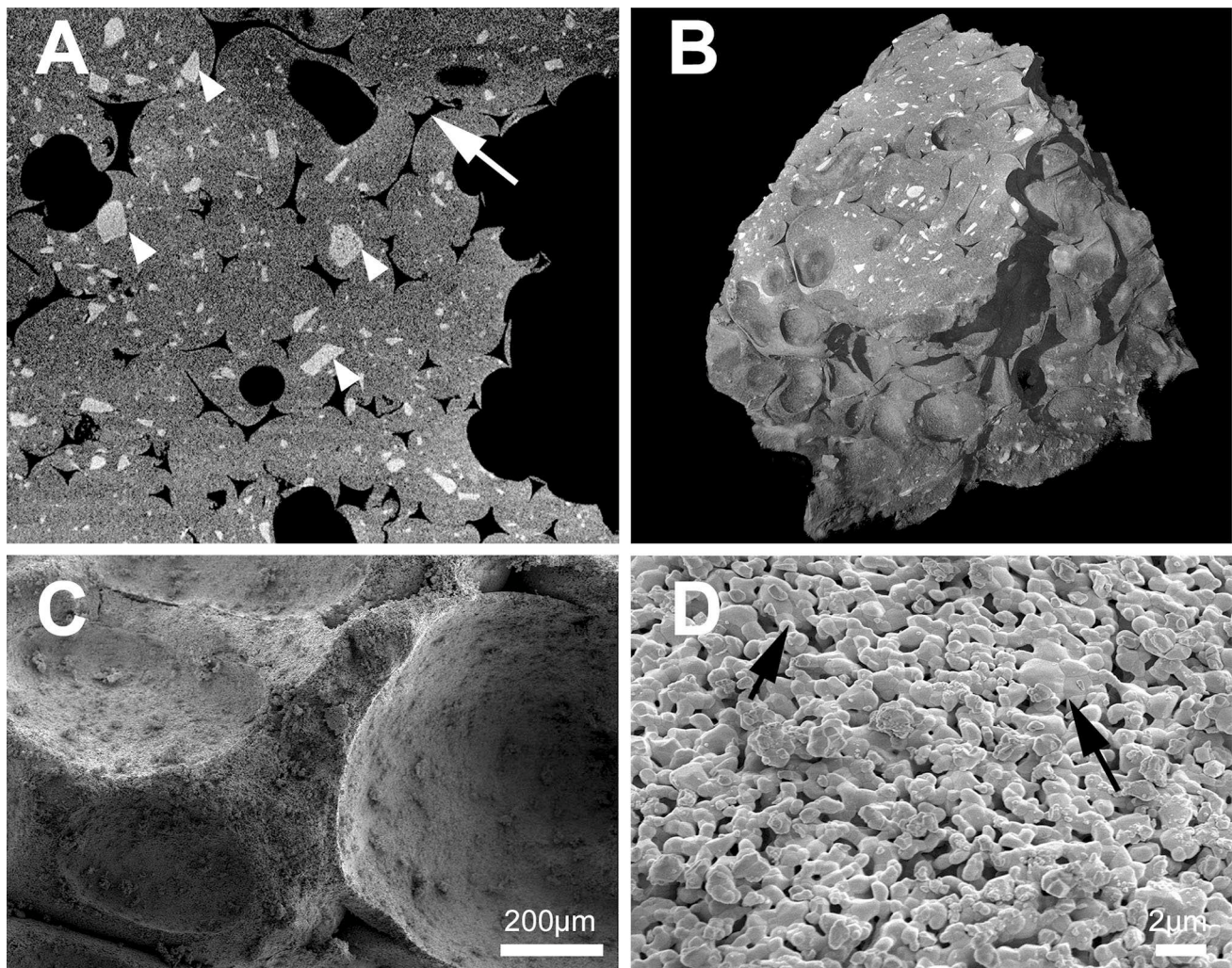
The 3D reconstruction allows the global visualization of granules' microarchitecture, and handling in the virtual space. The  $\beta$ -TCP granules exhibited macroporosity whose importance depended on the amount of powder in the slurries. The highest macroporosity was observed in granules prepared with the 10 and 11 g slurries. They contained many large pores and the presence of thin branches in the material was observable. The 15 and 18 g granules presented a lower extent of opened macropores and the 21 and 25 g granules were more compact with less macropores but a high number of concave surfaces. The internal porosity due to the polyurethane foam was evidenced on all types of granules. It appears as connected channels with a somewhat triangular section with concave sides (Fig. 4). Cross sections or videos of the 3D models allowed exploration of the inner part of the granules (see supplementary video material).

The TCH<sup>®</sup> granules had the same 3D microarchitecture than the 25 g granules made of  $\beta$ -TCP. However, the large  $\beta$ -TCP grains are well identified on cross sections of the 3D models (Fig. 3b).

### SEM images

The concave surfaces of the  $\beta$ -TCP granules were evidenced by SEM and the inner porosity due to the polyurethane was also well identified (Fig. 5). The free surface of the granules was formed by a pavement of polygonal





**Fig. 3** NanoCT and scanning electron microscopy analysis of TCH<sup>®</sup> granules prepared with 75 % HA and 25 %  $\beta$ -TCP. **a** 2D cross section of a granule imaged by nano-computed tomography. The inner porosity is due to removal of the polyurethane foam (arrow) and the macroporosity. The  $\beta$ -TCP grains appear whiter due to their high radio-opacity (arrowheads), the main phase of the granule is made

with HA; **b** 3D models of a TCH<sup>®</sup> granule; the concave surfaces, the inner porosity and the  $\beta$ -TCP grains (in white) are evidenced. **c** SEM of a TCH<sup>®</sup> granule at low magnification, the microarchitecture is similar to a  $\beta$ -TCP granule (compare with Fig. 4c); **d** SEM at higher magnification shows the surface composed of small HA grains and “islands” of hexagonal pavement due to  $\beta$ -TCP (arrows)

grains stuck together. A microporosity appeared at the surface of the granules: micropores were noted at the confluence of some polygonal tiles of the pavement. On the granule fractured surfaces, microporosity was also evidenced between partially melted grains. Inner porosity, left by the polyurethane foam, was also well defined in the form of triangular profiles connected with grooves. The pavement aspect also occurred at the surface of the inner porosity.

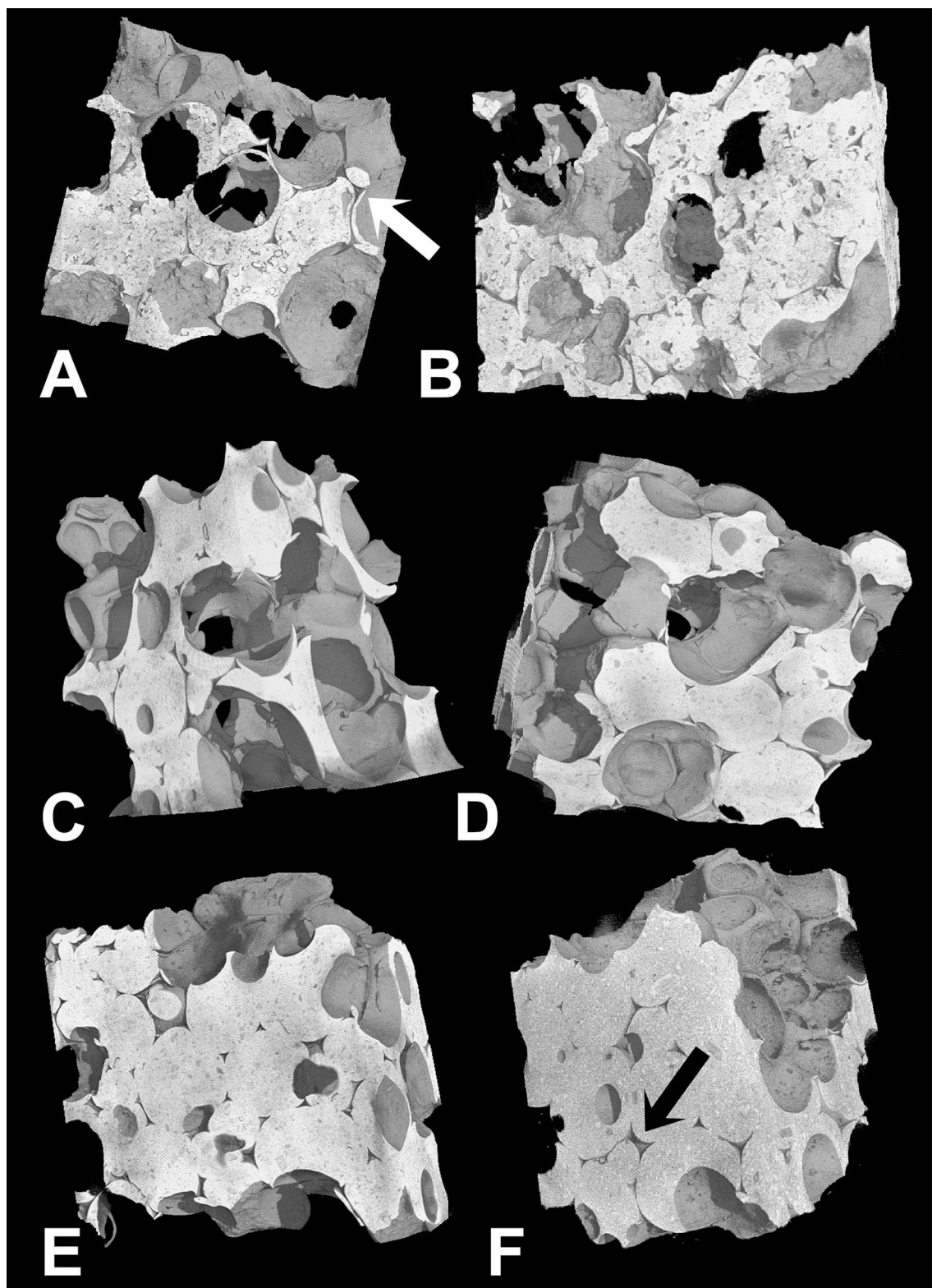
The TCH<sup>®</sup> granules had the same aspect at low magnification with concave surfaces and the inner porosity due to the polyurethane appearing on the free surfaces (Fig. 3c). At higher magnification, the surface of TCH<sup>®</sup> granules appeared completely different: many micropores were seen between the elementary HA grains which were

not all tied to each other. Some “islands”, with the typical polygonal pavement of  $\beta$ -TCP, were shown on the surface, between the HA-welded grains (Fig. 3d).

## Discussion

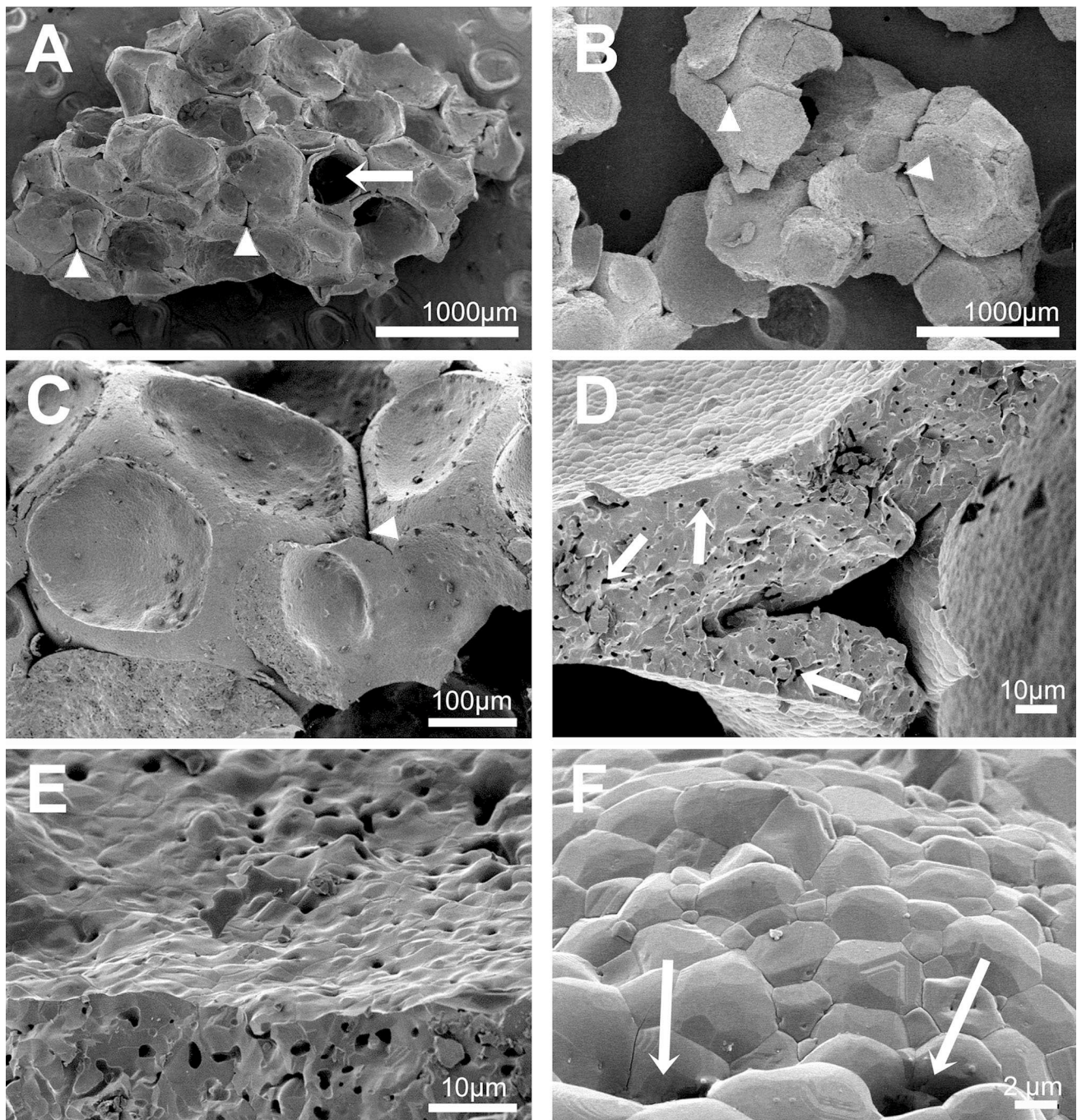
Bone micro- or nano-architecture can be evaluated by different methods such as microcomputed tomography (microCT), nano-computed tomography (nanoCT) and synchrotron tomography. These methods are non-destructive allowing 3D reconstruction based on the absorption of X-ray. Synchrotron uses a monochromatic and non-divergent beam which enables a higher spatial resolution, without artifact [14]. However, the technique is not easily





**Fig. 4** 3D models of  $\beta$ -TCP granules prepared with various concentrations in the slurry obtained by nanoCT. **a** 10 g, **b** 11 g, **c** 15 g, **d** 18 g, **e** 21 g and **f** 25 g of  $\beta$ -TCP powder in the slurry. *Arrows point on the inner porosity*





**Fig. 5** Scanning electron microscopy analysis of  $\beta$ -TCP granules prepared with various concentrations in the slurry. **a** 12 g  $\beta$ -TCP granule exhibiting macroporosity (arrow) and inner porosity (arrow heads), **b** 25 g  $\beta$ -TCP granules with numerous concave surfaces and inner porosity (arrow heads), **c** higher magnification of a 18 g  $\beta$ -TCP granules showing the concave surfaces and inner porosity (arrow

heads), **d** fractured surface of a 18 g  $\beta$ -TCP granule showing the triangular inner porosity and the microporosity between melted grains (arrows); **e** concave and fractured surfaces of a 10 g  $\beta$ -TCP granule showing the microporosity in surface and in depth; **f** surface of a 10 g  $\beta$ -TCP granule showing the polygonal pavement with 2 micropores (arrows)

available. MicroCT is a new type of technique which became available in biology or material laboratory after 2000 [15, 16]. The method has gained a considerable interest in the study of bone and biomaterials and provides 3D and 2D measurements of porosity [17–21]. MicroCT was used to

analyze the morphology and size of  $\beta$ -TCP granules but the method does not evidence the inner composition and the sintered minute grains composing the granules [11, 13, 22]. MicroCT of calcified objects uses a filtered polychromatic X-ray beam with an aluminum filter. On the other hand,

nanoCT uses a polychromatic X-ray and thin focal point tube to provide many structural details with a resolution better than 1  $\mu\text{m}$ . NanoCT produces phase contrast during the tomography acquisition and was found interesting to evidence the contrast of soft tissues [23–25]. Such an interesting resolution, and the fact that it is a less expensive method than synchrotron, makes nanoCT a good candidate for bone and biomaterials analysis [26, 27]. In the present study, nanoCT provided information on the external and internal microarchitecture of  $\beta$ -TCP granules prepared with different concentrations in the slurry. Images obtained with nanoCT showed that granules prepared with the lowest formulations (10, 11 and 15 g) had a higher macroporosity than the 21 and 25 g granules. The 21 and 25 g granules had a denser appearance with less interconnected pores but with a higher amount of concave surfaces. We have previously shown that compression tests evidenced a higher stiffness which was exponentially correlated with the amount of  $\beta$ -TCP in the slurries [11]. Slurries with a greater amount of material create large and compact clusters in the polyurethane foams. The internal porosity due to the polyurethane foam removal was present in all types of granules. The polyurethane foam is in the form of a network of trabeculae, interconnected at a large number of triangular nodes. The foam forms 3D cells having a tetrakaidecahedron structure [28–30]. The internal porosity reproduced the polyurethane foam network in negative and the nodes appeared as triangular or polygonal profiles. The commercial TCH<sup>®</sup> granules, prepared also by the foam technology, exhibited the same microarchitecture with an internal microporosity due to the removal of the polyurethane foam.

NanoCT revealed a marked heterogeneity in the composition of elementary grains of  $\beta$ -TCP sintered together to form the  $\beta$ -TCP granules: the grains have not the same gray level, suggesting that they do not have the same calcium concentration because the nanoCT images are based on X-ray absorption. This was previously reported for synchrotron images [31], SEM in the backscattered mode [32] and was also shown by our group in bones grafted with synthetic devices made with nacre [26]. The commercial TCH<sup>®</sup> granules also presented a considerable heterogeneity due to the presence of large  $\beta$ -TCP “islands” mixed with the main HA phase (75 %).

SEM allows visualization of small samples at higher magnification than nano- or microCT. SEM magnifications are much higher, up to 10,000 $\times$ , than those obtained with nanoCT (in the order of 50–100). In addition, SEM allowed a better characterization of the  $\beta$ -TCP granules’ surface with the hexagonal pavement texture and micropores. Micropores were also present at the free and fractured surfaces of the granules with a size about 1  $\mu\text{m}$ . These micropores correspond to an incomplete coalescence of

grains of  $\beta$ -TCP during the sintering step. SEM also revealed the difference in surface of the commercial TCH<sup>®</sup> granules with a characteristic aspect of HA [33] mixed with small hexagonal pavements due to  $\beta$ -TCP.

## Conclusion

$\beta$ -TCP is nowadays considered as one of the best bone substitutes due to its biocompatibility, bioactivity, osteoconductivity and rapid biodegradability.

Different formulations of  $\beta$ -TCP granules were characterized by nanoCT and SEM and compared to TCH<sup>®</sup> granules made of HA and  $\beta$ -TCP. These methods provide complementary information. NanoCT allows three-dimensional analysis of the internal and external architectures of the granules and evidenced the heterogeneous mineralization degree of the minute sintered  $\beta$ -TCP grains or the difference between HA and “islands” of  $\beta$ -TCP in TCH<sup>®</sup> granules. SEM provides higher magnifications than nanoCT and gives more details concerning the surface of the biomaterials. Although macro-, micro- and inner porosity were present in all types of granules, these methods showed marked differences in the architecture due to the concentration of  $\beta$ -TCP used in the slurries. NanoCT appears as an interesting method in the analysis of biomaterials and produces similar images than synchrotron.

**Acknowledgments** This work was made possible by grants from Contrat Region Pays de la Loire: Bioregos2 program. Miss L. Teranova received an Erasmus Mundus Ph.D. scholarship (program Nanofar). The authors thank Kasios, 18 chemin de la Violette, 31240 L’Union—France for help in preparing the different formulations of granules.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Jensen OT, Shulman LB, Block MS, Iacono VJ. Report of the Sinus Consensus Conference of 1996. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13:11–45.
2. Dorozhkin SV. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomater*. 2012;8:963–77.
3. Carrodegua R, De Aza S.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater*. 2011;7:3536–46.
4. Chazono M, Tanaka T, Komaki H, Fujii K. Bone formation and bioresorption after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. *J Biomed Mater Res Part A*. 2004;70:542–9.
5. Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, Proust JP. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J Biomed Mater Res*. 2002;63:408–12.
6. TenHuisen KS, Brown PW. Phase evolution during the formation of alpha-tricalcium phosphate. *J Am Ceramic Soc*. 1999;82:2813–8.



7. Vallet-Regi M, Rodriguez-Lorenzo LM, Salinas AJ. Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite. *Solid State Ion.* 1997;101:1279–85.
8. Chappard D, Guillaume B, Mallet R, Pascaretti-Grizon F, Baslé MF, Libouban H. Sinus lift augmentation and beta-TCP: a microCT and histologic analysis on human bone biopsies. *Micron.* 2010;41:321–6.
9. Suzuki O. Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials. *Jpn Dent Sci Rev.* 2013;49:58–71.
10. Anderson JM, Cook G, Costerton B, Hanson SR, Hensten-Petersen A, Jacobsen N, Johnson RJ, Mitchell RN, Pasmore M, Schoen FJ, Shirliff MPS. Host response to biomaterials and their evaluation. In: Ratner BD, Schoen FJ, Lemons JE, editors. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* 2nd Ed. San Diego: Elsevier; 2004. pp 293–300.
11. Ndiaye M, Terranova L, Mallet R, Mabilieu G, Chappard D. Three-dimensional arrangement of beta-tricalcium phosphate granules evaluated by microcomputed tomography and fractal analysis. *Acta Biomater.* 2015;11:404–11.
12. Schwartzwalder K, Somers H, Somers AV. Inventors; 3090094 A, assignee. Method of making porous ceramics. US Patent 3 090 094. 1963.
13. Filmon R, Retailleau-Gaborit N, Brossard G, Grizon-Pascaretti F, Baslé MF, Chappard D. Preparation of  $\beta$ -TCP granular material by polyurethane foam technology. *Image Anal Stereol.* 2009;28:1–10.
14. Nogueira LP, Braz D, Barroso RC, Oliveira LF, Pinheiro CJG, Dreossi D, Tromba G. 3D histomorphometric quantification of trabecular bones by computed microtomography using synchrotron radiation. *Micron.* 2010;41:990–6.
15. Ruegsegger P, Koller B, Muller R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int.* 1996;58:24–9.
16. Sasov A, Van Dyck D. Desktop X-ray microscopy and microtomography. *J Microsc.* 1998;191:151–8.
17. Borah B, Gross GJ, Dufresne TE, Smith TS, Cockman MD, Chmielewski PA, Lundy MW, Hartke JR, Sod EW. Three-dimensional microimaging (MRmicroI and microCT), finite element modeling, and rapid prototyping provide unique insights into bone architecture in osteoporosis. *Anat Rec.* 2001;265:101–10.
18. Massai D, Pennella F, Gentile P, Gallo D, Ciardelli G, Bignardi C, Audenino A, Morbiducci U. Image-based three-dimensional analysis to characterize the texture of porous scaffolds. *Bio Med Res Int.* 2014; ID 161437.
19. Schladitz K. Quantitative micro-CT. *J Microsc.* 2011;243:111–7.
20. Simon JL, Rekow ED, Thompson VP, Beam H, Ricci JL, Parsons JR. MicroCT analysis of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-dimensional printing for evaluating the effects of scaffold architecture on bone ingrowth. *J Biomed Mater Res Part A.* 2008;85:371–7.
21. van Lenthe GH, Hagenmuller H, Bohner M, Hollister SJ, Meinel L, Muller R. Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold-bone interaction in vivo. *Biomaterials.* 2007;28:2479–90.
22. Klein M, Goetz H, Pazen S, Al-Nawas B, Wagner W, Duschner H. Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20:67–74.
23. Wilkins S, Gureyev T, Gao D, Pogany A, Stevenson A. Phase-contrast imaging using polychromatic hard X-rays. *Nature.* 1996;384:335–8.
24. Kerckhofs G, Sainz J, Wevers M, Van de Putte T, Schrooten J. Contrast-enhanced nanofocus computed tomography images the cartilage substructure architecture in three dimensions. *Eur Cell Mater.* 2013;25:179–89.
25. Naveh GR, Brumfeld V, Shahar R, Weiner S. Tooth periodontal ligament: direct 3D microCT visualization of the collagen network and how the network changes when the tooth is loaded. *J Struct Biol.* 2013;181:108–15.
26. Pascaretti-Grizon F, Libouban H, Camprasse G, Camprasse S, Mallet R, Chappard D. The interface between nacre and bone after implantation in the sheep: a nanotomographic and Raman study. *J Raman Spectrosc.* 2014;45:558–64.
27. Weiss P, Obadia L, Magne D, Bourges X, Rau C, Weitkamp T, Khairoun I, Bouler JM, Chappard D, Gauthier O, Daculsi G. Synchrotron X-ray microtomography (on a micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials. *Biomaterials.* 2003;24:4591–601.
28. Sullivan RM, Ghosn LJ, Lerch BA. A general tetrakaidecahedron model for open-celled foams. *Int J Solids Struct.* 2008;45:1754–65.
29. Richardson J, Peng Y, Remue D. Properties of ceramic foam catalyst supports: pressure drop. *Appl Catal A Gen.* 2000;204:19–32.
30. Gibson LJ, Ashby MF. *Cellular solids: structure and properties.* Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
31. Borah B, Ritman EL, Dufresne TE, Jorgensen SM, Liu S, Sacha J, Phipps RJ, Turner RT. The effect of risedronate on bone mineralization as measured by micro-computed tomography with synchrotron radiation: correlation to histomorphometric indices of turnover. *Bone.* 2005;37:1–9.
32. Roschger P, Fratzl P, Eschberger J, Klaushofer K. Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. *Bone.* 1998;23:319–26.
33. Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Comparison of osteoinduction by autologous bone and biphasic calcium phosphate ceramic in goats. *Key Engin Mater.* 2007;330:1063–6.

## SYNTHESE ARTICLES 4 ET 5

Three-dimensional arrangement of  $\beta$ -tricalcium phosphate granules evaluated by microcomputed tomography and fractal analysis

Ndiaye M., Terranova L., Mallet R., Mabilieu G., Chappard D.

Acta Biomaterialia, 11 : 404-411, 2015

Facteur d'impact 2014 : 6.025

3D porous architecture of stacks of  $\beta$ -TCP granules compared with that of trabecular bone: microCT, vector analysis, and compression study

Chappard D., Terranova L., Mallet R., Mercier P.

Frontiers in endocrinology, 6 : 161, 2015

Facteur d'impact 2014: 2.154

et en e-book ISBN : 978-2-88919-311-0

L'os est un tissu calcifié qui a la capacité d'adapter son architecture aux contraintes extérieures. Dans les cas où le tissu osseux est endommagé ou comporte des microfractures, il est capable de se régénérer. Cependant, des pertes osseuses localisées peuvent survenir dans certains cas comme des kystes, des reprises de prothèses,... Les granules de céramique et notamment de  $\beta$ -TCP sont des biomatériaux fréquemment utilisés pour combler ces défauts osseux, mais la fragilité des granules de  $\beta$ -TCP est un frein à leur utilisation dans des zones fortement sollicitées. Dans les sites de greffe, les granules sont empilés et forment une matrice tridimensionnelle macroporeuse permettant l'infiltration cellulaire et vasculaire. Cependant, l'arrangement spatial de granules selon leur forme est peu connu.

Le but de ces études est de caractériser morphologiquement et quantitativement l'arrangement spatial d'empilements de granules de différentes formes puis de les comparer à l'os trabéculaire naturel.

Les granules de  $\beta$ -TCP ont été fabriqués par la technique des mousses de polyuréthane. Différentes formulations de barbotines ont été préparées, avec 10, 11, 15, 18, 21 et 25 g de grains élémentaires de  $\beta$ -TCP. Des granules de chaque type ont été empilés dans un tube et analysés par microCT. La reconstruction tridimensionnelle des granules a permis de calculer la fraction de volume du matériau ( $\text{Mat.V/V}$ ), la porosité et la dimension fractale ( $D_{3D}$ ). Les modèles 3D ont été découpés pour obtenir des sections bidimensionnelles binarisées. A partir des sections 2D, l'indice d'interconnectivité (ICI), le volume des pores entre les granules ( $V_{\text{Pore}}^*$ ), le volume des granules ( $V_{\text{Mat}}^*$ ), ainsi que la lacunarité ( $\delta$ ) et la succolarité ( $\sigma$ ) ont été mesurés. La lacunarité et la succolarité sont des dimensions fractales récemment décrites. La lacunarité caractérise la répartition spatiale et la densité des lacunes dans une image. La succolarité indique la capacité d'un fluide à traverser un ensemble dans une image. Ici, la succolarité dépend de l'interconnectivité du réseau de granules. Enfin, des analyses biomécaniques de compression ont été effectuées. Dans un second temps, pour répondre aux enjeux chirurgicaux, l'arrangement spatial d'empilement de granules commerciaux (12,5 g et 25 g de  $\beta$ -TCP) a été comparé à celui de cylindres d'os trabéculaire. Deux types d'os ont été prélevés : des échantillons d'épiphyse supérieure du tibia de jeunes veaux (Haute densité : HD) et de cadavres humains âgés (basse densité : LD). Les cylindres osseux et les granules, empilés dans un tube, ont été observés en microCT. La porosité ( $Po$ ), la surface spécifique ( $BS/TV$ ), le diamètre des pores ( $Po.Diam$ ).

La porosité est également évaluée grâce à un algorithme écrit sous Matlab. L'algorithme Vectopor™ utilise une projection de vecteurs sur les images microCT obtenues à partir des empilements de granules et des échantillons osseux (Chappard and Stancu 2015) (Figure 22). Pour chaque colonne, le nombre de pixels traversés par un vecteur est calculé puis il est associé à une couleur. Une table des couleurs (LUT) a été conçue et reflète le degré de porosité : du bleu foncé (sans porosité) au rouge (haute porosité). Une image de projection frontale est ainsi formée et établit la porosité des échantillons. La dimension fractale ( $D_f$ ) et la lacunarité ( $\delta$ ) ont été mesurées à partir de l'image de projection frontale.



### *Arrangement tridimensionnel de différentes formulations de granules de $\beta$ -TCP*

La variation de quantité de  $\beta$ -TCP dans les barbotines conduit à la fabrication de granules de différentes formes. Les granules de 10 et 11 g sont les plus poreux tandis que les granules fabriqués avec plus de  $\beta$ -TCP sont plus denses (21 et 25 g). Les sections bidimensionnelles binarisées des modèles d'empilement imagés en microCT ont permis d'établir des corrélations entre les différentes formulations de granules, les paramètres morphologiques et les dimensions fractales. Les granules empilés créent un environnement tridimensionnel poreux, mais leur forme va conditionner la géométrie d'empilement (Figure 23). Le pourcentage de matériau sur le volume total et le volume des granules augmentent avec la quantité de  $\beta$ -TCP dans les granules. Au contraire, la porosité est plus élevée dans les empilements de granules les plus poreux, qui contiennent plus de macropores avec des fines branches en périphérie. L'indice d'interconnectivité est important pour les granules de 10 et 11 g. Le volume des pores créé entre les granules est maximal pour les granules de 15 et 18 g. La dimension fractale des empilements diminue avec la quantité de  $\beta$ -TCP dans les granules. Les granules les plus poreux forment un empilement plus complexe dans toutes les directions dans l'espace. La lacunarité augmente jusqu'à une valeur maximale pour les granules de 15 g puis diminue. Les pores formés entre les granules de 15 g sont plus larges, ce qui a également été vérifié précédemment grâce au calcul de  $V^*_{\text{Pores}}$ . La succolarité est plus élevée pour les empilements de granules les plus denses, il y a moins de contact entre les granules et les pores sont plus homogènes.

Conformément aux résultats précédents, la porosité de l'empilement des granules commerciaux de 12,5 g est plus élevée que celle des granules de 25 g. De plus, elle correspond à l'ordre de grandeur de la porosité de l'os trabéculaire jeune de haute densité (HD). Les granules de 25 g forment un empilement avec de larges pores mais avec des surfaces denses de matériau. La surface spécifique de l'empilement de granules de 12,5 g est plus élevée que celles des granules de 25 g et celle des 2 types d'os. Elle correspond à la surface qui est en contact direct avec les cellules. L'analyse vectorielle montre que l'os HD est composé de surfaces avec beaucoup de matière (bleu) et des zones poreuses (jaune-rouge), tandis que l'os LD est composé de larges pores (rouge) (Figure 24). Les empilements de granules de 25 g présentent des zones avec beaucoup de matière (bleu foncé) et quelques larges pores. Au contraire, les empilements de granules de 12,5 g montrent une distribution plus homogène des pores et de la matière. La dimension fractale reste inchangée entre les groupes. La lacunarité des granules de 12,5 g est intermédiaire entre les valeurs de l'os trabéculaire HD et LD. L'empilement des granules de 12,5 g reflète mieux la microarchitecture poreuse de l'os trabéculaire.

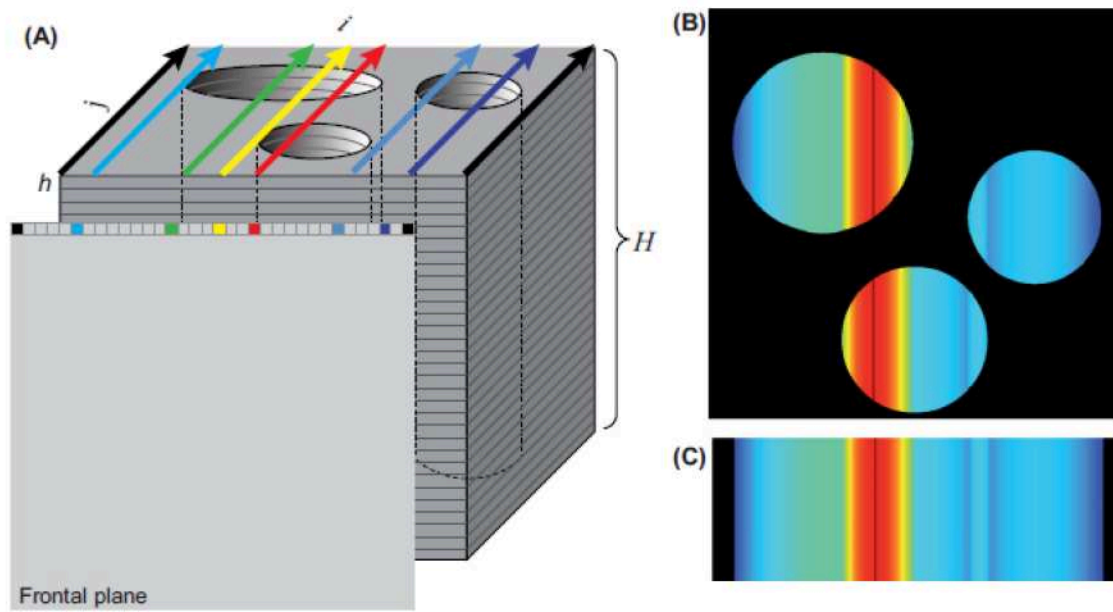


Figure 22 : Principe de l'algorithme de projection de vecteurs (Chappard and Stancu 2015).

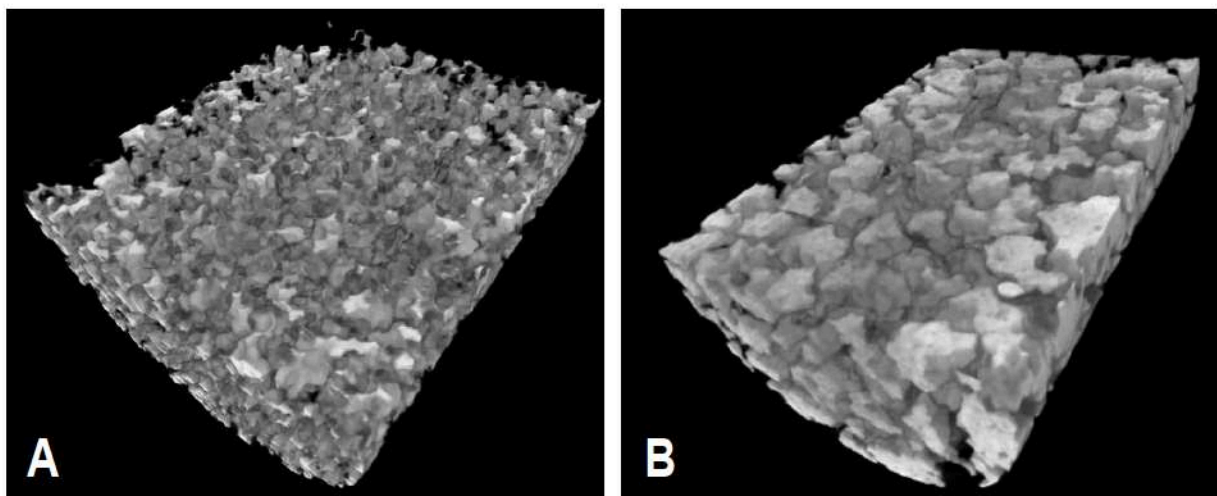


Figure 23 : Reconstruction tridimensionnelle de l'empilement de granules de  $\beta$ -TCP en microCT : (A) 10g et (B) 25g.

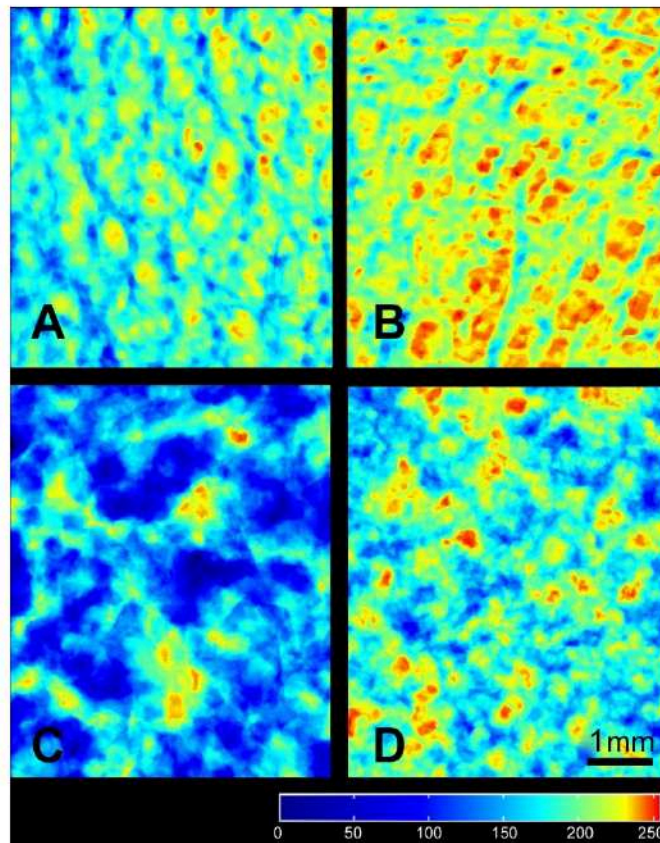


Figure 24 : Projections frontales des différents types de matériaux: (A) os haute densité, (B) os basse densité, (C) empilements de granules de 25g et (D) de granules de 12,5g.

#### *Analyses biomécaniques en compression*

La résistance biomécanique en compression des granules est influencée par leur forme. Les granules de  $\beta$ -TCP ont été empilés dans un support d'analyse de compression. Un poinçon placé au-dessus a enfoncé l'empilement de granules à une vitesse imposée de 2 mm/min (Figure 25). La charge totale imposée au système a été fixée à 400 N. L'avancement du poinçon dans l'empilement a été mesuré en continu en fonction de la contrainte imposée afin d'obtenir la courbe de compression. La compression des granules est un processus dynamique irréversible, c'est la déformation plastique. Au début de l'application de la charge, on assiste à un réarrangement des granules dans l'empilement par glissement et rotation. Les distances de contact entre granules sont réduites sans déformation excessive et les plus grands vides sont comblés. A la fin de cette étape de tassement, le nombre de points de contact entre les granules a augmenté et ils ne peuvent plus se réarranger entre eux. L'empilement est devenu plus dense et impose alors une réelle résistance. La raideur, un paramètre clé du comportement mécanique des matériaux, est déterminée comme la tangente à la courbe au début de la déformation.

Les courbes de compression des granules de 10, 11 et 15 g suivent la même tendance exponentielle (Figure 26). Les granules poreux ont une raideur plus faible. Ils sont plus friables et peu d'énergie est



nécessaire pour les briser dans l'empilement. Au contraire, la raideur devient beaucoup plus élevée pour les granules compacts de 21 et 25 g ; l'énergie de compression à fournir est plus forte.

Ces études montrent l'influence de l'architecture des granules sur leur arrangement dans un espace fermé. Dans un site de greffe, l'empilement 3D des granules doit offrir une large porosité et interconnectivité pour permettre l'invasion cellulaire et vasculaire, mais doit également résister aux forces de compression. Les granules de 15 et 18 g remplissent le mieux ces critères.

La comparaison de l'arrangement tridimensionnel de granules commerciaux avec de l'os trabéculaire nous permet de mimer au plus près l'architecture naturelle de l'os. Les granules commerciaux les plus poreux permettent de créer un environnement poreux proche de celui de l'os trabéculaire.



Figure 25 : Appareil de compression Instron, le poinçon écrase les granules empilés dans le support d'analyse.

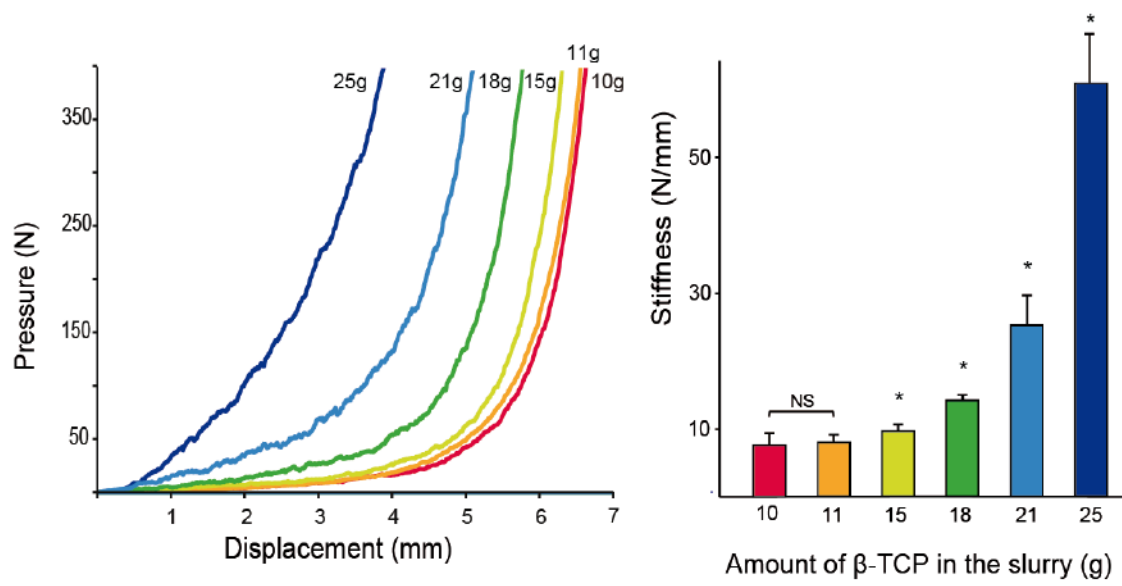
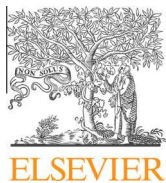


Figure 26 : A gauche, courbes de compression des différentes formulations de granules de  $\beta$ -TCP. A droite, calcul de la raideur des différents granules.



## Three-dimensional arrangement of $\beta$ -tricalcium phosphate granules evaluated by microcomputed tomography and fractal analysis



Mambaye Ndiaye<sup>a</sup>, Lisa Terranova<sup>a</sup>, Romain Mallet<sup>a,b</sup>, Guillaume Mabilieu<sup>a,b</sup>, Daniel Chappard<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> GEROM Groupe Etudes Remodelage Osseux et bioMatériaux – LHEA, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, LUNAM Université, 49933 Angers Cedex, France

<sup>b</sup> SCIAM, Service Commun d'Imagerie et Analyses Microscopiques, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, LUNAM Université, 49933 Angers Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 June 2014

Received in revised form 26 August 2014

Accepted 11 September 2014

Available online 19 September 2014

#### Keywords:

Granular material

Fractal geometry

Lacunarity

Succolarity

$\beta$ -TCP

### ABSTRACT

The macrophysical properties of granular biomaterials used to fill bone defects have rarely been considered. Granules of a given biomaterial occupy three-dimensional (3-D) space when packed together and create a macroporosity suitable for the invasion of vascular and bone cells. Granules of  $\beta$ -tricalcium phosphate were prepared using polyurethane foam technology and increasing the amount of material powder in the slurry (10, 11, 15, 18, 21 and 25 g). After sintering, granules of 1000–2000  $\mu\text{m}$  were prepared by sieving. They were analyzed morphologically by scanning electron microscopy and placed in polyethylene test tubes to produce 3-D scaffolds. Microcomputed tomography (microCT) was used to image the scaffolds and to determine porosity and fractal dimension in three dimensions. Two-dimensional sections of the microCT models were binarized and used to compute classical morphometric parameters describing porosity (interconnectivity index, strut analysis and star volumes) and fractal dimensions. In addition, two newly important fractal parameters (lacunarity and succolarity) were measured. Compression analysis of the stacks of granules was done. Porosity decreased as the amount of material in the slurry increased but non-linear relationships were observed between microarchitectural parameters describing the pores and porosity. Lacunarity increased in the series of granules but succolarity (reflecting the penetration of a fluid) was maximal in the 15–18 g groups and decreased noticeably in the 25 g group. The 3-D arrangement of biomaterial granules studied by these new fractal techniques allows the optimal formulation to be derived based on the lowest amount of material, suitable mechanical resistance during crushing and the creation of large interconnected pores.

© 2014 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Several types of biomaterials have been proposed that can be used to fill bone defects in implant dentistry, orthopaedics or plastic surgeries. The use of morcellized bone particles or synthetic biomaterial granules has been recognized for decades, to provide templates for osteoconduction [1,2]. Synthetic biomaterials such as ceramics offer the possibility of being produced in large amounts and of being prepared with a micro-and/or macroporosity [3,4]. The geometry of the grafted material is considered as a critical parameter to favor bone formation [5]. This has been particularly studied for designing porous scaffolds because an interconnected porosity is required to allow the migration of fluids and cells through the three-dimensional (3-D) microarchitecture

[6–8]. However, little is known about the 3-D disposition of the biomaterial granules implanted in a grafted site.  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) is a well-known ceramic with bioactive properties [9,10]. When prepared by the polyurethane-foam technique, the shape of  $\beta$ -TCP granules can be controlled by scanning electron microscopy (SEM) or X-ray microcomputed tomography (microCT) [11]. The spatial disposition of  $\beta$ -TCP granules according to their shape has never been studied. It is essential to develop granules with the best adapted shape that would favor the invasion of vascular growth bringing bone cells and allowing the diffusion of nutrients in the very center of the grafted area. MicroCT allows a quantitative evaluation of the material volume and porosity in three dimensions but the method cannot provide a good description of pore interconnectivity and geometry. Several algorithms have been described to evaluate the interconnectivity of marrow spaces in bone tissue (i.e. the porosity of trabecular bone) on two-dimensional (2-D) sections [12,13]. The fractal dimension can evaluate the complexity of the material to fill the reference space and is helpful in the study of porous objects such as bone

\* Corresponding author at: GEROM Groupe Etudes Remodelage Osseux et bioMatériaux – LHEA, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, LUNAM Université, 49933 Angers Cedex, France. Tel.: +33 244 68 83 49; fax: +33 244 68 83 50.

E-mail address: [daniel.chappard@univ-angers.fr](mailto:daniel.chappard@univ-angers.fr) (D. Chappard).



[14,15] or materials [16,17]. Recently, new fractal parameters have been described (lacunarity and succolarity) to evaluate the heterogeneity and connectivity of the drainage patterns within an object [18–20]. Lacunarity is a concept introduced by Mandelbrot to describe the nature of gaps, voids or pores within texture images [21]. Succolarity is another concept proposed by Mandelbrot and represents the degree of percolation of an image (i.e., how a fluid can flow through an image) [21]. In the present study, we have used granules of  $\beta$ -TCP with different shapes by varying the amount of the slurry in the polyurethane foam. Granules were placed in test tubes and allowed to settle. The 3-D arrangement of the granules was evaluated by microCT, and 2-D sections were used to compute fractal dimensions, lacunarity and succolarity in order to better characterize the porosity created between the granules.

## 2. Materials and methods

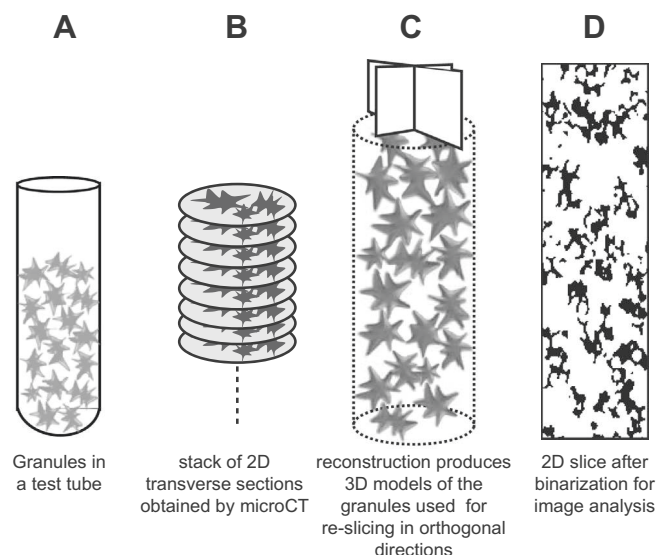
### 2.1. Preparation of $\beta$ -TCP granules

Granules of  $\beta$ -TCP were prepared by the polyurethane foam technology as previously described [11,22]. Different volume fractions were investigated: 10, 11, 15, 18, 21 and 25 g of  $\beta$ -TCP powder were mixed with distilled water to produce six types of slurries. They were used to impregnate 1 g cubes of polyurethane foam under vacuum. The blocks impregnated with the slurries were then dried in an oven and heated at 800 °C to completely burn the organic polymer foam. Then the 3-D scaffolds of  $\beta$ -TCP were sintered at 1200 °C; granules were obtained by crushing the blocks in an alumina mortar and the 1000–2000  $\mu$ m fraction was collected by sieving. This size of granule is the most commonly used for dental and implant surgery. The frequency distribution of the granules' size (measured by SEM) was always found to follow a log-normal distribution as expected (data not shown). This method provided a series of granules that differed in shape, according to the amount of  $\beta$ -TCP in the slurry. The shape of the granules was controlled by SEM before use.

### 2.2. MicroCT

The Skyscan 1172 X-ray microcomputed tomograph (Bruker microCT, Kontich, Belgium) was used in the cone beam acquisition mode. Granules of the different grades were placed in polyethylene test tubes (5 mm in diameter, 4 cm<sup>3</sup> of granules in each tube). The tubes were gently agitated to allow granules to settle (Fig. 1). For each series, three test tubes were prepared and microtomographed at 80 kV, 100  $\mu$ A with a 0.5 mm aluminum filter. The pixel size was fixed at 4.95  $\mu$ m and a 0.25° rotation angle was applied at each step. 2-D cross-sections of the stacks of granules were reconstructed from the series of projections images. They were used to prepare 3-D models of the granule arrangements by using the software provided by Bruker microCT (CtVol for surface rendering and CtVox for volume rendering). The fractional amount of material (Mat.V/V) and the porosity (Po.V/V = 100 – Mat.V/V; in %) were determined by the CtAn software. The fractal dimension ( $D_{3D}$ ) of the granules arrangement was determined in three dimensions by the Kolmogorov “cubic box counting” method, which is an extrapolation of the 2-D method (see below) to the 3-D space. The side of the cube ranged from 2 to 100 pixels.

For determining lacunarity and succolarity, 2-D sections were re-sliced from the 3-D models: two sagittal sections (separated by 200  $\mu$ m) were obtained, and two others sections were done in orthogonal planes. So, for each test tube, four sections were obtained and binarized.



**Fig. 1.** Methods used to prepare the images suitable for 2-D and 3-D analysis. (A) Granules of  $\beta$ -TCP are placed in a test tube and are allowed to settle. (B) The test tube is analyzed by microCT. (C) The 3-D model is reconstructed and re-sliced in two orthogonal directions to provide the 2-D images suitable for analysis after binarization (D).

### 2.3. Image analysis on 2-D sections

Binarized images were transferred to a Leica Q550 image analyzer to determine classical parameters describing both the materials and the porosity between the granules. The interconnectivity index of the porosity (ICI) was determined by skeletonization of the spaces between the granules, as previously reported [23]. The star volumes were determined by the grid algorithm (this method is sometimes referred as the MIL, maximum intercept length) [13,24]. The star volume was determined on the pores  $V_{Pore}^*$  (a high star volume indicates a highly fragmented material or the presence of large pores). The star volume of the granules ( $V_{Mat}^*$ ) was also determined. The Euler–Poincaré number ( $E$ ) was measured by counting the number of enclosed medullar cavities and connected trabeculae [25]. Assessment of the granules' shape was described by “strut analysis” [26]. The granules were skeletonized; the number of nodes and free ends of the skeleton were computed and the node-to-free-end ratio was determined ( $N/F$ ) [27]. A compact granule has a high number of nodes and a low number of free ends. A granule with numerous branches has a high number of free ends and a low number of nodes.

The Kolmogorov fractal dimension ( $D_K$ ) was measured by the box-counting method and the Minkowski–Bouligand ( $D_{MB}$ ) dilatation method as previously described [14]. Briefly  $D_K$  was computed by over imposing grids of square boxes (with  $\varepsilon$  pixels as side length) on the granules border and intersecting boxes were counted. The total number of boxes required to completely fill the granules boundaries reflected the perimeter with a scale ratio of  $\varepsilon$ . This step was repeated with  $\varepsilon$  varying from 2 to 100 pixels and a log–log graph (i.e.  $\log [N]$  against  $\log [\varepsilon]$ ) was used to determine  $D_K$  from the slope of the regression line.  $D_{MB}$  was obtained by using a series of dilatations of the granule's boundary and was repeated from 10 to 10 times; after each new dilatation  $\phi$ , the granule border thickened and the surface area of the dilated image  $A$  was measured.  $D_{KM}$  was determined on the log–log graph from the slope of  $\phi/A$ .

For computing lacunarity and succolarity, the 2-D images were transferred to a lab-made software written in Matlab (Math Works, Natick, Ma; release 7.10). Lacunarity ( $\delta$ ) was measured by the

“gliding box” method [18,28]. The technique was recently adapted to porous biomaterials (see details of the algorithms in Ref. [29]). Briefly, a square box of side  $\varepsilon$  was glided along all possible directions of the image. The total number of flooded pixels counted during this process was calculated. The procedure was repeated by gradually increasing the size of boxes. The total number of flooded pixels was defined by a mass distribution  $n(M, \varepsilon)$ . By dividing this number by the total number of boxes of size  $\varepsilon$  the probability distribution of  $Q(M, \varepsilon)$  was obtained and corresponded to the frequency of the number of occupation of a box of mass  $M$  and size  $\varepsilon$ . Local lacunarity ( $\delta$ ) for a box side  $\varepsilon$  was defined by the ratio between the second moment and the square of the first moment. A log–log graph of  $\log(\delta)$  and  $\log(\varepsilon)$  was used to determine  $\delta$  from the slope of the regression line. Lacunarity ( $\delta$ ) was measured on the pores, i.e. on the white pixels in Fig. 1D.

Succolarity ( $\sigma$ ) was calculated according to de Melo and Conci using a box counting approach on a square image of side  $n$  pixels [19]. Succolarity was calculated in four directions: e.g. from left to right, from right to left, from top to bottom and from bottom to top. Briefly, in a first step, the image was flooded in a given direction, ensuring that all black pixels of the first column were detected. Then all the four connected black pixels were selected until an impenetrable mass of white pixels was encountered. The flooded image was then analyzed using the sliding box method with the size of the box  $t$  ranging from 2 to  $n - 1$ , where  $n$  is the size of the image (i.e.,  $t$  is the factor of division of the image) [18]. The number of flooded pixels in the box  $B$  was determined. In a third step, the occupation percentage of the box  $PO_{(B)}$  was calculated as the ratio of the number of flooded pixels and the square size of the box. Then, the “pressure” ( $PR$ ) exerted on the boxes (by analogy to the liquid which has flooded the image) is stored in an array of pressures. The pressure increases from line to line (or column to column) along the direction of the flood. Finally, succolarity for a given direction was calculated as then ratio of

$$\sigma_{(direction, B)} = \frac{\sum_{t=1}^n PO_{(B)} \times PR_{(B)}}{\sum_{t=1}^n PR_{(B)}}$$

Values were similarly computed vertically (from top to bottom and bottom to top) and horizontally (from left to right and right to left) for the pores (resp.  $\sigma_l$  and  $\sigma_r$ ) i.e. on the white pixels in Fig. 1D.

#### 2.4. Biomechanical analysis

The compression characteristics of the different  $\beta$ -TCP powders were determined on an Instron 5942 machine with Bluehill software (Instron, Elancourt, France). The powders were placed into the test cell and compacted with a punch that fits with the cell diameter (10 mm in diameter). The maximum load was fixed at 400 N with a 2 mm  $\text{min}^{-1}$  displacement. For each type of granule, four measures were done and averaged to provide the compression curve of each type of  $\beta$ -TCP granule. The compression curve of each type of granule was obtained. The stiffness was automatically provided by measuring the tangent to the curve at the beginning of the deformation. The maximum displacement of the punch was obtained when the load reached 400 N. The work to failure was determined by measuring the area under the curve.

#### 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Systat statistical software release 13.0 (Systat Software Inc., San José, CA). All data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Differences between groups were analyzed by a non-parametric analysis of variance test (Kruskal–Wallis) with the Conover–Inman post hoc test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . When

non-linear relationships were obtained, the equation which best described the points was searched using TableCurve 2D (Systat Inc, release 5.01). The value of the coefficient of correlation  $r$  was calculated using a linear ( $r_{lin}$ ), a  $x^3$  polynomial regression ( $r_{pol}$ ), a logarithmic ( $r_{log}$ ) or an exponential ( $r_{exp}$ ) equation.

### 3. Results

#### 3.1. The $\beta$ -TCP granule morphology

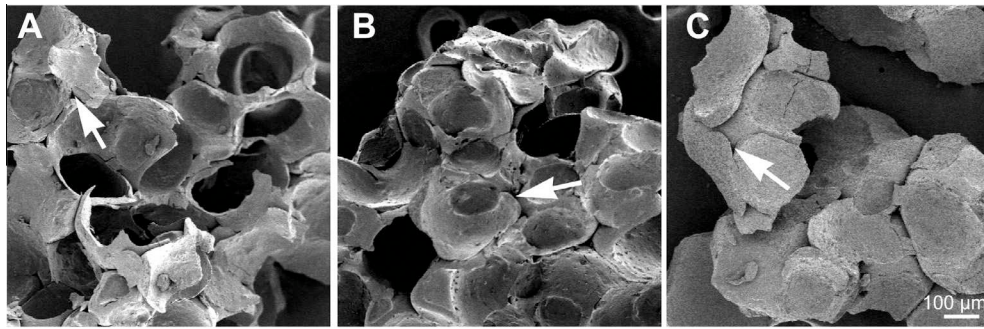
The porosity of the granules was evidenced with the naked eye and confirmed by SEM. The 10 g granules were the most porous with thin walls of sintered  $\beta$ -TCP but they were very difficult to handle due to a high fragility (Fig. 2). In contrast, the 25 g granules were denser, with numerous concave surfaces and rare macropores. The other formulations were associated with intermediate aspects: e.g., the 15 g granules had numerous macropores, thicker walls and they were less friable than the 10 g ones. As previously reported, the inner porosity due to sublimation of the polyurethane foam was always clearly identified in each group of granule. The external surface of the granules showed concave areas with the classical hexagonal pavement due to the surface melting of the grains.

#### 3.2. Biomechanical analysis

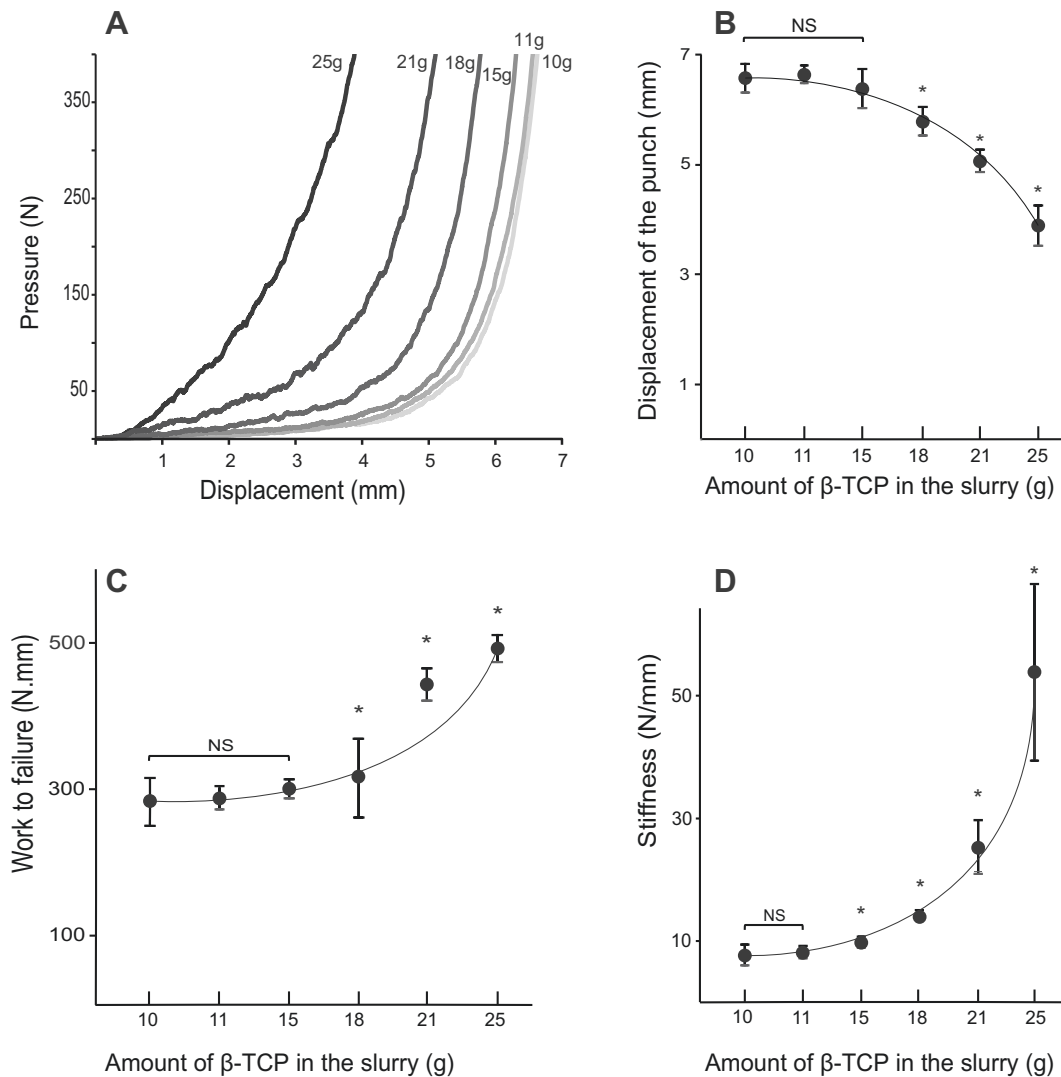
The compaction curve of each type of granule appears in Fig. 3A. For granules with the lowest formulation, the curves were exponential. The first domain of the curve corresponds to the collapse of the granules and the deformation is due to their irreversible compression. There was a direct relationship between the maximum displacement of the punch and the type of the granules: the more porous granules were associated with the highest displacement of the punch ( $r_{pol} = 0.95$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 3B). In contrast, the work to failure increased with the density of the granules ( $r_{pol} = 0.92$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 3C) but no significant difference was observed between the first three groups. Stiffness confirmed the previous results and there was a positive exponential relationship between the amount of  $\beta$ -TCP grains used to prepare the granules and this parameter ( $r_{exp} = 0.97$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 3D).

#### 3.3. Morphometric analysis

Videos obtained with the 10 and 25 g granules are provided as online [Supplementary Materials](#). Binarized images of the 2-D sections obtained after re-slicing the 3-D microCT models appear in Fig. 4. Morphometric parameters depicting the spatial arrangement of the granules are provided in Table 1. There was a non-linear negative relationship between porosity and the amount of powder in the slurry ( $r_{pol} = 0.98$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 5A). Porosity was inversely correlated with  $N/F$ , which reflected the compactness of the granule shape ( $r_{lin} = 0.84$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 5A). Porosity was linearly correlated with Euler–Poincaré’s number ( $r_{lin} = 0.96$ ;  $p < 0.001$ ) but not with  $V_{pore}^*$ ; on the contrary, there was a highly significant and negative log-correlation with  $V_{Mat}^*$ , meaning that the pore size between the granules was reduced as a function of the amount of powder in the slurry ( $r_{lin} = 0.81$ ,  $p < 0.0001$ ). There was an exponential correlation between the groups and  $V_{Mat}^*$  ( $r_{exp} = 0.99$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 5B). The relationship between  $V_{pore}^*$  and the different groups of granules appeared with an inverted U-shape with a maximum for the 15 g group (Fig. 5B). The best-fit equation was a polynomial regression ( $r_{pol} = 0.50$ ,  $p = 0.02$ ). ICI (reflecting the connectivity of the pores) had a mirror U-shape curve ( $r_{pol} = 0.88$ ,  $p < 0.0001$ ).



**Fig. 2.** SEM of different types of granules at the same magnification: (A) prepared with 10 g, (B) with 15 g, (C) with 25 g of  $\beta$ -TCP powder in the slurry. Note the thin branches with the lowest concentration and the more massive shape with the highest. The white arrows identify the inner porosity obtained after sublimation of the polyethylene foam.



**Fig. 3.** Biomechanical analysis of the different types of granules. (A) Relationships between displacement and pressure obtained by compression. (B) Relationship between the different groups of granules and the displacement of the punch. (C) Exponential relationship between the different groups of granule and the work to failure. (D) Exponential relationship between the different groups and stiffness.

### 3.4. Fractal parameters

The different fractal parameters according to the amount of  $\beta$ -TCP powder in the slurry appear in Table 2.  $D_{3D}$ ,  $D_K$  and  $D_{MB}$  regularly decreased as a log function of the amount of material in the

slurry.  $D_K$  and  $D_{MB}$  were linearly correlated ( $r_{lin} = 0.94$ ;  $p < 0.001$ ).  $D_{3D}$  was linearly correlated with  $D_K$  ( $r_{lin} = 0.46$ ;  $p = 0.05$ ) but the correlation with  $D_{MB}$  did not reach significance. Due to the size of the images, which was higher when considering the vertical direction (|, i.e., top-to-bottom and bottom-to-top analysis), the



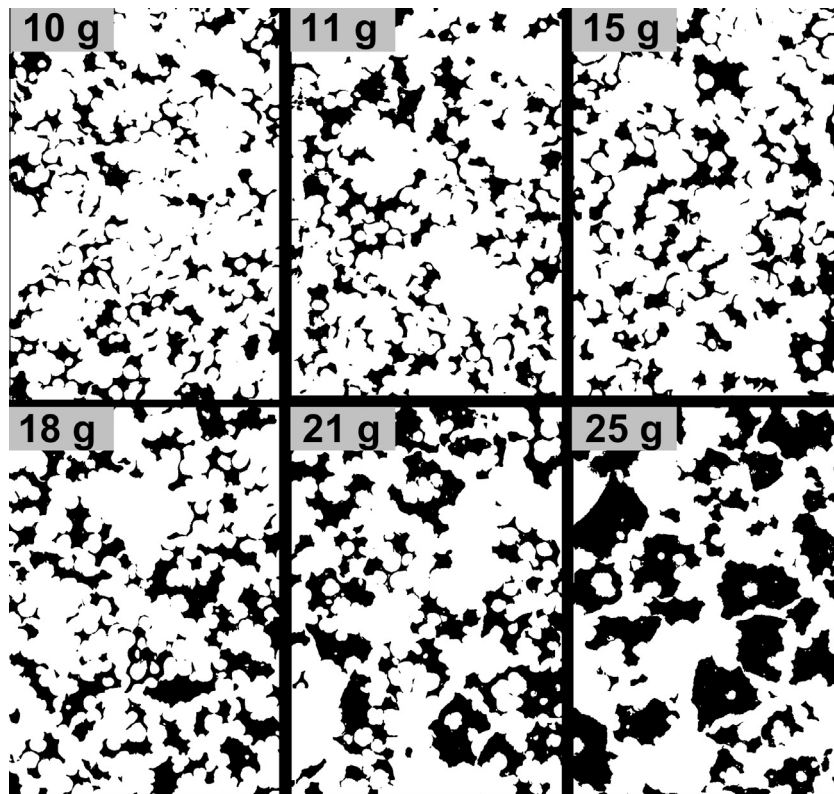


Fig. 4. Binarized images of the 2-D sections obtained on the 3-D microCT models obtained in the different groups of granules.

Table 1

Morphometric parameters obtained on 2-D and 3-D depending on the volume fraction of  $\beta$ -TCP used in the slurry to prepare the granules.

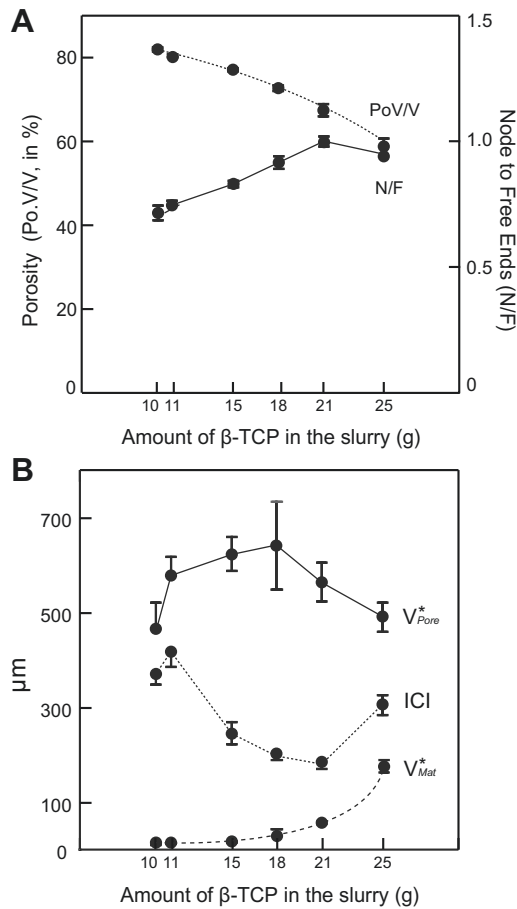
| Parameter           | Unit          | 10 g            | 11 g            | 15 g            | 18 g            | 21 g            | 25 g            |
|---------------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Mat V/V             | %             | 18.0 $\pm$ 0.4  | 19.5 $\pm$ 0.3  | 22.8 $\pm$ 0.3  | 27.3 $\pm$ 0.5  | 32.5 $\pm$ 1.0  | 41.1 $\pm$ 0.7  |
| Porosity            | %             | 81.9 $\pm$ 0.4  | 80.4 $\pm$ 0.3  | 77.1 $\pm$ 0.3  | 72.7 $\pm$ 0.5  | 67.5 $\pm$ 1.0  | 58.9 $\pm$ 0.7  |
| ICI                 | -             | 370 $\pm$ 17    | 416 $\pm$ 23    | 245 $\pm$ 18    | 196 $\pm$ 3     | 179 $\pm$ 8     | 305 $\pm$ 16    |
| N/F                 | %             | 0.71 $\pm$ 0.02 | 0.75 $\pm$ 0.01 | 0.83 $\pm$ 0.01 | 0.92 $\pm$ 0.02 | 1.0 $\pm$ 0.01  | 0.95 $\pm$ 0.01 |
| $V_{\text{Pore}}^*$ | $\mu\text{m}$ | 458 $\pm$ 40    | 577 $\pm$ 30    | 622 $\pm$ 27    | 640 $\pm$ 70    | 563 $\pm$ 31    | 490 $\pm$ 24    |
| $V_{\text{Mat}}^*$  | $\mu\text{m}$ | 11 $\pm$ 1      | 15 $\pm$ 1      | 17 $\pm$ 1      | 29 $\pm$ 2      | 56 $\pm$ 2      | 175 $\pm$ 8     |
| Euler N             | -             | 0.51 $\pm$ 0.03 | 0.44 $\pm$ 0.01 | 0.46 $\pm$ 0.02 | 0.31 $\pm$ 0.03 | 0.21 $\pm$ 0.02 | 0.08 $\pm$ 0.01 |

factor of division of the image was higher for the vertical direction (Fig. 6). However, evolution of  $\sigma|$  reached the same nadir, meaning that no preferential orientation of the granules was observed. Similarly,  $\sigma-$  also reached a nadir, either in the left-to-right or right-to-left direction but  $\sigma-$  values were always lower than the corresponding  $\sigma|$  values due to the reduced width of the image in the horizontal direction (due to the reduced amount of granule). For further statistical comparisons, only the average value of  $\sigma|$  will be used as  $\sigma|$  and  $\sigma-$  were linearly correlated ( $r = 0.999$ ;  $p < 0.0001$ ). A polynomial relationship was evidenced between  $\sigma|$  and the different groups of granule as a function of the amount of powder ( $r_{\text{pol}} = 0.83$ ;  $p < 0.0001$ ) (Fig. 7A). Lacunarity increased from the 10 g group up to the 15 g group and then decreased to reach the lowest value in the 25 g group ( $r_{\text{pol}} = 0.94$ ;  $p < 0.0001$ ) (Fig. 7A).  $\delta$  and  $\sigma|$  were linearly correlated ( $r_{\text{lin}} = -0.90$ ;  $p < 0.001$ );  $\sigma|$  was negatively correlated with porosity ( $r_{\text{lin}} = -0.91$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 7B) and  $\delta$  was positively correlated with porosity ( $r_{\text{lin}} = 0.89$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 7C),  $D_{\text{MB}}$  ( $r_{\text{lin}} = 0.74$ ;  $p < 0.001$ ) and the Euler–Poincaré number ( $r_{\text{lin}} = 0.87$ ;  $p < 0.001$ ) and highly correlated with  $V_{\text{Mat}}^*$  ( $r_{\text{lin}} = -0.94$ ;  $p < 0.0001$ ).  $\sigma|$  was also negatively correlated with  $D_K$  ( $r_{\text{lin}} = -0.79$ ;  $p < 0.001$ ),  $D_{\text{MB}}$  ( $r_{\text{lin}} = -0.82$ ;

$p < 0.001$ ) and highly correlated with  $V_{\text{Mat}}^*$  ( $r_{\text{lin}} = 0.89$ ;  $p < 0.0001$ ) and the Euler–Poincaré number ( $r_{\text{lin}} = 0.87$ ;  $p < 0.0001$ ) (Fig. 7D).

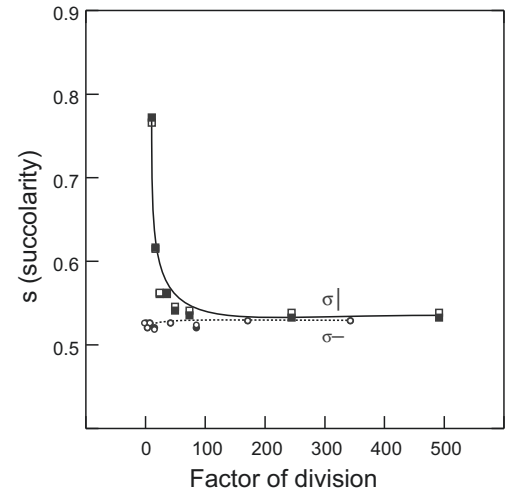
#### 4. Discussion

In this series, changing the amount of  $\beta$ -TCP powder in the slurry produced granules with considerably different shapes, leading to different types of 3-D arrangement and biomechanical property. Granules prepared with the lowest amount of material were brittle with very thin and fragile branches. In contrast, granules prepared with 25 g appeared more compact and presented fewer branches. The inner porosity due to sublimation of the polyurethane foam was always visible in SEM analysis. This was previously demonstrated and analyzed by microCT and SEM [11]. The free surface of the granules always exhibited the classical paving composed of geometric tiles with a round top corresponding to the melting of the individual grains during sintering. Between the grains, some micropores are known to occur [30] and their number was increased in the lowest formulations (data not shown). The biomechanical behavior of the different types of granule was in accordance with previously published results on the compression



**Fig. 5.** Morphometric analysis showing the variation of porosity and 2-D descriptors according to the amount of  $\beta$ -TCP in the slurry used to prepare the granules: (A) porosity and N/F; (B) star volume of the pores and material and ICI of the pores.

of powders [31,32]. Briefly, the granules occupy the full volume of the test cell and their arrangement depends on their shape. When the punch compacts the 3-D stack of granules, the first step is a rearrangement by sliding and rotation, producing a denser stack. The plastic deformation of the 3-D scaffold of the granules starts when the granules are no longer movable relative to each other. The technique is destructive for the granules, which are crushed at the end of the test. As expected, the displacement of the punch was maximal in the groups prepared with the lowest concentrations and the relationship was non-linear. In contrast, the work-to-failure and stiffness increased non-linearly as a function of the amount of powder in the slurry. It is likely that the 25 g granules which are the more compact are associated with higher compressive values. However, the biomaterial always remains more brittle than bone but the granules are stiff, a condition that favors osteoblast differentiation [33]. A classical recommendation made to surgeons by manufacturers is to gently pack the granules in the grafted area without crushing them, in order to preserve the microarchitecture produced.



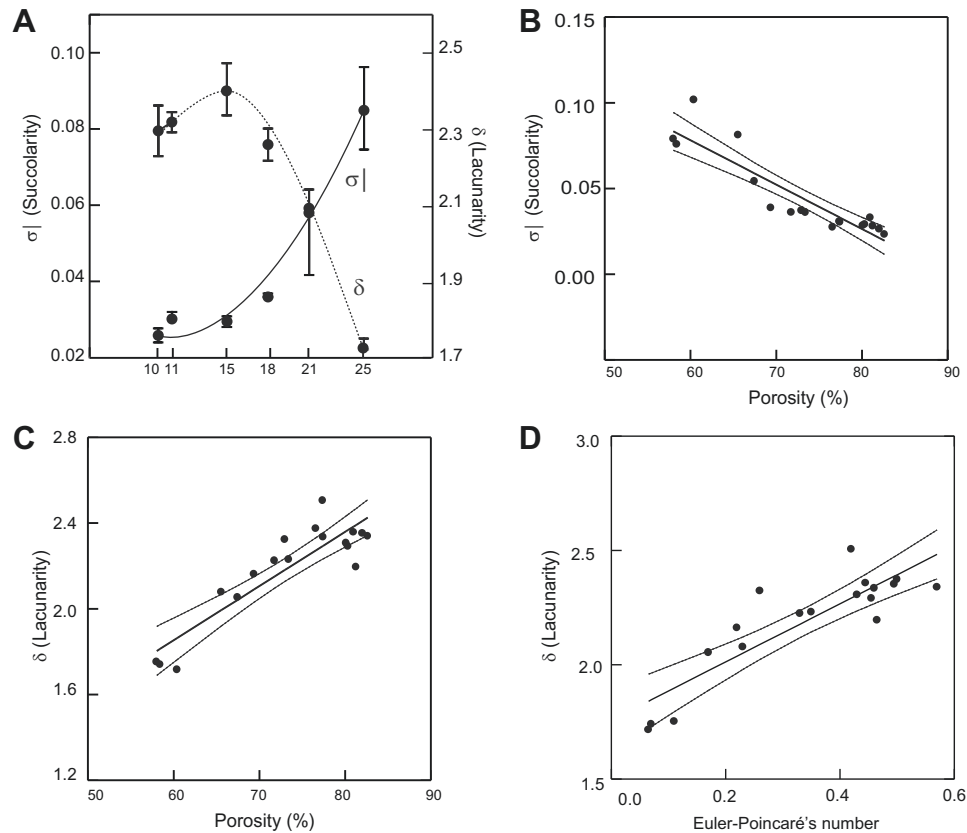
**Fig. 6.** Measurement of  $\sigma$  (succolarity) in the four directions:  $\sigma|$  i.e. from top to bottom: ■, bottom to top: □ (plain line) then  $\sigma_{\rightarrow}$ , i.e. from left to-right: ● and right-to-left: ○ (dotted line) in a 3-D arrangement of 10 g granules. The “factor of division” in the abscissa corresponds to the size of the sliding box used for computing  $\sigma$ .

MicroCT analysis of the different groups of granules clearly showed the 3-D arrangement. The porosity created between the granules can be evidenced on the 3-D models (see video in the online [Supplementary Materials](#)) as well as on the 2-D slices prepared from the stacks. Large voids can be noticed in the different stacks but contacts between the granules are due to the very thin branches obtained in the first groups. MicroCT is now recognized as a very important tool to study the 2-D and 3-D characteristics of porous materials such as bone or bone substitutes [34–37]. The method has been extensively used to describe the microarchitecture of cortical and trabecular bone in metabolic and malignant bone diseases. However, the 3-D algorithms are not fully validated and marked discrepancies have been reported by our group and others when comparing histomorphometry on histological sections and 3-D analysis [38–40]. In the present study, 3-D analysis was used to compute porosity (or reciprocally, the volume fraction of the material) and the fractal dimension  $D_{3D}$  by the box plot in three dimensions. Other parameters which characterize porosity were better explored on 2-D images of a large stack of granules obtained after re-slicing the 3-D models. Robust algorithms such as ICI, star volume, the Euler–Poincaré number and strut analysis were easily applied [13,23,24]. In addition, fractal dimensions obtained by the box-counting technique and the dynamic blankets were used to characterize the granules [14]. The use of newly described fractal parameters such as succolarity and lacunarity were found highly interesting to evaluate porosity [19,41]. These methods were previously found useful in the analysis of continuous porous blocks of materials [29] and were applied here to study the relationships of granules packed within test tubes. This condition mimics what is happening when a bone defect is filled with these types of granular materials and the voids between the

**Table 2**

Fractal parameters determined on 2-D and 3-D sections depending on the volume fraction of  $\beta$ -TCP used in the slurry to prepare the granules.

| Parameter              | 10 g              | 11 g              | 15 g              | 18 g              | 21 g              | 25 g              |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $D_K$                  | $1.485 \pm 0.008$ | $1.464 \pm 0.006$ | $1.435 \pm 0.005$ | $1.430 \pm 0.006$ | $1.426 \pm 0.003$ | $1.386 \pm 0.005$ |
| $D_{MB}$               | $1.230 \pm 0.006$ | $1.224 \pm 0.005$ | $1.186 \pm 0.003$ | $1.175 \pm 0.002$ | $1.159 \pm 0.005$ | $1.133 \pm 0.005$ |
| $D_{3D}$               | $2.157 \pm 0.013$ | $2.164 \pm 0.001$ | $2.123 \pm 0.02$  | $2.114 \pm 0.002$ | $2.173 \pm 0.038$ | $2.107 \pm 0.007$ |
| $\sigma $              | $0.26 \pm 0.001$  | $0.03 \pm 0.001$  | $0.29 \pm 0.001$  | $0.036 \pm 0.000$ | $0.058 \pm 0.012$ | $0.085 \pm 0.008$ |
| $\sigma_{\rightarrow}$ | $0.008 \pm 0.001$ | $0.009 \pm 0.001$ | $0.012 \pm 0.000$ | $0.015 \pm 0.003$ | $0.018 \pm 0.001$ | $0.034 \pm 0.006$ |
| $\delta$               | $2.295 \pm 0.05$  | $2.318 \pm 0.020$ | $2.404 \pm 0.052$ | $2.259 \pm 0.032$ | $2.098 \pm 0.033$ | $1.736 \pm 0.011$ |



**Fig. 7.** Relationship between the fractal parameters and (A) the amount of  $\beta$ -TCP used to prepare the granules,  $\sigma|$  is exponentially related the groups of granule (plain line) and  $\delta$  is maximal in the 15 g group (dotted line); (B) linear correlation of  $\sigma|$  and porosity ( $r_{\text{lin}} = -0.91$ ;  $p < 0.001$ ); (C)  $\delta$  and porosity ( $r_{\text{lin}} = 0.89$ ;  $p < 0.001$ ); (D)  $\delta$  and the Euler-Poincaré number ( $r_{\text{lin}} = 0.87$ ;  $p < 0.0001$ ).

granules are rapidly filled in vivo with blood and extracellular fluids. These voids are similar to the porosity obtained in a solid block of 3-D materials and as such can be explored by the same methods. However, the number of papers concerned with the 3-D architecture of particle aggregates is very limited [42]. In the present study, porosity regularly decreased as a function of the amount of powder used to prepare the granules but as previously reported for bone and porous scaffolds, the relationships between material quantity and its 3-D microarchitecture are not linear.  $V_{\text{Mat}}^*$  increased exponentially in the different groups of granules but the pores between the granules were correlated by non-linear or complex polynomial functions that depend on the shape of the granules. This is in relation to the presence of branches that can separate granules from each other. The maximal size of the pores was obtained for the 15 and 18 g granules, which had the highest  $V_{\text{Pore}}^*$  and lowest ICI values.

Lacunarity is known to be influenced by the uniformity of the spatial distribution of the pore density [43]. The maximal  $\delta$  value was reached in the 15 g group, meaning that some large pores are created in the 3-D packages of the granules. On the other hand, the lowest  $\delta$  value was obtained for the 25 g granules, which presented the most regular distribution of the pores, as evidenced by the linear relationship between  $\delta$  and  $V_{\text{Mat}}^*$ . Similar relationships have been reported in studies concerned with the porosity of soils [44,45].

Succolarity was extensively evaluated by de Melo in his thesis and related papers [18,19,41]. In this study,  $\sigma$  was calculated on the interconnected pores (i.e., the white pixels appearing on the binarized images of the stacks of granules). Succolarity also offers the advantage of being a direction-sensitive parameter, which can identify preferential directions within a texture [18]. In this

study,  $\sigma$  was maximal in the 25 g group composed of dense granules with a very few branches and homogenous pores between the granules.  $\sigma$  was positively correlated with  $V_{\text{Mat}}^*$  but no relationship could be found with  $V_{\text{Pore}}^*$ . ICI, which reflects the interconnectivity of the pores (and follows a U curve in the different groups), is also high in the 25 g group. Succolarity is an interesting parameter for porous biomaterials since it can be compared to the accessibility of biological fluids within the grafted site. This parameter offers more interesting data than the classical  $D_K$  parameter used in other studies [42]. Here, we found that the left-to-right and right-to-left values were identical, as were the top-to-bottom and bottom-to-top values. The differences between the horizontal (—) and vertical (|) values were dependent only on the width of the images and no preferential direction could be evidenced.

## 5. Conclusion

The interest in these methods is in choosing the best formulation to prepare granules of  $\beta$ -TCP with suitable shape and usable to fill bone defects. To summarize, granules (1) should be prepared with the minimum amount of biomaterial to ensure the fastest resorption rate, (2) should be resistant enough to avoid shrinkage or crushing when the surgeon compresses them with a plugger and (3) should maintain the largest pores to allow invasion by the vascular sprouts. From this study, it is concluded that 15–18 g in the slurry would be the optimal formulation.

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.



## Acknowledgments

This work was funded by a Grant from the Bioregos2 regional contract. The authors thank Kasios, 18 chemin de la Violette, 31240 L'Union, France for help in preparing the different formulations of granules.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.015>.

## References

- [1] Ghosh SK, Nandi SK, Kundu B, Datta S, De DK, Roy SK, et al. In vivo response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;86:217–27.
- [2] Ikeda N, Kawanabe K, Nakamura T. Quantitative comparison of osteoconduction of porous, dense A-W glass-ceramic and hydroxyapatite granules (effects of granule and pore sizes). *Biomaterials* 1999;20:1087–95.
- [3] Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 2005;26:3565–75.
- [4] Yuan H, de Bruijn JD, Zhang X, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone induction by porous glass ceramic made from bioglass (45S5). *J Biomed Mater Res* 2001;58:270–6.
- [5] Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* 1996;17:31–5.
- [6] Adachi T, Osako Y, Tanaka M, Hojo M, Hollister SJ. Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration. *Biomaterials* 2006;27:3964–72.
- [7] Dutta Roy T, Simon JL, Ricci JL, Rekow ED, Thompson VP, Parsons JR. Performance of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res – Part A* 2003;67:1228–37.
- [8] Filmon R, Retaillieu-Gaborit N, Grizon F, Galloyer M, Cincu C, Baslé MF, et al. Non-connected versus interconnected macroporosity in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) polymers. An X-ray microtomographic and histomorphometric study. *J Biomater Sci Polym Ed* 2002;13:1105–17.
- [9] Chazono M, Tanaka T, Kitasato S, Kikuchi T, Marumo K. Electron microscopic study on bone formation and bioresorption after implantation of beta-tricalcium phosphate in rabbit models. *J Orthop Sci* 2008;13:550–5.
- [10] Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci – Mater Med* 2003;14:195–200.
- [11] Filmon R, Retaillieu-Gaborit N, Brossard G, Grizon-Pascaretti F, Baslé MF, Chappard D. Preparation of  $\beta$ -TCP granular material by polyurethane foam technology. *Image Anal Stereol* 2009;28:1–10.
- [12] Chappard D, Legrand E, Baslé MF, Fromont P, Racineux JL, Rebel A, et al. Altered trabecular architecture induced by corticosteroids: a bone histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 1996;11:676–85.
- [13] Chappard D, Legrand E, Pascaretti C, Baslé MF, Audran M. Comparison of eight histomorphometric methods for measuring trabecular bone architecture by image analysis on histological sections. *Microsc Res Tech* 1999;45:303–12.
- [14] Chappard D, Legrand E, Haettich B, Chales G, Auvinet B, Eschard JP, et al. Fractal dimension of trabecular bone: comparison of three histomorphometric computed techniques for measuring the architectural two-dimensional complexity. *J Pathol* 2001;195:515–21.
- [15] Fazzalari NL, Parkinson IH. Fractal properties of subchondral cancellous bone in severe osteoarthritis of the hip. *J Bone Miner Res* 1997;12:632–40.
- [16] Haire TJ, Hodgkinson R, Ganney PS, Langton CM. A comparison of porosity, fabric and fractal dimension as predictors of the Young's modulus of equine cancellous bone. *Med Eng Phys* 1998;20:588–93.
- [17] Hu BX, Meerschaert MM, Barrash W, Hyndman DW, He C, Li X, et al. Examining the influence of heterogeneous porosity fields on conservative solute transport. *J Contam Hydrol* 2009;108:77–88.
- [18] de Melo RHC. Using fractal characteristics such as fractal dimension, lacunarity and succolarity to characterize texture patterns on images. Fluminense: Fed. Univ. Fluminense (Brazil); 2007. Link: <[http://www.ic.uff.br/~rmelo/msc\\_thesis.htm](http://www.ic.uff.br/~rmelo/msc_thesis.htm)>.
- [19] de Melo RHC, Conci A. How succolarity could be used as another fractal measure in image analysis. *Telecom Syst* 2013;52:1643–55.
- [20] Shahzad F, Mahmood SA, Gloaguen R. Nonlinear analysis of drainage systems to examine surface deformation: an example from Potwar Plateau (Northern Pakistan). *Nonlinear Proc Geophys* 2010;17:137–47.
- [21] Mandelbrot B. The fractal geometry of nature. New York: Freeman; 1977.
- [22] Schwartzwalder K, Somers H, Somers AV. Method of making porous ceramics. US Patent 3090094 A; 1963.
- [23] Le HM, Holmes RE, Shors E, Rosenstein DA. Computerized quantitative analysis of the interconnectivity of porous biomaterials. *Acta Stereol* 1992;11S1:267–72.
- [24] Levitz P, Tchoubar D. Disordered porous solids: from chord distributions to small angle scattering. *J Phys* 1992;1(2):771–90.
- [25] Compston JE. Connectivity of cancellous bone: assessment and mechanical implications. *Bone* 1994;15:463–6.
- [26] Mellish RW, Ferguson-Pell MW, Cochran GV, Lindsay R, Dempster DW. A new manual method for assessing two-dimensional cancellous bone structure: comparison between iliac crest and lumbar vertebra. *J Bone Miner Res* 1991;6:689–96.
- [27] Compston JE, Mellish RW, Garrahan NJ. Age-related changes in iliac crest trabecular microanatomic bone structure in man. *Bone* 1987;8:289–92.
- [28] Allain C, Cloitre M. Characterizing the lacunarity of random and deterministic fractal sets. *Phys Rev A* 1991;44. A3552–8.
- [29] N'Diaye M, Degeratu C, Boulter JM, Chappard D. Biomaterial porosity determined by fractal dimensions, succolarity and lacunarity on microcomputed tomographic images. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013;33:2025–30.
- [30] Chappard D, Guillaume B, Mallet R, Pascaretti-Grizon F, Baslé MF, Libouban H. Sinus lift augmentation and beta-TCP: a microCT and histologic analysis on human bone biopsies. *Micron* 2010;41:321–6.
- [31] Heckel R. An analysis of powder compaction phenomena. *Trans Metall Soc AIME* 1961;221:1001–8.
- [32] Kadiri MS. Compression de poudres pharmaceutiques et interaction avec l'outilage. Analyse expérimentale et modélisation numérique: Univ. Toulouse; 2004.
- [33] Witkowska-Zimny M, Walenko K, Wrobel E, Mrowka P, Mikulska A, Przybylski J. Effect of substrate stiffness on the osteogenic differentiation of bone marrow stem cells and bone-derived cells. *Cell Biol Int* 2013;37:608–16.
- [34] Jones JR, Poologundarampillai G, Atwood RC, Bernard D, Lee PD. Non-destructive quantitative 3D analysis for the optimisation of tissue scaffolds. *Biomaterials* 2007;28:1404–13.
- [35] Guldborg RE, Duvall CL, Peister A, Oest ME, Lin AS, Palmer AW, et al. 3D imaging of tissue integration with porous biomaterials. *Biomaterials* 2008;29:3757–61.
- [36] Laib A, Rueggsegger P. Calibration of trabecular bone structure measurements of in vivo three-dimensional peripheral quantitative computed tomography with 28-microm-resolution microcomputed tomography. *Bone* 1999;24:35–9.
- [37] Sasov A, Van Dyck D. Desktop X-ray microscopy and microtomography. *J Microsc* 1998;191:151–8.
- [38] Chappard D, Retaillieu-Gaborit N, Legrand E, Baslé MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res* 2005;20:1177–84.
- [39] Hordon LD, Itoda M, Shore PA, Shore RC, Heald M, Brown M, et al. Preservation of thoracic spine microarchitecture by alendronate: comparison of histology and microCT. *Bone* 2006;38:444–9.
- [40] Alexander JM, Bab I, Fish S, Muller R, Uchiyama T, Gronowicz G, et al. Human parathyroid hormone 1–34 reverses bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 2001;16:1665–73.
- [41] de Melo RHC, Vieira EA, Conci A. Comparing two approaches to compute lacunarity of mammograms. In: 13th international conference on systems, signal and image processing and semantic multimodal analysis of digital media (IWSSIP 2006). Budapest: IEEE Signal Process Society; 2006. p. 299–302.
- [42] Klein M, Goetz H, Pazen S, Al-Nawas B, Wagner W, Duschner H. Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:67–74.
- [43] Zeng Y, Payton R, Gantzer C, Anderson S. Fractal dimension and lacunarity of bulk density determined with X-ray computed tomography. *Soil Sci Soc Am J* 1996;60:1718–24.
- [44] Chun HC, Giménez D, Yoon SW. Morphology, lacunarity and entropy of intra-aggregate pores: aggregate size and soil management effects. *Geoderma* 2008;146:83–93.
- [45] Latief FDE, Fauzi U. Kozeny–Carman and empirical formula for the permeability of computer rock models. *Int J Rock Mech Min Sci* 2012;50:117–23.



# 3D porous architecture of stacks of $\beta$ -TCP granules compared with that of trabecular bone: a microCT, vector analysis, and compression study

Daniel Chappard<sup>1,2\*</sup>, Lisa Terranova<sup>1</sup>, Romain Mallet<sup>1,2</sup> and Philippe Mercier<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> GEROM Groupe Etudes Remodelage Osseux et bioMatériaux – LHEA, IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, L'Université Nantes Angers Le Mans, Angers, France, <sup>2</sup>Service Commun d'Imagerie et Analyses Microscopiques (SCIAM), IRIS-IBS Institut de Biologie en Santé, CHU d'Angers, L'Université Nantes Angers Le Mans, Angers, France, <sup>3</sup>Laboratoire d'Anatomie, Faculté de Médecine, Angers, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Phil Salmon,  
Bruker microCT, Belgium

### Reviewed by:

Egon Perilli,  
Flinders University, Australia  
Peter James Delisser,  
University of Bristol, UK

### \*Correspondence:

Daniel Chappard  
daniel.chappard@univ-angers.fr

### Specialty section:

This article was submitted to Bone Research, a section of the journal *Frontiers in Endocrinology*

**Received:** 17 December 2014

**Accepted:** 28 September 2015

**Published:** 12 October 2015

### Citation:

Chappard D, Terranova L, Mallet R and Mercier P (2015) 3D porous architecture of stacks of  $\beta$ -TCP granules compared with that of trabecular bone: a microCT, vector analysis, and compression study. *Front. Endocrinol.* 6:161. doi: 10.3389/fendo.2015.00161

The 3D arrangement of porous granular biomaterials usable to fill bone defects has received little study. Granular biomaterials occupy 3D space when packed together in a manner that creates a porosity suitable for the invasion of vascular and bone cells. Granules of beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) were prepared with either 12.5 or 25 g of  $\beta$ -TCP powder in the same volume of slurry. When the granules were placed in a test tube, this produced 3D stacks with a high (HP) or low porosity (LP), respectively. Stacks of granules mimic the filling of a bone defect by a surgeon. The aim of this study was to compare the porosity of stacks of  $\beta$ -TCP granules with that of cores of trabecular bone. Biomechanical compression tests were done on the granules stacks. Bone cylinders were prepared from calf tibia plateau, constituted high-density (HD) blocks. Low-density (LD) blocks were harvested from aged cadaver tibias. Microcomputed tomography was used on the  $\beta$ -TCP granule stacks and the trabecular bone cores to determine porosity and specific surface. A vector-projection algorithm was used to image porosity employing a frontal plane image, which was constructed line by line from all images of a microCT stack. Stacks of HP granules had porosity ( $75.3 \pm 0.4\%$ ) and fractal lacunarity ( $0.043 \pm 0.007$ ) intermediate between that of HD (respectively  $69.1 \pm 6.4\%$ ,  $p < 0.05$  and  $0.087 \pm 0.045$ ,  $p < 0.05$ ) and LD bones (respectively  $88.8 \pm 1.57\%$  and  $0.037 \pm 0.014$ ), but exhibited a higher surface density ( $5.56 \pm 0.11 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  vs.  $2.06 \pm 0.26$  for LD,  $p < 0.05$ ). LP granular arrangements created large pores coexisting with dense areas of material. Frontal plane analysis evidenced a more regular arrangement of  $\beta$ -TCP granules than bone trabecule. Stacks of HP granules represent a scaffold that resembles trabecular bone in its porous microarchitecture.

**Keywords:** porosity, microCT, 3D packing, 3D geometry, bone graft, fractal,  $\beta$ -TCP, granules

## INTRODUCTION

Bone is a calcified connective tissue, which fulfils a large number of functions in the body (1). Being both rigid and elastic due to the unique composition of its matrix made of collagen type I and hydroxyapatite crystals, it is adapted to gravity and muscle contractions. Bone cells are able to remodel and adapt bone mass and architecture throughout life allowing repair of microdamage (microcracks, trabecular microfractures) or fracture. To reduce the amount of this material within the body, Nature has developed a number of strategies to provide the maximum biomechanical competence with a genetically controlled bone mass. During aging, epigenetic factors, such as gravity and muscle strains, also modify bone mass and microarchitecture (Wolff's Law). Trabecular microarchitecture is now a well-recognized type of self-organization that fulfils this condition (2, 3).

Bone loss can occur systemically, for example, during aging. However, localized bone loss can also occur, as in some intra-bony defects, such as solitary or aneurysmal cysts, or acquired bone defects as observed after tooth extraction or during hip prosthesis revision. Granular biomaterials are often used to fill these defects, especially in non-bearing bones. Among the different orthophosphates that can be produced in large quantity by industry, beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) appears the most suitable, particularly in maxillo-facial and dental surgery (4). Granules of 1000–2000  $\mu\text{m}$  diameter represent the most commonly used size for filling alveolar sockets or increasing bone volume by sinus lift (5). However, when the surgeons place granules within a bone defect, it is the voids between the granules that represent the interconnected space available for vascular sprouts and bone cells to invade the grafted area. Calcium phosphate ceramics are known to be too brittle to be placed in load-bearing areas. Ceramic granules allow a perfect filling of the bone defects, but they are limited to grafted areas where no significant strength is needed (alveolar ridge augmentation, sinus lift ...) (5). Little is known about the 3D arrangement of a grafted stack of granules, and if the porosity of the stack is similar to that of trabecular bone to allow the accessibility of biological fluids, body fluids, cells, and vascularization within the grafted site (6, 7). In addition, when filling a bone defect, the surgeon has to avoid crushing of the granules to avoid altering the granules' microarchitecture (8). Hence, the biomechanical resistance of the granules in compression is also an important factor to be taken into account when choosing the grafting material (9).

The aims of the present study were (1) to compare the pore microarchitecture of the two types of  $\beta$ -TCP granules providing stacks of low porosity (LP) and high porosity (HP), respectively, with that of the two types of trabecular bone [high density (HD) and low density (LD)], in order to assess the granular stack that had the pore microarchitecture more similar to trabecular bone; (2) to compare the biomechanical properties in compression of these two types of granules."

## MATERIALS AND METHODS

### Bone Samples

For the bone with HD, five bone cylinders were harvested from the upper tibia epiphysis of young butchered animals (calves,

aged around 15 months, 500–600 kg). The calibrated cylinders (10 mm in diameter) were obtained with a diamond-tipped coring tool (Starlite Industries, Rosemont, PA, USA) perpendicular to the tibial plateau. Similarly, five cylinders (10 mm diameter) with low bone density (LD) were prepared from the upper tibial epiphysis from five aged human cadavers from the Anatomical Laboratory (mean age  $78.3 \pm 5.2$  years). For both the HD and LD cylinders, the articular and subchondral bone were removed to provide cylinders 23–25 mm in length containing only the secondary spongiosa. The subjects had given their body to science before death and had completed a form indicating that their corpses were to be used for medical education and research. Subjects were examined upon arrival at the laboratory of anatomy of the Faculty of Medicine. All bone samples were harvested following a strict protocol of the laboratory of anatomy; e.g., it was impossible to know any detail which could lead to the subject's identification (causes of death, previous medical records).

### $\beta$ -TCP Granules

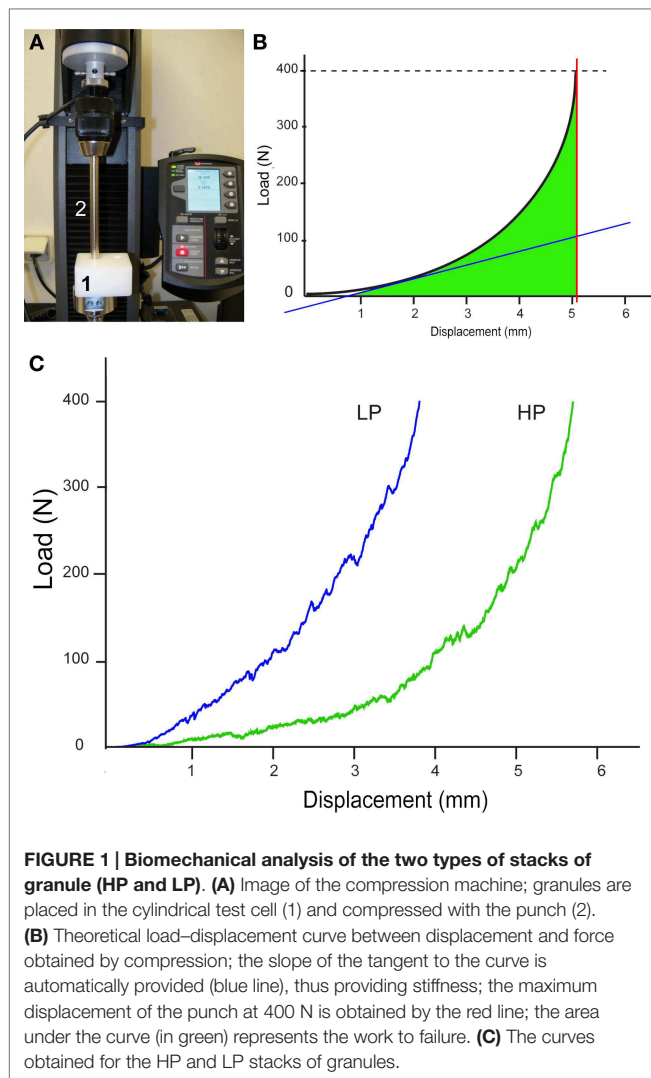
Beta-tricalcium phosphate granules were obtained from Kasios (L'Union, France). Granules were prepared by polyurethane foam technology and used as received. This technique has been extensively described elsewhere (10, 11). Two types of granules were used and placed in polyethylene test tubes (10 mm in diameter): compact granules were prepared with 25 g of  $\beta$ -TCP grain in a fixed volume of slurry and provided a LP stacks; lighter granules with 12.5 g of  $\beta$ -TCP grain 1 in the same volume of slurry produced the HP stacks (12).

The morphology of the two types of granules was qualitatively evaluated by scanning electron microscopy (SEM, Jeol JSM 6301F) before analysis. The  $\beta$ -TCP granules were glued on an aluminum stub with a double-sided carbon sellotape. They were gold-coated by sputtering with an MED 020 (Bal-Tec, Chatillon sur Cher, France). Images were captured at a 3-kV acceleration voltage in the secondary electron mode.

### Biomechanical Analysis

The compression characteristics of the two types of  $\beta$ -TCP granules were determined on an Instron 5942 machine with Bluehill software (Instron, Elancourt, France) (**Figure 1A**). As the test is destructive, new intact granules were placed into the cylindrical test cell of the machine and compacted with an adapted punch 10 mm in diameter. The maximum applied load was fixed at 400 N with a 2-mm  $\text{min}^{-1}$  displacement. For each type of stacks of granule (HP or LP), the load–displacement curve was recorded (N/mm) automatically by the machine. Stiffness was automatically provided by measuring the slope of the tangent to the curve at the beginning of the deformation (N/mm). The maximum displacement of the punch (in mm) was obtained when the load reached 400 N. The work to failure (N·mm) was determined as the area under the load–displacement curve from yield until failure and represents the energy absorbed by bone during plastic deformation (**Figure 1B**) (13). These parameters were calculated according to previously published equations (14, 15). Analysis was repeated five times for each type of granules and the averaged values were considered.





## MicroCT Analysis

MicroCT analysis was performed on a Skyscan 1172 microcomputed tomograph (Bruker microCT, Kontich, Belgium). Bone samples were placed in polystyrene test tubes (10 mm in diameter) and scanned while in fixative (10% formalin). Granules of  $\beta$ -TCP were placed in similar tubes and gently agitated to allow the granules to settle and optimize their 3D spatial arrangement in the dry state. Tubes were filled with  $\beta$ -TCP granules up to 30 mm in height. For each series of granules, analysis was done in triplicate. The microCT was operated at 80 kV, 100  $\mu$ A with a 0.5-mm aluminum filter. The pixel size was fixed at 4.95  $\mu$ m and the angular rotation step at 0.25°. 3D models of bones and granules were obtained with VG Studiomax (Volume Graphics GmbH, Heidelberg, Germany) operating in the volume rendering mode. Microarchitecture parameters were obtained with the CTAn software (Bruker) after global thresholding of the pores (16). They included measures of porosity (Po, in %), mean pore diameter (Po-Diam, in  $\mu$ m), and specific surface [representing the interface between bone or biomaterial and the porosity, BS/

TV, in  $\text{mm}^2/\text{mm}^3$ , where BS is the whole pore surface and TV is the volume of interest according to the ASBMR nomenclature (17)]. For the bone cylinders and the granule stacks, the region of interest (ROI) over-imposed on the 2D binarized sections was a 5-mm wide square; the height of analysis of the samples has concerned 15 mm. Pore diameter was determined by the sphere-fitting method in the CTAn software (18). In order to further investigate the porosity, the binarized stacks of 2D microCT sections of each sample were analyzed by software written in Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA). The algorithm for evaluation of porosity used a vector projection on a frontal plane (Vectopor) and has been extensively described elsewhere (19). In the present study, the pixels of the ROI which belonged to the same column received the same pseudo-color according to the number of pixels superimposed on pores. A look-up table (LUT) was designed ranging from deep blue (no porosity) to red (high porosity). Intermediate values depend on the value of porosity along the vector according to the LUT. The frontal plane vector projection image was assigned intensity values for each pixel based on the number of pixels, which contained pores in the related column of the microCT binarized image. The frontal plane image was saved with the colorized LUT and analyzed by the FracLac plugin developed for ImageJ (20, 21). The box-plot fractal dimension ( $D_f$ ) and the lacunarity ( $\lambda$ ) of the frontal plane images were determined as previously described (19). The box-plot fractal dimension evaluates the complexity of the material to fill the reference space and is helpful in the study of porous objects, such as bone (22, 23) or materials (24, 25). Lacunarity is another recently described fractal parameter reported to improve the description of a fractal porous object (26, 27). Lacunarity is influenced by the variation of the pores in a given structure; a low lacunarity reflects homogeneity, while a high lacunarity is an indicator of heterogeneity (28, 29).

## Statistical Analysis

Statistical analysis was done with Systat 13 (Systat Inc., San José, CA, USA). For each parameter, results are expressed as mean  $\pm$  SD. Differences for porosity between the four groups (HD, LD, HP, and LP) were sought with the Kruskal–Wallis non-parametric analysis of variance followed by the Conover–Inman test for all pairwise comparisons. For biomechanical parameters, differences between the HP vs. LP groups were analyzed by the non-parametric Mann–Whitney  $U$  test. A difference was considered as significant when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Qualitative Examination of the $\beta$ -TCP Granules

The difference in morphology of the granules was evident to the naked eye and confirmed by SEM. The 12.5-g preparation of granules was the most porous with thin walls of sintered  $\beta$ -TCP, while the 25-g granule preparation was denser, with numerous concave surfaces and occasional macropores (Figure 2). In all

cases, the inner porosity due to sublimation of the polyurethane foam was clearly identified as triangular voids connected by thin channels.

## Biomechanical Analysis of the $\beta$ -TCP Granules

The load vs. displacement curves of both HP and LP types of granules are shown in **Figure 1C**. The first domain of the curve corresponds to the collapse of the granules, after which the deformation is due to their irreversible compression. The HP stack had a statistically significant higher maximum

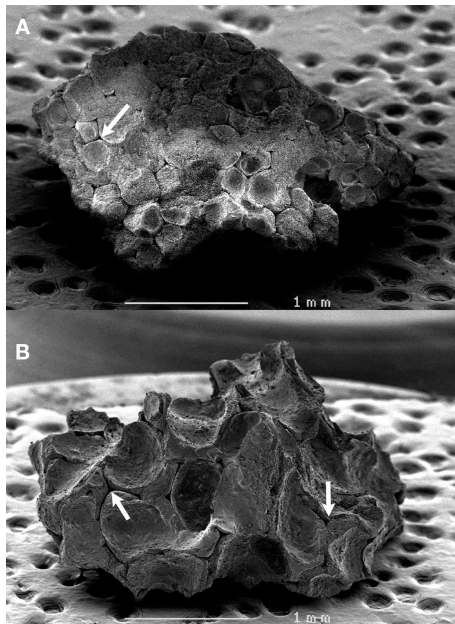
displacement compared to the LP stack, as expected ( $p < 0.05$ , **Table 1**). On the contrary, the stiffness and the work to failure were significantly higher in the LP stacks compared to the HP stack ( $p < 0.05$  in both cases).

## Morphometric Analysis of Bone and Granules

A 3D-rendering of the two types of bone cores and granule stacks is shown in **Figure 3**. Morphometric parameters are listed in **Table 1** and illustrated in **Figure 4**. The HD bone cores had a significantly smaller porosity than LD bones. The LP stacks had the lowest porosity among all groups. Conversely, HP stacks presented a porosity that is intermediate between that of a HD bone and that of a low-density bone. The HP formulation produced a  $\sim 28\%$  increase of porosity associated with a reduction of the mass of  $\beta$ -TCP. This was associated with a significant increase in BS/TV in the HP group compared to the LP group ( $+11.6\%$ ). The vector analysis of porosity clearly evidenced differences between the two pairs of materials: HD bones appeared inhomogeneous with areas containing large amounts of bony material (blue areas according to the LUT), while LD had a large number of red spots indicating HP (**Figures 5A,B**). Very similar findings were observed for the LP and HP stacks of granules: LP stacks had large areas of material but large holes were also present. On the contrary, the morphology of the stacks of HP granules had a more regular distribution of the pores and material (**Figures 5C,D**). Interestingly, the fractal dimension  $D_f$  did not differ among the four groups, but lacunarity  $\lambda$  was high in HD bones and even higher in the LP granules (**Table 1**).

## DISCUSSION

In this series of materials comprising bone cores and granular stacks made of  $\beta$ -TCP granules, a quantitative and morphological analysis of porosity was done. Porosity of the LP stacks was noticeably lower than a HD trabecular bone. However, the porosity of the HP stacks (and conversely the amount of material) was in the range of normal bone volume as determined by classical



**FIGURE 2 | SEM analysis of the two types of  $\beta$ -TCP granules. (A)** LP granules prepared with 25 g in the slurry, **(B)** HP granules prepared with 12.5 g. Note the inner porosity due to the sublimation of the polyurethane foam as triangular voids connected by thin channels (arrows).

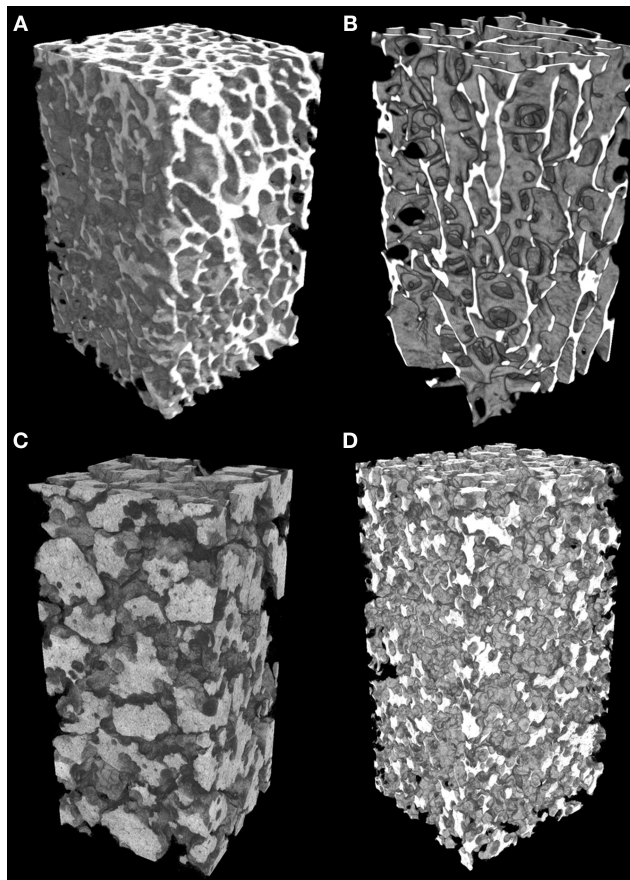
**TABLE 1 | Morphometric parameters of bone cylinders with a high-density (HD), low-density (LD), and  $\beta$ -TCP granules (compact low porosity granules: LP; high porosity granules: HP).**

|                                           | Bone              |                     | Granules          |                    |
|-------------------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
|                                           | HD                | LD                  | LP                | HP                 |
| Po (%)                                    | 69.1 $\pm$ 6.4    | 88.8 $\pm$ 1.5*     | 58.9 $\pm$ 1.3*   | 75.3 $\pm$ 0.4*§   |
| BS/TV (mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 4.08 $\pm$ 1.05   | 2.06 $\pm$ 0.26*    | 4.98 $\pm$ 0.09   | 5.56 $\pm$ 0.11§   |
| Po-Diam ( $\mu$ m)                        | 458 $\pm$ 123     | 875 $\pm$ 112*      | 359 $\pm$ 7       | 321 $\pm$ 7§       |
| Fractal dimension $D_f$                   | 2.747 $\pm$ 0.017 | 2.762 $\pm$ 0.014   | 2.635 $\pm$ 0.034 | 2.749 $\pm$ 0.009  |
| Lacunarity ( $\lambda$ )                  | 0.087 $\pm$ 0.045 | 0.037 $\pm$ 0.014*§ | 0.220 $\pm$ 0.110 | 0.043 $\pm$ 0.007§ |
| Stiffness (N/mm)                          |                   |                     | 65.4 $\pm$ 4.5    | 14.4 $\pm$ 1.8§    |
| Max. displac. (mm)                        |                   |                     | 3.90 $\pm$ 0.03   | 5.30 $\pm$ 0.31§   |
| Work to failure (N·mm)                    |                   |                     | 487 $\pm$ 7       | 447 $\pm$ 26§      |

Data are provided as mean  $\pm$  SD. Differences between the four groups were sought with the Kruskal–Wallis analysis of variance followed by the Conover–Inman post hoc test for all pairwise comparisons. For biomechanical parameters, differences between the HP vs. LP groups were analyzed by the Mann–Whitney U test.

\*Significantly different from HD cylinders with  $p < 0.05$ .

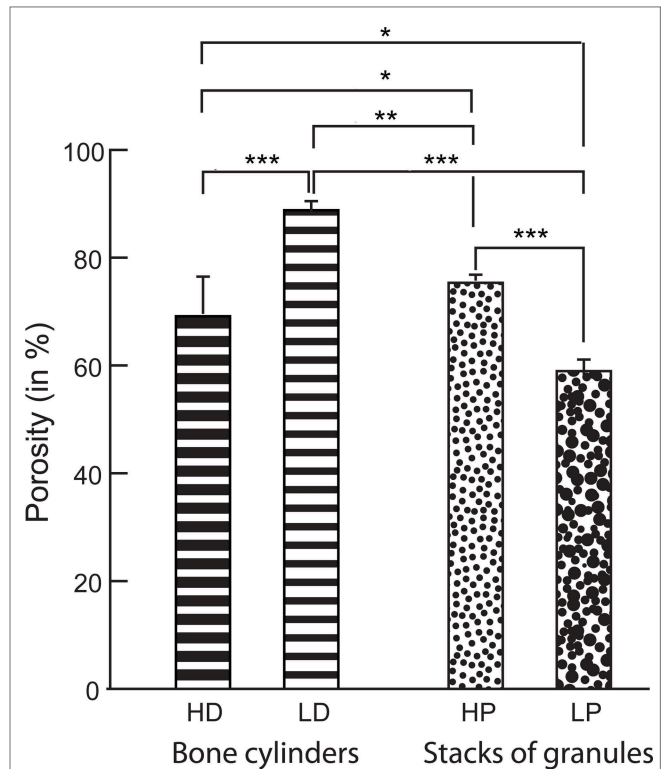
§Significantly different from LP granules with  $p < 0.05$ .



**FIGURE 3 | Microtomographic analysis of the different types of materials (appearing in white). (A)** High-density bone (HD) with numerous trabeculae and low porosity; **(B)** low-density bone (LD) from aged subjects with reduced trabeculae and increased porosity; **(C)** of compact granules (LP) of  $\beta$ -TCP; **(D)** scaffold of HP granules. All images have been prepared with a square ROI of 5 mm side; so the volume of interest is a parallelepiped (height: 15 mm; square section: 5 mm).

histomorphometry methods (30). This reflects the microarchitecture of the stacks of HP granules which contain more macropores and thin branches than the LP granules. However, as expected, this effect is detrimental to the biomechanical properties of the HP granules whose stacks have lower compressive mechanical properties, as evidenced by lower stiffness values, lower work to failure, and maximum displacement. The surgeon should be aware not to crush the granules in the grafted areas and the use of a bone syringe with a large diameter may help.

It should be noted that the BS/TV of HP granules is significantly higher than that of LP granules or that of HD and LD bones. This is especially important since BS/BV represents the bioactive surfaces of  $\beta$ -TCP that will be in direct contact with the biological fluids and the cells (31). The BS/TV values obtained in this study with  $\beta$ -TCP granules are similar to those reported by other groups with BCP (a mixture of  $\beta$ -TCP and hydroxyapatite) (32). Recent observations have stressed the interest of increasing the specific surface (BS/TV) of orthophosphate materials to promote

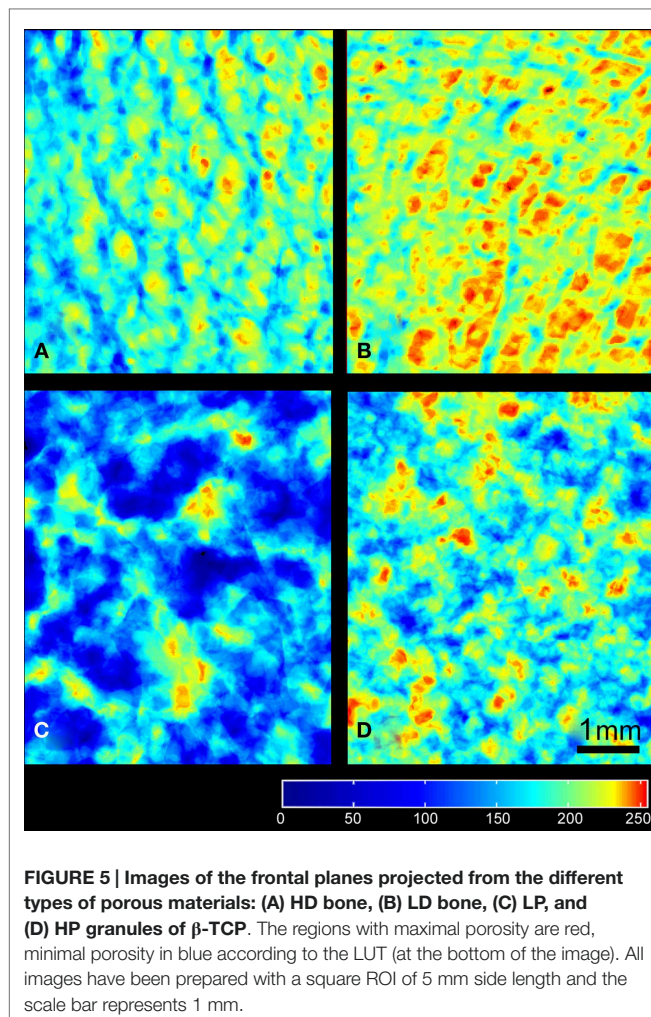


**FIGURE 4 | Porosity measured by microCT in the bone cylinders and stacks of granules.** Statistical analysis was done with Kruskal–Wallis analysis of variance followed by the Conover–Inman *post hoc* test. Error bars indicate SD. \*Significantly different with  $p < 0.02$ ; \*\*with  $p < 0.003$ ; \*\*\*with  $p < 0.0001$ .

bone formation (33). So, the HP formulation represents the highest surface available for osteoblast attachment and proliferation (osteoblasts are bone-forming cells). Because  $\beta$ -TCP is a biomaterial colonized by osteoconduction from nearby trabeculae, this parameter is of great importance (34).

MicroCT analysis is a relatively recently introduced tool in the analysis of bone and materials. Values for parameters, such as BV/TV and Po, are highly correlated with histomorphometry on 2D sections (35). In the present study, the difference in porosity between the stacks of granules can be clearly identified as previously reported (12). Different types of parameters have been proposed to evaluate the 3D arrangement of porous materials (e.g., the box-plot fractal dimension) (22, 23) and the interconnectivity of the pores created between the granules (29). The method was successfully applied to evaluate the complexity of different types of granule aggregates: sandstone (36), coal (37), metal grains (38), and soils (39). The complexity of the granule repartition, evaluated by  $D_f$ , did not differ between the four groups. However, fractal lacunarity appears as an interesting new tool capable to differentiate the groups but it does not bring morphological information (12, 28, 29, 40). We have recently developed vector analysis for visualization and quantification of the porosity in objects presenting a complex form (19). The method was found useful to analyze pores in materials prepared with various types





of porogens and in bones having a particularly complex shape. This is the case with alveolar bone at the mandible, which is very difficult to analyze because of the presence of the tooth roots. Recently, the bone loss induced by paralysis of *Mus masseter* and *Mus temporalis* was evidenced by this technique (41). The frontal plane is produced line by line during the vector analysis of each microCT image and represents the projection of porosity. The complexity of the image can be measured by fractal geometry on this projected 2D image. In the present series, there was no difference for  $D_f$  among the four groups under study. However, lacunarity is known to be influenced by the uniformity of the

spatial distribution; it is a useful parameter when objects do not differ by their fractal dimension (42, 43). The maximal  $\lambda$  value was reached in the LP (25 g) group meaning that very large pores are created in the 3D arrangement of the granules. On the other hand, the lowest  $\lambda$  values were obtained for the HP (12.5 g group) granules and the LD bone, which presented a regular distribution of pore dimensions. Similar relationships have been reported in studies concerned with the porosity of soils (44, 45).

The presence of pores larger than 100  $\mu$ m has been recognized as a key factor in the vascular invasion of grafted materials into bone (46, 47). In this study, Po-Diam values for bone were within the values typically reported for bone (48); Po-Diam of both HP and LP are larger than 300  $\mu$ m and well suited for body fluid and cell invasion (49).

There are some limitations to this study: (1) no compressive analysis was done on the bone cylinders, but synthetic ceramics are well known to be more brittle than bone; (2) bovine bone was used to obtain the HD cylinders, but the biomechanical parameters for trabecular bone are very close (stiffness in compression for bovine bone: 173 MPa vs. human: 139–472 MPa) (50); and (3) the other microarchitectural characteristics of the  $\beta$ -TCP materials having been reported elsewhere are not duplicated in the present study (12).

## CONCLUSION

The present study shows that the two types of  $\beta$ -TCP granules prepared differently did not produce the same interconnected porosity: LP granules provided very large but less numerous pores and HP granules provided a HP with a large interface. The HP stacks of granules presented a porosity similar to trabecular bone, although the granules were physically independent. This study confirms that vector analysis is a suitable method for the evaluation of porosity of complex objects.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs. Laurence Lechat for secretarial assistance. This work was made possible by grants from ANR, program LabCom “NextBone.” The authors thank Kasios, 18 chemin de la Violette, 31240 L’Union – France for providing the different formulations of granules. The analysis software (VECTOPOR) is now licensed by the Agence de Protection des Programmes (APP). Authors also thank Mrs. Nadine Gaborit for her skillful technical assistance with microCT and Phil Salmon for having reviewed the manuscript.

## REFERENCES

- Baslé MF. Le tissu osseux: ses niveaux d’organisation (the organisation levels of bone). *Tissu osseux et biomatériaux en chirurgie dentaire*. Paris: Quintessence International (2014). p. 67–80.
- Chappard D, Baslé MF, Legrand E, Audran M. New laboratory tools in the assessment of bone quality. *Osteoporos Int* (2011) 22:2225–40. doi:10.1007/s00198-011-1573-6
- Parfitt AM, Matthews CHE, 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* (1983) 72:1396–409. doi:10.1172/JCI111096
- Dorozhkin SV. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomater* (2012) 8:963–77. doi:10.1016/j.actbio.2011.09.003
- Chappard D, Guillaume B, Mallet R, Pascaretti-Grizon F, Baslé MF, Libouban H. Sinus lift augmentation and beta-TCP: a microCT and histologic analysis on human bone biopsies. *Micron* (2010) 41:321–6. doi:10.1016/j.micron.2009.12.005
- Gauthier O, Boulter J-M, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and,

- macroporosity, percentage, on, bone, ingrowth. *Biomaterials* (1998) **19**:133–9. doi:10.1016/S0142-9612(97)00180-4
7. Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: a histometric study. *J Orthop Res* (1987) **5**:114–21. doi:10.1002/jor.1100050114
  8. Long M, Martin C, Cooper M. Confined compression of bone substitute granules. *Key Eng Mater* (2005) **284**:361–4. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.284-286.361
  9. Rezwan K, Chen Q, Blaker J, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* (2006) **27**:3413–31. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.039
  10. Schwartzwalder K, Somers H, Somers AV, inventors. *Method of Making Porous Ceramics*. US patent 3 090 094 (1963).
  11. Filmon R, Retailleau-Gaborit N, Brossard G, Grizon-Pascaretti F, Baslé MF, Chappard D. MicroCT and preparation of  $\beta$ -TCP granular material by the polyurethane foam method. *Image Anal Stereol* (2009) **28**:103–12. doi:10.5566/ias.v28.p103-112
  12. Ndiaye M, Terranova L, Mallet R, Mabilieu G, Chappard D. Three-dimensional arrangement of beta-tricalcium phosphate granules evaluated by microcomputed tomography and fractal analysis. *Acta Biomater* (2015) **11**:404–11. doi:10.1016/j.actbio.2014.09.015
  13. Kadiri MS. *Compression de poudres pharmaceutiques et interaction avec l'outilage [PhD thesis]*. Toulouse: Analyse expérimentale et modélisation numérique Univ. (2004). Available from: <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000096/01/kadiri.pdf>
  14. Ritchie RO, Koester KJ, Ionova S, Yao W, Lane NE, Ager JW III. Measurement of the toughness of bone: a tutorial with special reference to small animal studies. *Bone* (2008) **43**:798–812. doi:10.1016/j.bone.2008.04.027
  15. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* (1993) **14**:595–608. doi:10.1016/8756-3282(93)90081-K
  16. Tassani S, Korfiatis V, Matsopoulos G. Influence of segmentation on micro-CT images of trabecular bone. *J Microsc* (2014) **256**:75–81. doi:10.1111/jmi.12159
  17. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* (2013) **28**:2–17. doi:10.1002/jbmr.1805
  18. Hildebrand T, Rueggsegger P. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microsc* (1997) **185**:67–75. doi:10.1046/j.1365-2818.1997.1340694.x
  19. Chappard D, Stancu IC. Porosity imaged by a vector projection algorithm correlates with fractal dimension measured on 3D models obtained by microCT. *J Microsc* (2015) **258**:24–30. doi:10.1111/jmi.12212
  20. Karperien A. *FracLac for ImageJ*. Charles Sturt University (1999–2013). Available from: <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fraclac/FLHelp/Introduction.htm>
  21. Rasband WS. *ImageJ*. Bethesda, MD (1997–2014). Available from: <http://imagej.nih.gov/ij/>
  22. Chappard D, Legrand E, Haettich B, Chales G, Auvinet B, Eschard JP, et al. Fractal dimension of trabecular bone: comparison of three histomorphometric computed techniques for measuring the architectural two-dimensional complexity. *J Pathol* (2001) **195**:515–21. doi:10.1002/path.970
  23. Fazzalari NL, Parkinson IH. Fractal properties of subchondral cancellous bone in severe osteoarthritis of the hip. *J Bone Miner Res* (1997) **12**:632–40. doi:10.1359/jbmr.1997.12.4.632
  24. Haire TJ, Hodgkinson R, Ganney PS, Langton CM. A comparison of porosity, fabric and fractal dimension as predictors of the Young's modulus of equine cancellous bone. *Med Eng Phys* (1998) **20**:588–93. doi:10.1016/S1350-4533(98)00063-0
  25. Hu BX, Meerschaert MM, Barrash W, Hyndman DW, He C, Li X, et al. Examining the influence of heterogeneous porosity fields on conservative solute transport. *J Contam Hydrol* (2009) **108**:77–88. doi:10.1016/j.jconhyd.2009.06.001
  26. Smith TG Jr, Lange GD, Marks WB. Fractal methods and results in cellular morphology – dimensions, lacunarity and multifractals. *J Neurosci Methods* (1996) **69**:123–36. doi:10.1016/S0165-0270(96)00080-5
  27. de Melo RHC. *Using Fractal Characteristics Such as Fractal Dimension, Lacunarity and Succolarity to Characterize Texture Patterns on Images*. Fluminense: Federal University of Fluminense (2007).
  28. de Melo RHC, Vieira EA, Conci A. Comparing two approaches to compute Lacunarity of mammograms. In: *13th Int Conf on Systems, Signal and Image Processing and Semantic Multimodal Analysis of Digital Media (IWSSIP 2006)*. Budapest: IEEE Signal Processing Society (2006). p. 299–302.
  29. N'Diaye M, Degeratu C, Boulter JM, Chappard D. Biomaterial porosity determined by fractal dimensions, succolarity and lacunarity on microcomputed tomographic images. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* (2013) **33**:2025–30. doi:10.1016/j.msec.2013.01.020
  30. Chappard D, Josselin N, Rouge-Maillart C, Legrand E, Baslé MF, Audran M. Bone microarchitecture in males with corticosteroid-induced osteoporosis. *Osteoporos Int* (2007) **18**:487–94. doi:10.1007/s00198-006-0278-8
  31. Webb K, Hlady V, Tresco PA. Relationships among cell attachment, spreading, cytoskeletal organization, and migration rate for anchorage-dependent cells on model surfaces. *J Biomed Mater Res* (2000) **49**:362–8. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(20000305)49:3<362::AID-JBM9>3.0.CO;2-S
  32. Frenken J, Bouwman W, Bravenboer N, Zijderfeld S, Schulten E, Ten Bruggenkatte C. The use of Straumann® Bone Ceramic in a maxillary sinus floor elevation procedure: a clinical, radiological, histological and histomorphometric evaluation with a 6-month healing period. *Clin Oral Implants Res* (2010) **21**:201–8. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01821.x
  33. Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res* (2006) **24**:867–76. doi:10.1002/jor.20115
  34. Araujo MG, Liljenberg B, Lindhe J. Beta-tricalcium phosphate in the early phase of socket healing: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* (2010) **21**:445–54. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01876.x
  35. Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Baslé MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res* (2005) **20**:1177–84. doi:10.1359/JBMR.050205
  36. Katz AJ, Thompson A. Fractal sandstone pores: implications for conductivity and pore formation. *Phys Rev Lett* (1985) **54**:1325. doi:10.1103/PhysRevLett.54.1325
  37. Friesen W, Mikula R. Fractal dimensions of coal particles. *J Colloid Interface Sci* (1987) **120**:263–71. doi:10.1016/0021-9797(87)90348-1
  38. Khanbarez H, Wu X, van der Zwaag S. Analysis of the fractal dimension of grain boundaries of AA7050 aluminum alloys and its relationship to fracture toughness. *J Mater Sci* (2012) **47**:6246–53. doi:10.1007/s10853-012-6544-6
  39. Ding W. Fractal dimension features of soil aggregates distribution with the different reclamation years on loess plateau. *Sens Lett* (2012) **10**:555–61. doi:10.1166/sl.2012.1897
  40. de Melo RHC, Conci A. How succolarity could be used as another fractal measure in image analysis. *Telecommun Syst* (2013) **52**:1643–55. doi:10.1007/s11235-011-9657-3
  41. Kun-Darbois JD, Libouban H, Chappard D. Botulinum toxin in masticatory muscles of the adult rat induces bone loss at the condyle and alveolar regions of the mandible associated with a bone proliferation at a muscle entheses. *Bone* (2015) **77**:75–82. doi:10.1016/j.bone.2015.03.023
  42. Zeng Y, Payton R, Gantzer C, Anderson S. Fractal dimension and lacunarity of bulk density determined with X-ray computed tomography. *Soil Sci Soc Am J* (1996) **60**:1718–24. doi:10.2136/sssaj1996.03615995006000060016x
  43. Mandelbrot B. *The Fractal Geometry of Nature*. New York, NY: Freeman, WH (1977).
  44. Chun HC, Giménez D, Yoon SW. Morphology, lacunarity and entropy of intra-aggregate pores: aggregate size and soil management effects. *Geoderma* (2008) **146**:83–93. doi:10.1016/j.geoderma.2008.05.018
  45. Latief FDE, Fauzi U, Kozeny-Carman and empirical formula for the permeability of computer rock models. *Int J Rock Mech Min Sci* (2012) **50**:117–23. doi:10.1016/j.ijrmms.2011.12.005
  46. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* (2005) **26**:5474–91. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002
  47. 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* (2006) **27**:3230–7. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.031

48. Chappard D, Legrand E, Pascaretti C, Baslé MF, Audran M. Comparison of eight histomorphometric methods for measuring trabecular bone architecture by image analysis on histological sections. *Microsc Res Tech* (1999) **45**:303–12. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19990515/01)45:4/5<303::AID-JEMT14>3.3.CO;2-#
49. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* (2000) **21**:2529–43. doi:10.1016/S0142-9612(00)00121-6
50. Wang X, Nyman JS, Dong X, Leng H, Reyes M. Fundamental biomechanics in bone tissue engineering. *Synth Lect Tissue Eng* (2010) **2**:1–225. doi:10.2200/S00246ED1V01Y200912TIS004

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Chappard, Terranova, Mallet and Mercier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'architecture des biomatériaux joue un rôle très important pour garantir leur ostéoconduction et leur ostéointégration en site greffé. La topographie de surface est également un facteur clé pour assurer l'adhésion et la prolifération des cellules. Au cours de ce travail, nous avons caractérisé la forme, la surface et la composition de membranes fibreuses de polystyrène et de granules de  $\beta$ -TCP à l'aide de nombreuses techniques d'imagerie : micro- et nanotomographie computerisée, microscopie électronique à balayage, EDS, microscopie confocale. La microspectroscopie Raman et spectroscopie infrarouge ont permis l'analyse chimique. Puis, nous avons étudié les comportements cellulaires tels que l'adhésion, la prolifération et la différenciation au contact des membranes de PS avant de les implanter dans un défaut osseux de taille critique. Les analyses en microscopie électronique et confocale nous ont permis d'observer les cellules sur les fibres. In vivo, les coupes histologiques nous ont permis d'explorer l'environnement biologique au contact des biomatériaux. Les techniques de caractérisation utilisées nous ont apportées de nombreux résultats à l'échelle micro- et nanométrique, essentiels pour interpréter les mécanismes biologiques.

La thèse s'articule autour de deux projets : le premier porte sur l'étude de membranes fibreuses de polystyrène obtenues par électrospinning. Ce projet s'inscrit dans une des thématiques du LabCom NextBone. Les membranes fibreuses de PS sont utilisées en tant que biomatériau pour le comblement de défauts osseux dont la réparation doit être assistée. Les membranes fibreuses synthétiques doivent apporter une alternative aux greffes biologiques qui aujourd'hui présentent des limites (second site chirurgical, problème de sécurité virale, morbidité). Les membranes fibreuses offrent une large surface tridimensionnelle à la porosité interconnectée pour favoriser la colonisation cellulaire et les échanges nutritionnels et gazeux.

Dans un premier temps, nous avons choisi de développer des membranes à base de polystyrène. Ce polymère est biocompatible et non-biodégradable ; les fibres non-résorbées doivent renforcer le tissu osseux nouvellement formé. Nous avons caractérisé les membranes en nanoCT et en MEB ; des techniques d'imagerie à l'échelle nanoscopique permettant d'évaluer précisément l'architecture tridimensionnelle et la surface des matériaux. Les membranes sont constituées de microfibres rugueuses de différentes tailles qui peuvent être alignées entre elles ou disposées aléatoirement. Les membranes de microfibres sont macroporeuses, la porosité étant définie comme l'ensemble des interstices. Nous avons ensuite évalué les effets de l'orientation et du diamètre des fibres sur le comportement cellulaire *in vitro*. La cytocompatibilité des différentes membranes a été montrée en ensemençant des cellules pré-ostéoblastiques d'origine murine, les cellules MC3T3. L'adhésion des cellules a été favorisée sur les membranes de fibres aléatoires de plus fort diamètre (3,5  $\mu\text{m}$ ). La prolifération cellulaire et l'activité de la phosphatase alcaline ont montré des résultats optimaux sur les deux membranes de fibres alignées (4,5 et 1,5  $\mu\text{m}$ ). Seules les membranes de fibres aléatoires de plus faible diamètre (1  $\mu\text{m}$ ) ont semblé limiter la prolifération et la différenciation cellulaire. Grâce à la microscopie confocale, nous avons ensuite pu mettre en évidence que les cellules

changeaient de morphologie au contact des fibres alignées ou aléatoires ; les noyaux des cellules cultivées sur les fibres alignées se sont allongés selon l'axe préférentiel des fibres. Des nodules calcifiés ont également pu être observés sur les fibres après 28 jours de culture. Les membranes ont donc offert une surface favorable à l'activité cellulaire.

Dans un deuxième temps, nous avons sélectionné les membranes de PS de fibres alignées avec le plus fort diamètre ; elles ont une meilleure résistance aux forces de traction que les membranes de fibres aléatoires. Les fibres ont été additionnées de grains de  $\beta$ -TCP ou de nanoparticules d'or afin d'améliorer la biocompatibilité et le potentiel ostéogénique *in vivo*. La présence du  $\beta$ -TCP et des AuNPs sur les fibres a été confirmée par microspectroscopie Raman et spectroscopie infrarouge respectivement et en MEB. La prolifération cellulaire a été testée sur les trois types de membranes (PS,  $\beta$ -TCP-PS, AuNPs-PS) ; elle est plus importante sur les membranes additionnées de  $\beta$ -TCP, grâce à sa bioactivité, pour des temps longs (7 jours). Ensuite, les membranes  $\beta$ -TCP-PS et AuNPs-PS ont été implantées dans des défauts osseux crâniens chez la souris pendant 6, 9 et 12 semaines. L'os nouvellement formé a été analysé par microCT et en histologie. Ces techniques nous ont fournis de nombreux résultats sur la réparation osseuse et l'environnement biologique au sein du défaut osseux. La quantité d'os néoformé a été plus importante pour les souris greffées avec les membranes  $\beta$ -TCP-PS. Cependant, ces membranes sont apparues seulement biotolérées : du tissu osseux lamellaire a été synthétisé mais une épaisse couche de tissu conjonctif dense comble les défauts. Il serait donc intéressant d'utiliser des polymères d'origine biologique (par exemple, le collagène, la fibroïne de soie, la chitine, l'alginate,...) pour améliorer la biocompatibilité des membranes *in vivo*. En effet, il est nécessaire d'utiliser des biomatériaux bioactifs pour induire une régénération osseuse complète. Cependant, certains polymères d'origine biologique, notamment le collagène, sont très rapidement biodégradables. Pour contrer cette limitation, nous pouvons envisager de développer des fibres avec une structure cœur-couronne : la structure interne est composée d'un polymère synthétique recouvert d'un polymère biologique (utilisation d'une aiguille co-axiale), pour conserver des propriétés mécaniques suffisantes durant le temps de régénération du tissu osseux. Il serait également possible de fonctionnaliser les fibres avec des facteurs de croissance ostéogéniques (TGF- $\beta$ ) et/ou angiogéniques (VEGF) pour améliorer la différenciation ostéoblastique et l'angiogenèse. Les fibres peuvent également être fonctionnalisées avec des protéines d'adhérence (vitronectine, fibronectine) ou des molécules bioactives, comme nous l'avons fait avec le  $\beta$ -TCP, pour favoriser l'adhérence et l'activité cellulaire.

Le deuxième projet porte sur les granules de  $\beta$ -TCP. Les granules de  $\beta$ -TCP sont des céramiques inorganiques dont la composition est proche de la phase minérale de l'os, avec une architecture poreuse interconnectée. Ces caractéristiques permettent aux granules d'être bioactifs et d'induire l'ostéoconduction pour reconstruire de manière plus optimale le tissu osseux. Ils sont très utilisés en chirurgie maxillo-faciale et orale, notamment pour combler des cavités osseuses de petites tailles avec une charge mécanique faible.



Dans un premier temps, nous avons évalué l'architecture externe et interne de six types de granules, contenant des quantités variables  $\beta$ -TCP, par nanoCT. L'architecture des granules est macroporeuse ; la taille et la densité des pores varient avec la quantité de  $\beta$ -TCP. La partie interne montre une hétérogénéité de calcification, on retrouve une nano- et microporosité interne.

Dans un second temps, les différents granules ont été empilés dans des tubes à essai pour mimer leur utilisation dans une cavité osseuse. L'architecture des empilements tridimensionnels obtenus a été analysée. La porosité et l'interconnectivité des pores ont été calculées car ce sont des éléments essentiels pour l'invasion cellulaire et vasculaire. L'architecture des empilements varie avec la forme des granules. Cependant, il est important de maintenir un équilibre entre la porosité et la quantité de matière pour résister aux contraintes mécaniques. Des analyses en compression ont été effectuées sur les empilements : les plus macroporeux sont les plus friables et ils résistent moins aux contraintes en compression. Nous avons pu voir que l'empilement de granules commerciaux (contenant 12,5 g de  $\beta$ -TCP) pouvait mimer l'architecture naturelle et les propriétés physiques de l'os trabéculaire jeune.

De nouvelles formes de  $\beta$ -TCP pourraient être envisagées pour s'adapter à différents type de défauts osseux. La quantité de  $\beta$ -TCP et la technique de mise en forme peuvent être adaptées pour développer des céramiques aux propriétés d'ostéoconduction et de résistance mécanique optimales en site greffé.

L'architecture des biomatériaux est au cœur de leur intégration en site osseux. Développer des matériaux par impression 3D permettrait de créer des structures à l'architecture proche de celle du tissu osseux, afin d'améliorer la réparation osseuse. Les polymères (PLA, PCL, collagène, alginate) et les céramiques ( $\beta$ -TCP, HA) couramment utilisés pour la régénération osseuse sont parfaitement compatibles avec cette méthode. De plus, la flexibilité de l'imprimante 3D nous permettrait également de recréer des pièces de comblement osseux adaptées aux patients.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anderson, J. M., G. Cook, B. Costerton, S. R. Hanson, A. Hensten-Pettersen, N. Jacobsen, R. J. Johnson, R. N. Mitchell, M. Pasmore, F. J. Schoen, M. Shirliff and S. P. (2004). Host response to biomaterials and their evaluation. . Biomaterials science: an introduction to materials in medicine 2<sup>nd</sup> Ed. B. D. Ratner, F. J. Schoen and J. E. Lemons. San Diego, Elsevier: 293-300.
- Aubin, J. E. (1998). "Advances in the osteoblast lineage." Biochem Cell Biol **76**(6): 899-910.
- Badami, A. S., M. R. Kreke, M. S. Thompson, J. S. Riffle and A. S. Goldstein (2006). "Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates." Biomaterials **27**(4): 596-606.
- Bagambisa, F. B., U. Joos and W. Schilli (1993). "Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics." J biomed mater res **27**(8): 1047-1055.
- Balguid, A., A. Mol, M. van Marion, R. A. Bank, C. Bouten and F. Baaijens (2008). "Tailoring fiber diameter in electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds for optimal cellular infiltration in cardiovascular tissue engineering." Tissue Eng Part A **15**(2): 437-444.
- Barrientos, J., R. Álvarez, M. G. Cantera and A. Verrier (2006). "Reconstruction of a large osseous zygomatic defect with a computer-generated HTR® implant." J Cranio Maxill Surg **34**, **S1**(0): 212.
- Bashur, C. A., L. A. Dahlgren and A. S. Goldstein (2006). "Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes." Biomaterials **27**(33): 5681-5688.
- Borah, B., G. J. Gross, T. E. Dufresne, T. S. Smith, M. D. Cockman, P. A. Chmielewski, M. W. Lundy, J. R. Hartke and E. W. Sod (2001). "Three-dimensional microimaging (MRmicrol and microCT), finite element modeling, and rapid prototyping provide unique insights into bone architecture in osteoporosis." Anat Rec **265**(2): 101-110.
- Borah, B., E. L. Ritman, T. E. Dufresne, S. M. Jorgensen, S. Liu, J. Sacha, R. J. Phipps and R. T. Turner (2005). "The effect of risedronate on bone mineralization as measured by micro-computed tomography with synchrotron radiation: correlation to histomorphometric indices of turnover." Bone **37**(1): 1-9.
- Bouwman, A. M., J. C. Bosma, P. Vonk, J. A. Wesselingh and H. W. Frijlink (2004). "Which shape factor(s) best describe granules?" Powder Technol. **146**: 66-72.
- Buser, D., R. K. Schenk, S. Steinemann, J. P. Fiorellini, C. H. Fox and H. Stich (1991). "Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs." J Biomed Mater Res **25**(7): 889-902.
- Carrodegua, R. G. and S. De Aza (2011). "alpha-Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications." Acta Biomater **7**(10): 3536-3546.
- Casper, C. L., J. S. Stephens, N. G. Tassi, D. B. Chase and J. F. Rabolt (2004). "Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process." Macromolecules **37**(2): 573-578.
- Chappard, D., I. Degasne, G. Huré, E. Legrand, M. Audran and M. F. Baslé (2003). "Image analysis measurements of roughness by texture and fractal analysis correlate with contact profilometry." Biomaterials **24**(8): 1399-1407.
- Chappard, D., B. Guillaume, R. Mallet, F. Pascaretti-Grizon, M. F. Baslé and H. Libouban (2010). "Sinus lift augmentation and beta-TCP: a microCT and histologic analysis on human bone biopsies." Micron **41**(4): 321-326.
- Chappard, D., B. Guillaume, R. Mallet, F. Pascaretti-Grizon, M. F. Baslé and H. Libouban (2010). "Sinus lift augmentation and beta-TCP: a microCT and histologic analysis on human bone biopsies." Micron **41**(4): 321-326.
- Chappard, D. and I. C. Stancu (2015). "Porosity imaged by a vector projection algorithm correlates with fractal dimension measured on 3D models obtained by microCT." J Microsc **258**(1): 24-30.
- Charnley, J. (1970). "Total hip replacement by low-friction arthroplasty." Clin Orthop Relat Res **72**: 7-21.
- Chazono, M., T. Tanaka, H. Komaki and K. Fujii (2004). "Bone formation and bioresorption after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects." J Biomed Mater Res A **70**(4): 542-549.
- Chen, M., P. K. Patra, S. B. Warner and S. Bhowmick (2007). "Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on electrospun polycaprolactone scaffolds." Tissue Eng **13**(3): 579-587.



- Dallas, S. L. and L. F. Bonewald (2010). "Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte." *Ann N Y Acad Sci* **1192**(1): 437-443.
- Degasne, I., M. F. Basle, V. Demais, G. Hure, M. Lesourd, B. Grolleau, L. Mercier and D. Chappard (1999). "Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces." *Calcif Tissue Int* **64**(6): 499-507.
- Deitzel, J. M., J. Kleinmeyer, D. Harris and N. B. Tan (2001). "The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles." *Polymer* **42**(1): 261-272.
- Dickens, B., L. Schroeder and W. Brown (1974). "Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in  $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. The crystal structure of pure  $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>." *J Solid State Chem* **10**(3): 232-248.
- Dodig, M., T. Tadic, M. S. Kronenberg, S. Dacic, Y.-H. Liu, R. Maxson, D. W. Rowe and A. C. Lichtler (1999). "EctopicMsx2Overexpression Inhibits andMsx2Antisense Stimulates Calvarial Osteoblast Differentiation." *Dev Biol* **209**(2): 298-307.
- Doherty, P., R. Williams, D. Williams and A. Lee (1992). *Biomaterial-Tissue Interfaces: Second Consensus Conference on Definitions in Biomaterials*, Chester 1991, Amsterdam: Elsevier.
- Dorozhkin, S. V. (2012). "Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates." *Acta Biomater* **8**(3): 963-977.
- Eggli, P. S., W. Muller and R. K. Schenk (1988). "Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution." *Clin Orthop Relat Res* **232**(232): 127-138.
- Eichhorn, S. J. and W. W. Sampson (2005). "Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies." *J R Soc Interface* **2**(4): 309-318.
- Elahi, M. F., W. Lu, G. Guoping and F. Khan (2013). "Core-shell fibers for biomedical applications-a review." *J Bioeng Biomed Sci* **2013**.
- Eppey, B. L. (1989). "Evaluation of HTR polymer as a craniomaxillofacial graft material." *J. Oral Maxillofac. Surg* **47**(8, S 1): 132-133.
- Fellah, B. H., O. Gauthier, P. Weiss, D. Chappard and P. Layrolle (2007). "Comparison of osteoinduction by autologous bone and biphasic calcium phosphate ceramic in goats." *Key Eng Mater.* **330**: 1063-1066.
- Filmon, R., M. F. Baslé, H. Atmani and D. Chappard (2002). "Adherence of osteoblast-like cells on calcospherites developed on a biomaterial combining poly(2-hydroxyethyl) methacrylate and alkaline phosphatase." *Bone* **30**(1): 152-158.
- Filmon, R., N. Retailleau-Gaborit, G. Brossard, F. Grizon-Pascaretti, M. F. Baslé and D. Chappard (2009). "Preparation of  $\beta$ -TCP granular material by polyurethane foam technology." *Image Anal Stereol* **28**: 1-10.
- Fontaine, P. A., D. Amory and D. Simon (2007). *Matériaux d'obturation et préparations cavitaires: évolution à travers le temps*.
- Formhals, A. (1934). *Process and apparatus for preparing artificial threads*, Google Patents.
- Frost, H. M. (1990). "Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem." *Anat Rec* **226**(4): 414-422.
- Giannoudis, P. V., H. Dinopoulos and E. Tsiridis (2005). "Bone substitutes: an update." *Injury* **36 Suppl 3**(3): S20-27.
- Gibson, L. J. and M. F. Ashby (1999). *Cellular solids: structure and properties*, Cambridge University Press.
- Guillaume, B., H. Libouban, M. F. Basle and D. Chappard (2010). "Comblement sinusien par  $\beta$ -TCP avant pose d'implants chez l'homme : Étude clinique et histologique." *Titane* **7**: 201-210.
- Huang, Z.-M., Y.-Z. Zhang, M. Kotaki and S. Ramakrishna (2003). "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites." *Compos Sci Technol* **63**(15): 2223-2253.
- Jarusuwannapoom, T., W. Hongrojanawiwat, S. Jitjaicham, L. Wannatong, M. Nithitanakul, C. Pattamaprom, P. Koombhongse, R. Rangkupan and P. Supaphol (2005). "Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers." *Eur. Polym. J* **41**(3): 409-421.
- Jensen, O. T., L. B. Shulman, M. S. Block and V. J. Iacono (1998). "Report of the Sinus Consensus Conference of 1996." *Int J Oral Maxillofac Implants* **13 Suppl**: 11-45.
- Jin, H. J., J. Chen, V. Karageorgiou, G. H. Altman and D. L. Kaplan (2004). "Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats." *Biomaterials* **25**(6): 1039-1047.
- Karageorgiou, V. and D. Kaplan (2005). "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis." *Biomaterials* **26**(27): 5474-5491.

- Karsenty, G. (2001). "Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation." *Endocrinology* **142**(7): 2731-2733.
- Kerckhofs, G., J. Sainz, M. Wevers, T. Van de Putte and J. Schrooten (2013). "Contrast-enhanced nanofocus computed tomography images the cartilage subtissue architecture in three dimensions." *Eur Cell Mater* **25**: 179-189.
- Khaliwala, C. B., S. R. Peyton and A. J. Putnam (2006). "Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(6): C1640-1650.
- Kim, S. E., Y. P. Yun, Y. K. Han, D. W. Lee, J. Y. Ohe, B. S. Lee, H. R. Song, K. Park and B. J. Choi (2014). "Osteogenesis induction of periodontal ligament cells onto bone morphogenic protein-2 immobilized PCL fibers." *Carbohydr Polym* **99**: 700-709.
- Klein, M., H. Goetz, S. Pazen, B. Al-Nawas, W. Wagner and H. Duschner (2009). "Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography." *Clin Oral Implants Res* **20**(1): 67-74.
- Koepp, H., S. Schorlemmer, R. Brenner, L. Claes, K.-P. Günther and A. Ignatius (2003). "Biocompatibility and osseointegration of b-TCP: histomorphological and biomechanical studies in a weight-bearing sheep model." *J Biomed Mater Res* **70B**: 209-217.
- Kumbar, S. G., R. James, S. P. Nukavarapu and C. T. Laurencin (2008). "Electrospun nanofiber scaffolds: engineering soft tissues." *Biomed Mater* **3**(3): 034002.
- Lao, L., Y. Wang, Y. Zhu, Y. Zhang and C. Gao (2011). "Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering." *J Mater Sci Mater Med* **22**(8): 1873-1884.
- Lim, S. H. and H. Q. Mao (2009). "Electrospun scaffolds for stem cell engineering." *Adv Drug Deliv Rev* **61**(12): 1084-1096.
- Lu, J., M. Descamps, J. Dejou, G. Koubi, P. Hardouin, J. Lemaitre and J. P. Proust (2002). "The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone." *J Biomed Mater Res* **63**(4): 408-412.
- Lutolf, M. P. and J. A. Hubbell (2005). "Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering." *Nat. Biotechnol* **23**(1): 47-55.
- Ma, J., X. He and E. Jabbari (2011). "Osteogenic differentiation of marrow stromal cells on random and aligned electrospun poly(L-lactide) nanofibers." *Ann Biomed Eng* **39**(1): 14-25.
- Marotti, G. (1993). "A new theory of bone lamellation." *Calcif Tissue Int* **53 Suppl 1**(1): S47-S55; discussion S56.
- Martin, J. Y., Z. Schwartz, T. W. Hummert, D. M. Schraub, J. Simpson, J. Lankford, Jr., D. D. Dean, D. L. Cochran and B. D. Boyan (1995). "Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)." *J Biomed Mater Res* **29**(3): 389-401.
- Massai, D., F. Pennella, P. Gentile, D. Gallo, G. Ciardelli, C. Bignardi, A. Audenino and U. Morbiducci (2014). "Image-based three-dimensional analysis to characterize the texture of porous scaffolds." *BioMed. Res. Int.* **2014**: ID 161437.
- McAndrew, M. P., P. W. Gorman and T. A. Lange (1988). "Tricalcium phosphate as a bone graft substitute in trauma: preliminary report." *J Orthop Trauma* **2**(4): 333-339.
- McCullen, S., Y. Zhu, S. Bernacki, R. Narayan, B. Pourdeyhi, R. Gorga and E. Lobo (2009). "Electrospun composite poly (L-lactic acid)/tricalcium phosphate scaffolds induce proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells." *Biomed Mater* **4**(3): 035002.
- Min, B. M., G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee and W. H. Park (2004). "Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro." *Biomaterials* **25**(7-8): 1289-1297.
- Mo, X. M., C. Y. Xu, M. Kotaki and S. Ramakrishna (2004). "Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation." *Biomaterials* **25**(10): 1883-1890.
- Montjovent, M. O., L. Mathieu, H. Schmoekel, S. Mark, P. E. Bourban, P. Y. Zambelli, L. A. Laurent-Applegate and D. P. Pioletti (2007). "Repair of critical size defects in the rat cranium using ceramic-reinforced PLA scaffolds obtained by supercritical gas foaming." *J Biomed Mater Res Part A* **83**(1): 41-51.
- Naveh, G. R., V. Brumfeld, R. Shahar and S. Weiner (2013). "Tooth periodontal ligament: Direct 3D microCT visualization of the collagen network and how the network changes when the tooth is loaded." *J Struct Biol* **181**(2): 108-115.
- Ndiaye, M., L. Terranova, R. Mallet, G. Mabilieu and D. Chappard (2015). "Three-dimensional arrangement of beta-tricalcium phosphate granules evaluated by microcomputed tomography and fractal analysis." *Acta Biomater* **11**: 404-411.
- Nery, E. B., K. L. Lynch and G. E. Rooney (1978). "Alveolar ridge augmentation with tricalcium phosphate ceramic." *J Prosthet Dent* **40**(6): 668-675.

- Nogueira, L. P., D. Braz, R. C. Barroso, L. F. Oliveira, C. J. G. Pinheiro, D. Dreossi and G. Tromba (2010). "3D histomorphometric quantification of trabecular bones by computed microtomography using synchrotron radiation." Micron **41**(8): 990-996.
- Otto, F., A. P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K. C. Gilmour, I. R. Rosewell, G. W. Stamp, R. S. Beddington, S. Mundlos and B. R. Olsen (1997). "Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development." Cell **89**(5): 765-771.
- Owen, M. and A. J. Friedenstein (1988). "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors." Ciba Found Symp **136**: 42-60.
- Pascaretti-Grizon, F., H. Libouban, G. Camprasse, S. Camprasse, R. Mallet and D. Chappard (2014). "The interface between nacre and bone after implantation in the sheep: a nanotomographic and Raman study." J. Raman Spectrosc **45**: 558-564.
- Pham, Q. P., U. Sharma and A. G. Mikos (2006). "Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review." Tissue Eng **12**(5): 1197-1211.
- Richardson, J., Y. Peng and D. Remue (2000). "Properties of ceramic foam catalyst supports: pressure drop." Appl. Catal., A **204**(1): 19-32.
- Rnjak-Kovacina, J., S. G. Wise, Z. Li, P. K. Maitz, C. J. Young, Y. Wang and A. S. Weiss (2011). "Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering." Biomaterials **32**(28): 6729-6736.
- Roschger, P., P. Fratzl, J. Eschberger and K. Klaushofer (1998). "Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies." Bone **23**(4): 319-326.
- Rouwkema, J., N. C. Rivron and C. A. van Blitterswijk (2008). "Vascularization in tissue engineering." Trends Biotechnol **26**(8): 434-441.
- Rueggsegger, P., B. Koller and R. Muller (1996). "A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture." Calcif Tissue Int **58**(1): 24-29.
- Russ, J. C. (2013). Fractal surfaces, Springer Science & Business Media.
- Saito, M. and K. Marumo (2010). "Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus." Osteoporis Int **21**(2): 195-214.
- Sasov, A. and D. Van Dyck (1998). "Desktop X-ray microscopy and microtomography." J Microsc **191**(Pt 2): 151-158.
- Schladitz, K. (2011). "Quantitative micro-CT." J Microsc **243**(2): 111-117.
- Schwartzwalder, K., H. Somers and A. V. Somers (1963). Method of making porous ceramics. US Patent 3090094 A.
- Sharawy, M., S. Tehemar and P. Hanes (2003). "Enhancement of osseointegration of implants placed into extraction sockets of healthy and periodontally diseased teeth by using PepGen p-15, GORETEX membrane, or combination." J. Dent. Res **82**: B179-B179.
- Shih, Y. R., C. N. Chen, S. W. Tsai, Y. J. Wang and O. K. Lee (2006). "Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers." Stem Cells **24**(11): 2391-2397.
- Shim, J.-H., T.-S. Moon, M.-J. Yun, Y.-C. Jeon, C.-M. Jeong, D.-W. Cho and J.-B. Huh (2012). "Stimulation of healing within a rabbit calvarial defect by a PCL/PLGA scaffold blended with TCP using solid freeform fabrication technology." J. Mater. Sci. Mater. Med **23**(12): 2993-3002.
- Shin, S. Y., H. N. Park, K. H. Kim, M. H. Lee, Y. S. Choi, Y. J. Park, Y. M. Lee, Y. Ku, I. C. Rhyu, S. B. Han, S. J. Lee and C. P. Chung (2005). "Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration." J Periodontol **76**(10): 1778-1784.
- Simon, J. L., E. D. Rekow, V. P. Thompson, H. Beam, J. L. Ricci and J. R. Parsons (2008). "MicroCT analysis of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-dimensional printing for evaluating the effects of scaffold architecture on bone ingrowth." J Biomed Mater Res A **85**(2): 371-377.
- Sisson, K., C. Zhang, M. C. Farach-Carson, D. B. Chase and J. F. Rabolt (2010). "Fiber diameters control osteoblastic cell migration and differentiation in electrospun gelatin." J Biomed Mater Res A **94**(4): 1312-1320.
- Suda, T., N. Takahashi and T. J. Martin (1992). "Modulation of osteoclast differentiation." Endocr Rev **13**(1): 66-80.
- Sullivan, R. M., L. J. Ghosn and B. A. Lerch (2008). "A general tetrakaidecahedron model for open-celled foams." Int J Solids Struct **45**(6): 1754-1765.
- Suzuki, O. (2013). "Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials." Jpn. Dent. Sci. Rev. **49**(2): 58-71.
- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." Science **289**(5484): 1504-1508.



- TenHuisen, K. S. and P. W. Brown (1999). "Phase evolution during the formation of alpha-tricalcium phosphate." J. Am. Ceramic Soc. **82**(10): 2813-2818.
- Tremblay, S. and D. Mantovani (2003). "Les fils de suture: de fil en aiguille." Le Médecin du Québec **38**(10): 105-108.
- Uyar, T. and F. Besenbacher (2008). "Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity." Polymer **49**(24): 5336-5343.
- Vallet-Regí, M., L. M. Rodriguez-Lorenzo and A. J. Salinas (1997). "Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite." Solid State Ion. **101**: 1279-1285.
- Van der Slot-Verhoeven, A. J., E. A. Van Dura, J. Attema, B. Blauw, J. Degroot, T. W. Huizinga, A. M. Zuurmond and R. A. Bank (2005). "The type of collagen cross-link determines the reversibility of experimental skin fibrosis." Biochim Biophys Acta **1740**(1): 60-67.
- Van Lenthe, G. H., H. Hagenmuller, M. Böhner, S. J. Hollister, L. Meinel and R. Müller (2007). "Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold-bone interaction in vivo." Biomaterials **28**(15): 2479-2490.
- Wannatong, L., A. Sirivat and P. Supaphol (2004). "Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene." Polym Int **53**(11): 1851-1859.
- Webster, D. J., P. Schneider, S. L. Dallas and R. Müller (2013). "Studying osteocytes within their environment." Bone **54**(2): 285-295.
- Weiner, S., W. Traub and H. D. Wagner (1999). "Lamellar bone: structure-function relations." J Struct Biol **126**(3): 241-255.
- Weiss, P., L. Obadia, D. Magne, X. Bourges, C. Rau, T. Weitkamp, I. Khairoun, J. M. Bouler, D. Chappard, O. Gauthier and G. Daculsi (2003). "Synchrotron X-ray microtomography (on a micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials." Biomaterials **24**(25): 4591-4601.
- Wilkins, S., T. Gureyev, D. Gao, A. Pogany and A. Stevenson (1996). "Phase-contrast imaging using polychromatic hard X-rays." Nature **384**(6607): 335-338.
- Williams, D. F. (1987). Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986, Elsevier Science Limited.
- Wutticharoenmongkol, P., P. Pavasant and P. Supaphol (2007). "Osteoblastic phenotype expression of MC3T3-E1 cultured on electrospun polycaprolactone fiber mats filled with hydroxyapatite nanoparticles." Biomacromolecules **8**(8): 2602-2610.
- Xu, C. Y., R. Inai, M. Kotaki and S. Ramakrishna (2004). "Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering." Biomaterials **25**(5): 877-886.
- Yang, F., R. Murugan, S. Wang and S. Ramakrishna (2005). "Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering." Biomaterials **26**(15): 2603-2610.
- Yang, S., K.-F. Leong, Z. Du and C.-K. Chua (2001). "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors." Tissue eng **7**(6): 679-689.
- Yashima, M., A. Sakai, T. Kamiyama and A. Hoshikawa (2003). "Crystal structure analysis of  $\beta$ -tricalcium phosphate Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> by neutron powder diffraction." J. Solid State Chem **175**(2): 272-277.
- Yoshimoto, H., Y. Shin, H. Terai and J. Vacanti (2003). "A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering." Biomaterials **24**(12): 2077-2082.
- Yu, D., Q. Li, X. Mu, T. Chang and Z. Xiong (2008). "Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low-temperature rapid-prototyping technology." Int J Oral Maxillofac Surg **37**(10): 929-934.

# Thèse de Doctorat

Lisa Terranova

## Matrices tridimensionnelles pour la régénération osseuse

### Résumé

L'architecture des biomatériaux de comblement osseux à un réel impact sur l'activité cellulaire, la vascularisation et la diffusion de facteurs de croissance. Dans un premier temps, différentes membranes de polystyrène (PS) composées de fibres alignées ou aléatoires ont été étudiées. Elles sont non-biodégradables et pourraient servir de supports pour la régénération de larges défauts osseux. Nous avons montré la cytocompatibilité in vitro des membranes en analysant l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. Ensuite, des membranes de PS ont été enrichies de grains de  $\beta$ -TCP ou de nanoparticules d'or. Nous les avons implantées dans un modèle de défaut crânien de taille critique chez la souris. L'addition de  $\beta$ -TCP a stimulé la repousse osseuse grâce à la grande bioactivité des céramiques. Les membranes ont été biotolérées, les fibres ont été encapsulées dans l'os néoformé mais également dans un tissu conjonctif dense. Les nanoparticules d'or immobilisées sur des fibres ont migré dans l'os ou ont été phagocytées. Dans un second temps, différentes formulations de granules poreux de  $\beta$ -TCP ont été analysées par nanotomographie aux rayons X. L'architecture macroporeuse des granules varie inversement avec la concentration en  $\beta$ -TCP. Les faces internes montrent une grande hétérogénéité de minéralisation. Pour mimer les conditions d'utilisation en chirurgie maxillo-faciale, les granules ont été empilés dans des tubes. Nous avons montré que l'architecture des empilements de granules dépendait de leur forme. L'empilement de granules commerciaux (contenant 12,5g de  $\beta$ -TCP) mime l'architecture naturelle et les propriétés physiques de l'os.

### Mots clés

Biomatériau de comblement osseux, electrospinning, microfibres de polystyrène, porosité, biocompatibilité, cytocompatibilité, bêta-tricalcium phosphate, nanotomographie computerisée

### Abstract

The architecture of bone filling biomaterials has a real impact on cellular activity, vascularization and diffusion of growth factors. As a first step, different polystyrene (PS) scaffolds composed of aligned or random fibers were studied. They were non-biodegradable and could be used as supports for regeneration of large bone defects. We showed the in vitro cytocompatibility of the scaffolds by analyzing cell adhesion, proliferation and differentiation. Then, polystyrene scaffolds were enriched with  $\beta$ -TCP grains or gold nanoparticles. We implanted them in a model of critical size defect in mouse calvaria. Addition of  $\beta$ -TCP stimulated bone regrowth due to the high bioactivity of the ceramics. Scaffolds were biotolerated, fibers were encapsulated in the newly formed bone and also in a dense connective tissue. The gold nanoparticles immobilized on fibers migrated into the bone or were phagocytized. As a second step, different formulations of porous granules of  $\beta$ -TCP were analyzed by X-ray nanotomography. The macroporous architecture of granules varies inversely with the concentration of  $\beta$ -TCP. The internal face showed a great heterogeneity of mineralization. To mimic the conditions in maxillofacial surgery, granules were stacked in tubes. We have shown that the architecture of the granules depends on their shape. The stacks of commercial granules (containing 12.5 g of  $\beta$ -TCP) mimicked the natural architecture and physical properties of bone.

### Key Words

Bone filling materials, electrospinning, polystyrene microfibers, porosity, biocompatibility, cytocompatibility, beta-tricalcium phosphate, nanocomputed tomography.