

Caractérisation de tissu osseux et de biomatériaux pour la régénération osseuse sur gros volume.

R. CASANOVA^a, D. MOUKOKO^a, M. PITHIOUX^a, D. MARCHAT^b, P. CHABRAND^a.

a. Institut des Sciences du Mouvement - UMR 6233 CNRS/Université de la Méditerranée 163, Avenue de Luminy, Case Postale 910, 13288 Marseille Cedex 09.

b. Ecole Nationale Supérieure des Mines, CIS-B2M, 158 Cours Fauriel, 42023 Saint-Etienne.

Résumé :

L'objectif de cette étude est de développer un processus expérimental de régénération de tissus osseux de grand volume. Une première étape vise à produire du matériau osseux à partir de lambeau de périoste vascularisé et à le caractériser grâce à des essais d'indentation. Ensuite, nous développons un processus impliquant un biomatériau poreux et biodégradable utilisé comme réceptacle de cellules mésenchymateuses. Dans les deux cas, le nouveau matériau obtenu est étudié grâce à des tests mécaniques et biologiques.

Abstract :

This work aims at developing an experimental process of large volume bone regeneration. In a first time, We developed an animal model based on vascularized periosteal properties. We study osteogenesis and we characterise mechanical properties with indentation test. Next, We intend to develop a process with a biomaterial support allowing proliferation and differentiation of cultured mesenchymal cells. In the two cases, the new materials is studied with biological and mechanical tests.

Mots clefs : régénération osseuse, intégration de biomatériau, test d'indentation.

Keywords : bone regeneration; biomaterials integration, indentation test.

1 Introduction.

La régénération de gros volume d'os est cruciale en traumatologie ou après ablation de tumeur osseuse. Dans la littérature les tissus squelettiques régénérés sont couramment étudiés pour les petits volumes [1, 2, 3]. L'objectif de cette étude est de développer un processus expérimental de régénération de tissus osseux de grand volume. Les tissus squelettiques mature : os, cartilage, tendon, proviennent tous du même précurseur cellulaire : les cellules souches mésenchymateuses [4]. Moukoko *et al* [5] a développé une procédure chirurgicale de régénération de long segment d'os basé sur les propriétés de la membrane vascularisée du périoste provenant de cellules osteoprogénitrices présentes dans ces couches profondes. A partir de ces expériences, nous étudions l'ostéogenèse et nous caractérisons les propriétés mécaniques de ce matériau nouvellement formé. Des tests d'indentation [5] sont utilisés pour quantifier ses caractéristiques élastiques et pour étudier son évolution du temps. Cependant, dans le cas de traumatismes avec grande perte d'os, le périoste peut être endommagé ou manquant. Nous développons donc un procédé incluant un biomatériau permettant la prolifération et la différenciation de cellules mésenchymateuses de culture. Le choix de ce biomatériau est un facteur déterminant pour le processus chirurgical [7]. Nous avons développé des expériences cliniques pour caractériser les propriétés optimales du futur implant. La réaction des tissus hôtes est testée au contact de l'os pour deux biomatériaux : un composite (bioverre et biopolymère résorbable) et une céramique de phosphate de calcium (Tri-Calcium-Phosphate) d'une porosité de 80% (figure 1). Pour chaque matériau, deux épaisseurs de 2 et 3 mm sont comparées. Nous étudions leur intégration, leur colonisation ainsi que leur résorption. Ces expériences pourront nous renseigner si une membrane apparaît autour de l'implant et si une nouvelle vascularisation s'installe dans le biomatériau.

2 Matériel et méthodes.

2.1 Régénération a partie de périoste.

Nous développons un modèle animal basé sur le lapin New-Zealand, une espèce standard pour l'étude de l'ostéogénèse et de la chondrogenèse. La première opération clinique consiste à régénérer une partie du tibia en laissant en place la membrane de périoste vascularisé (figure 1A). Le tibia est ensuite maintenu par un fixateur externe fixé sur 4 broches. Nous permettons ainsi au lapin de déambuler dans sa cage pendant la période de récupération et nous sécurisons le lieu de la régénération osseuse. Nous opérons ainsi 15 lapins que nous sacrifions ensuite par overdose de pentobarbital après différent temps de rétablissement compris entre 45 et 160 heures. Nous récupérons ainsi du matériau osseux néoformé de différent âge pour le tester par indentation. Pour chaque lapin, 3 éprouvettes sont découpées.

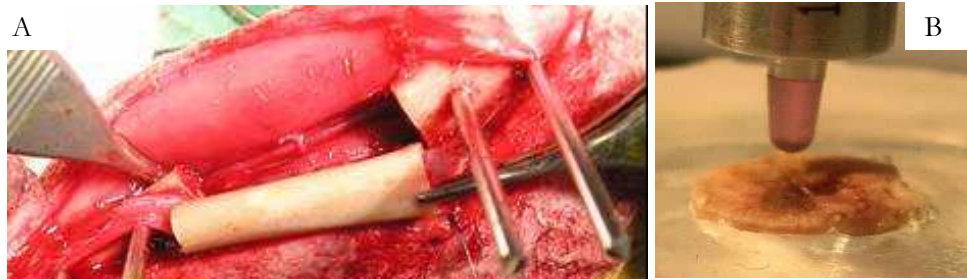


FIG. 1A–Ablation de 25mm de tibia..

FIG. 1B– Test d'indentation sur un échantillon d'os régénéré.

Les tests d'indentation permettent d'évaluer qualitativement les propriétés mécaniques du tissu régénéré (figure 1B). Nous mesurons en continu la force normale d'indentation comme une fonction de la profondeur de pénétration dans le matériau. Nous considérons un contact entre une sphère indéformable, ici en rubis, et un échantillon plan élastique. Il n'y a pas d'adhésion ou de frottement entre les deux milieux. Nous considérons les matériaux en petite déformation et dans leur limite élastique. Les dimensions de pénétration sont petites devant le rayon de courbure des matériaux. Dans ces conditions, nous calculons le module de Young réduit, donnée par la théorie de Hertz (1).

$$F_n = \frac{4}{3} \cdot E^* \cdot \sqrt{R} \cdot \delta^{\frac{3}{2}} \quad (1)$$

$$E^* = \frac{E}{1 - \nu^2} \quad (2)$$

F_n représente la force normale, R le rayon de l'indenteur et δ le profondeur de pénétration. E^* le module de Young réduit donné par (2) dans laquelle E est le module de Young et ν le coefficient de poisson. Sur chaque éprouvette, des cycles de charge-décharge sont effectués avec une force normale maximale définie entre 20 et 100 mN. Le rayon de l'indenteur est de 1mm. Le test est contrôlé en déplacement avec une vitesse constante comprise entre $20-500 \pm 1 \mu\text{m/s}$. Deux ou trois points sont testés sur chaque éprouvette par 4 cycles identiques de charge décharge de force normale maximale de 40mN et une vitesse de déplacement de $50 \mu\text{m/s}$. sur chaque échantillon, nous faisons varier pour un point d'indentation la vitesse de charge décharge et la force normale maximale. Nous effectuons également une étude histologique conventionnelle (décalcification et coloration HES) sur les tissus obtenus.

2.2 Régénération avec biomatériau.

La deuxième étape consiste à choisir un biomatériau pour une reconstruction avec perte du périoste. Le processus clinique est alors le suivant. Les lapins sont opérés deux fois : une première fois sur le membre postérieur droit et une semaine plus tard sur le gauche. La procédure chirurgicale est la même pour les deux cotés. Les deux types de biomatériaux sont placés au contact de l'os. Le biomatériau composite de 2mm est implanté sur l'os iliaque. Le biomatériau composite et la céramique TCP de 3mm sont posés sur le fémur (figure 2). La céramique TCP de 2mm est placée sur le tibia. Le périoste est localement gratté pour permettre un contact direct entre l'os et l'implant. Après 3 semaines, les lapins sont euthanasiés par overdose de pentobarbital. La patte droite récupère donc 4 semaines et la gauche 3 semaines. Les parties opérées

sont explantées pour observer et analyser les tissus osseux et les biomatériaux. Les échantillons sont préservés dans une solution formaldéhyde puis soumis à une étude histologique. Les échantillons de céramique TCP sont décalcifiés avec l'os support. Pour le composite de bioverre, la décalcification est impossible. Le biomatériau est donc extrait avant l'étude histologique conventionnelle sur les tissus hôtes environnant. Une coloration hématoxylin-Eosin-Saffron (HES) est utilisée. L'observation permet une analyse du développement des tissus et de leur organisation dans et autour du biomatériau.

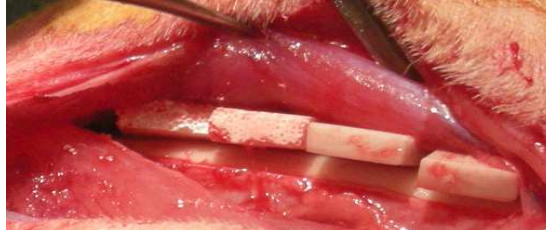


FIG. 2 – Biomatérial composite et céramique TCP de 3mm posé sur le fémur.

3 Résultats et discussion.

3.1 Résultats sur régénérat produit avec périoste.

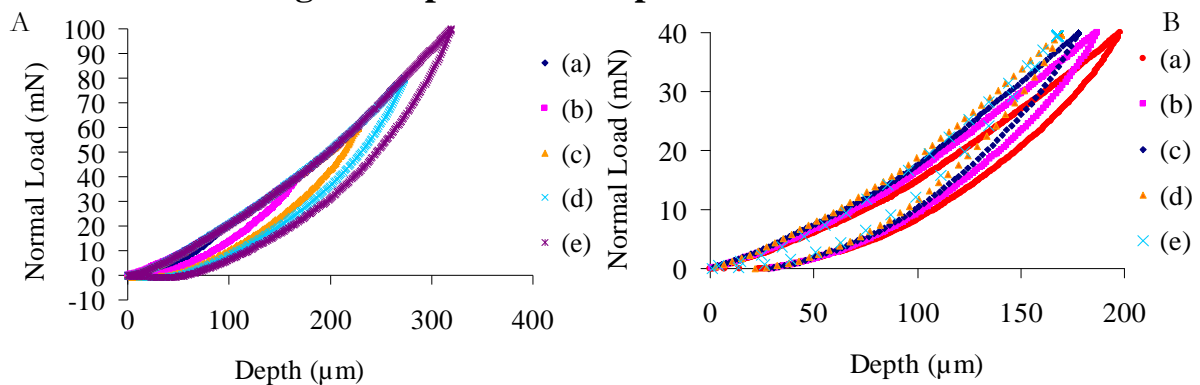


FIG. 3 – Courbe d'indentation sur régénérat de 86h pour :

A – Une force maximale de (a) 20mN, (b) 40mN, (c) 60mN, (d) 80mN, (e) 100mN et une vitesse de déplacement de 50μm/s

B: Une force maximale de 40mN et une vitesse de déplacement (a) 20μm/s, (b) 50μm/s, (c) 100μm/s, (d) 200μm/s et (e) 500μm/s.

Les courbes de charge sont indépendantes de la force normale maximale et correspondent à un comportement de matériau élastique (figure 3A). Pour un point testé sur un échantillon, les quatre cycles sont identiques : il n'y a pas d'effet plastique. Si la vitesse de déplacement affecte la réponse du matériel régénéré, son influence sur la rigidité est faible (figure 3B). La courbe montre, pendant le déchargement, différents effets de dissipation : viscosité, friction, adhérence.

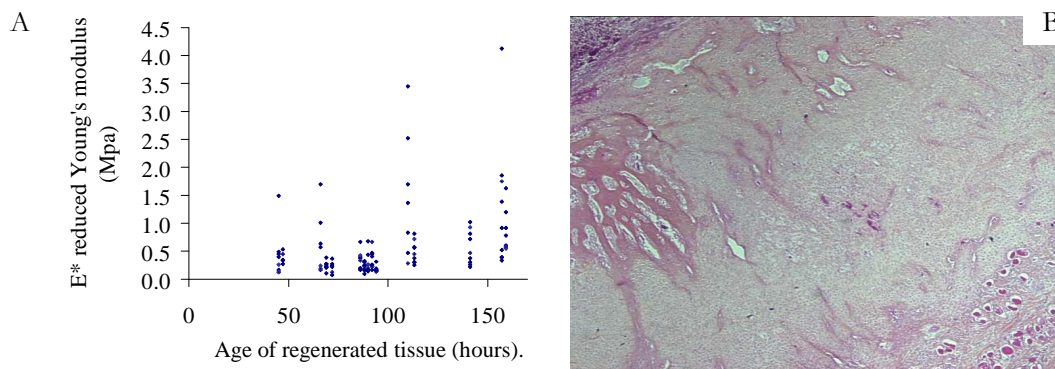


FIG. 4A– Module de Young réduit des échantillons d'os régénéré.

FIG. 4B– Histologie sur régénérat de 7 jours

La figure 4A montre l'évolution du module de Young réduit pendant les 7 premiers jours de régénération. Le tissu régénéré est un matériau en évolution avec plusieurs périodes. Les résultats montrent deux périodes. Avant 100 heures, le matériau est en plein essor volumique. Ces caractéristiques mécaniques sont constantes et homogènes avec un E^* semblable à celui du cartilage, c'est-à-dire entre 0.5 et 2.5 MPa [8]. Après 100 heures, le module de Young réduit augmente et les résultats sont disparates : l'ossification a commencé, certaines zones sont plus calcifiées que d'autres [5]. L'étude histologique du régénérat de 7 jours confirme ce résultat (figure 4B). Ce matériau est composé à 80% de cartilage et à 20% d'os [5]. Nous pourrions comparer cette évolution avec notre modèle de régénération avec biomatériau.

3.2 Résultats sur biomatériau.

Pour choisir le futur biomatériau de notre reconstruction segmentaire, regardons les résultats du second processus clinique. L'examen macroscopique du matériau composite ne démontre aucune intégration de l'implant aux tissus hôtes, muscle ou os (figure 5). Une épaisse membrane fibreuse entoure ce matériau, l'isolant des autres tissus. Il apparaît libre de cette membrane réactive et peut être facilement extrait avant l'analyse histologique. Le temps de récupération des lapins ne semble pas modifier l'apparence histologique des tissus hôtes, pas plus que ne le fait l'épaisseur des implants.

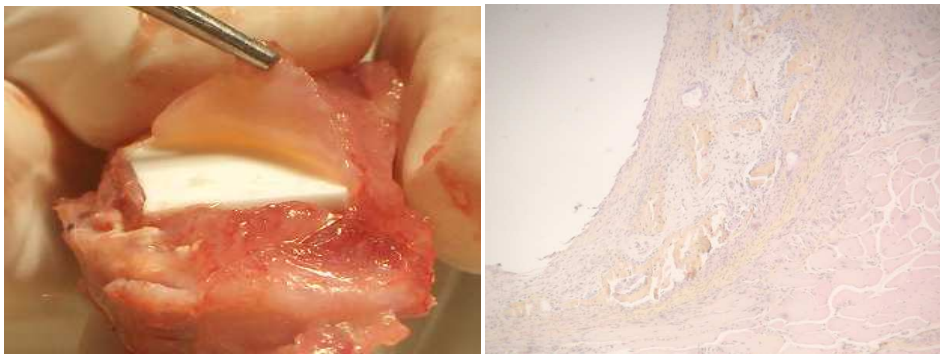


FIG. 5 – apparence macroscopique du biomatériau composite après extraction et résultat histologique sur des tissus de 4 semaines autour de ce matériau.

Pendant l'examen macroscopique de l'implant en céramique TCP, une fine membrane fibreuse est observée à l'interface implant-tissus mous (figure 6). Cependant, le biomatériau semble bien intégré aux tissus environnants duquel on ne peut le détacher. Sur les coupes histologiques, un tissu cicatriciel a envahi l'implant. Toutes les cavités sont remplies d'un tissu mésenchymateux. Du côté de l'os support, du tissu osseux est présent dans les pores et cela est plus avancé après 4 semaines de récupération qu'après 3 semaines. Du côté du muscle, les pores sont remplis par un mélange de tissus fibreux et musculaire. De plus, il apparaît une néoangiogénèse éparse. La porosité et la connectivité de TCP permettent ce développement. La taille des pores est la même après 3 ou 4 semaines. La résorption du biomatériau n'a pas commencé.

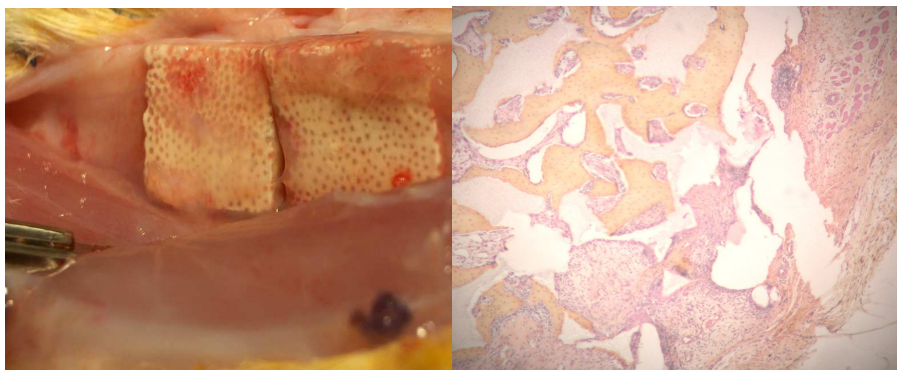


FIG. 6 – apparence macroscopique de la céramique TCP après extraction et résultat histologique de cette zone après 4 semaines de récupération du lapin.

4 Conclusion.

Une première étape de régénération osseuse basée sur les propriétés du périoste nous a permis de mieux comprendre le processus de régénération et de qualifier le matériau au cours de sa maturation. Nous avons également développé un processus de caractérisation utile pour la suite de notre recherche. La deuxième étape nous a montré que la céramique TCP s'intègre mieux que le composite de biomatériau. Elle paraît donc plus adaptée à notre problématique de reconstruction de gros volume de segment osseux. La présence d'une néoangiogenèse à travers la céramique TCP semble prometteuse pour la survie de cellules progénitrices cultivées greffées à l'intérieur d'un implant. La porosité et l'épaisseur du futur implant devront être déterminées plus précisément pour optimiser ces performances.

References

- [1] Cullinane DM., Salisbury KT., Alkhiary Y., Eisenberg S., Gerstenfeld L., Einhorn T.A., Effects of the local mechanical environment on vertebrate tissue differentiation during repair: does repair recapitulate development?”, *J experimental biology*, 206, 2459-2471, 2003.
- [2] Kelly D.J., Prendergast P.J., Mechanoregulation of stem cell differentiation and tissue regeneration in osteochondral defects, *J of biomechanics*, 38, 1413-1422, 2005.
- [3] Lobo E. G., Wren T. A. L., Beaupre G. S., Carter D. R., Mechanobiology of soft skeletal tissue differentiation—a computational approach of a fiber-reinforced poroelastic model based on homogeneous and isotropic simplifications, *Biomech Model Mechanobiol*, 2, 83–96, 2003.
- [4] Caplan A.I., The mesengenic process, *Clin Plast Surg*, 21, 429–435, 1994.
- [5] Moukoko D, Pithioux M, Chabrand P., Temporal evolution of mechanical properties of skeletal tissue regeneration in rabbits: an experimental study. *Med.Biol.Eng Comput.*, 45, 989-995, 2007.
- [6] Pailler-Mattéi C., Zahouani H., Analysis of adhesive behaviour of human skin in vivo by an indentation test , *Tribology International*, 39:12-21, 2006.
- [7] Barrere F., Mahmood T.A., de Groot K. van Blitterswijk C.A., Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions, *Materials Science and Engineering*, 59, 38–71, 2008.
- [8] Rasanen T., K. Messner, Regional variations of indentation stiffness and thickness of normal rabbit knee articular cartilage, *Journal of Biomedical Materials Research*, 31, 519-524, 1996.