

Année 2004

Thèse n° 2947

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Spécialité : Matériaux pour le vivant - Biomatériaux

Soutenue le

21 Décembre 2004

par Laure BARTOUILH de TAILLAC

CARACTERISATION ET MODIFICATION DE VISCOCELLULOSE MACROPOREUSE EN VUE DE SON UTILISATION COMME MATERIAU DE COMPLEMENT OSSEUX

Membres du Jury

Joëlle AMEDEE	Directeur de Recherche à l'INSERM	Présidente et Rapporteur du jury
Véronique MIGONNEY	Professeur à l'Université Paris-Nord	Rapporteur
Mario BARBOSA	Professeur à l'Université de Porto, Portugal	Rapporteur
Bernard DE JESO	Professeur à l'Université Bordeaux 1	Examineur
Marie-Christine DURRIEU	Chargée de Recherche à l'INSERM	Directeur
Charles BAQUEY	Directeur de Recherche à l'INSERM	Directeur
Pedro GRANJA	Assistant de Recherche à INEB, Porto, Portugal	Examineur invité

*La science a fait de nous des dieux
avant même que nous méritions d'être des hommes.*

Jean Rostand

A ma mère et à mon père

Merci pour votre soutien et votre patience

A ma sœur et à mon frère

Merci pour votre affection

A la mémoire de mes grands- parents

A toute ma famille

A tous mes amis

Merci d'avoir toujours été là pour moi

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse se sont déroulés au sein du laboratoire "Biomatériaux et Réparation tissulaire", Unité 577 INSERM, sous la Direction de Monsieur Charles Baquey et Madame Marie-Christine Durrieu.

Monsieur Charles Baquey, Directeur de Recherche à l'INSERM, m'a accueillie en m'accordant sa confiance, a dirigé mon travail de recherche, m'a apporté son aide scientifique et son soutien tout au long de ce travail. Je tiens à le remercier sincèrement pour la disponibilité dont il a fait preuve malgré son activité intense.

J'associe à ces remerciements Madame Marie-Christine Durrieu, Chargé de Recherche à l'INSERM, pour ses encouragements et ses conseils qui m'ont été très précieux tout au long de ce travail.

Je suis par ailleurs très reconnaissante envers l'Institut Français pour la Recherche Odontologique d'avoir financé une partie de ce travail. Je remercie particulièrement Monsieur Jean-Christophe Fricain, Maître de Conférence à l'Université Bordeaux 2 Praticien Hospitalier, pour avoir soutenu ce projet.

Je suis très honorée de la présence dans ce jury de Madame Joëlle Amédée, Directrice de Recherche à l'INSERM, de Madame Véronique Migonney, Professeur à l'Université Paris-Nord, et de Monsieur Mario Barbosa, Professeur à l'Université de Porto, qui ont accepté d'être respectivement présidente du jury et rapporteurs de mon travail, ainsi que Monsieur Bernard De Jeso, Professeur à l'Université Bordeaux 1, et Monsieur Pedro Granja, Assistant de Recherche à l'INstituto de Engenharia Biomédica à Porto, pour leur participation et leurs conseils. Je remercie tous les membres du jury pour l'intérêt porté à mon travail et leur exprime ma profonde gratitude.

Je tiens aussi à exprimer ma sincère reconnaissance envers Monsieur Mario Barbosa pour son accueil au sein du laboratoire INEB, et Monsieur Pedro Granja pour les fructueuses discussions que nous avons eues et les nombreux conseils qu'il m'a prodigués.

Durant ce travail, de nombreuses personnes m'ont apporté leur aide, aussi bien sur le plan technique que sur le plan humain. Je tiens donc à remercier sincèrement tous ceux qui m'ont consacré du temps en m'apportant leur soutien durant cette expérience. Je remercie plus particulièrement :

- Madame Christine Labrugère, Ingénieur à l'Institut de Chimie et de la Matière Condensée de Bordeaux, pour la réalisation des analyses XPS,
- Madame Reine Bareille, Ingénieur de Recherche à l'U.577 INSERM, pour son aide à la réalisation des tests de cytocompatibilité indirecte et d'attachement cellulaire,
- Madame Nicole Barthe, Maître de Conférence à l'Université Bordeaux 2 Praticienne Hospitalière, pour ses précieux conseils lors du radiomarquage de l'albumine à l'iode 125,
- Madame Brigitte Brouillaud, Maître de Conférence à l'Université Bordeaux 2, pour son aide à la réalisation des analyses réalisées avec le β -imager,
- Monsieur Laurent Pothuaud, Post-Doctorant à l'U.577 INSERM, pour son aide lors du calcul de la fonction de distribution de cordes,
- Monsieur René Paillet, Professeur à l'Université Bordeaux 1, pour m'avoir autorisé l'utilisation du porosimètre à mercure,
- Monsieur Bobet, Professeur à l'Université Bordeaux 1, pour m'avoir autorisé l'utilisation du granulomètre laser,
- Sébastien Laurence, pour notre collaboration et notre entente parfaite tout au long de ce travail,
- Patrick Guitton, Mac Gyver à l'U.577 INSERM, pour sa précieuse aide et sa bonne humeur...

Enfin, j'exprime un grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire de l'U.577 pour leur accueil amical et chaleureux, et sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé : Véro, Anne, Sophie, Betty, Jacqueline, Nicole, Monique, François... Un coucou amical à Fabien, Stéphane, Bertrand, Mario, Sandra et Cyril pour ces quatre années sympathiques. Bonne chance et bonne continuation...

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	7
Liste des abréviations	12
Liste des formules	14
Introduction	16
Première partie : Etude bibliographique	20
1. L'os	20
1.1. Le squelette	20
1.2. Le tissu osseux	21
1.2.1. Structure de l'os compact	21
1.2.2. Structure de l'os spongieux	21
1.3. Le remodelage osseux	22
1.4. Les mécanismes de la perte osseuse	23
1.4.1. L'ostéopénie physiologique	23
1.4.2. L'ostéoporose	24
2. Les substituts osseux	25
2.1. Cahier des charges d'un matériau de comblement osseux	25
2.2. Les greffes	29
2.2.1. Les autogreffes	29
2.2.2. Les allogreffes	29
2.2.3. Les xélogreffes	30
2.3. Les matériaux de comblement osseux	31
2.3.1. Les phosphates de calcium	32
2.3.2. Les ciments ioniques injectables	33
2.3.3. Matériaux dits "composites"	33
2.3.4. Autres matériaux de comblement osseux	33
3. La cellulose	34
3.1. Applications dans le domaine médical et orthopédique	35
3.2. Elaboration de la cellulose régénérée selon le procédé viscosé	39
3.3. Propriétés de la cellulose régénérée	40
3.3.1. Nature chimique et structurale	40
3.3.2. Propriété de perméabilité et d'hydroexpansivité.....	40
3.3.3. Propriétés mécaniques	41
3.3.4. Biocompatibilité – Biostabilité.....	43
4. Stratégies d'amélioration des propriétés de surface des matériaux de comblement osseux par traitements de surface	46

4.1. Greffage de peptides RGD sur la cellulose	47
4.1.1. Rôle de la séquence RGD.....	48
4.1.2. Greffage ou enduction de protéines ou de peptides comportant un motif RGD ..	50
4.1.3. Greffage de peptides RGD	50
4.1.4. Silanisation de la surface de matériaux	51
4.2. Principe d'élaboration d'un biomatériau cellulosique phosphaté promouvant la minéralisation	55
4.2.1. Phosphates et cellulose phosphatée.....	56
4.2.2. Phosphatation de la cellulose	56
4.2.3. Rôle de la phosphatation dans la promotion de la minéralisation.....	59
4.2.4. Rôle de la phosphatation dans l'attachement cellulaire	61
4.2.5. Rôle de la phosphatation H ₃ PO ₄ /P ₂ O ₅ /Et ₃ PO ₄ /hexanol dans la promotion de la minéralisation et dans l'attachement cellulaire	61
4.3. Stratégies d'élaboration d'un biomatériau cellulosique à base de protéines	62
4.3.1. Adsorption des protéines	63
4.3.2. Réticulation des protéines	64
4.3.2.1. Méthodes chimiques de réticulation	64
4.3.2.2. Oxydation de la cellulose par l'acide periodique HIO ₄	65
4.3.3. Réticulation par le collagène	66
4.3.3.1. Définition, structure et classification.....	67
4.3.3.2. Propriétés.....	67
4.3.3.2.1. Propriétés physiologiques.....	68
4.3.3.2.2. Biocompatibilité et adhésion cellulaire	69
4.3.3.2.3. Biodégradation.....	69
4.3.3.3. Biomatériaux à base de collagène	69
Deuxième partie : Matériels et Méthodes	72
1. Matériels	72
1.1. Elaboration des implants	72
1.2. Biofonctionnalisation de la surface de cellulose	73
1.2.1. Greffage de peptides RGD	73
1.2.2. Phosphatation, pré-incubation dans une solution de calcium et minéralisation...	73
1.2.3. Réticulation de la cellulose	73
1.3. Biocompatibilité <i>in vitro</i>	74
2. Méthodes	74
2.1. Conception de biomatériaux cellulosiques	74
2.1.1. Conception de CRV compacte	74
2.1.2. Conception de CRV macroporeuse	75
2.2. Nettoyage de la cellulose	76
2.3. Biofonctionnalisation de la surface de cellulose	77
2.3.1. Greffage de peptides RGD	77
2.3.1.1. Greffage de molécules silanes	78
2.3.1.2. Greffage de l'agent intermédiaire	78
2.3.1.3. Greffage de peptides (contenant le motif RGD) ou de ³⁵ S-Cystéine	78
2.3.2. Phosphatation et minéralisation de la cellulose.....	80
2.3.2.1. Phosphatation	80

2.3.2.2. Préparation des échantillons pour les différents traitements.....	81
2.3.2.3. Pré-incubation dans la solution de calcium	81
2.3.2.4. Minéralisation.....	82
2.3.3. Réticulation de la cellulose par les protéines	82
2.3.3.1. Oxydation de la cellulose.....	82
2.3.3.2. Réticulation par l'albumine	83
2.4. Caractérisations physico-chimiques	83
2.4.1. Etude de la porosité des matériaux.....	83
2.4.1.1. Granulométrie laser.....	83
2.4.1.2. Porosimétrie à mercure	86
2.4.1.3. Microtomographie	88
2.4.1.4. Fonctions de distribution de cordes sur un matériau poreux.....	89
2.4.2. Microscopie Electronique à Balayage pour l'étude de la topographie des matériaux	90
2.4.3. Etude de l'hydrophilie des matériaux.....	91
2.4.4. Spectroscopie électronique pour l'analyse chimique (ESCA) de la surface des matériaux	92
2.4.5. Imagerie β à haute résolution pour l'étude de la densité de peptides greffés.....	95
2.4.6. Etude de la fixation de l'albumine sur la cellulose	96
2.4.6.1. Marquage de l'albumine à l'Iode 125	96
2.4.6.2. Chromatographie par gel filtration	97
2.4.6.3. Etude de la réticulation par l'albumine.....	98
2.4.6.4. Echange de l'albumine	99
2.5. Caractérisations chimiques.....	99
2.5.1. Dosage des aldéhydes.....	99
2.5.2. Réactif de Schiff.....	101
2.5.3. Dosage des protéines	101
2.6. Etude de la Biocompatibilité <i>in vitro</i>	102
2.6.1. Isolement des cellules HBMSC.....	102
2.6.2. Cytotoxicité indirecte	103
2.6.2.1. Obtention des extraits des matériaux.....	103
2.6.2.2. Mise en présence des extraits et des solutions.....	104
2.6.2.3. Réalisation des tests.....	104
2.6.2.3.1. Test au rouge neutre	104
2.6.2.3.2. Test au MTT	105
2.6.3. Attachement cellulaire.....	106
Troisième partie : Résultats et Discussion	109
1. Caractérisation des implants celluloseux	109
1.1. Conditions d'obtention d'un biomatériau cellulosique.....	109
1.2. Caractérisation des matériaux compacts	110
1.2.1. Etude par spectroscopie de photoélectrons	110
1.2.2. Etude morphologique par MEB	111
Discussion.....	112
1.3. Caractérisation des matériaux poreux	113
1.3.1. Etude morphologique : MEB et microtomographie.....	113
1.3.2. Etude de la taille de l'agent porogène par granulométrie.....	114

1.3.3. Porosimétrie à mercure.....	116
1.3.4. Distribution de cordes	118
1.3.5. Colonisation cellulaire des matériaux macroporeux	120
Discussion.....	121
2. Modification de la cellulose	123
2.1. Greffage de peptides RGD sur la cellulose.....	124
2.1.1. Caractérisation des matériaux compacts	124
2.1.1.1. <i>Etude topographique par Microscopie Electronique à Balayage</i>	124
2.1.1.2. <i>Etude du caractère hydrophile de la surface de matériaux par mesure d'angle de contact.....</i>	125
2.1.1.3. <i>Analyse chimique par spectroscopie de photoélectrons</i>	126
2.1.1.4. <i>Etude de la densité de peptides greffés par imagerie β</i>	131
2.1.1.5. <i>Etude de la biocompatibilité in vitro</i>	131
2.1.1.5.1. Cytotoxicité et cytocompatibilité des extraits	132
2.1.1.5.2. Attachement cellulaire	133
2.1.2. Caractérisation des matériaux poreux	134
2.1.2.1. <i>Analyse chimique par spectroscopie de photoélectrons</i>	134
2.1.2.2. <i>Etude de la biocompatibilité in vitro : attachement cellulaire</i>	139
Discussion.....	140
2.2. Phosphatation de la cellulose macroporeuse.....	143
2.2.1. Etude topographique par Microscopie Electronique à Balayage	143
2.2.2. Analyse chimique par spectroscopie de photoélectrons.....	144
2.2.3. Etude de la biocompatibilité <i>in vitro</i> : cytotoxicité	147
Discussion.....	147
2.3. Réticulation de la cellulose macroporeuse par les protéines	149
2.3.1. Etude morphologique par MEB	149
2.3.2. Oxydation de la cellulose	150
2.3.2.1. <i>Dosage des aldéhydes</i>	150
2.3.2.2. <i>Réactif de Schiff</i>	151
2.3.3. Réticulation de la cellulose avec de l'albumine	152
2.3.3.1. <i>Marquage de l'albumine à l'Iode 125</i>	152
2.3.3.2. <i>Cinétique de rinçage</i>	153
2.3.3.3. <i>Fixation de l'albumine</i>	153
2.3.3.4. <i>Echange de l'albumine</i>	154
2.3.4. Analyse chimique par spectroscopie de photoélectrons.....	156
2.3.5. Etudes du comportement <i>in vitro</i> de la cellulose réticulée avec de l'albumine .	158
2.3.5.1. <i>Etude de la dégradation du matériau</i>	158
2.3.5.2. <i>Cytotoxicité</i>	159
Discussion.....	160
Conclusions générales et perspectives.	163
Liste des figures	167
Liste des tableaux	175

Annexe 1 : Dilution de SBF	177
Annexe 2 : Solution tampon de Tris HCl à pH 7.4 ± 0.1.....	178
Annexe 3 : Réactifs pour le dosage des aldéhydes.....	179
Références Bibliographiques	180
Productions scientifiques résultant de ce travail.....	187

Liste des abréviations

APTES	Aminopropyletriéthoxysilane
BCP	Phosphate biphasique
CMC	Carboxy-Méthyl-Cellulose
CRV	Cellulose Régénérée par procédé Viscose
CRV-P	Cellulose Régénérée par procédé Viscose puis phosphatée
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy
EDTA	Ethylène Diamine Tetraacétique
ESB	European Society of Biomaterials
ESCA	Spectroscopie Electronique pour l'Analyse Chimique
Gy	Gray
HA	Hydroxyapatite
IMDM	Incove's Modified Dulbecco's Medium (Milieu de Dulbecco Modifié par Iscove-GIBCO)
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MO	Masse Osseuse
MTT	Tétrazolium dye 3(4,5-diméthylthiazol 2-yl) –2,5-diphényl tétrazolium bromide
PMO	Pic de Masse Osseuse
RGD	Tripeptide (Arginine-Glycine-Acide Aspartique)
RGDC	Tétrapeptide (Arginine-glycine-Acide Aspartique-Cystéine)
RN	Rouge Neutre
SBF	Simulated Body Fluid
SMP	N-succinimidyl-3-maléimidopropionate
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TCP	Phosphate tricalcique
THS	Traitement Hormonal Substitutif
TRIS	Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane
USE	Unités Structurales Elémentaires
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy

Liste des formules

CaCl_2	Chlorure de calcium
CaCO_3	Carbonate de calcium
CO_2	Dioxyde de carbone
Et_3PO_4	Triéthylphosphate
HCl	Acide chlorydrique
HIO_4	Acide periodique
H_3PO_4	Acide phosphorique
MgCl_2	Dichlorure de magnésium
NaCl	Chlorure de sodium
P_2O_5	Pentaoxyde de phosphore

INTRODUCTION

Introduction

Les pathologies ostéo-articulaires dégénératives, les malformations et déformations vertébrales, les séquelles des traumatismes osseux, les tumeurs de l'appareil locomoteur, sans oublier le vieillissement des populations, nécessitent à des degrés variables des greffes osseuses.

A l'heure actuelle, l'autogreffe spongieuse constitue le traitement le plus logique et le mieux adapté aux pertes de substances osseuses. Cependant la pratique de telles greffes n'est pas sans inconvénient : les sites de prélèvements sont limités, leurs formes souvent inadaptées et leurs greffons de petits volumes. De plus, leurs utilisations sont souvent restreintes par les complications pouvant survenir au niveau du site donneur (douleurs opératoires, hématomes, suppurations,...).

L'intérêt porté aux substituts osseux s'est donc considérablement accru depuis quelques années. Ce phénomène est accentué par la prise de conscience des risques de contamination virale, associée à l'utilisation des allogreffes¹, et de transmission d'agents pathogènes, associée à celle des xéngreffes². Ces greffes constituent les seules alternatives, susceptibles de compléter le matériel d'autogreffe, pour le comblement de lacunes osseuses.

Il apparaît donc évident que les chirurgiens soient à la recherche d'un produit facilement disponible, d'utilisation commode, exempt de risques pathogènes pour le receveur, capable de s'intégrer au territoire osseux concerné par la lésion, et doté des propriétés mécaniques lui permettant de supporter les contraintes qui transitent par le site d'implantation.

Idéalement, les matériaux recherchés doivent être ostéoinducteurs et ostéoconducteurs, et donc capables de stimuler des phénomènes de reconstructions du tissu osseux et de guider cette reconstruction sur le site lésionnel. Ils doivent être aussi biocompatibles (toxicité, cytocompatibilité,...) et résorbables (sans générer de produits toxiques) de manière à être progressivement remplacés par le tissu osseux néoformé. Les biomatériaux doivent aussi posséder une bonne tenue biomécanique pour permettre leur utilisation sur des sites d'implantation à fortes concentrations de contraintes. A cela peuvent venir s'ajouter des

¹ Greffes réalisées entre un donneur et un receveur appartenant à la même espèce.

² Greffes pratiquées avec un tissu ou un organe provenant d'une espèce différente de celle de l'organisme receveur.

propriétés de mise en forme pratique pour la fabrication de formes géométriques complexes, et pour la possibilité de retouche extemporanée de l'implant par le chirurgien pour l'adapter au site d'implantation. Il faut aussi tenir compte des possibilités de stérilisation, de stockage et de coût acceptable. Quoiqu'il en soit, à l'heure actuelle, aucun des biomatériaux proposés ne répond parfaitement au cahier des charges d'un matériau de comblement osseux "idéal".

La cellulose pourrait représenter une solution intéressante au comblement des défauts osseux : c'est un matériau biocompatible, ostéoconducteur et dont la caractéristique d'hydroexpansivité entraîne une expansion volumique du matériau dans le défaut, permettant un comblement adapté à la cavité, mais aussi une fixation aux tissus osseux. Cependant, la pénétration du tissu osseux dans les implants macroporeux est limitée à la périphérie des matériaux qui ne possèdent pas de propriété ostéoinductrice. L'intégration du matériau pourrait être améliorée si on lui associait des facteurs biologiques aptes à réguler ses relations avec le milieu vivant.

La stratégie proposée dans ce travail de recherche, s'inscrit dans cette idée de conjuguer les connaissances nouvellement acquises en science biologique et en science des matériaux.

Idéalement, les matériaux de comblement osseux doivent servir de "charpente" à la croissance cellulaire et à la formation de la matrice extracellulaire en trois dimensions. Pour atteindre ce but, plusieurs paramètres du matériau macroporeux peuvent être ajustés. Une porosité, une taille de pores et une structure poreuse appropriées, sont des caractéristiques essentielles pour assurer la nutrition des cellules à l'intérieur de l'implant, et pour fournir dans le même temps un échafaudage approprié pour la régénération du tissu.

Afin de stimuler la biointégration de l'implant et d'augmenter son pouvoir ostéogène, différents traitements de surface ont été envisagés dans cette étude. Des implants de cellulose macroporeuse ont été biofonctionnalisés en surface par le greffage (i) de molécules bioactives, (ii) ou de phosphates de calcium, (iii) ou dans le volume par la réticulation du matériau avec des protéines.

La présence de peptides pro-adhésifs contenant la séquence Arg-Gly-Asp (dit RGD), greffés sur la surface d'un matériau de comblement osseux, pourrait lui permettre de mimer une surface biologique, ces peptides jouant un rôle de ligands pour les récepteurs présents en surface des membranes cellulaires. Ce processus de reconnaissance moléculaire pourrait favoriser l'attachement des cellules osseuses humaines à une surface greffée. L'amélioration

de l'attachement cellulaire pourra alors être exploitée pour l'élaboration de matériaux hybrides, matériaux associant une composante artificielle (le biomatériau) à une composante cellulaire (les cellules autologues).

Grâce aux propriétés de fixation du calcium de la cellulose phosphatée, le matériau pourrait être envisagée comme un biomatériau alternatif prometteur, susceptible, une fois implanté, de promouvoir une régénération adéquate des tissus.

Le but recherché lors de la réticulation de la cellulose par une protéine, et plus particulièrement par le collagène, serait d'allier les propriétés de celui-ci avec les caractéristiques hémostatiques, hydroexpansives et de dégradation apportées par la cellulose oxydée. Grâce à ses propriétés de reconnaissances cellulaires, un matériau de comblement osseux à base de collagène pourrait favoriser l'adhésion, la différenciation et la migration des cellules. Le traitement par réticulation de collagène d'un implant de cellulose macroporeuse pourrait ainsi stimuler sa biointégration et augmenter son pouvoir ostéogène en vue de promouvoir une régénération des tissus.

PREMIERE PARTIE :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Première partie : Etude bibliographique

1. L'os

Les os remplissent différentes fonctions dans le corps humain. Ils donnent au corps sa forme extérieure, soutiennent et protègent les parties molles, et renferment la moelle qui produit les cellules sanguines.

1.1. Le squelette

D'un point de vue statique, les os assurent le soutien du corps et la protection de certaines viscères ou autre. D'un point de vue dynamique, ils représentent les éléments bras de levier de transmission des forces musculaires au cours du mouvement. Le tissu osseux est constitué :

- d'eau : environ 1/4 du poids de l'os ;
- de matières organiques : environ 1/3 du poids de l'os, dont la majeure partie est représentée par une protéine, l'ossein ;
- et de sels minéraux inorganiques : le calcium, le phosphore, et le magnésium prédominent, bien que l'on trouve également du fer, du sodium, du potassium, du chlore, et du fluor en petites quantités [Grabowski, 1].

Deux méthodes fondamentales de classification servent à différencier les os du corps. Le premier système de classification est basé sur l'emplacement anatomique de l'os (axial ou appendiculaire), le second sur sa forme (long, court, plat, irrégulier, pneumatique ou sésamoïde) (Figure 1.). Les os du squelette ont des formes variables qui dépendent de leur fonction et de leur situation dans le corps [Cabrol, 2].

Les os sont composés d'une substance rigide, le tissu osseux et d'une substance molle, la moelle, rouge ou jaune, selon l'âge du sujet.

1.2. Le tissu osseux

En coupe, l'os frais présente de la surface vers la profondeur : le périoste (membrane fibreuse), l'os compact, et l'os spongieux, ou une cavité limitée par l'endoste.

1.2.1. Structure de l'os compact

L'os compact ou cortical, dur et dense, constitue la coque externe des os. L'os cortical est formé par une association dense d'unités structurales élémentaires (USE) cylindriques appelées ostéons. L'ostéon est composé de lamelles concentriques au canal de Havers [Cabrol, 2]. Ces canaux permettent le passage de vaisseaux sanguins qui vont venir irriguer l'os (Figure 2.).

1.2.2. Structure de l'os spongieux

L'os spongieux ou trabéculaire, situé dans les épiphyses des os longs, dans les os courts et les os plats, joue un rôle d'amortisseur grâce à la moelle emprisonnée dans les alvéoles. Il est friable et constitué d'unités structurales élémentaires (USE) figurant des arches ou des plaques, sortes d'ostéons déroulés à texture lamellaire qui s'accrochent les uns aux autres pour former une travée (ou trabécule osseuse). Celle-ci délimite de petites cavités et forme une structure alvéolaire. Les parois de celles-ci sont continues sur le sujet jeune mais se dégradent avec l'âge, se perforant et se réduisant à une structure filaire au stade ultime (figure 2.).

Les trabécules osseuses résistantes aux contraintes de flexion, de traction, de compression et de cisaillement, s'appuient sur l'os compact auquel elles transmettent les forces. L'os trabéculaire est anisotrope [Ashman et al., 3] : sous contraintes mécaniques il ne présente pas une unicité de comportement, quelle que soit la direction d'application de ces contraintes. Une description des propriétés d'anisotropie et d'élasticité de l'os trabéculaire a été faite par Ashman *et al.* [Ashman et al., 3].

Au niveau cellulaire, l'os trabéculaire contient différents types de cellules : ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes [Gibson et al., 4], (Figure 3.).

Les cellules ostéogènes sont des cellules non spécialisées qui proviennent du mésenchyme (figure 4.). Les ostéoblastes sont les cellules qui contribuent à la formation de l'os [Gibson and Ashby, 4] (figure 4.). Les ostéocytes sont des cellules osseuses matures qui proviennent des ostéoblastes et sont les cellules principales du tissu osseux (figure 4.). Les ostéoblastes se trouvent sur la surface de l'os mais deviennent des ostéocytes quand ils sont couverts de matrice. Ces derniers ne sécrètent plus de matrice. Alors que les ostéoblastes produisent le tissu osseux, les ostéocytes maintiennent les activités cellulaires quotidiennes de celui-ci, notamment l'échange des nutriments et des déchets avec le sang. Le rôle physiologique de ces cellules est encore mal connu [Gibson and Ashby, 4]. Les ostéoclastes sont issus de monocytes en circulation (un type de globule blanc) (figure 4.). Ils se posent sur la surface de l'os et assurent la résorption osseuse (destruction de la matrice) essentiellement dans le développement, la croissance, le maintien et la réparation de l'os [Gibson and Ashby, 4].

1.3. Le remodelage osseux

En tant que structure adaptée et adaptable, l'architecture osseuse est continuellement régénérée par formation et résorption locale d'os : c'est le remodelage osseux (figure 5.) [Cowin, 5]. Ce phénomène physiologique peut être schématisé de la façon suivante [Grabowski, 1] : les ostéoblastes apposent de l'os aux endroits réclamant plus de renfort, pendant que les ostéoclastes assurent la résorption là où l'os devient inutile dans ses fonctions mécaniques. La destruction ostéoclastique et la reconstruction ostéoblastique s'enchaînent dans le temps et l'espace à l'échelle microscopique. D'après l'hypothèse proposée par Wolff³, l'os s'adapte de lui-même aux conditions de chargement auxquelles il est soumis.

Chez un sujet en bonne santé, l'ensemble des taux de résorption et de formation reste constant, permettant la conservation de la masse osseuse. Mais le processus de remaniement

³ Lois de Wolff : l'os est un matériau adaptatif dont la structure et la géométrie se modifient en permanence en fonction des contraintes mécaniques qui lui sont appliquées.

n'est pas uniforme. Chaque année, un homme adulte renouvelle 25 % de son os trabéculaire et 4 % de son os cortical.

1.4. Les mécanismes de la perte osseuse

La perte de substance osseuse, un des problèmes majeurs de la santé publique, est un domaine en pleine évolution du fait de l'allongement de l'espérance de vie dans les pays occidentaux. Il convient cependant de distinguer l'ostéopénie, simple diminution de la masse osseuse (MO) et témoin d'une fragilité osseuse pas toujours associée à une fracture, de l'ostéoporose, maladie due à la raréfaction du volume osseux et associée à des fractures.

1.4.1. L'ostéopénie physiologique

La réduction de la masse osseuse (ostéopénie) avec l'âge est un phénomène physiologique inévitable, dont l'ampleur globale croît directement avec l'âge, ce qui fait le terrain de l'ostéoporose. Il y a là plusieurs facteurs qui interviennent depuis l'alimentation en passant par le mode de vie sans oublier les facteurs héréditaires. Le risque principal est celui des fractures.

Le profil de la perte osseuse est très différent selon le sexe : la femme ayant, après 50 ans, une perte osseuse plus importante que celle de l'homme. L'accélération du remodelage osseux est fonction de la carence en estrogènes qui accentue la raréfaction osseuse, en particulier au niveau de l'os spongieux. Le pic de masse osseuse est atteint entre 18 et 25 ans, puis la perte est nulle ou minime jusqu'à la ménopause. Après la ménopause, la carence en estrogènes induit une augmentation de la fréquence d'activation de nouvelles unités multicellulaire de remodelage, avec une résorption plus élevée que ne l'est la formation. Le bilan est donc négatif. La perte osseuse est très importante dans les années qui suivent la ménopause puis elle se ralentit. Chez les personnes âgées de plus de 70 ans, la perte osseuse est aggravée par la carence en calcium et en vitamine D. On estime que la femme perd 40 % de son capital osseux trabéculaire entre 20 et 80 ans alors que l'homme n'en perd que 27 % selon une pente régulière [Notelovitz, 6].

1.4.2. L'ostéoporose

L'ostéoporose est une diminution de la masse osseuse accompagnée de modifications de la microarchitecture entraînant une augmentation importante du risque de fractures. L'ostéoporose peut survenir chez des femmes ayant un pic de masse osseuse bas ou chez des femmes ayant après la ménopause une perte osseuse élevée.

En plus de la ménopause, du vieillissement et de l'hérédité qui sont les facteurs de risque majeurs de l'ostéoporose, il en existe beaucoup d'autres parmi lesquels l'alcoolisme, le tabagisme, un traitement long aux glucocorticoïdes, des antécédents d'hyperthyroïdie ou la sédentarité.

Le Pic de Masse Osseuse (PMO) atteint à la fin de l'adolescence est l'un des facteurs prépondérants qui va conditionner la minéralisation du squelette et, par conséquent, le risque de fracture osseuse [Kelly et al., 7]. Ce sont les facteurs génétiques qui déterminent à 80 % le PMO, les 20 % restants sont liés à des facteurs de l'environnement (alimentation, exercice physique, climat hormonal) [Kelly et al., 7]. Un exercice physique régulier est favorable au remodelage osseux : la traction sur les tendons ainsi que l'augmentation de la masse musculaire induisent des modifications positives de l'activité osseuse. De même, la vitamine D joue un rôle essentiel dans l'absorption du calcium et le maintien de l'équilibre calcique. Mais c'est l'arrêt de la sécrétion oestrogénique qui est responsable de la plus grande partie de la perte osseuse subie par une femme au cours de sa vie. Un traitement hormonal substitutif (THS) est capable d'interrompre cette perte osseuse et, par conséquent, de diminuer le risque d'ostéoporose et l'incidence des fractures.

Le dépistage des femmes à risque d'ostéoporose constitue alors la préoccupation majeure du clinicien.

2. Les substituts osseux⁴

Qu'elles proviennent des pathologies ostéo-articulaires dégénératives, des malformations et déformations vertébrales, des séquelles des traumatismes osseux, des tumeurs de l'appareil locomoteur, ou du vieillissement des populations, les pertes de substances osseuses nécessitent à des degrés variables des traitements chirurgicaux adaptés. Comme il a été évoqué précédemment, il existe plusieurs solutions chirurgicales à ces pertes de substances osseuses. Le choix du chirurgien parmi les greffes et matériaux déjà disponibles, va tenir compte de l'intérêt et des limites de chacun. Cependant il n'existe toujours pas à l'heure actuelle de matériau de comblement osseux répondant parfaitement au cahier des charges.

2.1. Cahier des charges d'un matériau de comblement osseux

Le matériau de comblement osseux idéal doit mettre en œuvre un biomatériau ayant des propriétés mécaniques proches de l'os, pouvant être à la fois sûr, efficace et disponible.

La sécurité d'un biomatériau repose sur la qualité de sa reproductibilité, sur sa biocompatibilité et sur l'absence de toxicité de ce biomatériau ainsi que ses produits de dégradation.

Actuellement, la biocompatibilité des implants est une condition indispensable à leur usage. Elle peut être définie par "la capacité d'un biomatériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique" (ESB-Chester, 1986 et 1991). Elle est caractéristique de l'endommagement que pourrait provoquer l'implant sur les tissus avoisinants [Spector et al., 8; Coleman et al., 9]. Le biomatériau ne doit pas être toxique : il est élaboré à partir de produits inertes qui n'entraînent pas de risques toxiques et qui sont bien acceptés par le receveur [Johnson et al., 10]. Si les cellules ne sont pas endommagées par le biomatériau ou par des produits libérés par la corrosion ou le frottement, le matériau est considéré comme compatible avec l'organisme. L'implant est un "corps étranger" qui ne doit

⁴ Biomatériaux destinés à réparer une perte de substance osseuse.

pas non plus être endommagé par les fluides corporels ou par les mécanismes de défense de l'organisme.

L'efficacité d'un matériau de comblement osseux repose sur ses résultats cliniques à court, moyen et long termes.

C'est pourquoi, un matériau de comblement osseux doit avoir des propriétés mécaniques proches de celles de l'os qui vont tenir compte de son lieu d'implantation. Les contraintes exercées sur les biomatériaux peuvent être statiques ou dynamiques (en fatigue, compression, flexion, extension...). De plus, la mise en place d'un implant modifie les contraintes mécaniques physiologiques appliquées au tissu osseux. En particulier, le régime des contraintes à l'interface os-implant est fortement perturbé. L'os est un matériau adaptatif dont la structure et la géométrie se modifient en permanence en fonction des contraintes mécaniques qui lui sont appliquées (lois de Wolff⁵). La modification du régime normal des contraintes appliquées au tissu osseux peut être à l'origine d'un remodelage adaptatif défavorable à la tenue de l'implant à long terme. Ces différentes interactions interviennent simultanément et déclenchent un processus de dégradation du système tissu-matériau implanté qui peut, dans certain cas, aboutir à un échec chirurgical. C'est pourquoi, ces exigences nécessitent une parfaite connaissance de la structure et de la composition du biomatériau [John, 11].

De même, il est important de tenir compte des propriétés chimiques du matériau et de sa surface qui est en contact avec les tissus environnants. En effet, des réactions se déroulent en permanence à l'interface du biomatériau et des tissus environnants [Spector et al., 8; Coleman et al., 9]. Elles ont des répercussions sur les cellules des tissus hôtes et peuvent être à l'origine de nombreuses irritations (inflammations, allergies) ou au contraire, avoir un effet stimulant pour la régénération des tissus environnants.

Idéalement, un biomatériau devrait être bioactif : il devrait y avoir une interaction entre les cellules des tissus environnants et le matériau de manière à reconstruire au contact de l'implant les tissus lésés, et à intégrer activement l'implant dans le tissu hôte. Les interactions entre l'environnement biologique tels que les tissus durs ou mous environnants l'implant, le sang et le liquide corporel peuvent provoquer à l'interface des biomatériaux de nombreuses

⁵ Lois de Wolff : l'os est un matériau adaptatif dont la structure et la géométrie se modifient en permanence en fonction des contraintes mécaniques qui lui sont appliquées.

réaction non désirées (inflammatoires, mutagènes, carcinogènes...). Elles permettent de distinguer trois sortes de matériaux :

- Les matériaux bio-inertes qui s'intègrent dans l'os sans interposition de couche fibreuse.

- Les matériaux bio-tolérés qui s'intègrent dans l'os avec interposition d'une couche tissulaire fibreuse.

- Les matériaux bio-actifs qui réagissent "positivement" à leur environnement biologique en permettant des réactions spécifiques à l'interface implant-tissu receveur. A leur contact, il apparaît un os néo-formé, avec l'établissement par des processus physico-chimiques, d'une continuité entre le matériau et la matrice osseuse.

Ces matériaux sont tous biocompatibles ; ils ne libèrent pas de substances toxiques et n'endommagent pas non plus les tissus environnants.

Les réactions qui se produisent à l'interface entre le biomatériau et les tissus environnant l'implant, se déroulent durant les premières secondes ou minutes de contact (figure 6.). Elles peuvent durer aussi sur plusieurs mois ou même sur plusieurs années et engendrer des dommages cellulaires de grande étendue comme la lyse de tissu par des contraintes mécaniques à l'interface, ou l'endommagement de cellules par des ions toxiques libérés par biocorrosion. Le matériau peut ainsi être modifié au cours du temps pendant toute la durée de l'implantation. Enfin, il est à noter que des effets à distance peuvent être provoqués par des particules détachées par des mécanismes chimiques ou tribologiques. Ces particules sont réparties dans tout l'organisme par les fluides corporels. L'implant est, au mieux toléré mais il n'est pas intégré dans le tissu hôte de l'organisme.

Cet ensemble des propriétés biologiques, mécaniques, physiques et chimiques rendent compte de la complexité du développement d'un matériau de comblement osseux. Un biomatériau "idéal" devrait être ostéoconducteur, ostéoinducteur et résorbable [Passuti et al., 12].

L'ostéoconduction est la propriété passive d'un matériau à recevoir et à guider la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur qui est au contact du matériau [Association pour l'Etude des Greffes et des substituts Osseux, 13]. Actuellement, les biomatériaux sont ostéoconducteurs, à des degrés divers, mais aucun n'est

ostéoinducteur : aucun n'a la propriété d'induire par lui même la repousse osseuse en site extra-osseux [Reddi et al., 14]. Par opposition l'ostéoformation correspond à la construction de la matrice osseuse par des cellules ostéoformatrices [Association pour l'Etude des Greffes et des substituts Osseux, 13].

De plus, l'ostéoconduction est en partie dépendante de la taille des pores et de l'interconnexion entre les pores du biomatériau. En effet, à la suite d'échecs cliniques observés avec des matériaux denses, comme les céramiques phosphocalciques, des matériaux macroporeux, bien que mécaniquement inférieurs, constituent presque exclusivement la génération actuelle des matériaux de comblement osseux [Daculsi et al., 15]. Il semblerait en effet qu'une macroporosité à pores interconnectés soit une condition indispensable à la colonisation osseuse en profondeur des biomatériaux massifs. De plus, la biodégradation ou le remodelage de l'implant à base de phosphate de calcium est conditionné par leur microporosité, paramètre contrôlant la diffusion des fluides biologiques et donc l'efficacité des phénomènes de dissolution et de redéposition [Daculsi et al., 16]. Cette architecture imite l'organisation de l'os trabéculaire caractérisée par une macroporosité interconnectée naturelle pouvant représenter jusqu'à 50 % du volume osseux total. Le problème mécanique se heurte à ce que la porosité est nécessaire à l'ostéoconduction, mais qu'elle fragilise le matériau [de Groot et al., 17].

Parallèlement à la formation d'un os néo-formé, ce biomatériau idéal devrait être capable de se dégrader *in vivo*. Sa résorption est liée non seulement à des processus physico-chimiques qui provoquent la solubilité de ses constituants, mais aussi à des processus cellulaires qui vont dégrader le matériau. Ces paramètres sont tous reliés à des facteurs biologiques (cellules et milieu environnant), et à des facteurs chimiques et physico-chimiques des biomatériaux.

Enfin, la disponibilité d'un matériau de comblement osseux suppose qu'il puisse être fabriqué en quantité suffisante pour répondre à toutes les demandes, qu'il puisse se conserver suffisamment longtemps sans dégradation significative de ses propriétés essentielles et que ses conditions de conservation soient les plus simples, à la portée de tout service de chirurgie osseuse. Il faut aussi tenir compte des possibilités de stérilisation et son coût doit rester acceptable. A cela peuvent venir s'ajouter des propriétés de mise en forme pratique (bonne usinabilité) pour la fabrication de formes géométriques complexes et de retouche extemporanée de l'implant par le chirurgien pour l'adapter au site d'implantation.

2.2. Les greffes

La chirurgie a eu recours à des éléments de substitution, soit de nature biologique autologues, homologues ou hétérologues, soit de nature synthétique.

2.2.1. Les autogreffes⁶

Le comblement osseux par l'autogreffe présente des avantages biologiques indiscutables : parfaitement compatible et intégré, sans risque de rejet, l'autogreffe est un matériau de comblement osseux vivant, et potentiellement ostéogène. Le pool cellulaire qui résiste à la transplantation (moins de 10 % des cellules osseuses greffées) apporté par l'autogreffe spongieuse, contribue au processus d'ostéogénèse au niveau du site de comblement. Toutefois, l'autogreffe présente des inconvénients non négligeables : elle ne permet pas le comblement de grandes pertes de substances osseuses, et son prélèvement chez l'Homme est source de nombreuses complications post-opératoires au niveau du site comblé (infection, douleurs récurrentes, hernies, fractures secondaires...), mais aussi au niveau du site donneur.

2.2.2. Les allogreffes⁷

L'utilisation des allogreffes est répandue en chirurgie ostéo-articulaire humaine. Ces greffes homologues sont essentiellement utilisées sous forme d'os de banque⁸.

L'os de banque provient le plus souvent des *res nullius*. Il peut aussi être récolté sur cadavre dans des conditions d'asepsie très rigoureuses. Dans ce cas comme dans l'autre, cela impose une sélection drastique des donneurs et de nombreux examens complémentaires visant

⁶ Terme employé lorsque le donneur et le receveur sont le même individu.

⁷ Greffes réalisées entre un donneur et un receveur appartenant à la même espèce.

⁸ Greffons prélevés sur des sujets vivants lors d'intervention chirurgicale ou sur des sujets moins de douze heures après le décès.

à prévenir toute contamination du receveur par un agent pathogène bactérien ou viral ou non conventionnel. Cet os est ensuite exposé à divers traitements. Il s'agit d'abord d'atténuer ou d'abolir le caractère immunogène du greffon sous peine d'encourir une réaction de rejet. Les techniques les plus courantes sont la lyophilisation et / ou la congélation à basse température. L'os de banque est ensuite stérilisé, en général par irradiation. Ces traitements reçus par les os de banque détruisent les cellules, dénaturent une fraction non négligeable de leurs protéines et altèrent leurs propriétés biologiques.

Aucun traitement ne peut garantir une absence totale à caractère immunogène, et permettre en même temps la préservation de la structure de osseuse. On peut donc toujours craindre une réaction à médiation immune de la part des tissus du receveur. La transmission d'agent infectieux par les os de banque est un problème majeur [Nemzek et al., 18]. Compte tenu de la sélection des patients et des examens de laboratoire préalables, le risque était jusqu'à présent considéré comme faible et concernait uniquement certains virus. L'émergence, avec l'encéphalopathie spongiforme bovine et la maladie de Creutzfeld-Jacob, de nouveaux agents infectieux "non conventionnels" remet en question l'innocuité des os de banque.

L'os de banque est une allogreffe totalement dévitalisée. Son intégration est incertaine et tardive. Il est disponible en quantité et peut permettre de remplir de grandes pertes de substances osseuses avec une tenue mécanique satisfaisante lorsqu'il est associé à une technique d'ostéosynthèse interne.

2.2.3. Les xéno greffes⁹

Les xéno greffes osseuses, souvent utilisées par le passé, sont passées au second plan depuis la fin des années 70 puisqu'on leur préfère les allogreffe. L'os d'origine bovine a été débarrassé de sa moelle osseuse. Selon les différents traitements subis par ces substituts osseux d'origine animale, on peut les classer en fonction de la conservation ou non de la matrice protéinique, en particulier du collagène de type I. Seuls les produits conservant leur matrice protéinique ou le collagène de type I, sont considérés comme des produits de comblement osseux d'origine animale. Les autres sont assimilés à de l'hydroxyapatite

⁹ Greffes pratiquées avec un tissu ou un organe provenant d'une espèce différente de celle de l'organisme receveur.

biologique (HA) (voir *la première partie Etude Bibliographique : 2.3.1. Les phosphates de calcium*). D'une manière générale, les substituts d'origine bovine subissent plusieurs étapes de traitement : élimination des débris cellulaires, déprotéinisation plus ou moins complète et spécifique, délipidation, traitement d'inactivation virale et contre les prions, enfin stérilisation finale par irradiation.

Les os d'origine bovine ont beaucoup été employés sous forme d'os pyrolysé, avant d'être progressivement abandonnés sous cette présentation. En effet, si la pyrolyse permet d'éliminer le potentiel immunogène de la xéno greffe, elle la rend tellement fragile qu'elle devient très difficile à manipuler et incompétente sur le plan mécanique. Ce traitement thermique dévitalise la xéno greffe et dénature les protéines qui la constituent.

Depuis, on a objectivé la transmission d'infections virales et en particulier des rétrovirus, par le biais des greffes d'os [Nemzek et al., 18]. Eu égard le risque d'infection par le virus HIV, la sélection drastique des donneurs et la multiplication des tests de laboratoire ne permettent pas de garantir l'innocuité absolue des allogreffes humaines. D'où un regain d'intérêt pour les produits de comblement d'origine bovine qui, par le biais de traitements particuliers (déprotéinisation), peuvent conserver des qualités mécaniques intéressantes pour le comblement des pertes de substance osseuse. On les trouve sur le marché sous les noms déposés de SurgiboneND, LaddecND, OxboneND [Mainard et al., 19].

2.3. Les matériaux de comblement osseux

Le comblement des défauts osseux, quel qu'en soit l'origine, peut également faire appel à des produits de comblement non osseux, non apparentés aux greffes mais qui répondent en partie au cahier des charges d'un biomatériau (voir *la première partie Etude Bibliographique : 2.1. Cahier des charges d'un matériau de comblement osseux*).

Un large éventail de matériaux de comblement osseux de nature minérale (de synthèse ou dérivés) a fait l'objet de nombreux travaux d'études [Mainard et al., 19].

Tous les substituts minéraux de l'os sont à base de sels de calcium : ce sont soit des bioverres, des squelettes coralliens traités industriellement, des céramiques ou des ciments. Actuellement, les céramiques destinées au comblement osseux sont biphasiques et associent en général de l'hydroxyapatite (HA majoritaire) et un phosphate tricalcique (TCP) (figure 7.)

[Mainard et al., 19]. La principale caractéristique biologique de ces comblements est d'être ostéoconducteurs (voir *la première partie Etude Bibliographique : 2.1. Cahier des charges d'un matériau de comblement osseux*). Ces matériaux sont capables d'être liés au tissu osseux sans interposition de tissu fibreux. Toutefois, la nature de l'interaction biomatériau / tissu osseux n'est pas encore parfaitement connue.

2.3.1. Les phosphates de calcium

Les céramiques de phosphates de calcium sont des matériaux fabriqués à partir de la compaction d'une poudre sous un effet de pression, associée à un processus thermique à haute température (1100 à 1300 °C), le frittage. Les céramiques sont des matériaux minéraux non organiques. Leur macroporosité résulte du mélange de la poudre de phosphate de calcium avec des agents porogènes qui seront éliminés après frittage par sublimation. On peut donc réaliser des matériaux à partir de particules calibrées, en contrôler la densité et la porosité.

On distingue principalement les phosphates tricalciques (TCP) dont le β TCP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, l'hydroxyapatite (HA) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ et les céramiques biphasées (BCP), mélanges en proportion variable de HA et de β TCP.

Les HA peuvent être différenciées en fonction de leur origine synthétique ou biologique. Les HA biologiques sont obtenues à partir de l'os des bovidés ou à partir du corail.

La solubilité des céramiques de phosphates de calcium est inversement proportionnelle au rapport Ca/P. À porosité égale, le β TCP (Ca/P = 1,5) est plus rapidement biodégradé que l'HA (Ca/P = 1,67).

Le grand avantage retiré de l'association de l'HA avec le β TCP est un équilibre entre la biodégradation et les propriétés bioactives du matériau.

La taille des pores de la céramique conditionne sa colonisation par des cellules osseuses. On distingue ainsi les micropores (< 10 μm) propices à la diffusion des ions et des liquides nourriciers, des macropores (100-600 μm) propices à la colonisation cellulaire osseuse.

Ces céramiques sont parfaitement biocompatibles et ostéoconductrices, en revanche leurs qualités mécaniques peuvent varier considérablement [Mainard et al., 19].

2.3.2. Les ciments ioniques injectables

Les ciments phosphocalciques représentent des solutions alternatives pour le comblement de pertes de substance osseuse [Lacout et al., 20].

Ces matériaux peuvent être injectés directement dans le défaut osseux afin de le combler. Le durcissement de la pâte injectée est obtenu par hydrolyse ou par cristallisation d'un sel acide et d'un sel basique. Les propriétés mécaniques de ces ciments sont fortement dépendantes de la stœchiométrie de la réaction et en particulier de la non-dilution de la pâte dans le site opératoire [Lacout et al., 20]. L'intérêt d'employer des ciments tient à leur plasticité temporaire, qui permet de les modeler pour les adapter à la forme de la perte de substance osseuse. Des études sont conduites actuellement dans le but de renforcer les qualités mécaniques des ciments hydrauliques [Lacout et al., 20].

2.3.3. Matériaux dits "composites"

Ces produits associent un biomatériau avec un tissu naturel ou du collagène, en général d'origine bovine, dans le but de reconstituer la structure même de l'os [Sharrock, 21].

2.3.4. Autres matériaux de comblement osseux

Le plâtre de Paris (sulfate de calcium di-hydraté) est le matériau de comblement osseux le plus ancien, puisqu'il est utilisé dès 1862 dans des comblements de perte de substance osseuse. Toutefois, sa résorption est trop rapide par rapport à la repousse osseuse et ses propriétés mécaniques en contrainte sont médiocres. Actuellement, un regain d'intérêt existe pour ce matériau, dont la commercialisation pourrait à nouveau être envisagée.

Les squelettes coralliens sont composés essentiellement de carbonates de calcium (> 97 %) à l'état cristallin sous forme d'aragonite, et d'un nombre réduit d'acides aminés.

L'architecture et la porosité du matériau, qui dépendent de l'espèce de corail considéré, sont propices à la colonisation par le tissu osseux. Quant à la biocompatibilité et à l'intégration en site osseux, elles sont bonnes pour tous les types de coraux [Doherty et al., 22]. Le corail a été utilisé en clinique dès 1979 en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale.

Les matériaux minéraux n'ont pas de potentiel ostéoinducteur (voir *la première partie Etude Bibliographique : 2.1. Cahier des charges d'un matériau de comblement osseux*). C'est une propriété importante dans le comblement osseux.

3. La cellulose

La situation socio-économique dans le monde moderne a suscité l'intérêt de l'utilisation de polymères naturels. Grâce à leur biodégradabilité et à leur faible toxicité, ils pourraient répondre aux problèmes environnementaux de plus en plus présents. Ce sont des ressources renouvelables, abondantes et de faibles coûts, et l'intérêt qui leur est porté tient aussi à la polyvalence de leur structure chimique. Les connaissances relatives à la chimie de ces polymères pourraient permettre le développement de matériaux fonctionnels avancés répondant à de nombreuses exigences et besoins.

L'utilisation de polymères naturels, ou biopolymères, comme matériau structural n'est pas récente. La nature elle-même les a souvent utilisés comme par exemple, la chitine dans l'exosquelette de plusieurs mollusques [Yokogawa et al., 23], le collagène comme support mécanique dans les tissus conjonctifs et la soie dans les toiles d'araignée [Jin et al., 24].

Quant à la cellulose, polymère naturel le plus abondant sur terre, elle peut être produite aussi bien par les plantes que par les micro-organismes, elle est renouvelable et biodégradable par dégradation enzymatique ou microbienne (figure 8.) [Atkins, 25]. Plusieurs procédés d'extraction et d'élaboration ou de transformation permettent d'en faire des matériaux ou des dérivés aux applications variées [Ikada, 26; Miyamoto et al., 27]. Ce polysaccharide apparaît dans un nombre si important d'objets de notre vie quotidienne, qu'il serait difficile aujourd'hui de se passer d'elle : c'est une source de coton pour les textiles, et de bois pour les constructions et le papier. En 1838, Anselme Payen isole une substance qu'on appellera plus tard, cellulose. Mais deux découvertes majeures marquèrent un changement important dans le

monde moderne : le coton-poudre (nitrocellulose) en 1845 par Christian F. Schönbein, et la celluloid[®] (premier plastique utile) en 1869 par John W. Hyatt [Hon, 28; Reveley, 29].

3.1. Applications dans le domaine médical et orthopédique

Pendant des décennies, la cellulose et ses dérivés (esters, éthers, copolymères greffés...) ont été utilisés intensivement dans le secteur biomédical (tableau 1.). La biocompatibilité de la plupart des matériaux cellulosiques a été établie [Ikada, 26; Miyamoto et al., 27]. Isaka [Ikada, 26] a décrit notamment la cellulose comme un polymère induisant une adsorption protéinique et une adhésion cellulaire (particulièrement les cellules du sang) relativement peu élevées, ayant une réponse immune faible (faible phagocytose par les macrophages et faible relargage d'interleukine-1), et induisant une haute activation du système du complément. Elle est difficilement biodégradable dans le corps et n'est pas digestible, mais elle peut être hydrolysable par transformation structurale [Miyamoto et al., 27].

En pharmacie, la cellulose et ses dérivés trouvent des applications relativement variées (tableau 1.) [Ikada, 26; Reveley, 29; Franz, 30; Dumitriu et al., 31].

Dans le secteur médical, la cellulose régénérée selon le procédé viscoscose (CRV), peut être transformée sous forme de fibre (Rayonne[®]), de film (Cellophane[®]) [Mandolfo et al., 32; Ishihara et al., 33], ou sous forme massique (Biomatériau Bordelais) [Pommier et al., 34; Pommier et al., 35]. Un grand nombre d'applications de la cellulose et de ses dérivés tirent avantage de ses propriétés anti-thrombogènes (membrane de dialyse) [Ikada, 26; Ishihara and Nakabayashi, 33] et anticoagulantes, et d'autres de ses propriétés hémostatiques (pansements) [Matthew et al., 36; Skoog, 37]. La cellulose peut aussi être utilisée en tant que support pour l'immobilisation de substances biologiquement actives comme les anticorps et les enzymes [Franz, 30].

Les membranes de purification du sang utilisant la cellulose sous forme de pellicules minces, trouvent une application directe en hémodialyse où elles constituent un échangeur d'ions, compte tenu de leur perméabilité [Ishihara and Nakabayashi, 33]. Les membranes d'hémodialyse ou de fibres creuses constituent l'une des applications majeures de la cellulose

dans le domaine biomédical [Ikada, 26]. Les membranes surtout utilisées sous forme de cellulose régénérée (cellophane[®], cuprophane[®]), sont des films hydrophiles qui absorbent l'eau et permettent la diffusion de soluté à travers les régions amorphes du matériau [Ikada, 26; Mandolfo et al., 32; Ishihara and Nakabayashi, 33]. Ses principaux avantages sont d'avoir : une bonne hémocompatibilité ; une faible capacité d'adhésion cellulaire et protéique ; un faible pouvoir inducteur de la réponse immunitaire ; un haut pouvoir de pénétration d'eau ; une grande résistance des films cristallins minces ; un pouvoir de transport effectif de solutés de petites tailles (ions phosphate) ; et ceci pour un faible coût [Ikada, 26; Mandolfo et al., 32; Ishihara and Nakabayashi, 33]. Cependant la cellulose régénérée présentent quelques inconvénients comme : l'activation du système du complément induisant une leucopénie¹⁰ éphémère [Ikada, 26; Mandolfo et al., 32; Ishihara and Nakabayashi, 33]. L'acétate, le diacétate et le triacétate de cellulose sont aussi utilisés mais de façon mineure. Beaucoup de dérivés alternatifs de cellulose ont été proposés pour améliorer l'hémocompatibilité des membranes de dialyse. Ishihara *et al.* [Ishihara et al., 38] ont incorporé à la surface de la cellulose régénérée, un polymère ayant un groupe polaire phospholipidique, le 2-méthylacryloéthylphosphorylcholine (MPC). Cette approche améliore l'hémocompatibilité du matériau tout en diminuant l'activation du complément, et sans affecter pour autant les propriétés mécaniques et la perméabilité de la cellulose originale. Par ailleurs, Ikada [Ikada, 26] rapporte que le greffage de poly(éthylèneglycol) (PEG) à la surface du matériau, évite l'activation du complément.

La cellulose régénérée oxydée est utilisée comme pansement absorbable sous le nom commercial de Surgicel[®] (Johnson & Johnson) : c'est une gaze qui devient gélatineuse au contact du sang et qui adhère aux tissus avoisinants [Franz, 30; Matthew et al., 36; Skoog, 37]. Sa structure en forme de tamis à mailles serrées permet de concentrer les facteurs de coagulation, et l'action coagulante est augmentée grâce au pH acide du matériau, lui garantissant en outre une action bactéricide. Une fois implanté, cet agent hémostatique présente des propriétés anti-bactériennes [Matthew et al., 36] et se dégrade quel que soit le type de procédures chirurgicales employées [Skoog, 37].

¹⁰ Déficience en globules blancs.

L'utilisation de la cellulose comme matériau support a permis d'immobiliser un grand nombre de composés comme les protéines, les anticorps, les antibiotiques et les enzymes [Franz, 30; Dumitriu and Dumitriu, 31; Lagoa et al., 39; Simionescu et al., 40]. Les dérivés de cellulose sont particulièrement employés dans la conception de médicaments administrés par voie orale (traitement anti-toux, diététique, laxatif...) ou par voie locale (pommade, crème...) [Franz, 30; Oth et al., 41].

Des éponges de cellulose régénérée par procédé viscosc (CRV) ont aussi été proposées comme matrice tissulaire implantable pour la régénération de tissu osseux [Martson et al., 42] et du tissu conjonctif [Martson et al., 43; Pajulo et al., 44]. Mais ce matériau se dégrade de façon très lente [Martson et al., 43]. Quant aux composites à base de cellulose et de phosphates de calcium, ils ont été utilisés en tant que matériaux de comblement osseux injectable [Dupraz et al., 45]. Les dérivés de cellulose comme l'hydroxypropylméthyl cellulose (HPMC) ou la carboxyméthyl cellulose (CMC) sont utilisés comme milieu dispersant. Afin de mieux contrôler la rhéologie du ciment de phosphate de calcium et en faciliter la manipulation, les particules de céramiques sont mises en suspension dans ce milieu visqueux. La biocompatibilité et la biodégradation *in vivo* de ces matériaux ont été démontrées et les résultats préliminaires laissent présager des propriétés ostéoconductrices importantes, avec une recolonisation de l'implant par les cellules, une croissance osseuse allant de la périphérie au centre du matériau après dix semaines d'implantation et une résorption des plus petites granules de BCP (voir *la première partie Etude bibliographique : 2.3.1.1. les phosphates de calcium*).

De récents travaux [Poustis et al., 46] ont montré que la cellulose régénérée par procédé viscosc (CRV), utilisée dans cette étude, pouvait trouver des applications en chirurgie orthopédique sous forme de joint de scellement de prothèses de hanche et d'obturateur diaphysaire : ils ont tous les deux fait l'objet d'une étude de faisabilité concluante, mais seul ce dernier a été validé cliniquement [Pommier et al., 34; Pommier et al., 35].

Lors de la pose d'une prothèse de hanche, le composé fémoral et la cupule cotyloïdienne sont généralement scellés à l'os à l'aide d'un ciment acrylique. L'intérêt majeur de l'utilisation de cellulose comme joint de scellement de prothèses de hanche, réside dans ses

propriétés d'hydro-expansivité. En effet, son avidité pour l'eau lui donne la capacité de gonfler en milieu aqueux, en particulier au sein des tissus, et d'occuper au mieux le site d'implantation. Dès lors que les échantillons ne disposent pas de l'espace disponible nécessaire par l'expansion volumique, l'absorption d'eau est beaucoup plus limitée et le déséquilibre du système est à l'origine de forces de pression normales à l'interface. Les forces de pression générées vont alors s'appliquer au niveau de la paroi de l'os cortical fémoral, et au niveau de la queue de la prothèse de hanche [Pommier et al., 34].

L'obturateur diaphysaire intervient lors du scellement de prothèse fémorale de hanche avec du ciment acrylique (figure 9.). Sa fonction est limitée, mais elle est essentielle lors de la phase d'introduction sous pression du ciment polymérisable, qui doit assurer le blocage *in situ* de la queue de la prothèse. Avant la mise en place de la prothèse, l'obturateur est introduit dans le canal diaphysaire fémoral, de manière à faire obstacle à la diffusion du ciment et à le contenir durant sa polymérisation dans le tiers fémoral supérieur. L'expansion volumique de la cellulose va améliorer le contact entre l'obturateur et la paroi de l'os cortical fémoral, et permettre ainsi d'assurer une étanchéité parfaite entre le compartiment contenant la queue de la prothèse, le ciment et le compartiment sous-jacent.

Grâce à ses propriétés, la CRV pourrait être un matériau de choix dans le comblement de défaut osseux : elle est ostéoconductrice, biocompatible, biostable et hydroexpansive [Poustis et al., 46; Barbié et al., 47]. Lors de son expansion volumique, les forces appliquées en tous points de l'os périphérique vont améliorer le contact entre le substitut cellulosique et l'os périphérique [Poustis et al., 46; Barbié et al., 47] permettant à la fois un comblement adapté à la cavité, mais aussi une fixation aux tissus osseux.

Connaissant l'enjeu économique que représente le marché des biomatériaux, l'orientation vers un nouveau type d'implants à la fois biocompatibles et bioactifs est de plus en plus privilégiée. Dans le domaine orthopédique, on peut envisager la conception de matériaux de comblement osseux qui, en plus d'assurer leur rôle mécanique d'implant, seraient capables de promouvoir et/ou d'accélérer la régénération osseuse.

3.2. Elaboration de la cellulose régénérée selon le procédé viscosé

A l'état naturel, les macromolécules de cellulose se trouvent au sein des tissus végétaux, mais plus ou moins enchevêtrées avec d'autres macromolécules, en particulier la lignine. Il est donc important de pouvoir séparer correctement la cellulose de ces autres molécules. C'est pourquoi, on va procéder à une régénération de la cellulose selon le procédé viscosé (CRV).

Le terme de régénération traduit le fait que pour obtenir de la cellulose purifiée à partir de cellulose naturelle (bois), il est nécessaire de passer par une étape de transformation en un dérivé cellulosique (le xanthate). L'intérêt de cette étape est d'isoler la cellulose des autres constituants du bois (lignine, hémicellulose, ...).

L'élaboration de la cellulose régénérée selon le procédé viscosé [Pommier et al., 34] est effectuée à partir de pâte cellulosique et comprend plusieurs étapes :

- Préparation de la pâte cellulosique. Cette pâte provient du traitement chimique et mécanique de tissus végétaux, destinés à isoler les fibres de cellulose.
- Obtention de l'alcali cellulose. La suspension de fibres est mélangée à une solution de soude fortement concentrée pour éliminer certaines impuretés et former l'alcali cellulose.
- Xanthogénération. L'alcali cellulose est déchiquetée et mûrie pour atteindre le degré de polymérisation souhaité, puis traitée par le sulfure de carbone afin d'obtenir le xanthate de cellulose. Le dérivé obtenu est complètement solubilisé dans les solutions de soude et les parties insolubles sont éliminées. L'opération de régénération peut alors débuter.
- Régénération. Elle consiste à décomposer le xanthate par un acide. Durant la réaction, le thiocarbonate de sodium formé et d'autres composés soufrés donnent une couleur jaune orangée à la pâte, appelée pâte viscosé.
- Purification. La plus grande partie de ces composés est éliminée au cours d'opérations conduites selon un protocole original et au cours desquelles la cellulose régénérée coagule, formant une masse solide qui doit être abondamment lavée.

3.3. Propriétés de la cellulose régénérée

3.3.1. Nature chimique et structurale

Le biomatériau cellulosique est un polymère de masse molaire élevée, de formule brute $(C_6H_{10}O_5)_n$. La cellulose est constituée d'enchaînements macromoléculaires dont le motif répétitif est la molécule de glucose sous forme de D-glucopyranose. Les molécules de glucose sont reliées entre elles par des ponts osidiques de type β (1-4) (figure 8.).

Hydrogel physique et chimique [Bordi et al., 48], la cellulose est un polymère tridimensionnel hydrophile capable d'absorber et de créer des liaisons polaires avec les molécules d'eau par ses fonctions hydroxyle [Dumitriu and Dumitriu, 31; Drury et al., 49].

Ce matériau très réticulé est semi-cristallin : il se caractérise par une certaine proportion de cristallites au sein d'une masse amorphe. Sa stabilité est assurée par des liaisons hydrogènes inter- et intra-moléculaires.

La réticulation de ce matériau n'a pas permis d'évaluer par calorimétrie différentielle sa température de transition vitreuse, mais les résultats observés ont pu mettre en évidence une désorption d'eau qui a lieu dans le matériau au voisinage de 30-60 °C.

Une analyse faite par porosimétrie au mercure a montré que la cellulose présentait une "porosité naturelle" : les pores répartis de façon homogène sur le matériau, ont un diamètre moyen de 100 Å [Barbié et al., 47].

3.3.2. Propriété de perméabilité et d'hydroexpansivité

De par sa nature, la cellulose est un hydrogel très perméable à l'eau, aux gaz, aux ions et aux molécules. En présence d'un environnement aqueux, la CRV est capable d'absorber une grande quantité de liquide. Cette absorption s'accompagne d'une augmentation de volume qui peut atteindre jusqu'à 60 %. Des études ont été menées sur l'expansion volumique de la cellulose par immersion dans des solutions d'albumine et du soluté physiologique à 37 °C [Brie, 92]. Les résultats ont montré que quel que soit le milieu biologique présent, le matériau cellulosique a conservé son important caractère hygroscopique. La présence d'une

macromolécule telle que l'albumine, n'a pas modifié ce comportement : elle est capable de diffuser librement à l'intérieur de la masse cellulosique.

Cependant, suivant le taux d'hydroexpansivité que va manifester le matériau, ses propriétés mécaniques vont varier. Parallèlement à l'hydratation du matériau suite à son immersion dans l'eau, on assiste à une altération de ses propriétés mécaniques : ces dégradations sont d'autant plus importantes que la quantité d'eau absorbée est grande. Ainsi la cohésion mesurée par la force nécessaire à l'arrachage d'une vis (norme NF B 51-260), diminue de 45 % pour une prise en eau de 10 % (w/w) [Poustis et al., 46]. L'absorption d'eau est par contre beaucoup plus limitée dès lors que les échantillons ne disposent pas de l'espace disponible nécessité par l'expansion volumique voisine. Le déséquilibre du système est alors à l'origine de forces de pression normales à l'interface, forces dont on va pouvoir tirer profit pour des applications en orthopédie.

3.3.3. Propriétés mécaniques

Pour déterminer les propriétés mécaniques caractérisant la biocellulose, de nombreuses études ont été menées [Poustis et al., 46]:

- sur ses caractéristiques mécaniques statiques,
- sur le fluage,
- sur ses caractéristiques biomécaniques (le vieillissement *in vitro* et *in vivo*, et la fatigue biomécanique),
- sur sa résistance au frottement,
- sur sa résistance à la radiostérilisation.

a) Caractéristiques mécaniques statiques

Les conditions opératoires retenues au cours de l'élaboration de la CRV déterminent son degré d'hydratation résiduelle, sa masse volumique, mais également son taux de cristallinité. Il est important de noter que ce taux conditionne le comportement mécanique du matériau en statique et sous contrainte, mais aussi ses propriétés biologiques [Miyamoto et al., 27].

Dans le tableau 2., sont rapportées les différentes valeurs qui caractérisent l'os cortical, un ciment acrylique et un certain type de CRV avec 0 % d'expansion volumique. On peut constater la relative proximité des modules d'élasticité respectifs de la CRV et de l'os cortical, ce paramètre étant trois fois plus grand que pour celui d'un ciment acrylique standard [Poustis et al., 46].

b) Fluage du matériau

Le comportement visco-élastique du matériau a été évalué à partir d'essai de fluage¹¹ en compression sur des éprouvettes cylindriques après une expansion diamétrale de 2 %. Après une phase de déformation instantanée consécutive à la mise en charge, le matériau se déforme rapidement et se stabilise avec apparition d'un palier après environ quinze heures. Le seuil de 4.5 MPa de l'appui unipodal humain, qui correspond à 25 % de la charge critique [Barbié et al., 47], conduit à une déformation permanente du matériau par fluage de 5 %. Ce matériau présente un comportement visco-élastique de type Kelvin-Voigt généralisé (figure 10.a), avec en premier stade, un comportement de type Maxwell (figure 10.b) [Poustis et al., 46].

c) Caractéristiques biomécaniques

Vieillessement *in vitro* et *in vivo*

Les essais réalisées sur des éprouvettes placées *in vitro* en milieu physiologique avec un gonflement contrôlé diamétral de 2 %, montrent une stabilité de la résistance en compression après deux heures et jusqu'à six mois de vieillissement [Poustis et al., 46].

Quant aux essais de vieillissement *in vivo* dans les masses musculaires des lombes de rats, les résultats montrent : que le milieu musculaire qui permet une expansion volumique plus importante par rapport à une expansion diamétrale limitée à 2 %, conduit à une diminution des propriétés mécaniques ; et qu'il y a une résistance à la compression stable au cours du temps [Poustis et al., 46].

¹¹ Déformation progressive dans le temps sous une contrainte constante.

Fatigue biomécanique

L'influence d'un phénomène de fatigue a été évaluée par la résistance en compression d'un matériau cellulosique. Après un gonflement latéral de 2 %, les éprouvettes sont testées en fatigue, dans une enceinte chauffée à 37 °C et avec 95 % d'humidité relative, pendant 10^4 , 10^5 et 10^6 cycles à une fréquence de 1 Hz, sous une contrainte alternée de 0-8 MPa. Les essais en compression des éprouvettes fatiguées, montrent une augmentation de la résistance du matériau [Poustis et al., 46] qui est certainement due à une réorganisation de la structure du matériau sous contrainte en compression uniaxiale.

d) Résistance à la radiostérilisation

Pour utiliser le matériau cellulosique dans le domaine chirurgical, la méthode couramment employée pour stériliser les polymères est de soumettre les implants à des rayonnements γ [Chamberlain et al., 50]. La dose standard recommandée est de 25 kGray (kGy) (Norme NF/EN 552). Ce processus de stérilisation¹² permet non seulement de détruire des agents contaminants (toxines, bactéries, micro-organismes), mais il rend aussi le matériau mécaniquement plus performant par une augmentation vraisemblable de sa réticulation interne qui rigidifie la structure de la cellulose [Poustis et al., 46]. Cette résistance supplémentaire augmente la capacité du matériau à répondre aux sollicitations physiologiques osseuses lors de son utilisation en chirurgie orthopédique. Des tests en compression réalisés sur des matériaux stérilisés ont montré toutefois que l'amélioration des propriétés mécaniques reste mineure [Poustis et al., 46].

3.3.4. Biocompatibilité – Biostabilité

Les études effectuées ont permis de vérifier que la CRV satisfaisait la plupart des critères de biocompatibilité. A l'aide de tests (Norme NF 90-702) basés sur l'emploi de cellules en culture, l'absence de relargage par la CRV (stérilisée par irradiation gamma, 25 kGy) de substances cytotoxiques sous l'effet d'un véhicule d'extraction simulant les fluides

¹² Ensemble de méthodes et de moyens mis en œuvre, visant à éliminer tous les micro-organismes vivants de quelque nature que ce soit, portés par un objet parfaitement nettoyé.

biologiques, a pu être vérifiée, aussi bien avec des cellules issues de lignées continues (fibroblastes de souris Balb 3T3), qu'avec des ostéoblastes d'origine humaine. Néanmoins, la mise en contact direct d'ostéoblastes avec la CRV dans des conditions de culture standard ne conduit pas à l'observation d'une vitesse normale de prolifération ; les cellules s'attachent initialement au matériau, puis progressivement s'en détachent et meurent. Compte tenu de l'absence de toxicité indirecte du matériau, il semblerait que la mort cellulaire soit due à une incompatibilité entre les cellules et les caractéristiques physico-chimiques de surface du matériau [Van Wachem et al., 51]. Il est admis que l'adhésion cellulaire à un substrat est influencée par différentes propriétés de surfaces comme la mouillabilité, la charge de la surface, la rugosité...

Des implantations dans l'os spongieux de fémurs de lapin, n'ont pas mis en évidence d'inflammation des tissus ou de néoformations osseuses au voisinage immédiat de l'implant [Barbié et al., 47]. La restructuration du tissu osseux environnant, n'est pas altérée par la présence de l'implant qui soumet l'os trabéculaire à une compression mécanique due à son hydrophilie.

Par ailleurs, le comportement à long terme de la cellulose après implantation a été examiné [Baquey, 52]. Pour cela, des matériaux cellulosiques ont été marqués au carbone 14 par méthylation partielle sur l'alcali cellulose contenue dans le matériau, avant d'être implantés dans les muscles paravertébraux de rats, et des coupes d'animaux sacrifiés ont été autoradiographiées. L'implantation du matériau cellulosique ne provoque aucune altération anatomique et physiologique des organes de l'animal : les muscles paravertébraux, les organes étudiés (foie, rate, reins, ganglions, para-aortoiliaques), ainsi que le cœur ne présentent aucune anomalie histologique durant les vingt quatre semaines de traitement. De plus, il n'est constaté aucune dégradation de l'implant, ni de relargage de produit ou d'élément toxique suite à des échanges matériaux / milieu vivant, ce qui semblerait confirmer la biostabilité de la cellulose [Baquey, 52].

Plus récemment, des études menées par Bruneteau [Bruneteau et al., 53] et par Laurence [Laurence, 54] ont été réalisées sur des matériaux de cellulose macroporeuse de 55 % de volume poreux en phase humide et de tailles de pores allant de 250 à 900 μm . L'implantation dans le condyle fémoral du lapin a montré une ostéoconduction mais qui reste limitée à la périphérie des implants, et un début de résorption après quatre semaines d'implantation [Bruneteau et al., 53]. L'étude a surtout souligné le caractère hémostatique du matériau et sa bonne adaptabilité au site opératoire. Lors de la mise en place dans la lacune osseuse,

l'implant se gorge de sang, augmente de volume et comprime les parois du défaut osseux en le comblant parfaitement [Bruneteau et al., 53]. Laurence [Laurence, 54] a étudié le devenir *in vivo* d'implants de cellulose macroporeuse ayant subi un pré-traitement d'oxydation à l'acide periodique, avant leur implantation chez le lapin. Après un mois d'implantation, les matériaux de cellulose oxydée n'ont montré aucun phénomène d'ostéoconduction. Par contre, les parois cellulosiques ont été dégradées et phagocytées par les histiocytes.

De par ses propriétés bien spécifiques, la cellulose pourrait représenter une solution intéressante au comblement des défauts osseux.

Ressource renouvelable, abondante et de faible coût, la cellulose possède les caractéristiques de n'importe quel hydrogel. Non seulement son pouvoir hydroexpansif permet une meilleure adaptation du matériau au niveau du site opératoire, mais en plus son caractère hémostatique va limiter le saignement lors de l'intervention chirurgicale. Biocompatible et biostable, la cellulose ressemble aux tissus vivants de par sa consistance et son haut pouvoir d'absorption. Elle permet ainsi la diffusion d'eau, de gaz, de protéines et de nutriments à l'intérieur du matériau, nécessaire pour l'adhésion, la prolifération et la survie des cellules lors de la recolonisation de l'implant.

Malgré son caractère ostéoconducteur, la cellulose ne satisfait pas le critère de bioactivité. En effet, la pénétration du tissu osseux dans les implants macroporeux est limitée à la périphérie et ne se fait pas au cœur des matériaux [Laurence, 54; Fricain et al., 55]. Deux stratégies ont alors été envisagées afin de favoriser la colonisation cellulaire du matériau, ainsi que son intégration : tout d'abord la réalisation d'un matériau macroporeux proche de l'architecture osseuse, puis l'association à sa surface de facteurs biologiques aptes à réguler ses relations avec le milieu vivant. La biofonctionnalité des implants de cellulose macroporeuse a donc été améliorée :

- soit par une fonctionnalisation de surface du matériau (1) par greffage des peptides d'adhésion contenant le motif Arg-Gly-Asp, dit RGD, (2) ou par phosphatation de façon à promouvoir la minéralisation,

- soit par une réticulation du matériau avec du collagène.

4. Stratégies d'amélioration des propriétés de surface des matériaux de comblement osseux par traitements de surface

Pour répondre au mieux au cahier des charges d'un matériau de comblement osseux, les recherches actuelles s'orientent vers une meilleure biointégration de l'implant et à une augmentation de son pouvoir ostéogène (ostéoconducteur et ostéoinducteur) (voir *la première partie Etude Bibliographique : 2.1. Cahier des charges d'un matériau de comblement osseux*). Des améliorations peuvent être réalisées aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau des propriétés des matériaux.

Dans le domaine cellulaire, deux stratégies sont envisageables.

La première consiste en une utilisation thérapeutique de gènes codant pour des protéines (comme par exemple les "Bone Morphogenetic protein" ou BMP [Shah et al., 56]) qui peuvent être injectés directement au receveur. Le problème de cette technique réside dans le contrôle difficile de l'expression des protéines dans le tissu hôte.

Une seconde stratégie relève des concepts de l'ingénierie tissulaire qui combine à la fois un matériau, des cellules et parfois des facteurs bioactifs (figure 11.) (voir *la première partie Etude Bibliographique : 2.1. Cahier des charges d'un matériau de comblement osseux*) [Ratner, 57; Baquey, 58]. Obtenir cet os hybride en est encore au stade expérimental car de nombreux phénomènes ne sont pas maîtrisés et sont en cours d'étude. Actuellement, ce travail de recherche vise le contrôle de la réponse phénotypique des cellules osseuses par l'immobilisation de facteurs bioactifs à la surface des biomatériaux. Dans le cadre de cette étude, un traitement par greffage de molécules bioactives en surface du matériau a été envisagé afin de favoriser l'adhésion d'ostéoblastes sur le matériau, et de stimuler ainsi la biointégration de l'implant et par la suite la régénération directe des tissus.

En science des matériaux, des techniques physiques, chimiques ou physico-chimiques de modification de surface cherchent à améliorer la biointégration des matériaux [Castner et al., 59]. Les traitements de surface vont permettre d'attribuer à l'implant des propriétés superficielles différentes de celles du volume (tableau 3.). La fonctionnalisation d'une surface peut être utilisée (1) soit pour contrôler l'adsorption de certaines protéines, (2) soit pour permettre l'adhésion de certaines cellules, (3) soit pour fixer une biomolécule à fonctionnalité recherchée, (4) soit pour délivrer un principe actif.

Dans ce travail de recherche, les méthodes qui ont été plus particulièrement développées sont : le greffage de molécules bioactives (dans le cadre de la réalisation de matériaux hybrides), la phosphorylation et la réticulation du matériau avec des protéines.

4.1. Greffage de peptides RGD sur la cellulose

Une des orientations de l'ingénierie tissulaire est l'association d'un biomatériau avec des cellules ostéogènes provenant du patient [Ratner, 57; Baquey, 58]. Ces cellules sontensemencées extemporanément ou après amplification par culture sur un support matriciel 3D avant d'être implantées chez le receveur. L'idéal serait que ce matériau hybride soit capable d'assurer de façon transitoire la fonction du tissu qu'il remplace, en induisant la régénération du tissu et en assumant son rôle physiologique.

L'originalité de ce travail de recherche tient donc au fait de conjuguer les connaissances nouvellement acquises en réparation tissulaire et en science des biomatériaux. En effet, il est vraisemblablement possible de corréler de manière de plus en plus précise et pertinente les caractéristiques physico-chimiques des matériaux avec les réponses biologiques des cellules autologues. Les matériaux peuvent être rendus biologiquement actifs grâce à différents procédés. La stratégie développée lors de ce travail est le greffage d'une séquence RGD [Pierschbacher et al., 60; Pierschbacher et al., 61; Ruoslahti et al., 62] sur une surface d'un matériau de comblement osseux qui pourrait ainsi mimer une surface biologique, les peptides jouant le rôle de ligands pour les récepteurs présents en surface des membranes cellulaires. Ce processus de reconnaissance moléculaire pourrait favoriser l'attachement des cellules osseuses humaines à une surface greffée, de déterminer leur forme, et de maintenir leur fonction et l'intégrité du tissu. Par une pré-cellularisation de l'implant, les cellules associées à l'interface constitueraient une ébauche de tissu autour de l'implant qui pourrait alors poursuivre sa croissance *in vivo*. Ainsi, l'adhérence entre l'os en cours de synthèse et le matériau serait renforcée, et l'implant intégré au lieu d'être seulement toléré.

4.1.1. Rôle de la séquence RGD

En 1984, une séquence térapeptidique de la fibronectine a été reconnue pour ses fonctions de reconnaissance cellulaire : le térapeptide actif est Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) [Pierschbacher and Ruoslahti, 61]. Mais il a été établi postérieurement que la séquence tripeptide RGD est l'unité fonctionnelle minimum permettant la conservation de l'activité d'attachement des cellules [Pierschbacher and Ruoslahti, 61].

L'activité fonctionnelle des peptides RGD a été démontrée pour différents types de cellules. La séquence RGD apparaît dans plus de 100 protéines : fibronectine, fibrinogène, collagène, ostéopontine... [Ruoslahti and Pierschbacher, 62]. Dans quelques protéines, l'activité d'adhésion cellulaire a été attribuée à la séquence RGD, tandis que dans d'autres cette séquence paraît fonctionnellement silencieuse. Des observations récentes avancent que la spécificité pourrait résider dans la conformation du tripeptide RGD, et que le rôle des séquences environnantes serait de pousser les peptides RGD à adopter une conformation appropriée. Des modifications de séquences peptidiques aussi faibles soient-elles - échange de la glycine par l'alanine ou de l'acide aspartique par l'acide glutamique qui consiste en l'addition d'un méthyl ou d'un groupement méthylène au tripeptide RGD, ou le remplacement de l'argine par la lysine - éliminent les activités des peptides [Pierschbacher and Ruoslahti, 60].

Aujourd'hui, il est connu que les récepteurs cellulaires appartiennent à la famille des intégrines au sein de l'ensemble des molécules de l'adhésion cellulaire. Les intégrines peuvent être considérées comme ayant 2 "têtes" (figure 12.). Elles permettent une communication entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette à travers la membrane plasmique.

Du côté extracellulaire, elles lient les protéines d'adhésion, et dans beaucoup de cas reconnaissent les séquences RGD à l'intérieur de ces ligands. Elles favorisent les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire, et entre les cellules elles-mêmes. Du côté intracellulaire, elles réagissent avec les éléments du cytosquelette. Les intégrines sont constituées de sous-unités α et β qui sont liées de manière non covalente. Cette association se fait par des cations divalents (figure 13.). Les intégrines peuvent être classées suivant plusieurs critères : par exemple suivant si elles peuvent ou non reconnaître la séquence RGD à

l'intérieur de leurs ligands respectifs. Mais le mécanisme par lequel cette séquence RGD se lie aux intégrines reste à établir.

La fonction des peptides RGD stimule la recherche dans l'élaboration de nouveaux agents thérapeutiques qui traitent les maladies associées aux aberrations d'adhésion cellulaire.

L'enduction d'une surface par des peptides de synthèse contenant la séquence RGD favorise l'attachement cellulaire, alors qu'en solution ils inhibent l'attachement des cellules à une surface recouverte de fibronectine ou de peptides [Ruoslahti and Pierschbacher, 62]. Les travaux de Verrier *et al.* [Verrier et al., 63] ont conduit à des résultats encourageants sur l'influence d'un revêtement de peptides RGD sur les processus d'adhésion cellulaire de cellules ostéoprogénitrices. Verrier [Verrier et al., 63] s'est particulièrement intéressée à l'effet de la séquence et de la structure - linéaire ou cyclique - de peptides contenant les acides aminés RGD sur l'adhésion cellulaire. Des surfaces ont été revêtues de protéines de la matrice extracellulaire, et des essais d'adhésion cellulaire et d'inhibition avec des peptides - linéaires ou cycliques - contenant la séquence RGD, ont été réalisés. Les résultats de ces tests ont montré des différences d'adhésion cellulaire suivant la nature des protéines de la matrice extracellulaire déposées sur la surface du matériau.

Afin de permettre dans certain cas d'augmenter le nombre de cellules adhérentes à la surface des matériaux, la fixation des séquences peptidiques comportant la séquence RGD a aussi été réalisée de manière covalente sur différents supports (polyuréthane, polyéthylène, titane, HA...) et notamment la cellulose (figure 14.) [Lin et al., 64; Guillemot et al., 65; Durrieu et al., 66; Kobayashi et al., 67]. Kobayashi *et al.* ont greffé des peptides GRGDS sur des microsphères de cellulose afin d'immobiliser des hépatocytes humains [Kobayashi et al., 67]. Le greffage des peptides se fait par amination des sites -OH de la cellulose, puis par addition de succinimide suivant la méthode de Matsumoto et Osawa [Matsumoto et al., 68]. Cette immobilisation a permis d'obtenir une haute densité de cellules adhérentes après vingt quatre heures d'ensemencement [Kobayashi et al., 67]. Parmi les autres méthodes disponibles pour lier de façon covalente des biomolécules à un support solide, Porté *et al.* ont choisi de greffer des peptides adhésifs *via* le greffage de molécules silanes [Porte-Durrieu et al., 69]. Ils ont démontré que le greffage d'un peptide RGDC sur une surface de TA6V (alliage de titane) ou de HA, silanisée par de l'APTES, peut promouvoir l'attachement des ostéoblastes humains [Durrieu et al., 66; Porte-Durrieu et al., 69]. Comme le montrent les résultats des tests d'inhibition compétitive présentés dans l'article, l'attachement des HUVEC a été attribué au rôle médiateur des peptides greffés en surface du matériau.

4.1.2. Greffage ou enduction de protéines ou de peptides comportant un motif RGD

Les travaux en 1991 de Massia et Hubbel [Massia et al., 70] ont démontré l'intérêt de travailler sur l'incorporation de séquences oligopeptidiques impliquées dans l'adhésion cellulaire plutôt que sur des protéines complètes au sein desquelles de nombreux oligopeptides présentent une conformation stérique incompatible avec leur récepteur. L'utilisation de peptides biologiquement actifs permet de cibler plus spécifiquement certaines cellules. Ainsi, plusieurs objectifs en ingénierie tissulaire peuvent être atteints plus facilement avec des petits peptides qu'avec des protéines entières.

Une simple enduction de peptides ne constitue pas une méthode suffisamment reproductible pour fournir des surfaces envisageables pour une application dans les biomatériaux. La quantité de peptides absorbée en surface reste inconnue et à long terme, des protéines ou des peptides adsorbés en surface et exposés à des solutions pourraient se désorber, se dénaturer et/ou s'échanger avec les protéines du milieu [Castner and Ratner, 59]. C'est pourquoi une chimie d'immobilisation favorisant une stabilité à long terme est une voie à adopter pour la réalisation d'implants biomédicaux. Le greffage de peptides contenant une séquence RGD sur une surface, présente alors de nombreux avantages par rapport à un simple revêtement : une désorption nulle, la minoration de l'amputation protéolytique des séquences peptidiques, le contrôle de la présentation de la séquence (c'est-à-dire C- ou N- terminal) et la possibilité d'orienter l'arrangement spatial de la séquence ou des séquences choisies [Massia and Hubbell, 70; Irvine et al., 71].

4.1.3. Greffage de peptides RGD

La biofonctionnalisation d'une surface par des peptides nécessite de conserver leur bioactivité optimale. Cette bioactivité est évaluée par la réponse des cellules à la surface de ces matériaux. Il faut cependant préciser que :

- le procédé de greffage des peptides ne doit pas les dénaturer ou les inactiver,

- leur orientation ou leur configuration est un point crucial qui peut modifier leur interaction avec les cellules [Gurrath et al., 72],

- la densité de surface des peptides doit être contrôlée afin de promouvoir l'adhésion des cellules, l'étalement, mais aussi la formation de contacts focaux. Massia et Hubbell [Massia and Hubbell, 70] ont évalué une densité de RGD minimum de 10^{-4} pmol/mm², avec un espace de 140 nm entre les ligands des peptides pour la formation de contacts focaux et de 440 nm pour l'étalement cellulaire. Toutefois, il apparaît qu'un regroupement de peptides au niveau nanoscopique peut influencer l'adhésion cellulaire. D'après Maheshwari *et al.* [Maheshwari et al., 73], le regroupement de ligands réduit significativement la densité moyenne de ligand requis pour assurer la migration des cellules, alors que des ligands non-regroupés favorisent l'attachement cellulaire, mais ne permettent pas un étalement complet (figure 15.).

- la distance entre les espèces bioactives et la surface du matériau doit permettre l'accessibilité, la flexibilité et l'ajustement des peptides RGD aux intégrines cellulaires. Parfois, une distance minimale est requise pour permettre l'attachement cellulaire [Beer et al., 74]. Après avoir testé l'influence de différentes longueurs d'espaceur (en faisant varier le nombre de motifs de glycine), Beer *et al.* [Beer et al., 74] ont conclu qu'une longueur de 46 Å était nécessaire pour atteindre les récepteurs membranaires. Néanmoins, d'autres études réalisées pratiquement sans aucun espace entre la surface du matériau et le peptide RGD, ont montré une excellente adhésion cellulaire [Massia and Hubbell, 70].

4.1.4. Silanisation de la surface de matériaux

L'une des méthodes les plus couramment utilisées pour la fonctionnalisation de surface, est la silanisation.

En effet, de nombreuses études ont été menées sur la silanisation de matériaux (tels que les noirs de carbone, l'alliage de titane, l'hydroxyapatite, les polysaccharides (agarose, cellulose, ...) ...) notamment pour la fixation de molécules biologiques [Durrieu et al., 66; Porte-Durrieu et al., 69; Pope et al., 75].

Un inventaire des différents agents de pontage de type organosilane a d'ailleurs été dressé par Plueddemann *et al.* [Plueddemann, 76] et Collins *et al.* [Collins, 77]. Actuellement,

les agents de couplage les plus utilisés sont les organosilanes de formule générale : Y-R'-Si(OR)₃ où -OR est une fonction hydrolysable méthoxy (-OCH₃) ou éthoxy (-OC₂H₅), qui réagit avec les sites -OH présents ou créés en surface de matériaux. On peut également remplacer le groupement alkoxy par des groupements chloro, mais ces derniers peuvent présenter l'inconvénient de libérer de l'acide chlorhydrique lors de l'hydrolyse. La réaction avec les alcoxysilanes a comme avantage que le groupe alcool est beaucoup moins agressif que l'acide chlorhydrique, mais présente l'inconvénient d'une vitesse beaucoup plus faible que celle observée avec les chlorosilanes. -Y est un groupement organofonctionnel sélectionné pour sa réactivité vis-à-vis de la molécule, que l'on cherche à immobiliser (figure 16.). La vitesse de réaction du silane dépend de la nature du groupement partant. En effet, l'ordre des réactivités des silanes est le suivant : diméthyllamino ((CH₃)₂N-) > chloro (Cl-) > alkoxy (RO-).

La réaction de silanisation reste une réaction difficile à maîtriser à cause du nombre important de paramètres à contrôler précisément [McGovern et al., 78; Silberzan et al., 79]. La nature et le nombre de fonctions hydrolysables jouent un rôle important, de même que le pH, la concentration des silanes, la température et la nature du solvant. Mais c'est surtout la présence de molécules d'eau en surface du matériau ou dans le solvant, qui influence le mécanisme de réaction des organosilanes avec une surface [Silberzan et al., 79]. En effet, la silanisation d'une surface peut être effectuée soit en milieu aqueux, soit en milieu anhydre.

a) Méthode de silanisation en milieu aqueux

[Nishiyama et al., 80; Kallury et al., 81; Abdelmouleh et al., 82]

La fonctionnalisation de la surface s'effectue en utilisant une solution aqueuse de silane. Au contact de l'eau, le silane évolue et subit :

- une hydrolyse (figure 17.). Les silanes s'adsorbent sur la surface hydratée du matériau, ce qui entraîne l'hydrolyse des groupements facilement hydrolysables (alkoxy), portés par l'atome de silicium.

- puis une condensation (figure 18.). Dans le cas de silanes multifonctionnels, les molécules subissent une condensation entre elles et/ou à la surface du matériau par la création de ponts hydrogènes entre hydroxyle. La condensation des silanols provoque la formation

d'un réseau de molécules liées à la surface de façon covalente. Les molécules greffées sont polymérisées horizontalement et verticalement. Un réseau tri-dimensionnel de polysiloxanes est donc formé à la surface du matériau. La réaction de polymérisation est difficile à contrôler et des couches d'épaisseur variable sont obtenues.

Des deux réactions, c'est l'hydrolyse qui est la plus rapide. En effet, il suffit de quelques secondes à trente minutes, pour que la totalité du silane soit hydrolysé. Par contre, la condensation est beaucoup plus lente et peut nécessiter plusieurs heures. La réaction de condensation comme celle de l'hydrolyse est dépendante du pH. La catalyse acide va favoriser une hydrolyse rapide et une condensation lente, et elle va donc augmenter la durée de vie des silanols en solution. En revanche, une catalyse basique entraîne une condensation en siloxanes avant même que la majorité des groupements alcoxysilane soit hydrolysée.

Dans le cas d'une réaction de silanisation avec un agent aminopropyltriéthoxysilane (APTES), l'orientation de la chaîne d'aminopropyle (l'amine peut être soit près de la surface soit pointer loin de la surface) est déterminée par la présence d'eau dans la réaction. Kallury [Kallury et al., 81] a démontré que l'addition d'une base dans la réaction réduit la quantité de groupement amine en interaction avec la surface. Il est donc souhaitable de travailler en milieu basique afin d'avoir un nombre de site d'ancrage plus important pour la prochaine étape du greffage.

Afin de contrôler la polymérisation des silanols, Abdelmouleh *et al.* [Abdelmouleh et al., 82] ont mis en contact l'APTES pré-hydrolysé et la cellulose en milieu aqueux. Puis ils ont fait subir au substrat un traitement en température à 120 °C sous atmosphère inerte, afin de réaliser le greffage chimique du silane sur la cellulose. Suivant la proportion ajoutée entre les quantités de silane et de cellulose, une mono- ou une multi-couche ont été observées à la surface du matériau.

Il est à noter que dans le cas de silanes monofonctionnels la réaction de condensation des silanes est limitée, et qu'elle ne peut pas entraîner la polymérisation des molécules entre elles. Toutefois, les silanes trifonctionnels sont préférés aux monofonctionnels du fait de leur réactivité plus élevée et de leur coût plus faible.

La méthode de silanisation en milieux aqueux est très employée car elle permet d'obtenir de nombreux sites d'ancrage. Toutefois, elle conduit souvent à des dépôts non

homogènes et surtout polymérisés susceptibles de se détacher plus facilement du support par la suite. Pour obtenir un greffage plus homogène et plus solide au cours du temps, il est préférable de réaliser la réaction de silanisation en milieu organique anhydre [Chaimberg et al., 83].

b) Silanisation en milieu organique

[Chaimberg and Cohen, 83; Engelhardt et al., 84]

La réaction de silanisation en milieu organique est réalisée dans des solvants organiques anhydres. Toutefois deux méthodes aux finalités totalement différentes peuvent être envisagées : soit le matériau a préalablement été chauffé de façon à éliminer toutes traces d'eau, soit le matériau n'a subi aucun traitement en température [Chaimberg and Cohen, 83].

Lorsqu'il reste de l'eau en surface du matériau, le silane va alors polymériser de la même façon que si la réaction se déroulait en milieu aqueux. Par contre, si le matériau a subi un traitement en température, il n'y aura pas d'hydrolyse du silane car la réaction sera réalisée en milieu parfaitement anhydre.

Deux mécanismes de réactions de silanisation ont été proposés en milieu anhydre.

Dans le premier mécanisme, la liaison chimique entre les silanes en solution et la surface se produit par l'attaque nucléophile du groupe $-OH$ sur le silicium de l'organosilane. La réaction est une condensation directe des groupements alkoxy portés par le silane et les fonctions hydroxyle de la surface du matériau (figure 19.).

Le principe de la réaction proposée dans le second mécanisme se place dans le cas où le silane utilisé est un aminosilane. La fonction amine contenue dans la chaîne organique peut servir de catalyseur et la réaction obéit à un processus auto-catalytique (figure 20.). La liaison chimique entre les silanes en solution et la surface se produit par condensation directe.

De manière générale, afin d'obtenir une répartition plus homogène des molécules silanes greffées en surface, mais aussi un meilleur contrôle conformationnel et une meilleure accessibilité des sites pour le greffage ultérieur, il est important d'éviter la formation de polysiloxanes [Chaimberg and Cohen, 83].

Contrairement aux techniques de silanisation en milieu aqueux, la polymérisation des silanes est éliminée en milieu totalement anhydre (c'est-à-dire avec un traitement en température du matériau et l'utilisation de solvants anhydres). Il est généralement rapporté que les molécules silanes forment un recouvrement en monocouche de "brush-like" [Engelhardt and Mathes, 84]. Il est important également de noter qu'un recouvrement en multicouche peut être obtenu, quand il reste de l'eau adsorbée en surface du matériau du à un dégazage incomplet du matériau [Parnas et al., 85]. L'eau adsorbée peut réagir avec les groupements alkoxy des silanes liés à la surface et ainsi former des groupements silanol. Les molécules silanes présentes en solution peuvent alors réagir avec les molécules silanes liés en surface et former une multicouche [Nishiyama et al., 80].

Et puis la silanisation en milieu organique anhydre présente d'autres avantages par rapport à une silanisation en milieu aqueux : la densité de greffage obtenue est plus importante, mais surtout l'ancrage des silanes sur le matériau est plus stable [Chaimberg and Cohen, 83].

4.2. Principe d'élaboration d'un biomatériau cellulosique phosphaté promouvant la minéralisation

Le phosphate de cellulose est utilisé depuis des décennies dans le traitement de maladies liées au métabolisme du calcium (tels que les calculs rénaux) en raison de sa grande capacité à fixer le calcium, de sa non-toxicité et de sa non-assimilation par l'organisme. Il a largement été utilisé en chromatographie pour son aptitude à lier spécifiquement des espèces biologiquement actives, telles que des enzymes et des peptides [Lagoa et al., 39; Simionescu et al., 40]. Les biomatériaux destinés aux applications orthopédiques doivent présenter une structure biomimétique capable de promouvoir la régénération du tissu osseux sans provoquer de réactions défavorables et en assurant les fonctions physiologiques de l'os (voir *la première partie Etude Bibliographique : 2.1. Cahier des charges d'un matériau de comblement osseux*). Grâce à ses propriétés de fixation du calcium, la cellulose phosphatée pourrait être envisagée comme un biomatériau alternatif prometteur, susceptible, une fois implanté, de promouvoir une régénération adéquate des tissus [Granja et al., 86].

4.2.1. Phosphates et cellulose phosphatée

Les phosphates doivent être définis comme des composés chimiques dans lesquels le phosphore est lié à quatre atomes d'oxygène. Ils sont généralement représentés suivant la formule $(RO)_3P=O$, où $P=O$ est la liaison phosphoryle. Du point de vue de la nomenclature, les composés sont appelés : orthophosphates ou simplement phosphates, pour les composés contenant des ions PO_4^{3-} ; polyphosphates, pour les composés formant une chaîne linéaire P-O-P ; métaphosphates, pour les composés cycliques ; ultraphosphates, pour les matériaux polymères à branches.

Quant aux phosphates de cellulose, ce sont des dérivés esters de l'acide phosphorique. Le phosphore peut être lié de façon covalente aux chaînes de cellulose *via* une réaction des groupements hydroxyle $-OH$ avec l'acide pour donner des groupements phosphate : cellulose-O- $PO(OH)_2$ (figure 21.). Lorsqu'une seule fonction $-OH$ est impliquée dans la liaison cellulose-phosphate, le produit formé est un monoester. Il existe aussi d'autres classes d'oligophosphates de cellulose comme les di- et tri-ester de cellulose phosphatée. Lors de la phosphatation, le phosphore peut aussi être lié à la cellulose par des groupes d'acide phosphonique et phosphite, mais ceci ne sera pas discuté ici. Les noms des phosphates de cellulose les plus rencontrés dans la littérature sont reportés dans le tableau 4., ainsi que leur nombre de registre du chemical abstract.

4.2.2. Phosphatation de la cellulose

Depuis plusieurs décennies, de nombreuses méthodes de phosphatation de la cellulose ont été étudiées, notamment par Klemm *et al.* [Klemm et al., 87]. La cellulose peut aussi bien être phosphatée par réaction avec des sels de phosphate inorganique, qu'avec des réactifs organiques. De toutes ces méthodes, les dérivés phosphore pentavalent, comme l'acide phosphorique (H_3PO_4), l'anhydride phosphorique (P_2O_5) et l'oxychlorure de phosphore ($POCl_3$), sont les plus fréquemment utilisés.

La phosphatation de cellulose peut être réalisée par le greffage covalent du phosphore soit par réaction directe avec les groupements hydroxyle $-OH$ présents sur la cellulose, soit à partir d'un éther ou d'un ester de cellulose déjà formé et généralement soluble. Dans le premier cas, la réaction commence dans un système hétérogène, et dans le second cas, un système homogène est généralement employé. Mais les tendances de

substitution régiosélective peuvent être exploitées en utilisant simultanément ces deux voies de phosphatation. Néanmoins, ce mécanisme n'est pas encore bien défini.

Dans le cadre de ce travail de recherche, nous nous intéressons uniquement à une réaction de phosphatation directe entre les fonctions –OH de la cellulose et des phosphates inorganiques.

L'acide orthophosphorique (H_3PO_4) est le principal agent phosphatant utilisé lors de la réaction de phosphatation de cellulose, même si beaucoup d'autres réactifs peuvent être employés. Les produits obtenus avec ces différents agents phosphatant sont classés en fonction de leur solubilité et de leur degré de substitution qui leur confèrent des différences significatives.

Le système urée/ H_3PO_4 est quant à lui le système le plus étudié pour phosphatater la cellulose. Ceci est due à sa facilité d'utilisation qui consiste à ajouter l'acide H_3PO_4 à l'urée, puis à conduire la réaction à une température de 120 °C. Beaucoup de variantes de cette procédure ont été reportées, avec des températures variant de 120 à 150 °C. Un sel de monophosphate d'ammonium contenant une faible quantité d'azote est généralement formé. Les produits obtenus peuvent être dégradés et dans certains cas insolubles dans l'eau. En utilisant cette méthode, Nehls *et al.* [Nehls et al., 88] ont reporté que la substitution se faisait préférentiellement sur le C-6 de la cellulose avec une formation d'oligophosphate de cellulose (figure 8.). Le rôle de l'urée serait de fournir un support à la réaction en étant, à la fois un agent de gonflement pour la cellulose, et un solvant pour H_3PO_4 entre 140 et 160 °C, intervalle de température où elle est à l'état liquide.

Des recherches ont largement été menées sur les méthodes consistant à mettre en suspension de l'oxychlorure de phosphore ($POCl_3$), ou du trichlorure de phosphore (PCl_3), ou du pentachlorure de phosphore (PCl_5) dans du diméthylformamide (DMF), ou du formamide, ou de la pyridine. Cependant les produits obtenus sont excessivement chlorés et dégradés, et ont l'inconvénient pour certaines applications d'être solubles dans l'eau. Zeronian *et al.* [Zeronian et al., 89] ont montré que lorsque le coton mercerisé¹³ avec la soude était stocké dans l'eau avant la réaction, les pourcentages de phosphore obtenus étaient meilleurs. En effet, il semblerait que le matériau une fois gonflé soit rendu plus accessible aux réactifs chimiques.

¹³ Coton traité à la soude caustique pour donner aux tissus un éclat permanent et un accroissement de leur résistance mécanique.

Clermont [Clermont, 90] a préparé de la cellulose phosphatée de coton et de papier filtre, en utilisant P_2O_5 dans le DMF à une température située entre 60 et 70 °C pendant une heure. Les produits obtenus sont insolubles et contiennent moins de 1.5 % de phosphore.

Touey et Kingsport [Touey et al., 91] ont préparé dans une enceinte à température contrôlée de la cellulose phosphatée stable, soluble dans l'eau et non dégradée. Les produits obtenus contiennent jusqu'à 13 % de phosphore. H_3PO_4 a été utilisé avec du P_2O_5 dans du DMF, ou du diméthylsulfoxyde, ou de la pyridine, ou encore du dioxane. L'utilisation du mélange d'un alcool avec d'autres diluants, comme le triéthylphosphate (Et_3PO_4), a été reportée comme une alternative utile. D'après les paramètres expérimentaux utilisés, des gels de cellulose phosphatée peuvent être obtenus. En se basant sur des travaux non publiés, l'auteur a étudié plusieurs variations possibles de cette procédure et a proposé la méthode utilisant les réactifs suivants $H_3PO_4/P_2O_5/Et_3PO_4$ /hexanol. Ce choix s'est basé sur la possibilité d'obtenir des produits sans ammonium ou sans autres composés chimiques potentiellement nocifs, générés par des méthodes autres.

Lors de ce travail de recherche, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la méthode de phosphatation $H_3PO_4/P_2O_5/Et_3PO_4$ /hexanol développée par Granja.

Au cours de son travail de thèse [Granja, 92], Granja a phosphaté de la cellulose en optimisant la méthode $H_3PO_4/P_2O_5/Et_3PO_4$ /hexanol [Granja et al., 93]. Les paramètres de réaction étudiés ont été le temps de pré-gonflement de la cellulose, la séquence d'addition des réactifs, la température et le temps de réaction, ainsi que les quantités relatives de réactifs.

Tout d'abord, la synthèse a été optimisée en utilisant de la cellulose microcristalline. Il a été démontré par cette méthode qu'une liaison covalente se formait entre les groupes phosphate et la chaîne cellulosique, et que seuls des monoesters étaient obtenus [Granja et al., 93]. Lorsque les teneurs en phosphate sont faibles, cette réaction conduit à une substitution régiosélective sur l'atome de carbone C-6 (figure 8.) [Nehls et al., 88; Granja et al., 93]. Le phosphate de cellulose obtenu a pour caractéristiques principales d'être essentiellement amorphe (caractérisé par diffraction de rayon X), de gonfler considérablement dans l'eau (étude au cours du temps du gonflement de matériaux lyophilisés immergés dans de l'eau) et de résister à la stérilisation gamma sous atmosphère d'azote.

Par la suite, cette synthèse a été appliquée avec succès à la modification de surface de cellulose régénérée sous forme d'hydrogel compact (CRV) (voir *la première partie Etude*

Bibliographique : 3.3.1. Nature chimique et structurale) [Granja et al., 94]. Les produits phosphatés obtenus sont caractérisés par une augmentation de leur rugosité (observée par rugosimétrie laser) et de leur hygroscopicité.

4.2.3. Rôle de la phosphatation dans la promotion de la minéralisation

La minéralisation se produit au sein de la matrice osseuse organique extracellulaire. Cette matrice agit comme un agent de nucléation du cristal, puis de croissance cristalline. Elle joue un rôle de support servant à l'organisation des dépôts calciques. La phase minérale est constituée de cristaux de phosphate de calcium complexes qui se déposent sur et à l'intérieur des fibrilles de collagène de façon ordonnée (figure 22.). Le constituant principal de la substance minérale des tissus calcifiés est l'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ associée sous une forme indéterminée à du carbonate de calcium.

In vitro, la formation d'apatite est un processus complexe qui implique une germination contrôlée et la croissance des noyaux en solution aqueuse. Une fois les noyaux d'apatite formés, ceux-ci croissent par accumulation d'ions calcium et phosphate présents dans la solution. La germination peut être réalisée dans une solution pure hypersaturée ou bien dans une dilution de SBF (Simulated Body Fluid), dont les concentrations en ions sont équivalentes à celles des fluides corporels. Elle peut être soit d'origine homogène si elle se déroule en solution, soit d'origine hétérogène si elle se fait sur un substrat étranger.

Le processus de minéralisation et l'évaluation des facteurs l'influençant sont des questions importantes, et notamment pour la compréhension des maladies relatives à ce phénomène. Il semblerait que les molécules biologiques possédant des fonctions phosphate, comme les phosphoprotéines¹⁴, jouent un rôle primordial dans la régulation de la minéralisation (figure 23.). Bien que les relations entre les phosphates et la minéralisation n'aient pas encore été clarifiées [Wu et al., 95], les phosphates paraissent influencer considérablement ce processus [Van Den Bos et al., 96; Bellows et al., 97; Beertsen et al., 98].

Le greffage de fonctions phosphate à la surface de matériaux a donc été envisagé afin de favoriser la minéralisation. Plusieurs études indépendantes ont rapporté des conclusions similaires à savoir que, lorsque les espèces phosphate étaient immobilisées sur une surface,

¹⁴ Ou phosphorynes, sont des espèces organiques contenant des phosphates. Elles existent dans les tissus sous forme de protéines non collagéniques et possèdent des propriétés de liaison avec le calcium.

elles promouvaient la formation d'apatite, alors qu'elles semblaient l'inhiber quand elles se trouvaient en solution [Linde et al., 99; Hunter et al., 100]. En présentant des fonctions similaires à celles des tissus qu'ils vont remplacer, de tels matériaux pourraient servir de modèle pour l'étude des phénomènes relatifs à la minéralisation.

Des études de minéralisation ont notamment été menées sur la cellulose phosphatée (voir *la première partie Etude Bibliographique : 4.1.2.2. Phosphatation de la cellulose*). Il a été constaté que la cellulose phosphatée seule n'était pas capable d'induire la formation d'apatite, mais *a contrario* la cellulose phosphatée sous forme de sel de calcium pouvait induire cette formation [Mucalo et al., 101]. L'étude menée par Mucalo *et al.* [Mucalo et al., 101] en conditions physiologiques simulées, a montré l'induction de la formation d'apatite sur la cellulose (coton) phosphatée par la méthode de l'urée/H₃PO₄. Quant à Li *et al.*, ils ont phosphaté du bambou, composé principalement de cellulose, par les méthodes urée/H₃PO₄ et DMF/H₃PO₄ [Li et al., 102]. Le choix de ce matériau est dû à ses propriétés mécaniques et macrostructurales proches de celles du tissu osseux. Le pré-traitement de la cellulose phosphatée dans une solution de calcium a été décrit comme absolument nécessaire pour que la formation d'apatite se fasse [Li et al., 102]. Shimabayashi *et al.* [Shimabayashi et al., 103] ont étudié la formation de l'hydroxyapatite (HA) en présence de cellulose phosphatée insoluble en solution aqueuse. A travers des liaisons formées entre les ions phosphate et les ions calcium, les fibres de cellulose phosphatée permettraient de promouvoir la formation de l'HA par la création de sites de nucléation hétérogène nécessaire pour la croissance du cristal [Shimabayashi et al., 103].

L'utilisation de polymères phosphatés autres que la cellulose a montré des résultats similaires à savoir de la capacité d'un sel de calcium d'induire la formation d'une apatite [Yokogawa et al., 23; Kato et al., 104; Tanahashi et al., 105]. Tanahashi et Matsuda [Tanahashi and Matsuda, 105] ont étudié quant à eux le dépôt d'apatite sur des monocouches auto-assemblées d'alcanethiols greffés avec différentes fonctions chimiques parmi lesquelles figuraient des groupements phosphate. L'étude indique que les surfaces chargées négativement agissent comme des substrats forts pour la nucléation d'apatite. La minéralisation telle que la formation d'apatite, arrive principalement par adsorption d'ions calcium et par complexation avec un groupe chargé négativement présent en surface du matériau. Les groupements phosphate ont été les plus efficaces dans la minéralisation au niveau de leur interaction avec les ions calcium [Tanahashi and Matsuda, 105].

4.2.4. Rôle de la phosphatation dans l'attachement cellulaire

L'adhésion cellulaire a surtout été étudiée sur des surfaces phosphatées autres que la cellulose. Gunasakaram *et al.* [Gunasekaran et al., 106] qui ont observé le comportement des cellules de Schwann sur le collagène phosphaté, reportent une augmentation de la prolifération cellulaire. Cependant la phosphatation de protéines est habituellement restreinte à quelques acides aminés, et les fonctions non phosphatées de la protéine restent disponibles pour se comporter différemment. Les protéines phosphorylées sont connues pour jouer un rôle clé dans le métabolisme cellulaire et pour permettre l'influx des ions Ca^{2+} [Katayama et al., 107]. Katayama *et al.* [Katayama et al., 107] ont remarqué que la phosphatation de l'ostéopontine augmentait l'adhésion des ostéoclastes, mais pas celle des ostéoblastes. Par contre, Yamamoto *et al.* [Yamamoto et al., 108] ont montré qu'il y avait une amélioration de l'adhésion des ostéoblastes à la surface de polymères (poly(éthylènetéréphtalate)) phosphatés inducteurs de la formation d'un minéral de phosphate de calcium. Quelques études soutiennent au contraire que les particules de phosphate de calcium inhibent la prolifération des ostéoblastes. Ce fait semble lié à un excès d'ions phosphate et calcium libérés dans le milieu de culture [Alliot-Licht et al., 109; Sun et al., 110]. L'adhésion cellulaire sur des surfaces phosphatées reste un phénomène controversé.

4.2.5. Rôle de la phosphatation $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{Et}_3\text{PO}_4$ /hexanol dans la promotion de la minéralisation et dans l'attachement cellulaire

Lors de ce travail de recherche, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la méthode de phosphatation $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{Et}_3\text{PO}_4$ /hexanol développée par Granja.

Granja a cherché à minéraliser des phosphates de cellulose dans des conditions physiologiques simulées, en immergeant les matériaux dans une solution simulant le liquide interstitiel (Simulated Body Fluid (SBF)). L'évaluation de la capacité des phosphates de cellulose à induire la formation d'une couche d'apatite, a montré que seuls les sels de calcium de cellulose phosphatée ont été capables d'induire la formation d'apatite. Il est donc nécessaire de pré-incuber le matériau dans une solution de CaCl_2 avant de l'immerger dans du SBF. La formation de sels de calcium de cellulose phosphatée va non seulement favoriser

l'induction d'apatite, mais en plus, elle va permettre de neutraliser l'acidité présente dans le matériau due aux fonctions phosphate.

Granja a également étudié la minéralisation sur des matériaux de CRV non-phosphatés. Ces matériaux non modifiés, mais pré-incubés dans une solution de calcium, ont également donné la formation homogène d'une couche d'apatite. Toutefois, l'interface observée en MEB entre l'hydrogel et la couche minérale n'apparaît pas aussi continue que sur les matériaux phosphatés [Granja et al., 111].

Des études *in vitro* de biocompatibilités réalisées avec des cellules osseuses, ont montré que la cellulose phosphatée n'était pas cytotoxique, quelle que soit sa teneur en phosphate. Cependant, elle conduit à de faibles pourcentages d'attachement, de prolifération et de différenciation d'ostéoprogéniteurs par rapport à la cellulose non modifiée. Ce comportement a été attribué à la charge négative de la cellulose phosphatée par rapport à la cellulose non modifiée [Granja, 92].

Enfin, des études d'implantation animale chez le lapin ont révélé d'une part la biocompatibilité de la cellulose non modifiée et de la cellulose phosphatée, et d'autre part leurs propriétés d'ostéoconduction. Même si on note une activité de remodelage du tissu osseux, l'ostéointégration n'est pas complète [Granja, 92; Fricain et al., 112]. De plus il semblerait n'y avoir aucune différence significative entre la CRV non modifiée et la CRV phosphatée.

4.3. Stratégies d'élaboration d'un biomatériau cellulosique à base de protéines

Un matériau de comblement osseux associé à des protéines humaines comme le collagène de type I, pourrait mimer une matrice extracellulaire en exposant des séquences peptidiques reconnaissables par les récepteurs membranaires impliqués dans l'adhésion des cellules (voir la première partie *Etude Bibliographique : 4.1. Greffage de peptides RGD sur la cellulose*). L'attachement des cellules osseuses ainsi favorisé assurerait la biointégration de l'implant et par la suite la régénération des tissus.

L'enduction d'une surface par des protéines est une méthode facile à mettre en œuvre, mais elle ne constitue pas une méthode suffisamment reproductible pour fournir des surfaces

envisageables pour une application dans les biomatériaux. L'immobilisation d'une protéine par sa réticulation en surface d'un biomatériau, pourrait permettre un meilleur contrôle de cette surface par rapport à une simple adsorption.

La réticulation des protéines sur un biomatériau se fait par voies chimiques. Elles mobilisent des groupements réactifs portés par certains résidus amino-acides comme par exemple des fonctions carboxyle, des fonctions amine, ou des fonctions alcool primaire et secondaire des résidus hydroxylés.

4.3.1. Adsorption des protéines

Les protéines sont des biopolymères de structures complexes, ayant différents domaines hydrophobes et hydrophiles, et pouvant avoir des charges positives ou négatives. Elles vont s'adsorber de façon différente à la surface du matériau selon l'affinité des protéines pour le matériau concerné.

En effet, les propriétés de surface à l'échelle moléculaire influencent grandement les interactions protéiques. Elles incluent les propriétés chimiques, physico-chimiques (propriétés électrostatiques, énergie de surface...), physiques (porosité, rugosité), ainsi que la distribution régulière et irrégulière par domaines de chacune des combinaisons de ces facteurs. Chaque couple constitué d'une protéine et d'un matériau étant un cas particulier, il est difficile de prévoir des comportements généraux applicables à tous les cas de figure.

Les liaisons les plus souvent observées entre une protéine et une surface, sont des liaisons faibles, électrostatique et hydrogène. Les liaisons électrostatiques se forment entre des groupements chargés de la protéine et les sites de charge opposée de la surface. Quant à la liaison hydrogène, elle est fortement dépendante de la composition chimique de la surface du matériau.

D'autre part, Brash a mis en évidence en 1978 *via* un double marquage [Brash et al., 113], l'existence d'un échange d'une partie des protéines adsorbées avec les protéines en solution, la quantité totale de protéines adsorbées restant constante. Les échanges protéiques ont au moins deux conséquences importantes : (i) la couche adsorbée peut changer de composition avec le temps ; (ii) les protéines relarguées de la surface peuvent être altérées et entraîner une réponse biologique.

4.3.2. Réticulation des protéines

De la même manière que pour le greffage de peptides (voir *la première partie Etude Bibliographique : 4.1.2. Greffage ou enduction de protéines ou de peptides comportant un motif RGD*), une chimie d'immobilisation par réticulation a été envisagée afin de favoriser une stabilité à long terme de la protéine à la surface de l'implant.

4.3.2.1. Méthodes chimiques de réticulation

La réticulation chimique des protéines par agents pontants, est caractérisée par l'introduction d'une nouvelle molécule chimique entre deux molécules de protéine. Plusieurs catégories d'agents réticulants, parmi lesquels les aldéhydes, les isocyanates et les polyépoxydes, peuvent être employés pour réticuler les protéines : ceux qui se lient aux groupements amine pour former des liaisons imine ou urée, et aux groupements hydroxyle pour former des liaisons esters ou urethanes (tableau 5.).

Cette réticulation offre de nombreux avantages, comme le contrôle de la stabilité mécanique et biologique des matériaux formés. Cependant, les méthodes chimiques peuvent, être responsables de modifications des propriétés biologiques des protéines, voire induire une certaine toxicité [Weadock et al., 114].

La réticulation par les aldéhydes est l'une des plus utilisées. Les fonctions aldéhyde vont réagir avec les groupements amine ou hydroxyle des protéines (tableau 5.). Le glutaraldéhyde est l'un des plus utilisés [Rousseau et al., 115]. Cependant les matériaux réalisés peuvent présenter une certaine toxicité vis-à-vis des cellules, liée aux groupements aldéhyde n'ayant pas réagi ou provenant de la dégradation du matériau.

Pour pallier le problème de dépolymérisation spontanée que connaissent les polymères d'aldéhyde (comme le paraformaldéhyde), divers polyaldéhydes macromoléculaires ont été récemment proposés. Cette classe d'agents réticulants est principalement constituée de polysaccharides oxydés, tels que la cellulose, l'amidon, le dextrane et le glycogène, qui présentent comme avantage d'être des polymères naturels stables, sur lesquels il est possible de créer artificiellement des groupements aldéhyde réactifs. A moins de subir une dégradation enzymatique spécifique, ces polymères naturels ne présentent pas de dépolymérisation

spontanée, étant à l'origine de la libération de composés éventuellement toxiques. Le principe de la réticulation des protéines avec des polysaccharides oxydés est basé sur la réaction des groupements aldéhyde du polyaldéhyde avec les groupements amine des protéines.

Des procédés de réticulation du collagène par des polysaccharides ont fait l'objet de plusieurs dépôts de brevets d'inventions [Liu et al., 116; Watt et al., 117].

Des matrices de collagène/polysaccharides ont été réalisées par Liu *et al.* [Liu and Spiro, 116] dans le but de soutenir la croissance de l'os et du tissu cartilagineux. Tout d'abord le polysaccharide (acide hyaluronique, héparane, dextran, alginate...) est oxydé à l'aide d'un agent oxydant, tel que le periodate de sodium ou de potassium, pour former des groupements aldéhyde par ouverture du cycle de résidus saccharides. Ensuite, ces fonctions aldéhyde réagissent avec les sites amine présents sur les chaînes peptidiques du collagène pour former des liaisons covalentes.

Plus spécifiquement, des éponges de cellulose régénérée oxydée (Surgicel[®] de Johnson & Johnson) réticulées avec du collagène (Promogran[®] [Watt et al., 117]) ont aussi fait l'objet d'études pour le traitement des blessures chroniques (figure 24.a) [Hart et al., 118; Cullen et al., 119]. L'oxydation de la cellulose par le tétraoxyde d'azote N₂O₄ [Ryden et al., 120] permet de convertir la fonction hydroxyle présente sur le C-6 en groupement carboxylique et de former des fonctions cétone en C-2 ou C-3. Le carbonyle endocyclique formé déstabilise la liaison β (1-4) et facilite le clivage glycosidique (figure 24.b). Le processus de réticulation du collagène par la cellulose oxydée régénérée va se faire sur les groupements –COOH des résidus d'acide uronique présents sur la chaîne de cellulose.

4.3.2.2. Oxydation de la cellulose par l'acide periodique HIO₄

L'oxydation de la cellulose par l'acide periodique HIO₄ conduit à la formation de fonctions aldéhyde qui vont permettre la formation de liaison covalente entre la cellulose oxydée et les protéines (figures 25.a et b) (voir *la première partie Etude Bibliographique : 4.2.1.2. Méthodes chimiques de réticulation*).

L'acide periodique possède la capacité de réagir avec la cellulose dans son ensemble sans en endommager la structure [Nevell et al., 121]. L'action de l'acide periodique sur la

cellulose est régiosélective et s'exprime sur les fonctions alcool des carbones C-2 et C-3, conduisant à la formation de deux fonctions aldéhyde (figure 25.a) [Syamala Devi et al., 122; Dan Dimitrijevic et al., 123]. Elle permet l'obtention de composés instables en milieu alcalin et à pH physiologique, qui par réarrangement forment de l'acide glycolique et de l'acide 2,4-dihydroxybutyrique, molécules métabolisables par l'organisme [Singh et al., 124]. Cette instabilité à pH physiologique pourrait être exploitée pour réaliser un matériau de comblement osseux capable de se dégrader une fois implanté.

Des études de dégradation ont été menées *in vitro* par Laurence [Laurence, 54] sur des matériaux de cellulose macroporeuse oxydée : à pH physiologique simulant le pH du sang (entre 7.35 et 7.45) et à un pH plus acide (3 ± 0.2) simulant le pH régnant dans la chambre de résorption des ostéoclastes [Laurence, 54]. D'un côté, des tests en conditions statiques ont permis d'évaluer la dégradation des matériaux en conditions proches de celles observées au niveau du site d'utilisation (fixe), et de l'autre des tests en dynamique ont permis de simuler une dégradation accélérée (sous agitation) afin de prévoir le comportement des matériaux à plus long terme. Par comparaison avec des matériaux non traités, la biodégradabilité des matériaux oxydés par le periodate, a été démontré à pH physiologique et à pH acide. Ces matériaux ont aussi fait l'objet d'une étude de dégradation *in vivo* lors d'une implantation dans le condyle fémoral du lapin [Laurence, 54]. Bien que des observations au microscope photonique aient montré une dégradation des parois celluloses, cette dégradation reste beaucoup plus lente que celle observée *in vitro* en conditions simulées.

4.3.3. Réticulation par le collagène

Le collagène de type I est le composant principal de la matrice extracellulaire de la plupart des tissus conjonctifs. Ses propriétés physico-chimiques, sa résistance mécanique, ses propriétés biologiques, son faible caractère immunogène et son pouvoir hémostatique, font du collagène de type I un excellent candidat pour la fabrication de biomatériaux.

4.3.3.1. Définition, structure et classification

L'une des caractéristiques du collagène est sa structure en triple hélice rigide (figure 26). Cette conformation résulte de l'association de trois chaînes polypeptidiques nommées chaînes α [Miller, 125]. Le motif répétitif caractéristique de chaque chaîne α est : $-(\text{Gly-X-Y})_n-$, où les résidus amino-acides X et Y sont, dans la plupart du temps, respectivement des résidus prolyl et hydroxyprolyl qui stabilisent cette structure [Miller, 125; Van Der Rest et al., 126]. Pour des raisons d'encombrement stérique, les résidus glycyll occupent le centre de l'hélice et les résidus amino-acides situés en X et Y sont exposés à la surface de la protéine, avec leurs chaînes latérales dirigées vers l'extérieur. Cette situation offre un fort potentiel d'interactions latérales avec des molécules adjacentes, sous la forme de liaisons ionique, hydrogène ou hydrophobe.

A l'heure actuelle, plusieurs types de collagène ont été décrits [Myllyharju et al., 127]. Ils possèdent des domaines en triple hélice, ainsi que des zones globulaires, qui conditionnent leurs caractéristiques et leurs propriétés.

Les collagènes peuvent être classés en deux grands groupes (figure 27.) :

- les collagènes fibrillaires [Lethias et al., 128] (types I, II, III, V et XI), caractérisés par des triples hélices continues ou très partiellement interrompues par des domaines non hélicoïdaux, sont le plus souvent associés en fibrilles formant l'ossature de la matrice extracellulaire. Ils sont présents de façon majoritaire dans les tissus.

- les collagènes non fibrillaires [Lethias et al., 128], caractérisés par de fréquentes interruptions de la triple hélice, sont formés de réseaux ou de filaments (types IV, VI, VIII et X) ou sont associés aux fibres (types IX, XI, XIV et XIX).

Les collagènes se distinguent par leur structure primaire, leur concentration, leur localisation tissulaire et leur fonction [Van Der Rest and Garrone, 126].

4.3.3.2. Propriétés

Le collagène de type I est choisi préférentiellement comme support de la croissance osseuse pour le comblement de défaut osseux car il est un constituant essentiel de l'os.

4.3.3.2.1. Propriétés physiologiques

La principale fonction des collagènes fibrillaires est de fournir aux tissus une assise à la fois résistante et souple. Les autres molécules de la matrice extracellulaire (fibronectine, vitronectine, laminine...) se mettent entre les fibres de collagène, fixent les molécules d'eau, gonflent et maintiennent l'ensemble de la matrice extracellulaire dans un état de rigidité et en même temps d'élasticité indispensable au rôle de support des couches cellulaires [Montes et al., 129]. Présent dans pratiquement tous les tissus, le collagène de type I est quantitativement majoritaire dans les tissus où il assure un rôle mécanique structural essentiel comme pour la peau, les tendons, l'os et les vaisseaux [Montes and Junqueira, 129; Ramshaw et al., 130].

Le collagène assure également un rôle important dans la croissance et la différenciation cellulaires [Grinnell, 131]. Constituant présent dans toutes les matrices extracellulaires, il est le support naturel des mouvements cellulaires qui ont lieu notamment : au cours du développement embryonnaire, ou au cours de processus normaux (phénomènes inflammatoires, cicatrisation), ou de processus pathologiques (cancer).

Plus spécifiquement, les fibres de collagène de type I constituent des supports de fixation cellulaire. Dans le tissu conjonctif mou, les fibroblastes possèdent des interactions multiples avec ces fibres, qu'elles synthétisent et qui contrôlent leur propre synthèse. Grâce aux relations étroites existantes avec ces cellules, les molécules de collagène vont avoir un rôle informatif.

En cas de lésion tissulaire, la synthèse de collagènes fibrillaires, et plus particulièrement celles du collagène de type I est activée [Silver et al., 132]. Ces molécules participent à la construction du tissu cicatriciel et contribuent efficacement à la réparation tissulaire grâce à leur résistance mécanique. En cas de lésion vasculaire, le collagène de type I est également connu pour ses propriétés hémostatiques car il est capable de provoquer l'adhésion des plaquettes, leur activation et l'agrégation qui en résulte [Kawamoto et al., 133].

4.3.3.2.2. Biocompatibilité et adhésion cellulaire

Le collagène de type I est une molécule faiblement immunogène [Ramshaw et al., 130; Miyata et al., 134]. La réponse immunitaire induite par le collagène pourrait être fortement diminuée par le processus de réticulation [Ramshaw et al., 130; Miyata et al., 134].

In vitro, le collagène de type I se révèle être un bon substrat en culture cellulaire pour l'étude de l'adhésion et de la différenciation cellulaires. Un tel substrat permet de maintenir la structure et les caractères de différenciation de différentes cellules [Strom et al., 135].

4.3.3.2.3. Biodégradation

Comme toutes les molécules biologiques, les molécules de collagène sont la résultante de cycles de synthèse / résorption, qui sont mis en jeu lors des phénomènes de croissance et de remodelage des tissus, lors du vieillissement, ainsi que lors de processus de cicatrisation [Ramshaw et al., 130]. Au sein des tissus, le collagène de type I peut être dégradé par des processus métaboliques : au niveau extracellulaire par la mise en jeu d'enzymes spécifiques, et au niveau cellulaire par le phénomène de phagocytose [Ramshaw et al., 130; Miyata et al., 134]. Ces enzymes sont sécrétées par différents types cellulaires, dont les fibroblastes, les chondrocytes et certaines cellules du système immunitaire telles que les macrophages.

Ces différents types de dégradation pourraient être mis en jeu lors de l'implantation *in vivo* d'un matériau à base de collagène. Le taux de résorption du collagène de type I constituant un biomatériau est fonction du site d'implantation. En effet, les tissus fortement vascularisés dégradent plus vite le collagène implanté que les tissus pauvres en vaisseaux sanguins.

4.3.3.3. Biomatériaux à base de collagène

Les applications envisagées (tableau 6.) pour les matériaux à base de collagène sont très variées et résultent directement des propriétés physico-chimiques et biologiques du

collagène : faible caractère immunogène, biodégradable, propriétés hémostatiques, interaction avec les cellules...

L'emploi du collagène en solution injectable pour la chirurgie esthétique, est l'une des applications les plus médiatisées, mais il joue également un rôle important en tant qu'éponge hémostatique en chirurgie dentaire. Les pansements Promogran[®] [Watt et al., 117] en cellulose/collagène créent un environnement favorable à la guérison de blessures chroniques (figure 24.) [Hart et al., 118; Cullen et al., 119] (voir *la première partie Etude Bibliographique : 4.2.1.2. Méthodes chimiques de réticulation*). En plus des propriétés hémostatiques, anti-bactériennes et de dégradation apportées par la cellulose oxydée, le collagène joue un rôle chimiotactique vis-à-vis des cellules.

Dans le domaine de la recherche, les biomatériaux à base de collagène connaissent un essor en ingénierie tissulaire [Choi et al., 136] qui tend à développer des substituts bioartificiels en vue de restaurer, de maintenir et d'améliorer une fonction tissulaire. Le collagène, principal constituant de la matrice extracellulaire, est par conséquent un candidat idéal pour ces systèmes. Dans le but d'exploiter ses caractéristiques, des substituts cutanés ont été développés pour une utilisation dans les soins des grands brûlés, mais aussi pour l'étude *in vitro* d'effets cytotoxiques de produits pharmaceutiques et cosmétiques [Augustin et al., 137]. Une autre voie de recherche envisagée est la réalisation de cultures tridimensionnelles, qui reconstitueraient les systèmes connus par les cellules *in vivo* et qui permettraient d'assurer le maintien de leur différenciation. Utilisés en tant que modèles, ces réseaux permettent l'étude *in vitro* de l'influence sur les cellules, des tensions mécaniques, comparables à celles exercées au sein des tissus [Prajapati et al., 138].

DEUXIEME PARTIE :
MATERIELS ET METHODES

Deuxième partie : Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Elaboration des implants

La viscose est fournie dans des poches de congélation, par la société VISKASE, spécialisée dans la fabrication de boyaux alimentaires (Beauvais). Elle est stockée à -20 °C au congélateur.

Compte tenu de la réglementation dans le domaine alimentaire, les éléments extrêmement toxiques comme le mercure (Hg), l'arsenic (As) et le plomb (Pb) ne sont pas présents en teneur quantifiable dans le produit de base. "Le polluant" qui pourrait par sa présence ou son relargage dans le tissu provoquer une réaction inflammatoire et donc entraîner une non-biocompatibilité du matériau, est le soufre et ses dérivés qu'il convient d'éliminer. Les caractéristiques physico-chimiques de la pâte viscose sont présentées dans le tableau 7.

Les granules de carbonates de calcium utilisées -comme agents porogènes pour former un treillis tridimensionnel préfigurant la porosité du matériau- sont fournies par Provençale s.a., France, sous le nom de Mikhart 0.35-0.7 (diamètre de 250 à 900 μm). Préalablement à leur utilisation, les granules ont été tamisées en 2 lots (1) et (2) à l'aide d'un tamis de 500 μm de maillage. On dispose donc de trois lots de granules de CaCO_3 pour réaliser trois lots de pastilles de cellulose macroporeuse de porosité différente :

(1) de 500 à 900 μm

(2) de 250 à 500 μm

(1+2) de 250 à 900 μm .

1.2. Biofonctionnalisation de la surface de cellulose

1.2.1. Greffage de peptides RGD

Les molécules silanes (aminopropyltriéthoxysilanes, APTES) employées ont été fournies par Roth-Sochiel, France, et sont utilisées sans aucune purification.

L'agent intermédiaire employé, le succinimidylmaléimidepropionate (SMP) a été fourni par Aldrich, France.

Les peptides RGDC et GRGDSPC ont été fournis par Bachem, France.

La ³⁵S-Cystéine a été fournie par NEN, Perkin Elmer, Belgique.

1.2.2. Phosphatation, pré-incubation dans une solution de calcium et minéralisation

L'hexanol, le P₂O₅, le Et₃PO₄ et le H₃PO₄ à 85 % employés ont été fournis par Merck, France.

La solution de calcium de concentration C = 0.05 M, est préparée à partir de pastilles de CaCl₂ (fournies par Aldrich, France). Puis la solution est rendue stérile par filtration sous vide dans un filtre Büchner stérile (porosité de la membrane : 0.2 mm).

Le NaCl, NaHCO₃, K₂HPO₄, MgCl₂, et Na₂SO₄ employés ont été fournis par Merck (France), et le KCl et TRIS par Sigma (France), et le CaCl₂ par Aldrich (France).

La dilution de SBF a été préparée suivant le protocole de l'annexe 1.

1.2.3. Réticulation de la cellulose

Le HIO₄ employé a été fourni par Aldrich, France.

La solution d'albumine de concentration C = 10 mg/ml, est préparée à partir de poudre d'albumine bovine fournie par Aldrich, France.

L' ¹²⁵Iode a été fourni par la Société Amersham Biosciences, France.

La solution tampon a été préparée suivant le protocole de l'annexe 2.

1.3. Biocompatibilité *in vitro*

Depuis plusieurs années, l'U577 INSERM s'intéresse à l'adhésion des cellules ostéoprogénitrices humaines isolées à partir de la moelle osseuse humaine sur différents supports (protéines de la matrice extracellulaire, matériaux de comblement osseux) [Verrier et al., 63]. Ces cellules ont pour devenir d'être ostéoblastes et sont susceptibles de fabriquer une matrice extracellulaire minéralisable abondante.

2. Méthodes

2.1. Conception de biomatériaux cellulotiques

2.1.1. Conception de CRV compacte

[Pommier et al., 34]

La pâte visqueuse stockée à -20 °C est mise à décongeler à $+4\text{ °C}$ pendant environ 24 heures pour lui redonner son aspect visqueux. Mais la visqueuse évolue avec le temps et a tendance à coaguler progressivement jusqu'à former un bloc compact, qu'il est impossible de laver à cœur. Pour effectuer convenablement l'opération de lavage, il faut donc incorporer à la visqueuse des additifs (du carbonate de sodium, Na_2CO_3 , et du sulfite de sodium, Na_2SO_3), avant que la viscosité n'atteigne une valeur trop élevée. Ces sels vont provoquer la précipitation des polysulfures et le dégazage du soufre sous la forme d'hydrogène sulfuré.

On additionne donc 2 g/l de sels Na_2CO_3 et 10 g/l de sels Na_2SO_3 à 1 l de pâte cellulotique dans un mélangeur – batteur. Le produit doit être rendu homogène avec élimination des éventuels agrégats de sels. L'homogénéisation dure 30 min pour 0.5 l de pâte.

On répartit alors la cellulose dans des moules dont les formes préfigureront les échantillons à obtenir. De façon à avoir des petites pastilles rondes de cellulose de 1.3 cm de diamètre, on a utilisé comme moules, des boîtes de culture en polystyrène de 48 puits.

On procède ensuite à l'étape de dégazage, qui consiste à introduire les moules dans un dessiccateur relié à une trompe à vide. Une fois le vide obtenu, il est maintenu jusqu'à disparition totale des bulles. De manière à poursuivre le dégazage et à coaguler la cellulose

plus rapidement, on peut placer les moules dans un bain-marie à + 80 °C, pendant 1 heure. Puis les moules sont laissés à température ambiante toute la nuit. Enfin on termine le dégazage en mettant les moules dans une étuve chauffée à + 50 °C, pendant 24 heures.

Les matériaux forment des blocs, qui sont alors démoulés et lavés par bains successifs. Pour procéder au lavage des échantillons, on les plonge dans des béchers contenant de l'eau déionisée, renouvelée régulièrement. Ces béchers sont agités et chauffés dans un bain-marie à + 80 °C. La coloration des solutions recueillies est un bon moyen pour vérifier la qualité du lavage. En effet, elles présentent un dégradé de couleur de l'orange soutenu dans les premières heures, au jaune clair au bout de 48 heures. Le lavage a cependant été poursuivi pendant une semaine afin d'éliminer tout le soufre contenu dans les échantillons.

Les pastilles de cellulose sont conservées à + 4 °C dans un flacon hermétique rempli d'eau déionisée.

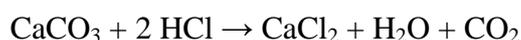
2.1.2. Conception de CRV macroporeuse

[Bartouilh de Taillac et al., 139]

Les échantillons à macroporosité contrôlée et interconnectée sont obtenus en utilisant des granules calibrées de carbonate de calcium (CaCO₃) comme agents porogènes lors de l'étape de moulage du matériau. Les granules compactées dans un corps de seringue forment un treillis tridimensionnel préfigurant la porosité du matériau. On injecte à l'intérieur de ce treillis de la cellulose qui va "coaguler" dans l'espace laissé vacant par le carbonate de calcium [Bruneteau et al., 53; Fricain et al., 55; Bartouilh de Taillac et al., 139].

On procède ensuite à l'étape de dégazage et de coagulation de la cellulose, qui consiste à introduire les moules dans une étuve chauffée à + 50 °C, pendant 24 heures [Pommier et al., 34].

Après coagulation de la cellulose, les matériaux sont démoulés et les grains de carbonate de calcium dissous dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) de concentration 3 M [Bruneteau et al., 53; Fricain et al., 55]. Il se produit alors un dégazage de CO₂ et la formation de molécules d'eau et de sels de CaCl₂ solubles dans l'eau (et donc éliminés par rinçage) suivant la réaction :



Le dégazage du CO₂ est amélioré en plaçant les échantillons dans un dessiccateur relié à une trompe à vide. Puis afin d'éliminer l'excès de HCl ainsi que les sels de CaCl₂, les échantillons macroporeux obtenus vont être lavés par bains successifs d'eau déionisée.

Les pastilles sont ensuite congelées, puis séchées dans un lyophilisateur pendant 15 heures pour être placées par la suite dans une boîte en polypropylène jusqu'à leur utilisation.

Trois groupes de pastilles de cellulose macroporeuse de porosité différente ont été réalisés en fonction du diamètre des granules de la matrice inverse utilisée lors de leur fabrication :

- (1) de 500 à 900 µm
- (2) de 250 à 500 µm
- (1+2) de 250 à 900 µm.

2.2. Nettoyage de la cellulose

Les pastilles de cellulose sont tout d'abord immergées dans de l'eau déionisée pendant 24 heures, puis dans une solution de méthanol pendant 24 heures, avant d'être extraites pendant 24 heures dans un Soxhlet au méthanol afin d'éliminer toutes traces d'impuretés (figure 28.). L'extracteur Soxhlet présente comme avantage de nettoyer le matériau de nombreuses fois, tout en utilisant le même solvant pur. Le but de ce pré-traitement est d'obtenir un maximum de sites -OH réactifs à la surface de la cellulose en la débarrassant des pollutions résiduelles de carbone, azote, soufre, ... Cela doit permettre d'aboutir à un taux maximum de chaînes sur le support. Il est important aussi de valider une méthode de nettoyage pour que les matériaux " débutent " toujours avec la même " histoire " d'un point de vue chimique, thermique...

Avant toute autre utilisation, les échantillons sont replacés dans un dessiccateur.

2.3. Biofonctionnalisation de la surface de cellulose

2.3.1. Greffage de peptides RGD

La méthodologie de greffage utilisée se découpe en 3 étapes (figure 29.) [Bartouilh de Taillac et al., 139; Bartouilh de Taillac et al., 140] :

- Des molécules silanes de l'aminopropyltriéthoxysilanes (APTES) sont tout d'abord greffées sur les fonctions hydroxyle présentes en surface de la cellulose afin de fournir des groupements réactifs $-NH_2$ à sa surface.

- Par la suite, un groupement chimique intermédiaire [Shriver-Lake et al., 141] va permettre la fixation des peptides sur la surface de cellulose. Dans un premier temps la fonction ester succinimide de l'espaceur (le succinimidylmaléimidopropionate, SMP) va venir réagir avec le groupement amine de l'APTES présent à la surface de la cellulose modifiée.

- Ensuite l'immobilisation du peptide va se faire sur le groupement maléimide de l'espaceur par l'intermédiaire du groupement thiol $-SH$ de la cystéine participant à la structure de l'oligopeptide à fixer suivant une addition Michael (figure 30.) [Elbert et al., 142].

L'agent hétéro-bifonctionnelle utilisé présente une structure et une conformation telles qu'il offre un grand degré de liberté stérique à la surface du matériau pour la fixation de biomolécules. La liaison avec le peptide contenant le motif RGD et l'acide aminé cystéine est alors facilitée.

La modification de la surface de cellulose comprend plusieurs étapes. La totalité de ce traitement est réalisée dans une enceinte sous atmosphère (argon), température (de la température ambiante à 70 °C), pression (de la pression atmosphérique à 10^{-5} Torr) contrôlées, ce qui permet une parfaite maîtrise des paramètres de greffage.

Tout d'abord, les échantillons sont dégazés à 10^{-5} Torr pendant 15 heures à 70 °C. Ce traitement thermique ou déshydratation permet d'éliminer une partie de l'eau adsorbée à la surface [Simon et al., 143].

2.3.1.1. Greffage de molécules silanes

Les molécules silanes APTES sont liées de manière covalente à la surface du matériau en immergeant la cellulose dans une solution de silane / toluène anhydre ($C = 1.2 \cdot 10^{-2}$ M), sous atmosphère d'argon, sous agitation, pendant 1h30. Après réaction, les échantillons sont rincés plusieurs fois sous agitation dans le toluène sous atmosphère d'argon, avant d'être soniqués pendant 10 minutes. Pour finir, ils sont mis à dégazer pendant 4 heures, à 50 °C, sous vide à 10^{-5} Torr.

A ce stade, la réaction de silanisation est terminée (figure 29.II).

2.3.1.2. Greffage de l'agent intermédiaire

Après le greffage de l'APTES, on effectue le greffage d'un agent intermédiaire hétéro-bifonctionnel, ici le succinimidylmaléimidepropionate (SMP) sur le site $-NH_2$ du silane.

Pour cela, on immerge la surface silanisée dans une solution de SMP / DMF anhydre (diméthylformamide, $C = 2 \cdot 10^{-3}$ M), sous atmosphère d'argon, sous agitation, pendant 1h30. Après la réaction, les échantillons sont rincés plusieurs fois sous agitation dans du DMF sous atmosphère d'argon, avant d'être soniqués pendant 10 minutes. Puis pour finir, ils sont mis à dégazer pendant 4 heures, à 50 °C, sous 10^{-5} Torr (figure 29.III).

2.3.1.3. Greffage de peptides (contenant le motif RGD) ou de ^{35}S -Cystéine

La troisième étape du traitement consiste :

- soit à greffer le peptide RGDC contenant la séquence $-RGD-$ par l'acide aminé terminal, la Cystéine, en formant une liaison entre la fonction thiol et le groupement maléimide de l'agent intermédiaire,
- soit à greffer un seul acide aminé, la ^{35}S -Cystéine (^{35}S -Cys).

a) Greffage du peptide RGDC

Après le greffage de l'APTES et du SMP, on effectue le greffage du peptide d'adhésion contenant le motif Arg-Gly-Asp (RGD) (figure 30.).

Pour cela, on immerge la cellulose prémodifiée dans une solution de RGD / DMF anhydre (diméthylformamide, $C = 10^{-3}$ M), sous atmosphère d'argon, sous agitation, pendant 18 heures. Après la réaction, les échantillons sont rincés plusieurs fois sous agitation dans du DMF, avant d'être soniqués pendant 10 minutes (figure 29.IV).

b) Greffage de la Cystéine marquée au ^{35}S

De la même manière que pour le greffage du peptide RGD, on effectue le greffage de la ^{35}S -Cystéine.

Pour cela, on immerge une plaque de cellulose compacte greffée avec l'APTES et le SMP dans une solution de ^{35}S -Cystéine ($C = 10^{-3}$ M), sous atmosphère d'argon, sous agitation, pendant 18 heures. Après la réaction, les échantillons sont rincés plusieurs fois sous agitation dans de l'eau, avant d'être soniqués pendant 10 minutes (figure 29.IV).

La radioactivité de la solution de ^{35}S -Cystéine est de 4 μCi /ml. La quantité C (en pmol/mm^2) de Cystéine marquée au ^{35}S greffée à la surface de la plaque de cellulose a été calculée d'après la formule suivante :

$$C = \frac{A \times C_0}{A_0}$$

Avec A : activité des échantillons traités (en cpm/mm^2)

C_0 : concentration en ^{35}S -Cystéine dans la solution d'incubation (en g/l),

avec $C_0 = 10^{-3}$ M soit 0.107 g/l

A_0 : activité pour 1 ml de la solution mère (en cpm/l). Cette activité a pu être déterminée à partir d'une courbe étalon réalisée avec plusieurs solutions diluées reliant les μCi aux cpm. Soit $A_0 = 4.75 \cdot 10^8$ cpm/l.

Une gamme étalon de la solution de ^{35}S -Cystéine a été réalisée afin d'évaluer la radioactivité présente en surface de la cellulose marquée.

Afin de vérifier la stabilité du greffage dans le temps et dans des conditions rigoureuses, la lame de cellulose greffée de ^{35}S -Cystéine a été immergée dans de l'eau déionisée sous agitation.

2.3.2. Phosphatation et minéralisation de la cellulose

2.3.2.1. Phosphatation

Les matériaux de cellulose macroporeuse obtenus sont gonflés successivement dans de l'éthanol pendant 24 heures, puis dans de l'hexanol pendant 24 heures, avant toute modification chimique [Granja, 92; Granja et al., 93]. La réaction de phosphatation (voir *la première partie Etude Bibliographique : 4.1.2.1. Phosphates et cellulose phosphatée*) se fait dans un réacteur à doubles parois, équipé d'une entrée d'azote, d'un condensateur, d'un système de refroidissement d'un agitateur mécanique et d'une ampoule à brome (figure 31.). Les implants en CRV sont tout d'abord immergés dans 30 ml d'hexanol placé préalablement dans le réacteur. Puis une solution de pentaoxyde de phosphore (50 g) mélangé dans 37 ml de triéthylphosphate et 42 ml d'acide phosphorique à 85 %, est ajoutée à la suspension (figure 21.). La réaction est poursuivie pendant 8 heures à une température constante de 25 °C, sous courant d'azote et agitation constante. La CRV phosphatée (CRV-P) alors obtenue est rincée avec de l'hexanol et de l'éthanol plusieurs fois. Enfin, elle est lavée avec de l'eau déionisée, au moins pendant 24 heures, afin d'enlever l'excès de H_3PO_4 . Ce lavage est poursuivi jusqu'à ce que des tests détectant les phosphates inorganiques soient négatifs. Les matériaux modifiés sont alors séchés à température ambiante dans un dessiccateur [Granja, 92; Granja et al., 93].

2.3.2.2. Préparation des échantillons pour les différents traitements

Afin de limiter les risques de contamination bactérienne et autres, toutes les expérimentations suivantes ont été réalisées dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire.

Pour la phase de minéralisation des matériaux, les échantillons de cellulose sont fixés de façon verticale dans des tubes de centrifugation (figure 32.). En effet, lors de l'immersion des échantillons dans du SBF, il est important de ne pas provoquer de précipitation, mais la formation de phosphate de calcium (voir *la première partie Etude Bibliographique : 4.1.2.3. Rôle de la phosphatation dans la promotion de la minéralisation*).

L'ensemble échantillon / tube est ensuite stérilisé par exposition à un rayonnement de source γ pendant 8 heures avec une dose de 25 kGray (kGy). Ces irradiations ont été réalisées au sein de l'unité 577 INSERM qui dispose d'une source de Césium 137 (IBL 337 de Cis Bio International) avec un débit de dose d'environ 2.5 kGy/h.

2.3.2.3. Pré-incubation dans la solution de calcium

La cellulose phosphatée chargée négativement est alors neutralisée par formation d'un sel de calcium de cellulose phosphatée (voir *la première partie Etude Bibliographique : 4.1.2.3. Rôle de la phosphatation dans la promotion de la minéralisation*).

Les matériaux sont immergés pendant 3 jours, à 37 °C, dans 14 ml d'une solution de CaCl_2 (C = 0.05 M). La solution est renouvelée toutes les 24 heures [Granja et al., 86; Granja et al., 111].

Chaque pastille est ensuite rincée avec de l'eau déionisée stérile.

2.3.2.4. Minéralisation

Après les 3 jours de pré-incubation dans la solution de CaCl_2 , les matériaux sont immergés pendant 14 jours, à 37 °C, dans 14 ml de SBF de pH = 7.4. La solution renouvelée toutes les 48 heures est ajustée à une température de 37 °C et à un pH de 7.4 avant chaque utilisation [Granja et al., 86; Granja et al., 111].

Après 14 jours de minéralisation (voir *la première partie Etude Bibliographique : 4.1.2.3. Rôle de la phosphatation dans la promotion de la minéralisation*), chaque pastille est ensuite rincée avec de l'eau déionisée stérile et séchée à température ambiante avant sa caractérisation.

2.3.3. Réticulation de la cellulose par les protéines

2.3.3.1. Oxydation de la cellulose

Les échantillons de cellulose macroporeuse sont traités pendant 1h30 avec 10 ml d'acide periodique (HIO_4) à différentes concentrations (0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.25 M et 0.5 M) (figure 25.a) (voir *la première partie Etude Bibliographique : 4.2.1.3. Oxydation de la cellulose par l'acide periodique HIO_4*). Puis afin d'éliminer l'excès de HIO_4 , les échantillons obtenus sont lavés par bains successifs d'eau déionisée.

Les pastilles sont ensuite congelées, puis séchées dans un lyophilisateur pendant 15 heures pour être placées dans un dessiccateur avant toute utilisation.

Un dosage des fonctions aldéhyde a permis de déterminer le degré d'oxydation de chaque matériau. Et l'immersion de ces matériaux dans du Réactif de Schiff, a permis de confirmer la présence ou non des fonctions aldéhyde, et de mettre en évidence la répartition de ces fonctions dans l'implant.

2.3.3.2. Réticulation par l'albumine

Le protocole de réticulation de la cellulose oxydée a été mis au point avec une protéine modèle, l'albumine bovine.

Les échantillons de cellulose oxydée sont incubés pendant 24 heures à température ambiante dans 10 ml d'une solution d'albumine bovine de concentration $C = 10$ mg/ml (figure 25.b) (voir *la première partie Etude Bibliographique : 4.2.1.2. Méthode chimique de réticulation*). Puis ils sont congelés et lyophilisés.

2.4. Caractérisations physico-chimiques

2.4.1. Etude de la porosité des matériaux

2.4.1.1. Granulométrie laser

a) Principe

La granulométrie a pour objet la détermination de la taille des particules élémentaires qui constituent les ensembles de grains de substances diverses telles que poudres, sable,... et la fréquence statistique des différentes tailles de grains dans l'ensemble étudié [Cho et al., 144].

Lorsque l'on souhaite définir la taille d'une particule, le problème de sa forme apparaît immédiatement. En effet, une particule non poreuse parfaitement sphérique peut être caractérisée par une seule grandeur : son rayon r . De cette valeur, il sera possible de déterminer avec exactitude : son volume, sa surface... selon la grandeur qui sera la plus pertinente pour le système étudié. Mais si les particules ne sont pas sphériques, le nombre de paramètres permettant de définir la particule augmente rapidement. En effet, supposons que notre particule puisse être observée par microscopie. Cette technique nous donne une projection 2D de la particule. Si l'on souhaite toujours décrire la particule avec un seul paramètre, il est possible de la décrire soit par la sphère de plus petit diamètre inscrite dans la particule, soit par la sphère de plus grand diamètre dans laquelle peut être inscrite la particule, soit par une sphère dont la masse serait équivalente à celle de la particule... Il est clair que la

notion de taille devient ambiguë et il est important lors de toute détermination de bien le préciser.

La technique de la granulométrie laser est basée sur les éléments fondamentaux développés dans les théories de diffraction de Fraunhofer [de Boer et al., 145] et de diffusion de Mie et Rayleigh [Cho and Choi, 144; de Boer et al., 145] d'un faisceau laser.

La théorie de Fraunhofer [de Boer et al., 145]

Pour l'application de cette théorie, les hypothèses suivantes sont nécessaires :

- les particules sont sphériques, non poreuses et opaques,
- le diamètre des particules est supérieur à la longueur d'onde,
- le mouvement est aléatoire et toutes les particules diffractent la lumière avec la même efficacité quelle que soit leur taille.

Lorsqu'une particule est éclairée par un faisceau de lumière cohérente et monochromatique, il apparaît un motif de diffraction sous forme de franges concentriques alternativement claires et sombres (figure 33.). Selon la théorie de Fraunhofer, l'intensité du rayonnement diffracté est une fonction du rayon des particules. L'angle de diffraction, défini par le premier point d'annulation, est d'autant plus grand que les particules sont petites.

Dans cette étude, notre intérêt s'est porté plus particulièrement sur l'application de la théorie de Mie et Rayleigh qui tient compte des phénomènes de diffusion.

La théorie de Mie et Rayleigh [Cho and Choi, 144; de Boer et al., 145]

Dès que le diamètre des particules est très inférieur à la longueur d'onde, la technique de diffraction laser doit céder la place à la spectrométrie par corrélation de photons qui utilise les approximations de Rayleigh. Pour des particules de taille proche de la longueur d'onde utilisée, la théorie de Mie (1908) apporte une précision indispensable.

En effet, la lumière laser n'est pas seulement diffractée par la particule, mais elle est aussi réfléchi et diffusée (figure 34.).

Cela signifie que le faisceau laser traversant la cellule d'analyse va se propager sans déflexion jusqu'à ce qu'il rencontre une particule dont l'indice de réfraction est différent de l'indice de la phase continue. Ce changement d'indice crée une réfraction du faisceau laser. Cette partie réfractée de lumière pénétrant dans la particule va ressortir en étant toujours soumise aux phénomènes de réflexion et réfraction dus à la différence des milieux. Le

faisceau va enfin arriver sur le détecteur en ayant subi plusieurs variations de son axe de propagation (figure 35.). Il est alors bien évident que l'application de la théorie de Mie nécessite la connaissance des propriétés optiques des particules et du milieu de dispersion. L'indice de réfraction est un nombre complexe, sa partie réelle représente le rapport des vitesses de la lumière entre le milieu et la particule, sa partie imaginaire représente l'adsorption du matériau.

b) Protocole

L'appareil utilisé pour la réalisation des tests est un granulomètre laser Mastersizer 2000 de Malvern Instruments SA. Il est constitué principalement :

- d'un banc d'optique avec l'émetteur de source laser ; la zone d'échantillonnage composée de lentilles interchangeable en fonction de la plage étudiée et de cellules de mesure en fonction du mode de mesure utilisé, par voie sèche ou voie humide ; le récepteur composé d'un ensemble de photodiodes,

- des accessoires de préparation pour la voie sèche par dispersion de l'échantillon assurée par de l'air et pour la voie humide par circulation des particules dans un dispersant,

- d'un système informatique avec logiciel assurant le traitement des données brutes.

Après avoir vérifié le bruit de fond, l'échantillon est introduit dans la cellule de mesure pendant une période de "mesure inspection" qui correspond à une concentration optimale de la poudre au niveau de la cellule. L'optimisation souhaitée est donnée sous forme de barre graphe. Le déclenchement de la mesure se fait sous forme de capture d'image de diffusion du faisceau traversé par les particules (données brutes). Par la suite, un logiciel convertira les données brutes en données exploitables. Les principales données retenues sont :

- D10 = taille de particule pour laquelle 10 % de l'échantillon se trouve en dessous de cette dimension,

- D50 = taille de particule pour laquelle 50 % de l'échantillon a une taille inférieure et 50 % de l'échantillon a une taille supérieure. C'est le diamètre médian (MMD, Mass Median Diameter),

- D90 = taille de particule pour laquelle 90 % de l'échantillon se trouve en dessous de cette dimension.

- Le span est la mesure de la largeur de la distribution et sa valeur est :

$$\text{span} = \frac{D90 - D10}{D50}$$

Ici seule la voie sèche sera utilisée pour caractériser la taille des grains de la poudre de CaCO_3 (indice de réfraction de 1.5723) par application de la théorie de Mie et Rayleigh. Ces analyses ont été effectuées à l'Institut de Chimie et de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB), à Pessac.

2.4.1.2. Porosimétrie à mercure

a) Principe

Un porosimètre à mercure permet de déterminer la taille et le volume des pores. Son principe a été suggéré en 1921 par Washburn [Washburn, 146] et appliqué expérimentalement à des échantillons de bauxite¹⁵ et d'argile.

Le principe de cette technique est basé sur la loi gouvernant la pénétration capillaire d'un liquide non mouillant, tel le mercure dans des pores cylindriques. La pression nécessaire pour forcer le liquide à pénétrer dans les pores est inversement proportionnelle à leur rayon.

L'échantillon, de volume connu, est placé dans une cellule dans laquelle règne le vide. Il est mis en présence de mercure qui ne pénètre pas dans les pores du fait de son angle de contact supérieur à 90 °. Pour le faire pénétrer, il faut utiliser une pression d'autant plus grande que les pores à remplir seront petits. Le vide ayant été suffisamment poussé dans la cellule, les seules forces s'opposant à la pénétration du mercure sont d'ordre capillaire. En supposant que le ménisque du mercure est sphérique et que les pores sont cylindriques, leur rayon r est lié à la pression de mercure P_{Hg} par la relation de Washburn [Washburn, 146] :

$$P_{\text{Hg}} = \frac{2\gamma \cos \theta}{r}$$

¹⁵ Roche renfermant surtout de l'alumine hydratée, plus ou moins mêlée d'oxydes de fer et de silicium.

avec γ : tension superficielle du mercure

θ : angle de contact entre le bord du ménisque du mercure et la paroi

Le volume de mercure V pénétrant dans les pores et la pression appliquée sont mesurés simultanément (figure 36.). Le porosimètre fournit donc une série de mesures du couple (P_{Hg} , V) qui va permettre de caractériser la structure poreuse et la distribution de la taille des pores, moyennant certaines hypothèses sur la forme des pores (capillaires cylindriques). Les pores ne sont généralement pas cylindriques mais cette hypothèse simplificatrice permet toutefois de classer les matériaux. La porosimétrie permet également d'obtenir la surface spécifique en fonction de la taille des pores, et donc la surface spécifique totale.

b) Protocole

Les mesures ont été réalisées grâce à un appareil AutoPore IV de Micromeritics. Le dispositif est composé d'une cellule destinée à recevoir l'échantillon, d'une pompe à vide, de deux systèmes de pressurisation (l'un pour les basses pressions et l'autre pour les hautes pressions), et d'appareils de mesure de pression et de volume.

➤ Analyse basse pression

L'échantillon poreux est pesé puis placé dans un pénétromètre, comprenant une cellule d'analyse et une tige de verre calibrée dont la surface externe est métallisée (figure 36.). Ce pénétromètre doit être choisi en fonction de la taille de l'échantillon et de sa porosité, paramètres conditionnant la quantité de mercure nécessaire à la mesure.

Le pénétromètre est alors introduit dans la chambre de basse pression, puis mis sous vide. Il se remplit alors automatiquement de mercure, puis une pression de l'ordre de 10^5 Pa est graduellement appliquée. A chaque pas de pression, un volume de mercure pénètre dans l'échantillon. Le volume de mercure restant dans la tige du pénétromètre est mesuré en déterminant la capacitance électrique. Cette capacitance varie avec la longueur de la tige du pénétromètre remplie avec du mercure.

Quand celui-ci est initialement rempli de mercure, le mercure occupe la totalité de la tige. Lorsque la pression croît, le mercure pénètre dans l'échantillon, et le volume de mercure dans la tige du pénétromètre diminue d'une quantité égale au volume des pores remplis. Cette

diminution de la longueur occupée par le mercure dans la tige se traduit par une diminution de la capacité du pénétromètre. Le logiciel convertit cette mesure de capacitance en volume de mercure introduit dans les pores de l'échantillon.

➤ Analyse haute pression

Une fois la mesure sous basse pression effectuée, le pénétromètre est pesé, puis il est placé dans une chambre haute pression jusqu'à l'obtention de 420 MPa.

Ici seule l'analyse basse pression sera utilisée pour caractériser la taille des pores des échantillons de cellulose, car la macroporosité nous intéresse davantage que la microporosité de la cellulose. Ces analyses ont été effectuées au Laboratoire des Composites ThermoStructuraux (LCTS), à Pessac.

Les résultats sont alors exprimés sous forme d'un tableau associant à chaque valeur de pression un volume cumulé de mercure introduit. Le traitement de ces données permet d'atteindre, compte tenu des hypothèses, le spectre de pores en volume ou en surface de pore, la surface spécifique, la densité apparente "absolue", la porosité ouverte...

2.4.1.3. Microtomographie

a) Principe

La microtomographie permet d'étudier la microstructure de divers matériaux avec une résolution micronique, voire submicronique. C'est une technique non destructive qui se décompose en deux étapes : l'acquisition d'un millier de radiographies et l'utilisation d'un algorithme de reconstruction pour obtenir l'image en trois dimensions (3D) de l'échantillon.

Depuis leur découverte il y a plus d'un siècle, les rayons X sont utilisés pour caractériser les corps solides (radiographie, diffraction de Bragg). Depuis une vingtaine d'années on assiste à un développement continu de la tomographie d'absorption, dont l'aspect le plus connu est le scanner médical, qui permet une visualisation à trois dimensions de l'objet à étudier [Jokisch et al., 147].

Le principe de la tomographie se base sur la mesure de l'atténuation d'un rayonnement X monochromatique par un volume élémentaire de matière. Les tomographes sont constitués d'une source de rayons X, d'un plateau tournant permettant la rotation de cette source et d'un détecteur plan composé de photodiodes. Chacun des éléments sensibles (ou photodiodes) de

ce détecteur délivre un signal proportionnel à l'intensité transmise à travers l'objet. Le détecteur de type plan permet d'obtenir une image 2D appelé projection (figure 37.a). On combine alors numériquement de nombreuses vues bidimensionnelles, prises sous une multitude d'angles différents, pour fournir soit des rendus tridimensionnels, soit des coupes ou des projections suivant des directions arbitraires.

L'essor de ces techniques est bien sûr associé à celui de l'informatique. Plus récemment les progrès des sources de rayons X, et en particulier l'avènement des nouvelles sources de rayonnement synchrotron, ont permis d'atteindre des résolutions spatiales dans la gamme de 1 à 20 μm (microtomographie). Ces résolutions spatiales permettent d'aborder de très nombreux nouveaux sujets, car elles permettent la visualisation des hétérogénéités dans le volume des matériaux (inclusions, porosités, fissures, phases, ...) [Farber et al., 148].

b) Protocole

Le microtomographe utilisé est le Skyscan-1072 X-ray scanner qui possède une résolution de 5.5 à 9.5 μm . Les principaux éléments sont la source de rayons X (80 kV, de 0 à 1000 μA) couplée à un moteur permettant sa rotation et son déplacement autour de l'objet, le porte-échantillon et le détecteur (caméra 12-bit, 1024 x 1024 pixels). Ces analyses ont été effectuées par la Société Synergie 4, à Evry.

2.4.1.4. Fonctions de distribution de cordes sur un matériau poreux

a) Principe

La fonction de distribution de cordes est un outil mathématique qui va permettre de calculer la distribution de la taille des pores d'un matériau poreux [Roberts et al., 149; Pothuau et al., 150].

Les trajets de plusieurs droites d'orientation aléatoire dans un même plan, sont explorés de façon itérative à partir de l'image 2D d'un échantillon poreux (figure 37.c). A chaque intersection de ces droites avec l'interface solide/pore du matériau, va correspondre une corde de longueur donnée (figure 37.c). La distribution de longueurs de cordes $p(l)$ est évaluée à partir d'un nombre important d'itérations (plusieurs millions). Elle comptabilise la probabilité de trouver une corde de longueur comprise entre l et $l + dl$.

b) Protocole

Un programme informatique de détermination des fonctions de distribution de cordes réalisé par Laurent Pothuau [Pothuau et al., 150] au laboratoire de l'Unité 577 INSERM, est appliqué à des images digitalisées obtenues par microtomographie à rayons X. Pour chaque échantillon, la distribution de longueurs de corde $p(l)$ a été, dans notre cas, moyennée à partir de l'analyse de 7 coupes en deux dimensions.

La distribution de cordes ne donne pas une information directe sur le diamètre des pores du matériau, elle donne simplement une idée de la dimension caractéristique de ces pores. Dans l'hypothèse où le réseau de pores est constitué de formes sphériques, un calcul mathématique basé sur un théorème de stéréologie (Théorème de Cahn) permet de transformer la distribution de cordes $p(l)$ en distribution du nombre de sphères $p(s)$ de diamètre s . Ce calcul a été réalisé par Pierre Levitz au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (Ecole Polytechnique Paris).

2.4.2. Microscopie Electronique à Balayage pour l'étude de la topographie des matériaux

a) Principe

Ces analyses ne fournissent pas d'informations quant aux propriétés chimiques ou physico-chimiques de matériaux, mais sont très employées pour étudier leur texture physique. La microscopie électronique à balayage est actuellement la méthode la plus utilisée pour observer la topographie de matériaux. Un faisceau d'électrons finement focalisé balaie la surface de l'échantillon. Un détecteur mesure le flux d'électrons secondaires émis par l'échantillon irradié (figure 38.).

Le diamètre d'impact de la sonde est de 100 à quelques nanomètres ; le grossissement utile est de 30 à 50000. Tous les matériaux conducteurs ou rendus tels par dépôt d'une couche conductrice (or ou graphite) sont analysables. De plus, ils doivent supporter le vide et un bombardement électronique intense.

L'observation des dépôts biologiques nécessite une fixation et une déshydratation préalables effectuées selon des procédés préservant leur architecture.

b) Protocole

L'observation des surfaces a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique MEB Hitachi S2500, sous une tension de 20 kV.

Les surfaces à analyser ont été collées sur un porte-échantillon et l'ensemble a été soumis à une métallisation (couche d'or d'environ 80 Å) afin de permettre l'évacuation des charges qui apparaîtront en surface sous l'impact du faisceau d'électrons. L'échantillon a ensuite été introduit dans l'appareil et placé sous un vide de 10^{-6} mm Hg.

2.4.3. Etude de l'hydrophilie des matériaux

a) Principe

La mesure d'angle de contact d'un liquide avec les surfaces traitées est une excellente méthode permettant de caractériser de façon macroscopique les propriétés d'une surface. En effet, l'angle de contact d'un liquide sert principalement à évaluer sa principale propriété physico-chimique : l'énergie libre de surface, dont la valeur dépendra aussi de la composition et de la structure chimique des surfaces ainsi que de leur texture physique.

Par conséquent, sans pouvoir renseigner en détail sur les facteurs qui modifient l'angle de contact, sa variation suite à un traitement sera un bon indice concernant les modifications de surface introduites.

L'équation de Young permet de tenir compte des différentes énergies interfaciales qui déterminent la forme d'une goutte de liquide à la surface d'un solide ; elle fait intervenir les énergies de surface du solide et du liquide, ce dernier étant lui-même en équilibre avec sa phase vapeur (figure 39.).

$$\gamma_{sl} = \gamma_{sv} - \gamma_{lv} \cdot \cos\theta$$

avec s : solide

l : liquide,

v : vapeur,

γ_{sv} : énergie superficielle du solide en présence de la vapeur du liquide,

γ_{lv} : énergie de surface du liquide en équilibre avec la phase vapeur $\gamma_{lv} = \gamma_l$,

γ_{sl} : énergie interfaciale entre le solide et le liquide.

b) Protocole

Les angles de contact sont mesurés avec de l'eau sur un appareil Digitrop (GBX, Scientific Instrumentation) muni du logiciel Windrop ++ qui permet une mesure automatique des angles de contact. Le goniomètre est un appareil de mesure optique qui permet d'accéder très simplement à la valeur de l'angle de contact. Il peut être muni d'une caméra (comme dans le cas du matériel utilisé) ou d'un appareil photographique permettant de visualiser les gouttes sur un moniteur. L'ensemble est relié, à la carte de numérisation d'un ordinateur afin de pouvoir analyser l'image en direct et de pouvoir mesurer l'angle de contact entre la goutte et le solide automatiquement.

L'échantillon est déposé dans la chambre de mesure. L'aiguille de la seringue est descendue dans la cellule et une goutte d'un liquide donné est déposée sur le solide à étudier.

2.4.4. Spectroscopie électronique pour l'analyse chimique (ESCA) de la surface des matériaux

a) Principe

L'ESCA que l'on appelle aussi XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy), est une technique très puissante qui permet d'obtenir l'analyse élémentaire totale (exceptés les atomes légers d'hydrogène et d'hélium) dès le premier nanomètre de toute surface solide pouvant être

stabilisée sous vide. On trouvera dans la littérature d'excellents articles reprenant ces principes et leur application aux biomatériaux [Ratner, 151].

L'ESCA est une technique qui ne requiert pratiquement pas de préparation de la surface à analyser et qui ne l'affecte que faiblement.

Elle permet :

- de connaître à 1 % près la composition chimique du premier nanomètre d'une surface,
- de connaître les liaisons chimiques présentes dans ce volume de surface et d'évaluer leur importance relative,
- d'obtenir un profil de l'évolution de ces valeurs dans la profondeur de l'échantillon analysé au prix de la destruction progressive des couches superficielles.

➤ Analyse quantitative par ESCA

Lors d'une analyse, on place l'échantillon à étudier dans une enceinte sous vide poussé et on bombarde sa surface par un faisceau monochromatique de rayons X à haute énergie. Les photons X interagissent avec les électrons des orbitales atomiques et moléculaires présents en surface de l'échantillon (figure 40.).

De tous les photoélectrons ainsi produits, seuls ceux provenant des 5 à 10 premiers nanomètres auront suffisamment d'énergie pour émerger hors de l'échantillon et être captés par l'analyseur. Le détecteur, couplé à une électronique de comptage, va ensuite intégrer la quantité d'électrons pour chaque énergie et l'enregistreur va fournir un spectre présentant le pourcentage d'électrons enregistrés pour chaque valeur d'énergie. L'énergie des électrons est caractéristique des orbitales, et donc des atomes, dont ils proviennent, et des liaisons auxquelles ils participent. La surface des pics du spectre est proportionnelle au nombre d'électrons émis par chaque orbitale. L'intégration numérique de ces surfaces et l'emploi d'un facteur de correction (facteur de sensibilité atomique) tenant compte de la probabilité d'émission et d'absorption de chaque électron, permet de calculer à quelques pour cent près (de 1 à 5 selon les surfaces et les "contaminateurs") les teneurs relatives de la surface en chaque atome plus lourd que l'hélium selon la formule :

$$\% N = (S_n / F_n) / [\sum (S_i / F_i)]$$

avec : S_i = surface du pic de l'élément i

F_i = facteur de sensibilité atomique de l'élément i

➤ Informations qualitatives fournies par ESCA

L'énergie des électrons provenant des orbitales de chaque atome est affectée par les atomes voisins. On peut donc identifier les différents sites d'un composé, détecter la présence de plusieurs composés chimiques dans un échantillon hétérogène, et comparer les énergies d'un niveau atomique pour divers composés. L'emploi de techniques permettant de décomposer de façon fine les pics complexes est couramment pratiqué.

b) Protocole

L'appareil utilisé est un spectromètre ESCALAB VG 220i-XL. La puissance de la source MgK_{α} ($h\nu = 1253.6$ eV) est de 100 W. L'acquisition des signaux C1s, O1s, N1s et Si2p est effectuée avec une énergie moyenne constante de 20 eV. L'échantillon est placé dans la chambre d'analyse qui est équipée d'un système de pompage permettant d'atteindre un vide de 10^{-10} Torr. Les analyses ont été réalisées sur 5 échantillons différents, où trois observations de 150 μ m de diamètre ont été effectuées sur chaque surface. Ces analyses ont été effectuées par Ch. Labrugère, ingénieur au centre de Caractérisation des Matériaux avancés (CeCaMa) de l'Institut de Chimie et de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB), à Pessac.

2.4.5. Imagerie β à haute résolution pour l'étude de la densité de peptides greffés

a) Principe

Le β imager est bâti autour d'un détecteur de rayonnement β , qui est une chambre à face parallèle couplée optiquement avec une caméra CCD intensifiée (figure 41.) [Barthe et al., 152]. Le système est sensible à tous les rayonnements β , y compris celui du tritium. Lorsqu'un électron pénètre dans la chambre, il ionise le mélange gazeux. Sous l'action d'un champ électrique approprié, les électrons issus de l'ionisation sont multipliés et génèrent une avalanche qui produit de la lumière par effet d'excitation - désexcitation des molécules du gaz : mélange d'argon et de traces de triéthylamine (TEA) qui émet dans l'UV.

Les spots lumineux de faible intensité sont amplifiés et convertis en signaux vidéo électroniques par une caméra intensifiée (CCD). Un système d'acquisition d'image peut alors décoder ce signal, le numériser et analyser la répartition de la lumière dans le spot lumineux. Ceci permet une localisation précise de la particule. En effet, les premiers électrons d'ionisation produits à l'endroit où pénètre la particule β seront beaucoup plus multipliés que les électrons générés en fin de parcours. On peut aussi améliorer la résolution spatiale en introduisant une deuxième grille amplificatrice entre l'échantillon et la première grille. On applique alors un champ électrique très élevé entre l'échantillon et la nouvelle grille pour augmenter l'avalanche. Dans le deuxième étage, par contre, le champ est plus bas et est plus favorable à la production de lumière.

b) Protocole

L'appareil utilisé est un Béta-Imager 2000 (Société Biospace) et l'acquisition des résultats est réalisée à l'aide du logiciel Béta-Vision (Société Biospace). Les dimensions du champ de détection sont de 200 x 250 mm². La sensibilité pour le ³⁵S est de 0.01 cpm/mm² et sa résolution spatiale est de 350 μ m plein champ et de 120 μ m en zoom maximum.

Avant d'être fixé sur une plaque métallique, l'échantillon de cellulose compacte greffée de ³⁵S-Cystéine est soigneusement entouré de papier Mylar (Société Biospace). Trois gammes de sang marqué au tritium, également fixées sur la plaque vont servir de références pour la cellulose marquée. Le porte-échantillon peut alors être placé dans la chambre d'analyse.

2.4.6. Etude de la fixation de l'albumine sur la cellulose

Lors des études de réticulation de la cellulose oxydée par l'albumine, il a fallu déterminer la nature des liaisons existantes entre l'albumine et la cellulose : à savoir si la protéine est simplement absorbée, adsorbée et/ou greffée au matériau. Pour ce faire de l'albumine marquée à l'Iode-125 a été utilisée.

2.4.6.1. Marquage de l'albumine à l'Iode 125

a) Principe

L'incorporation d'un radioélément dans des molécules de protéines permet un suivi du comportement de protéines au contact d'un matériau.

L'incorporation implique une liaison covalente du radioélément au niveau du groupement tyrosyl et à moindre degré au niveau des résidus histidine de la protéine. Dans la plupart des protéines, l'iode se fixe sur les positions 3 et 5 du noyau phénol (3,5-diiodotyrosine). Il peut se former également une petite quantité de monoiodotyrosine. Le marquage radioactif utilisé est dérivé de la technique à la chloramine T décrite par Greenwood *et al.* en 1963 [Greenwood et al., 153].

Plusieurs protéines peuvent être marquées par la méthode de la chloramine T, mais certaines perdent leur activité biologique. Une liste partielle de protéines, dont l'albumine bovine, marquées par cette méthode sans perte détectable d'activité immunologique et enzymatique est donnée dans le tableau 8. Les compositions en acides aminés, en azote et en soufre de l'albumine sont données dans les tableaux 9. et 10.

b) Protocole

1 mCi d'¹²⁵I est ajouté à une solution de 500 µl de protéine à 4 mg/ml dans du tampon phosphate isotonique, Phosphate Buffer Saline (PBS). 12 µl de chloramine T (solution à 2

mg/ml dans du PBS fabriquée extemporanément) sont rajoutées à la solution. Une agitation est maintenue pendant 40 secondes.

La radioiodation se fait pendant 5 minutes, puis la réaction d'oxydation est arrêtée par une solution de bisulfite de sodium (15 µl d'une solution dans du PBS préparée extemporanément à 2 mg/ml). Une agitation est maintenue pendant 40 secondes. Puisque l'albumine ne possède pas de pont disulfure, il n'y a aucun risque ici d'utiliser un réducteur.

2.4.6.2. Chromatographie par gel filtration

a) Principe

La chromatographie d'exclusion-diffusion ou filtration sur gel permet l'élution des substances dans l'ordre inverse de leurs masses molaires. Cette technique de chromatographie est souvent utilisée pour déterminer la masse molaire de protéines, l'élution des substances à séparer suivant une distribution de Gauss qui dépend de la taille des pores du gel Sephadex[®] utilisé. Sephadex[®] est un gel de dextrane réticulé se présentant sous forme de perles, insoluble dans l'eau. Le gel est polymérisé sous forme de perles fines de 20 à 80 µm.

Un degré de réticulation (ou de taille de pore) déterminé permettra la diffusion dans le grain de gel, de molécules ayant une taille inférieure ou au plus égale à la taille des pores. Lors d'une séparation chromatographique, les molécules d'une dimension supérieure aux plus gros pores du gel ne peuvent pénétrer dans les grains, elles circulent entre ces grains et quittent la colonne lorsqu'un volume de la phase mobile s'est écoulé. Les molécules d'une taille inférieure à celles des pores pénètrent dans les grains plus ou moins rapidement, en plus ou moins en grand nombre selon leur taille et leur encombrement stérique...

b) Protocole

La chromatographie d'exclusion-diffusion a été utilisée ici pour séparer les protéines marquées à l'iode radioactif (¹²⁵I) de l'iode libre. Pour ce faire, une colonne Sephadex[®] G-25M a été utilisée. Etant donné que les poids molaires respectifs de l'albumine marquée et de l'iode libre sont de 66 000 g/mol et de 125 g/mol, le produit sortant le premier est l'albumine

car sa taille est supérieure à celle des pores des billes constituant la colonne, et donc il passe autour des billes. Quant à l'iode libre, de taille plus petite, il passe dans les pores et met plus de temps à sortir. A la sortie de la colonne, l'éluat est collecté dans une série de tubes (120) de manière à ce que chaque tube contienne 20 gouttes, afin de bien séparer les deux constituants. La radioactivité volumique (cpm/ml) de chacun de ces tubes est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur γ .

2.4.6.3. Etude de la réticulation par l'albumine

a) Principe

Après la réticulation de la cellulose par l'albumine marquée à l'Iode-125 (albumine-¹²⁵I), les échantillons sont rincés dans de l'eau jusqu'à ce que le taux de comptage des eaux de rinçage soit équivalent au bruit de fond du compteur.

Connaissant la surface de l'échantillon à tester, la concentration totale en protéine (froide et marquée) de la solution de réticulation et l'activité de cette solution, il est possible de calculer la quantité de protéine considérée comme adsorbée et/ou greffée à la surface du matériau.

b) Protocole

Après réticulation avec de l'albumine-¹²⁵I, les échantillons sont immergés dans différents bains d'eau de rinçage.

Un contrôle régulier de la radioactivité des eaux de lavage détermine la fin du rinçage (comptage équivalent au bruit de fond du compteur).

La quantité de protéine absorbée, adsorbée et/ou greffée dans tout le volume de la cellulose peut être déterminée par la relation suivante :

$$C = \frac{A_E \cdot C_S}{A_S \cdot m_E} \quad \text{mg/g de cellulose}$$

Avec A_E : activité en cpm de l'échantillon testé,

A_S : activité en cpm de 1 ml de solution mère de réticulation,

C_S : concentration totale en protéine (froide et marquée) de la solution d'incubation en mg/ml,

m_E : masse de l'échantillon en g.

2.4.6.4. Echange de l'albumine

a) Principe

Afin de s'assurer de l'efficacité du greffage et/ou de l'adsorption de l'albumine, nous allons essayer de savoir si l'albumine présente sur la cellulose est échangeable avec de l'albumine froide en solution.

b) Protocole

Après le rinçage des matériaux de cellulose réticulée avec de l'albumine- ^{125}I , les échantillons sont immergés dans une solution d'albumine exempte de protéine radiomarquée. La radioactivité des implants est mesurée à différents temps.

2.5. Caractérisations chimiques

2.5.1. Dosage des aldéhydes

a) Principe

La méthode proposée pour le dosage des groupes carbonyle $-\text{CHO}$ dans la cellulose est basée sur la réaction de l'hydrazine [Albertsson et al., 154]. Après lavage à l'eau, l'hydrazone

de cellulose est dissoute dans l'acide sulfurique et hydrolysée. L'hydrazine libérée est dosée colorimétriquement avec du p-diméthylaminobenzaldéhyde.

b) Protocole

Tout d'abord, 20 à 40 mg de cellulose oxydée ou non sont placés dans 15 ml de solution d'hydrazine pendant 20 heures à température ambiante (annexe 3). Par la suite, la cellulose hydrazone éventuellement obtenue est lavée soigneusement sur un verre fritté G3 avec 200 ml d'eau déionisée par portion de 15 ml (soit l'équivalent de 15 lavages) laissée au contact du matériau pendant 2 à 3 minutes. Les matériaux rincés vont être dissous dans 5 ml d'acide sulfurique à 70 %. Après agitation, ils sont mis à incuber dans un bain-marie à 35 °C pendant une heure. La solution obtenue est alors diluée dans 10 ml d'eau déionisée et 40 ml de solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde, puis elle est complétée avec de l'eau déionisée jusqu'aux 100 ml. La DO est alors lue à 458 nm.

Le blanc est réalisé en ajoutant 40 ml de solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde à 10 ml d'acide chlorhydrique 1 M.

Une gamme étalon du nombre de moles d'aldéhyde en fonction de la DO lue à 458 nm a été réalisée à partir d'une solution de sulfate d'hydrazine.

Le degré d'oxydation de la cellulose peut alors être déterminé à partir de la masse de l'échantillon de cellulose ($m_{\text{cellulose}}$) :

$$\text{Degré d'oxydation} = \frac{n_{\text{CHO}}}{\frac{m_{\text{cellulose}}}{M_{\text{cellulose}}} \times 2} \times 100$$

Avec n_{CHO} : nombre de moles d'aldéhyde dosé.

$$M_{\text{cellulose}} = 162 \text{ g/mol}$$

2.5.2. Réactif de Schiff

a) Principe

Le réactif de Schiff est obtenu par décoloration de la fuchsine, colorant rose violacé, par du dioxyde de soufre SO₂ ou un sulfite.

Les aldéhydes, en présence de réactif de Schiff, vont consommer le sulfite. Cette consommation de sulfite va provoquer la coloration de la fuchsine en rose fuchsia.

En outre, la réaction d'aldéhyde avec des fonctions amine donne des bases de Schiff qui correspondent à des imine substituées.

b) Protocole

Le réactif de Schiff est mis en contact avec les différents matériaux à tester, afin de mettre en évidence qualitativement une teneur éventuelle en fonctions aldéhyde.

2.5.3. Dosage des protéines

a) Principe

La technique la plus couramment employée dans le dosage des protéines est le dosage de Lowry [Lowry et al., 155]. La réaction de Lowry est basée sur l'amplification de la réaction du biuret (formation d'un complexe entre les ions cuivriques et la liaison peptidique), ainsi que sur la réaction ultérieure avec le réactif de Folin. Après réduction par les protéines (tyrosine, tryptophane) du réactif phospho-molybdique de Folin, on obtient plusieurs espèces ayant une coloration caractéristique bleue qui présente une absorbance maximum vers 660 nm. L'addition de sulfate de cuivre rend la réaction nettement plus sensible en favorisant le transfert d'électrons. Mais cette technique est peu spécifique car de nombreux dérivés interfèrent comme par exemple le Tris ou le glucose (en particulier les sucres réducteurs) [Sapan et al., 156]. En effet, ceux-ci interviennent lors de la réduction des ions Cu²⁺ en ions Cu⁺.

Couramment employé, le dosage de Bradford [Bradford, 157] est connu pour ne pas interagir avec ces dérivés [Sapan et al., 156]. De plus c'est une technique rapide et sensible. Le bleu de Coomassie G-250 passe d'une forme de couleur rouge à une forme de couleur bleue lorsqu'il se lie à la protéine. La coloration bleue présente une absorbance maximum vers 590-595 nm.

b) Protocole

50 µl de NaOH de C = 1 M et 1 ml de réactif de Bradford sont ajoutés aux 20 µl de la solution à doser de protéines. Après 5 minutes à l'obscurité, la DO est lue à 595 nm.

Une gamme a été préalablement réalisée à partir d'une solution d'albumine diluée dans une solution tamponnée de tris.

2.6. Etude de la Biocompatibilité *in vitro*

2.6.1. Isolement des cellules HBMSC

Les prélèvements de moelle osseuse humaine (issus du service du Pr Durandea, service traumatologie, CHR Pellegrin) sont obtenus à partir de la diaphyse fémorale de patients sains (âgés de 40 ans à 60 ans) subissant des interventions chirurgicales au niveau de la hanche après un traumatisme. La moelle osseuse est homogénéisée par des passages successifs dans des aiguilles de grosseur décroissante : G-16, G-18 puis G-21 et centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu par 10 ml de milieu IMDM supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) et de la dexaméthasone à 10^{-8} M [Vilamitjana-Amédée et al., 158].

Cette suspension cellulaire estensemencée à raison de 4.10^5 cellules/cm² dans ce même milieu et incubée en atmosphère humide (5 % CO₂, 95 % air) à 37 °C. Le milieu de culture est remplacé tous les 3 jours et la dexaméthasone (10^{-8} M) est ajoutée lors des 3 premiers changements de milieu. La confluence cellulaire est obtenue, après environ 2 semaines de culture. Dès lors, la couche cellulaire est détachée à l'aide d'une solution de trypsine à 0.2 % (p/v) EDTA 2 mM dans du tampon PBS 0.1 M pH 7.4. La suspension cellulaire est centrifugée à 1000 g pendant 10 min puis répartie dans 2 boîtes de 75 cm² afin de réaliser le

premier passage. Les cellules sont utilisées pour les expérimentations entre le 1^{ier} et le 2^{ième} passage (figure 42.).

2.6.2. Cytotoxicité indirecte

(figure 43.)

L'objectif de la norme NF EN 30993 (Biological evaluation of medical devices) est de définir un schéma d'essais concernant l'évaluation *in vitro* de la cytotoxicité, en proposant plusieurs catégories d'essais (à partir d'extraits de matériaux ou en contact direct) et plusieurs catégories de mode d'évaluation à l'aide de lignées cellulaires établies.

Il est préférable de choisir, pour les essais *in vitro*, le type de cellules différenciées le plus proche de l'application à laquelle le matériau à étudier est destiné. Cette démarche correspond à l'évaluation de la cytocompatibilité.

La toxicité éventuelle d'un matériau envers les cellules peut être recherchée en étudiant l'effet provoqué par l'extrait de ce matériau. Les extraits permettent de mettre en évidence l'effet toxique de substances "entraînables" ou de produits de relargage solubles.

2.6.2.1. Obtention des extraits des matériaux

Les extraits des matériaux cellulotiques ont été préparés selon la norme européenne EN 30993-5 (Biological evaluation of medical devices. Part 5 : tests for cytotoxicity : *in vitro* methods). Conformément à cette norme, l'obtention des extraits a été réalisé en respectant le rapport (Surface apparente immergée de l'échantillon / Volume du véhicule d'extraction) qui doit être compris entre 3 et 6 cm²/ml.

Des fragments de chaque matériau ont été placés dans le véhicule d'extraction. Ce dernier est constitué par du milieu de culture IMDM (Milieu de Dulbecco Modifié par Iscove-GIBCO).

L'extraction a été réalisée dans des tubes en polypropylène afin d'éviter toute interaction. Les échantillons ont été placés pendant 120 heures dans un incubateur à 37 °C dans une atmosphère enrichie avec 5 % de CO₂. Le liquide résultant de l'incubation du matériau dans le milieu de culture est appelé liquide d'extraction.

On a utilisé pour les études de cytocompatibilité, l'extrait pur (non dilué 100 %) ou dilué avec du milieu de culture IMDM supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau foetal (BOEHRINGER, France) pour obtenir des dilutions de 50 % (v/v), 10 % (v/v) et 1 % (v/v).

Deux témoins ont été utilisés pour ces études :

- Témoin positif : phénol à 6.4 g/l (c'est-à-dire susceptible d'induire une réponse cytotoxique de façon reproductible),
- Témoin négatif : milieu de culture IMDM contenu dans un tube identique et incubé dans les mêmes conditions que les matériaux.

2.6.2.2. Mise en présence des extraits et des solutions

Des cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits pour permettre la lecture sur un spectrophotomètre DYNEX MRX^R (Laboratoire dynatech, Saint Cloud, France). La densité d'ensemencement est de 40000 cellules par cm² pour les cellules HOP. En 96 heures, le tapis cellulaire est subconfluent, ce qui permet la réalisation des tests.

100 µl d'extraits de matériaux ont été distribués dans chacun des puits de culture à raison de 6 puits par type d'extrait. Les plaques ont été placées pendant 24 heures à 37 °C dans une atmosphère enrichie avec 5 % de CO₂.

2.6.2.3. Réalisation des tests

2.6.2.3.1. Test au rouge neutre

a) Principe

Ce test de viabilité cellulaire, mis au point par Parish et Mullbacher en 1983 [Parish et al., 159], est basé sur l'incorporation par les cellules vivantes, d'un colorant vital qui se fixe sur les sites anioniques de la membrane lysosomiale. Une altération de cette membrane

provoque une diminution de la fixation du colorant. L'intensité de la réaction colorée permet d'évaluer le nombre de cellules vivantes après incubation en présence d'un agent toxique.

b) Protocole

Les plaques de culture sont retirées de l'incubateur après 24 heures de contact entre le liquide d'extraction et les cellules ; chaque puits est alors rincé avec 200 µl de tampon phosphate 0.1 M pH 4.4 (GIBCO). Une solution de rouge neutre (SIGMA) est diluée au 1/80^e dans du milieu de culture IMDM ; 100 µl de cette dilution sont alors distribués dans chacun des puits. Après 3 heures d'incubation à 37 °C, la solution de rouge neutre est retirée et l'extraction du colorant est réalisée en ajoutant dans chaque puits 100 µl d'une solution constituée à 50 % d'acide acétique à 1 %, et à 50 % d'éthanol. Les plaques sont agitées jusqu'à homogénéisation de la coloration. On obtient dans chacun des puits une coloration d'intensité variable dont l'absorbance est mesurée sur le spectrophotomètre à la longueur d'onde de 540 nm. La coloration s'étend de l'incolore pour les concentrations entraînant 100 % de cytotoxicité à une couleur plus ou moins rouge pour le témoin négatif et les extraits peu ou pas toxiques.

2.6.2.3.2. Test au MTT

a) Principe

Ce test a été introduit par Moshmann en 1983 [Mosmann, 160] pour déterminer l'activité métabolique cellulaire. Le MTT ou Bromure de 3-(4,5-Diméthiazol-2-yl)-2,5-Diphényl Tétrazolium (SIGMA) est un sel de tétrazolium de couleur jaune en solution aqueuse à pH neutre. Il est métabolisé par la succinate-déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en cristaux bleus de formazan. La quantité de formazan généré par les cellules, après incubation en présence d'un agent toxique, donne une indication sur l'activité métabolique des cellules vivantes.

b) Protocole

Les plaques de culture sont retirées de l'incubateur après 24 heures de contact entre le liquide d'extraction et les cellules ; chaque puits est alors rincé avec 200 µl de tampon phosphate 0.1 M pH 7.4 (GIBCO). La solution mère de MTT à 5 g/l (SIGMA) est diluée au 1/5^e dans du milieu sans rouge phénol (Dulbecco's Medium w/o phenol red-GIBCO). Après élimination du liquide d'extraction, 125 µl de MTT sont distribués dans chaque puits ; les plaques sont alors replacées pendant 3 heures à 37 °C dans une atmosphère enrichie avec 5 % de CO₂. Après élimination du surnageant, les cristaux de formazan formés sont solubilisés par l'addition de 100 µl de DMSO (Diméthyl Sulfoxyde – SIGMA). La solubilisation des cristaux est quasi instantanée mais leur coloration n'est stable qu'environ 1 heure. Les plaques sont donc rapidement lues dans le spectrophotomètre à la longueur d'onde de 540 nm. La coloration s'étend de l'incolore pour les concentrations entraînant 100 % de cytotoxicité à une couleur violacée plus ou moins foncée pour le témoin négatif et les extraits peu ou pas toxiques.

2.6.3. Attachement cellulaire

a) Principe

Les essais d'attachement cellulaire sur différentes surfaces ont été effectués selon une méthode adaptée de Majeska *et al.* [Majeska et al., 161] et de Landegren [Landegren, 162]. L'enzyme N-acétyl-β-D-hexosaminidase (2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucosideacetamido deoxuglucohydrolase) est une enzyme lysosomiale connue pour être impliquée dans la dégradation des constituants cellulaires glycosylés. Le substrat dérivé p-nitrophénol peut être employé pour la quantification spectrophotométrique de cette enzyme. Son activité fait de cette enzyme un indicateur idéal pour la mesure d'un nombre de cellules.

b) Protocole

Les cellules sontensemencées à une densité cellulaire de 20 000 cellules/cm² pour les matériaux compacts et de 30 000 cellules/cm² pour les matériaux poreux, dans du milieu de culture (IMDM) dépourvu de SVF et incubées pendant 1 heure, 3 heures et 24 heures à 37 °C. Après lavage de la couche cellulaire avec du PBS 0.1 M pH 7.4, le nombre de cellules adhérentes est quantifié par le dosage de l'activité de l'enzyme lysosomiale, la N-acétyl-β-D-hexosaminidase. 400 µl de la solution substrat, le p-nitrophényl N-acétyl-β-D-hexosaminide 7.5 mM, Na citrate 0.1 M pH 5, Triton X100 5 % (v/v), sont ajoutés sur les matériaux. Après incubation pendant 2 heures à 37 °C en chambre humide, la réaction est arrêtée par l'ajout de 600 µl de solution tampon (Glycine 50 mM, EDTA 5 mM, PBS 0.1 M pH 10.4). La quantification de la réaction est réalisée au spectromètre à la longueur d'onde de 405 nm (Dynex MRX Microplate Reader).

Le plastique des boîtes de culture constitue le témoin positif de l'attachement cellulaire.

Ces analyses ont été réalisées par Reine Bareille, Ingénieur de Recherche à l'Unité 577 INSERM.

TROISIEME PARTIE :
RESULTATS ET DISCUSSION

Troisième partie : Résultats et Discussion

Dans un premier temps, les résultats relatifs à la confection des implants cellulose ont été analysés :

- 1) les conditions d'obtention des matériaux cellulose.
- 2) la vérification de la qualité du lavage par XPS et la caractérisation morphologique des matériaux par MEB.
- 3) l'optimisation des matériaux cellulose macroporeux en vue de les voir répondre au mieux au cahier des charges d'un matériau de substitution osseuse ou en vue d'une utilisation comme support matriciel dans une stratégie d'ingénierie tissulaire.

Dans un deuxième temps, les résultats de nos tentatives de modification de la cellulose seront analysés après fixation covalente superficielle de peptides pro-adhésifs vis-à-vis des cellules, après phosphatation, après oxydation, suivie ou non d'une réticulation par une protéine.

1. Caractérisation des implants cellulose

Du fait de ses propriétés, la cellulose régénérée pourrait offrir une solution intéressante au comblement des défauts osseux : biocompatible, ostéoconductrice et hygroscopique. Lorsqu'elle est placée dans un défaut osseux, son hydroexpansivité entraîne une augmentation de son volume au contact de l'eau des tissus environnants permettant ainsi un comblement adapté à la cavité, mais aussi une fixation mécanique aux tissus osseux.

La cellulose régénérée a tout d'abord été élaborée et caractérisée sous une forme compacte, puis sous une forme macroporeuse.

1.1. Conditions d'obtention d'un biomatériau cellulose

Plusieurs lots de biocellulose ont été préparés suivant le brevet de Pommier *et al.* [Pommier et al., 34] : la cellulose a été régénérée à partir de pâte visqueuse, puis lavée afin d'éliminer le soufre (voir la deuxième partie Matériels et Méthodes : 2.1. La conception et 2.2. Nettoyage de la cellulose).

Cette élimination du soufre intervient à 2 niveaux du processus de fabrication : lors du traitement chimique de la viscosse par Na_2CO_3 et Na_2SO_3 , et lors du lavage. Au cours de cette étape, on réalise une élimination partielle du soufre en traitant la solution de viscosse par un mélange réactif avec les sulfures (carbonate et sulfite de sodium). Ces sels provoquent le dégazage du soufre sous la forme H_2S et induisent la création de pores dans le matériau, ce qui augmente la surface d'échange entre les bains de lavage et le matériau [Ayuso, 163].

L'étape de moulage consiste à réaliser la coagulation de la viscosse dans un volume de forme géométriquement déterminée de manière à définir la forme finale du matériau. Afin d'éviter les défauts dus à la présence de bulles, il convient de dégazer la viscosse avant sa coagulation.

Il est important de noter que pour augmenter l'efficacité du lavage, on peut alterner les phases d'élimination du soufre et les phases de coagulation de la cellulose [Pommier et al., 34]. De plus, une étude menée par Ayuso en 1991 [Ayuso, 163] montre que le lavage de la cellulose sera d'autant plus efficace et rapide que la température sera élevée. En effet la cinétique de lavage est doublée quand celui-ci est fait à $+ 80\text{ }^\circ\text{C}$ au lieu de $+ 60\text{ }^\circ\text{C}$. Cette étude a aussi permis à ces auteurs de concevoir une méthode de lavage industriel efficace avec : une température d'extraction de $+ 80\text{ }^\circ\text{C}$, de l'eau permutée, un lavage à contre courant, un système simple et efficace pour piéger les gaz.

1.2. Caractérisation des matériaux compacts

L'étude réalisée sur le matériau compact a permis non seulement de vérifier l'efficacité du nettoyage par extraction par méthanol de la cellulose régénérée, et aussi de vérifier la conservation des caractéristiques physiques et physico-chimiques du matériau à l'issue des conditions infligées en préalable à la mise en route de diverses modifications chimiques.

1.2.1. Etude par spectroscopie de photoélectrons

Afin de s'assurer de l'efficacité du lavage, un contrôle physico-chimique par analyse XPS des matériaux cellulosiques en sortie de fabrication a été effectué. Ces analyses n'ont mis en évidence aucune contamination, aussi bien en surface qu'à l'intérieur du matériau. Les

seuls éléments présents sont le carbone et l'oxygène (figure 44., surface A). Pour éliminer toute trace de pollutions carbonée et oxygénée, et afin de conférer à tous les matériaux la même "histoire" d'un point de vue chimique et thermique, les matériaux sont extraits 24 heures dans du méthanol. Le méthanol a été choisi comme agent de gonflement de la cellulose (Polymer Handbook, 2nd Edition). A nouveau, les seuls éléments détectés par XPS sont le carbone et l'oxygène (figure 44., surface B). Les résultats quantitatifs relatifs à l'analyse des surfaces sont rassemblés dans le tableau 11. Les valeurs ont été déterminées et calculées à partir de l'aire totale respective des pics C1s et O1s. Après extraction, il apparaît clairement une diminution de la composante du carbone au profit de celle de l'oxygène. Le rapport C/O est alors de 1.15, plus proche de celui attendu théoriquement (1.2) en absence de pollution organique de la surface du matériau, que de la valeur 1.33 obtenue dans le cas de la cellulose brute (tableau 11.).

Pour une meilleure compréhension des liaisons chimiques présentes, les spectres XPS haute résolution C1s enregistrés en surface des échantillons brut et nettoyé sont présentés "désommés" dans les figures 45.A et B. Le spectre C1s présente essentiellement 3 composantes : COOR, C-O et C-C (figures 45.A et B). Les liaisons chimiques présentes dans le volume superficiel exploré sont identiques pour les échantillons bruts et nettoyés. Cependant on constate une diminution de la composante de type C-C pour la cellulose nettoyée par rapport à la cellulose brute. Ce résultat corrobore une diminution de la pollution carbonée à la surface de la cellulose nettoyée. En effet Ratner [Ratner et al., 164] a montré en 1990 que tout substrat soumis à un environnement atmosphérique est recouvert même après un nettoyage rigoureux, d'une couche d'environ 4 à 100 Å d'épaisseur principalement de dioxyde de carbone et d'eau.

1.2.2. Etude morphologique par MEB

Lors de la modification de surface de la cellulose par le greffage de peptides RGD, le matériau subit tout d'abord un traitement en température à chaque étape, puis il est immergé dans du toluène lors du greffage du silane.

La Microscopie Electronique à Balayage a permis de suivre les modifications de l'état de surface de la cellulose après un nettoyage à l'extracteur Soxhlet au méthanol pendant 24 heures, après un traitement en température à 30 °C, 70 °C et 95 °C et après une immersion dans le toluène. Les implants de cellulose ont été observés par MEB au grossissement 5000.

Tout d'abord, la cellulose nettoyée a subi un traitement thermique sous vide (10^{-5} torr) à 30 °C, 70 °C et 95 °C (figure 46.). Que se soit après une simple extraction au Soxhlet ou après un traitement thermique, il n'apparaît pas de changement notable de la surface : la surface est plane et homogène, avec parfois des différences de topographie dues à la rétraction du matériau lors de la coagulation de la viscosité.

Ensuite, l'état de surface de la cellulose immergée pendant une heure dans le toluène, a été analysé après avoir subi un traitement en température (figure 47.). La surface reste homogène et non fissurée, avec parfois des retractions du matériau.

Discussion

L'étude réalisée par MEB a permis de vérifier que le nettoyage à l'extracteur Soxhlet au méthanol n'occasionnait aucun changement de surface de la cellulose. De plus, malgré un reste de pollution (composé riche en oxygène), cette extraction Soxhlet paraît efficace et nécessaire pour préparer de manière reproductible la surface de la cellulose pour toute modification ultérieure.

Les conditions opératoires retenues pour réaliser un traitement en température et préparer les surfaces du matériau avant le greffage de peptides RGD sont donc de $T = 70$ °C, $P = 10^{-5}$ Torr, $t = 15$ h, sachant qu'à trop haute température la cellulose risquerait de se craqueler et de devenir plus fragile [Klason et al., 165]. Le prétraitement en température et sous vide de la surface du matériau vise non seulement à éliminer l'eau et le reste de pollution, mais aussi à exacerber la densité de sites -OH que l'on veut modifier [Simon et al., 143], et aussi à favoriser la réaction de silanisation en milieu organique anhydre. D'après

Chaimberg *et al.*, la densité de greffage obtenue sera plus importante et plus homogène, mais surtout l'ancrage des silanes sur le matériau sera plus stable [Chaimberg and Cohen, 83].

1.3. Caractérisation des matériaux poreux

La conception d'un matériau macroporeux a été entreprise en vue d'augmenter la colonisation en profondeur des biomatériaux par les tissus. Différentes techniques de caractérisation ont été utilisées pour décrire la structure poreuse du matériau dans son ensemble : la morphologie du matériau, la forme des pores, le volume poreux, la distribution de la taille des pores, l'interconnexion... Cette étude a été complétée par celle de la capacité de colonisation de l'implant par les ostéoblastes.

1.3.1. Etude morphologique : MEB et microtomographie

La MEB a permis d'explorer la topographie de la cellulose de porosité (1), (2) et (1+2) en surface ainsi qu'au cœur du matériau après une section des échantillons (voir la deuxième partie *Matériels et Méthodes : 2.1.2. Conception de CRV macroporeuse*).

La lyophilisation des matériaux a apporté l'avantage d'empêcher la déformation des échantillons liés à un séchage brutal à l'air libre : les cylindres conservent alors une belle structure et une forme régulière. Les modifications de l'état de surface des échantillons ont été analysées après une déshydratation par lyophilisation, suivi d'un nettoyage par extraction au méthanol pendant 24 heures (procédé Soxhlet), et d'un traitement thermique sous vide (dégazage à 70 °C pendant 15 heures).

Les matériaux sont constitués d'alvéoles formant des pores visibles à l'œil nu dont la paroi présente des plis et des replis (figures 48., 49. et 50. a et b). Après les différents traitements décrits au paragraphe précédent, l'analyse topographique de la surface de cellulose ne montre pas de changement notable : la structure et la forme des échantillons restent les mêmes et il n'y a pas de détérioration visible (figures 48., 49. et 50. a et b).

Que se soit en surface ou dans le volume, l'étude des échantillons de porosité (1), (2) et (1+2) a montré une structure régulière de l'architecture poreuse avec des pores de taille

moyenne se situant respectivement dans les intervalles 500-600 μm (figure 48.), de 150-250 μm (figure 49.) et de 150-600 μm (figure 50.).

De plus, les photographies obtenues après la section des échantillons montrent l'existence d'une interconnexion entre les pores, ainsi que l'absence de granules de CaCO_3 au centre des matériaux quelle que soit leur porosité (figures 48., 49., et 50.). La dissolution de l'agent porogène par l'acide chlorydrique lors de la fabrication des matériaux poreux a donc été efficace.

Les photographies prises en microtomographie confirment la régularité et l'homogénéité de la répartition des différentes tailles de pores (figure 51.). Ultérieurement, ces images vont permettre l'analyse de la distribution des cordes (voir *la deuxième partie Matériels et Méthodes : 2.4.1.4. Fonctions de distribution de cordes sur un matériau poreux ; et la troisième partie Résultats et Discussion : 1.3.4. Distribution de cordes*).

1.3.2. Etude de la taille de l'agent porogène par granulométrie

Les résultats de la granulométrie laser sont présentés sous deux aspects différents : le premier sous la forme de distributions des pourcentages en nombre de la taille des granules (figure 52.) et le deuxième sous la forme d'un tableau regroupant les valeurs des diamètres seuils D10, D50 et D90 (tableau 12.) (voir *la deuxième partie Matériels et Méthodes : 2.4.1.1. Granulométrie laser*),. Les données D10, D50, D90 correspondent à des mailles fictives au travers desquelles passent respectivement 10, 50, et 90 % des particules solides. Les D10 et les D90 sont des paramètres intéressants comme indicateurs des limites de la plage entre lesquelles on trouve l'essentiel des granules. Le D50, diamètre médian, caractérise la globalité de l'échantillon. La vision globale de la distribution permet une vision plus fine de la répartition des particules.

Au vu des résultats, il existe deux sous-populations de tailles de particules distinctes : la première dont le diamètre se situe en-dessous de 100 μm , représente l'essentiel des particules, et la deuxième dont le diamètre se situe au-dessus de 200 μm .

Les particules de petites tailles ont des diamètres situés (intervalles dont les limites correspondent aux D10 et D90) (figures 52. et tableau 12.): entre 59 et 134 μm pour l'échantillon (1), entre 35 et 84 μm pour l'échantillon (2), et entre 44 et 111 μm pour l'échantillon (1+2). Etant donné que le lot (1+2) est formé par la combinaison des lots (1) et (2), il est intéressant de corréliser le D50 du lot (1+2), à celui du lot (1) et du lot (2). On remarque que dans son ensemble les granules de taille (1+2) ont un diamètre moyen D50 de $62 \pm 1 \mu\text{m}$: ce diamètre se situe sensiblement au centre de l'intervalle donné par le D50 des particules de taille (1) et celui des particules de taille (2) (respectivement $80 \pm 1 \mu\text{m}$ et $50 \pm 1 \mu\text{m}$) (tableau 12.).

Les particules de plus grandes tailles ont des diamètres situés (figure 52.): entre 321 et 639 μm pour l'échantillon (1), entre 222 et 408 μm pour l'échantillon (2), et entre 269 et 493 μm pour l'échantillon (1+2).

Il est important de rappeler que les valeurs données par le fournisseur fixent les limites inférieure et supérieure des tailles de grains de CaCO_3 présentes dans un lot. Par contre, les mesures faites en granulométrie représentent les diamètres des granules les plus probables. Les lots de grains de CaCO_3 (1), (2) et (1+2) ont été réalisés de la façon suivante : à partir d'un lot de granules de 250-900 μm de diamètre, deux autres lots ont été constitués à l'aide d'un tamis de 500 μm de maillage. Au vu de ces données et des résultats obtenus, plusieurs points importants ont pu être soulignés.

Tout d'abord l'intervalle donné par granulométrie laser pour la poudre (1+2) est de 269-493 μm de diamètre pour une taille de 250-900 μm donnée par le fournisseur. Ensuite la mesure de la taille des particules de la poudre (1) est de 321-639 μm . La valeur inférieure est un peu éloignée de celle attendue (respectivement 321 et 500 μm) : ce sont toutes les particules supérieures à 500 μm qui auraient dû être récupérées dans le tamis. D'autre part la mesure de la taille des particules de la poudre (2) est de 222-408 μm . On constate que la valeur supérieure de cet intervalle n'est pas trop éloignée de celle attendue après tamisage (respectivement 408 et 500 μm) : ce sont toutes les particules inférieures à 500 μm qui ont été tamisées. Par contre, la valeur inférieure a été sur-évaluée par le fournisseur (respectivement 222 et 250 μm).

Les différences entre le tamisage et la diffraction laser tiennent au fait que dans les deux cas les particules sont assimilées à des sphères. Or des incertitudes peuvent être

engendrées par le tamisage suivant l'orientation des particules lors de leur arrivée sur le tamis (figure 53.). Une non-sphéricité des particules pourrait expliquer les différences observées entre les diamètres maximums prévus par le tamis et ceux mesurés par le granulomètre laser.

Lors de la dissolution des granules de CaCO_3 par l'acide chlorydrique, si l'on considère que la place laissée vacante par l'agent porogène est celle du pore, alors la taille de ces pores à l'état humide peut être déterminée par extrapolation des tailles de grains trouvés par granulométrie laser.

1.3.3. Porosimétrie à mercure

Le volume poreux des échantillons (1), (2) et (1+2) a tout d'abord été calculé de façon théorique, avant d'être comparé avec les valeurs expérimentales de la porosimétrie à mercure (tableau 13.).

Le volume poreux des échantillons à l'état sec a été calculé à partir de la masse volumique de la cellulose sèche et des caractéristiques dimensionnelles des échantillons cylindriques de cellulose macroporeuse (masse, diamètre et hauteur).

$$\text{Donc Volume}_{\text{échantillon}} = \text{hauteur} \cdot \Pi \cdot \text{rayon}^2,$$

$$\text{d'où Volume}_{\text{cellulose}} = \text{masse}_{\text{échantillon}} / \text{masse volumique}_{\text{cellulose sèche}},$$

$$\text{d'où Volume poreux global} = V_{\text{échantillon}} - V_{\text{cellulose}}.$$

D'où le pourcentage de porosité du matériau :

$$\% p = (V_{\text{poreux}} / V_{\text{échantillon}}) \times 100.$$

La technique de porosimétrie à mercure (Hg) va permettre d'obtenir non seulement la répartition de la taille des pores, mais aussi le pourcentage de porosité ouverte en phase sèche (voir la deuxième partie *Matériels et Méthodes* : 2.4.1.2. *Porosimétrie à mercure*).

Le volume de Hg déplacé a été calculé à partir de l'ensemble (pénétrromètre + échantillon) avec ou sans Hg :

$$\text{Volume Hg déplacé} = \frac{(\text{masse}_{\text{pénétrromètre + échantillon + Hg}} - \text{masse}_{\text{pénétrromètre + échantillon}})}{\text{masse volumique}_{\text{Hg}}}$$

Le volume de Hg contenu dans le pénétromètre a été calculé à partir de la masse du pénétromètre avec ou sans Hg :

$$\text{Volume}_{\text{Hg dans pénétromètre}} = \frac{(\text{masse}_{\text{pénétromètre + Hg}} - \text{masse}_{\text{pénétromètre}})}{\text{masse volumique}_{\text{Hg}}}$$

D'où une variation de volume de Hg de :

$$\Delta V = V_{\text{Hg dans pénétromètre}} - V_{\text{Hg déplacé}},$$

$$\text{d'où } \% p = (\Delta V / V_{\text{échantillon}}) \times 100.$$

Toutes les valeurs ont été listées dans le tableau 13. Le calcul des volumes poreux donne des résultats comparables d'un matériau à l'autre : 95.7 % pour la porosité (1), 95.4 % pour la porosité (2), et 94.6 % pour la porosité (1+2). Bien qu'elle donne des porosités légèrement plus basses que celles déterminées par le calcul, ces résultats sont confirmés par la porosimétrie à mercure : 75.9 % pour la porosité (1), 81.1 % pour la porosité (2), et 95.5 % pour la porosité (1+2).

Le fait de tenir compte ou non de la microporosité et de la porosité fermée des matériaux peut expliquer l'écart existant entre les deux modes de détermination du volume poreux. En outre, le calcul à partir de la masse volumique de la cellulose sèche prend en compte tous les pores du matériau quel que soit leur diamètre et que ceux-ci soient ouverts ou fermés. Quant à la porosité à mercure, elle n'estime que la porosité ouverte et en plus elle doit être réalisée à basse pression pour déterminer la macroporosité, mais aussi à haute pression pour la microporosité (voir *la deuxième partie Matériels et Méthodes : 2.4.1.2. La porosimétrie à mercure*). Ici seule l'analyse basse pression a été utilisée pour caractériser la cellulose macroporeuse.

La porosimétrie à mercure a également permis de déterminer pour chacun des matériaux (1), (2), et (1+2), la répartition de la taille des pores dans ces échantillons (voir *la deuxième partie Matériels et Méthodes : 2.4.1.2. La porosimétrie à mercure*). Ceux-ci ont une population de pores qui s'étend entre quelques dizaines de μm et plusieurs centaines de μm . Le volume poreux maximum est atteint pour des diamètres de pores de (figure 54.) :

- pour l'échantillon (1) : 124, 308 μm et un pic majoritaire à 208 μm ,
- pour l'échantillon (2) : 109 μm et un pic majoritaire à 142 μm ,
- pour l'échantillon (1+2) : 50, 65, 161, 308 μm et un pic majoritaire à 237 et 95 μm .

On peut noter que les échantillons de porosité (1+2) possèdent une plage de distribution plus large et plus étendue que les échantillons de porosité (1) et (2).

Il existe de grandes différences entre la taille des grains de CaCO_3 utilisés comme agent porogène et la taille des pores mesurée par la porosimétrie mercure. Bien que cette technique soit utilisée en basse pression pour mesurer des pores de taille macroscopique, elle ne permet pas d'accéder au diamètre réel des pores. Etant donné que la mesure du diamètre se fait à partir de la pression nécessaire appliquée pour faire entrer le mercure dans les pores, on comprend alors que la porosimétrie à mercure permet surtout de déterminer le diamètre d'entrée des pores, appelé méat, plutôt que le diamètre du pore lui-même [Farber et al., 148].

1.3.4. Distribution de cordes

La distribution de longueur de cordes de la phase poreuse, puis la distribution du diamètre des pores, ont été calculées pour les matériaux de porosité (1), (2) et (1+2).

Les données expérimentales des distributions de diamètre des pores (voir *la deuxième partie Matériels et Méthodes : 2.4.1.4. Fonctions de distribution de cordes sur un matériau poreux*) ont été traitées par une analyse statistique qui a permis de déterminer le premier et le deuxième moment de la fonction de distribution $p(s)$. Le premier moment correspond à la valeur moyenne l_s du diamètre du pore de la fonction $p(s)$ et le deuxième moment à la variance σ^2 , dont on déduit la déviation standard σ :

$$l_s = \frac{\left(\sum_{i=1}^N s_i \cdot p(s_i) \right)}{\left(\sum_{i=1}^N p(s_i) \right)}$$

D'où

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^N (s_i - \bar{s})^2 \cdot p(s_i)}}{\sum_{i=1}^N p(s_i)}$$

Avec

$$\sum_{i=1}^N p(s_i) = 1$$

En supposant que les pores des matériaux sont sphériques, la figure 55. indique que la distribution du diamètre de ces pores est polydispersée. L'analyse statistique des données expérimentales montre que la probabilité la plus forte est de trouver un pore de dimension $441 \pm 169 \mu\text{m}$ pour le matériau de porosité (1), $369 \pm 108 \mu\text{m}$ pour le matériau de porosité (2), et $442 \pm 168 \mu\text{m}$ pour le matériau de porosité (1+2). La distribution du diamètre des pores montre qu'il existe plusieurs tailles caractéristiques, ce qui pourrait expliquer la valeur élevée de l'écart type (figure 55.).

Les résultats ont permis de déterminer la probabilité $p(s)$ de trouver un pore de dimension s pour le matériau (1), (2) ou (1+2). Quant aux valeurs données par le fournisseur, il est important de rappeler qu'elles fixent les limites inférieure et supérieure des tailles de grains de CaCO_3 . Ce ne sont pas les tailles de granules les plus probables.

Tout d'abord, on constate que le matériau (2) a une distribution de diamètre de pores peu étendue entre 261 et $477 \mu\text{m}$. La probabilité de trouver un pore de taille située dans cet intervalle est relativement élevée avec 73% . Cette distribution de diamètre de pores est celle attendue d'après la taille des grains de CaCO_3 utilisés comme agents porogènes ($250\text{-}500\mu\text{m}$).

Quant aux matériaux (1) et (1+2), ils ont une distribution de taille de pores très larges (respectivement $272\text{-}610 \mu\text{m}$ et $274\text{-}610 \mu\text{m}$). La distribution du diamètre des pores du matériau (1+2) se trouve dans l'intervalle de la taille des grains donnée par le fournisseur ($250\text{-}900 \mu\text{m}$). La probabilité de trouver un pore entre $274 \mu\text{m}$ et $610 \mu\text{m}$ de diamètre est de

65 %. Concernant le matériau (1), l'intervalle de taille de grains donné par le fournisseur après tamisage (500-900 μm) ne correspond pas au diamètre des pores obtenu par le calcul de la distribution de cordes (272-610 μm). Il est étonnant de trouver comme limite inférieure 272 μm de diamètre au lieu d'une valeur plus élevée ou équivalente à 500 μm . La limite supérieure est identique à celle du matériau (1+2).

Les résultats trouvés en granulométrie pourraient en partie expliquer ces différences. En effet, les mesures de la taille des grains de CaCO_3 ont montré que l'essentiel des particules étaient de petites tailles (59-134 μm pour le matériau (1) et 44-111 μm pour le matériau (1+2)) et que les particules les plus grosses (321-639 μm pour le matériau (1) et 269-493 pour le matériau (1+2)) étaient peu nombreuses (tableau 14.) (voir *la troisième partie Résultats et Discussion : 1.3.2. Etude de la taille de l'agent porogène par granulométrie*).

Les valeurs trouvées en distribution de cordes peuvent être rapprochées de celles obtenues en granulométrie car elles représentent les diamètres des grains les plus probables. D'après les résultats obtenus pour les matériaux (1), (2) et (1+2), ces deux méthodes se recourent assez bien (tableau 14.).

1.3.5. Colonisation cellulaire des matériaux macroporeux

Des ostéoprogéniteurs ont étéensemencés sur des matériaux de cellulose macroporeuse de porosité (1), (2) et (1+2) dans du milieu de culture supplémenté de SVF et incubés pendant 3 jours à 37 °C.

La MEB a permis de vérifier la présence des cellulesensemencées en surface et au cœur des matériaux après une section des échantillons (figures 56. et 57.) (voir *la deuxième partie Matériels et Méthodes : 2.4.2. Microscopie Electronique à Balayage pour l'étude de la topographie des matériaux*).

Que se soit au voisinage de la surface ou au centre du matériau, les cellules ont été retrouvées dans l'ensemble des pores des implants de porosité (1), (2) et (1+2) (figures 56. et 57.). De forme arrondie, elles mesurent de 10 à 15 μm de diamètre.

Discussion

Les différentes techniques de caractérisation utilisées ont davantage permis de décrire la structure poreuse du matériau dans son ensemble, plutôt que de caractériser uniquement la taille de ses pores : porosité, diamètre des pores, distribution de la taille des pores, interconnexion... Les résultats relatifs à la taille des pores des implants (1), (2) et (1+2) déterminés par les différentes techniques utilisées lors de cette étude, ont été regroupés dans le tableau 14. A titre d'exemple, seule la caractérisation de la porosité du matériau (1+2) a été comparée suivant les différentes méthodes.

Les photographies réalisées par MEB donnent des informations sur la répartition des différentes tailles de pores et sur leur morphologie : les matériaux sont constitués d'alvéoles formant des pores interconnectés entre eux et répartis de façon régulière et homogène dans l'implant macroporeux.

Quant à la granulométrie laser, elle renseigne sur la matrice inverse du matériau. En effet, la mesure granulométrique de l'agent porogène mélangé à la viscosine de cellulose, donne une idée très précise de ce que sera l'implant après dissolution de ces granules. Les particules de petites tailles sont majoritaires avec une répartition de diamètre allant de 44 μm à 111 μm pour le matériau (1+2) et les grosses particules ont des diamètres situés entre 269 et 493 μm pour le matériau (1+2) (tableau 14.).

La porosimétrie à mercure constitue, avec l'adsorption d'azote par le BET (Brunauer, Emmett et Teller, technique non utilisée lors de ce travail), la méthode la plus pratiquée pour caractériser la structure des pores [Sing, 1966]. Comme il a été expliqué auparavant, la porosimétrie à mercure permet surtout de déterminer le diamètre d'entrée des pores plutôt que le diamètre du pore lui-même. La taille des pores ou des interconnexions du matériau (1+2) pourrait donc être située entre 38 et 350 μm avec une prépondérance de diamètres égales à 237 μm et 95 μm (tableau 14.). Le volume poreux du matériau (1+2) a été évalué à environ 95 % à l'état sec.

La tomographie à rayons X donne des renseignements sur la structure poreuse en trois dimensions du matériau sur : la forme des pores, leur distribution spatiale et leur interconnexion. Cette méthode non destructive permet la restitution d'un objet 3D à partir d'un grand nombre de projections 2D. Les intérêts de la tomographie sont multiples : les

coupes sont directement alignées les unes sous les autres, il n'y a pas de déformation mécanique de l'échantillon, l'orientation de l'échantillon et l'épaisseur des coupes peuvent être modifiées à volonté. L'association de la tomographie avec un outil mathématique de calcul de distribution de cordes, indique la répartition des différentes tailles de pores d'un matériau. Récemment, l'utilisation de cette méthode a permis d'étudier l'architecture osseuse [Jokisch et al., 147] et la structure poreuse de particules d'intérêt pharmaceutique [Farber et al., 148]. Les images réalisées par tomographie ont données des résultats comparables et complémentaires à ceux du MEB : les pores interconnectés sont répartis de façon régulière dans toutes les directions du volume du matériau. La distribution de diamètre des pores du matériau (1+2) se situe principalement entre 274 et 610 μm (tableau 14.). Ces valeurs sont assez proches de celles obtenues en granulométrie (269-493 μm) (tableau 14.). Il devrait donc être possible de déterminer quel sera le diamètre des pores du matériau en fonction de la taille des grains utilisés comme agent porogène. La porosimétrie à mercure n'étant pas une technique parfaitement adaptée pour la caractérisation des pores de taille macroscopique, la distribution de cordes pourrait être une approche intéressante.

Idéalement, les implants destinés à l'ingénierie tissulaire doivent servir de "charpente" à la croissance cellulaire et à la formation de la matrice extracellulaire en trois dimensions. Pour atteindre ce but, plusieurs paramètres du matériau peuvent être ajustés. Une porosité, une taille de pores et une structure poreuse appropriées, sont des caractéristiques essentielles pour assurer la nutrition des cellules à l'intérieur de l'implant, et pour fournir dans le même temps un échafaudage approprié pour la régénération du tissu.

Une grande surface va favoriser l'attachement et la croissance cellulaire, tandis qu'un volume avec de larges pores est nécessaire pour coloniser le matériau avec une quantité suffisante de cellules pour la réparation tissulaire. D'autre part, des biomatériaux hautement poreux et ayant un réseau de pores interconnectés, vont faciliter la vascularisation de l'implant, ainsi que la diffusion des nutriments et des déchets générés. De cette façon, ils vont augmenter la viabilité des cellules au centre de l'implant.

Le diamètre des cellules en suspension impose une taille minimale de pores, qui va varier d'un type cellulaire à l'autre. Il est reporté dans la littérature qu'un diamètre de pore situé entre 200 et 400 μm est préférable pour faciliter la migration, l'attachement et la prolifération des ostéoblastes [Boyan et al., 167; Whang et al., 168]. La courbure de ce type de pore offrirait une compression et une tension optimales sur les mécanorécepteurs des cellules, et elle leur permettrait de migrer à travers l'implant grâce à l'interconnexion des

pores [Boyan et al., 167]. La migration cellulaire a été observée pour des diamètres supérieurs à 150 μm [Baksh et al., 169]. Toutefois ces chiffres sont à utiliser avec précaution car certains auteurs préconisent une macroporosité plus petite de 100 à 150 μm [Spector et al., 170]. Il semblerait pourtant que des pores de petite taille soient aussi nécessaires pour l'accrochage des cellules au matériau et que des pores plus grands soient requis pour la migration cellulaire et la production de matrice extracellulaire. La microporosité aurait quant à elle, un rôle essentiel dans les échanges nutritifs.

L'implant cellulosique de porosité (1+2) pourrait être un matériau de choix pour la régénération du tissu osseux avec : un volume poreux important de 95 %, la présence de pores larges de 269 à 493 μm de diamètre, une majorité de pores de petites tailles de 44 à 111 μm de diamètre, et une interconnexion des pores allant de 38 à 350 μm de dimension (tableau 14.).

Lors de l'implantation d'éponges de cellulose régénérée, la formation de tissu de granulation en site sous-cutané [Martson et al., 43; Pajulo et al., 44], et celle de tissu osseux en site fémoral ont été observées [Martson et al., 42; Bruneteau et al., 53; Laurence, 54]. Le néo-tissu se développe surtout en périphérie de l'implant, mais aussi à l'intérieur. Cependant, la plupart des travaux ne décrivent pas la porosité des éponges implantées. Pajulo *et al.* ont montré qu'il y avait une augmentation de la synthèse du tissu de granulation dans un matériau macroporeux de pores de 50 à 300 μm , quand le nombre de pores et le taux d'interconnexion augmentaient [Pajulo et al., 44]. Une étude préliminaire menée par Bruneteau [Bruneteau et al., 53] et Laurence [Laurence, 54] sur des implants réalisés avec un agent porogène de diamètre situé entre 250 et 900 μm , a montré le caractère ostéoconducteur de ces matériaux.

2. Modification de la cellulose

Différents traitements de surface ont été envisagés dans cette étude afin de stimuler la biointégration de l'implant et d'augmenter son pouvoir ostéogène. Des implants de cellulose compacte et/ou macroporeuse ont été biofonctionnalisés en surface (1) par greffage de

molécules bioactives, (2) ou par phosphatation dans la perspective d'avoir une continuité de la phase minérale avec le biomatériau, ou dans la masse (3) par réticulation du matériau avec de l'albumine.

2.1. Greffage de peptides RGD sur la cellulose

Dans ce travail, les matériaux cellulose ont été rendus biologiquement actifs grâce au greffage de peptides contenant la séquence RGD. La surface ainsi modifiée pourrait mimer une surface biologique et exposer des ligands reconnaissables par les récepteurs présents en surface des membranes cellulaires.

L'étude a tout d'abord été menée sur un matériau compact de façon à vérifier la faisabilité du greffage de molécules sur la cellulose, puis sur un matériau macroporeux destiné à mimer la structure osseuse. La caractérisation physico-chimique des matériaux greffés par des peptides d'adhésion a été complétée par une étude de cytocompatibilité indirecte, et par une étude d'attachement cellulaire qui vise à vérifier les propriétés biomimétiques de l'implant vis-à-vis des ostéoblastes humains.

2.1.1. Caractérisation des matériaux compacts

2.1.1.1. Etude topographique par Microscopie Electronique à Balayage

Les pastilles de cellulose vierges ou greffées ont été observées par MEB au grossissement 5000. Le MEB a permis de suivre les modifications de l'état de surface de la cellulose nettoyée et après chaque étape de greffage des molécules (APTES, SMP, RGDC).

Dans l'ensemble, l'analyse topographique des matériaux ne montre pas de changement notable de la surface : la surface reste plane, homogène et non fissurée. Il apparaît toutefois un "lissage" de la surface du matériau après le greffage des peptides RGDC (figure 58.).

2.1.1.2. Etude du caractère hydrophile de la surface de matériaux par mesure d'angle de contact

Les mesures d'angle de contact de l'eau ont été effectuées sur les pastilles de cellulose avant et après les différents greffages [Bartouilh de Taillac et al., 139; Bartouilh de Taillac et al., 140]. La difficulté d'obtenir des surfaces régulières et non gondolées, ont rendu toutefois ces mesures délicates à cause de la rétraction du matériau durant le séchage.

Vu la grande capacité d'absorption de la cellulose avant greffage, aucune mesure d'angle de contact en statique n'a pu être effectuée (voir *la première partie Etude Bibliographique : 3.3.1. Nature chimique et structurale*). En effet, une goutte d'eau déposée à la surface pénètre presque instantanément à l'intérieur du matériau. L'appareil dont nous disposons nous permet toutefois d'avoir accès à l'aide d'une caméra au temps de pénétration d'une goutte d'eau dans le matériau. Des mesures en dynamique ont été réalisées pour mesurer la cinétique d'absorption de cette goutte d'eau (figure 59.). Cette cinétique a été évaluée et elle est reproductible.

Après chaque étape de greffage, la mesure d'angle de contact est réalisable et aucune absorption de goutte n'est observée dans les temps de mesures effectuées. Le tableau 15. présente les angles de contact moyens obtenus et les écarts types des mesures effectuées après chacune de ces étapes.

Pour le matériau cellulosique greffé par l'APTES (1^{ère} étape), l'angle moyen a été évalué à environ 60 °. La surface de l'échantillon devient donc beaucoup plus hydrophobe après l'association aux fonctions hydroxyle de la cellulose d'APTES contenant des groupements propyle $-(CH_2)_3-$.

Après fonctionnalisation par la molécule SMP (2^{ème} étape), l'hydrophilie est très largement augmentée, puisque la cellulose / APTES / SMP affiche un angle de contact moyen de 39 °. Cette augmentation est due à la présence de groupements maléimide polaires capables de former des liaisons avec les molécules d'eau.

Après le greffage du peptide d'adhésion (3^{ème} étape), l'angle de contact moyen est de 46 °. Cet angle n'est pas significativement différent de celui obtenu après le greffage du SMP.

Les angles de contact de gouttes d'eau mesurés sur les matériaux de cellulose non traitée, de cellulose fonctionnalisée par l'APTES, par le SMP et par le peptide RGD, montrent une modification du caractère hydrophile des matériaux en fonction des différentes étapes du greffage. De nature très hydrophile, la surface de cellulose est rendue plus hydrophobe par les différents greffages réalisés pour la fonctionnaliser. Cette approche "macroscopique" donne une première indication de la modification de la surface de cellulose par le greffage chimique.

2.1.1.3. Analyse chimique par spectroscopie de photoélectrons

Des analyses XPS ont été réalisées sur des échantillons de cellulose à divers stades du greffage jusqu'à la phase finale, c'est-à-dire le greffage des peptides RGDC [Bartouilh de Taillac et al., 139; Bartouilh de Taillac et al., 140].

Par souci de clarté, les résultats quantitatifs sont présentés dans le tableau 16. et les liaisons chimiques dans le tableau 17. De la même manière que précédemment pour la cellulose brute et nettoyée, les valeurs ont été déterminées et calculées à partir de l'aire totale respective des pics C1s, O1s, Si2p et N1s.

(A) Cellulose nettoyée.

Les pics du carbone et de l'oxygène sont principalement détectés (figure 60.A et tableau 16.).

Les composantes majoritaires sont bien les liaisons C-O, située à 286.4 eV et O-C-O, centrée à 287.2 eV : liaisons présentes dans la cellulose (figures 61.A et 8.). Toutefois, la pollution carbonée se manifeste à travers un ensemble (non négligeable) de liaisons C-C (situées à 284.5 eV) et COOR (situées à 288.4 eV).

Une analyse plus détaillée des résultats a été fournie dans *la troisième partie Résultats et Discussion : 1. Caractérisation des implants cellulosesiques.*

(B) Cellulose greffée avec l'APTES.

Les atomes d'azote et de silicium apparaissent clairement en surface de la cellulose après greffage de l'APTES (figure 60.B). D'un point de vue quantitatif, les résultats présentés dans le tableau 16, montrent un rapport Si/N d'environ 0.95, ce qui est proche de la valeur attendue 1. Le pic du carbone augmente par rapport à celui de l'oxygène avec un rapport expérimental C/O de $63.3/32.8 = 1.9$, pour une valeur théorique pas très éloignée de $57.6/36.4 = 1.6$ (tableau 16.).

Le spectre C1s possède une allure totalement différente de celle du spectre de la cellulose nettoyée. La composante centrée à 284.5 eV traduisant les liaisons de type C-C, est maintenant majoritaire. Les liaisons oxydées C-C-O, C-O, O-C-O et COOR, situées entre 285.3 et 288.6 eV, sont en proportions plus faibles. Ce résultat semble donc témoigner d'un recouvrement de la cellulose par le greffage des molécules d'APTES (groupements propyle - $(\text{CH}_2)_3$ - attendus et groupements éthoxy $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ de la molécule silane n'ayant pas réagi) (figures 61.B et 29.).

Il est à noter également l'apparition de deux composantes : une située à 283.6 eV représentative d'une liaison C-O-Si et l'autre située à 285.85 eV représentative d'une liaison C-N (groupements présents dans l'APTES) (figure 29.). Ces liaisons sont en proportion identique avec respectivement 14.5 % et 15.6 % du signal C1s entier (tableau 18.).

La composante Si2p $3/2$ localisée à 102.4 eV témoigne d'une forme oxydée du silicium et plus particulièrement d'un état d'oxydation du silicium compris entre 2+ et 3+ [Alfonsetti et al., 171]. Par conséquent la composante majoritaire du signal Si2p est attribuée à la liaison $-\text{Si}(\text{O})_3$ attendue entre le substrat et les molécules silanes APTES greffées (figure 62.). Cette composante semble donc confirmer le greffage de l'APTES sur les sites $-\text{OH}$ de la cellulose (figure 29.). Après le greffage de la molécule de SMP et du peptide RGDC, le spectre Si2p présente la même allure que précédemment. Aucun changement n'a eu lieu dans les liaisons impliquant le silicium, ce qui est un résultat attendu (figure 62.).

Le spectre N1s montre un large pic qui se découpe en trois composantes (figure 63.B). La composante majoritaire située à 398.4 eV est typique d'une liaison C-NH₂ (24.3 % du signal N1s entier) (tableau 19.) [Briggs, 172]. Deux autres composantes à haute énergie de liaison (400.2 eV et 401.9 eV) montrent que l'azote est impliqué dans un environnement plus oxydé (figure 29.). En effet, la liaison C-N-O peut être due à une pollution oxygénée ou à des

interactions entre le groupement amine terminal $-NH_2$ de l'APTES et les groupements hydroxyle $-OH$ présents en surface du matériau [Kahn, 173].

Conclusion :

La présence du silicium et de l'azote en proportions voisines ainsi que des liaisons de type $-Si(O-)_3$ pour Si2p et C-NH₂ pour N1s semblent donc confirmer le greffage des molécules APTES sur la cellulose selon le schéma théorique en formant des liaisons covalentes entre les molécules silanes et les $-OH$ présents à la surface de la cellulose (figure 29.).

(C) Cellulose greffée avec le SMP.

Le spectre général de l'échantillon présente les éléments chimiques attendus : oxygène, azote, carbone et silicium (figure 60.C). Après le greffage du SMP, les quantités de carbone et d'oxygène restent à peu près constantes et le rapport expérimental Si/N est de l'ordre de $1.9/2.3 = 0.8$ pour une valeur théorique de $2.3/4.5 = 0.5$ (tableau 16.). La légère augmentation de la quantité d'azote au détriment de celle du silicium est un résultat attendu car la molécule SMP greffée contient un atome d'azote (figure 29.).

Le spectre C1s de la surface cellulose / APTES / SMP a évolué par rapport à celui obtenu après seul greffage de l'APTES (figure 61.C). Les deux composantes majoritaires sont des liaisons C-O et C-C centrées respectivement à 286.2 eV et 284.6 eV. Il y a donc une diminution du pic représentatif des liaisons C-C (diminution de 31.5 % à 20.1 %) au profit de liaisons de type C-O et O-C-O (respectivement 20.3 % et 17 % du signal C1s entier), et de l'apparition de liaisons de type O=C-N (10.7 % du signal C1s entier) (tableau 18.). Ces résultats corroborent la présence de la molécule SMP en surface (figure 29.). La diminution de la liaison C-Si-O à 283.6 eV pourrait indiquer par ailleurs le recouvrement de la cellulose (diminution de 14.5 % à 4.2 %) (tableau 18.).

Le spectre N1s se découpe en trois composantes après greffage du SMP (figure 63.C). Cependant ces pics ont évolué par rapport à ceux obtenus après seul greffage de l'APTES. Les deux composantes caractéristiques d'un environnement oxydé de l'azote (situées à 399.7 eV, de type liaison amide, et situées à 401.2 eV, de type liaison imide) ont augmenté

(augmentation de 59.4 % à 94 %), au détriment de la composante caractéristique de la liaison C-NH₂ (détectée à 398.5 eV) qui devient minoritaire (6 % du signal N1s entier) (tableau 19.). Ceci est un résultat attendu car la liaison maléimide est présente dans la molécule SMP et la liaison amide se forme au cours du greffage avec l'APTES (figures 63.C et 29.).

Les aires sous pics des déconvolutions du spectre N1s permettent de mesurer la proportion de chaque liaison impliquant l'atome d'azote : liaisons amine, amide et imide. Les pourcentages des liaisons amine obtenus à l'étape de l'APTES et à celle du SMP, ont permis de déterminer la quantité de liaisons -NH₂ qui ont été greffées de molécules SMP (40.6 % de -NH₂ à l'étape APTES - 6.0 % de -NH₂ à l'étape SMP = 34.6 % de molécules greffées, car le SMP ne possède pas de fonction -NH₂) et d'en déduire le rendement de 85 % de ce greffage (tableau 19.).

Conclusion :

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure en la présence très probable de la molécule SMP : il semblerait que le greffage de l'agent intermédiaire SMP sur l'APTES / cellulose se produise selon le schéma théorique, c'est-à-dire en formant des liaisons covalentes entre le SMP et les fonctions -NH₂ présentes dans la molécule silane (figure 29.).

(D) Cellulose greffée avec le peptide " RGDC ".

Le spectre général de l'échantillon présente les éléments attendus : oxygène, azote, carbone, silicium, soufre (en limite de détection) (figure 60.D). Comme attendu, il y a une légère diminution des quantités en carbone et en oxygène, avec des valeurs expérimentales passant de 59.7 à 55.3 % pour le carbone (en théorie, de 59.1 à 55.6 %), et de 36.1 à 35.9 % pour l'oxygène (en théorie, de 34.1 à 30.5 %) (tableau 16.). Un rapport Si/N de 1.37 est obtenu expérimentalement pour un rapport de 0.11 attendu théoriquement. La présence d'une grande quantité de silicium (5.1 %) par rapport à celle de l'azote (3.7 %) semble présager d'un greffage non homogène du peptide à la surface du matériau. Néanmoins, les spectres relatifs aux liaisons chimiques laissent fortement suspecter la présence de la molécule RGDC. Un accrochage non systématique de la molécule de SMP sur l'APTES, ainsi que de la molécule de RGDC sur le SMP, peuvent expliquer ces faits.

Le spectre C1s est relativement similaire au spectre greffé SMP (figure 61.D). Cependant les formes oxydées entre 286.4 eV et 288.6 eV sont en proportions différentes, avec un léger supplément de liaisons de type O=C-N (11.2 % du signal C1s entier) caractéristiques des liaisons peptidiques (tableau 18.) (figure 30.).

Le spectre N1s affiche de nouveau trois composantes dont les proportions respectives ont évolué (figure 63.D). La première typique de la liaison C-NH₂ peut provenir du peptide RGDC lui-même ou de certaines molécules aminosilanes n'ayant pas réagi avec le SMP (6 %) et ayant par conséquent cette fonction encore disponible. Des groupements plus oxydés sont toutefois attendus, puisque des environnements amide O=C-N sont présents dans la chaîne peptidique. Ceci semble se traduire par la présence d'un pic majoritaire à 400.2 eV (56.4 % du signal N1s entier). Les groupements imide, dont le pic à 401.4 eV a diminué, semblent maintenant être masqués par la chaîne peptidique (diminution de 28.5 % à 25.2 %) (tableau 19.).

De la même manière que précédemment, la proportion de molécules RGDC greffées a été calculée à partir des proportions des liaisons amine présentes : 12.4 % (18.4 % de -NH₂ à l'étape RGDC – 6 % de -NH₂ à l'étape SMP) de liaisons -NH₂ ont été ajoutées. Etant donné que la molécule RGDC contient 2 fonctions amine, le rendement de la réaction est de 15 % de peptides greffés pour 100 molécules silane greffées sur la cellulose vierge (avec 40.6 % de -NH₂ à l'étape APTES) (tableau 19.).

Conclusion :

Même s'il n'y a pas un accrochage systématique des peptides RGDC sur la surface SMP / APTES / cellulose, il semblerait que le greffage du peptide d'adhésion se fasse en formant une liaison covalente entre la molécule SMP et le peptide RGDC (figure 29.).

Conclusion générale :

Cette étude avait pour but de démontrer la faisabilité de greffage de molécules sur la cellulose. L'interprétation des spectres XPS a amené à des conclusions reproductibles d'une série d'expérimentation à une autre. Même si le rendement du greffage du peptide n'est que de 15 molécules greffées pour 100 molécules APTES greffées en surface de cellulose, il

semblerait que le greffage de l'APTES, du SMP, puis du peptide RGD, soit toujours réalisé suivant le schéma théorique (figure 29.).

2.1.1.4. Etude de la densité de peptides greffés par imagerie β

Les analyses basées sur l'utilisation de Cystéine radiomarquée au soufre 35 (^{35}S) couplée à l'imagerie β haute résolution, permettent de mettre en évidence la densité de Cystéine retenue en surface de la cellulose, l'homogénéité de répartition du greffage et la stabilité dans le temps sous agitation dans l'eau [Bartouilh de Taillac et al., 139]. La Cystéine marquée au ^{35}S a été choisie pour mimer le comportement du peptide contenant cet acide aminé.

Les résultats des analyses d'imagerie β montrent non seulement un greffage relativement homogène de ^{35}S -Cystéine, mais aussi la présence de l'acide aminé même après plusieurs jours passés dans un environnement aqueux sous agitation (figure 64.).

Comme le montre la courbe de la figure 65., la quantité de peptides greffés à la surface de cellulose est évaluée à 2.5 pmol/mm^2 , et au bout de 162 heures dans un environnement aqueux, elle reste relativement stable avec une estimation de 2 pmol/mm^2 . La différence constatée étant faible, il y a peu ou pas de désorption des molécules non correctement greffées et/ou d'hydrolyse des chaînes due au caractère labile de la liaison Si-O-C. La scission de cette liaison, liaison beaucoup plus sensible à l'hydrolyse que la liaison relativement stable C-O-C, est catalysée par l'ensemble des acides et des bases. Le clivage hydrolytique de la liaison Si-O-C va dépendre de la nature des groupements liés aux atomes de carbon et de silicium [Tacke et al., 174]. Dans cette étude, il semblerait que la liaison cellulose/silane soit relativement stable.

2.1.1.5. Etude de la biocompatibilité in vitro

Dans un premier temps, des études de cytotoxicité indirecte ont été réalisées afin de vérifier la biocompatibilité des matériaux modifiés par les peptides RGD. Puis l'efficacité du

revêtement biomimétique des peptides RGD a été évaluée sur la cellulose vierge et modifiée par l'étude de l'attachement et de la prolifération cellulaires à partir d'ostéoblastes humains en culture [Bartouilh de Taillac et al., 139; Bartouilh de Taillac et al., 140].

2.1.1.5.1. Cytotoxicité et cytocompatibilité des extraits

La moyenne et l'écart type des absorbances mesurées ont été calculés lors des tests colorimétriques. Les résultats des tests au Rouge Neutre (viabilité cellulaire) et au MTT (activité métabolique) sont exprimés en pourcentage du témoin négatif qui représente 100 % de viabilité et d'activité métabolique cellulaires. Une dilution est considérée comme cytotoxique si l'absorbance devient inférieure à 75 %, seuil en dessous duquel la viabilité et l'activité métabolique cellulaires traduisent une action cytotoxique des extraits des matériaux. Le témoin positif de cytotoxicité (solution de phénol) induit comme attendu, une altération élevée et reproductible (de 25 à 30 %) de la viabilité et de l'activité métabolique des cellules utilisées.

Les résultats des tests du Rouge Neutre et du MTT permettent de conclure à l'absence de cytotoxicité du matériau avant et après chaque greffage. Même si les résultats présentés ne montrent que les tests relatifs à la cellulose nettoyée et à la cellulose greffée APTES / SMP / RGDC, ces tests ont aussi été réalisés pour les étapes intermédiaires de greffages et ils ne présentent pas eux non plus de cytotoxicité. En effet les histogrammes des figures 66. a et b, montrent que les extraits purs ou dilués du matériau cellulosique n'altèrent ni la viabilité, ni l'activité métabolique des cellules utilisées.

La cellulose greffée ou non, ne paraît pas relarguer de substance cytotoxique pour les cellules : non seulement leur viabilité est très élevée avec un pourcentage avoisinant les 100 %, mais en plus elles ont une bonne activité métabolique.

2.1.1.5.2. Attachement cellulaire

L'attachement des cellules ostéoprogénitrices humaines est mesuré avec du milieu sans sérum sur la cellulose compacte vierge et modifiée (figure 67.) [Bartouilh de Taillac et al., 139; Bartouilh de Taillac et al., 140].

Le nombre de cellules attachées sur la cellulose compacte est multiplié par un facteur 4,6, 1,8 et 3 après greffage du peptide RGDC respectivement 1 heure, 3 heures et 24 heures après l'ensemencement par rapport à la cellulose vierge. Le rôle médiateur du peptide RGD vis-à-vis de l'adhésion cellulaire est significatif à tous les temps, mais c'est à 1 heure qu'il est le plus marqué.

Les cellules vont tout d'abord s'attacher au support, s'étaler si elles ont suffisamment de sites d'ancrages, puis synthétiser de la matrice extracellulaire. La population cellulaire initialement recrutée à 1 heure, est toujours présente après 3 heures et 24 heures d'ensemencement. Les cellules se sont probablement étalées et elles ont du commencer à synthétiser des protéines.

Le fait que cet attachement cellulaire se déroule dès les premières heures d'ensemencement peut être intéressant en vue d'une application de l'implant de cellulose comme matériau hybride (voir *la première partie Etude bibliographique : 4.1.1. Greffage de peptides RGD sur la cellulose*). L'objectif du greffage de peptides contenant la séquence RGD est de faire adhérer les cellules en grand nombre et le plus rapidement possible sur le matériau. Lors de l'opération chirurgicale de comblement d'un défaut osseux, deux voies différentes peuvent être envisagées. Soit le matériau est cellularisé rapidement avec de la moelle osseuse du patient, afin d'être implanté en per-opératoire et éviter ainsi une nouvelle intervention. Soit on procède à une sélection des cellules ostéoprogénitrices de la moelle osseuse, qui vont être amplifiées avant la cellularisation de l'implant. Le matériau hybride pourra ensuite être implanté lors d'une seconde intervention.

2.1.2. Caractérisation des matériaux poreux

L'étude a été poursuivie par la fonctionnalisation d'un matériau macroporeux dans le but d'améliorer la colonisation en profondeur de la cellulose par les tissus (voir *la première partie Etude Bibliographique : 2.1. Cahier des charges d'un matériau de comblement osseux*).

2.1.2.1. Analyse chimique par spectroscopie de photoélectrons

De la même manière que pour les matériaux compacts, des analyses XPS ont été réalisées sur des échantillons de cellulose macroporeuse à divers stades du greffage jusqu'à la phase finale [Bartouilh de Taillac et al., 139]. Comme précédemment les valeurs ont été déterminées et calculées à partir de l'aire totale respective des pics C1s, O1s, Si2p et N1s (tableau 20.).

(A) Cellulose nettoyée.

En surface de la cellulose vierge, les analyses XPS mettent en évidence les atomes de carbone et de l'oxygène avec des quantités attendues de 57.2 % de carbone (54.5 % en théorie) et de 42.8 % d'oxygène (45.5 % en théorie) (figure 68.A) (tableau 20.).

Le spectre C1s présente essentiellement quatre composantes présentes dans la molécule de cellulose (figure 8.) : C-O, située à 286.3 eV, C-C-O, située à 285.25 eV, C-C, située à 284.3 eV et O-C-O située à 287.2 eV. Les résultats quantitatifs relatifs à l'analyse des surfaces sont rassemblés dans le tableau 21. Le rapport expérimental C/O de 1.34 n'est pas très éloigné du rapport théorique attendu de 1.2, mais il traduit une pollution carbonée qui se manifeste à travers un ensemble non négligeable de liaisons C-C et de liaisons COOR (situées à 288.2 eV) (figure 69.A).

(B) Cellulose greffée avec l'APTES.

Les analyses XPS de la cellulose greffée avec la molécule silane, confirment la présence des atomes d'azote et de silicium, en plus de ceux de l'oxygène et du carbone (figure 68.B). Les mesures expérimentales conduisent à un rapport Si/N de $3.5/2.3 = 1.5$ qui n'est pas très éloigné de la valeur attendue 1 (tableau 20.). De plus après greffage de l'APTES, il y a une augmentation de la quantité de carbone (augmentation de 57.2 % à 63.5 %), ainsi que du rapport expérimental C/O jusqu'à la valeur $63.5/30.7 = 2.1$ (avant le greffage le rapport était de $57.2/42.8 = 1.3$) (tableau 20.).

Les liaisons C-C situées à 284.6 eV, sont majoritaires avec 37.6 % du signal C1s entier, en comparaison avec le spectre de la cellulose vierge. Les liaisons oxydées C-C-O présentes en proportion non négligeable (11.5 % du signal C1s entier), peuvent être attribuées à des groupements éthoxy de la molécule APTES qui n'auraient pas réagi avec les fonctions -OH. Il est à noter également l'apparition d'une composante impliquant C et (Si, O) située à 283.65 eV et d'une composante C-N située à 285.8 eV (respectivement 6.6 % et 10.8 % du signal C1s entier). Ces résultats semblent donc témoigner d'un recouvrement de la cellulose par le greffage des molécules d'APTES (groupement propyle $-(CH_2)_3-$, liaison silane C-Si-O et fonction amine C-NH₂ attendus) (figure 69.B et 29.) (tableau 21.).

Le spectre Si2p montre une composante maximum à 102.4 eV attribuée à la liaison -Si-(O-)₃ attendue entre le substrat et les molécules silanes APTES greffées (figure 70.). De toutes ces observations, il ressort que les chaînes $-CH_2-CH_2-NH_2$ sont bien greffées en surface de la cellulose (figure 29.). Après le greffage de la molécule de SMP et du peptide RGDC, aucune modification n'a été observée pour le spectre Si2p, par rapport aux changements considérables observées pour les spectres C1s et N1s (figure 70.).

De plus, le spectre N1s révèle trois composantes (figure 71.B) : une de faible énergie caractéristique des groupements C-NH₂ (situés à 398.8 eV : 28.2 % du signal N1s entier) et deux autres (situés à 401.8 eV : 27.9 % du signal N1s entier, et à 400 eV : 43.9 % du signal N1s entier) qui peuvent être attribuées à l'azote dans un environnement plus oxydé (figure 29.) (tableau 22.). Cette dernière composante est très élevée par rapport à ce qui était attendu. Comme cela a été précisé auparavant, elle peut être due à des interactions entre les groupements amine terminaux et les groupements oxygène de la surface.

(C) Cellulose greffée avec le SMP.

Le spectre général de l'échantillon présente les éléments attendus : oxygène, azote, carbone et silicium (figure 68.C). A l'étape du SMP, le rapport Si/N attendu est de 1/2 et la valeur expérimentale trouvée de l'ordre de $3.4/4.1 = 0.8$ (tableau 20.). Le greffage de la molécule de SMP prend effectivement place comme attendu théoriquement, mais l'accrochage ne se fait pas de façon systématique. Ceci doit être du (1) à l'inaccessibilité de certains groupements amine (azote en environnement oxydé), ou bien (2) à la grande taille de l'agent intermédiaire, ou bien (3) à la perte de groupements amine $-NH_2$ présents sur l'APTES.

Lors de la déconvolution du spectre C1s, une nouvelle composante oxydée apparaît à 287.9 eV (figure 69.C). Elle est aussi bien relative à la fonction amide $O=C-N$ formée entre l'APTES et le SMP, qu'à la fonction imide présente dans le groupement maléimide de la molécule SMP (figure 29.). Le fait que la liaison C-C soit toujours majoritaire avec 33.2 % du signal C1s entier, est justifié par l'apport de groupement éthyle $-(CH_2)_2-$ lors du greffage de l'agent intermédiaire (tableau 21.).

Concernant le spectre N1s, la composante amine située à 398.4 eV diminue (diminution de 28.2 % à 23.7 %), au profit de l'augmentation de la composante amide (augmentation de 43.9 % à 56.1 % du signal N1s entier) (figure 71.C) (tableau 22.). Cette augmentation est corrélée avec la présence des groupements amide $O=C-N$ et des groupements imide présents dans la molécule SMP (figure 29.). Ces résultats corroborent la présence de la molécule SMP en surface. Cependant, il semblerait que le greffage de la molécule sur le substrat APTES / cellulose ne se fasse pas de façon systématique. Le rendement (voir les analyses XPS réalisées sur la cellulose compacte) du greffage de la molécule SMP sur le silane semble confirmer ce résultat avec 16 % de molécules greffées.

(D) Cellulose greffée avec le peptide " RGDC ".

Après greffage du peptide, les analyses XPS confirment la présence des éléments chimiques attendus (oxygène, azote, carbone et silicium), la légère augmentation de la quantité d'azote et l'apparition de l'atome de soufre en limite de détection, présent sur le groupement thiol des peptides RGDC (figure 68.D). Les quantités de carbone et d'oxygène restent à peu près constantes avec des valeurs (60.2 % pour le carbone et 31 % pour

l'oxygène) pas trop éloignées de celles attendues (55.6 % pour le carbone et 30.5 % pour l'oxygène) (tableau 20.). Un rapport Si/N de $3.4/5.2 = 0.65$ est obtenu expérimentalement pour un rapport de 0.11 attendu théoriquement (dans le cas d'une séquence de RGD greffée sur chaque atome de silicium) (tableau 20.). La présence d'une quantité constante de silicium (alors qu'une diminution était attendue) semble indiquer un greffage non homogène du peptide à la surface du matériau. Néanmoins, les spectres relatifs aux liaisons chimiques laissent fortement suspecter la présence de la molécule RGDC. Un accrochage non systématique de la molécule de SMP sur l'APTES, ainsi que de la molécule de RGDC sur le SMP, peuvent expliquer ces faits.

Le spectre C1s ne subit pas de grandes modifications après greffage du peptide d'adhésion (figure 69.D). Cependant les formes oxydées entre 286.3 eV et 289 eV sont en légères augmentations de 9.9 % à 10.8 %, traduisant un supplément de liaisons de type O=C-N et de type -COOH (liaisons présentes dans le peptide RGDC) (tableau 21.) (figure 30.).

Le maximum situé à 399.7 eV du spectre N1s (57.7 % du signal N1s entier), est dû aux espèces amide O-C=N caractéristiques de la liaison peptidique. L'augmentation de la composante -NH₂ (augmentation de 23.7 % à 27.1 %) est liée à la présence de groupements amine dans le peptide RGDC (figures 71.D et 30). Au vu de ces résultats, les fonctions imide dont le pic a diminué (diminution de 20.2 % à 15.2 %), semblent être masquées par la chaîne peptidique (tableau 22.).

Le rendement (voir les analyses XPS réalisées sur la cellulose compacte) du greffage du peptide RGDC sur la molécule SMP est de 6 % par rapport au greffage de la molécule silane. Ce faible pourcentage pourrait expliquer les résultats obtenus précédemment et le fait d'avoir le greffage du peptide RGDC qui se fait selon le schéma théorique, mais pas de façon systématique.

Conclusion générale:

D'après les spectres obtenus en XPS, il paraît raisonnable de penser que le peptide d'adhésion est bien immobilisé à la surface de la cellulose poreuse. Toutefois, de la même manière que pour le greffage réalisé sur le matériau compact, il semblerait que l'accrochage de la molécule RGDC ne soit pas systématique.

La comparaison des résultats obtenus pour la cellulose compacte et la cellulose poreuse, n'a pas montré de grandes différences entre les deux matériaux.

D'un point de vue quantitatif, les pourcentages des éléments chimiques du carbone et de l'oxygène sont comparables et varient de façons similaires après chaque étape du greffage, mais une petite différence a été trouvée dans le cas du silicium et de l'azote. En plus d'être légèrement supérieure dans le cas de la cellulose poreuse, le pourcentage de silicium reste constant (3.4 %) au cours des différentes étapes de greffage, alors qu'il augmente de manière significative pour la cellulose compacte (augmentation de 1.9 à 5.1 %). D'autre part on constate qu'après toutes les étapes du greffage, l'augmentation de la quantité d'azote est plus importante sur le matériau poreux (augmentation de 2.9 % contre 1.7 %). L'augmentation de l'azote au détriment du silicium, semble indiquer un recouvrement de la molécule silane APTES, d'abord par la molécule SMP, puis par le peptide RGDC. Ces résultats semblent en faveur d'un greffage non systématique, mais plus homogène du peptide RGDC sur la cellulose poreuse par rapport à la cellulose compacte.

Les déconvolutions des spectres N1s et Si2p des matériaux compact et poreux présentent les mêmes tendances. Il existe de légères différences, mais elles ne sont pas significatives. Il en est de même pour les déconvolutions des spectres C1s du matériau non modifié et greffé de molécules silanes. La différence la plus nette entre la cellulose compacte et la cellulose poreuse, se situe au niveau des spectres relatifs aux deux dernières étapes du traitement. Dans le cas du matériau poreux, la composante C-C est nettement majoritaire, alors qu'elle ne l'est pas pour le matériau compact. Toutefois, les tendances restent les mêmes d'une étape à l'autre.

La différence la plus importante se situe au niveau du rendement du greffage du peptide, qui est plus élevé dans le cas du matériau compact (15 % par rapport à 6 %). La baisse de 9 % de peptides greffés en surface de la cellulose poreuse, se fait peut être au profit d'une homogénéité du greffage. De plus il est important de souligner que le rendement réactionnel du peptide sur le matériau vierge n'a pas pu être déterminé, mais seulement celui du peptide sur la molécule silane. La comparaison du rendement réactionnel entre le matériau compact et le matériau poreux est donc peu exploitable. Bien que conduisant à un rendement plus faible, la cellulose macroporeuse présente une surface beaucoup plus importante que celle de la cellulose compacte. Son nombre de sites -OH disponibles pour le greffage de molécules silanes est donc beaucoup plus élevé. Par conséquent, on peut supposer que la baisse de

rendement du greffage des peptides sur le silane, est compensée par un nombre plus important de fonctions hydroxyle greffées. Et ce d'autant que le rendement du greffage du peptide sur l'agent intermédiaire est plus élevé pour le matériau poreux (38 % contre 18 %).

Seule une étude précise par imagerie β pourrait théoriquement renseigner sur la densité de peptides ou de silanes radiomarqués greffés en surface de la cellulose, et permettre une comparaison de ces densités entre le matériau compact et poreux. Les limites de cette technique vis-à-vis du caractère poreux de l'échantillon, n'ont pas rendu cette analyse possible pour le moment.

2.1.2.2. Etude de la biocompatibilité in vitro : attachement cellulaire

L'attachement des cellules ostéoprogénitrices humaines est mesuré avec du milieu sans sérum sur la cellulose poreuse vierge et modifiée (figure 72.) [Bartouilh de Taillac et al., 139].

Les résultats des tests d'attachement cellulaire montrent une augmentation du nombre de cellules adhérentes sur le matériau greffé de peptides RGDC après 24 heures d'ensemencement : il est 1.7 fois plus important par rapport à la cellulose brute. Le peptide RGDC greffé sur un matériau de cellulose macroporeuse semble effectivement avoir un rôle médiateur vis-à-vis de l'adhésion cellulaire.

Cependant, le nombre de cellules attachées après 1 heure et 3 heures d'ensemencement est équivalent pour la cellulose vierge et modifiée. L'effet tardif à 24 heures des peptides RGD vis-à-vis des ostéoblastes, est peut être due à la morphologie macroporeuse du matériau. En effet, les cellules mettent vraisemblablement davantage de temps à pénétrer dans les pores du matériau, et à rencontrer une surface propice à la création de liaisons ligands-récepteurs bien établies. Ces liaisons doivent être suffisamment nombreuses pour leurs permettre de résister aux rinçages pratiqués lors du test d'attachement. Il est clair que ces processus d'adhérence cellulaire, quoique plus longs lorsque la cellulose est macroporeuse, sont hautement facilités lorsque le support est greffé de peptides RGD.

Les différences de pourcentages d'adhésions observées entre le matériau compact et poreux, sont difficilement comparables, car les tests d'attachement cellulaire n'ont pas été réalisés avec le même pool cellulaire. En effet, la différence de sexe, mais aussi d'âge du patient dont est issu le pool cellulaire, pourraient influencer ces résultats. Des rendements de greffage différents pour le matériau compact et le matériau poreux, pourraient également expliquer ces pourcentages. Malheureusement, le rendement réactionnel du peptide sur le matériau vierge n'a pas pu être déterminé, et seul le rendement du peptide sur la molécule silane a été réalisé (voir *la troisième partie Résultats et Discussion : 2.1.1.1. Caractérisation des matériaux poreux*). La comparaison de ces rendements n'est donc pas exploitable.

La MEB a permis de vérifier la présence des cellules attachées en surface et au cœur des matériaux après une section des échantillons (figure 73.) (voir la deuxième partie *Matériels et Méthodes : 2.4.2. Microscopie Electronique à Balayage pour l'étude de la topographie des matériaux*). Que se soit au voisinage de la surface ou au centre du matériau, les cellules ont été retrouvées dans l'ensemble des pores des implants greffés de peptides RGD (figure 73.). Après 24 heures d'ensemencement, elles se sont attachées, puis étalées sur le support en formant de nombreux prolongements avec les sites d'ancrage du matériau.

Discussion

Le concept de matériau hybride consiste à associer un biomatériau avec une composante cellulaire. L'objectif étant de remplacer, de maintenir et d'assurer de façon transitoire la fonction du tissu qu'il remplace, en lui associant avant l'implantation, des cellules provenant du patient [Baquey, 58].

L'originalité de ce travail de recherche s'inscrit dans cette idée de conjuguer les connaissances nouvellement acquises en réparation tissulaire et en science des matériaux. Dans cette étude, la cellulose a été rendue biologiquement active par le greffage en surface de séquences RGD [Bartouilh de Taillac et al., 139; Bartouilh de Taillac et al., 140] qui pourraient mimer certaines caractéristiques de la matrice extracellulaire et jouer un rôle de

ligands pour les récepteurs présents en surface des membranes cellulaires [Pierschbacher and Ruoslahti, 60; Pierschbacher and Ruoslahti, 61].

Les matériaux greffés de peptides RGD sont connus pour leurs propriétés d'adhésion cellulaire [Ruoslahti and Pierschbacher, 62; Durrieu et al., 66; Kobayashi et al., 67; Porte-Durrieu et al., 69]. Afin de favoriser l'expression de ces propriétés sur le long terme, l'immobilisation de la séquence RGD en surface des matériaux apparaît essentielle pour optimiser la relation surface/cellule [Ruoslahti and Pierschbacher, 62; Durrieu et al., 66; Kobayashi et al., 67; Porte-Durrieu et al., 69]. Le principal avantage apporté par un greffage covalent comparé à un simple recouvrement avec des protéines du plasma, est une meilleure stabilité du peptide. Même si l'adsorption de biomolécules est généralement facile à mettre en œuvre, elle ne permet pas une présence pérenne de ces biomolécules sur le long terme due aux risques de désorption, de dénaturation et/ou d'échange avec les protéines du milieu [Castner and Ratner, 59]. Par contre, la formation d'une liaison chimique entre le peptide et la surface du biomatériau, empêche toute désorption. La molécule liée est beaucoup plus stable sous conditions physiologiques et elle est plus résistante quand elle est soumise aux conditions environnementales. D'autre part, le greffage de peptides RGD permet un meilleur contrôle de l'architecture microstructurale et moléculaire des surfaces des biomatériaux ; notamment de l'orientation (c'est-à-dire C- ou N- terminal) et de l'arrangement spatial de la séquence ou des séquences choisies [Massia and Hubbell, 70; Irvine et al., 71].

Concernant la méthode d'immobilisation des peptides utilisée lors de ce travail de recherche, les avantages sont multiples.

Tout d'abord, les réactions réalisées à température ambiante pourraient permettre de greffer des biomolécules sans les dénaturer.

Ensuite, les différentes étapes du greffage ont été effectuées sous atmosphère contrôlée en milieu anhydre. Cette condition est indispensable, surtout lors de l'étape du greffage du silane, afin d'éviter la formation de dépôts non homogènes susceptibles de se détacher du support. En effet, la réaction de silanisation en milieu organique permet d'obtenir une répartition plus homogène des molécules silanes greffées en surface, mais aussi un meilleur contrôle conformationnel et une meilleure accessibilité des sites pour le greffage ultérieur [Chaimberg and Cohen, 83]. Toutefois, Simon a montré que lors du greffage d'un silane trifonctionnel comme l'APTES, un excès d'agrégats de silane était observé à la surface du matériau [Simon et al., 143]. Il pourrait être dû à des chaînes non correctement fixées et

enchevêtrées. De façon à obtenir des surfaces greffées planes et continues, un rinçage rigoureux associé à un lavage aux ultrasons a été réalisé sur les matériaux après la réaction de silanisation [Simon et al., 143].

De plus, cette méthode n'est pas limitée aux agents hétérobifonctionnels comprenant la fonction maléimide utilisés lors de la deuxième étape de greffage. D'autres espaceurs comportant une combinaison à la fois des fonctions ester succinimide (ou hydrazide) et maléimide (ou disulfide) peuvent être utilisés. Shriver-Lake *et al.* [Shriver-Lake et al., 141] ont comparé neuf espaceurs hétérobifonctionnels différents par la réactivité de leur groupement, leur longueur, la rigidité de la molécule et par leur capacité à fixer des anticorps. Aucune différence de réactivité entre ces espaceurs et le greffage de biomolécules n'a été mise en évidence. Par conséquent, de nombreuses biomolécules possédant différents résidus réactifs peuvent être greffés par cette méthode.

Cette réaction peut être réalisée sur différents matériaux. Elle a été validée au sein du laboratoire sur des matériaux en silice, titane, alliage de titane (TA6V), HA, HA- β TCP [Durrieu et al., 66; Porte-Durrieu et al., 69].

La méthodologie utilisée a permis de mettre en évidence par imagerie β , non seulement un greffage relativement homogène (échelle supramicrométrique) des peptides en surface de cellulose, mais aussi la stabilité de ce greffage après plusieurs jours passés dans un environnement aqueux sous agitation [Bartouilh de Taillac et al., 139].

La quantité de peptides immobilisés en surface des matériaux cellulosiques est évaluée à 2 pmol/mm² (d'après les mesures faites avec la Cystéine-³⁵S utilisée pour modéliser le peptide RGDC), ce qui est légèrement inférieur aux 3.8 pmol/mm² de peptides greffés sur des alliages titane [Guillemot et al., 65]. Massia et Hubbell [Massia and Hubbell, 70] ont évalué à 10⁻⁵ pmol/mm² la densité de surface de peptides RGD suffisante pour promouvoir l'étalement cellulaire (correspondant à un espace entre les peptides de 440 nm), et seulement à 10⁻⁴ pmol/mm² pour établir la formation de contacts focaux (correspondant à un espace entre les peptides de 140 nm). Donc une répartition de peptide RGD équivalente à celle de la Cystéine obtenue dans ce travail devrait être suffisante pour favoriser l'étalement des cellules et pour induire la formation de contacts focaux. Même si on considère que la séquence de peptide RGD présente un plus grand encombrement stérique qu'un simple acide aminé Cystéine, la distribution du peptide obtenue dans nos conditions expérimentales devrait être suffisante pour induire la formation de contacts focaux.

L'étude réalisée montre que l'immobilisation sur la cellulose du peptide contenant la séquence RGD permet une augmentation significative de l'attachement et de l'étalement d'ostéoblastes dans du milieu de culture sans sérum [Bartouilh de Taillac et al., 139; Bartouilh de Taillac et al., 140]. Le fait que cet attachement cellulaire se fasse dès les premières heures d'ensemencement, devrait être un atout en vue d'une application de la cellulose comme matériau hybride. La cellulose greffée de peptides actifs pourrait être pré-cellularisée par des cellules osseuses autologues avant son implantation, dans le but d'obtenir une nouvelle génération de substituts osseux selon les concepts de l'ingénierie tissulaire.

2.2. Phosphatation de la cellulose macroporeuse

Du fait de ses propriétés de fixation du calcium, la cellulose phosphatée a été envisagée comme un biomatériau susceptible, une fois implanté, de favoriser la continuité entre la phase minérale et l'implant.

La cellulose sous forme macroporeuse a été phosphatée suivant la méthode mise au point par Granja sur le matériau compact. Afin de tester la capacité de ces implants à induire la formation d'apatite, des études de minéralisation ont été réalisées *in vitro* en conditions physiologiques simulées dans une solution simulant les fluides corporels. Puis cette étude a été complétée par des tests de cytocompatibilité indirecte réalisés avec des ostéoblastes humains.

2.2.1. Etude topographique par Microscopie Electronique à Balayage

La MEB a permis de suivre après chaque étape du traitement, la topographie de la cellulose de porosité (1+2) en surface ainsi qu'au cœur du matériau après une section des échantillons. Les modifications de l'état de surface des échantillons ont été analysées après une phosphatation de 8 heures, après une minéralisation de 14 jours, et après une phosphatation puis une minéralisation.

L'analyse topographique de la surface de cellulose après phosphatation, ne montre pas de changement notable de l'échantillon (figures 74. et 50.) : les pores en forme d'alvéoles et l'interconnexion entre ces pores restent identiques, et il n'y a pas de détérioration visible. Que se soit en surface ou dans le volume, l'étude des échantillons phosphatés a montré une structure régulière des matériaux avec des pores de taille moyenne approximative de 150-600 μm (figure 74.).

Après minéralisation, que les matériaux aient subi un pré-traitement de phosphatation ou non, les photographies prises en MEB montrent une alternance de zones vraisemblablement minéralisées et de zones dépourvues de phosphates de calcium (figures 75. et 76.). Les régions minéralisées sont retrouvées aussi bien en surface qu'au coeur de l'implant (figures 75. et 76.). Les phosphates de calcium recouvrent l'ensemble des pores et apparaissent sous forme d'une couche homogène, avec parfois de petits agrégats (figures 75. et 76.). Ils sont aussi retrouvés de façon légèrement plus éparse au centre qu'à la périphérie de l'échantillon (figures 75. et 76.). Les phosphates de calcium semblent s'être formés de façon préférentielle sur les parties proéminentes du matériau.

Le traitement de phosphatation ne semble pas favoriser la minéralisation car il n'y a pas de différences importantes entre les matériaux phosphatés puis minéralisés et ceux simplement minéralisés (figures 75. et 76.).

2.2.2. Analyse chimique par spectroscopie de photoélectrons

Des analyses XPS ont été réalisées sur des échantillons de cellulose macroporeuse après phosphatation, après immersion dans une solution de calcium et après immersion dans du SBF. Comme précédemment les valeurs ont été déterminées et calculées à partir de l'aire totale respective des pics C1s, O1s et P1s (tableau 23.).

(A) Cellulose nettoyée.

En surface de la cellulose vierge, les analyses XPS mettent en évidence les atomes de carbone et de l'oxygène avec des quantités attendues de 57.2 % de carbone (54.5 % en théorie) et de 42.8 % d'oxygène (45.5 % en théorie) (figure 77.a) (tableau 23.).

La description du spectre C1s (figure 78.) est la même que celle réalisée pour la cellulose vierge macroporeuse avant le greffage de peptides contenant la séquence RGD (voir *la troisième partie Résultats et Discussion : 2.1.2.1. Caractérisation des matériaux poreux : Analyse chimique par spectroscopie de photoélectrons*).

Après les différents traitements subis par la cellulose (phosphatation, pré-incubation dans la solution de calcium et minéralisation), le spectre C1s présente la même allure que pour le matériau non modifié. Ceci est un résultat attendu car les modifications n'ont pas apporté de nouveau groupement carboné.

(B) Cellulose phosphatée.

Les analyses XPS de la cellulose phosphatée confirment la présence de l'atome de phosphore, en plus de ceux de l'oxygène et du carbone (figure 77.b). Il y a une légère augmentation de la quantité d'oxygène (augmentation de 42.8 % à 45.6 %) au détriment de celle du carbone (diminution de 57.2 % à 50.8 %), ce qui est un résultat attendu après le greffage de fonctions phosphate $-PO(OH)_2$ (tableau 23.). Toutefois, il y a une pollution non négligeable de silicium qui gêne le greffage des groupements phosphate (1.5 % de phosphore au lieu de 6.7 % attendu). Cette pollution n'étant pas retrouvée à la surface de la cellulose nettoyée, elle provient certainement des produits de Et_3PO_4 (pur à 99.8 %) ou de H_3PO_4 (pur à 85 %) utilisés lors de l'étape de phosphatation (tableau 23.).

Ces résultats semblent néanmoins confirmer la phosphatation de la cellulose macroporeuse.

(C) Cellulose phosphatée immergée dans une solution de calcium.

En plus de l'oxygène, du phosphore et du carbone, l'atome de calcium apparaît clairement en surface du matériau après immersion dans une solution de calcium (figure 77.c).

D'un point de vue quantitatif, les résultats présentés dans le tableau 23., montrent un rapport P/Ca d'environ 0.7, ce qui est proche de la valeur attendue 1. Toutefois, les pourcentages en phosphore et en calcium restent inférieurs à ceux attendus (1.3 % et 1.9 % respectivement contre 6.2 % attendu) (tableau 23.). La pollution par le chlore peut provenir de la solution de calcium CaCl_2 utilisée pour pré-incuber le matériau avant la minéralisation.

(D) Cellulose phosphatée et minéralisée.

Le spectre général de l'échantillon présente les éléments attendus en oxygène, carbone, phosphore et calcium, ainsi que du sodium et du chlore (figure 77.d). D'un point de vue quantitatif, les compositions en carbone, oxygène et azote n'ont pratiquement pas évolué (tableau 23.). Par contre, la quantité de calcium a diminué de 1.3 % au profit d'une quantité non négligeable en sodium (4.2 %) et en chlore (1.5 %) (tableau 23.). La présence de ces éléments provient sûrement de la dilution SBF dont la composition comprend du chlorure de sodium.

D'après la MEB (voir *la troisième partie Résultats et Discussion : 2.2.1. Etude topographique par Microscopie Electronique à Balayage*), les phosphates de calcium sont répartis sur le matériau suivant certaines régions. Il est possible que l'analyse XPS ne soit pas réalisée dans une zone minéralisée, ce qui pourrait expliquer les quantifications obtenues.

(E) Cellulose minéralisée.

Les analyses XPS réalisées en surface du matériau non phosphaté, mais pré-incubé dans une solution de calcium, puis minéralisée, ont mis en évidence la présence des atomes de carbone, d'oxygène et de calcium, ainsi que celle du sodium et du chlore (figure 77.c). Elles n'ont pas détecté de phosphore. La composition obtenue est relativement semblable à celle du matériau phosphaté puis minéralisé (tableau 23.).

De la même manière que pour le matériau phosphaté puis minéralisé, il est possible que l'analyse XPS n'ait pas été réalisée dans une zone minéralisée (voir *la troisième partie Résultats et Discussion : 2.2.1. Etude topographique par Microscopie Electronique à Balayage*).

2.2.3. Etude de la biocompatibilité *in vitro* : cytotoxicité

Les résultats des tests au Rouge Neutre (viabilité cellulaire, figure 79.a) et au MTT (activité métabolique, figure 79.b) sont exprimés en pourcentage du témoin négatif qui représente 100 % de viabilité et d'activité métabolique cellulaires.

Les résultats des tests du Rouge Neutre et du MTT permettent de conclure à l'absence de cytotoxicité du matériau de cellulose macroporeuse vierge et phosphatée quelle que soit la dilution des extraits. En effet les extraits purs ou dilués des implants cellulose n'altèrent ni la viabilité, ni l'activité métabolique des cellules utilisées.

Quelle soit vierge ou phosphatée, la cellulose macroporeuse ne paraît donc pas relarguer de substance cytotoxique pour les ostéoblastes.

Discussion

Grâce à ses propriétés de fixation du calcium, la cellulose phosphatée utilisée sous forme de sel de calcium, pourrait être envisagée comme un biomatériau capable d'induire la formation d'apatite.

La minéralisation se fait principalement par fixation et complexation d'ions calcium avec des groupements chargés négativement en surface du matériau [Tanahashi and Matsuda, 105]. Il apparaît même indispensable de pré-incuber le matériau dans une solution de CaCl_2 avant de l'immerger dans du SBF car seuls les sels de calcium ont été capables d'induire la formation d'apatite [Granja, 92; Mucalo et al., 101]. La formation de sels de calcium de cellulose phosphatée va non seulement favoriser l'induction d'apatite, mais elle va en plus permettre de neutraliser l'acidité due aux fonctions phosphate.

Dans cette étude, la cellulose est phosphatée par la méthode mise au point par Granja sur la cellulose compacte avec les réactifs $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{Et}_3\text{PO}_4/\text{hexanol}$ [Granja et al., 94]. Les résultats prometteurs qu'il a obtenus, ont poussé à continuer dans cette voie de modification de surface par la phosphatation d'un matériau cellulosique de forme macroporeuse. La technique de phosphatation utilisée permet de conserver les principales caractéristiques de la cellulose, avec notamment une résistance à la stérilisation γ , une non cytotoxicité et surtout la

capacité de gonfler dans un environnement aqueux [Granja et al., 94]. Bien que le pourcentage de phosphore greffé sur la cellulose reste relativement faible avec 1.5 % du pourcentage atomique, il semble suffisant pour fixer les ions Ca^{2+} et induire la formation de phosphates de calcium. L'incorporation de calcium par la cellulose peut se faire par deux mécanismes différents : par absorption ou accrochage mécanique lorsque le matériau gonfle dans la solution de CaCl_2 , et par adsorption ou interaction ionique des ions Ca^{2+} avec les ions phosphate chargés négativement.

La phosphatation d'un matériau macroporeux pourrait favoriser dans un premier temps la minéralisation en profondeur de l'implant, puis par la suite la régénération du tissu selon une architecture proche de celle de l'os.

Les études de minéralisation réalisées en conditions physiologiques simulées, ont montré l'induction de la formation de phosphates de calcium sur la cellulose phosphatée et non phosphatée. Les photographies MEB ont permis de mettre en évidence la présence d'une couche relativement homogène de phosphates de calcium aussi bien en surface qu'au cœur de l'implant. Néanmoins après 14 jours d'incubation dans du SBF, cette couche n'est pas généralisée à l'ensemble des pores du matériau, elle n'est présente que par zones. Des temps d'incubations plus longs pourraient sans doute suffire à généraliser la minéralisation à l'ensemble de l'implant.

Une étude de minéralisation utilisant une dilution SBF radiomarquée avec des phosphores 33, pourrait permettre de déterminer au cours du temps les zones de formation des phosphates de calcium sur l'implant macroporeux et leur proportion par rapport à la surface du matériau. Par la suite, cette étude permettrait de suivre la dynamique de renouvellement des phosphates de calcium formés avec du SBF non radiomarquée.

Lors de ces expérimentations, aucune différence notable n'a pu être relevée entre le matériau ayant subi un traitement de phosphatation ou non. Les mêmes observations avaient déjà été faites par Granja sur la cellulose compacte, avec toutefois une interface davantage continue entre l'hydrogel phosphaté et la couche minérale [Granja et al., 86].

Afin de vérifier que la cellulose phosphatée apporte un avantage non négligeable par rapport à la cellulose non phosphatée, il serait intéressant de poursuivre cette étude par une implantation chez l'animal. En effet, il est possible que la propriété de fixation du calcium d'un matériau phosphaté, soit surtout marquée lors d'une expérimentation *in vivo* plutôt qu'*in vitro*.

2.3. Réticulation de la cellulose macroporeuse par les protéines

Le but recherché lors de la réticulation de la cellulose par une protéine, et plus particulièrement par le collagène, est d'allier sa bioactivité avec les caractéristiques hémostatiques, hydroexpansives et de dégradabilité apportées par la cellulose oxydée. Grâce à la capacité de reconnaissance cellulaire du collagène, un matériau de comblement osseux à base de cette protéine pourrait favoriser l'adhésion, la différenciation et la migration des cellules.

La réticulation de la cellulose macroporeuse par une protéine, a été réalisée *via* l'oxydation de la cellulose par l'acide periodique. La réticulation a ensuite été réalisée avec une protéine modèle, l'albumine bovine. Mais la réticulation par une autre protéine comme le collagène, sera plus à même de contribuer à apporter au matériau cellulosique des propriétés mimant celles des matrices extracellulaires.

La caractérisation physico-chimique a tout d'abord été réalisée sur la cellulose oxydée puis sur le matériau réticulé afin de vérifier la réalité du greffage. Enfin la cytocompatibilité indirecte de ces matériaux a été testée avec des ostéoblastes humains.

2.3.1. Etude morphologique par MEB

La MEB a permis de suivre la topographie des échantillons de cellulose après oxydation par l'acide periodique et après réticulation par l'albumine à plusieurs grossissements (voir la deuxième partie *Matériels et Méthodes* : 2.3.3. *Réticulation de la cellulose par les protéines*).

D'un point de vue macroscopique, l'implant prend un aspect plus compact après oxydation et son volume diminue de façon importante. Cette diminution a été quantifiée à 33 % par Laurence [Laurence, 54].

Après oxydation les matériaux ne présentent plus une structure alvéolaire caractéristique des implants non oxydés, mais semblent davantage déchirés (figures 80.a et 50.). Bien que l'architecture poreuse soit conservée, la structure apparaît déchiquetée avec des perforations au niveau des cloisons augmentant le taux d'interconnexions (figure 80.b et c).

L'albumine réticulant la cellulose a formé à la surface de la structure poreuse de l'implant comme des filaments et des petites alvéoles en forme de nid d'abeille (figure 81.a, b et c).

2.3.2. Oxydation de la cellulose

2.3.2.1. Dosage des aldéhydes

Tout d'abord l'efficacité de la méthode de dosage des aldéhydes par l'hydrazine a été vérifiée sur des matériaux de cellulose oxydée à des degrés contrôlés. Le nombre de moles d'acide periodique nécessaire pour oxyder la cellulose à 25 %, 50 %, 75 % et 100 % a été calculé à partir de la masse de l'échantillon de cellulose (voir *la deuxième partie Matériels et Méthodes : 2.5.2. Dosage des aldéhydes*). En effet d'après la littérature [Syamala Devi et al., 122; Dan Dimitrijevic et al., 123], l'action de l'acide periodique est régiosélective et s'exprime sur les fonctions alcool des carbones C-2 et C-3 de la cellulose : 1 mole de HIO_4 oxyde 1 une unité glucose pour former deux fonctions aldéhyde (figure 8.).

L'histogramme de la figure 82. présente l'oxydation des échantillons déterminée par le dosage des groupes aldéhyde, en fonction de l'oxydation contrôlée des matériaux (par la détermination du nombre de moles de HIO_4 nécessaire pour oxyder la cellulose à 25 %, 50 %, 75 % et 100 %). Malgré les légères différences observées entre ces deux procédés (le dosage des aldéhydes et le calcul de x moles de HIO_4 nécessaire pour oxyder x moles d'unité glucose), le dosage des aldéhydes par l'hydrazine semble être une méthode efficace pour déterminer le degré d'oxydation des matériaux.

Ensuite des matériaux de cellulose ont été oxydés par l'acide periodique à des concentrations différentes (à 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.25 M et 0.5 M). Un lot de matériaux oxydés une première fois à une concentration de 0.5 M, a été immergé une deuxième fois dans une solution d'acide de concentration 0.5 M (2 x 0.5 M).

Suivant la concentration en HIO_4 utilisée, les matériaux présentent bien des degrés d'oxydation différents (figure 83.). La cellulose non oxydée et le Surgicel[®] ont servi de témoins. La cellulose non oxydée ne présente pas de fonction aldéhyde et donc pas de degré d'oxydation. Et le Surgicel[®], cellulose oxydée entre 16 et 24 % d'après le Pharmacopeia of

the United States, indique un degré d'oxydation situé à $22 \pm 7 \%$, ce qui est en accord avec la littérature (figure 83.).

Pour une concentration de 0.5 M d'acide periodique, la cellulose est oxydée à 100 %. Le lot (2 x 0.5 M) a permis de s'assurer de l'oxydation de tous les carbones C-2 et C-3 de la cellulose en fonction aldéhyde. Bien que le matériau soit entièrement oxydé, son degré d'oxydation est inférieur à 100 %, mais aussi au degré d'oxydation trouvé pour les matériaux traités une seule fois à 0.5 M. Ce résultat peut s'expliquer par une manipulation plus importante du matériau traité deux fois à 0.5 M qui est devenu plus friable en périphérie. Lors du rinçage de la cellulose-hydrazone pour enlever l'excès d'hydrazine, des petits morceaux de cellulose oxydée ont pu se détacher de l'échantillon et ne pas être comptabilisés lors du dosage.

On peut donc supposer qu'après un traitement à l'acide periodique 0.5 M pendant 1h30, les échantillons de cellulose sont entièrement oxydés. Cette concentration a été choisie ultérieurement pour proposer de la cellulose oxydée à 100 % en vue d'une réticulation ultérieure.

2.3.2.2. Réactif de Schiff

L'immersion dans du Réactif de Schiff des matériaux de Surgicel[®], de cellulose non oxydée et de cellulose oxydée, a permis de confirmer la présence ou non de fonctions aldéhyde, mais surtout de mettre en évidence la répartition de ces fonctions dans l'échantillon.

Comme attendu, la cellulose non oxydée ne présente pas de coloration car elle ne contient pas de fonctions aldéhyde (figure 84.b). Par contre le Surgicel[®], cellulose oxydée entre 16 et 24 % (Pharmacopeia of the United States), se colore en rose clair (figure 84.c). Et la cellulose oxydée à 100 % prend une couleur mauve, beaucoup plus foncée que celle du Surgicel[®] (figure 84.a). La coloration se fait de façon uniforme sur toute la surface de l'échantillon, mais aussi en son cœur (figure 84.).

2.3.3. Réticulation de la cellulose avec de l'albumine

2.3.3.1. Marquage de l'albumine à l'Iode 125

La séparation de l'albumine radiomarquée, de l'iode libre est faite par filtration sur gel. Etant donné que les masses molaires respectives de l'albumine marquée et de l'iode libre sont de 66 000 g/mol et de 125 g/mol, le produit élué en premier est la protéine marquée. L'activité du pool d'albumine marquée à l'Iode 125 permet d'estimer l'activité volumique à 25 µCi/ml.

Une éventuelle dénaturation des protéines ou altération de l'activité biologique de la molécule native peut provenir d'une quantité trop importante d'Iode 125 incorporée par molécule, d'une température de stockage trop élevée, de dommages par auto-radiolyse. Des dommages dus à l'oxydation, lors de l'utilisation d'un excès d'agent oxydant peuvent affecter l'intégrité physico-chimique des protéines et entraîner une perte de l'activité biologique et de l'identité immunologique.

L'intégrité des protéines après marquage à l'Iode 125 a été contrôlée lors d'un travail effectué par Porté *et al.* [Porte-Durrieu et al., 175] par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les résultats relatifs à cette électrophorèse ainsi que les autoradiographies des gels obtenus, montrent qu'il n'y a pas de scission de chaîne lors du marquage radioactif de l'albumine.

Afin de mettre en évidence une éventuelle différence de comportement d'adsorption entre la protéine marquée et la protéine native, une série d'expériences a été menée par Porté *et al.* sur des surfaces de PVDF [Porte-Durrieu et al., 175]. Les résultats ne révèlent aucune adsorption préférentielle significative pour l'une ou l'autre des formes d'albumine utilisée. En effet, pour tous les rapports testés [protéines marquées] / [protéines natives], la quantité de protéines adsorbées sur le PVDF reste constante.

2.3.3.2. Cinétique de rinçage

Afin d'éliminer toutes les protéines ne s'étant pas adsorbées ou greffées à la surface de la cellulose oxydée, les échantillons sont rincés à l'eau déionisée. Pour vérifier l'efficacité du rinçage, la radioactivité des eaux de lavage est analysée.

La figure 85. montre la décroissance de la radioactivité volumique contenue dans les eaux provenant du rinçage des matériaux recouverts d'albumine marquée à l'iode 125. Une chute rapide de la radioactivité est observée durant les deux premières heures. Cette désorption correspond sûrement à la libération de l'albumine absorbée dans l'implant et de celle adsorbée à la surface des matériaux. Puis la radioactivité volumique des eaux de rinçage tend rapidement vers zéro. Un temps de rinçage de 48 heures est nécessaire pour que cette radioactivité soit de l'ordre du bruit de fond.

Si l'on additionne la radioactivité volumique des eaux à la fin du rinçage des matériaux, il est intéressant de noter que la valeur trouvée est 2.2 fois plus importante pour la cellulose non oxydée que pour celle de la cellulose oxydée. Ceci conforterait l'hypothèse que l'albumine présente après rinçage sur le matériau non oxydé, ne peut être retenue que par adsorption, et que celle présente sur le matériau oxydé doit être aussi liée de façon covalente.

2.3.3.3. Fixation de l'albumine

La fixation de l'albumine radiomarquée à l'Iode 125 sur la cellulose oxydée et non oxydée est mesurée avant et après 48 heures de rinçage dans de l'eau déionisée (tableau 24.) (figure 86.).

Les quantités d'albumine retenue sur la cellulose non oxydée et oxydée sont respectivement de 139 et 154 mg/g de cellulose après la réticulation éventuelle : il y a 1.1 fois plus d'albumine sur le matériau oxydé que sur le matériau non oxydé (tableau 24.).

Après rinçage, les quantités d'albumine retenue sont de 13 et 93 mg/g de cellulose sur la cellulose non oxydée et oxydée respectivement : la quantité de protéine est nettement plus importante (7 fois plus grande) sur le matériau oxydé que sur le non oxydé (tableau 24.).

Les quantités d'albumines retrouvées dans les eaux de rinçage sont de 126 et 61 mg/g de cellulose après le rinçage du matériau non oxydé et oxydé respectivement : il y a 2.1 fois plus d'albumine qui s'est désorbée de la cellulose non oxydée que de l'oxydée (tableau 24.).

En émettant l'hypothèse que le rinçage entraînait la désorption de l'albumine absorbée et de la plupart des molécules adsorbées, il ne devrait rester sur la cellulose non oxydée qu'une couche d'albumine adsorbée et sur la cellulose oxydée une couche d'albumine adsorbée, ainsi qu'une couche d'albumine greffée.

La différence de quantités d'albumines désorbées entre la cellulose non oxydée et oxydée (126 et 61 mg/g de cellulose respectivement) s'explique tout d'abord par une diminution de volume du matériau après oxydation. En effet, lors d'une étude menée par Laurence [Laurence, 54], la diminution du volume de l'implant oxydé a été évaluée à 33 % par rapport à l'implant non oxydé. La quantité d'albumine absorbée par l'échantillon oxydé est donc moins importante que celle absorbée par l'échantillon non oxydé.

Une deuxième explication serait que, la désorption de l'albumine adsorbée soit moins importante pour la cellulose oxydée que pour la non oxydée. La modification après oxydation, des propriétés de surface de la cellulose, pourrait alors expliquer cette différence. En effet, les propriétés de surface à l'échelle moléculaire influencent grandement les interactions protéiques. Elles incluent les propriétés chimiques, physico-chimiques (propriétés électrostatiques, énergie de surface...), physiques (porosité, rugosité), ainsi que la distribution régulière et irrégulière par domaines de chacune des combinaisons de ces facteurs. L'interaction entre la molécule adsorbée et le matériau oxydé serait alors plus forte que celle formée avec le matériau non oxydé.

2.3.3.4. Echange de l'albumine

Une surface artificielle mise au contact d'une solution de protéines se recouvre d'un film adsorbé dont la composition n'est pas statique, mais évolue perpétuellement [Castner and Ratner, 59]. Brash a étudié en 1978 ce phénomène [Brash and Samak, 113], et il a démontré qu'il existait un processus de remplacement des protéines adsorbées par d'autres protéines, de différentes ou de même natures, se trouvant dans le milieu circulant. Ce fait ne correspond pas à un phénomène de désorption des protéines, mais plutôt à un phénomène d'échange entre les protéines adsorbées et celles en solution. Le marquage radioactif de l'albumine a permis de suivre ces échanges protéiques.

Les quantités d'albumines qui se sont échangées sont de 23 % pour le matériau non oxydé et de 5 % pour le matériau oxydé (figure 87. et tableau 24.). Après échange, les quantités d'albumine retenue sont de 10 et 88 mg/g de cellulose sur la cellulose non oxydée et oxydée respectivement : la quantité de protéines est toujours nettement plus importante (8.8 fois plus grande) sur le matériau oxydé que sur le non oxydé (tableau 24.).

D'après Brash [Brash and Samak, 113], les protéines adsorbées sur une surface hydrophile ont un haut pouvoir d'échange avec les protéines du milieu environnant. Or un faible taux d'échange a été constaté pour la cellulose oxydée et dans une moindre mesure pour la non oxydée. Ces pourcentages sembleraient donc indiquer une interaction très forte entre l'albumine et la surface des matériaux.

L'albumine présente sur la cellulose oxydée est sûrement greffée de façon majoritaire et elle ne peut donc pas s'échanger avec d'autres molécules. Toutefois il n'est pas possible d'en déduire la quantité d'albumine greffée, car une partie de l'albumine adsorbée à la surface du matériau n'est sans doute pas échangeable.

Après rinçage de la cellulose non oxydée, les molécules les moins liées se sont déjà désorbées de la surface des échantillons. Alors la faible quantité d'albumine adsorbée présente après le rinçage (13 mg/g de cellulose), interagit fortement avec la surface du matériau et s'échange difficilement (tableau 24.).

Que se soit pour le matériau non oxydé ou pour le matériau oxydé, un palier est atteint aux environs de trois cent heures d'incubation dans la solution d'albumine froide. Au delà de neuf cent heures, la cellulose oxydée se dégrade très fortement. Le palier n'est pas significatif d'un arrêt des échanges de protéines, mais simplement de l'incapacité de pouvoir dès lors les percevoir avec la radioactivité. En effet, les protéines marquées et non marquées adsorbées en surface s'échangent avec celles présentes en solution. Au bout d'un certain temps, toutes les protéines marquées de la surface du matériau qui peuvent s'échanger, ont été remplacées.

2.3.4. Analyse chimique par spectroscopie de photoélectrons

Des analyses XPS ont été réalisées sur des échantillons de cellulose macroporeuse après oxydation avec l'acide periodique HIO_4 et après réticulation avec l'albumine (après un rinçage de 48 heures). Comme précédemment les valeurs ont été déterminées et calculées à partir de l'aire totale respective des pics C1s, O1s et N1s (tableau 25.).

(A) Cellulose nettoyée.

En surface de la cellulose vierge, les analyses XPS mettent en évidence les atomes de carbone et de l'oxygène avec des quantités attendues de 57.2 % de carbone (54.5 % en théorie) et de 42.8 % d'oxygène (45.5 % en théorie) (tableau 25. et figure 88.A).

La description du spectre C1s (figure 89.A) est la même que celle réalisée pour la cellulose vierge macroporeuse avant le greffage de peptides contenant la séquence RGD (voir *la troisième partie Résultats et Discussion : 2.1.2.1. Caractérisation des matériaux poreux : Analyse chimique par spectroscopie de photoélectrons*).

(B) Cellulose oxydée par HIO_4 .

Le spectre général de l'échantillon présente les éléments attendus, oxygène et carbone, avec des quantités de carbone (54 %) et d'oxygène (46 %) très proches des valeurs théoriques attendues (respectivement 54.5 % et 45.5 %) (tableau 25). (figures 88.B et 25.a).

Lors de la déconvolution du spectre C1s, la composante majoritaire après oxydation est toujours la liaison C-O centrée à 286.3 eV. La diminution des composantes C-C (diminution de 16.3 % à 10.6 %) et C-C-O (diminution de 14.5 % à 10.1 %), pourrait s'expliquer par la rupture des liaisons C-C et C-C-O en C-2 et C-3 par ouverture du cycle glycosidique. La double liaison de la fonction aldéhyde est moins électronégative qu'une fonction $-\text{COOR}$ et légèrement plus qu'une fonction O-C-O. Etant donné le nombre important de composantes présentes lors de cette déconvolution de spectre C1s, il a été difficile de "voir" toutes les composantes du carbone ayant comme voisins 2 oxygènes sous forme de double liaison. La

liaison O-C-O est donc celle qui englobe la contribution de la fonction aldéhyde. La forte augmentation de cette composante située à 287.4 eV (augmentation de 18.8 % à 28.6 %), témoigne de la formation de fonctions aldéhyde $-CH=O$ après oxydation de la cellulose (tableau 26.) (figures 89.B et 25.a) [Syamala Devi et al., 122; Dan Dimitrijevic et al., 123].

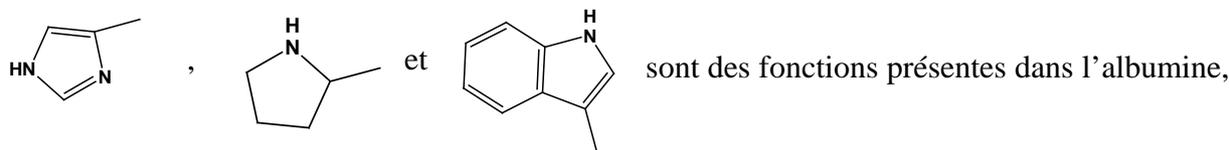
Ces résultats semblent donc confirmer l'oxydation de la cellulose par l'acide periodique.

(C) Cellulose réticulée avec de l'albumine.

Les analyses XPS de la cellulose réticulée confirment la présence des atomes d'azote et de soufre, en plus de ceux de l'oxygène et du carbone (figure 88.C). Il y a une augmentation de la quantité de carbone (augmentation de 54 % à 62.2 %) au détriment de celle de l'oxygène (diminution de 46 % à 21.7 %), ce qui s'explique par la présence des groupements $-(CH_2)_x-$ contenus dans la molécule d'albumine (tableau 25.). Les quantités en azote et en soufre, respectivement 13.9 % et 2.3 %, sont proches des valeurs attendues dans une molécule d'albumine avec respectivement des quantités de 15.9 % et 2 % (tableau 10.).

Le spectre C1s possède une allure totalement différente de celle du spectre correspondant à la cellulose oxydée. La composante centrée à 284.4 eV traduisant les liaisons de type C-C, est maintenant majoritaire. Les liaisons C-C-O situées à 285.3 eV, C-O situées à 286.5 eV et O-C-O situées à 287.2 eV, sont en proportions plus faibles et la liaison O-C-O située à 287.4 eV n'est plus détectable. Il semblerait y avoir un recouvrement de la cellulose oxydée par l'albumine (groupements $-(CH_2)_x-$ attendus) (figure 89.C).

Il est à noter également l'apparition de deux composantes impliquant l'atome d'azote située à 285.8 eV (liaisons C-N) et à 287.5 eV (liaisons N-C=O) (respectivement 22 % et 17.4 % du signal C1s entier) (tableau 26.). En effet, non seulement les groupements $-NH_2$,



mais en plus le groupement $-NH-C(=O)-$ est caractéristique de la liaison peptidique (tableau 10.).

Selon la même interprétation exposée précédemment, il est difficile de "voir" la composante du carbone ayant comme "voisins" 2 atomes d'azote. La liaison imine $-N=CH-$ (liaison formée entre la fonction aldéhyde de la cellulose et la fonction amine de la protéine)

est polarisée moins électronégativement que C-O, mais légèrement plus que C-N. Cette composante est celle qui témoigne de la contribution de la fonction $-N=CH-$. Vu la forte proportion de la composante C-N (22 % du signal C1s entier), il semblerait que la liaison imine soit détectée à la surface du matériau analysé (figure 89.C).

La présence des différentes fonctions contenues dans la molécule d'albumine, et des liaisons imine, semblent donc confirmer l'immobilisation de la protéine à la surface de la cellulose macroporeuse.

2.3.5. Etudes du comportement *in vitro* de la cellulose réticulée avec de l'albumine

2.3.5.1. Etude de la dégradation du matériau

Le comportement des implants chargés d'albumine ont été testés *in vitro* dans une solution physiologique de pH = 7.4 et à 37 °C, simulant le pH du sang (entre 7.35 et 7.45). Les tests effectués en conditions statiques ont permis d'évaluer la dégradation des matériaux en conditions proches de celles observées au niveau du site d'utilisation (fixe).

Aux environs des 8 heures d'incubation, des petits fragments de cellulose de l'implant dégradé, sont retrouvés dans le liquide physiologique (éléments difficilement perceptibles à l'œil nu pendant les premières heures d'incubation).

Au delà de 24 heures, les fragments de cellulose provenant de la dégradation de l'implant sont plus importants (visibles à l'œil nu).

Au bout de 72 heures d'incubation, le matériau oxydé greffé d'albumine est pratiquement entièrement dégradé.

Quant au matériau non oxydé recouvert d'albumine, aucune dégradation n'a été observée après plusieurs jours d'incubation dans le liquide physiologique.

Lors du rinçage à l'eau déionisée, la dégradation de l'échantillon oxydé n'avait pas été observée après 13 jours d'incubation. L'eau déionisée étant légèrement plus acide que le

liquide physiologique (pH = 7.4), la dégradation du matériau est plus lente dans celle-ci [Laurence, 54].

2.3.5.2. Cytotoxicité

Les résultats des tests au Rouge Neutre (viabilité cellulaire) et au MTT (activité métabolique) sont exprimés en pourcentage du témoin négatif qui représente 100 % de viabilité et d'activité métabolique cellulaires.

Les résultats des tests au Rouge Neutre et au MTT permettent de conclure à l'absence de cytotoxicité du matériau de cellulose macroporeuse quelle que soit la dilution des extraits. En effet les histogrammes de la figure 90. montrent que les extraits purs ou dilués des implants cellulose se trouvent au-dessus des 75 % d'absorbance, seuil en dessous duquel la viabilité et l'activité métabolique cellulaire traduisent une action cytotoxique des extraits des matériaux.

Bien que la cellulose oxydée soit à la limite de la cytotoxicité pour des dilutions de 10 % et 1 %, elle devient très cytotoxique pour des extraits purs et dilués à 50 %. Cette toxicité est sûrement liée à la présence des fonctions aldéhyde de la cellulose oxydée. Toutefois, ces résultats sont comparables à ceux du Surgicel[®], qui est un matériau de cellulose oxydée utilisé comme pansement absorbable. Malgré la cytotoxicité de ses extraits, cette gaze hémostatique favorise la coagulation du sang grâce à son pH acide (vraisemblablement responsable de la toxicité révélée par les tests du Rouge Neutre et du MTT).

Après réticulation avec de l'albumine, la cytotoxicité des implants est diminuée, mais les extraits purs et dilués à 50 % restent cytotoxiques. Il est intéressant de noter que l'implant de cellulose réticulée avec de l'albumine puis rincé à l'eau déionisée, génère des extraits plus cytotoxiques que sans rinçage. On peut supposer que pour les implants non rincés, l'albumine absorbée est d'abord libérée dans le véhicule d'extraction où elle va sans doute capter les substances toxiques libérables à partir de la cellulose oxydée (figure 90.). Le relargage de protéines pourrait être utilisé par la suite afin de protéger les cellules des tissus environnants de la libération de substances cytotoxiques.

Discussion

Un matériau de comblement osseux associé à des protéines humaines, pourrait mimer une matrice extracellulaire en exposant des séquences peptidiques reconnaissables par les récepteurs membranaires impliqués dans l'adhésion cellulaire [Pierschbacher and Ruoslahti, 60; Pierschbacher and Ruoslahti, 61]. L'attachement des cellules osseuses ainsi favorisé, permettrait d'assurer dans un premier temps la biointégration de l'implant, puis par la suite la régénération des tissus.

Dans cette idée d'associer un biomatériau avec une composante biologique, un implant de cellulose macroporeuse pourrait être réticulé avec du collagène de type I. Le but recherché serait d'associer les propriétés hémostatique et d'hydroexpansivité de la cellulose [Bruneteau et al., 53; Fricain et al., 112], avec le rôle chimio-tactique du collagène vis-à-vis des cellules [Cullen et al., 119; Grinnell, 131].

La réticulation d'une protéine sur la cellulose a été réalisée *via* l'oxydation de la cellulose par l'acide periodique [Syamala Devi et al., 122; Dan Dimitrijevic et al., 123]. En effet, la création de fonctions aldéhyde par HIO_4 va permettre la formation de liaisons covalentes entre le matériau oxydé et la protéine [Liu and Spiro, 116]. D'autre part, l'oxydation de la cellulose pourrait apporter un deuxième avantage. Elle permet l'obtention de composés instables à pH physiologique, qui par réarrangement forment des molécules métabolisables par l'organisme [Singh et al., 124]. Cette instabilité pourrait être exploitée afin de réaliser un matériau de comblement osseux capable de se dégrader une fois implanté.

La méthodologie utilisée durant cette étude a permis de s'assurer de l'immobilisation de la protéine à la surface du matériau oxydé. La réticulation de la cellulose par une protéine humaine va permettre, de favoriser les caractéristiques de ce matériau composite sur le long terme, et d'assurer l'interface surface/cellule, par rapport à une simple adsorption protéique. Le but du greffage covalent de la protéine à la surface du matériau oxydé, va être d'éviter des phénomènes de désorption et d'échange protéique, mais aussi de mieux contrôler l'architecture microstructurale et moléculaire de cette surface [Castner and Ratner, 59; Massia and Hubbell, 70; Irvine et al., 71].

Vroman a remarqué en 1962 [Vroman, 176] que l'adsorption de protéines sur une surface hydrophile diminue son caractère hydrophile, alors qu'une même adsorption sur une

surface hydrophobe augmente son caractère hydrophile. Dans le premier cas, la protéine oriente ses groupements hydrophiles vers la surface et ses groupements hydrophobes vers la solution et inversement dans le second cas.

Selon la nature des interactions, hydrophiles ou hydrophobes, la protéine prend une conformation qu'elle adapte à la surface du matériau en orientant ces groupements de façon à optimiser les contacts, c'est-à-dire à minimiser l'énergie libre entre les deux systèmes. Généralement, les zones hydrophiles des protéines sont extériorisées, mais elles peuvent être intériorisées au sein du volume macromoléculaire pour que les zones hydrophobes interagissent avec les surfaces hydrophobes. L'extériorisation de ces zones, irréversible la plupart du temps, entraîne un changement de conformation protéique. Le changement conformationnel de la protéine (qui découvre des séquences reconnaissables ou non par les protéines circulantes) entraîne une perte des propriétés qu'elle avait dans sa forme native : elle est dite dénaturée.

Brash a mis en évidence l'existence d'un échange d'une partie des protéines adsorbées avec les protéines en solution, la quantité totale de protéines adsorbées restant constante [Brash and Samak, 113]. Les échanges protéiques ont au moins deux conséquences importantes : (i) la couche adsorbée peut changer de composition avec le temps ; (ii) les protéines relarguées de la surface peuvent être altérées et entraîner une réponse biologique.

Une prochaine étude pourra être de déterminer si les molécules greffées et les molécules adsorbées qui se sont échangées, sont conformationnellement altérées, et si elles sont capables d'induire des réactions biologiques.

La réticulation de cellulose oxydée par le collagène de type I pourrait être un moyen de rendre l'implant à la fois bioactif et biodégradable. La combinaison de la biorésorption avec la capacité d'induire la formation osseuse, ouvre de nouvelles perspectives pour l'obtention d'un matériau de comblement osseux, qui une fois implanté dans les tissus osseux, pourrait de façon parallèle, promouvoir la régénération osseuse, et être éliminé à l'aide d'une cinétique contrôlable.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Conclusions générales et perspectives.

Le succès d'un remplacement osseux par un matériau de comblement, réside dans ses propriétés de biointégration et dans son aptitude à promouvoir la régénération osseuse.

Les nombreux progrès survenus ces dernières années dans le domaine des biomatériaux, ont contribué à une orientation des recherches vers la conception de matériaux implantables biologiquement actifs. Ces matériaux peuvent être rendus biologiquement actifs grâce à différents procédés comme par exemple l'incorporation de facteurs d'adhésion cellulaire, comme les oligopeptides, ou de facteurs de différenciation osseuse, comme les BMP.

Au début de ce travail, l'objectif fixé était la mise au point d'un matériau de comblement osseux macroporeux à base de cellulose, qui pourrait assurer de façon transitoire la fonction du tissu qu'il remplace en induisant la régénération de celui-ci.

Le choix de la cellulose reposait sur un certain nombre d'arguments : en plus de ses propriétés hémostatiques et de biocompatibilité, et sa capacité d'ostéoconduction, la cellulose possède une caractéristique particulière, l'hydroexpansivité. En présence d'un environnement aqueux, cette propriété permet une expansion volumique du matériau dans le défaut, permettant un comblement adapté à la cavité, mais aussi une fixation rétentive aux tissus osseux. Ainsi lors de la mise en place de l'implant dans la lacune osseuse, celui-ci se gorge de sang, augmente de volume et comprime les parois du défaut osseux en le comblant parfaitement.

Afin d'assurer la nutrition des cellules osseuses à l'intérieur de l'implant, et de fournir dans le même temps un échafaudage approprié pour la régénération du tissu osseux, la cellulose a été envisagée sous une forme macroporeuse.

Les différentes techniques de caractérisation utilisées ont permis de décrire la structure poreuse du matériau dans son ensemble : la morphologie du matériau, la forme des pores, la porosité, la distribution de la taille des pores, l'interconnexion, la capacité de colonisation de l'implant par les ostéoblastes... Idéalement, les matériaux de comblement osseux doivent servir de "charpente" à la croissance cellulaire et à la formation de la matrice extracellulaire en trois dimensions. L'implant cellulosique de porosité (1+2) (selon la définition utilisée au cours de ce travail) pourrait être un matériau de choix pour la régénération du tissu osseux

avec : un volume poreux important de 95 %, la présence de pores larges de 269 à 493 μm de diamètre, une majorité de pores de petite taille de 44 à 111 μm de diamètre, et une interconnexion des pores allant de 38 à 350 μm de dimension. Ce matériau pourrait à la fois assurer la diffusion des nutriments, favoriser la vascularisation, et faciliter la migration, l'attachement et la prolifération des ostéoblastes à l'intérieur de l'implant. Ces perspectives restent à être documentées par une expérimentation chez l'animal.

Une autre stratégie envisagée pour élaborer des substituts osseux, exploite les concepts de l'ingénierie tissulaire qui préconisent l'association d'un biomatériau avec des cellules ostéogènes provenant du patient. Ces cellules sontensemencées extemporanément ou après amplification par culture sur un support matriciel 3D avant d'être implantées chez le receveur. Grâce à cette pré-cellularisation, les cellules associées au matériau initieraient l'élaboration d'une ébauche de tissu qui pourrait alors poursuivre sa croissance *in vivo*. Ainsi, l'adhérence entre l'os en cours de synthèse et le matériau serait renforcée, et l'implant intégré au lieu d'être seulement toléré.

Afin d'accroître l'affinité des cellules pour le matériau, des méthodologies de greffage de peptides d'adhésion en surface de l'implant d'une part, et de réticulation du matériau avec une protéine comme le collagène de type I d'autre part, ont été développées. En effet, un matériau de comblement osseux associé à des peptides ou à des protéines humaines, pourrait mimer une matrice extracellulaire en exposant des séquences peptidiques reconnaissables par les récepteurs membranaires impliqués dans l'adhésion cellulaire. Cette approche permettrait alors de favoriser l'attachement des cellules osseuses lors de la cellularisation de l'implant, de déterminer leur forme, et de maintenir leur fonction et l'intégrité du tissu.

L'une des originalités de ce travail réside dans le mode d'immobilisation employée. Une chimie de fixation des molécules favorisant une stabilité à long terme est incontestablement la voie à suivre pour la réalisation d'implants biomédicaux. Le greffage de peptides RGD ou la réticulation par des protéines, possède alors de nombreux avantages par rapport à une simple adsorption de molécules sur le matériau. Comme cela l'a été démontré, les avantages d'une fixation forte molécules/matériaux sont notamment un taux de désorption et d'échange pratiquement nul, et un meilleur contrôle de l'homogénéité et de la reproductibilité de l'état de surface.

Dans le cas du greffage de peptides pro-adhésifs, l'imagerie β a permis de mettre en évidence non seulement un greffage relativement homogène des peptides en surface de cellulose, mais aussi la stabilité de ce greffage après plusieurs jours passés dans un environnement aqueux sous agitation. Avec une densité de molécules de cystéine immobilisées en surface des matériaux évaluée à 2 pmol/mm^2 , la distribution du peptide RGD obtenue dans nos conditions expérimentales devrait être suffisante pour promouvoir l'étalement cellulaire et la formation de contacts focaux. Une étude d'attachement cellulaire a notamment permis de vérifier les propriétés biomimétiques du matériau greffé par des peptides RGD, par rapport aux observations faites avec un matériau non modifié. En effet, il a été observé une augmentation significative du pourcentage d'adhésion des ostéoblastes humains après 24 heures d'ensemencement dans du milieu de culture sans sérum.

Parallèlement à la fixation de peptides d'adhésion, la réticulation du matériau cellulosique par l'albumine a été réalisée *via* la formation de liaisons covalentes imine entre la cellulose oxydée par l'acide periodique et les sites d'amine libre présents sur la protéine. Des analyses de spectroscopie de photoelectrons X et le recours à l'albumine radiomarquée à l'iode 125 ont permis de s'assurer de l'immobilisation de la protéine à la surface du matériau oxydé. En outre, la stabilité de la liaison protéine/biomatériau a été évaluée après plusieurs rinçages à l'eau déionisée et après une étude d'échange protéinique.

Bien que les extraits purs et dilués à 50 % des matériaux totalement oxydés, s'avèrent cytotoxiques vis-à-vis des ostéoblastes humains, la toxicité observable est diminuée après réticulation de ces matériaux. Des matériaux à la fois oxydés à un degré moindre, et aussi réticulés avec une protéine plus spécifique, pourraient présenter un grand intérêt s'ils ne démontraient pas de cytotoxicité. Une prochaine étude basée sur l'emploi de cellulose oxydée réticulée par du collagène de type I, permettra de déterminer si les molécules greffées et les molécules adsorbées qui sont potentiellement échangeables, n'ont pas été conformationnellement altérées, et si elles sont capables d'induire les réactions cellulaires attendues.

D'autre part, l'instabilité de la cellulose oxydée en conditions physiologiques, pourrait être exploitée afin de réaliser un matériau de comblement osseux capable de se dégrader une fois implanté. Ainsi la combinaison de la biorésorption de la cellulose oxydée, avec la capacité d'un matériau réticulé avec du collagène de type I d'induire la formation osseuse en

site osseux, ouvre de nouvelles perspectives : l'obtention d'un matériau de comblement osseux, qui une fois implanté dans l'os, pourrait de façon parallèle, promouvoir la régénération osseuse, et être éliminé avec une cinétique contrôlable.

Notre intérêt s'est également porté sur la cellulose phosphatée. Grâce à ses propriétés de fixation du calcium, celle-ci peut être utilisée sous forme de sel calcique, comme biomatériau capable d'induire la formation d'apatite. La phosphatation d'un matériau cellulosique macroporeux pourrait favoriser dans un premier temps la minéralisation en profondeur de l'implant, puis par la suite la régénération du tissu selon une architecture proche de celle de l'os. Ces hypothèses pourraient être vérifiées par une expérimentation animale appropriée.

Après phosphatation de la cellulose, le pourcentage atomique de phosphore greffé reste relativement faible autour de 1.5 %. Cependant il semble suffisant pour fixer les ions calcium et induire la formation de phosphates de calcium. Les photographies MEB ont permis de mettre en évidence la présence d'une couche relativement homogène de phosphates de calcium aussi bien en surface qu'au cœur de l'implant. Néanmoins après 14 jours d'incubation dans du SBF, cette couche n'est pas généralisée à l'ensemble des pores du matériau, elle n'est présente que par zones. L'hétérogénéité de ce dépôt pourrait provenir d'une inhomogénéité de la phosphatation de l'implant. Des études utilisant du phosphore 33 pourraient alors être envisagées.

A l'issue de ce travail, il apparaît que la cellulose utilisée sous une forme macroporeuse associant à la fois des propriétés d'adhésion cellulaire, et des propriétés de résorption, pourrait représenter une solution intéressante au comblement des défauts osseux dans les stratégies développées en ingénierie tissulaire.

Liste des figures

Figure 1 : Organisation structurale des os d'après Cabrol [Cabrol, 2].

Figure 2 : Schéma de l'os cortical et spongieux. Système de Havers d'après Grabowski [Grabowski, 1].

- a) Agrandissement de plusieurs ostéons (système de Havers) de l'os compact ;
- b) Agrandissement de travées d'os spongieux. Par souci de clarté, un seul ostéon est représenté par travée sur la figure b), qui en comporte normalement plusieurs accolés.
- c) Détails d'une coupe de travée osseuse.

Figure 3 : Les différentes cellules du tissu osseux.

Ce dessin représentant une travée montre les quatre types de cellules osseuses. On peut voir un ostéoblaste, un ostéocyte qui est situé dans sa lacune, un ostéoclaste et une cellule bordante.

Figure 4 : Les cellules de l'os trabéculaire d'après Gibson [Gibson and Ashby, 4; Gibson et al., 177] : la cellule ostéogène qui se différencie en ostéoblaste qui se différencie lui même en ostéocyte.

Figure 5 : Le remodelage osseux se déroule de façon cyclique en quatre phases (d'après Cowin [Cowin, 5]) :

- a) Une phase d'activation : le long de la surface osseuse inactive recouverte de cellules bordantes, ou d'ostéoblastes, surviennent les précurseurs mononucléés des ostéoclastes.
- b) Une phase de résorption : l'os ancien est résorbé par les ostéoclastes.
- c) Une phase d'inversion : les ostéoclastes sont remplacés par des cellules mononucléées.
- d) Une phase de reconstruction (ostéoformation) : les ostéoblastes colonisent la lacune et la combrent en apposant une nouvelle matrice osseuse. Durant cette dernière phase, certains ostéoblastes restent enfermés dans la matrice nouvellement formée et deviennent alors des ostéocytes.

Figure 6 : Illustration de la réaction de l'organisme lors de l'implantation d'un corps étrangers.

- 1) Le chirurgien implante un biomatériau dans un site chirurgical.
- 2) Rapidement, l'implant adsorbe une couche de protéines, processus normal pour une surface de solide immergée dans des fluides biologiques.
- 3) Des cellules, neutrophiles et macrophages, interrogent et "attaquent l'envahisseur", c'est-à-dire le biomatériau.
- 4) Quand les macrophages ne peuvent pas digérer le corps étranger, ils fusionnent en cellules géantes pour ingérer l'objet. Cependant, si celui-ci est trop grand pour une complète ingestion, les cellules géantes envoient alors des messagers chimiques, les cytokines, pour appeler d'autres cellules.
- 5) Les fibroblastes arrivent et commencent à synthétiser du collagène.
- 6) L'implant est complètement enveloppé dans une enveloppe de collagène acellulaire et non vasculaire. Entre l'enveloppe de collagène et l'implant se trouvent des macrophages. D'après Castner [Castner and Ratner, 59].

Figure 7 : Biomateriaux d'hydroxyapatite.

Figure 8 : Schématisation de la formule générale de la cellulose.

Figure 9 : Mise en place d'un bouchon diaphysaire (ou obturateur fémoral) lors de la pose d'une prothèse totale de hanche.

- a) Curetage de l'os fémoral pour la pose de la prothèse.
- b) Mise en place du bouchon diaphysaire à l'aide d'un outil adapté.
- c) Coulage de ciment acrylique pour le scellement de la prothèse.
- d) Mise en place de la prothèse totale de hanche dans le fémur.

Figure 10 : a) Modèle de KELVIN-VOIGT. b) Modèle de MAXWELL.

Figure 11 : Principe du matériau hybride :

Prélèvement de cellules ostéogéniques autologues chez l'Homme.

Mise en culture sur un matériau de cellulose macroporeuse.

Implantation pour combler le défaut osseux.

Figure 12 : Représentation schématique d'une intégrine typique d'après Horton [Horton, 178]. La liaison du ligand contenant la séquence RGD à la surface de la cellule est réalisée par l'intermédiaire des récepteurs de l'adhésion cellulaire (les intégrines). Les intégrines sont des hétérodimères constitués de deux sous unités α et β liés de manière non covalente.

Figure 13 : A) Les intégrines, composés de deux sous-unités α et β , jouent un rôle important dans l'attachement cellulaire en formant une liaison entre les protéines de la matrice extra cellulaire (MEC) d'une part, et les éléments du cytosquelette de la cellule d'autre part.

B) Les intégrines lient les domaines d'adhésion des protéines de la MEC par reconnaissances spécifiques de ces sites. La séquence RGD, présente dans la fibronectine et dans beaucoup d'autres protéines d'adhésion cellulaire, est l'unité fonctionnelle minimum permettant la conservation de l'activité d'attachement des cellules (d'après Tirell [Tirrell et al., 179]).

Figure 14 : Schématisation des réactions biochimiques entre la cellule osseuse et les peptides contenant une séquence RGD d'après Walluscheck [Walluscheck et al., 180]. La cellule endothéliale interagit par l'intermédiaire des récepteurs de la matrice cellulaire avec la séquence RGD et ainsi adhère au polymère substrat.

Figure 15 : Illustration schématique de polymère présentant des séquences RGD pour l'adhésion cellulaire.

(A) Une même quantité de ligand est présentée dans des microdistributions différentes.

(B) La distribution différente de ligands est attribuée à une distribution différente des intégrines à la surface membranaires de la cellule (d'après Hersel [Hersel et al., 181]).

Figure 16 : Structures des molécules de silanes greffées.

A) Organosilane. R : radical organique ; Y : groupement facilement hydroxylable.

B) 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES).

Figure 17 : Réaction d'hydrolyse d'un silane.

Figure 18 : Réaction de condensation d'un silane.

Figure 19 : Mécanisme proposé par une attaque nucléophile du groupement silanol faisant intervenir le silicium de l'organosilane dans un état de transition pentavalent, ce qui entraîne la migration du proton du groupe hydroxyle sur l'atome d'azote (d'après Unger [Unger, 182]).

Figure 20 : Réaction de condensation entre une molécule d'APTES et la surface de cellulose dans un solvant anhydre.

Figure 21 : Estérification d'une fonction -OH par l'acide phosphorique. Structure de la cellulose phosphatée.

Figure 22 : Dépôt de calcaire dans les molécules de tropocollagène.

Figure 23 : Mécanisme de la formation d'hydroxyapatite sur un substrat de phosphoprotéine immergé dans une solution physiologique contenant des ions calcium et phosphate.

Figure 24 : Oxydation de la cellulose par le tétraoxyde d'azote N_2O_4 d'après Ryden et al. [Ryden and Selvendran, 120].

Figure 25 : a) Oxydation de la cellulose par l'acide periodique HIO_4 . b) Mécanisme de réticulation du collagène sur la cellulose oxydée.

Figure 26 : Agencement microscopique de la triple hélice d'une molécule de collagène.

Figure 27 : Représentation schématique des supra-structures formées par différents types de collagènes. Les domaines en triple hélice sont représentés par des traits noirs et les domaines globulaires par des traits doubles ou des cercles blancs. Les cercles plus grands situés aux extrémités des molécules correspondent aux globules visibles en microscopie électronique avec ombrage tournant. D'après Van Der Rest et Garrone [Van Der Rest and Garrone, 126].

Figure 28 : Extracteur Soxhlet.

Figure 29 : Schématisation d'une immobilisation d'un peptide contenant une séquence Arginine - Glycine - Acide aspartique (RGD) sur une surface de cellulose.

R représente un peptide contenant une séquence RGD.

APTES : Aminopropyltriéthoxysilane.

SMP : Succinimidylmaléimide propionate.

DMF : Diméthylformamide.

Figure 30 : Schématisation de la séquence RGDC.

Figure 31 : Montage utilisé pour la phosphorylation. La réaction se fait dans un réacteur à double parois, équipé d'une entrée d'azote ou d'argon, d'un condensateur, d'un système de refroidissement, d'un agitateur mécanique et d'une ampoule à brome.

Figure 32 : Tube pour la minéralisation.

Figure 33 : a) Diffraction de la lumière par une particule. b) Principe de la théorie de Fraunhofer.

Figure 34 : Diffraction et diffusion de la lumière par une particule.

Figure 35 : Description du dispositif expérimental d'un granulomètre laser.

Figure 36 : Schéma du principe d'un porosimètre à mercure.

Figure 37 : a) Image digitalisée obtenue par microtomographie de rayon X (1024x1024) (coupe de l'échantillon 1).

b) Image obtenue après seuillage de l'image.

c) Les fonctions de distribution de longueurs de cordes sont calculées par comptage du nombre de cordes ayant une longueur donnée.

Figure 38 : Schématisation des interactions électrons-matière.

Figure 39 : Goutte de liquide à la surface d'un solide ; intervention des énergies de surface du solide et du liquide.

Figure 40 : Schématisation d'un instrument ESCA.

Figure 41 : Principe de fonctionnement d'un scintillateur gazeux proportionnel appliqué à l'imagerie β . Le détecteur est ici une chambre à avalanche à faces parallèles.

Figure 42 : Isolement des cellules ostéoprogénitrices à partir des cellules stromales humaines HBMSC. Caractéristiques phénotypiques .

1) Les cellules stromales ont étéensemencées en présence du milieu IMDM contenant 10 % de SVF, et 10-8 M dexaméthasone pendant environ 2 semaines (observation en microscopie optique x 360).

2) Puis, dès l'obtention de la confluence cellulaire (observation en microscopie optique x 130), l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) (3) a été analysée par cytochimie à l'aide d'un kit de détection (SIGMA) utilisant le substrat de l'enzyme (le naphthol AS-MX phosphate).

Figure 43 : Evaluation de la cytotoxicité.

1) et 2) Le matériau est placé dans un véhicule d'extraction pendant 120 heures à 37 °C.

3) Le liquide résultant de l'incubation du matériau dans le véhicule d'extraction est appelé liquide d'extraction.

4) Les études de cytotoxicité sont réalisées sur l'extrait pur et sur des dilutions à 50 %, 10 % et 1 %.

5) Des cellules sontensemencées en présence des solutions pendant 24 heures à 37 °C.

6) Des tests de viabilité (Rouge neutre) et d'activité métabolique (MTT) sont alors réalisés.

Figure 44 : Spectres généraux XPS : (A) Cellulose brute ; (B) Cellulose nettoyée.

Figure 45 : Spectres XPS : (A) C1s de la cellulose brute ; (B) C1s de la cellulose nettoyée.

Figure 46 : Observations au MEB des surfaces de :

(A) cellulose nettoyée

(B) cellulose nettoyée + traitement (T= 30 °C, P= 10-5 torr, t= 15 h)

(C) cellulose nettoyée + traitement (T= 70 °C, P= 10-5 torr, t= 15 h)

(D) cellulose nettoyée + traitement (T= 95 °C, P= 10-5 torr, t= 15 h)

Figure 47 : Observation au MEB des surfaces de :

(A) cellulose après traitement (T= 30 °C, P= 10-5 torr, t= 15 h) puis 1h dans le toluène

(B) cellulose après traitement (T= 70 °C, P= 10-5 torr, t= 15 h) puis 1h dans le toluène

(C) cellulose après traitement (T= 95 °C, P= 10-5 torr, t= 15 h) puis 1h dans le toluène

Figure 48 : Observation au MEB de la surface des échantillons de la cellulose vierge de porosité (1) à un grossissement de a) 20 , b) 50, c) 100 et d) 130.

Figure 49 : Observation au MEB de la surface des échantillons de la cellulose vierge de porosité (2) à un grossissement de a) 20 , b) 50, et c) 50 et d) 200.

Figure 50 : Observation au MEB de la surface des échantillons de la cellulose vierge de porosité (1+2) à un grossissement de a) 20 , b) 50, et c) 100 et d) 600.

Figure 51 : Images digitalisées obtenues par microtomographie de rayon X (1024x1024). Observation des échantillons de cellulose vierge de porosité a) (1) (à une résolution de 9.5 µm / pixel), b) (2) (à une résolution de 9.5 µm / pixel), et c) (1+2) (à une résolution de 5.5 µm / pixel).

Figure 52 : Granulométrie des grains de CaCO₃ utilisés comme agents porogènes dans la fabrication de la cellulose macroporeuse. Distribution des pourcentages en nombre de la taille des particules du lot a) (1), b) (2) et c) (1+2).

Figure 53 : Alignement des particules dans un tamis.

Figure 54 : Répartition de la taille des pores, mesurée par porosimétrie à mercure, de trois échantillons de porosités (1), (2) et (1+2).

Figure 55 : Distributions de probabilité en fonction du diamètre des pores (en µm) des matériaux de porosité (1), (2) et (1+2).

Figure 56 : Ostéoprogéniteursensemencés sur des matériaux de cellulose macroporeuse de porosité a) (1) (x 1100), b) (2) (x 1700) et c) (1+2) (x 3500), observés au MEB en surface des implants.

Figure 57 : Ostéoprogéniteursensemencés sur des matériaux de cellulose macroporeuse de porosité a) (1) (x 1100), b) (2) (x 1100) et c) (1+2) (x 3000), observés au MEB au centre des implants.

Figure 58 : Observations au MEB des surfaces : (A) Cellulose nettoyée ; (B) Cellulose greffée avec les molécules APTES ; (C) Cellulose greffée avec les molécules APTES, puis SMP ; (D) Cellulose greffée avec les molécules APTES, SMP, puis des peptides RGDC.

Figure 59 : Cinétique d'absorption d'une goutte d'eau déposée sur un matériau cellulosique nettoyé (mesure d'angle de contact en dynamique).

Figure 60 : Spectres généraux XPS de la : (A) Cellulose nettoyée ; (B) Cellulose après greffage des molécules APTES ; (C) Cellulose après greffage des molécules APTES, puis SMP ; (D) Cellulose après greffage des molécules APTES, SMP, puis des peptides RGDC.

Figure 61 : Spectres XPS C1s sur le matériau compact : (A) Cellulose vierge ; (B) Cellulose + APTES ; (C) Cellulose + APTES + SMP ; (D) Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

Figure 62 : Spectres XPS Si2p sur le matériau compact de Cellulose + APTES ; Cellulose + APTES + SMP ; Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

Figure 63 : Spectres XPS N1s sur le matériau compact : (B) Cellulose + APTES ; (C) Cellulose + APTES + SMP ; (D) Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

Figure 64 : Lames de cellulose greffée à la 35S-Cystéine, visualisées par imagerie haute résolution a) après le greffage de l'acide aminé et b) après 162 heures passées dans l'eau sous agitation.

Figure 65 : Etude au cours du temps de la désorption de la 35S-Cystéine greffée à la surface d'une lame de cellulose compacte lorsqu'elle est immergée dans de l'eau sous agitation.

Figure 66 : Cytotoxicité de la cellulose compacte vierge et greffée de peptides RGDC.
a) Viabilité d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif et b) activité métabolique d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif (milieu de culture non dilué incubé dans les mêmes conditions que les matériaux) évaluée par le test au Rouge Neutre. Les extraits du matériau sont utilisés purs (100 % v/v) et à différentes dilutions (50 % v/v, 10 % v/v, 1 % v/v). Le témoin positif est une solution de phénol à une concentration finale de 6.4 g/l. (n = 5).

Figure 67 : Tests d'attachement de culture d'ostéoblastes humains à 1 heure, 3 heures et 24 heures sur cellulose compacte (n = 15).

Figure 68 : Spectres généraux XPS sur le matériau poreux : (A) Cellulose vierge ; (B) Cellulose + APTES ; (C) Cellulose + APTES + SMP ; (D) Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

Figure 69 : Spectres XPS C1s sur le matériau poreux : (A) Cellulose vierge ; (B) Cellulose + APTES ; (C) Cellulose + APTES + SMP ; (D) Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

Figure 70 : Spectres XPS Si2p sur le matériau poreux de Cellulose + APTES ; Cellulose + APTES + SMP ; Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

Figure 71 : Spectres XPS N1s sur le matériau poreux : (B) Cellulose + APTES ; (C) Cellulose + APTES + SMP ; (D) Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

Figure 72 : Tests d'attachement de culture d'ostéoblastes humains à 1 heure, 3 heures et 24 heures sur cellulose macroporeuse (n = 15).

Figure 73 : Ostéoprogéniteurs ensemencés sur des matériaux de cellulose macroporeuse de porosité (1+2), greffés de peptide RGD. Observations au MEB de la surface des implants (a) x 300) et b) x 1000), et du coeur des implants (c) x 300 et d) x 800) après 24 heures d'ensemencement.

Figure 74 : Observation au MEB a) de la surface et b) du coeur des échantillons de cellulose de porosité (1+2), phosphatée pendant 8 heures, à un grossissement de 50.

Figure 75 : Observation au MEB en surface (a, b et c) et au coeur (d) des échantillons de cellulose de porosité (1+2) phosphatée pendant 8 heures, puis minéralisée pendant 14 jours, à un grossissement de a) 300, b) 2500, c) 6000 et d) 1500.

Figure 76 : Observation au MEB en surface (a, b et c) et au coeur (d) des échantillons de cellulose de porosité (1+2) minéralisée pendant 14 jours, à un grossissement de a) 400, b) 600, et c) et d) 800.

Figure 77 : Spectres généraux XPS sur le matériau poreux : a) Cellulose vierge ; b) Cellulose phosphatée ; c) Cellulose phosphatée pré-incubée dans une solution de calcium ; (d) Cellulose phosphatée minéralisée ; e) Cellulose minéralisée.

Figure 78 : Spectres XPS C1s de la cellulose nettoyée sur le matériau poreux.

Figure 79 : Cytotoxicité de la cellulose poreuse nettoyée et phosphatée.

a) Viabilité d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif et b) activité métabolique d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif (milieu de culture non dilué incubé dans les mêmes conditions que les matériaux) évaluée par le test au Rouge Neutre. Les extraits du matériau sont utilisés purs (100 % v/v) et à différentes dilutions (50 % v/v, 10 % v/v, 1 % v/v). Le témoin positif est une solution de phénol à une concentration finale de 6.4 g/l. (n = 5).

Figure 80 : Observation au MEB à un grossissement de a) 50, b) 200 et c) 200 de la surface des échantillons de cellulose oxydée à 0.5 M.

Figure 81 : Observation au MEB de la surface des échantillons de cellulose oxydée à 0.5 M et réticulée par de l'albumine à un grossissement de a) 50, b) 200 et c) 400.

Figure 82 : Oxydation des matériaux déterminée par le dosage des aldéhydes en fonction du nombre de moles d'acide periodique utilisées pour oxyder la cellulose à 0 %, 25 %, 50 %, 75 % et 100 % : 1 mole de HIO₄ oxyde 1 unité glucose (soit 100 % d'oxydation).

Figure 83 : Oxydation de la cellulose déterminée par le dosage des aldéhydes en fonction de la concentration d'acide periodique utilisé. Le lot (2 x 0.5 M) correspond à des matériaux oxydés une première fois à 0.5 M, puis immergés une deuxième fois dans une solution d'acide à 0.5 M.

Figure 84 : Immersion dans du réactif de Schiff de : a) cellulose oxydée à 100 % ; b) cellulose non oxydée ; c) Surgicel[®] (cellulose oxydée entre 16 et 24 %).

Figure 85 : Réticulation de la cellulose avec l'albumine : contrôle de la radioactivité volumique contenue dans les eaux de lavage.

Figure 86 : Quantités d'albumine retenue (en mg/g de cellulose) sur les matériaux de cellulose non oxydée et oxydée, avant et après le rinçage, et après l'échange avec l'albumine froide.

Figure 87 : Etude en fonction du temps d'échange entre l'albumine en solution et l'albumine adsorbée sur la cellulose a) non oxydée et b) oxydée.

Figure 88 : Spectre généraux XPS sur la cellulose macroporeuse : (A) nettoyée ; (B) oxydée ; (C) réticulée avec de l'albumine.

Figure 89 : Spectre XPS C1s sur la cellulose macroporeuse : (A) nettoyée ; (B) oxydée ; (C) réticulée avec de l'albumine.

Figure 90 : Cytotoxicité du Surgicel[®] et de la cellulose macroporeuse vierge, oxydée, réticulée avec de l'albumine, réticulée avec de l'albumine et rincée.

a) Viabilité d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif et
b) activité métabolique d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif (milieu de culture non dilué incubé dans les mêmes conditions que les matériaux) évaluée par le test au Rouge Neutre. Les extraits du matériau sont utilisés purs (100 % v/v) et à différentes dilutions (50 % v/v, 10 % v/v, 1 % v/v). Le témoin positif est une solution de phénol à une concentration finale de 6.4 g/l. (n = 5).

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples d'applications biomédicales de la cellulose et de ses dérivés.

Tableau 2 : Propriétés physiques comparées de CRV, d'os cortical et de ciment acrylique.
a : SIMPLEX P de HOWMEDICA, b : Déterminations par méthode ultrasonore, c : suivant la direction longitudinale, d : technique de flexion 3 points [Poustis et al., 46].

Tableau 3 : Traitements de surface.

Tableau 4 : Numéros du registre du Chemical Abstract des dérivés de cellulose et de leurs sels.

Tableau 5 : Liaisons de réticulation sur une protéine et agents de réticulation chimique.

Tableau 6 : Diverses formes d'applications de biomatériaux à base de collagène.

Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques de la pâte visqueuse provenant de la société VISKASE.

Tableau 8 : Liste partielle de protéines marquées par la méthode de la Chloramine T d'après Mc Conahey et al., 1980 [McConahey et al., 183].

Tableau 9 : Teneur en acides aminés des albumines.

Tableau 10 : Teneur en azote et en soufre des albumines.

Tableau 11 : Composition expérimentale des liaisons chimiques (en %) obtenus par XPS à partir des déconvolutions du spectre C1s, des surfaces de cellulose compacte brute et nettoyée.

Tableau 12 : Tableau regroupant les valeurs numériques des D10, D50 et D90 obtenues dans la distribution de la taille des particules en fonction du pourcentage en nombre.

D10 = diamètre seuil pour lequel 10 % des particules se trouvent en dessous de cette dimension.

D50 = diamètre pour lequel 50 % des particules ont une taille inférieure et 50 % une taille supérieure. C'est le diamètre médian (MMD, Mass Median Diameter).

D90 = diamètre seuil pour lequel 90 % des particules se trouvent en dessous de cette dimension.

Tableau 13 : Résultats des pourcentages de porosité des échantillons (1+2), (1) et (2), obtenus 1) par le calcul et 2) par la porosimétrie à Hg.

Tableau 14 : Comparaison des diamètres des grains de CaCO₃ donnés par le fournisseur (de 250 à 900 µm) après tamisage dans un tamis de 500 µm de maillage et de ceux déterminés par granulométrie laser (2 porosités différentes, une petite et une plus grande) (en µm), et des diamètres des pores du matériau déterminés par la porosimétrie à mercure et la distribution de cordes (en µm).

Tableau 15 : Mesure d'angles de contact exprimés en degré de l'eau sur la cellulose greffée avec les molécules APTES et SMP, et le peptide RGDC. Les analyses ont été réalisées sur 15 échantillons, avec 3 gouttes déposées sur chaque matériau et 5 mesures faites à partir d'une goutte.

Tableau 16 : Compositions atomiques théoriques et expérimentales (en %), et rapports atomiques (Si / N) théoriques et expérimentaux, obtenus par XPS des surfaces de cellulose compacte vierge, greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des positions énergétiques attendues pour les liaisons impliquant le carbone, l'azote, le silicium (avec une tolérance de ± 0.2 eV).

Tableau 18 : Composition expérimentale des liaisons chimiques (en %) obtenus par XPS à partir des déconvolutions du spectre C1s, des surfaces de cellulose compacte greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.

Tableau 19 : Composition expérimentale des liaisons chimiques (en %) obtenus par XPS à partir des déconvolutions du spectre N1s, des surfaces de cellulose compacte greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.

Tableau 20 : compositions atomiques théoriques et expérimentales (en %), et rapports atomiques (Si / N) théoriques et expérimentaux, obtenus par XPS des surfaces de cellulose poreuse vierge, greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.

Tableau 21 : Composition expérimentale des liaisons chimiques (en %) obtenus par XPS à partir des déconvolutions du spectre C1s, des surfaces de cellulose poreuse greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.

Tableau 22 : Composition expérimentale des liaisons chimiques (en %) obtenus par XPS à partir des déconvolutions du spectre N1s, des surfaces de cellulose poreuse greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.

Tableaux 23 : Compositions atomiques théoriques et expérimentales (en %), et rapports atomiques (P/Ca) théoriques et expérimentaux, obtenus par XPS des surfaces de a) cellulose macroporeuse vierge ; phosphatée ; incubée dans une solution de CaCl₂ ; et b) phosphatée et minéralisée dans du SBF ; simplement minéralisée dans du SBF.

Tableau 24 : Quantités d'albumine retenue (en mg/g de cellulose et en %) sur les matériaux de cellulose non oxydée et oxydée, avant et après le rinçage, et après l'échange avec l'albumine froide.

Tableau 25 : compositions atomiques théoriques et expérimentales (en %), obtenus par XPS des surfaces de cellulose macroporeuse vierge, oxydée et réticulée avec de l'albumine.

Tableau 26 : composition expérimentale des liaisons chimiques (en %) obtenus par XPS à partir des déconvolutions du spectre C1s, des surfaces de cellulose nettoyée, oxydée et réticulée avec de l'albumine.

Annexe 1 : Dilution de SBF

Dans 500 ml d'eau déionisée, on dissout les différents réactifs présents dans le tableau (avec TRIS : $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ -tris-(hydroximéthyl)aminométhane) :

Réactifs	M (g/mol)	Conc (mM)	m (g)
NaCl	58.5	136.8	8.003
NaHCO₃	84.0	4.2	0.353
KCl	74.5	3.0	0.224
K₂HPO₄, 3H₂O	228.0	1.0	0.228
MgCl₂, 6 H₂O	203.3	1.5	0.305
HCl, 1 M	36.5	-	40 ml
CaCl₂	111.1	2.5	0.278
Na₂SO₄	142.1	0.5	0.071
TRIS	121.0	50.1	6.057

L'addition de chacun des réactifs ne doit être réalisée qu'après la dissolution totale du réactif précédent. La solution placée dans une fiole jaugée de capacité 1 l, est alors ajustée jusqu'au volume total avec de l'eau déionisée.

Après immersion de l'erlen dans un bain thermostaté chauffé à 37 °C, on ajuste le pH de la dilution de SBF à 7.4. Puis afin de la rendre stérile, elle est filtrée sous vide dans un filtre Büchner stérile (porosité de la membrane : 0.2 mm).

La solution peut être conservée à une température de 4 °C pour une période inférieure à 30 jours.

Annexe 2 : Solution tampon de Tris HCl à pH 7.4 ± 0.1

Dissoudre 13.25 g de Tris (hydroxyméthyle)aminométhane dans 500 ml d'eau dans une fiole de 1000 ml.

Ajouter 125 ml d'acide chlorhydrique 1 M.

Compléter la fiole de 1000 ml avec de l'eau déionisée.

Ajuster le pH avec de HCl ou du Tris.

Annexe 3 : Réactifs pour le dosage des aldéhydes

Préparation des solutions :

- solution d'hydrazine à 0.5 M :

10.49 g d'hydrazine dihydrochloride dissout dans 200 ml d'eau déionisée, auxquels 2 g d'acide borique sont ajoutés. Le pH est ajusté à 9 par addition de solution NaOH.

- solution de p-diméthylaminobenzaldéhyde :

16 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde dissout dans 800 ml d'éthanol à 99.5 % et 80 ml d'acide chlorhydrique concentré.

Références Bibliographiques

- [1] Grabowski, T., Principes d'anatomie et de physiologie De Boeck Université, Québec 1994.
- [2] Cabrol, C., Anatomie 1. Appareil locomoteur Paris 1995.
- [3] Ashman, R. B., Corin, J. D., and Turner, C. H. Journal of Biomechanical Engineering 20 (1987) 979-986.
- [4] Gibson, L. J., and Ashby, M. F. (1982). Paper presented at: Proc R Soc Lond.
- [5] Cowin, S. C. Journal of Biomechanical Engineering 108 (1986) 83-88.
- [6] Notelovitz, M. Fertility and Sterility 59 (1993) 707-725.
- [7] Kelly, P. J., Eisman, J. A., and Sambrook, P. N. Osteoporosis International 1 (1990) 56-60.
- [8] Spector, M., Cease, C., and Xia, T. L. CRC Critical Reviews in Biocompatibility 5 (1989) 269-295.
- [9] Coleman, D. L., King, R. N., and Andrade, J. D. Journal of Biomedical Materials Research 8 (1974) 199-211.
- [10] Johnson, H. J., Northup, S. J., Seagraves, P. A., Garvin, P. J., and Wallin, R. F. Journal of Biomedical Materials Research 17 (1983) 571-586.
- [11] John, V., Introduction to Engineering Materials Simon & Schuster, New York 1983.
- [12] Passuti, N., Delecrin, J., Gouin, F., and Heymann, D., Substituts osseux, Vol 14-015-B-10 Elsevier, Paris 1999.
- [13] Association pour l'Etude des Greffes et des substituts Osseux, S. T. e. O., Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (Paris), (1994). pp. 35.
- [14] Reddi, A. H., Wientroub, S., and Muthukumaran, N. Orthopedic Clinics of North America 18 (1987) 207-212.
- [15] Daculsi, G., Passuti, N., Martin, S., Deudon, C., Legeros, R. Z., and Raheer, S. Journal of Biomedical Materials Research 24 (1990) 379-396.
- [16] Daculsi, G., and Passuti, N. Biomaterials 11 (1990) 86-87.
- [17] de Groot, K., Tencer, A., Waite, P., Nichols, J., and Kay, J. Annals of the New York Academy of Sciences 523 (1988) 272-277.
- [18] Nemzek, J. A., Arnoczky, S. P., and Swenson, C. L. Journal of Bone and Joint Surgery-American volume 76 (1994) 1036-1041.
- [19] Mainard, D., Delagoutte, J., and Wepierre, G., Les substituts de l'os : possibilités actuelles Paris Romillat 1990.
- [20] Lacout, J., Mejdoubi, E., and Michaud, P., Ciment hydraulique à base de phosphate de calcium Paris Romillat 1996.
- [21] Sharrock, P. Bioceramics 6 (1994) 333-338.
- [22] Doherty, M. J., Schlag, G., Schwarz, N., Mollan, R. A., Nolan, P. C., and Wilson, D. J. Biomaterials 15 (1994) 601-608.
- [23] Yokogawa, Y., Paz Reyes, J., Mucalo, M. R., Toriyama, M., Kawamoto, Y., Suzuki, T., Nishizawa, K., Nagata, F., and Kameyama, T. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 8 (1997) 407-412.
- [24] Jin, H.-J., and Kaplan, D. L. Nature 424 (2003) 1057-1061.
- [25] Atkins, E. International Journal of Biological Macromolecules 16 (1994) 51.
- [26] Ikada, Y., Biomedical applications of cellulose membranes Ellis Horwood, Chichester, UK 1989.
- [27] Miyamoto, T., Takahashi, S., Ito, H., Inagaki, H., and Noishiki, Y. Journal of Biomedical Materials Research 23 (1989) 125-133.
- [28] Hon, D.-S., Cellulose: a random walk along its historical path, Vol 1 1994.

- [29] Reveley, A., A review of cellulose derivatives and their industrial applications Ellis Horwood, Chichester, UK 1985.
- [30] Franz, G. *Advances in Polymer Science* 76 (1986) 1-30.
- [31] Dumitriu, S., and Dumitriu, M., *Hydrogels as support for drug delivery systems* Marcel Dekker, New York, USA 1996.
- [32] Mandolfo, S., Tetta, C., David, S., Gervasio, R., Ognibene, D., Wratten, M. L., Tessore, E., and Imbasciati, E. *International Journal of Artificial Organs* 20 (1997) 603-609.
- [33] Ishihara, K., and Nakabayashi, N. *Artificial Organs* 19 (1995) 1215-1221.
- [34] Pommier, J. C., Poustis, J., Baquey, C., and Chauveaux, D. (Brevet Français, extension Européenne), (1987).
- [35] Pommier, J. C., Poustis, J., Baquey, C., and Chauveaux, D. (Brevet Français, extension Européenne), (1991).
- [36] Matthew, I. R., Browne, R. M., Frame, J. W., and Millar, B. G. *Biomaterials* 16 (1995) 275-278.
- [37] Skoog, T. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery* 1 (1967) 113-130.
- [38] Ishihara, K., Nakabayashi, N., Fukumoto, K., and Aoki, J. *Biomaterials* 13 (1992) 145-149.
- [39] Lagoa, R., Murtinho, D., and Gil, M., *Membranes of cellulose derivatives as supports for immobilization of enzymes* ACS Symposium Series 723, Oxford University Press, Cary, USA 1999.
- [40] Simionescu, C., Dumitriu, S., Bulacovschi, V., and Popa, V. *Journal of Polymer Science Part C - Polymer Symposium* 66 (1979) 171-183.
- [41] Oth, M., Franz, M., Timmermans, J., and Moes, A. *Pharmaceutical Research* 9 (1992) 298-302.
- [42] Martson, M., Viljanto, J., Hurme, T., and Saukko, P. *European Surgical Research Europäische Chirurgische Forschung Recherches Chirurgicales Europeennes* 30 (1998) 426-432.
- [43] Martson, M., Viljanto, J., Hurme, T., Laippala, P., and Saukko, P. *Biomaterials* 20 (1999) 1989-1995.
- [44] Pajulo, Q., Viljanto, J., Lonnberg, B., Hurme, T., Lonnqvist, K., and Saukko, P. *Journal Of Biomedical Materials Research* 32 (1996) 439-446.
- [45] Dupraz, A., Nguyen, T. P., Richard, M., Daculsi, G., and Passuti, N. *Biomaterials* 20 (1999) 663-673.
- [46] Poustis, J., Baquey, C., and Chauveaux, D. *Clinical Materials* 16 (1994) 119-124.
- [47] Barbié, C., Chauveaux, D., Barthe, X., Baquey, C., and Poustis, J. *Clinical Materials* 5 (1990) 251-258.
- [48] Bordi, F., Paradossi, G., Rinaldi, C., and Ruzicka, B. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 304 (2002) 119-128.
- [49] Drury, J. L., and Mooney, D. J. *Biomaterials* 24 (2003) 4337-4351.
- [50] Chamberlain, V. C., Lambert, B., and Tang, F. W., *Sterilization effects* Edwards Brothers, Ann Arbor, USA 1999.
- [51] Van Wachem, P. B., Hogt, A. H., Beugeling, T., Feijen, J., Bantjes, A., Detmers, J. P., and van Aken, W. G. *Biomaterials* 8 (1987) 323-328.
- [52] Baquey, C. (1992). Paper presented at: Fourth World Biomaterials Congress (Berlin).
- [53] Bruneteau, P., Fricain, J. C., Porté-Durrieu, M. C., and Baquey, C. (2001). Paper presented at: European Society for Biomaterials.
- [54] Laurence, S. *DEA en Physiologie Cellulaire Intégrée "Biologie Santé"*, Université Victor Segalen Bordeaux 2, (2002) Bordeaux.
- [55] Fricain, J. C., Bruneteau, P., Porté-Durrieu, M. C., and Baquey, C. (2001). Paper presented at: Journée Française de Biologie et des tissus Minéralisés (Strasbourg).

- [56] Shah, A. K., Lazatin, J., Sinha, R. K., Lennox, T., Hickok, N. J., and Tuan, R. S. *Biology of the Cell* 91 (1999) 131-142.
- [57] Ratner, B. D. *Journal of Biomedical Materials Research* 27 (1993) 837-850.
- [58] Baquey, C. (1988). Paper presented at: Congrès BIOMAT 88 (Bordeaux).
- [59] Castner, D. G., and Ratner, B. D. *Surface Science* 500 (2002) 28-60.
- [60] Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (1984) 5985-5988.
- [61] Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. *Nature* 309 (1984) 30-33.
- [62] Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M. D. *Science* 238 (1987) 491-497.
- [63] Verrier, S., Pallu, S., Bareille, R., Jonczyk, A., Meyer, J., Dard, M., and Amédée, J. *Biomaterials* 23 (2002) 585-596.
- [64] Lin, H. B., Sun, W., Mosher, D. F., Garcia-Echeverria, C., Schaufelberger, K., Lelkes, P. I., and Cooper, S. L. *Journal of Biomedical Materials Research* 28 (1994) 329-342.
- [65] Guillemot, F., Brouillaud, B., Labrugère, C., Barthe, N., Basse-Cathalinat, B., Baquey, C., and Porté-Durrieu, M. C. *Biomaterials* (soumis).
- [66] Durrieu, M. C., Pallu, S., Guillemot, F., Bareille, R., Amédée, J., and Baquey, C. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 15 (2004) 779-786.
- [67] Kobayashi, N., Taguchi, T., Noguchi, H., Okitsu, T., Totsugawa, T., Watanabe, T., Matsumura, T., Fujiwara, T., Urata, H., Kishimoto, N., *et al.* *Cell Transplantation* 10 (2001) 387-392.
- [68] Matsumoto, I., Seno, N., Golovtchenko-Matsumoto, A. M., and Osawa, T. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 87 (1980) 535-540.
- [69] Porte-Durrieu, M. C., Guillemot, F., Pallu, S., Labrugere, C., Brouillaud, B., Bareille, R., Amedee, J., Barthe, N., Dard, M., and Baquey, C. *Biomaterials* 25 (2004) 4837-4846.
- [70] Massia, S., and Hubbell, J. *Journal of Cell Biology* 114 (1991) 1089-1100.
- [71] Irvine, D. J., Hue, K.-A., Mayes, A. M., and Griffith, L. G. *Biophysical Journal* 82 (2002) 120-132.
- [72] Gurrath, M., Muller, G., Kessler, H., Aumailley, M., and Timpl, R. *European Journal Of Biochemistry / FEBS* 210 (1992) 911-921.
- [73] Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D. A., Wells, A., and Griffith, L. G. *Journal of Cell Science* 113 (Pt 10) (2000) 1677-1686.
- [74] Beer, J. H., Springer, K. T., and Collier, B. S. *Blood* 79 (1992) 117-128.
- [75] Pope, N. M., Kulcinski, D. L., Hardwick, A., and Chang, Y. A. *Bioconjugate Chemistry* 4 (1993) 166-171.
- [76] Plueddemann, E. P., *Silane coupling agents* New York 1982.
- [77] Collins, W., *The modern Plastics Encyclopedia* Mc Graw Hill Co., New York 1978.
- [78] McGovern, M. E., Kallury, K. M. R., and Thompson, M. *Langmuir* 10 (1994) 3607-3614.
- [79] Silberzan, P., Leger, L., Ausserre, D., and Benattar, J. *Langmuir* 7 (1991) 1647-1751.
- [80] Nishiyama, N., Katsuki, H., Horie, K., and Asakura, T. *Journal of Biomedical Materials Research* 21 (1987) 1029-1038.
- [81] Kallury, K. M. R., MacDonald, P. M., and Tompson, M. *Langmuir* 10 (1994) 492-499.
- [82] Abdelmouleh, M., Boufi, S., Belgacem, M. N., Duarte, A. P., Ben Salah, A., and Gandini, A. *International Journal of Adhesion and Adhesives* 24 (2004) 43-54.
- [83] Chaimberg, M., and Cohen, Y. *Journal of Colloid and Interface Science* 134 (1990) 576-579.
- [84] Engelhardt, H., and Mathes, D. *Journal of Chromatography* 142 (1977) 311-320.
- [85] Parnas, R. S., Chaimberg, M., Taepaisitphonyse, V., and Cohen, Y. *Journal of Colloid and Interface Science* 129 (1989) 441.

- [86] Granja, P. L., Barbosa, M. A., Pouységu, L., de Jeso, B., Rouais, F., and Baquey, C. *Journal of Materials Science* 36 (2001) 2163-2172.
- [87] Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., and Wagenknecht, W., Cellulose phosphate and other phosphorus-containing cellulose derivatives. *Comprehensive cellulose chemistry*, Vol 2 Weinheim, Germany 1998.
- [88] Nehls, I., Philipp, B., and Wagenknecht, W., ¹³C NMR spectroscopic studies on regioselective derivatization of cellulose Woodhead, Cambridge, UK 1995.
- [89] Zeronian, S. H., Adams, S., Alger, K., and Lipska, A. E. *Journal of Applied Polymer Science* 25 (1980) 519-528.
- [90] Clermont, L. P. (US), (1971).
- [91] Touey, G., and Kingsport, T. (Brevet U.S.), (1956).
- [92] Granja, P. L. PhD, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, (2001) Porto.
- [93] Granja, P. L., Pouységu, L., Pétraud, M., de Jeso, B., Baquey, C., and Barbosa, M. A. *Journal of Applied Polymer Science* 82 (2001) 3341-3353.
- [94] Granja, P. L., Pouységu, L., Deffieux, D., Daudé, G., de Jeso, B., Labrugere, C., Baquey, C., and Barbosa, M. A. *Journal of Applied Polymer Science* 82 (2001) 3354-3365.
- [95] Wu, C. B., and Veis, A. *Biomaterials* 11 (1990) 16-18.
- [96] Van Den Bos, T., Oosting, J., Everts, V., and Beertsen, W. *Journal of Bone Mineral Research* 10 (1995) 616-624.
- [97] Bellows, C. G., Heersche, J. N., and Aubin, J. E. *Bone and Mineral* 17 (1992) 15-29.
- [98] Beertsen, W., van den Bos, T., and Niehof, J. *Bone and Mineral* 20 (1993) 41-55.
- [99] Linde, A., Lussi, A., and Crenshaw, M. A. *Calcified Tissue International* 44 (1989) 286-295.
- [100] Hunter, G. K., Kyle, C. L., and Goldberg, H. A. *The Biochemical Journal* 300 (Pt 3) (1994) 723-728.
- [101] Mucalo, M. R., Yokogawa, Y., Suzuki, T., Kawamoto, Y., Nagata, F., and Nishizawa, K. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 6 (1995) 658-669.
- [102] Li, S. H., Liu, Q., de Wijn, J. R., Zhou, B. L., and de Groot, K. *Biomaterials* 18 (1997) 389-395.
- [103] Shimabayashi, S., Hashimoto, N., Kawamura, H., and Uno, T., Formation of hydroxyapatite in the presence of phosphorylated and sulfated polymer in an aqueous phase Plenum Press, New York, USA 1995.
- [104] Kato, K., Eika, Y., and Ikada, Y. *Journal of Biomedical Materials Research* 32 (1996) 687-691.
- [105] Tanahashi, M., and Matsuda, T. *Journal of Biomedical Materials Research* 34 (1997) 305-315.
- [106] Gunasekaran, S., Sabelman, E. E., and Hu, M. (1999). Paper presented at: 25th Annual Meeting Society Biomaterials (USA, Society for Biomaterials).
- [107] Katayama, Y., House, C. M., Udagawa, N., Kazama, J. J., McFarland, R. J., Martin, T. J., and Findlay, D. M. *Journal of Cellular Physiology* 176 (1998) 179-187.
- [108] Yamamoto, M., Kato, K., and Ikada, Y. *Journal of Biomedical Materials Research* 37 (1997) 29-36.
- [109] Alliot-Licht, B., Gregoire, M., Orly, I., and Menanteau, J. *Biomaterials* 12 (1991) 752-756.
- [110] Sun, J. S., Tsuang, Y. H., Liao, C. J., Liu, H. C., Hang, Y. S., and Lin, F. H. *Journal of Biomedical Materials Research* 37 (1997) 324-334.
- [111] Granja, P. L., Ribeiro, A. S., de Jeso, B., Baquey, C., and Barbosa, M. A. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine* 12 (2001) 785-791.
- [112] Fricain, J. C., Granja, P. L., Barbosa, M. A., de Jeso, B., Barthe, N., and Baquey, C. *Biomaterials* 23 (2002) 971-980.

- [113] Brash, J. L., and Samak, Q. M. *Journal of Colloid and Interface Science* 65 (1978) 495-504.
- [114] Weadock, K., Olson, R. M., and Silver, F. H. *Biomaterials Medical Devices and Artificial Organs* 11 (1983) 293-318.
- [115] Rousseau, C. F., and Gagnieu, C. H. *Biomaterials* 23 (2002) 1503-1510.
- [116] Liu, L. S., and Spiro, R. C. (United States Patent),(1999). pp. 1-9.
- [117] Watt, P. W., Harvey, W., Wiseman, D., Light, N. D., Saferstein, L., and Cini, J. (European Patent),(2003). pp. 1-15.
- [118] Hart, J., Silcock, D., Gunnigle, S., Cullen, B., Light, N. D., and Watt, P. W. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (2002) 1557-1570.
- [119] Cullen, B., Watt, P. W., Lundqvist, C., Silcock, D., Schmidt, R. J., Bogan, D., and Light, N. D. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (2002) 1544-1556.
- [120] Ryden, P., and Selvendran, R. R. *Carbohydrate Research* 195 (1990) 257-272.
- [121] Nevell, T. P., and Haig Zeronian, S., *Cellulose chemistry and its applications* New York 1985.
- [122] Syamala Devi, K., Sinha, T. J. M., and Vasudevan, P. *Biomaterials* 7 (1986) 193-196.
- [123] Dan Dimitrijevic, S., Tatarko, M., Gracy, R. W., Linsky, C. B., and Olsen, C. *Carbohydrate Research* 195 (1990) 247-256.
- [124] Singh, M., Ray, A. R., and Vasudevan, P. *Biomaterials* 3 (1982) 16-20.
- [125] Miller, E. J. *Molecular and Cellular Biochemistry* 13 (1976) 165-192.
- [126] Van Der Rest, M., and Garrone, R. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5 (1991) 2814-2823.
- [127] Myllyharju, J., and Kivirikko, K. I. *Annals Of Medicine* 33 (2001) 7-21.
- [128] Lethias, C., Labourdette, L., Willems, R., Comte, J., and Herbage, D. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology* 15 (1996) 104-113.
- [129] Montes, G. S., and Junqueira, L. C. *Revue Canadienne de Biologie Expérimentale* 41 (1982) 143-156.
- [130] Ramshaw, J. A., Werkmeister, J. A., and Glattauer, V. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 13 (1996) 335-382.
- [131] Grinnell, F., *Cell-Collagen interactions: overview*, Vol 82 Cunningham LW & Frederiksen DW, New York, USA 1982.
- [132] Silver, F. H., and Glasgold, A. I. *Otolaryngologic Clinics of North America* 28 (1995) 847-864.
- [133] Kawamoto, Y., and Kaibara, M. *Biochimica et Biophysica Acta* 1035 (1990) 361-368.
- [134] Miyata, T., Taira, T., and Noishiki, Y. *Clinical Materials* 9 (1992) 139-148.
- [135] Strom, S. C., and Michalopoulos, G., *Collagen as a substrate for cell growth and differentiation*, Vol 82 Cunningham LW & Frederiksen DW, New York, USA 1982.
- [136] Choi, Y. S., Hong, S. R., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., and Nam, Y. S. *Journal of Biomedical Materials Research* 48 (1999) 631-639.
- [137] Augustin, C., Collombel, C., and Damour, O. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 13 (1997) 27-36.
- [138] Prajapati, R. T., Chavally-Mis, B., Herbage, D., Eastwood, M., and Brown, R. A. *Wound Repair and Regeneration : Official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 8 (2000) 226-237.
- [139] Bartouilh de Taillac, L., Fricain, J. C., Barthe, N., Brouillaud, B., Labrugere, C., Bareille, R., Baquey, C., and Porte-Durrieu, M. C. *Les cahiers de l'ADF* 16-17 (2004) 18-25.
- [140] Bartouilh de Taillac, L., Porte-Durrieu, M. C., Labrugere, C., Bareille, R., Amedee, J., and Baquey, C. *Composites Science and Technology* 64 (2004) 827-837.
- [141] Shriver-Lake, L. C., Donner, B., Edelstein, R., Breslin, K., Bhatia, S. K., and Ligler, F. S. *Biosensors and Bioelectronics* 12 (1997) 1101-1106.

- [142] Elbert, D. L., and Hubbell, J. A. *Biomacromolecules* 2 (2001) 430-441.
- [143] Simon, A., Cohen-Bouhacina, T., Porte, M. C., Aime, J. P., and Baquey, C. *Journal of Colloid and Interface Science* 251 (2002) 278-283.
- [144] Cho, J., and Choi, M. *Journal of Aerosol Science* 31 (2000) 1077-1095.
- [145] de Boer, G. B. J., de Weerd, C., Thoenes, D., and Goossens, H. W. J. *Particle Characterization* 4 (1987) 14-19.
- [146] Washburn, E. W. *Physical Review* 17 (1921) 273-283.
- [147] Jokisch, D. W., Patton, P. W., Rajon, D. A., Inglis, B. A., and Bolch, W. E. *Medical Physics* 28 (2001) 1493-1504.
- [148] Farber, L., Tardos, G., and Michaels, J. N. *Powder Technology* 132 (2003) 57-63.
- [149] Roberts, A. P., and Torquato, S. *Physical Review E, Statistical Physics, Plasmas, Fluids, And Related Interdisciplinary Topics* 59 (1999) 4953-4963.
- [150] Pothuau, L., Porion, P., Lespessailles, E., Benhamou, C. L., and Levitz, P. *Journal Of Microscopy* 199 (Pt 2) (2000) 149-161.
- [151] Ratner, B. D. *Polymer Science Technology* 34 (1986) 13.
- [152] Barthe, N., Coulon, P., Hennion, C., Ducassou, D., Basse-Cathalinat, B., and Charpak, G. *Journal Of Nuclear Medicine: Official Publication, Society Of Nuclear Medicine* 40 (1999) 868-875.
- [153] Greenwood, F. C., Hunter, W. N., and Glover, J. S. *Biochemical Journal* 89 (1963) 114.
- [154] Albertsson, U., and Samuelson, O. *Analytica Chimica Acta* 27 (1962) 441-446.
- [155] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1951) 265-275.
- [156] Sapan, C. V., Lundblad, R. L., and Price, N. C. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29 (Pt 2) (1999) 99-108.
- [157] Bradford, M. M. *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254.
- [158] Vilamitjana-Amédée, J., Bareille, R., Rouais, F., Caplan, A. E., and Haramand, M. F. *In vitro Cellular Development Biology* 29 (1993) 699-707.
- [159] Parish, C. R., and Mullbacher, A. *Journal of Immunological Methods* 58 (1983) 225-237.
- [160] Mosmann, T. *Journal of Immunological Methods* 65 (1983) 55-63.
- [161] Majeska, R. J., Port, M., and Einhorn, T. A. *Journal of Bone Mineral Research* 8 (1993) 3.
- [162] Landegren, U. *Journal of Immunological Methods* 67 (1984) 379-388.
- [163] Ayuso, C. *Maîtrise*, (1991).
- [164] Ratner, B. D., Castner, D. G., Horbett, T. A., Lenk, T. J., Lewis, K. B., and Rapoza, R. J. *Journal of vacuum science & technology A* 8 (1990) 2306-2317.
- [165] Klason, C., Kubat, J., and Gatenholm, P., *Cellulosics utilization - Research and Rewards in cellulosics Elsevier Applied Science, London and New York* 1989.
- [166] Sing, K. S. W. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 241 (2004) 3-7.
- [167] Boyan, B. D., Hummert, T. W., Dean, D. D., and Schwartz, Z. *Biomaterials* 17 (1996) 137-146.
- [168] Whang, K., Thomas, C. H., Healy, K. E., and Nuber, G. *Polymer* 36 (1995) 837-842.
- [169] Baksh, D., Davies, J. E., and Kim, S. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9 (1998) 743-748.
- [170] Spector, M., Michno, M. J., Smarook, W. H., and Kwiatkowski, G. T. *Journal of Biomedical Materials Research* 12 (1978) 665-677.
- [171] Alfonsetti, R., De Simone, G., Lozzi, L., Passacantando, M., Picozzi, P., and Santucci, S. *Surface and Interface Analysis* 22 (1994) 89-92.

- [172] Briggs, D., High Resolution XPS of Organic Polymers: the Scienta ESCA 300 Database 1992.
- [173] Kahn, F. J. Applied Physics Letters 22 (1973) 386-388.
- [174] Tacke, R., and Linoh, H., The Chemistry of Organic Silicon Compounds 1989.
- [175] Porte-Durrieu, M.-C., Aymes-Chodur, C., Betz, N., Brouillaud, B., Rouais, F., Le Moel, A., and Baquey, C. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 131 (1997) 364-375.
- [176] Vroman, L. Nature 196 (1962) 476-477.
- [177] Gibson, L. J., Ashby, M. F., Schajer, G. S., and Robertson, C. I. (1982). Paper presented at: Proc R Soc Lond.
- [178] Horton, M. A. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 29 (1997) 721-725.
- [179] Tirrell, M., Kokkoli, E., and Biesalski, M. Surface Science 500 (2002) 61-83.
- [180] Walluscheck, K. P., Steinhoff, G., Kelm, S., and Haverich, A. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 12 (1996) 321-330.
- [181] Hersel, U., Dahmen, C., and Kessler, H. Biomaterials 24 (2003) 4385-4415.
- [182] Unger, K. K., Porous silica Amsterdam 1979.
- [183] McConahey, P. J., and Dixon, F. J. Methods in Enzymology 70 (1980) 210-213.

Productions scientifiques résultant de ce travail

Publications

Bartouilh de Taillac L., Pothuaud L., Laurence S., Baquey Ch., "Morphologic characterization of porous cellulosic materials by microcomputed tomography (μ CT) for bone substitution", International Symposium on Advanced Biomaterials /Biomechanics, (2005), accepté.

Bartouilh de Taillac L., Porté-Durrieu M.C, Labrugère Ch., Bareille R., Amédée J., Baquey Ch., "Grafting of RGD peptides to cellulose to enhance human osteoprogenitor cells adhesion and proliferation", *Composites Science and Technology*, (2004), 64 (6), pp 827-837.

Bartouilh de Taillac L., Fricain J.C., Barthe N, Brouillaud B, Labrugere Ch., Bareille R., Baquey Ch., Porte-Durrieu M.C., "Validation du concept de matériaux hybrides à base de cellulose macroporeuse - Application à l'odontologie", *Les cahiers de l'ADF*, (2004), 16-17, pp 18-25.

Proceedings

Bartouilh de Taillac L., Bareille R., Amédée J., Baquey Ch., Porté M.-C., "Développement d'un nouveau dispositif de comblement osseux - greffage de peptides d'adhésion sur cellulose", Journées d'Etude sur l'Adhésion 2001, SFV ed. (2001) pp. 125-129.

Bartouilh de Taillac L., Labrugère C., Bareille R., Amédée J., Fricain J.-C., Baquey Ch., Porté M.-C., "Elaboration d'un dispositif de comblement osseux par greffage de peptides d'adhésion sur cellulose", Matériaux 2002 : de la conception à la mise en œuvre, 21-25 Octobre 2002, Tours, France.

Communications orales

Bartouilh de Taillac L., Pothuau L., Laurence S., Baquey Ch., "Morphologic characterization of porous cellulosic materials by microcomputed tomography (μ CT) for bone substitution", International Symposium on Advanced Biomaterials /Biomechanics, (2004), 3-6 avril 2005, Montréal, Québec, Canada.

Bartouilh de Taillac L., Bareille R., Amédée J., Baquey Ch., Porté M.C., "Modification de surface de cellulose régénérée par procédé viscosse (CRV[®]) par greffage de peptides d'adhésion pour la réalisation d'un dispositif de comblement osseux" - 11^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, 5 et 6 Juin 2001, Compiègne, France (*Communication orale et Communication affichée*).

Bartouilh de Taillac L., Labrugère Ch., Amédée J., Bareille R., Fricain J.C., Fortin F., Baquey Ch., Porté M.C., "Human osteoblasts interaction with adhesion peptides grafted onto cellulose", 17th European Conference on Biomaterials, 11-14 Septembre 2002, Barcelone, Espagne.

Bartouilh de Taillac L., Labrugère C., Bareille R., Amédée J., Fricain J.-C., Baquey Ch., Porté M.-C., "Elaboration d'un dispositif de comblement osseux par greffage de peptides d'adhésion sur cellulose", Matériaux 2002 : de la conception à la mise en œuvre, 21-25 Octobre 2002, Tours, France.

Bartouilh de Taillac L., Porté M.C., Bareille R., Amédée J., Barthe N., Brouillaud B., Labrugère C., Baquey Ch., "Greffage de peptides d'adhésion en surface de cellulose : caractérisation physico-chimique par XPS et imagerie β haute résolution – Etude de l'adhésion d'ostéoprogéniteurs humains" - 12^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, 21-22-23 mai 2003, Nantes, France (*Communication orale et Communication affichée*).

Bartouilh de Taillac L., Fricain J.C., Barthe N, Brouillaud B, Labrugere Ch., Bareille R., Baquey Ch., Porte-Durrieu M.C., "Validation du concept de matériaux hybrides à base de cellulose macroporeuse - Application à l'odontologie", Le congrès de l'ADF, novembre 2003, Paris, France.

Communications affichées

Bartouilh de Taillac L., Bareille R., Amédée J., Baquey Ch., Porté M.C., "Modification de surface de cellulose régénérée par procédé viscosse (CRV[®]) par greffage de peptides d'adhésion pour la réalisation d'un dispositif de comblement osseux" - 11^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, 5 et 6 Juin 2001 – Compiègne, France (*Communication orale et Communication affichée*).

Bartouilh de Taillac L., Bareille R., Amédée J., Baquey Ch., Porté M.-C., "Développement d'un nouveau dispositif de comblement osseux - greffage de peptides d'adhésion sur cellulose", 11^{ème} Journées d'étude sur l'adhésion, 8-12 Octobre 2001 – Lège - Cap Ferret, France (*prix du meilleur Poster*).

Bartouilh de Taillac L., Porté M.-C., Bareille R., Amédée J., Labrugère Ch., Fortin F., Baquey Ch., "Development of a new generation of bone substitute – Covalent immobilization of the active peptides onto cellulose", Society for Biomaterials, 24-27 Avril 2002, Tampa, Floride, Etatas Unis (*Communication affichée*).

Bartouilh de Taillac L., Porté M.C., Bareille R., Amédée J., Baquey Ch., "Greffage de peptides d'adhésion en surface de cellulose : caractérisation physico-chimique par XPS et imagerie β haute résolution – Etude de l'adhésion d'ostéoprogéniteurs humains" - 12^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, 21-22-23 mai 2003 – Nantes, France (*Communication orale et Communication affichée*).

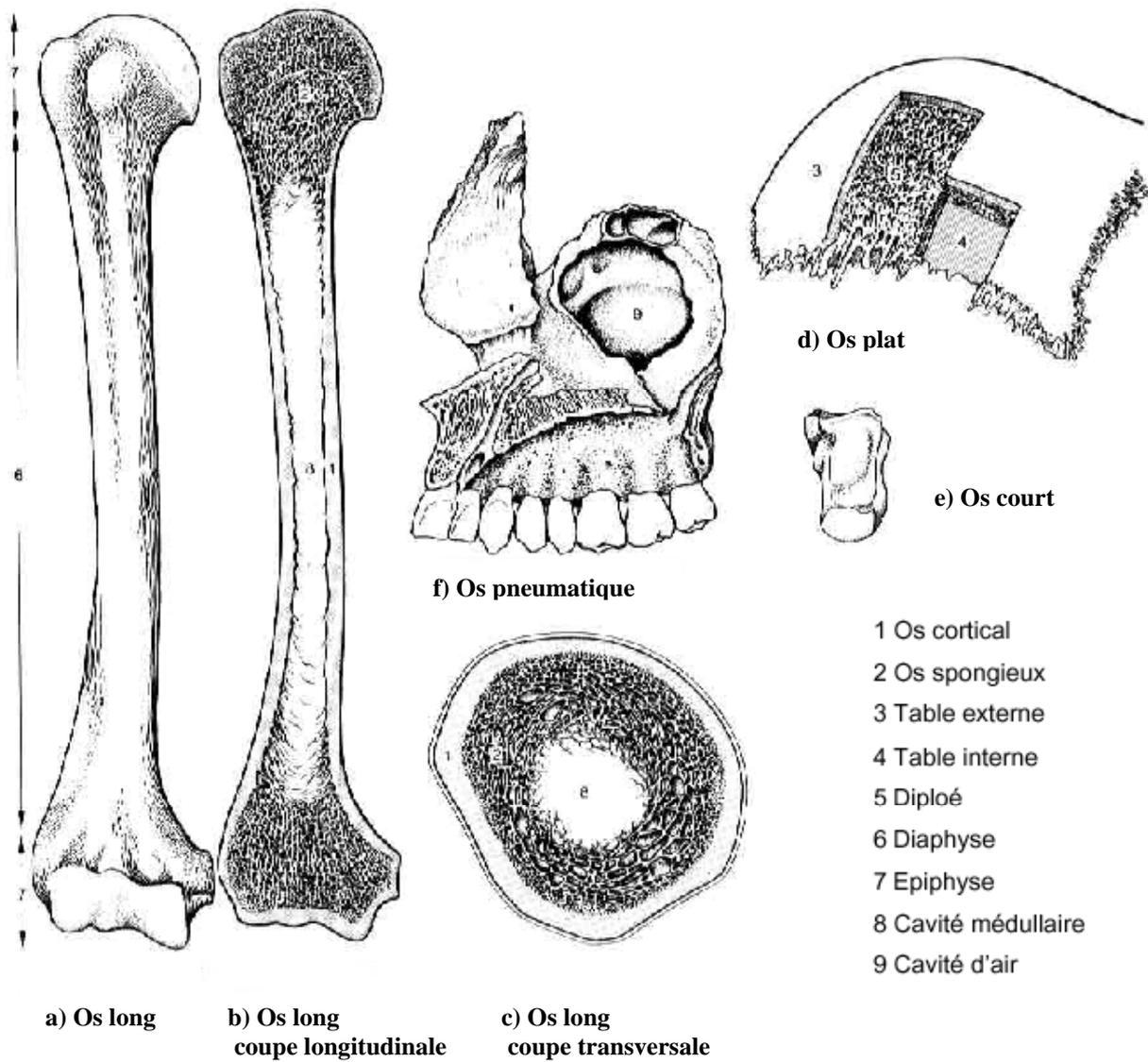


Figure 1 : Organisation structurale des os d'après Cabrol {Cabrol, 1995 #143}.

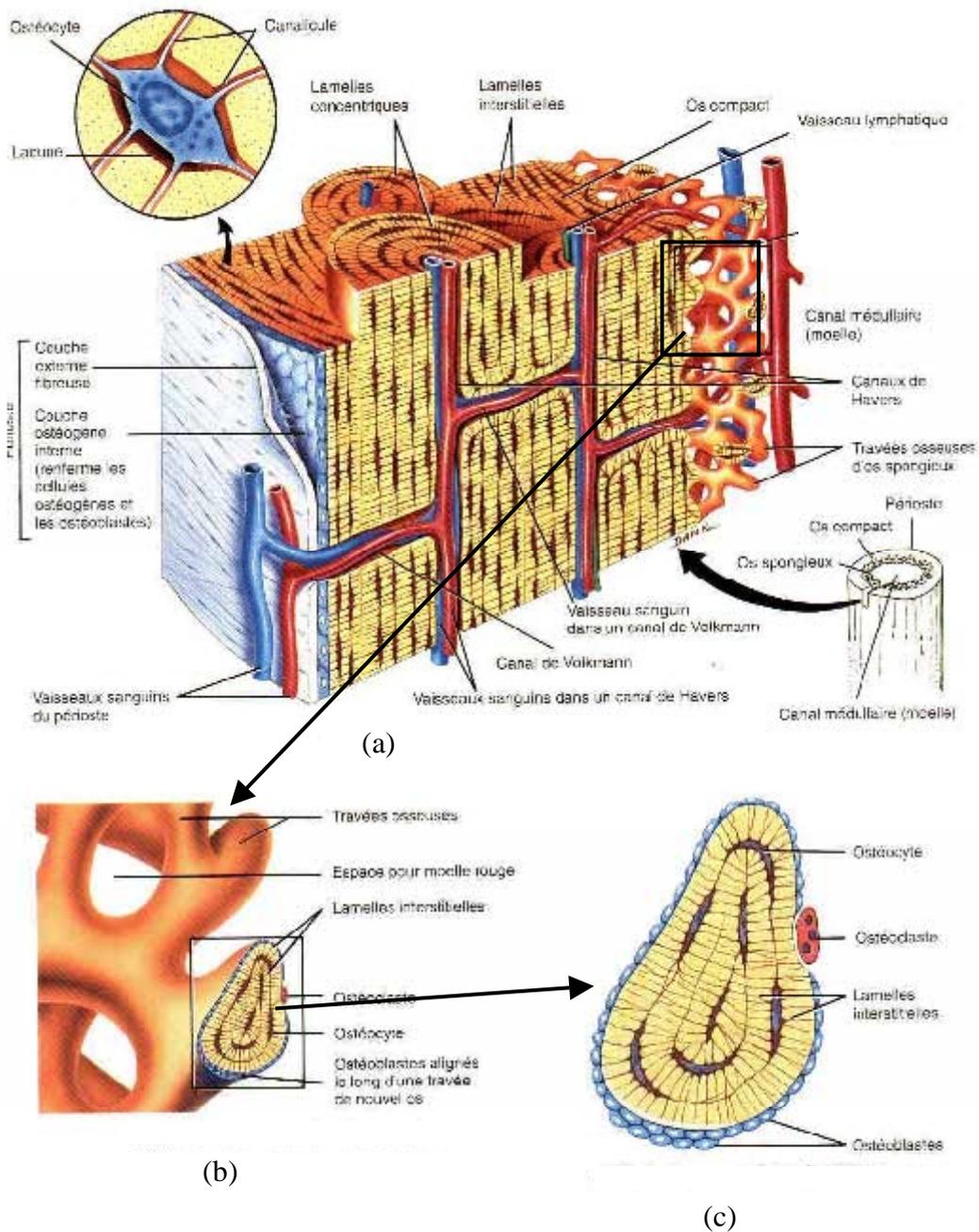


Figure 2 : Schéma de l'os cortical et spongieux. Système de Havers d'après Grabowski {Grabowski, 1994 #144}.

- a) agrandissement de plusieurs ostéons (système de Havers) de l'os compact ;
- b) Agrandissement de travées d'os spongieux. Par souci de clarté, un seul ostéon est représenté par travée sur la figure b), qui en comporte normalement plusieurs accolés.
- c) Détails d'une coupe de travée osseuse.

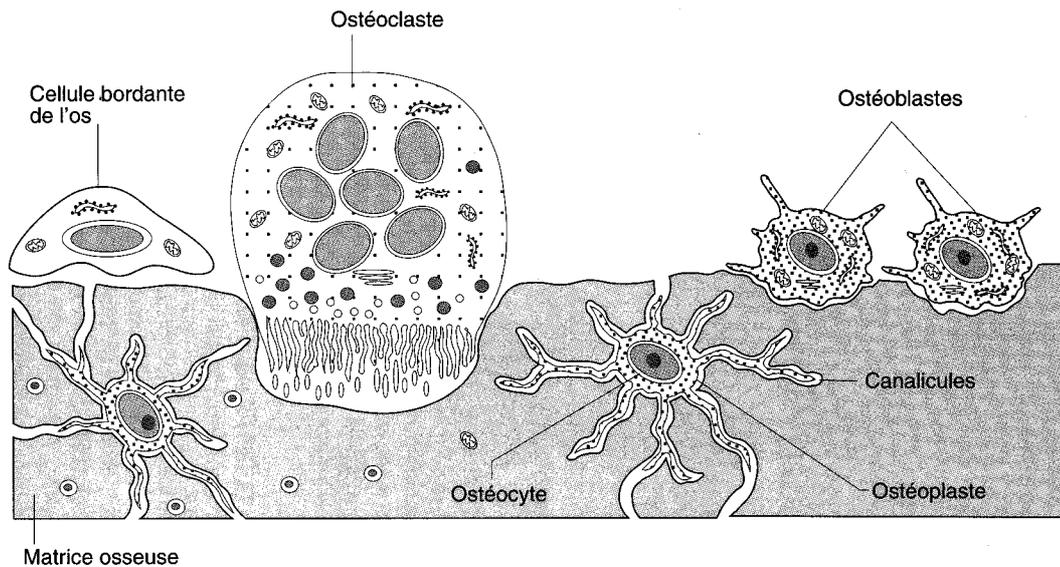


Figure 3 : Les différentes cellules du tissu osseux.

Ce dessin représentant une travée montre les quatre types de cellules osseuses. On peut voir un ostéoblaste, un ostéocyte qui est situé dans sa lacune, un ostéoclaste et une cellule bordante.

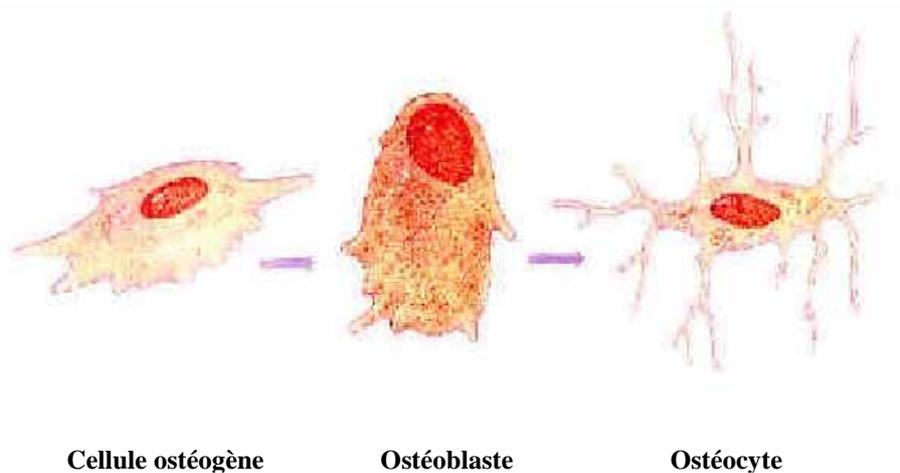


Figure 4 : Les cellules de l'os trabéculaire d'après Gibson {Gibson, 82 #147; Gibson, 82 #148} : la cellule ostéogène qui se différencie en ostéoblaste qui se différencie lui même en ostéocyte.

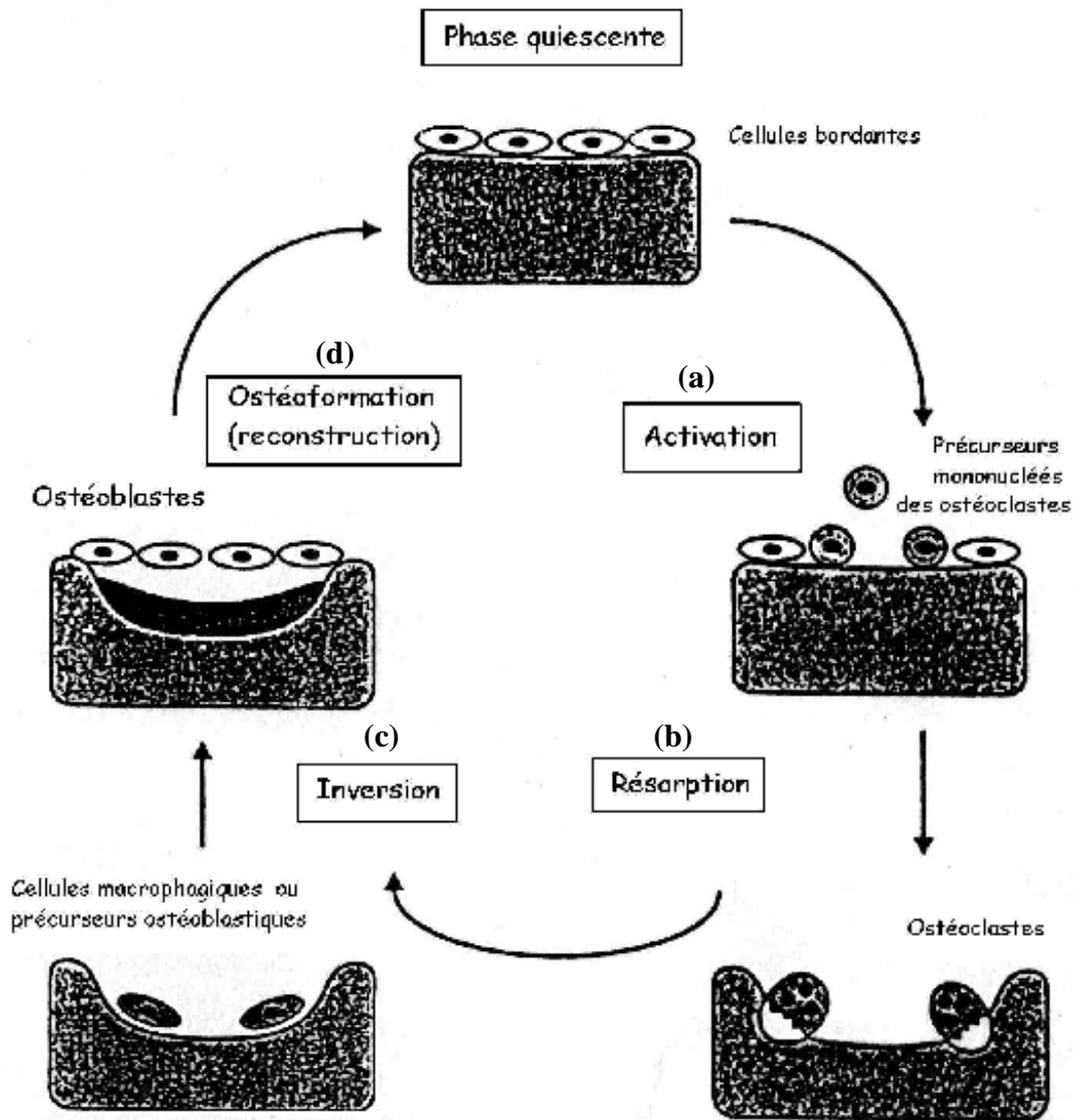


Figure 5 : Le remodelage osseux se déroule de façon cyclique en quatre phases (d'après Cowin {Cowin, 1986 #149}) :

- Une phase d'activation : le long de la surface osseuse inactive recouverte de cellules bordantes, ou d'ostéoblastes, surviennent les précurseurs mononucléés des ostéoclastes.
- Une phase de résorption : l'os ancien est résorbé par les ostéoclastes.
- Une phase d'inversion : les ostéoclastes sont remplacés par des cellules mononucléées.
- Une phase de reconstruction (ostéoformation) : les ostéoblastes colonisent la lacune et la combent en apposant une nouvelle matrice osseuse. Durant cette dernière phase, certains ostéoblastes restent enfermés dans la matrice nouvellement formée et deviennent alors des ostéocytes.

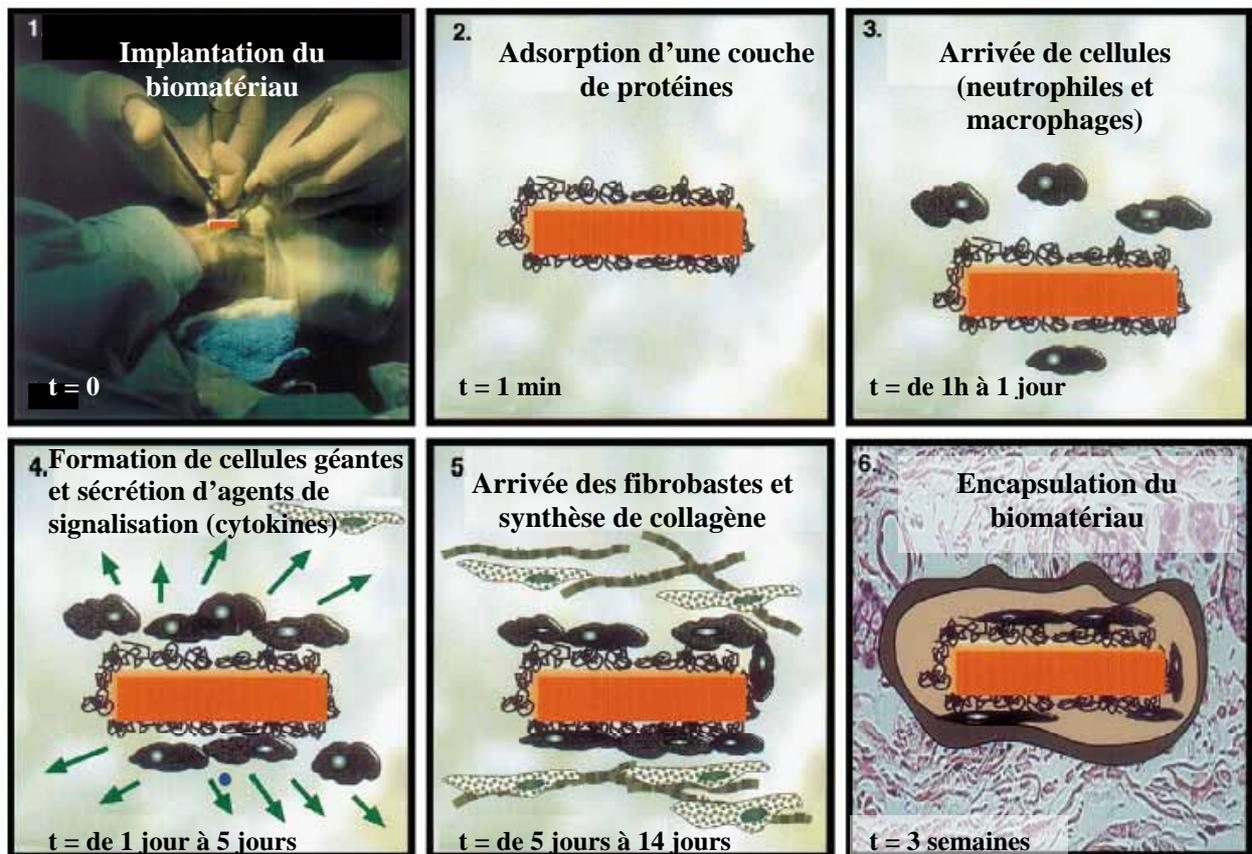


Figure 6 : Illustration de la réaction de l'organisme lors de l'implantation d'un corps étrangers.

- 1) Le chirurgien implante un biomatériau dans un site chirurgical.
- 2) Rapidement, l'implant adsorbe une couche de protéines, processus normal pour une surface de solide immergée dans des fluides biologiques.
- 3) Des cellules, neutrophiles et macrophages, interrogent et "attaquent l'envahisseur", c'est-à-dire le biomatériau.
- 4) Quand les macrophages ne peuvent pas digérer le corps étranger, ils fusionnent en cellules géantes pour ingérer l'objet. Cependant, si celui-ci est trop grand pour une complète ingestion, les cellules géantes envoient alors des messagers chimiques, les cytokines, pour appeler d'autres cellules.
- 5) Les fibroblastes arrivent et commencent à synthétiser du collagène.
- 6) L'implant est complètement enveloppé dans une enveloppe de collagène acellulaire et non vasculaire. Entre l'enveloppe de collagène et l'implant se trouvent des macrophages. D'après Castner {Castner, 2002 #267}.



Figure 7 : Biomatériaux d'hydroxyapatite.

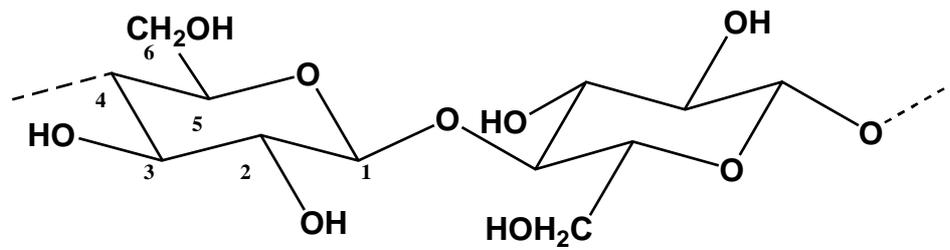


Figure 8 : Schématisation de la formule générale de la cellulose.

Application	Cellulose ou dérivé de cellulose
Purification du sang : hémodialyse, hémofiltration, séparation plasma, leucodéplétion (membranes ou fibres creuses) – parmi les plus larges applications de polymère en thérapie	Cellulose régénérée (cellophane [®] , cuprophane [®] , CA, CDA, CTA)
Contact avec le sang du à des propriétés antithrombogénique et à une activité anticoagulante (sutures, gazes, compresses)	NaCS, CMC
Hémostase (matériaux résorbables)	Cellulose oxydée (Surgicel [®]), CS
Traitement des lithiases rénales	NaCP
Activité anti-tumeur	MC, CMC, CA
Matériau de support pour l'immobilisation de composés biologiquement actifs : anticorps et enzymes (catalyseur, isolation de substances pures)	CMC, CP
Agent anti-bactérien pour les instruments chirurgicaux stériles	Cellulose couplée avec des ions métalliques
Formes galéniques (solutions, suspensions, agent de suspension, liant, capsules, cachets et comprimés)	MCC, MC, EC, CMC, NaCMC, CMC, CAP, CAB, HPC, HEC, HPMC
Vecteur de médicament (relargage lent de médicament,...)	
Produits pour applications locales (pommades, crèmes)	CAP, HPC, HEC, CMC, cellulose oxydée, CAB, HPMC
Produits ophtalmologiques (lentilles de contact, collyres)	MC, HEC, HMC, CMC
	CAB, MC, HPMC

Tableau 1 : Exemples d'applications biomédicales de la cellulose et de ses dérivés {Ikada, 1989 #62}{Reveley, 1985 #287}{Dumitriu, 1996 #309}{Franz, 1986 #302}.

CA : cellulose acetate ; CAB : cellulose acetate butyrate ; CAP : cellulose acetate propionate ; CDA : cellulose diacetate ; CMC : carboxymethyl cellulose ; CS : cellulose sulfate ; CTA : cellulose triacetate ; EC : ethylcellulose ; HEC : hydroxyethylcellulose ; HMC : hydroxymethylcellulose ; HPC : hydroxypropylcellulose ; HPMC : hydroxypropylmethylcellulose ; MC : methylcellulose ; MCC : microcristalline cellulose ; NaCMC : sodium carboxymethylcellulose ; NaCP : sodium cellulose phosphate ; NaCS : sodium cellulose sulfate.

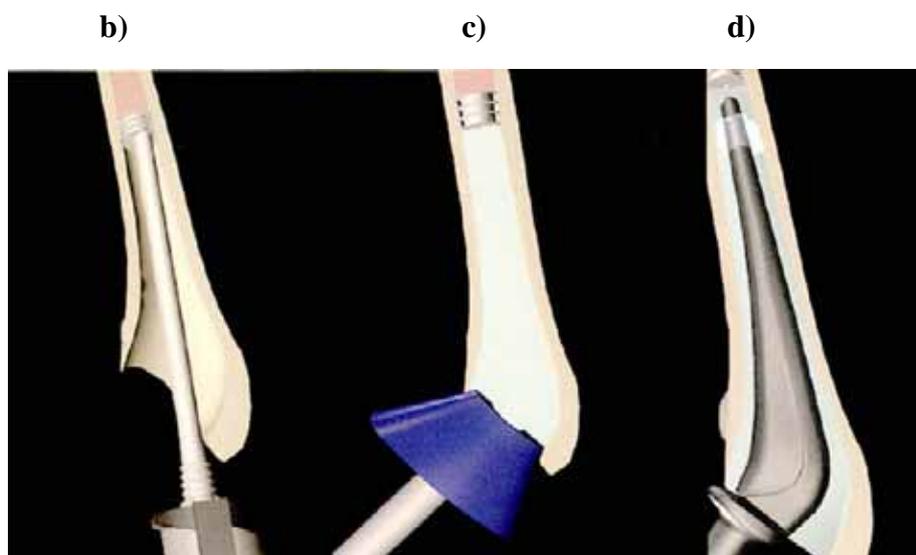


Figure 9 : Mise en place d'un bouchon diaphysaire (ou obturateur fémoral) lors de la pose d'une prothèse totale de hanche.

- a) Curetage de l'os fémoral pour la pose de la prothèse.
- b) Mise en place du bouchon diaphysaire à l'aide d'un outil adapté.
- c) Coulage de ciment acrylique pour le scellement de la prothèse.
- d) Mise en place de la prothèse totale de hanche dans le fémur.

	CRV	Os Cortical	Ciment Acrylique (a)
Masse volumique (g.cm⁻³)	1.45	1.86	1.084
Module de Young ^(b) (GPa)	16.7 ± 0.3	23.4 ± 0.3 ^(c)	5.7 ± 0.2
Contrainte maximale (MPa)			
Traction	16 ± 1	-	-
Compression	17 ± 1.5	180	85
Flexion ^(d)	24 ± 5	-	-
Cisaillement	11 ± 0.3	-	-
Mode de rupture	propagation lente de la rupture	rupture fragile	rupture fragile

Tableau 2 : Propriétés physiques comparées de CRV, d'os cortical et de ciment acrylique.

a : SIMPLEX P de HOWMEDICA, b : Déterminations par méthode ultrasonore, c : suivant la direction longitudinale, d : technique de flexion 3 points {Poustis, 1994 #1; Baquey, 1992 #8}.

a) Modèle de KELVIN-VOIGT

Association en parallèle :

$$\sigma = \sigma_1 + \sigma_2$$

$$\varepsilon = \varepsilon_1 = \varepsilon_2$$

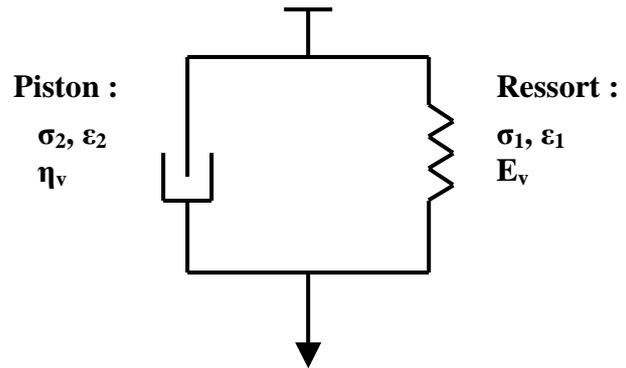
E_v : module d'élasticité

η_v : viscosité

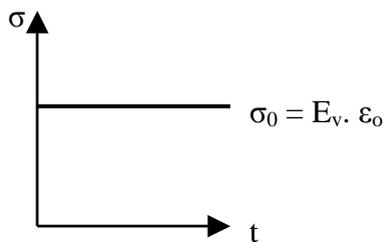
σ_1, σ_2 : contrainte

$\varepsilon_1, \varepsilon_2$: déformation

à $t = 0$, $\varepsilon = \varepsilon_0$ et $\sigma = \sigma_0$

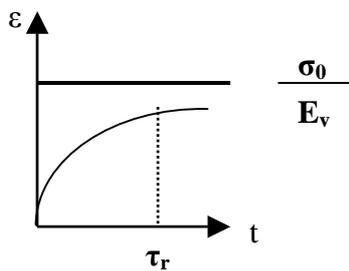


Relaxation : $\varepsilon = \varepsilon_0$ et $\sigma = E_v \cdot \varepsilon_0$



Solide élastique : le ressort tient l'ensemble comme si le piston n'intervenait pas.

Fluage : $\sigma = \sigma_0$ et $\varepsilon(t) = \frac{\sigma_0}{E_v} \times [1 - \exp((-E_v/\eta_v) \cdot t)]$



(temps de retardation)

Le piston guide le fluage mais il est ralenti par le ressort qui ne peut plus se déformer au delà de la limite σ_0/E_v .

b) Modèle de MAXWELL

Association en série :

$$\varepsilon = \varepsilon_1 + \varepsilon_2$$

$$\sigma = \sigma_1 = \sigma_2$$

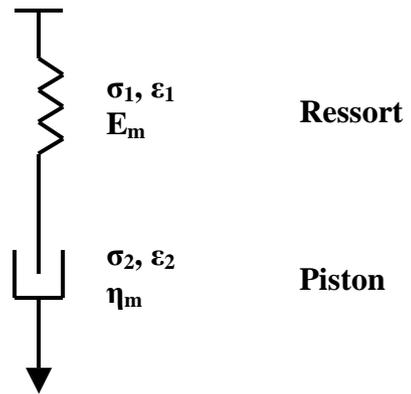
E_m : module d'élasticité

η_m : viscosité

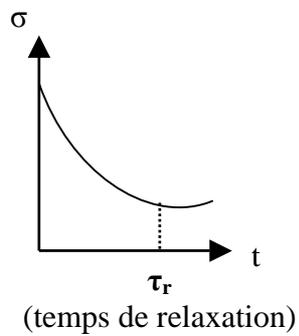
σ_1, σ_2 : contrainte

$\varepsilon_1, \varepsilon_2$: déformation

à $t = 0, \varepsilon = \varepsilon_0$ et $\sigma = \sigma_0$

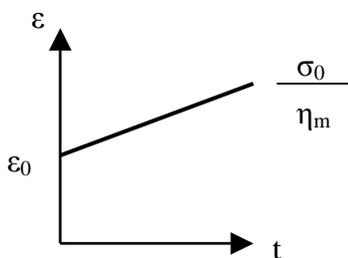
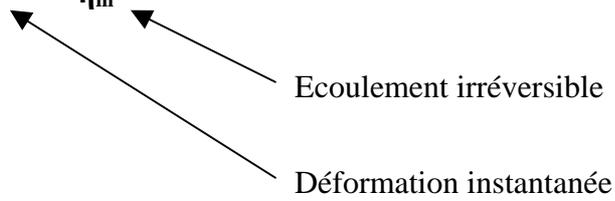


Relaxation : $\varepsilon = \varepsilon_0$ et $\sigma(t) = \sigma_0 \times \exp [(-E_m/\eta_m).t]$



Relaxation de contrainte $\tau = \eta_m/E_m$.

Fluage : $\sigma = \sigma_0$ et $\varepsilon(t) = \varepsilon_0 + \frac{\sigma_0}{\eta_m} .t$



Liquide visqueux.

Figure 10 : a) Modèle de KELVIN-VOIGT ; b)Modèle de MAXWELL.

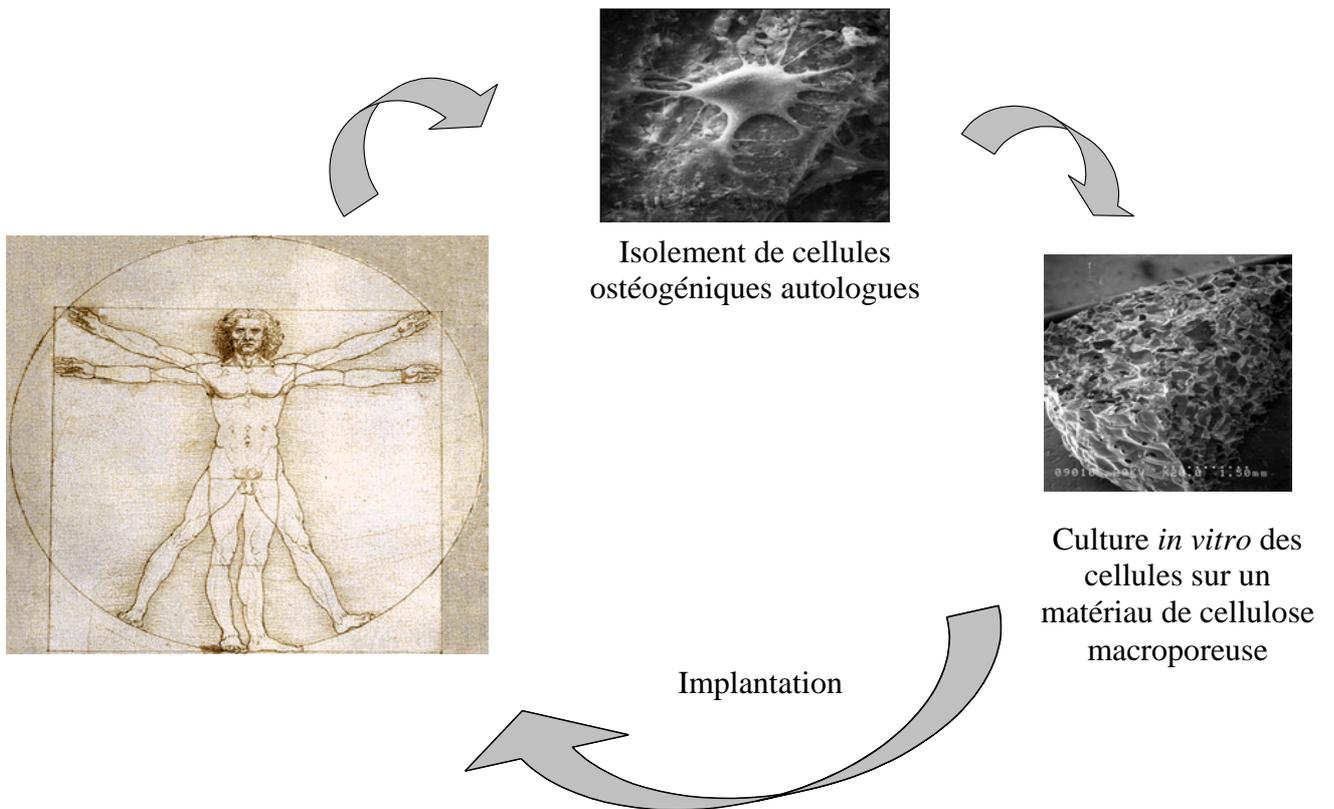


Figure 11 : Principe du matériau hybride :
Prélèvement de cellules ostéogéniques autologues chez l'Homme.
Mise en culture sur un matériau de cellulose macroporeuse.
Implantation pour combler le défaut osseux.

Revêtements par voie humide ou par voie sèche :

Le matériau d'apport ne réagit pas avec le substrat et n'y diffuse pas ou très peu.

- Projection thermique : le matériau d'apport est projeté à l'état liquide ou pâteux sur une surface (projection plasma d'HA, arc électrique...).
- Dépôts chimiques en phase vapeur : mise en contact avec le substrat chauffé de composés volatils des éléments constitutifs du revêtement à former.
- Dépôts physiques en phase vapeur : le matériau d'apport est évaporé, ou sublimé, ou pulvérisé sur une surface (évaporation sous vide, dépôt ionique, pulvérisation cathodique).

Traitements de conversion :

- Oxydation anodique.
- Greffage chimique (silanisation, greffage de molécules biologiques...) {Kobayashi, 2001 #367; Pope, 1993 #10}.
- Radiogreffage par rayonnement γ {Chamberlain, 1999 #414}.

Traitements de diffusion :

Le matériau d'apport diffuse dans le substrat et réagit ou non avec lui.

- Diffusion des métaux et des métalloïdes.
- Implantation ionique : des ions sont accélérés dans le vide pour être injectés dans la surface du substrat à traiter. Ils sont arrêtés en perdant leur énergie par collision avec les atomes de ce dernier.

Traitements par transformation structurale :

Il n'y a pas de matériau d'apport, la structure superficielle du substrat est modifiée.

- Fusion et trempe superficielle des métaux (laser).
- Traitements mécaniques des métaux (durcissement par chocs).

HA : Hydroxyapatite

Tableau 3 : Traitements de surface.

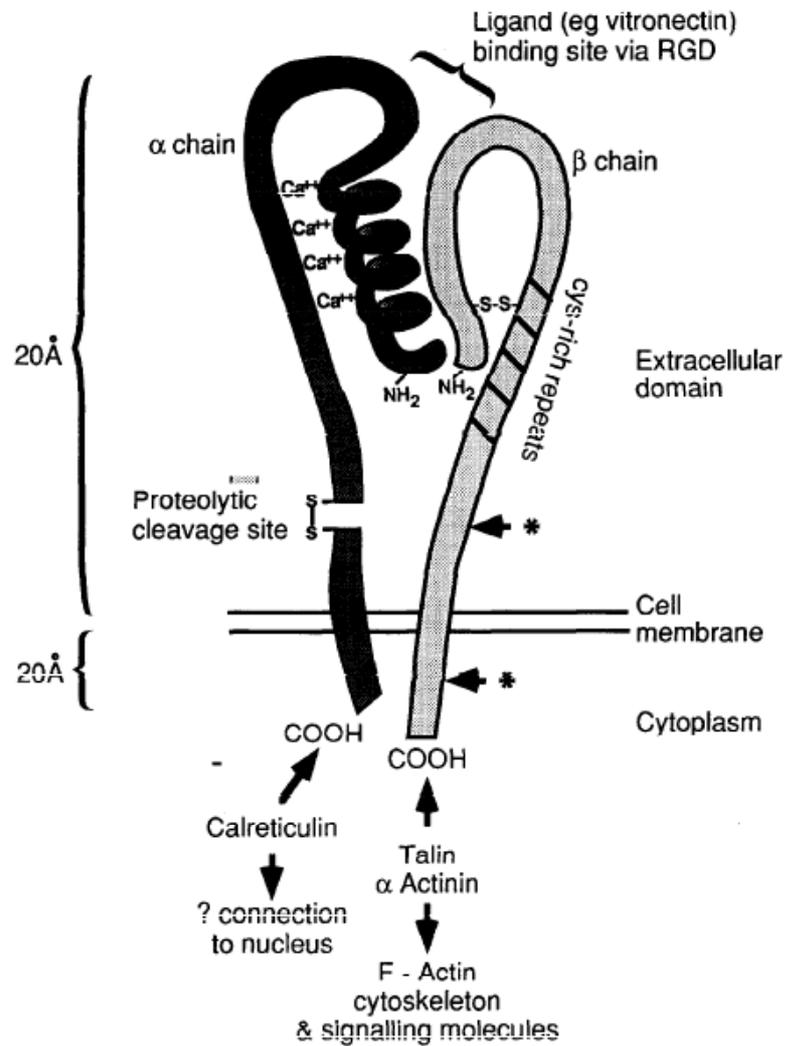


Figure 12 : Représentation schématique d'une intégrine typique d'après Horton {Horton, 1997 #387}. La liaison du ligand contenant la séquence RGD à la surface de la cellule est réalisée par l'intermédiaire des récepteurs de l'adhésion cellulaire (les intégrines). Les intégrines sont des hétérodimères constitués de deux sous unités α et β liés de manière non covalente.

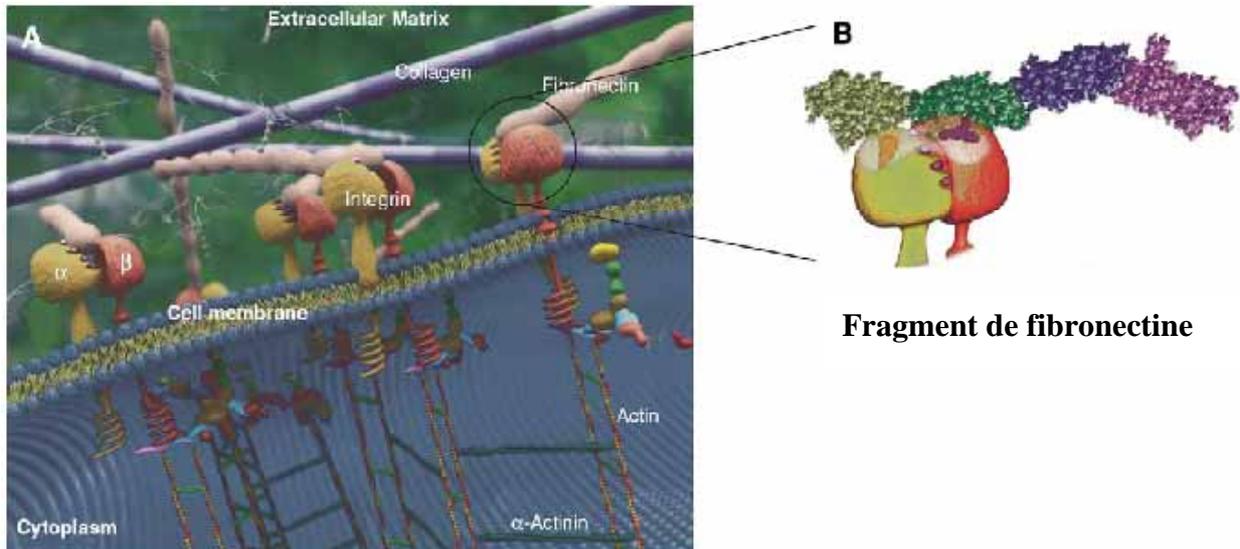


Figure 13 : A) Les intégrines, composés de deux sous-unités α et β , jouent un rôle important dans l'attachement cellulaire en formant une liaison entre les protéines de la matrice extra cellulaire (MEC) d'une part, et les éléments du cytosquelette de la cellule d'autre part.

B) Les intégrines lient les domaines d'adhésion des protéines de la MEC par reconnaissances spécifiques de ces sites. La séquence RGD, présente dans la fibronectine et dans beaucoup d'autres protéines d'adhésion cellulaire, est l'unité fonctionnelle minimum permettant la conservation de l'activité d'attachement des cellules (d'après Tirell {Tirrell, 2002 #268}).

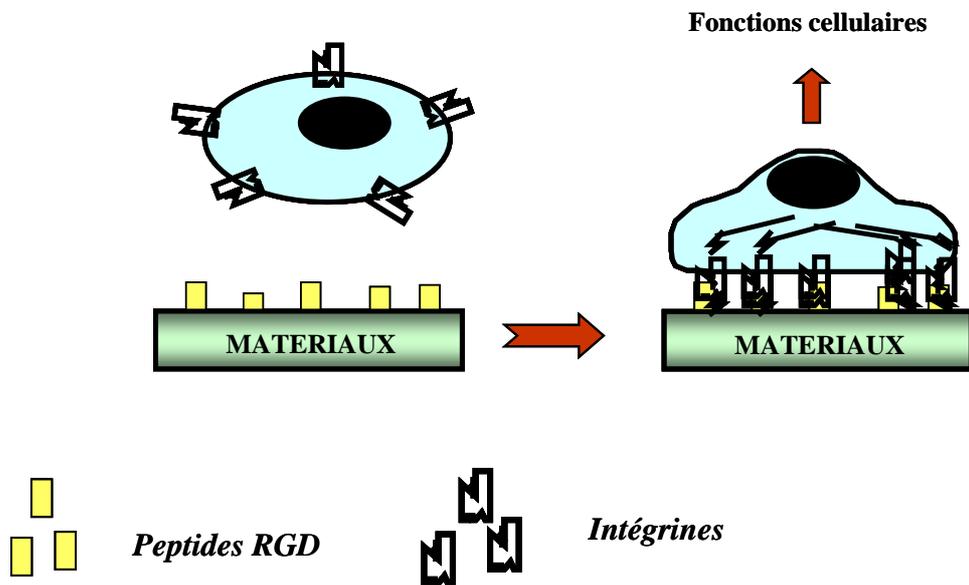


Figure 14 : Schématisation des réactions biochimiques entre la cellule osseuse et les peptides contenant une séquence RGD d'après Walluscheck {Walluscheck, 1996 #191}. La cellule endothéliale intéragit par l'intermédiaire des récepteurs de la matrice cellulaire avec la séquence RGD et ainsi adhère au polymère substrat.

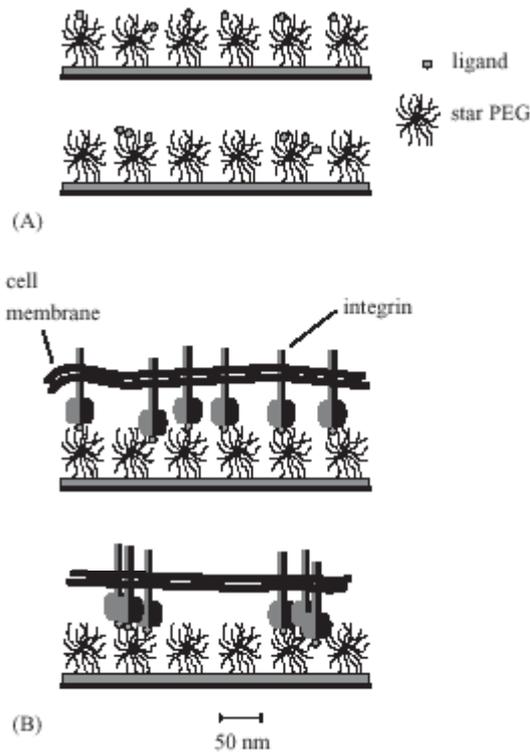


Figure 15 : Illustration schématique de polymère présentant des séquences RGD pour l'adhésion cellulaire.

- (A) Une même quantité de ligand est présentée dans des microdistributions différentes.
- (B) La distribution différente de ligands est attribuée à une distribution différente des intégrines à la surface membranaires de la cellule (d'après Hersel {Hersel, 2003 #366}).

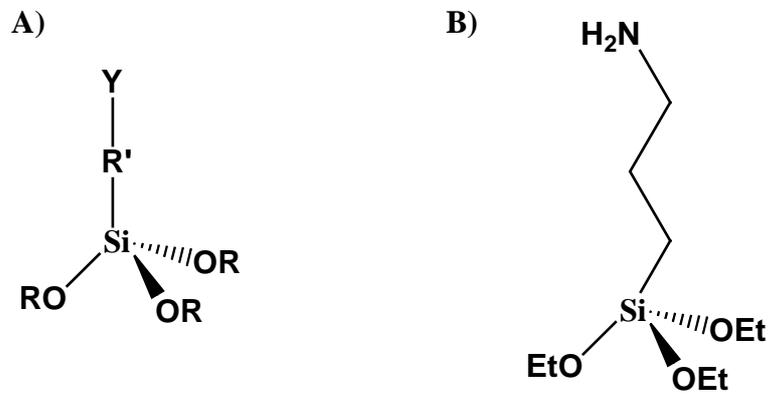


Figure 16 : Structures des molécules de silanes greffées.

A) Organosilane. R : radical organique ; Y : groupement facilement hydroxylable.

B) 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES).

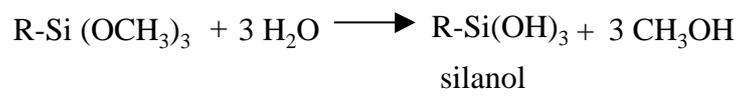


Figure 17 : Réaction d'hydrolyse d'un silane.

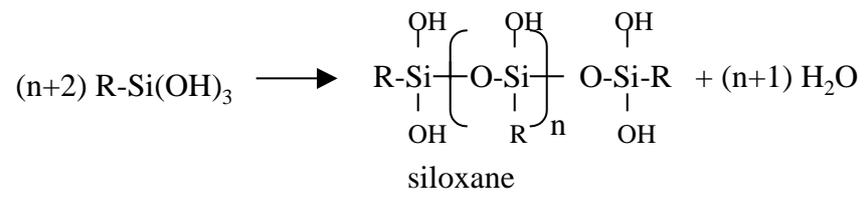


Figure 18 : Réaction de condensation d'un silane.

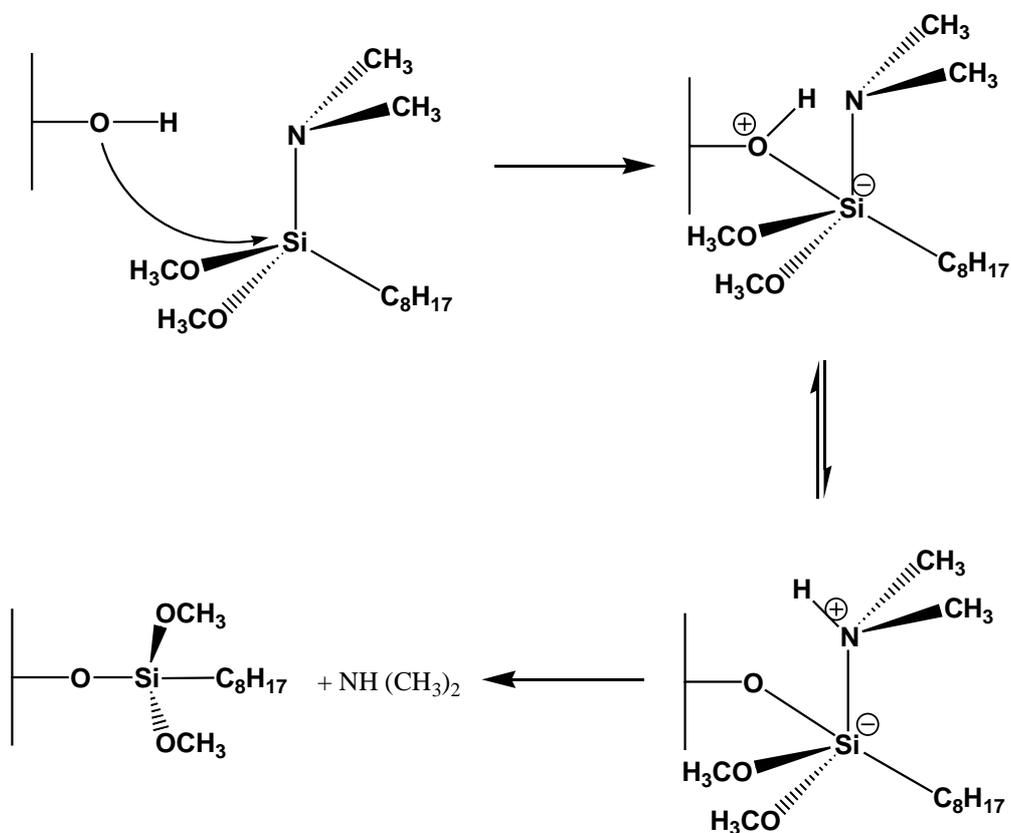


Figure 19 : Mécanisme proposé par une attaque nucléophile du groupement -OH faisant intervenir le silicium de l'organosilane dans un état de transition pentavalent, ce qui entraîne la migration du proton du groupe hydroxyle sur l'atome d'azote (d'après Unger {Unger, 1979 #223}).

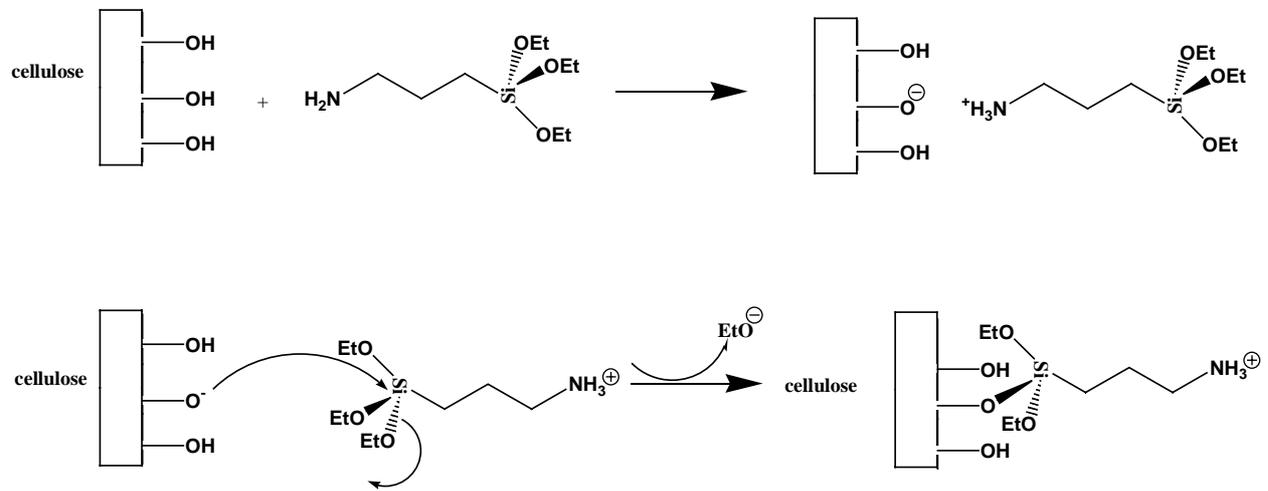


Figure 20 : Réaction de condensation entre une molécule d'APTES et la surface de cellulose dans un solvant anhydre.

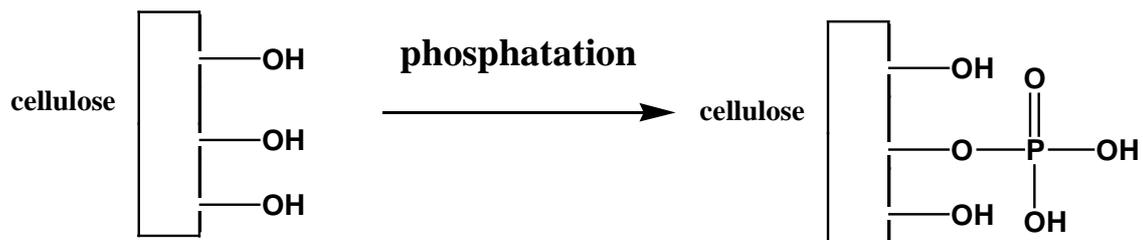


Figure 21 : Estérification d'une fonction -OH par l'acide phosphorique. Structure de la cellulose phosphatée.

Dérivés de phosphate de cellulose	Abréviation	CAS
Phosphate de cellulose ou phosphocellulose	CP	9015-14-9
Phosphate d'acétate de cellulose	CAPh	9032-33-1
Phosphate de chloroéthyle de cellulose	CCP	77137-53-2
Phosphate de diéthyl de cellulose	CDP	60800-51-3
Sel de Ba de phosphate de cellulose	BaCP	37264-85-0
Sel de Be de phosphate de cellulose	BeCP	37264-86-1
Sel de Ca de phosphate de cellulose	CaCP	9038-39-5
Sel de Cu de phosphate de cellulose	CuCP	37264-87-2
Sel de Mg de phosphate de cellulose	MgCP	37264-89-4
Sel de Na de phosphate de cellulose	NaCP	9038-41-9
Sel de NH ₃ de phosphate de cellulose	AmCP	9038-38-4
Sel de Ni de phosphate de cellulose	NiCP	37264-90-7
Sel de Pb de phosphate de cellulose	PbCP	37264-88-3
Phosphonate de cellulose	-	37264-91-8
Phosphonate de cellulose de NH ₃	-	54992-03-9
Glucose 6-phosphate	-	15209-11-7

Tableau 4 : Numéros du registre du Chemical Abstract des dérivés de cellulose et de leurs sels.

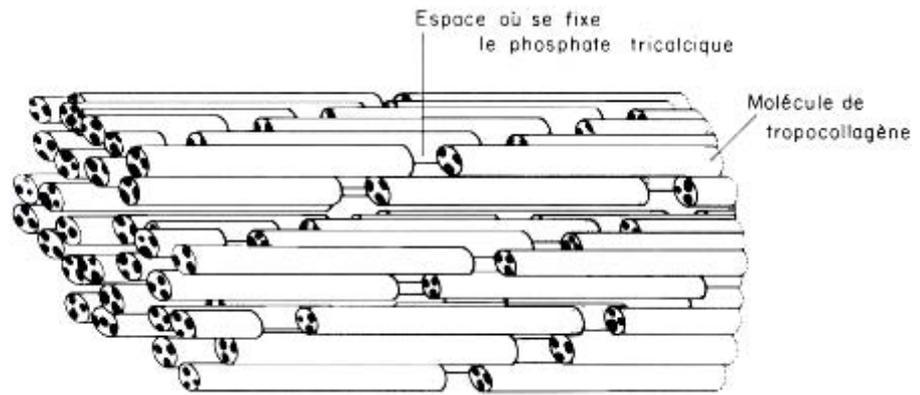


Figure 22 : Dépôt de calcaire dans les molécules de tropocollagène.

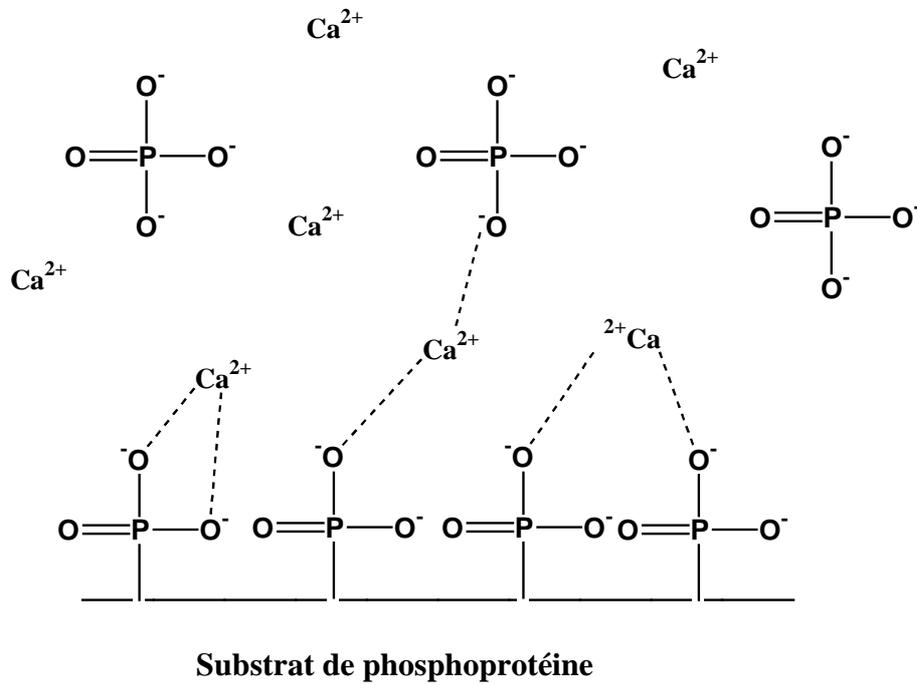


Figure 23 : Mécanisme de la formation d'hydroxyapatite sur un substrat de phosphoprotéine immergé dans une solution physiologique contenant des ions calcium et phosphate.

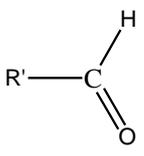
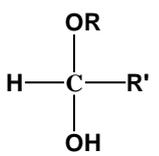
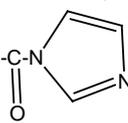
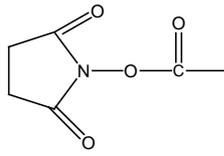
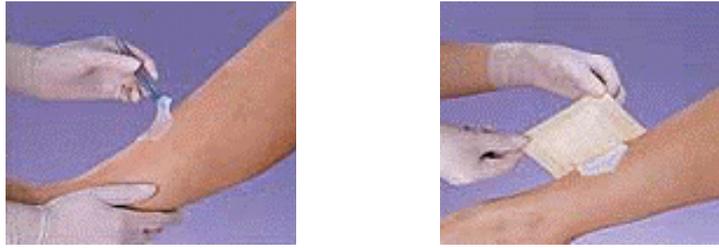
Agent chimique de réticulation	Groupe réactif de l'agent de réticulation	Groupe cible sur la protéine	Liaison de réticulation sur une protéine
Aldéhyde Ex : glutaraldéhyde, polysaccharides oxydés comme la cellulose		R-NH ₂	Liaison imine R-N=CH-R'
		R-OH	Liaison héli-acétal 
-azide d'acide -imidazole -succinimidyl	-CO-N ₃  	-NH ₂	Liaison amide -CO-NH-
-acide activé -azide d'acide -halogénure d'acide	-COOH -CO-N ₃ -COX avec X = -Cl -Br -I	-OH	Liaison ester -CO-O-
Isocyanate Ex : hexaméthylène diisocyanate (HMDIC)	-N=C=O	-NH ₂	Liaison urée -N-CO-N-
		-OH	Liaison urethane -N-CO-O-

Tableau 5 : Liaisons de réticulation sur une protéine et agents de réticulation chimique.

a)



b)

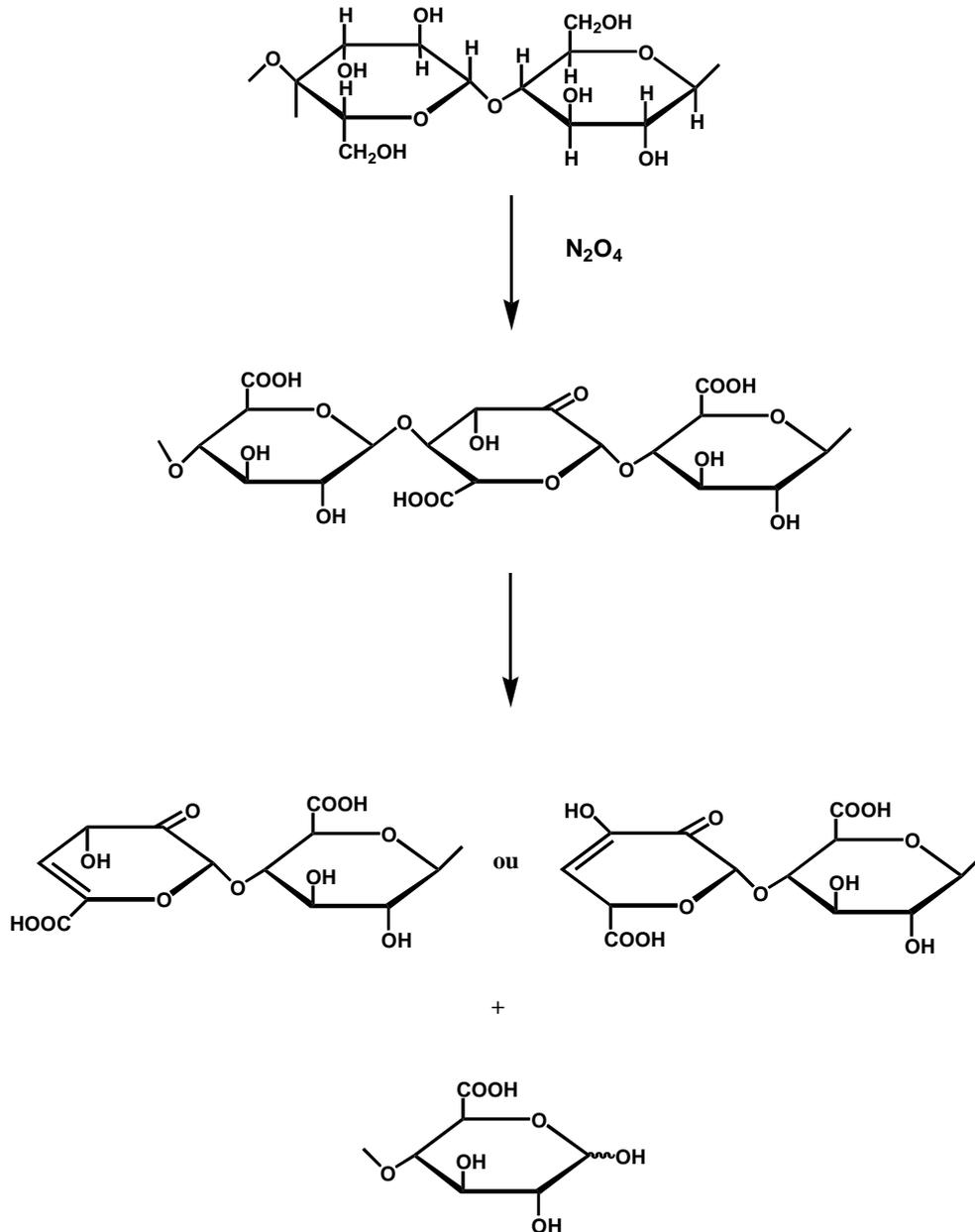
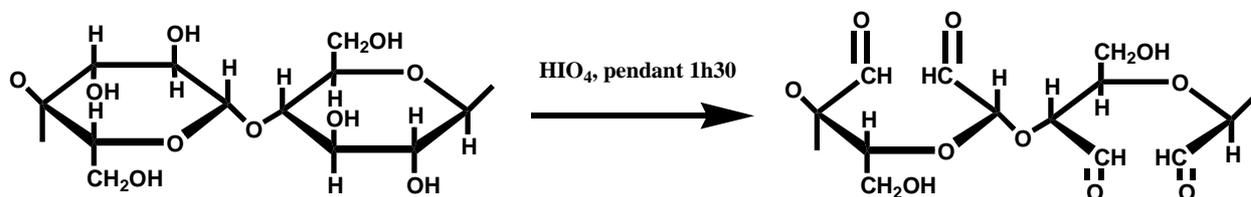


Figure 24 : a) Pansement Promogran[®] de Johnson & Johnson en cellulose régénérée réticulée avec du collagène.

b) Oxydation de la cellulose par le tétraoxyde de nitrogène N_2O_4 d'après Ryden *et al.* {Ryden, 1990 #453}.

a)



b)

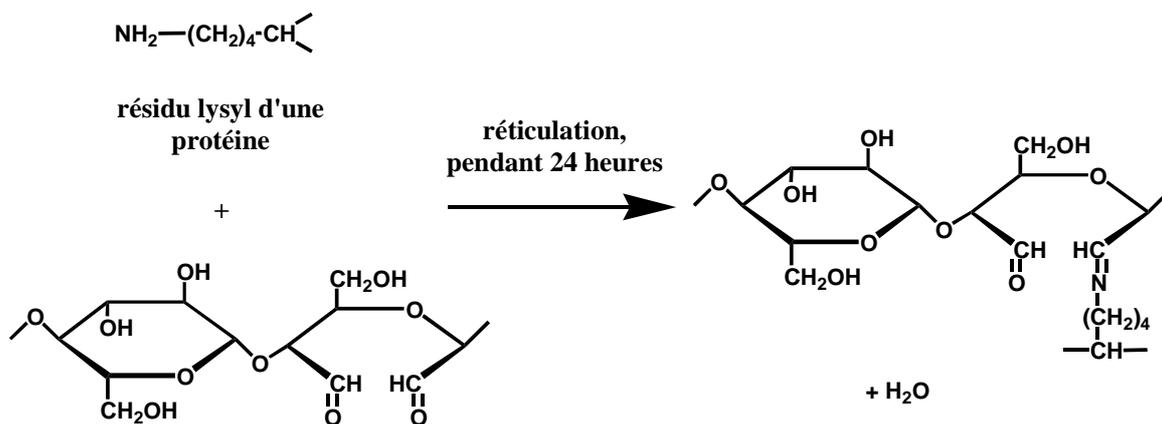


Figure 25 : a) Oxydation de la cellulose par l'acide périodique HIO_4 .

b) Mécanisme de réticulation de la cellulose oxydée par une protéine.

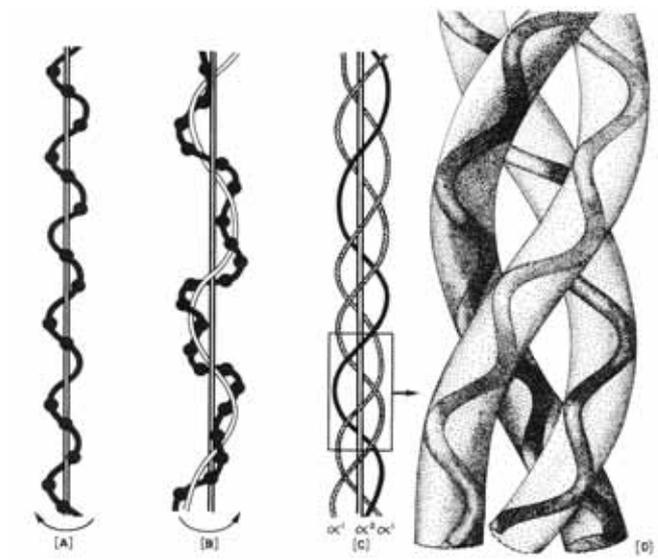


Figure 26 : Agencement microscopique de la triple hélice d'une molécule de collagène.

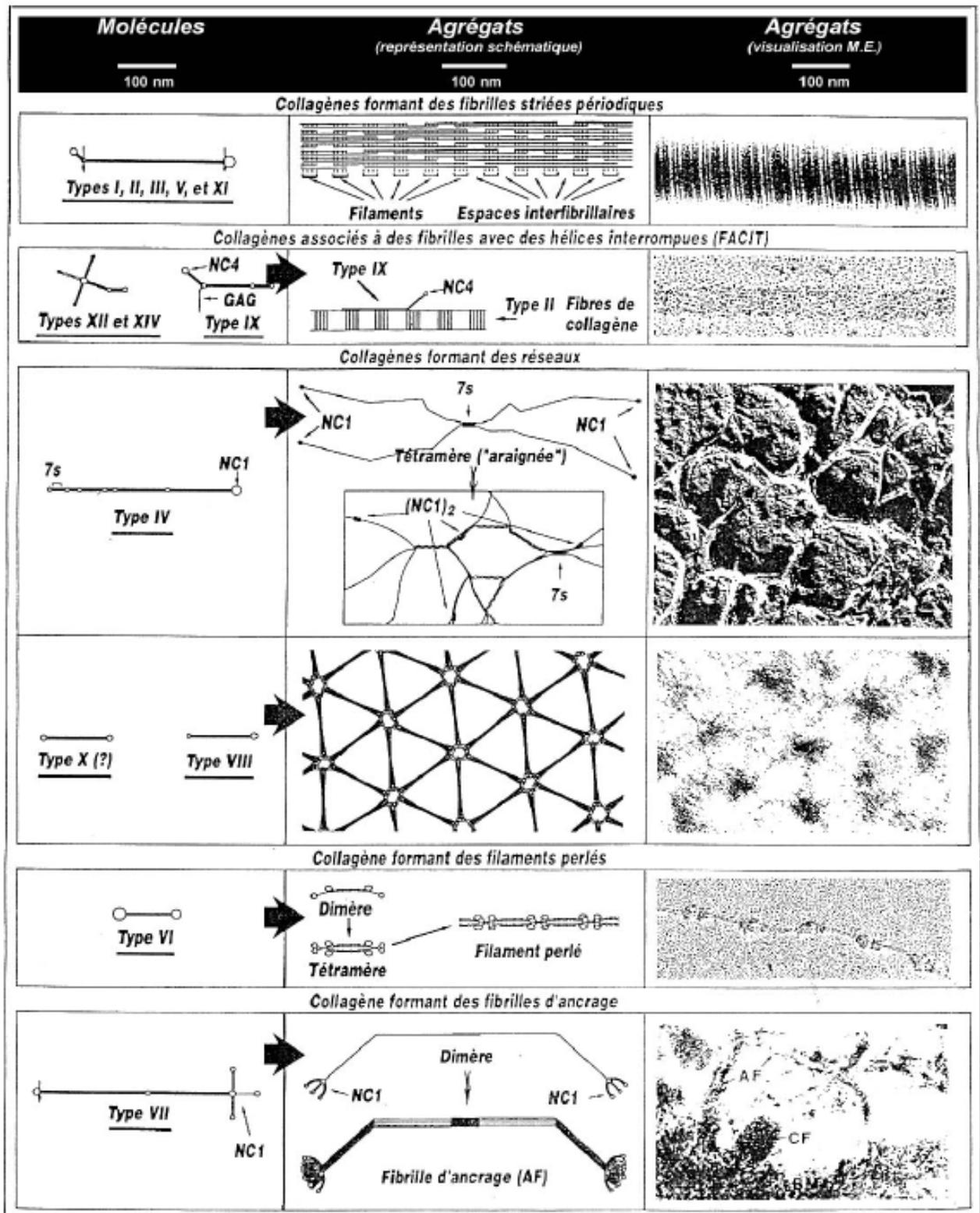


Figure 27 : Représentation schématique des supra-structures formées par différents types de collagènes. Les domaines en triple hélice sont représentés par des traits noirs et les domaines globulaires par des traits doubles ou des cercles blancs. Les cercles plus grands situés aux extrémités des molécules correspondent aux globules visibles en microscopie électronique avec ombrage tournant. D'après Van Der Rest et Garonne {Van Der Rest, 1991 #436}.

Forms and processing	Applications
Solution, acidic and neutral (chemical modification)	Dermal implant, coating of plastic, carrier of drug, cell culture matrix, material for shape formation, vitreous replacement, viscosurgery, cosmetic use
Membrane (control of permeability, heparin sustained release treatment)	Dialysis membrane, wound dressing, permeable membrane for cell matrix, anti-adhesion membrane, material for hybrid organ, drug delivery system
Microsphere (chemical modification)	Microcarrier for cell culture, agent to block capillary vessel, drug delivery system
Sponge (control of porosity, protamine fixation, chemical modification)	Three-dimensional cell culture, wound dressing, hemostatic agent, artificial skin, material for hybrid organs
Paper	Wound dressing
Strand	Surgical suture, cotton type hemostatic agent
Powder	Hemostatic agent
Hollow fiber (control of permeability)	Cell culture matrix, material for hybrid organs, tubular tissue substitutes
Rod, sphere	Drug delivery system
Hydrogel (cross-linking)	Soft contact lens, tissue implants, corneal shield, cell culture matrix
Heterograft Natural tissue (heparin sustained release treatment, chemical modification)	Cardiovascular graft, wound dressing, artificial heart valve, anti-adhesion membrane and others

Tableau 6 : Diverses formes d'application de biomatériaux à base de collagène d'après Miyata *et al.* {Miyata, 1992 #424}.

Paramètre	Viscosité (en poises)	Dosage du soufre total	Dosage de la cellulose	Dosage de la soude
Viscose provenant de VISKASE	200 - 350	2.02 – 2.12 %	75 – 79.5 %	6.6 %

Tableau 7 : Caractéristiques physico-chimiques de la pâte visqueuse provenant de la société VISKASE.

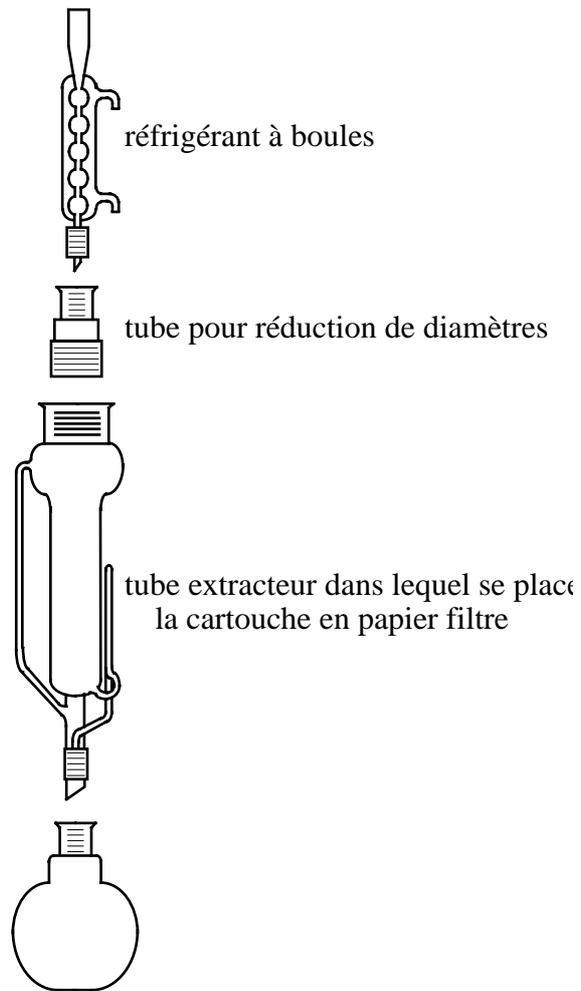


Figure 28 : Extracteur "Soxhlet".

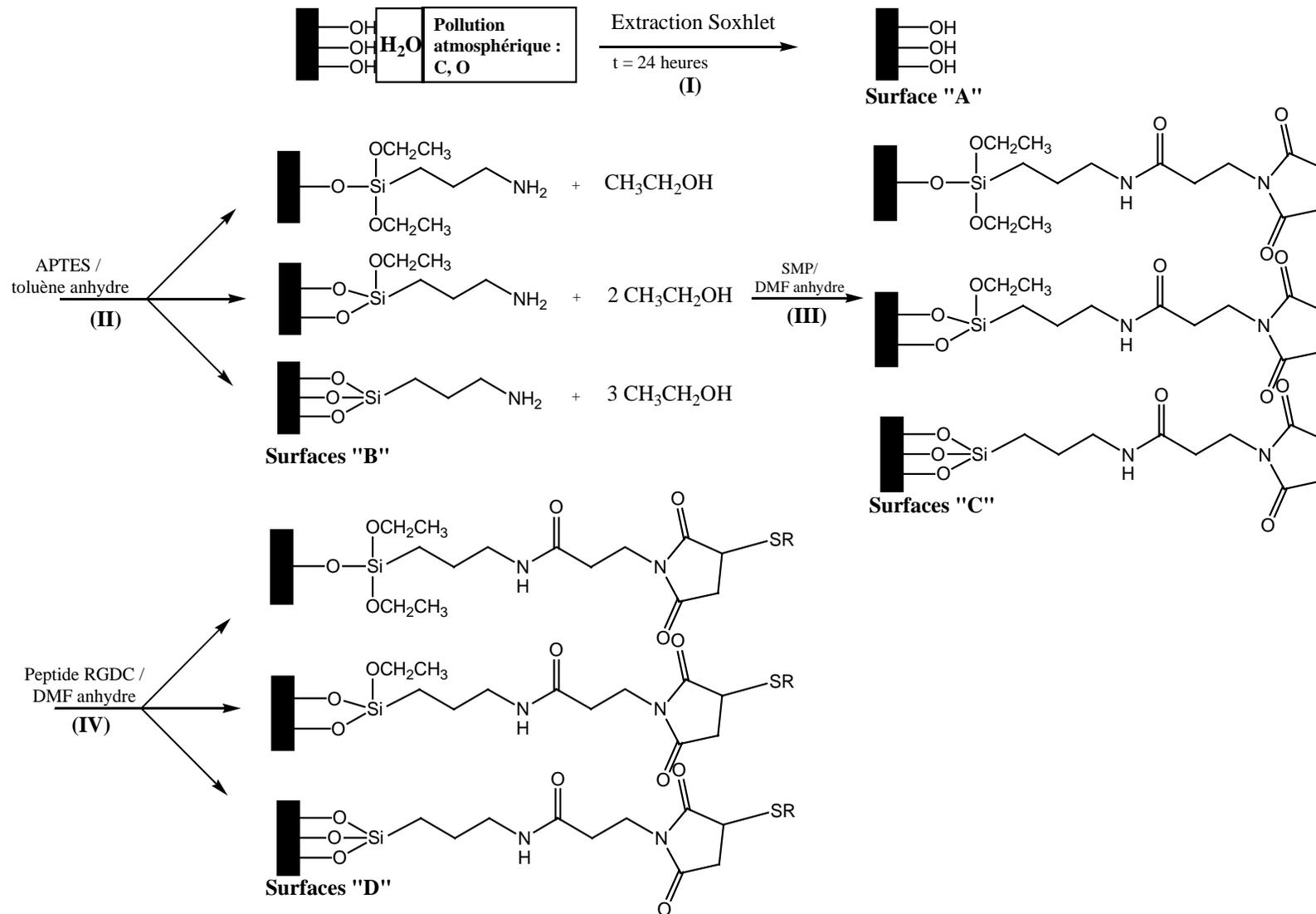


Figure 29 : Schématisation d'une immobilisation d'un peptide contenant une séquence Arginine - Glycine - Acide aspartique (RGD) sur une surface de cellulose.

R représente un peptide contenant une séquence RGD.

APTES : Aminopropyltriéthoxysilane.

SMP : Succinimidylmaléimide propionate.

DMF : Diméthylformamide.

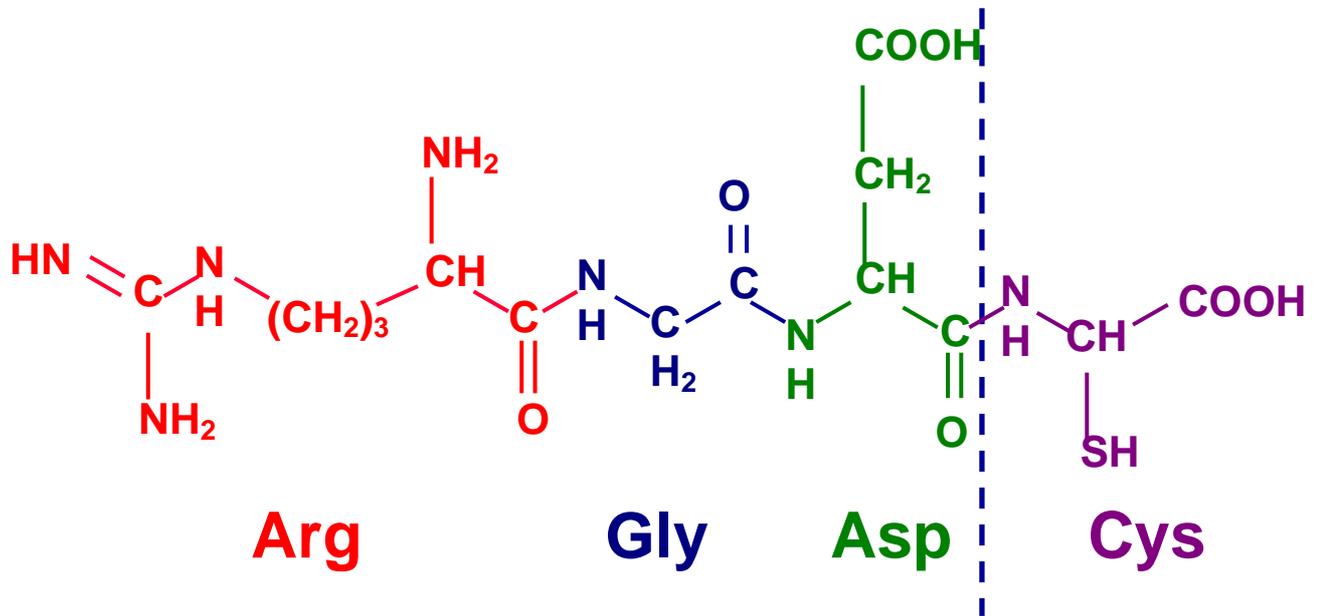


Figure 30 : Schématisation de la séquence Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC).

Entrée d'azote
ou d'argon

Réfrigérant

Système de
refroidissement



Ampoule à brome

Agitateur mécanique

Réacteur

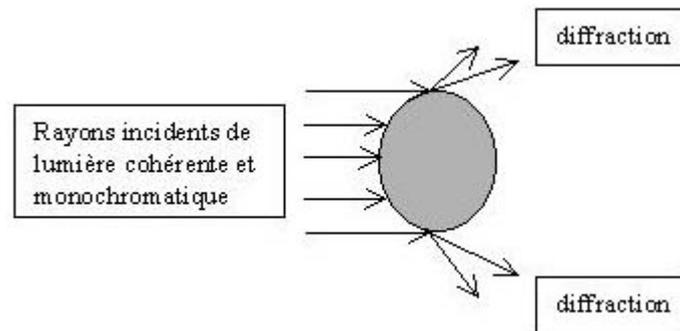


Figure 31 : Montage utilisé pour la phosphatation. La réaction se fait dans un réacteur à double parois, équipé d'une entrée d'azote ou d'argon, d'un condensateur, d'un système de refroidissement, d'un agitateur mécanique et d'une ampoule à brome.



Figure 32 : Tube pour la minéralisation.

a)



b)

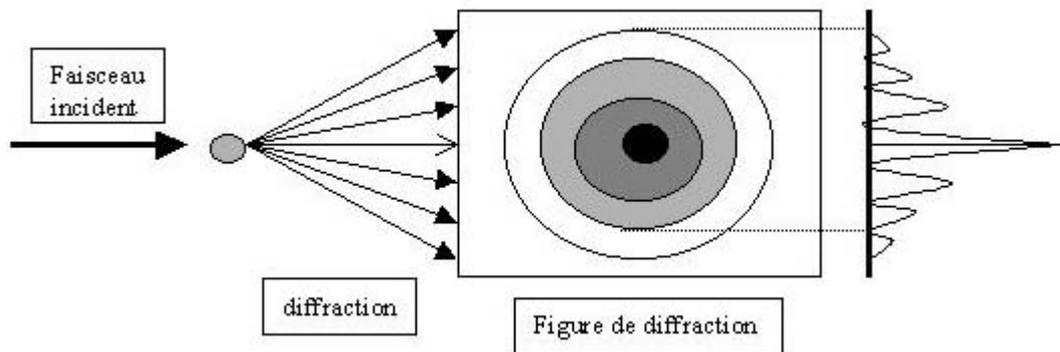


Figure 33 : a) Diffraction de la lumière par une particule.
b) Principe de la théorie de Fraunhofer.

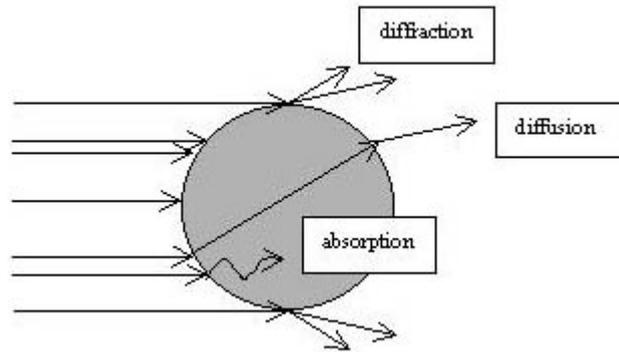


Figure 34 : Diffraction et diffusion de la lumière par une particule.

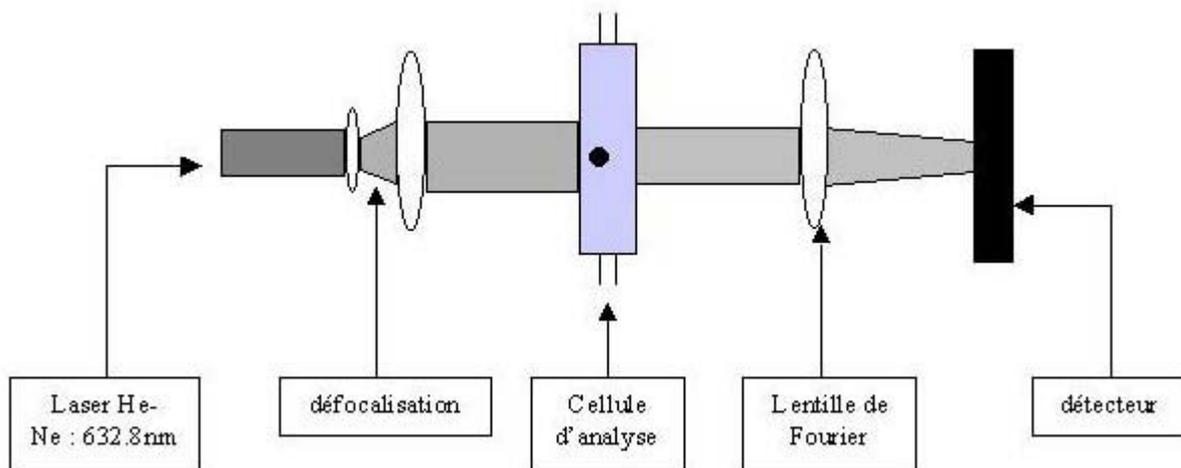


Figure 35 : Description du dispositif expérimental d'un granulomètre laser.

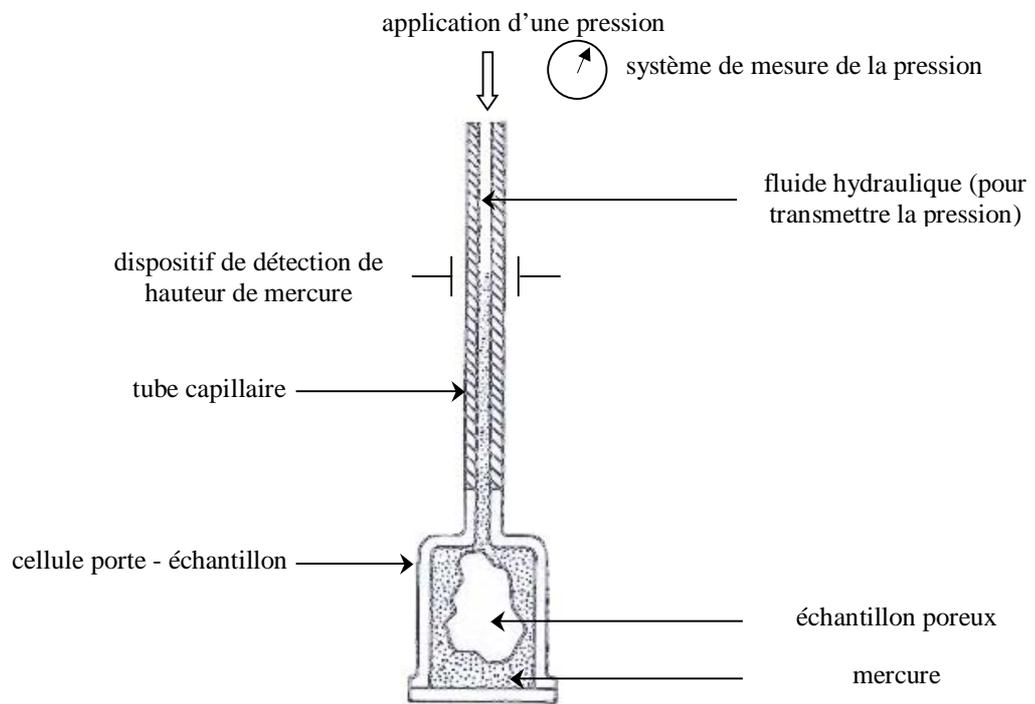


Figure 36 : Schéma du principe d'un porosimètre à mercure.

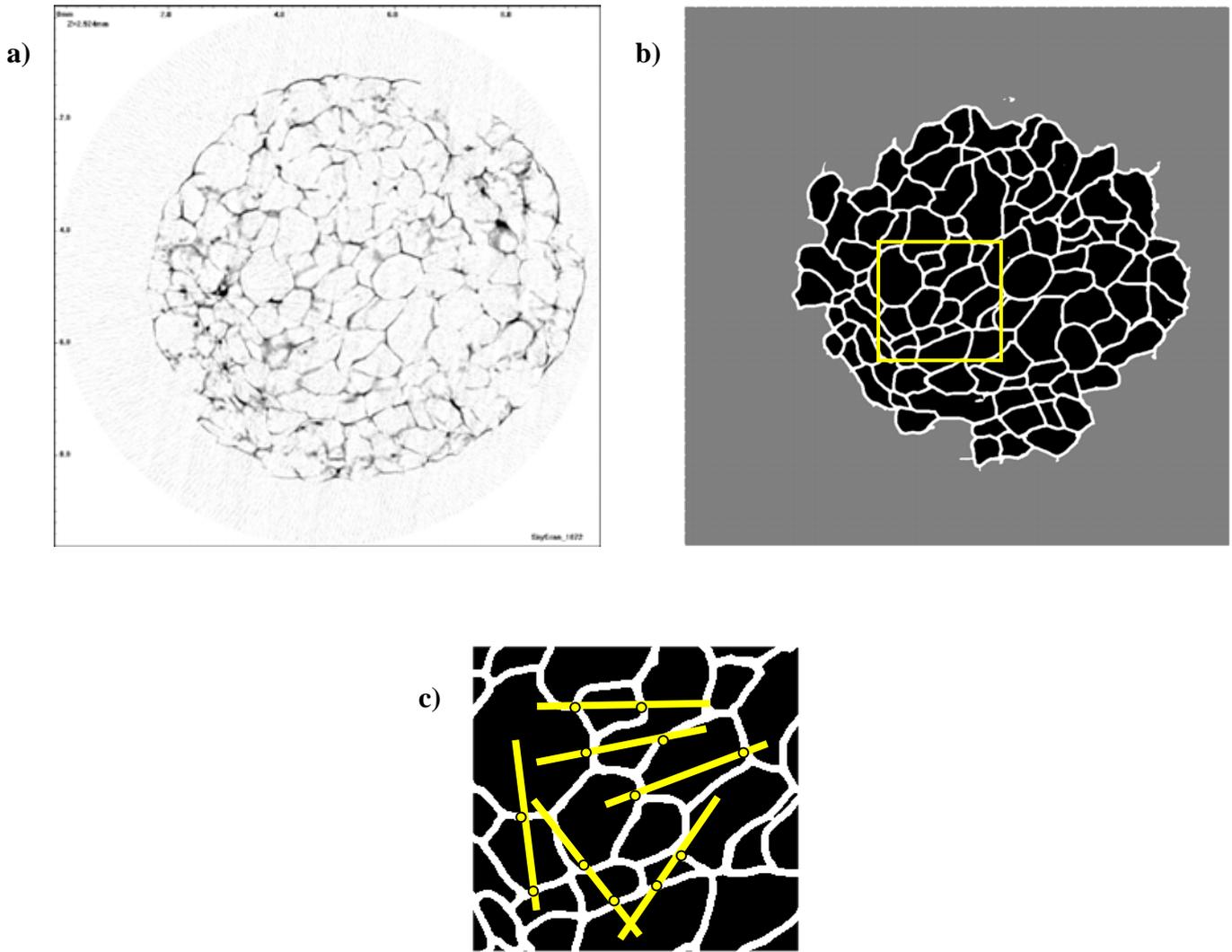


Figure 37 : a) Image digitalisée obtenue par microtomographie de rayon X (1024x1024) (coupe de l'échantillon 1).
 b) Image obtenue après seuillage de l'image.
 c) Les fonctions de distribution de longueurs de cordes sont calculées par comptage du nombre de cordes ayant une longueur donnée.

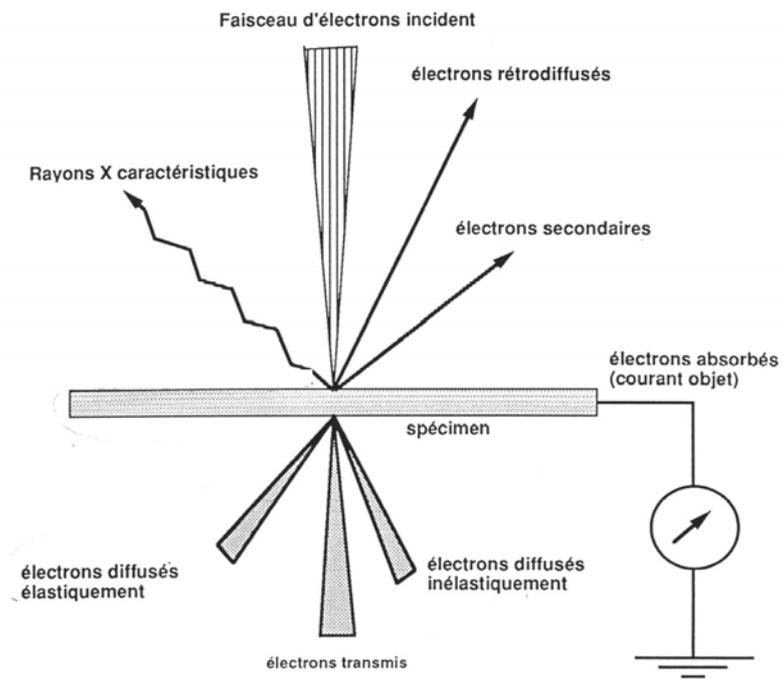


Figure 38 : Schématisation des interactions électrons-matière.

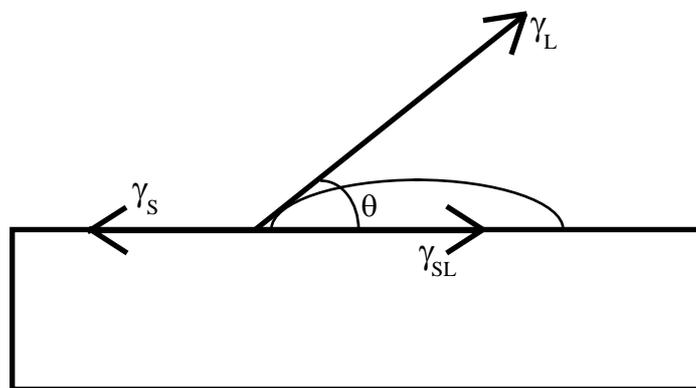


Figure 39 : Goutte de liquide à la surface d'un solide ; intervention des énergies de surface du solide et du liquide.

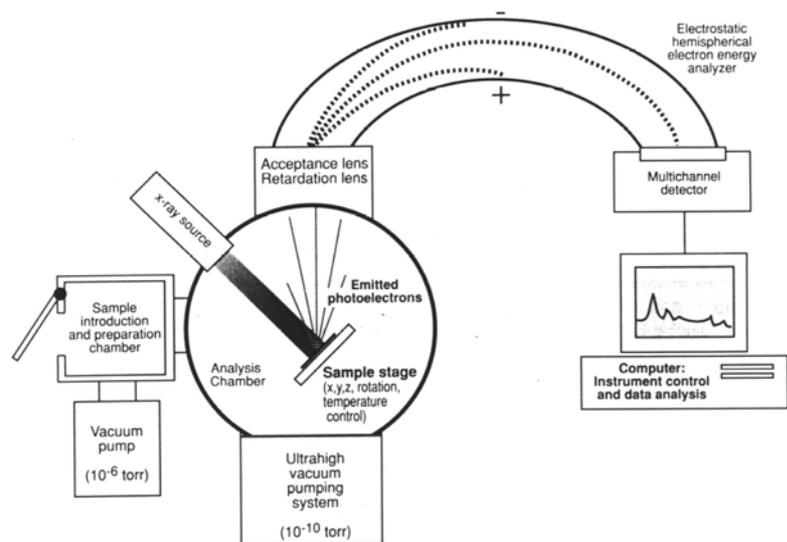


Figure 40 : Schématisation d'un instrument ESCA.

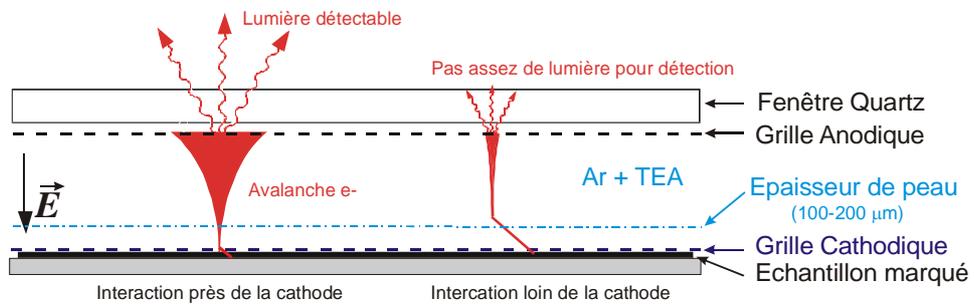
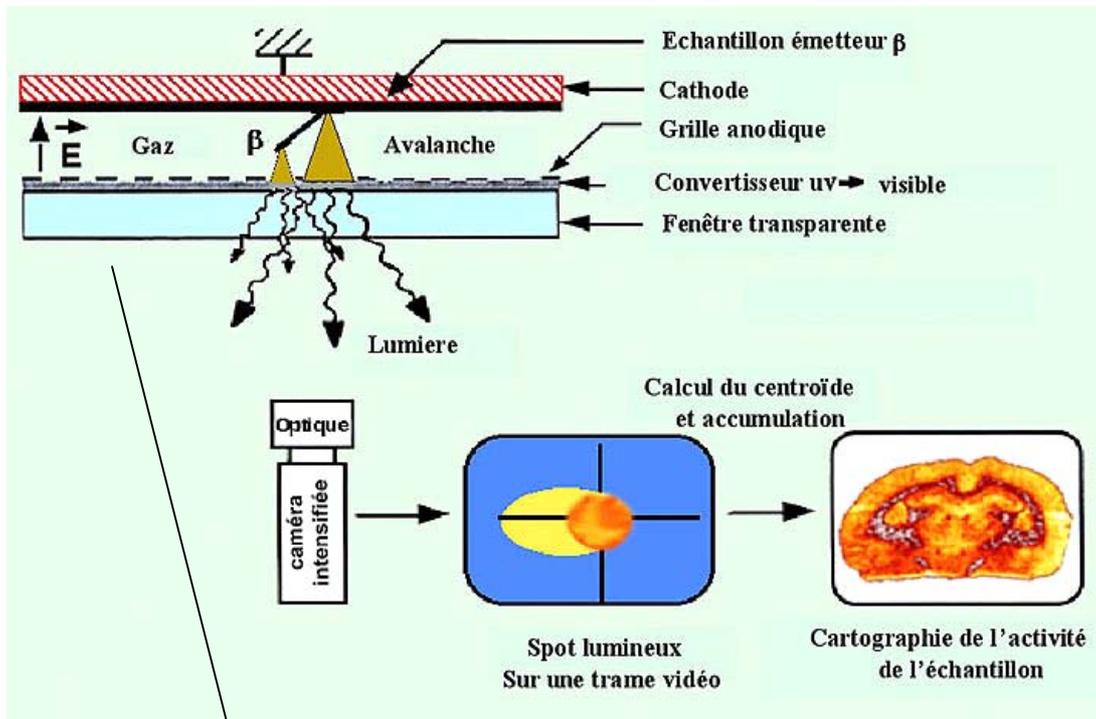


Figure 41 : Principe de fonctionnement d'un scintillateur gazeux proportionnel appliqué à l'imagerie β . Le détecteur est ici une chambre à avalanche à faces parallèles.

Liste partielle de protéines marquées par la méthode de la Chloramine T
Albumines de bœuf, de cheval, humaine
Actine
Aldolase
Catalase
Collagenase
Fibrine
Fibrinogène
Insuline
Plasmine
Plasminogène
Prothrombine
Thrombine
Trypsine

Tableau 8 : Liste partielle de protéines marquées par la méthode de la Chloramine T d'après Mc Conahey et al., 1980 {McConahey, 1980 #486}.

	Albumines (%)
Glycine	1.6
Alanine	-
Valine	7.7
Leucine	11.0
Isoleucine	1.7
Proline	5.1
Phénylalanine	7.8
Cystéine	0.7
Cystine	5.58
Méthionine	1.28
Tryptophane	0.19
Arginine	6.15
Histidine	3.5
Lysine	12.3

Tableau 9 : Teneur en acides aminés des albumines.

	Albumines (%)
N total	15.95
S total	1.96
N amidique	0.88
N indolique	0.013
N guanidinique	1.50
N imidazolique	0.064
N peptidique	11.56

Tableau 10 : Teneur en azote et en soufre des albumines.

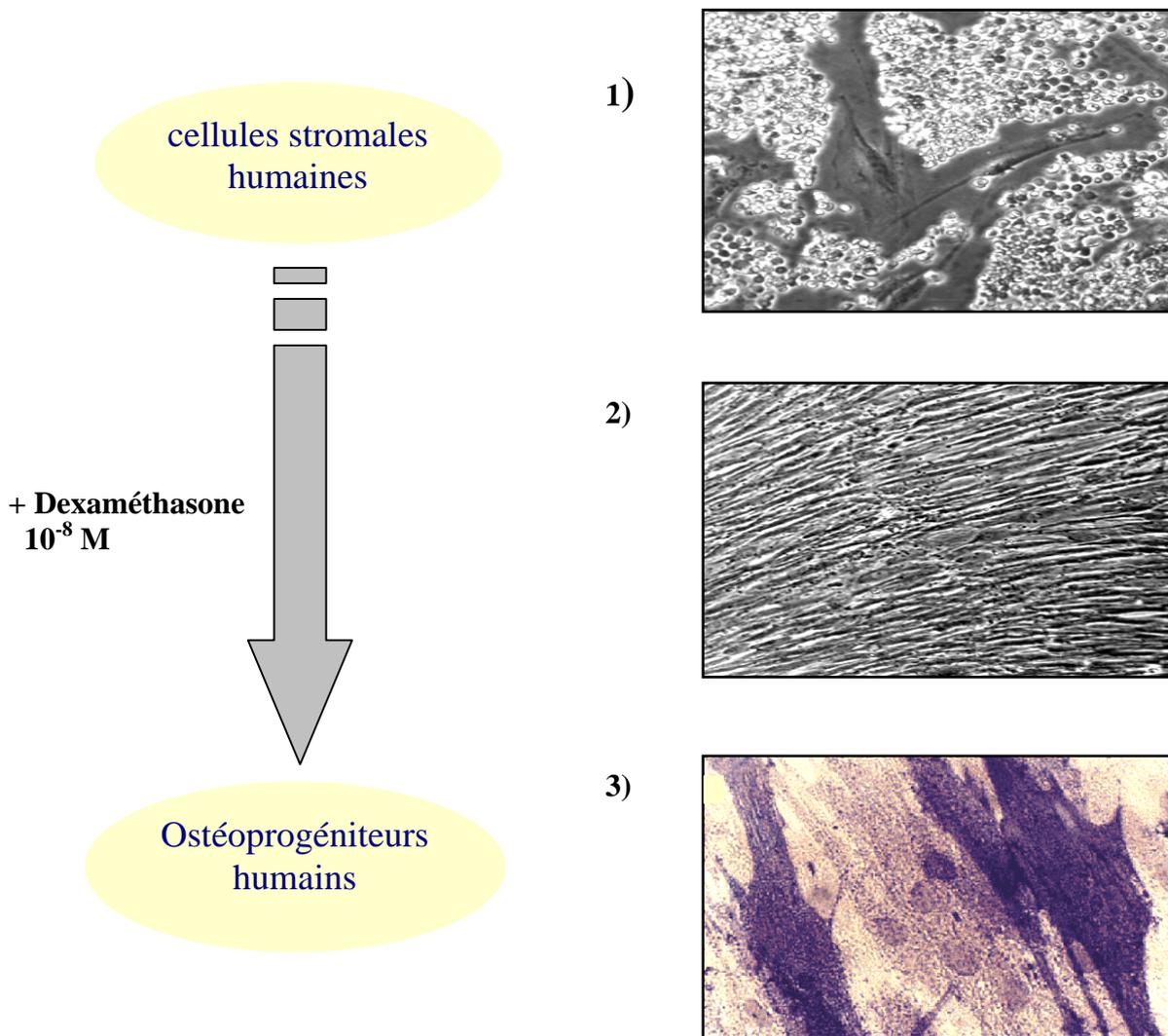


Figure 42 : Isolement des cellules ostéoprogénitrices à partir des cellules stromales humaines HBMSC. Caractéristiques phénotypiques .

- 1) Les cellules stromales ont été ensemencées en présence du milieu IMDM contenant 10 % de SVF, et 10⁻⁸ M dexaméthasone pendant environ 2 semaines (observation en microscopie optique x 360).
- 2) Puis, dès l'obtention de la confluence cellulaire (observation en microscopie optique x 130), l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) (3) a été analysée par cytochimie à l'aide d'un kit de détection (SIGMA) utilisant le substrat de l'enzyme (le naphthol AS-MX phosphate).

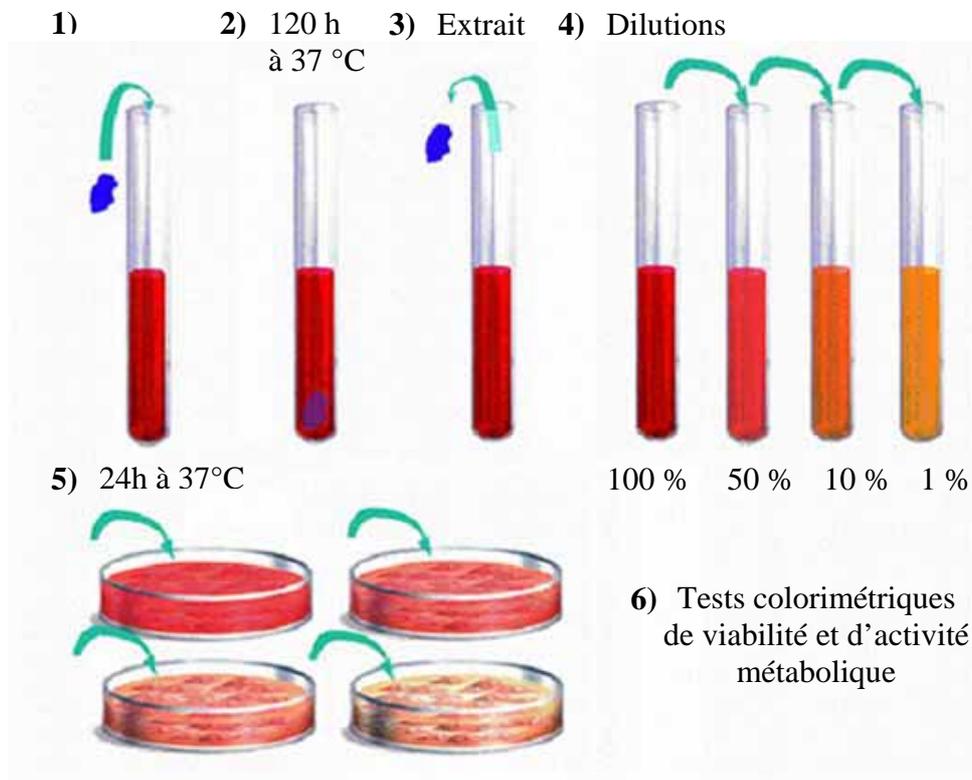


Figure 43 : Evaluation de la cytotoxicité.

- 1) et 2) Le matériau est placé dans un véhicule d'extraction pendant 120 heures à 37 °C.
- 3) Le liquide résultant de l'incubation du matériau dans le véhicule d'extraction est appelé liquide d'extraction.
- 4) Les études de cytotoxicité sont réalisées sur l'extrait pur et sur des dilutions à 50 %, 10 % et 1 %.
- 5) Des cellules sont ensemencées en présence des solutions pendant 24 heures à 37 °C.
- 6) Des tests de viabilité (Rouge neutre) et d'activité métabolique (MTT) sont alors réalisés.

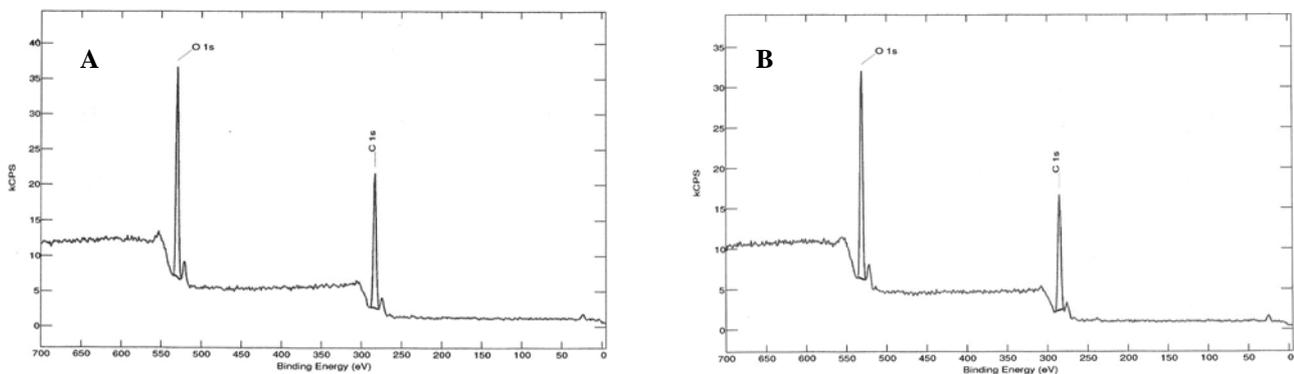


Figure 44 : Spectres généraux XPS ; (A) Cellulose compacte brute ; (B) Cellulose compacte nettoyée

Pourcentages atomiques (théoriques et expérimentaux)	C	O	C / O
Cellulose Valeurs théoriques	54.5	45.5	1.20
Cellulose brute Analyse XPS	57.1	42.9	1.33
Cellulose nettoyée Analyse XPS	53.5	46.5	1.15

Tableau 11 : Compositions (%) et rapports atomique théoriques et expérimentaux (obtenus par XPS) dans le cas de la cellulose compacte brute et nettoyée.

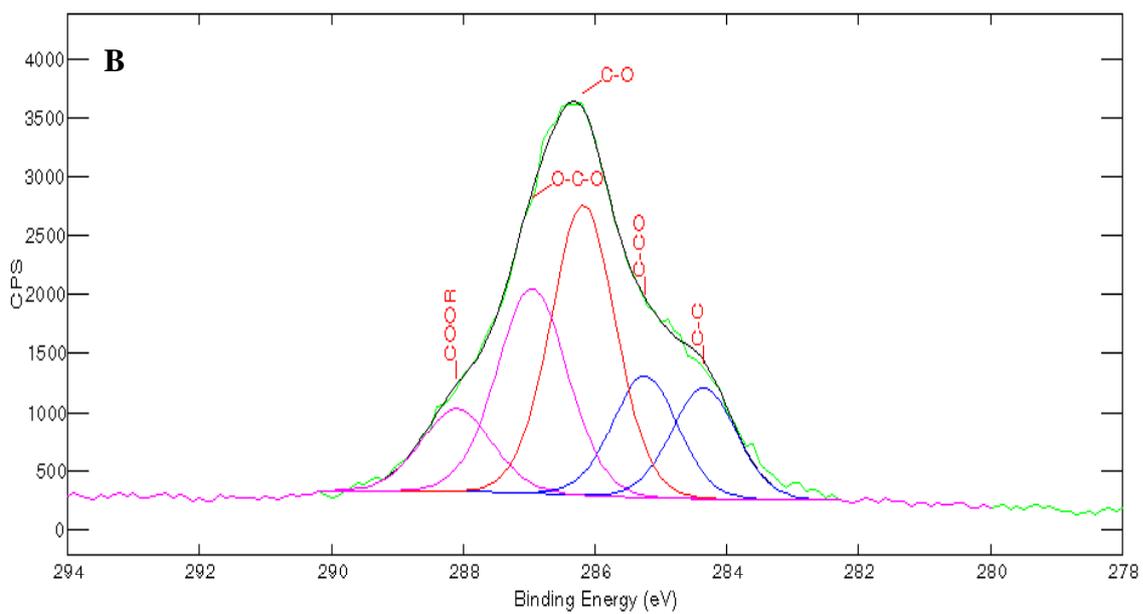
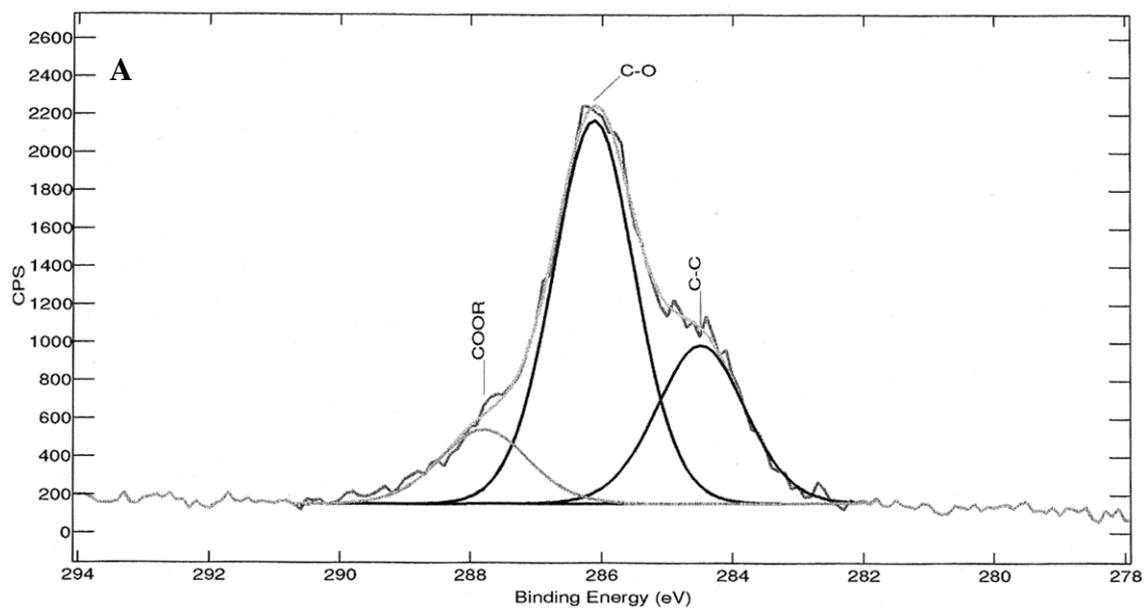


Figure 45 : Spectres XPS C1s sur le matériau compact :
 (A) Cellulose brute ; (B) Cellulose nettoyée.

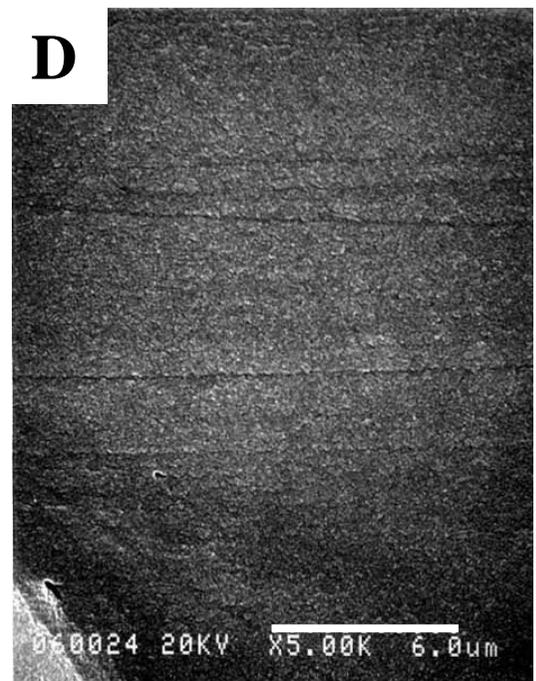
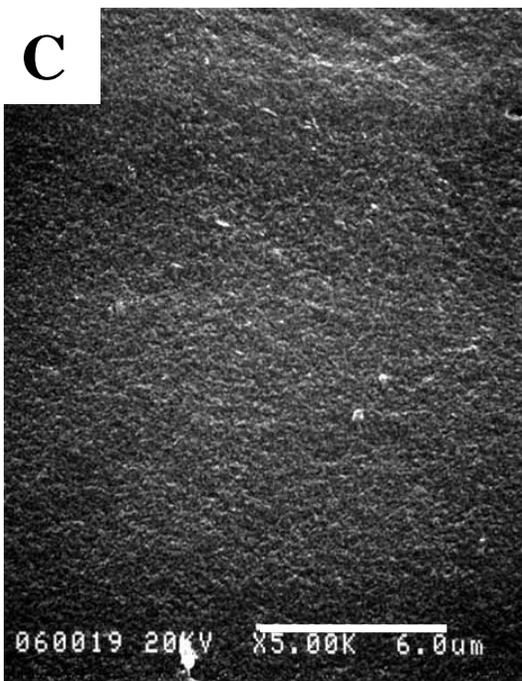
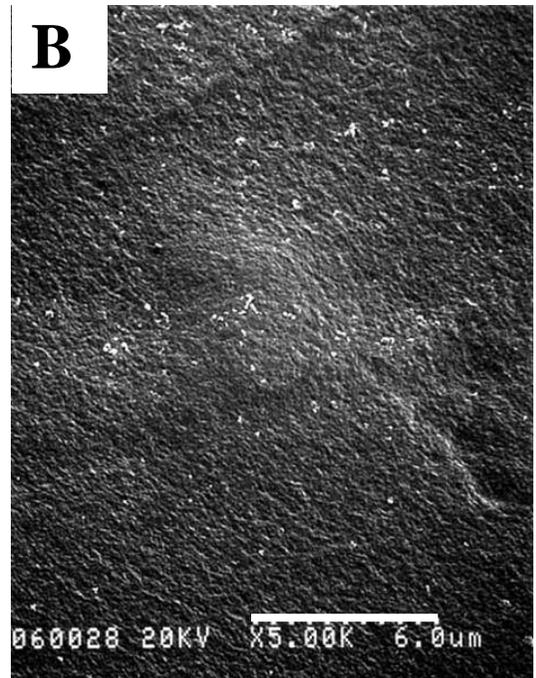
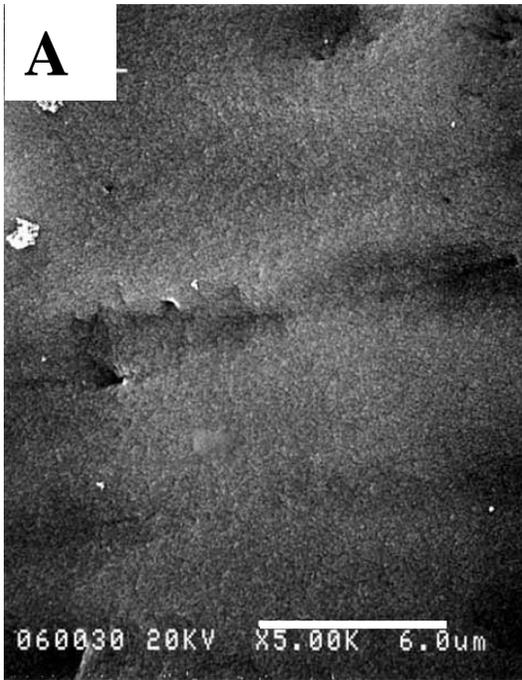


Figure 46 : Observations au MEB des surfaces de :

- (A) cellulose nettoyée
- (B) cellulose nettoyée + traitement ($T= 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P= 10^{-5}$ torr, $t= 15$ h)
- (C) cellulose nettoyée + traitement ($T= 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P= 10^{-5}$ torr, $t= 15$ h)
- (D) cellulose nettoyée + traitement ($T= 95\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P= 10^{-5}$ torr, $t= 15$ h)

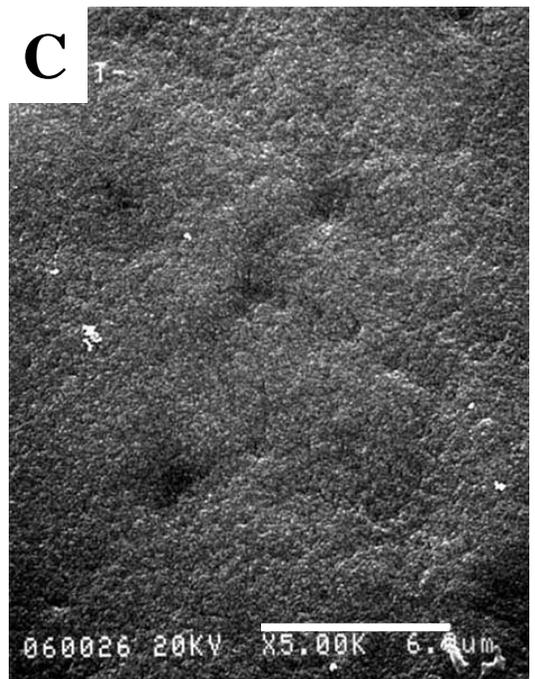
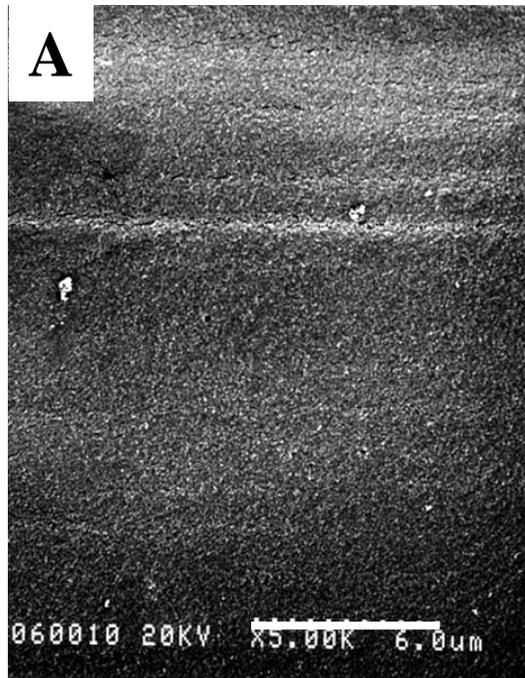


Figure 47 : Observation au MEB des surfaces de :

- (A) cellulose après traitement (T= 30 °C, P= 10⁻⁵ torr, t= 15 h) puis 1h dans le toluène
- (B) cellulose après traitement (T= 70 °C, P= 10⁻⁵ torr, t= 15 h) puis 1h dans le toluène
- (C) cellulose après traitement (T= 95 °C, P= 10⁻⁵ torr, t= 15 h) puis 1h dans le toluène

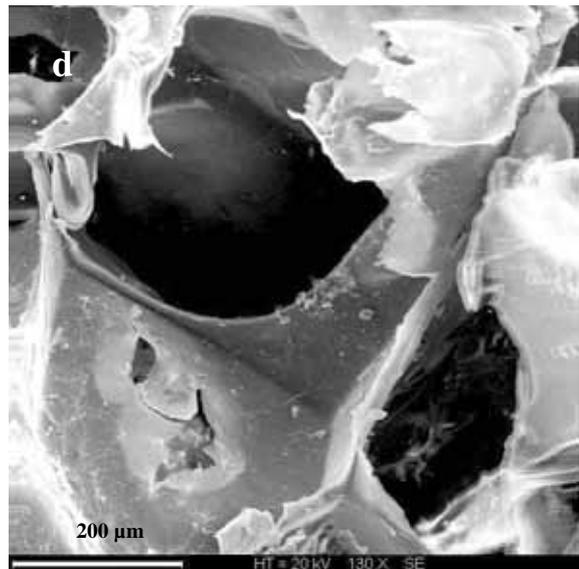
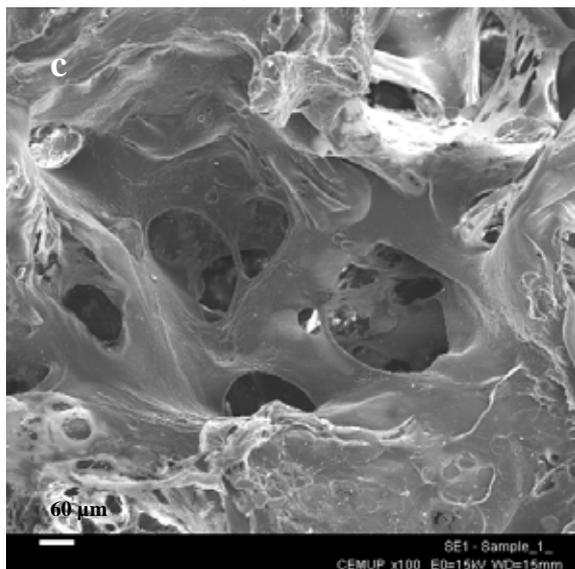
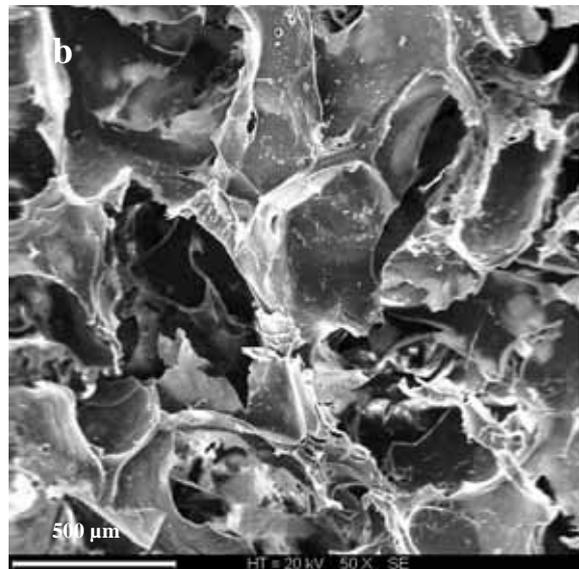
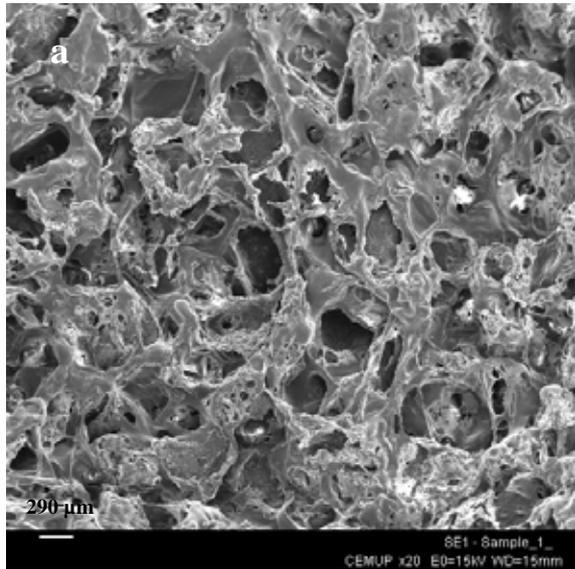


Figure 48 : Observation au MEB de la surface des échantillons de la cellulose vierge de porosité (1) à un grossissement de a) 20 , b) 50, c) 100 et d) 130.

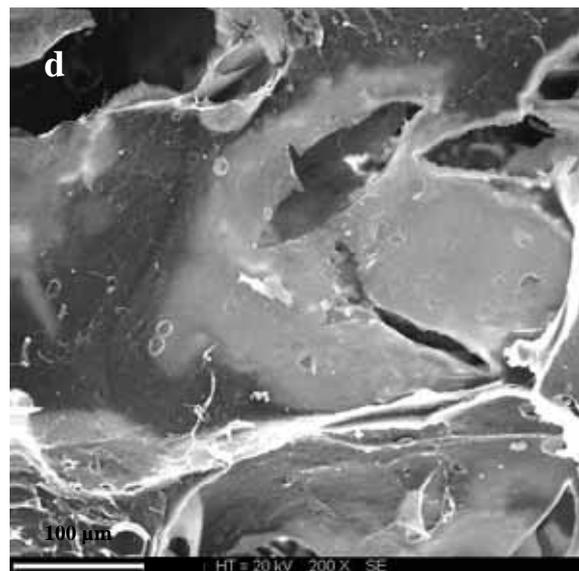
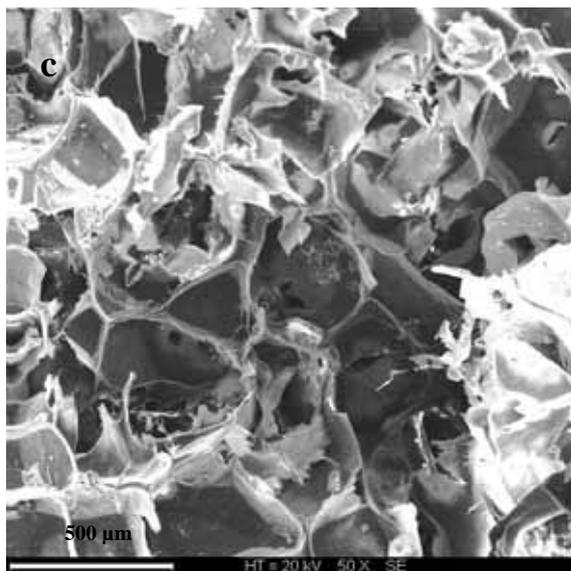
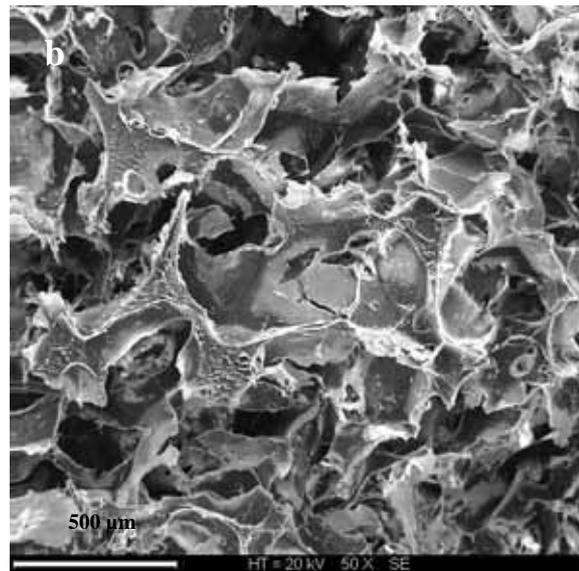
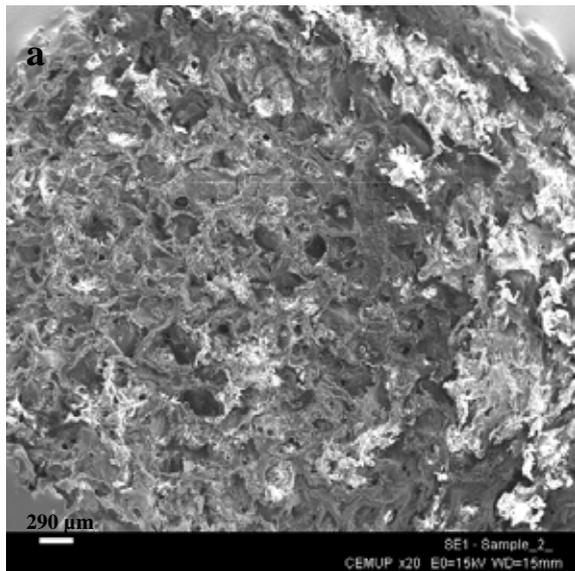


Figure 49 : Observation au MEB de la surface des échantillons de la cellulose vierge de porosité (2) à un grossissement de a) 20 , b) 50, et c) 50 et d) 200.

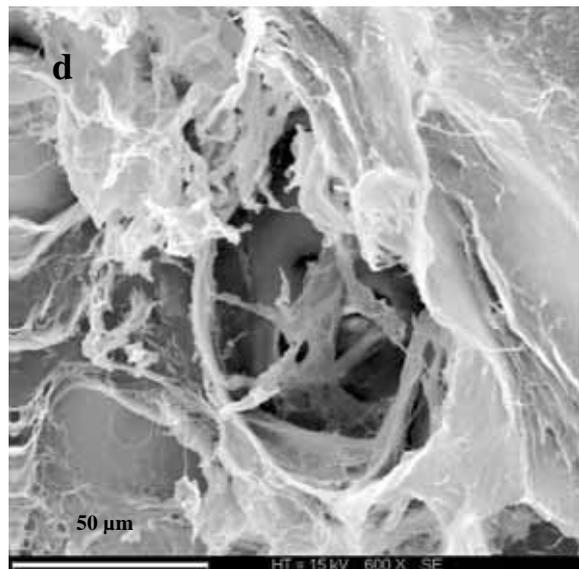
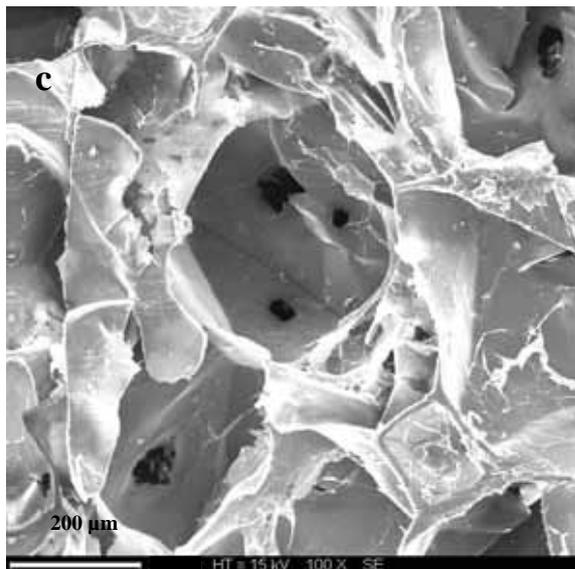
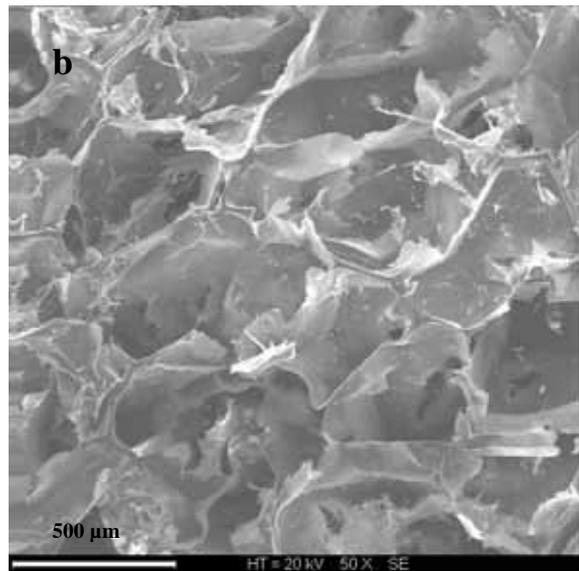
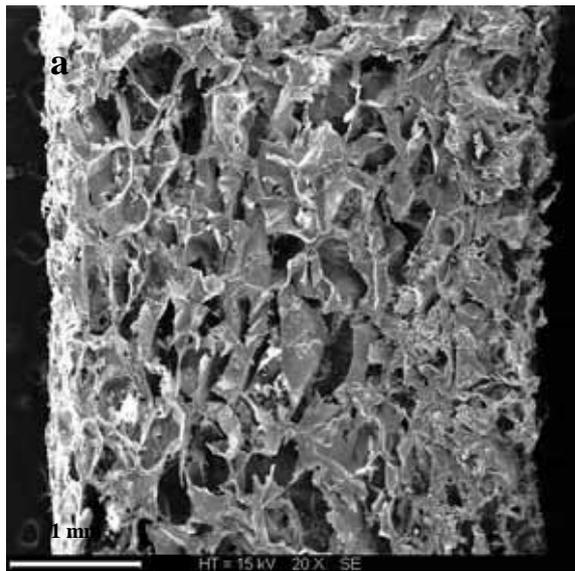


Figure 50 : Observation au MEB de la surface des échantillons de la cellulose vierge de porosité (1+2) à un grossissement de a) 20 , b) 50, et c) 100 et d) 600.

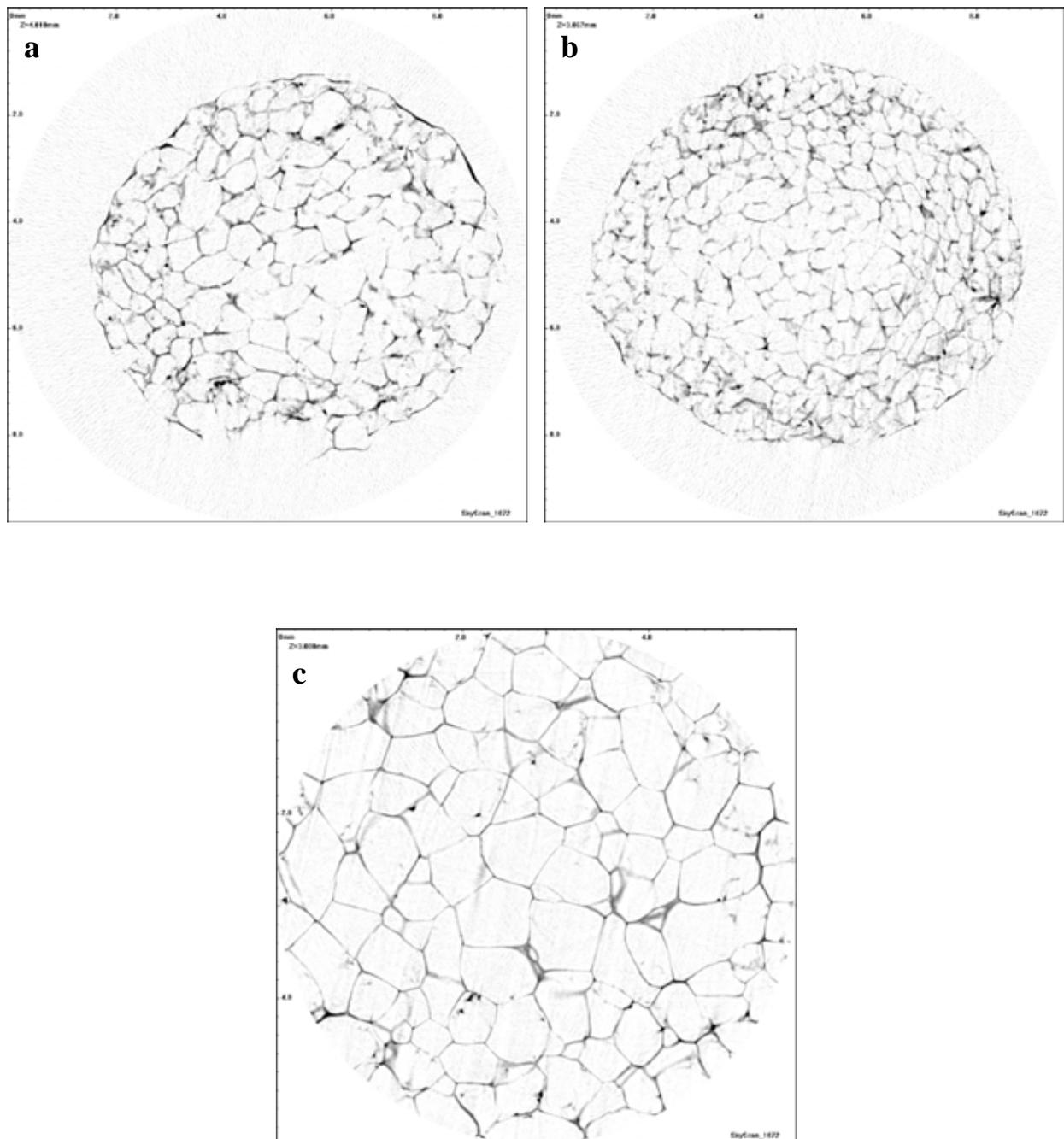
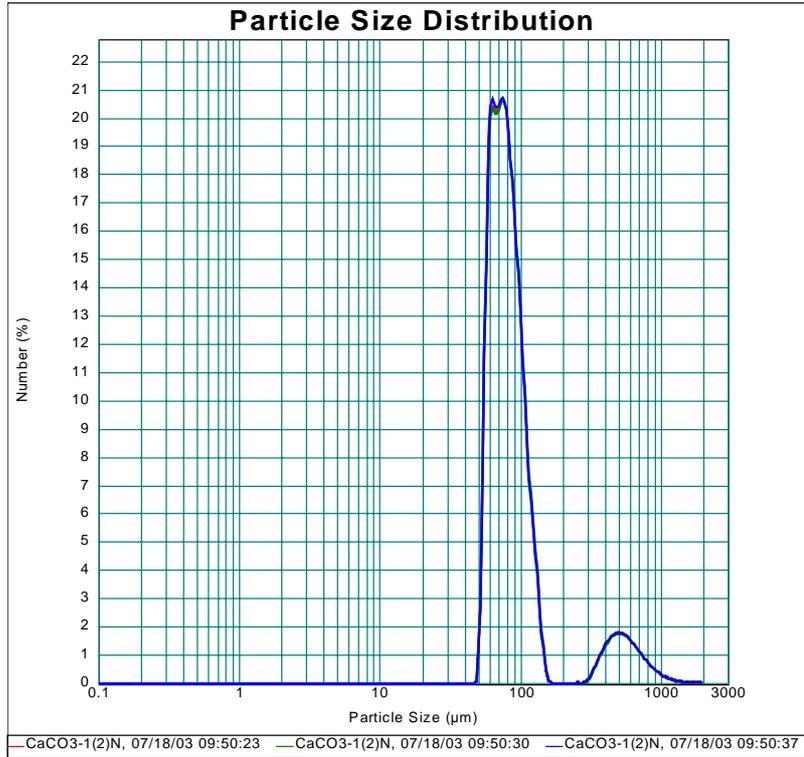
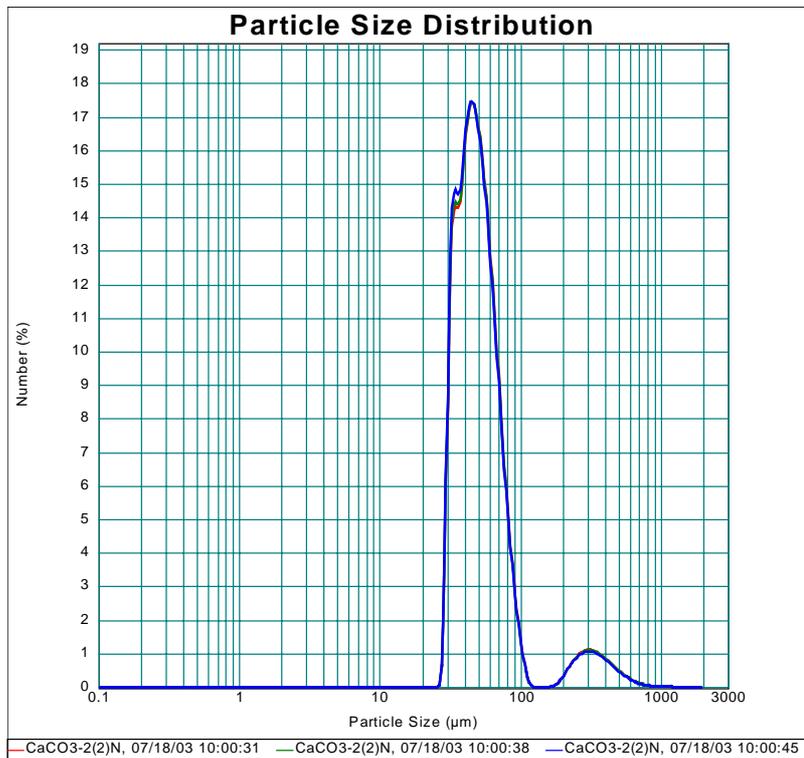


Figure 51 : Images digitalisées obtenues par microtomographie de rayon X (1024x1024). Observation des échantillons de cellulose vierge de porosité a) (1) (à une résolution de $9.5 \mu\text{m} / \text{pixel}$), b) (2) (à une résolution de $9.5 \mu\text{m} / \text{pixel}$), et c) (1+2) (à une résolution de $5.5 \mu\text{m} / \text{pixel}$).

a)



b)



c)

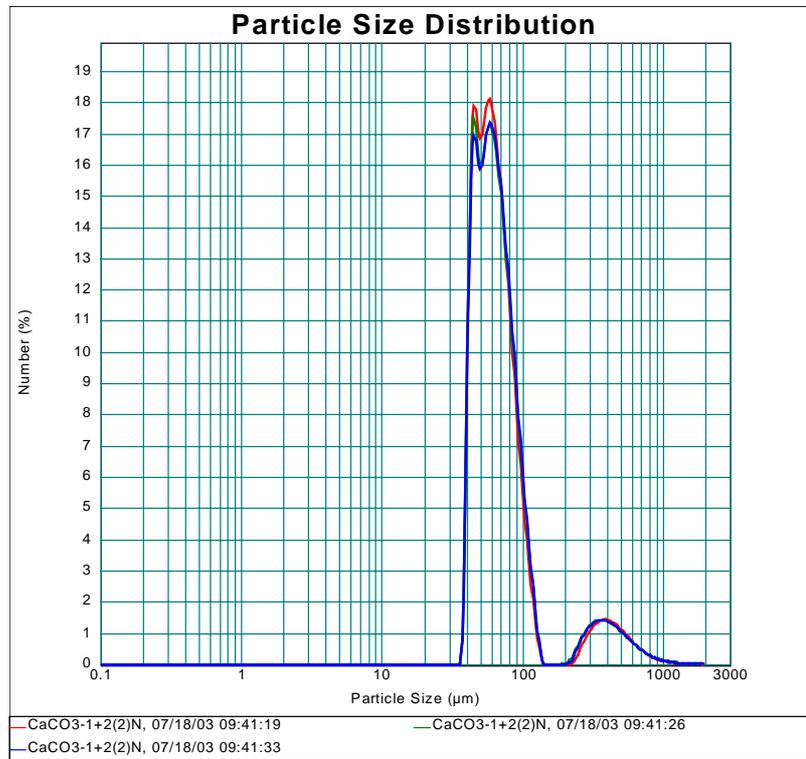


Figure 52 : Granulométrie des grains de CaCO₃ utilisés comme agents porogènes dans la fabrication de la cellulose macroporeuse. Distribution des pourcentages en nombre de la taille des particules du lot a) (1), b) (2) et c) (1+2).

Matériaux de porosité	D10 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)
(1)	59.1 \pm 0.2	79.6 \pm 0.6	134.2 \pm 1.8
(2)	34.7 \pm 2.2	49.7 \pm 1.5	83.9 \pm 1.9
(1+2)	43.9 \pm 0.3	62.1 \pm 1.5	110.8 \pm 4.0

Tableau 12 : Tableau regroupant les valeurs numériques des D10, D50 et D90 obtenues dans la distribution de la taille des particules en fonction du pourcentage en nombre.
D10 = diamètre seuil pour lequel 10 % des particules se trouvent en dessous de cette dimension.
D50 = diamètre pour lequel 50 % des particules ont une taille inférieure et 50 % une taille supérieure. C'est le diamètre médian (MMD, Mass Median Diameter).
D90 = diamètre seuil pour lequel 90 % des particules se trouvent en dessous de cette dimension.

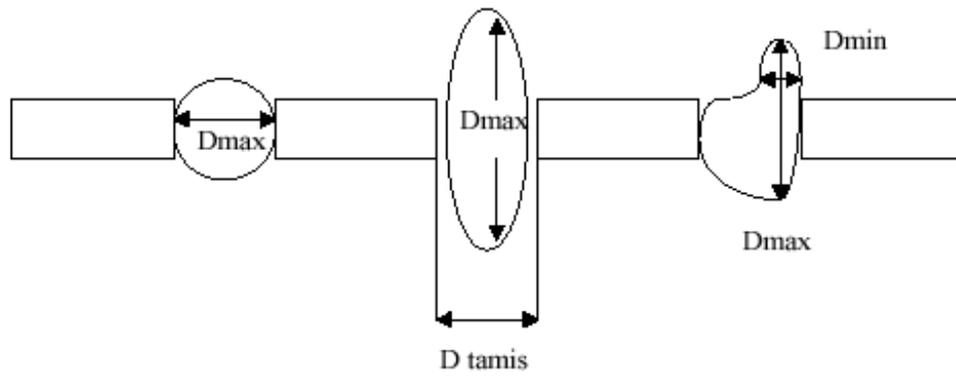


Figure 53 : Alignement des particules dans un tamis.

	Echantillons		
	1+2	1	2
masse (g)	0.012	0.0102	0.0106
diamètre (cm)	0.707	0.718	0.719
hauteur (cm)	0.389	0.4	0.395
V_{échantillon} (cm³)	0.153	0.162	0.160
V_{cellulose} (cm³)	0.008	0.007	0.007
V_{poreux} (cm³)	0.144	0.155	0.153
% porosité¹	94.6	95.7	95.4
m_{pénétrömètre + échantillon} (g)	55.4862	55.4942	55.5089
m_{pénétrömètre + échantillon + Hg} (g)	102.1977	102.516	102.433
variation de masse (g)	46.7115	47.0218	46.9241
V_{Hg déplacé} (cm³)	3.4514	3.4743	3.4671
ΔV (cm³)	0.1458	0.1229	0.1301
% porosité²	95.5	75.9	81.1

Avec $\rho_{\text{cellulose sèche}} = 1.45 \text{ g/cm}^3$, $\rho_{\text{Hg}} = 13.5340 \text{ g/cm}^3$, $V_{\text{Hg dans pénétrömètre}} = 3.59723 \text{ cm}^3$.
L'incertitude liée au pied à coulisse est de 10^{-3} cm et celle liée à la balance est de 10^{-4} g

Tableau 13 : Résultats des pourcentages de porosité des échantillons (1+2), (1) et (2), obtenus 1) par le calcul et 2) par la porosimétrie à Hg.

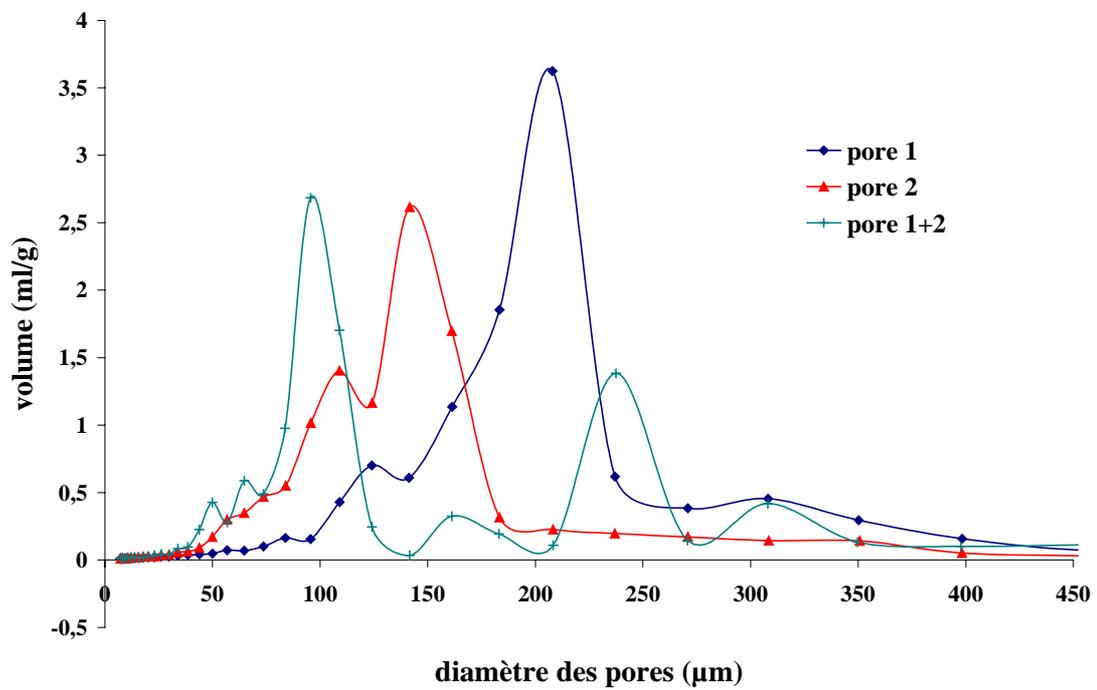


Figure 54 : Répartition de la taille des pores, mesurée par porosimétrie à mercure, de trois échantillons de porosités (1), (2) et (1+2).

	Matériaux de porosité	(1)	(2)	(1+2)
Diamètre des grains de CaCO₃ (µm)	Données du fournisseur	500 - 900	250 - 500	250 - 900
	Granulométrie laser	59 – 134 321 - 639	35 – 84 222 - 408	44 – 111 269 - 493
Diamètre des pores (µm)	Porosimétrie Hg	95 - 398	44 - 185	38 - 350
	Fonction de distribution de cordes	272 - 610	261 - 477	274 - 610

Tableau 14 : Comparaison des diamètres des grains de CaCO₃ donnés par le fournisseur (de 250 à 900 µm) après tamisage dans un tamis de 500 µm de maillage et de ceux déterminés par granulométrie laser (2 porosités différentes, une petite et une plus grande) (en µm), et des diamètres des pores du matériau déterminés par la porosimétrie à mercure et la distribution de cordes (en µm).

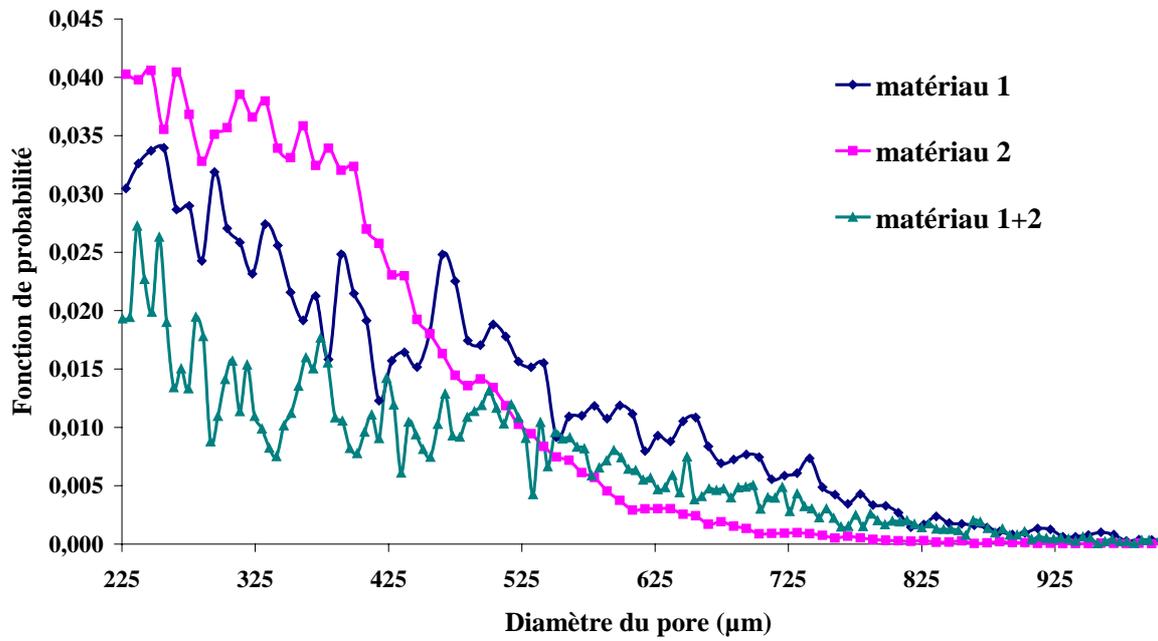


Figure 55 : Distributions de probabilité en fonction du diamètre des pores (en µm) des matériaux de porosité (1), (2) et (1+2).

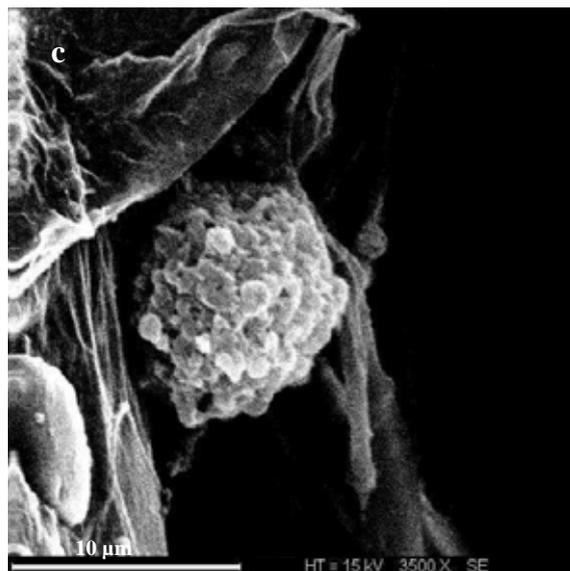
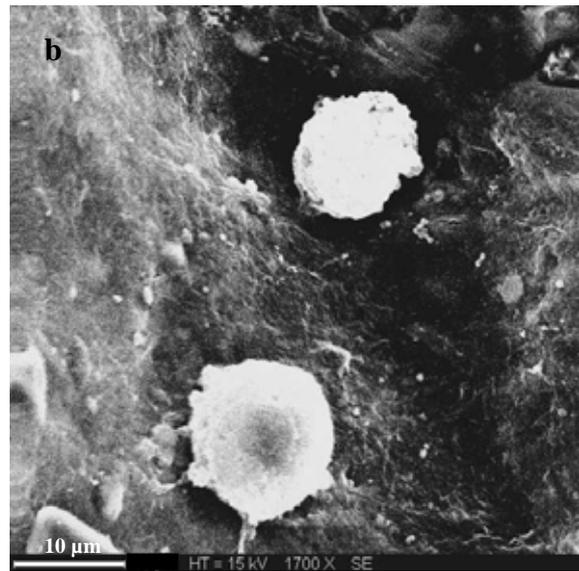
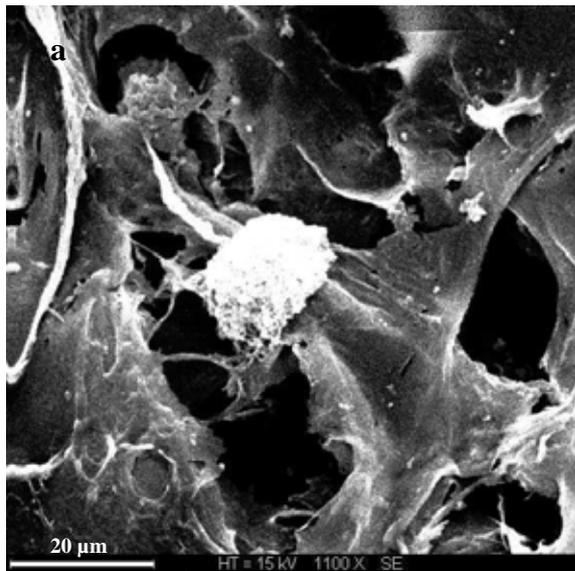


Figure 56 : Ostéoprogéniteurs ensemencés sur des matériaux de cellulose macroporeuse de porosité a) (1) (x 1100), b) (2) (x 1700) et c) (1+2) (x 3500), observés au MEB en surface des implants.

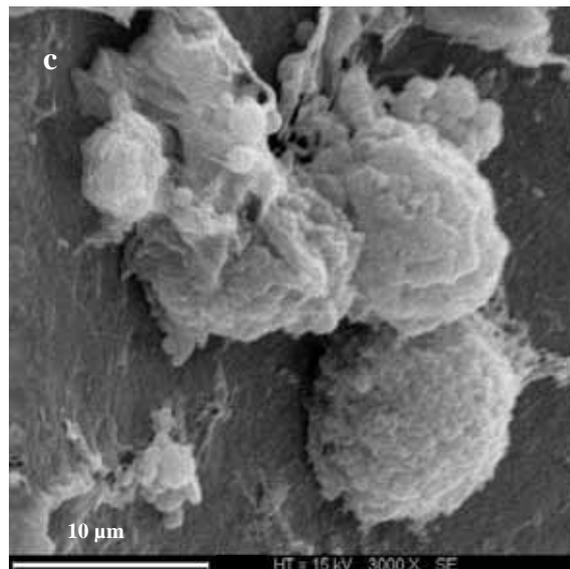
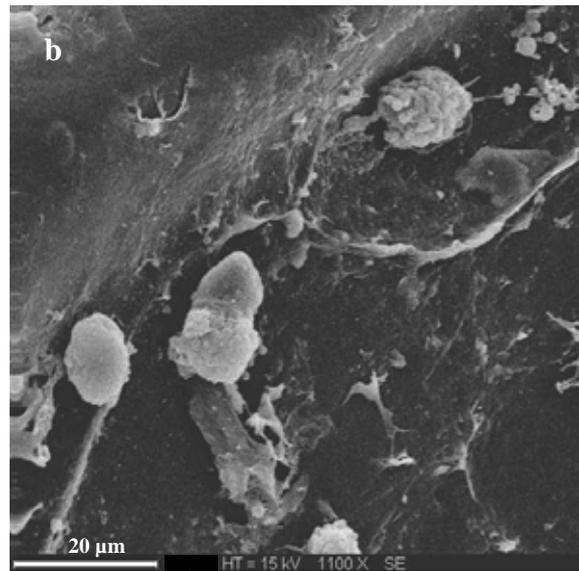
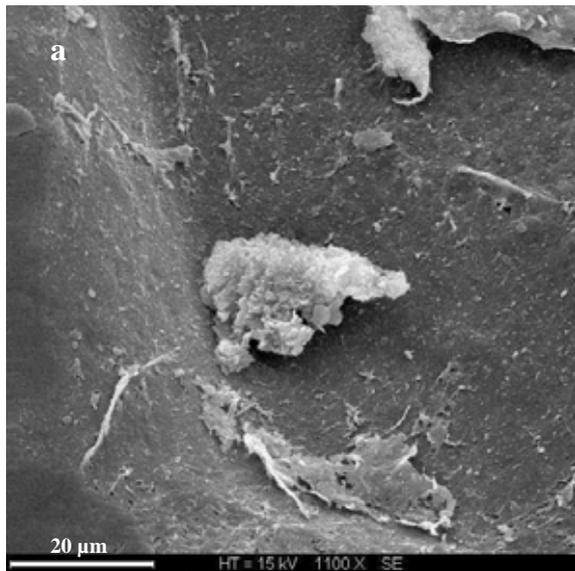


Figure 57 : Ostéoprogéniteurs ensemencés sur des matériaux de cellulose macroporeuse de porosité a) (1) (x 1100), b) (2) (x 1100) et c) (1+2) (x 3000), observés au MEB au centre des implants.

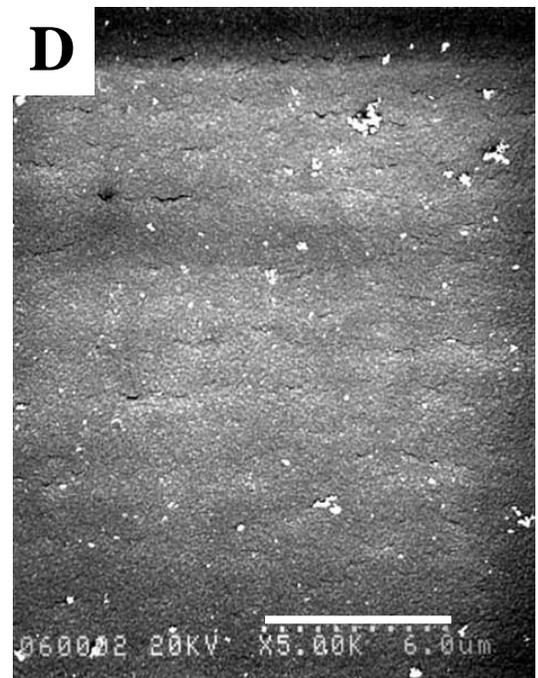
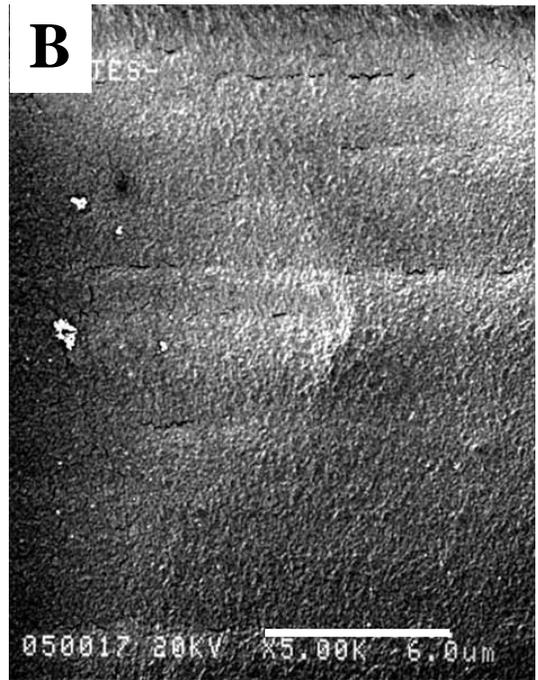
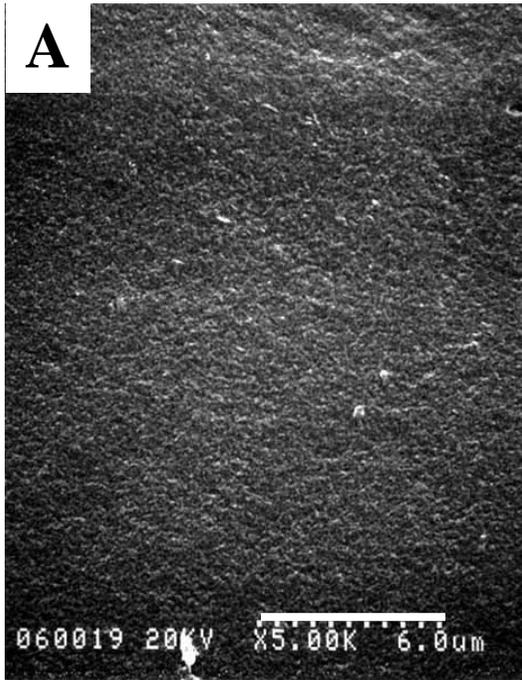


Figure 58 : Observation au MEB des surfaces :

- (A) cellulose nettoyée
- (B) cellulose greffée avec les molécules APTES
- (C) cellulose greffée avec les molécules SMP
- (D) cellulose greffée avec les peptides RGDC

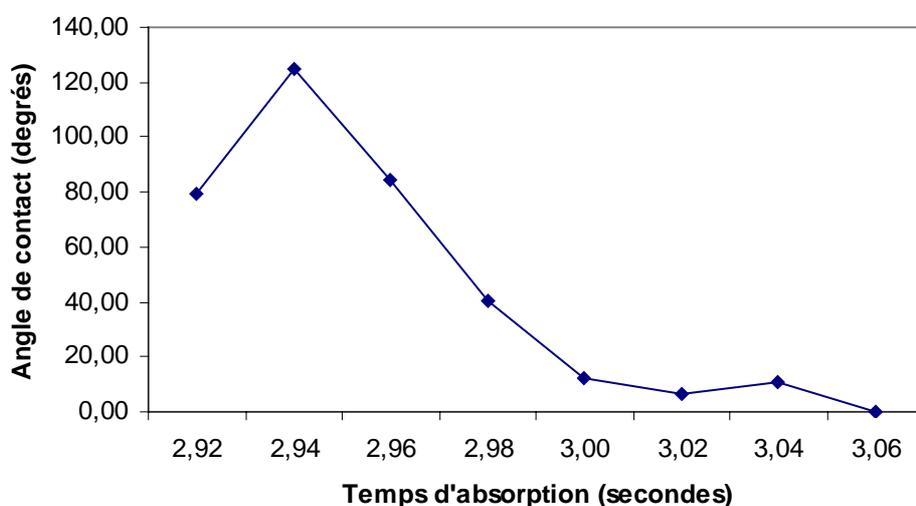


Figure 59 : Cinétique d'absorption d'une goutte d'eau déposée sur un matériau cellulosique compacte nettoyé (Mesure d'angle de contact en dynamique).

Matériaux	Angles de contact moyens (degrés)
Cellulose + APTES	61 ± 5
Cellulose + APTES + SMP	39 ± 5
Cellulose + APTES +SMP + RGDC	46 ± 4

Tableau 15 : Mesure d'angles de contact exprimés en degré de l'eau sur la cellulose greffée avec les molécules APTES et SMP, et le peptide RGDC. Les analyses ont été réalisés sur 15 échantillons, avec 3 gouttes déposées sur chaque matériau et 5 mesures faites à partir d'une goutte.

%	C	O	Si	N	C / O	Si / N
Cellulose Nettoyée	53.5	46.5	-	-	1.15	-
	54.5	45.5			1.2	
Cellulose+APTES	63.3	32.8	1.9	2.0	1.9	0.95
	57.6	36.4	3	3	1.6	1
Cellulose+APTES+SMP	59.7	36.1	1.9	2.3	1.65	0.82
	59.1	34.1	2.3	4.5	1.7	0.5
Cellulose+APTES +SMP+RGDC	55.3	35.9	5.1	3.7	1.5	1.37
	55.6	30.5	1.4	12.5	1.8	0.11

Tableau 16 : Compositions atomiques **théoriques** et expérimentales (en %), et rapports atomiques (Si / N) **théoriques** et expérimentaux, obtenus par XPS des surfaces de cellulose compacte vierge, greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.

C1s (eV)		N1s (eV)		Si2p_{3/2} (eV)	
283.7	C-Si-O	398.6	C-NH₂	102.4	SiO₃C
284.6	C-C	400.0	amide		
285.3	C-C-O	401.5	imide		
285.8	C-N				
286.4	C-O				
287.2	O-C-O				
287.9	N-C=O				
288.8	COOR				

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des positions énergétiques attendues pour les liaisons impliquant le carbone, l'azote, le silicium (avec une tolérance de ± 0.2 eV) (D. Briggs, 1998).

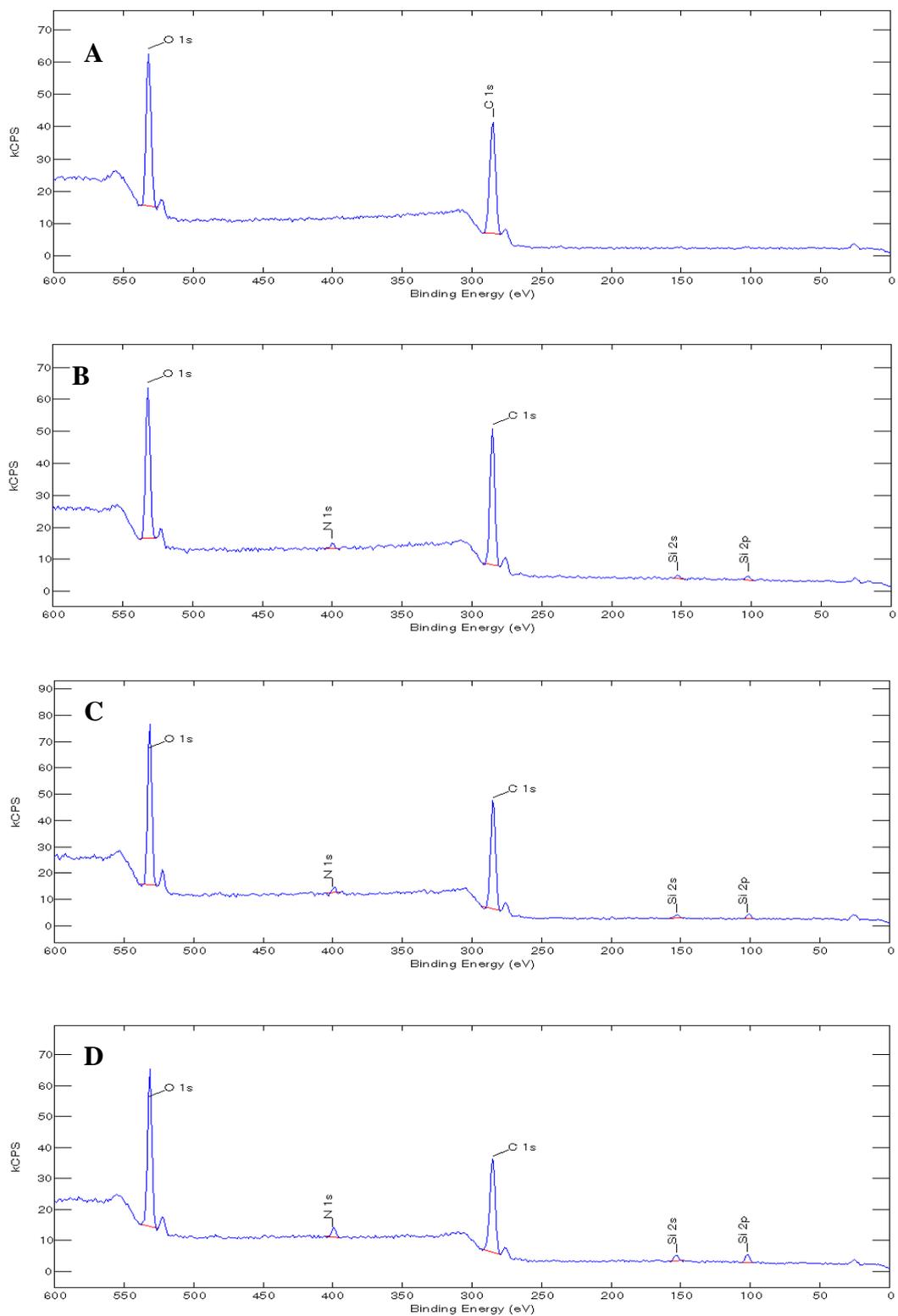


Figure 60 : Spectres généraux XPS sur le matériau compact : (A) Cellulose vierge ; (B) Cellulose + APTES ; (C) Cellulose + APTES + SMP ; (D) Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

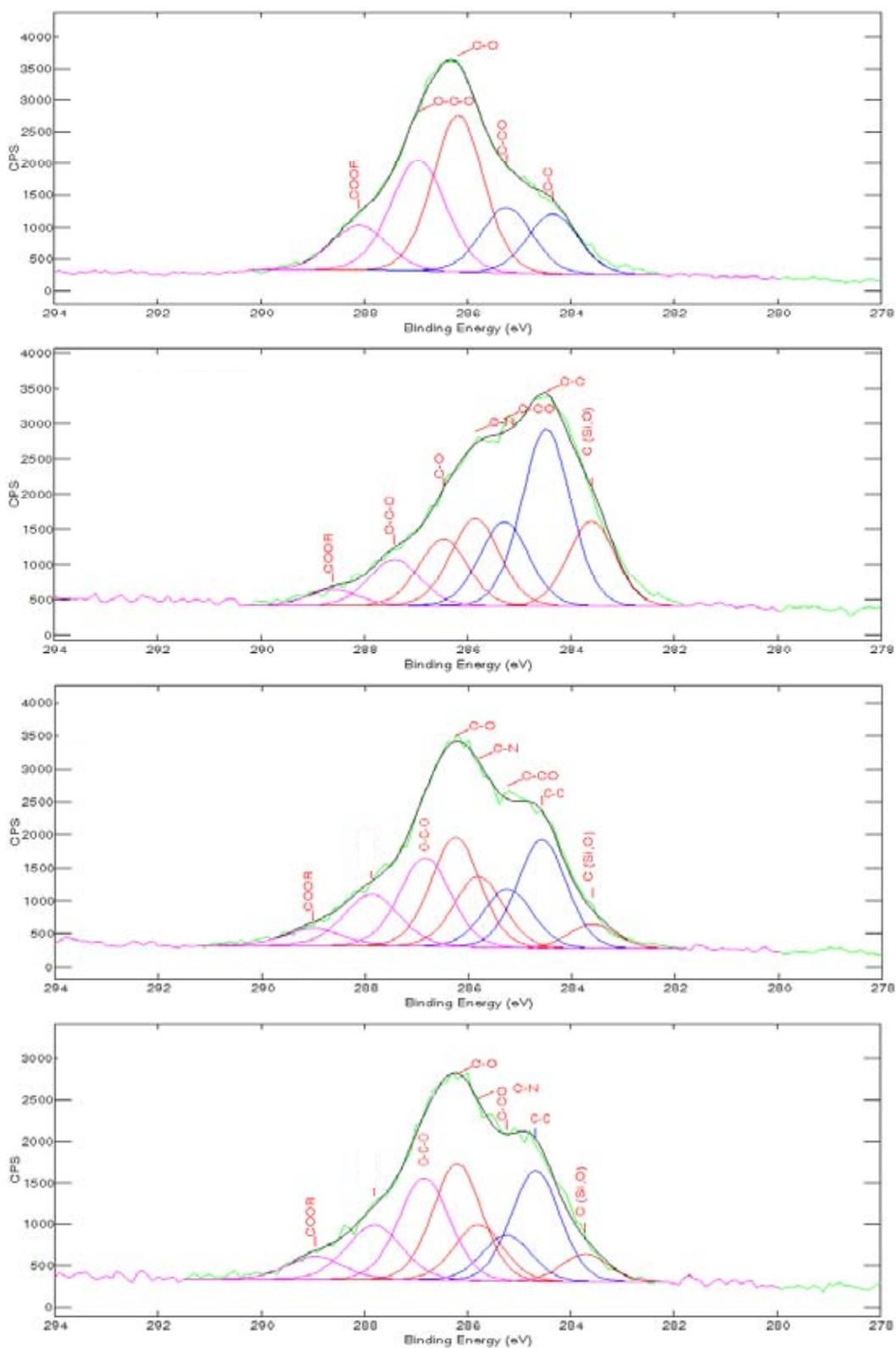


Figure 61 : Spectres XPS C1s sur le matériau compact : (A) Cellulose vierge ; (B) Cellulose + APTES ; (C) Cellulose + APTES + SMP ; (D) Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

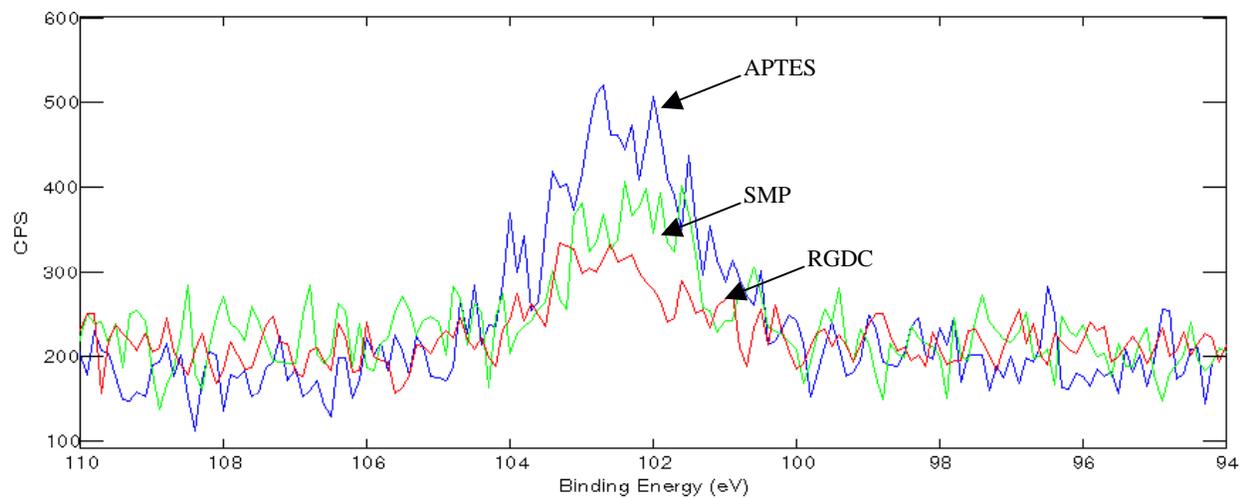


Figure 62 : Spectres XPS Si2p sur le matériau compact de Cellulose + APTES ; Cellulose + APTES + SMP ; Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

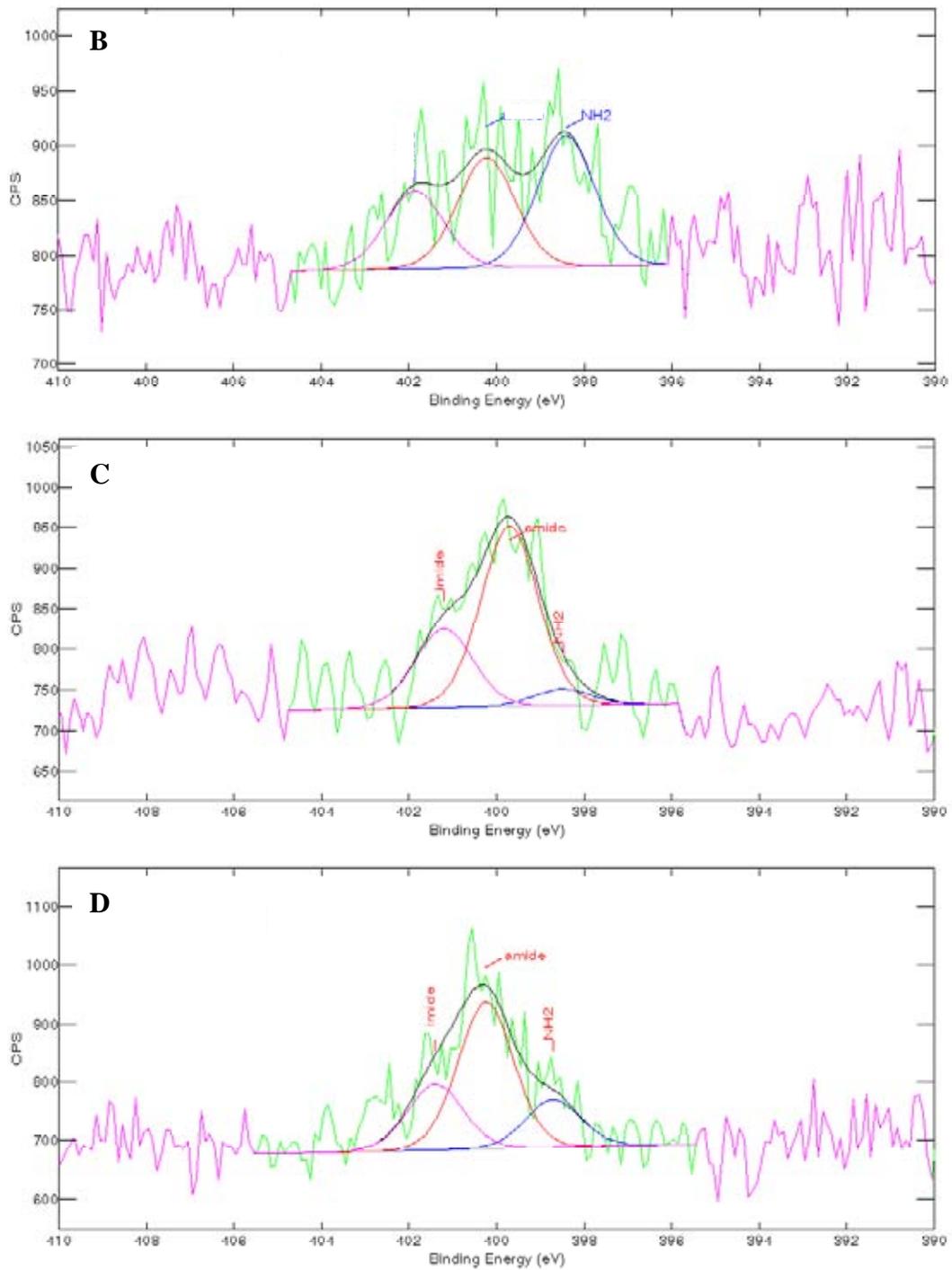


Figure 63 : Spectres XPS N1s sur le matériau compact : (B) Cellulose + APTES ; (C) Cellulose + APTES + SMP ; (D) Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

Liaisons	APTES	SMP	RGDC
C-O-Si	14.5	4.2	4.8
C-C	31.5	20.1	20.2
C-C-O	14.9	10.9	8.4
C-N	15.6	13.1	10.2
C-O	11.9	20.3	21.3
O-C-O	8.6	17.0	19.3
O=C-N	-	10.7	11.2
COOR	3.0	3.6	4.6

Tableau 18 : Composition expérimentale des liaisons chimiques (en %) obtenus par XPS à partir des déconvolutions du spectre C1s, des surfaces de cellulose compacte greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.

Liaisons	APTES	SMP	RGDC
Amine	40.6	6.0	18.4
Niveau d'oxydation "Amide"	35.1	65.5	56.4
Niveau d'oxydation "Imide"	24.3	28.5	25.2

Tableau 19 : Composition expérimentale des liaisons chimiques (en %) obtenus par XPS à partir des déconvolutions du spectre N1s, des surfaces de cellulose compacte greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.



Figure 64 : Lames de cellulose greffée à la ^{35}S -Cystéine, visualisées par imagerie β haute résolution a) après le greffage de l'acide aminé et b) après 162 heures passées dans l'eau sous agitation.

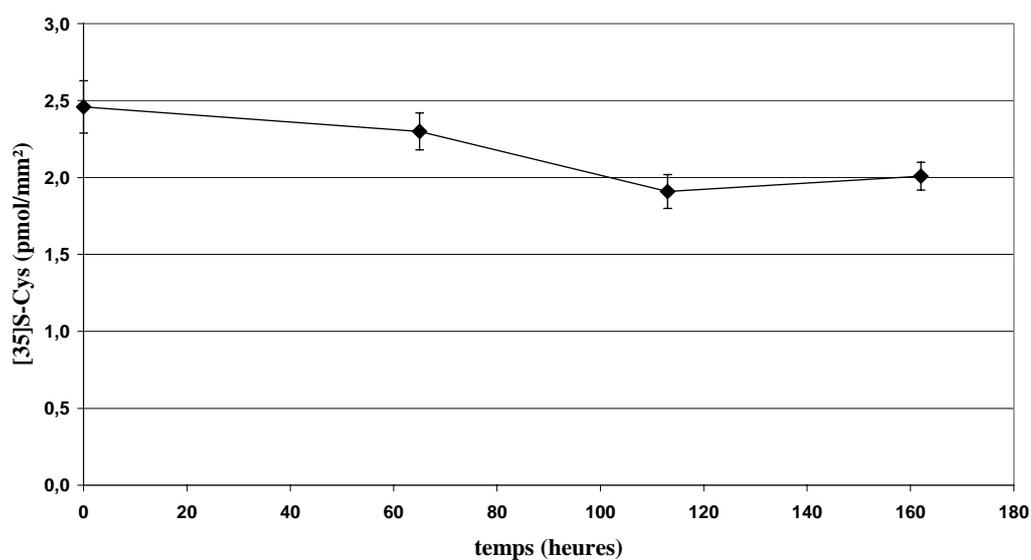


Figure 65 : Etude au cours du temps de la désorption de la ^{35}S -Cystéine greffée à la surface d'une lame de cellulose compacte lorsqu'elle est immergée dans de l'eau sous agitation.

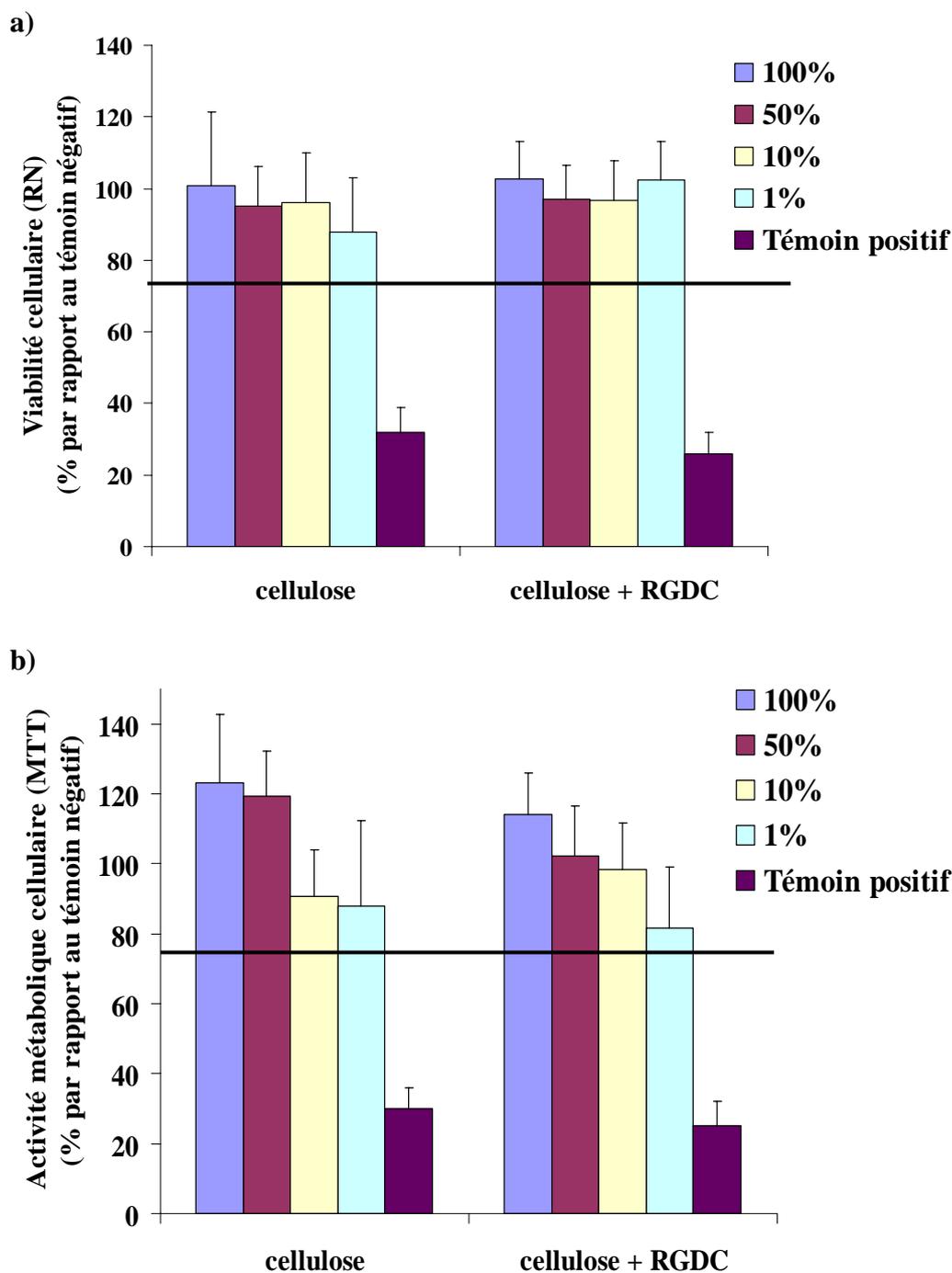


Figure 66 : Cytotoxicité de la cellulose compacte vierge et greffée de peptides RGDC.

a) Viabilité d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif et b) activité métabolique d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif (milieu de culture non dilué incubé dans les mêmes conditions que les matériaux) évaluée par le test au Rouge Neutre. Les extraits du matériau sont utilisés purs (100 % v/v) et à différentes dilutions (50 % v/v, 10 % v/v, 1 % v/v). Le témoin positif est une solution de phénol à une concentration finale de 6.4 g/l. (n = 5).

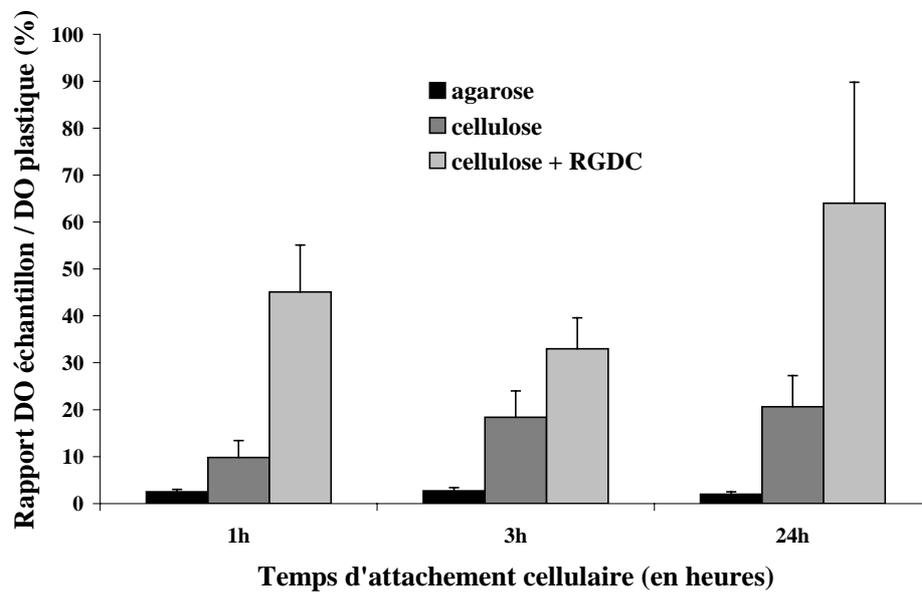


Figure 67 : Tests d'attachement de culture d'ostéoblastes humains à 1 heure, 3 heures et 24 heures sur cellulose compacte (n = 15).

%	C	O	Si	N	C / O	Si / N
Cellulose Nettoyée	57.2	42.8	-	-	1.3	-
	54.5	45.5			1.2	
Cellulose+APTES	63.5	30.7	3.5	2.3	2.1	1.5
	57.6	36.4	3	3	1.6	1
Cellulose+APTES+SMP	60.3	32.2	3.4	4.1	1.9	0.8
	59.1	34.1	2.3	4.5	1.7	0.5
Cellulose+APTES +SMP+RGDC	60.2	31.0	3.4	5.2	1.9	0.65
	55.6	30.5	1.4	12.5	1.8	0.11

Tableau 20 : Compositions atomiques **théoriques** et expérimentales (en %), et rapports atomiques (Si / N) **théoriques** et expérimentaux, obtenus par XPS des surfaces de cellulose poreuse vierge, greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.

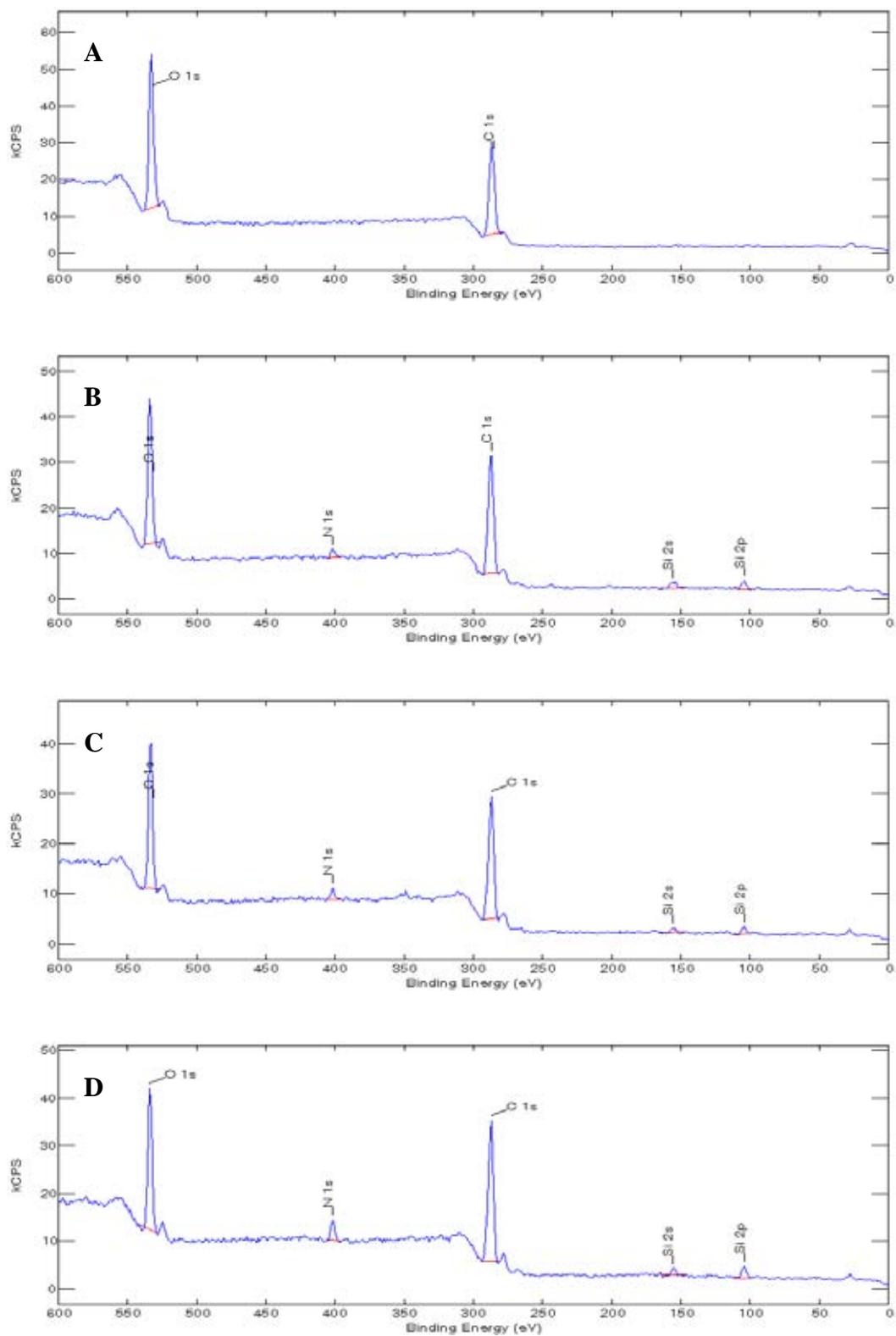


Figure 68 : Spectres généraux XPS sur le matériau poreux : (A) Cellulose vierge ; (B) Cellulose + APTES ; (C) Cellulose + APTES + SMP ; (D) Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

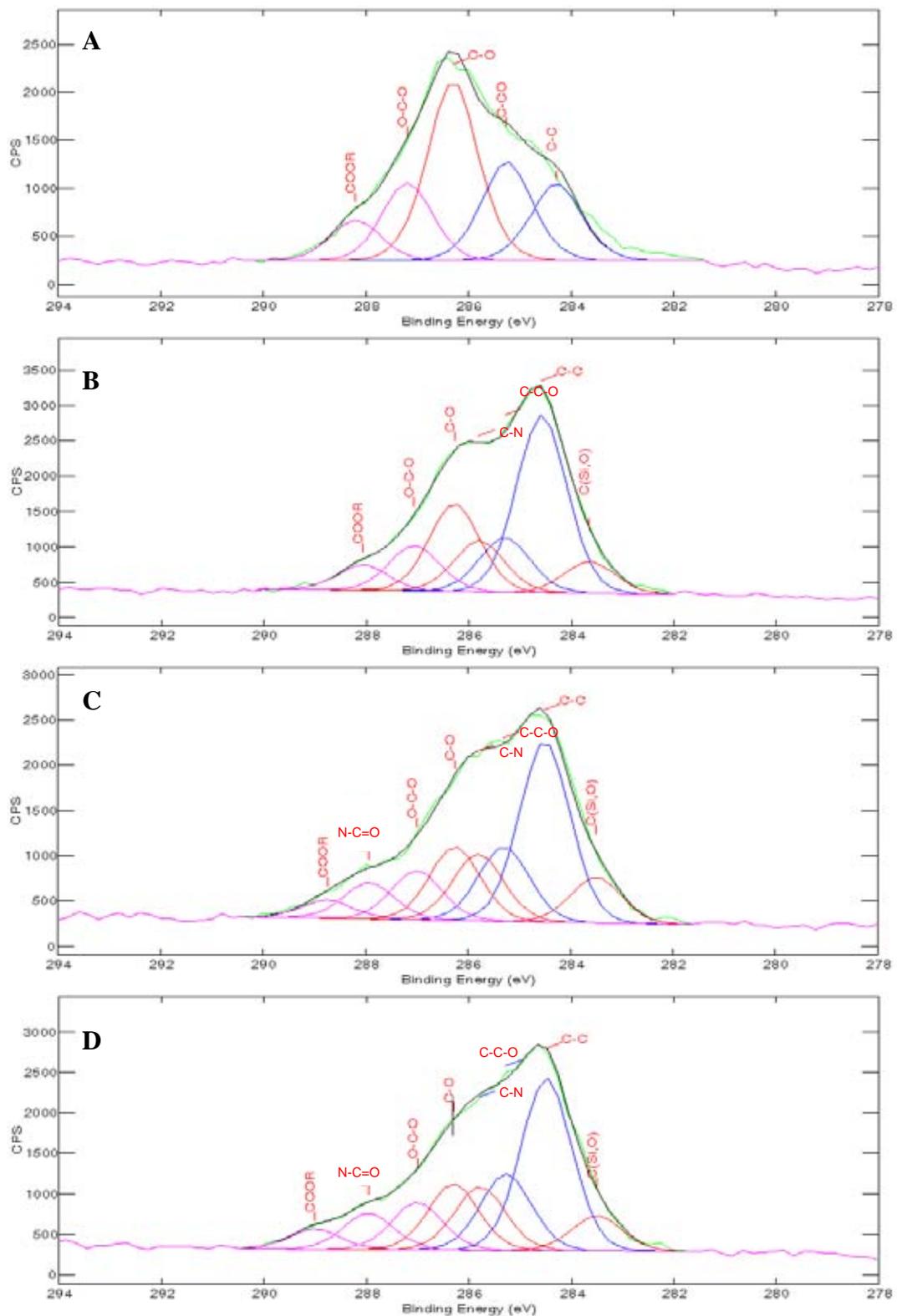


Figure 69 : Spectres XPS C1s sur le matériau poreux : (A) Cellulose vierge ; (B) Cellulose + APTES ; (C) Cellulose + APTES + SMP ; (D) Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

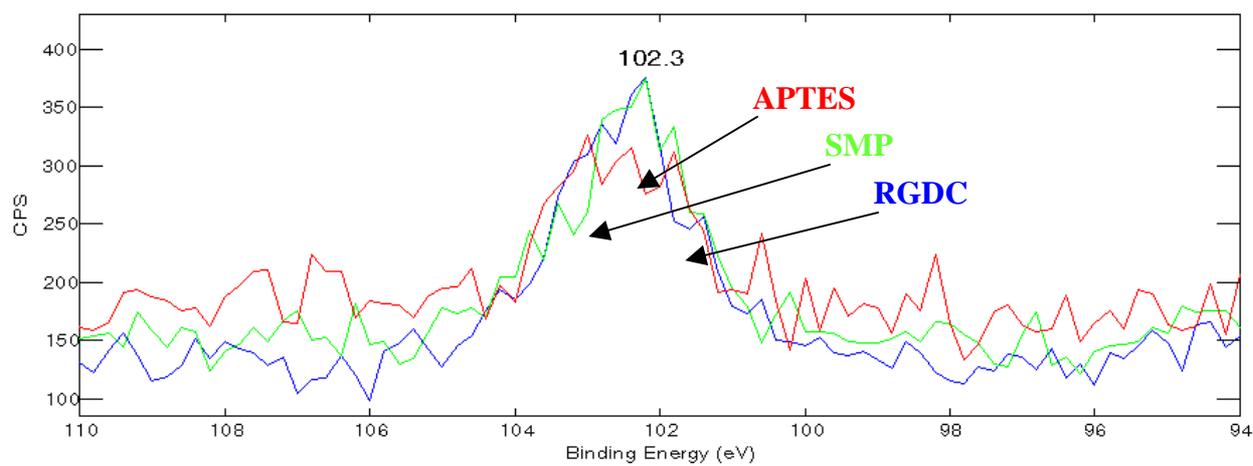


Figure 70 : Spectres XPS Si2p sur le matériau poreux de Cellulose + APTES ; Cellulose + APTES + SMP ; Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

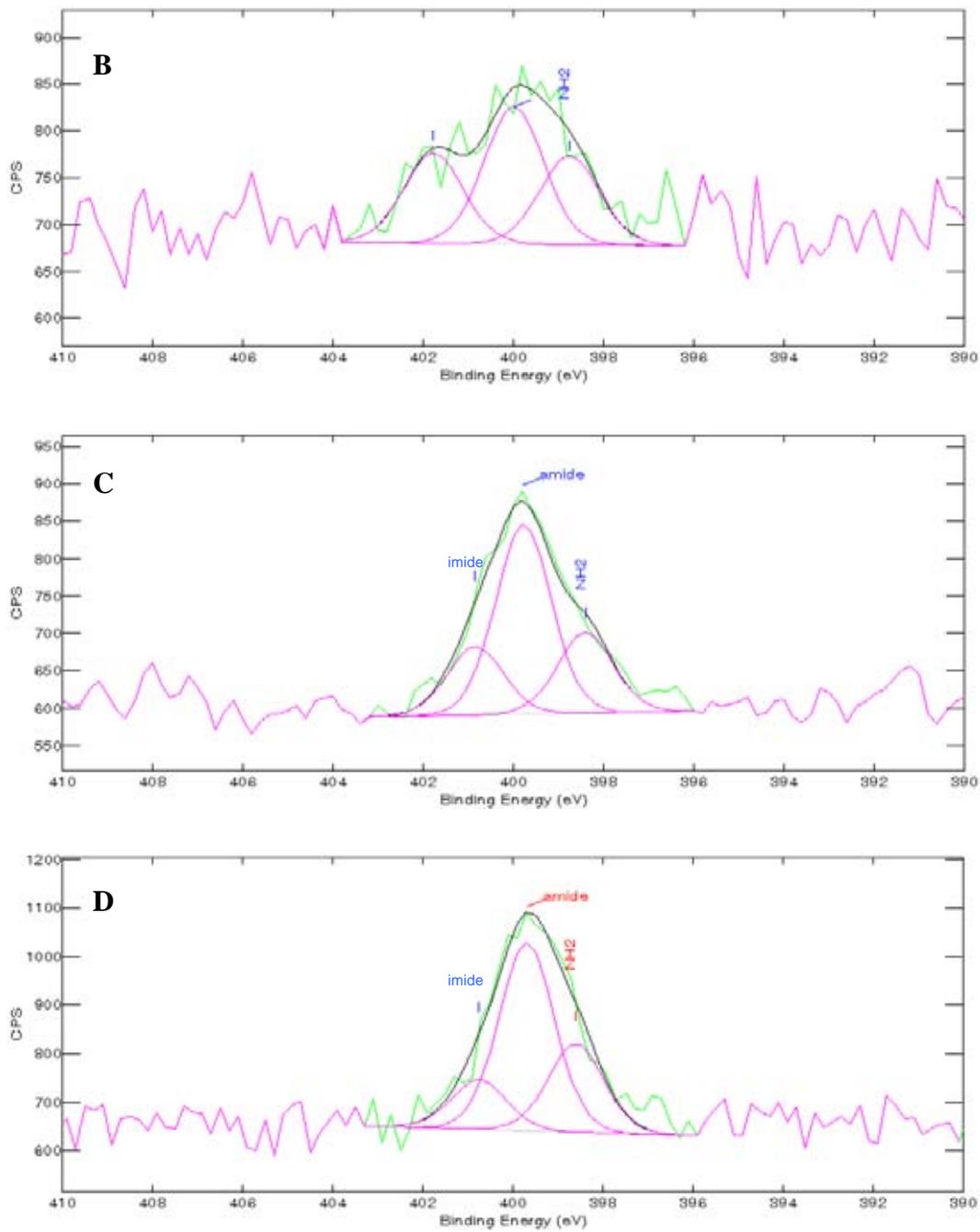


Figure 71 : Spectres XPS N1s sur le matériau poreux : (B) Cellulose + APTES ;
 (C) Cellulose + APTES + SMP ; (D) Cellulose + APTES + SMP + RGDC.

	APTES	SMP	RGDC
C-O-Si	6.6	8.3	6.7
C-C	37.6	33.2	33.4
C-C-O	11.5	13.7	14.8
C-N	10.8	12.3	12.3
C-O	18.6	13.5	12.8
O-C-O	9.6	9.1	9.2
O=C-N	-	6.7	7.1
COOR	5.3	3.2	3.7

Tableau 21 : Composition expérimentale des liaisons chimiques (en %) obtenus par XPS à partir des déconvolutions du spectre C1s, des surfaces de cellulose poreuse greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.

	APTES	SMP	RGDC
Amine	28.2	23.7	27.1
Niveau d'oxydation "Amide"	43.9	56.1	57.7
Niveau d'oxydation "Imide"	27.9	20.2	15.2

Tableau 22 : Composition expérimentale des liaisons chimiques (en %) obtenus par XPS à partir des déconvolutions du spectre N1s, des surfaces de cellulose poreuse greffée avec l'APTES, greffée avec le SMP et greffée avec le peptide RGDC.

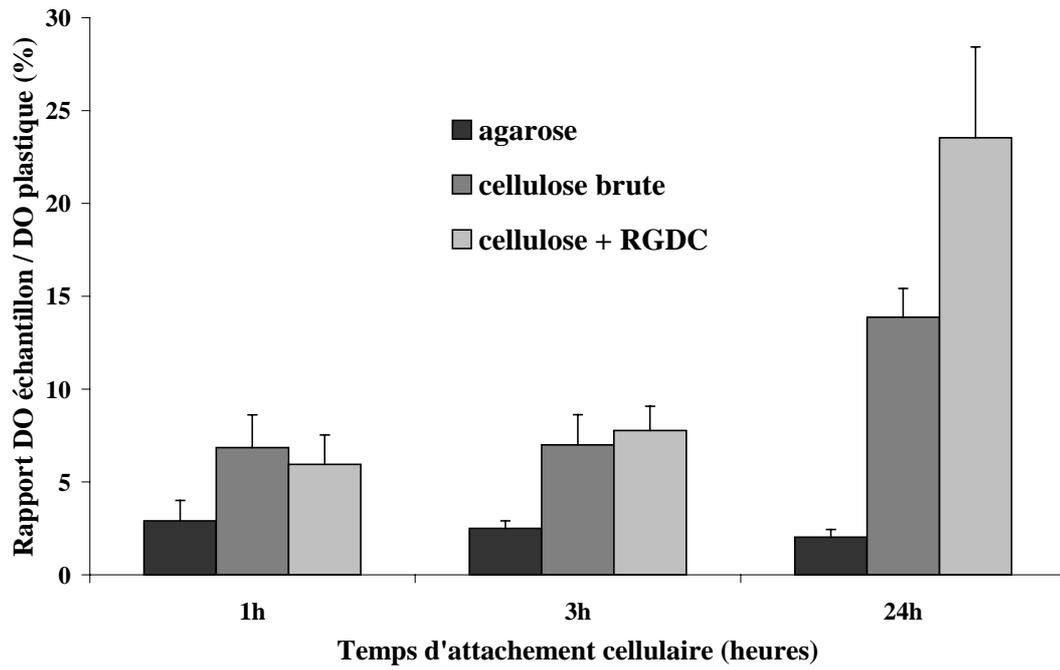


Figure 72 : Tests d'attachement de culture d'ostéoblastes humains à 1 heure, 3 heures et 24 heures sur cellulose macroporeuse (n = 15).

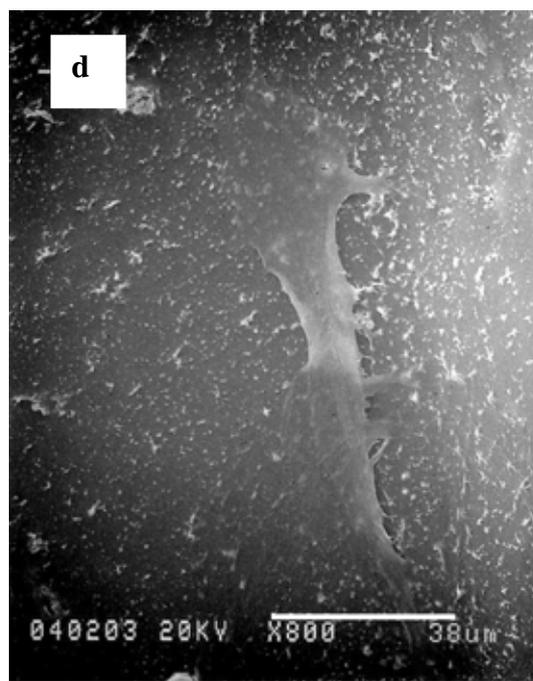
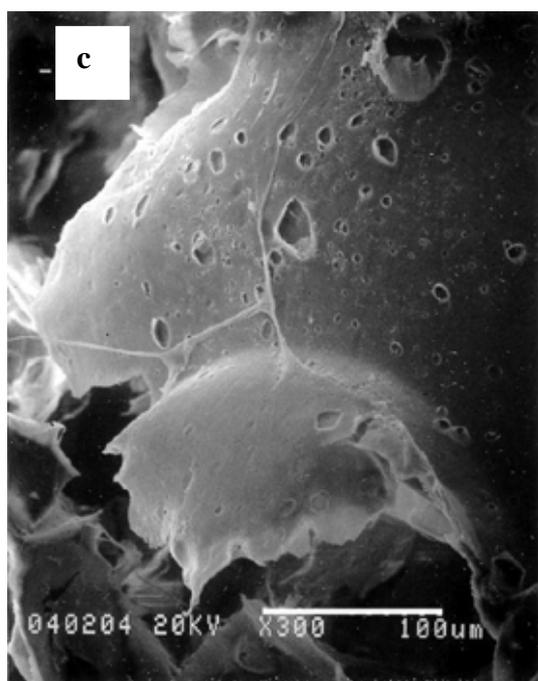
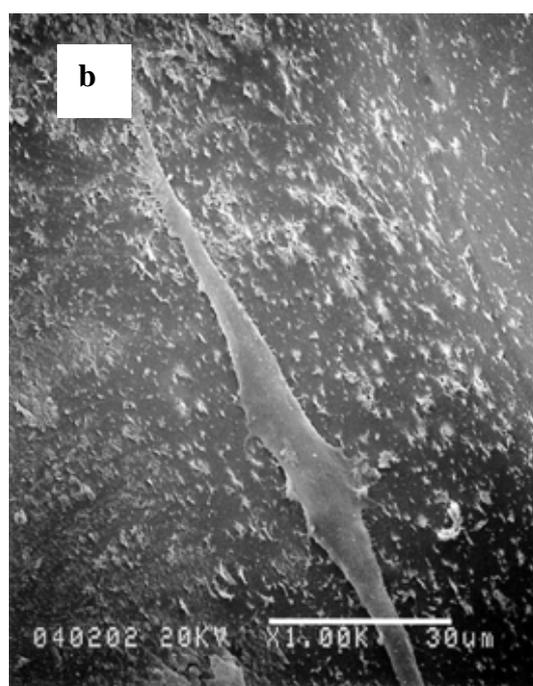
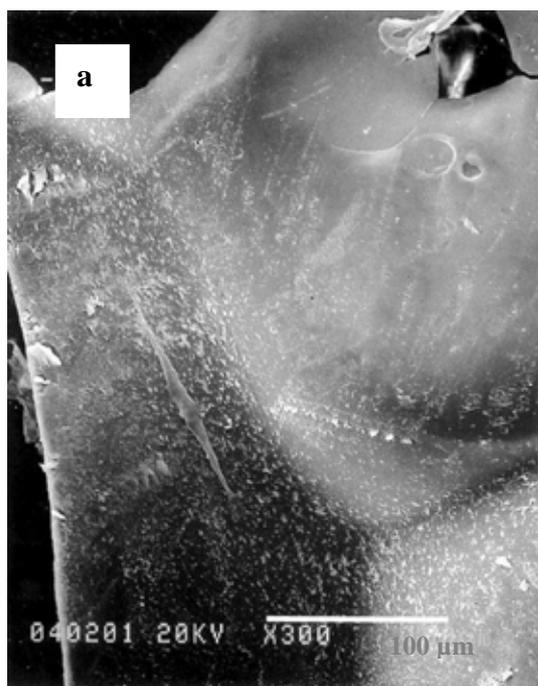


Figure 73 : Ostéoprogéniteurs ensemencés sur des matériaux de cellulose macroporeuse de porosité (1+2), greffés de peptide RGD. Observations au MEB de la surface des implants (a) x 300 et b) x 1000), et du coeur des implants (c) x 300 et d) x 800) après 24 heures d'ensemencement.

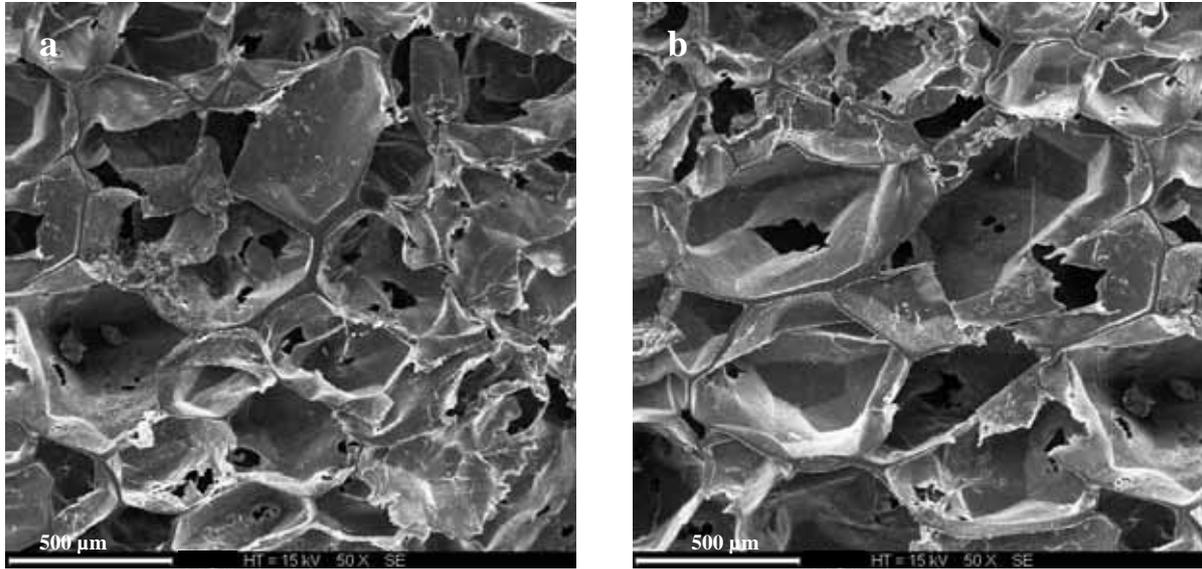


Figure 74 : Observation au MEB a) de la surface et b) du coeur des échantillons de cellulose de porosité (1+2), phosphatée pendant 8 heures, à un grossissement de 50.

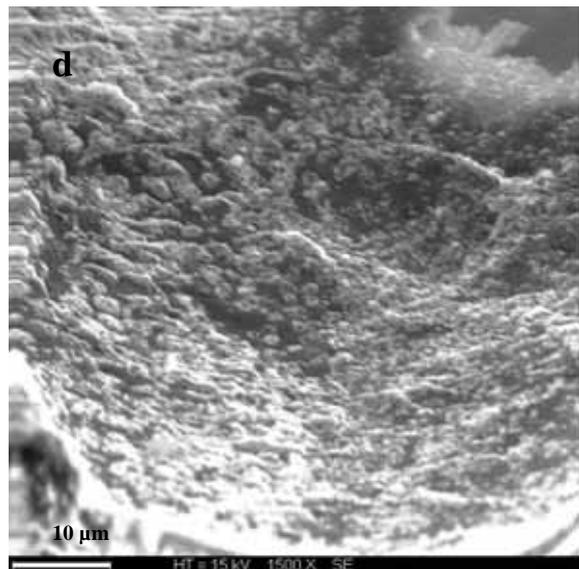
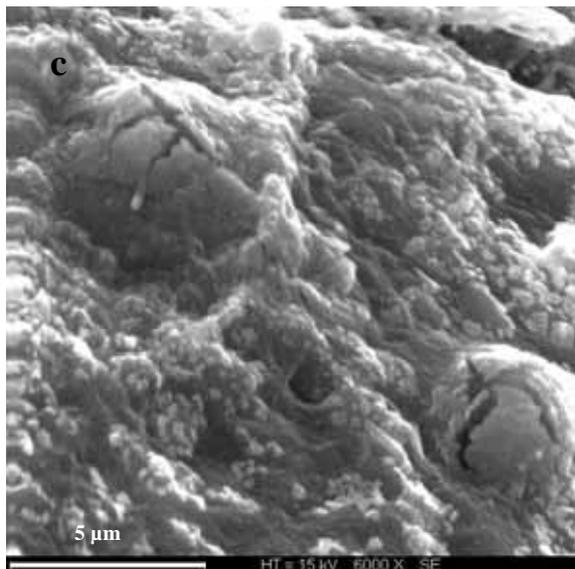
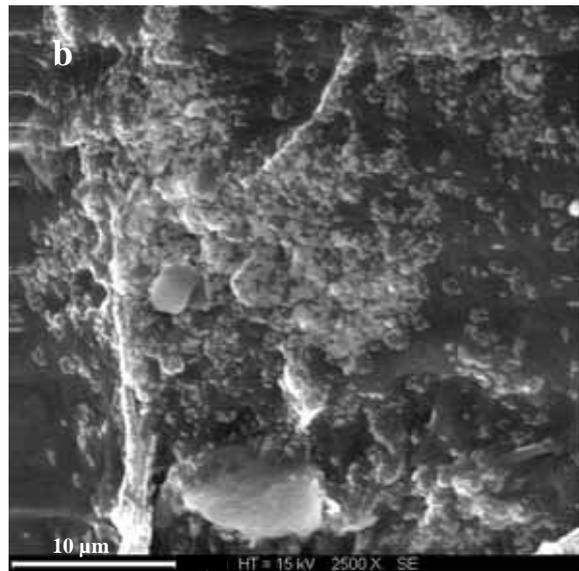
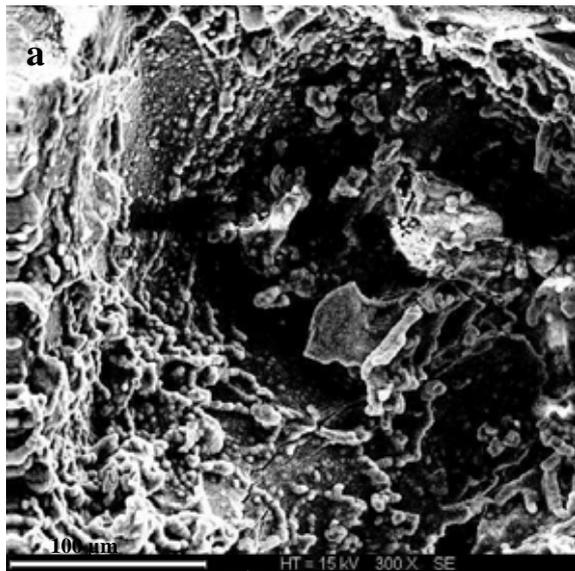


Figure 75 : Observation au MEB en surface (a, b et c) et au coeur (d) des échantillons de cellulose de porosité (1+2) phosphatée pendant 8 heures, puis minéralisée pendant 14 jours, à un grossissement de a) 300, b) 2500, c) 6000 et d) 1500.

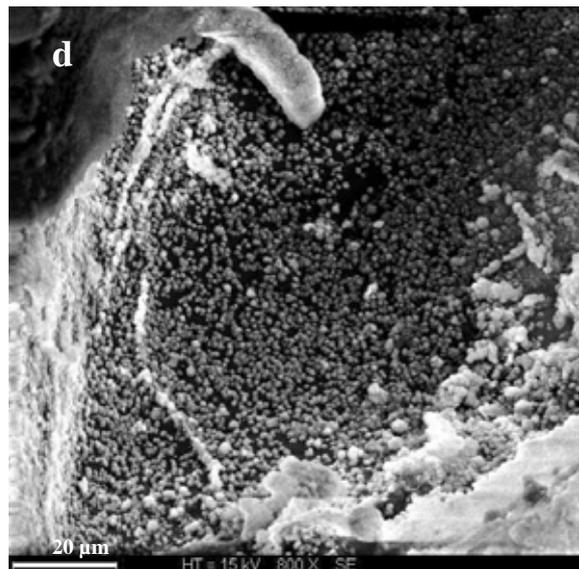
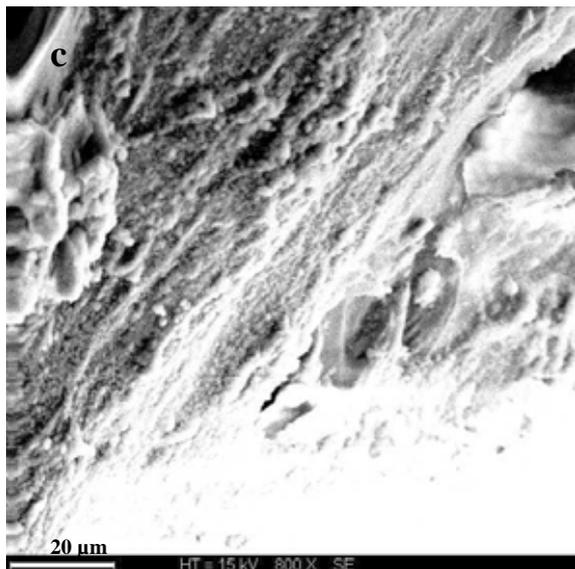
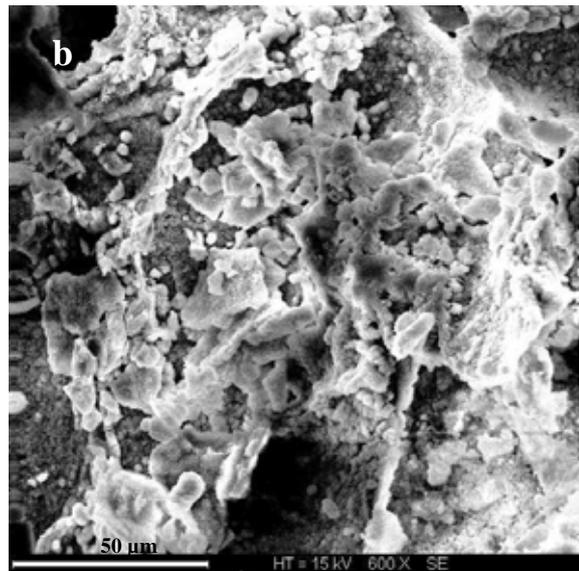
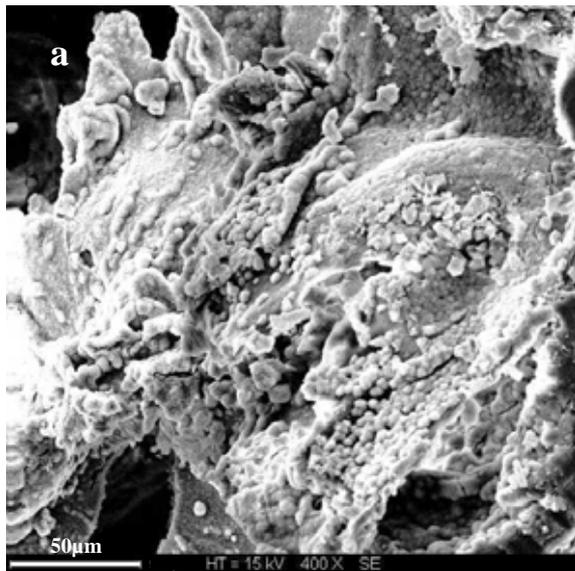


Figure 76 : Observation au MEB en surface (a, b et c) et au coeur (d) des échantillons de cellulose de porosité (1+2) minéralisée pendant 14 jours, à un grossissement de a) 400, b) 600, et c) et d) 800.

a)

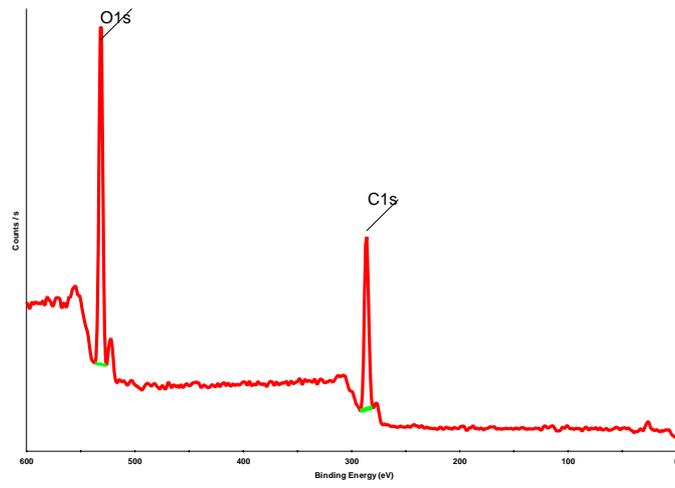
%	C	O	P	Ca	P/Ca	Pollutions
Cellulose	57.2 54.5	42.8 45.5	-	-		-
Cellulose phosphatée	50.8 40.0	45.6 53.3	1.5 6.7	-	-	Si : 2
Cellulose phosphatée + Ca	56.5 37.5	39.1 50.0	1.3 6.25	1.9 6.25	0.7 1	Cl : 1.1

b)

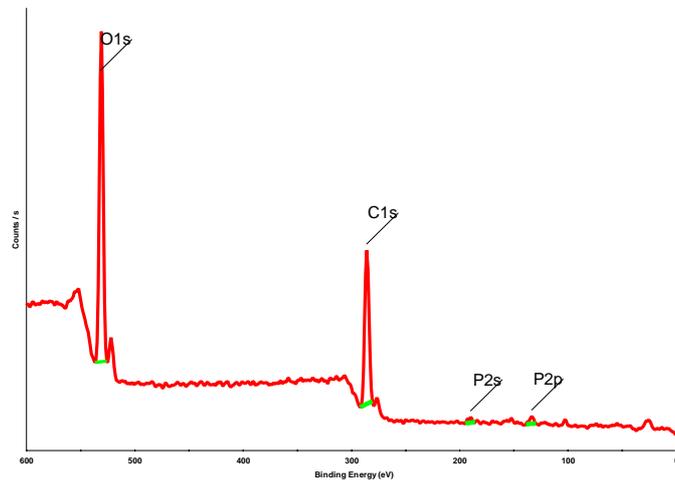
%	C	O	P	Ca	Na	Cl
Cellulose phosphatée minéralisée	54.8	37.3	1.6	0.6	4.2	1.5
Cellulose minéralisée	53.7	39.4	-	0.4	4.5	2

Tableaux 23 : Compositions atomiques **théoriques** et expérimentales (en %), et rapports atomiques (P/Ca) **théoriques** et expérimentaux, obtenus par XPS des surfaces de a) cellulose macroporeuse vierge ; phosphatée ; incubée dans une solution de CaCl_2 ; et b) phosphatée et minéralisée dans du SBF ; simplement minéralisée dans du SBF.

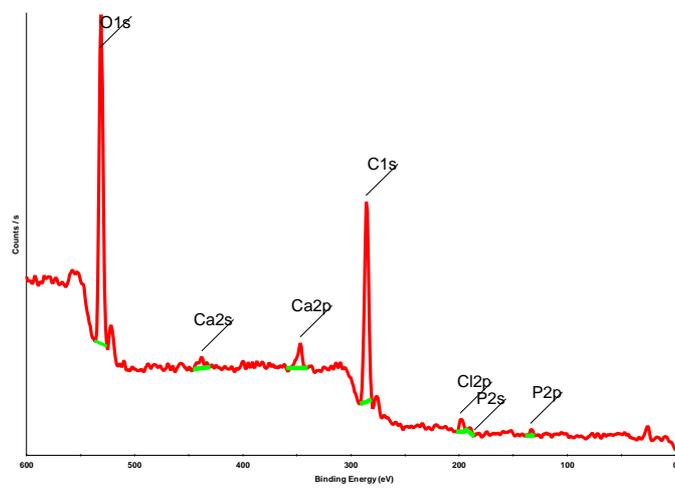
a)



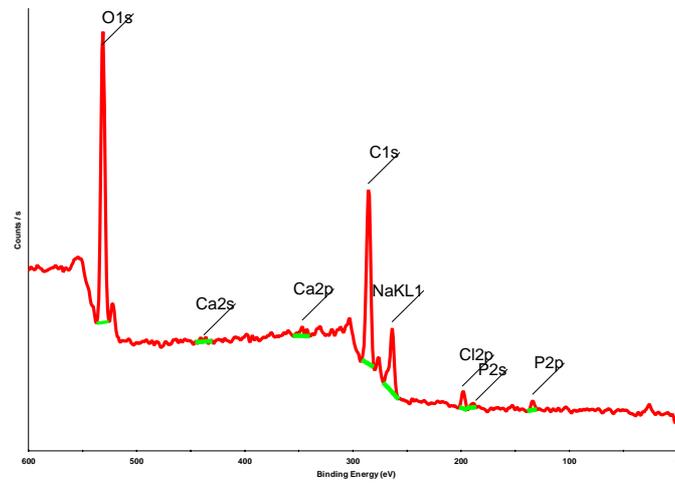
b)



c)



d)



e)

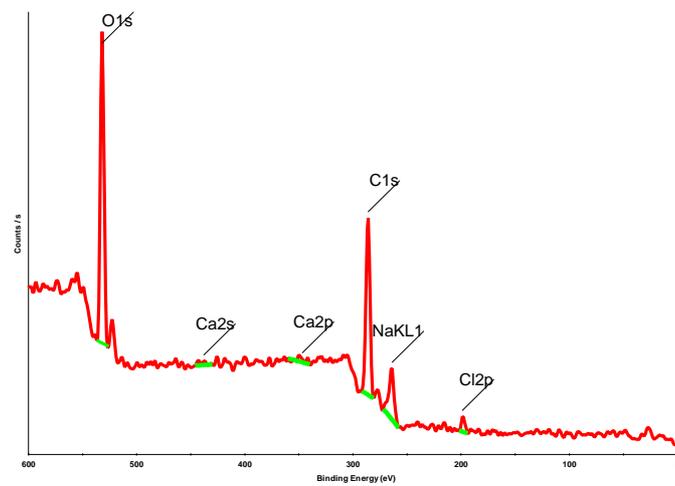


Figure 77 : Spectres généraux XPS sur le matériau poreux : a) Cellulose vierge ; b) Cellulose phosphatée ; c) Cellulose phosphatée pré-incubée dans une solution de calcium ; (d) Cellulose phosphatée minéralisée ; e) Cellulose minéralisée.

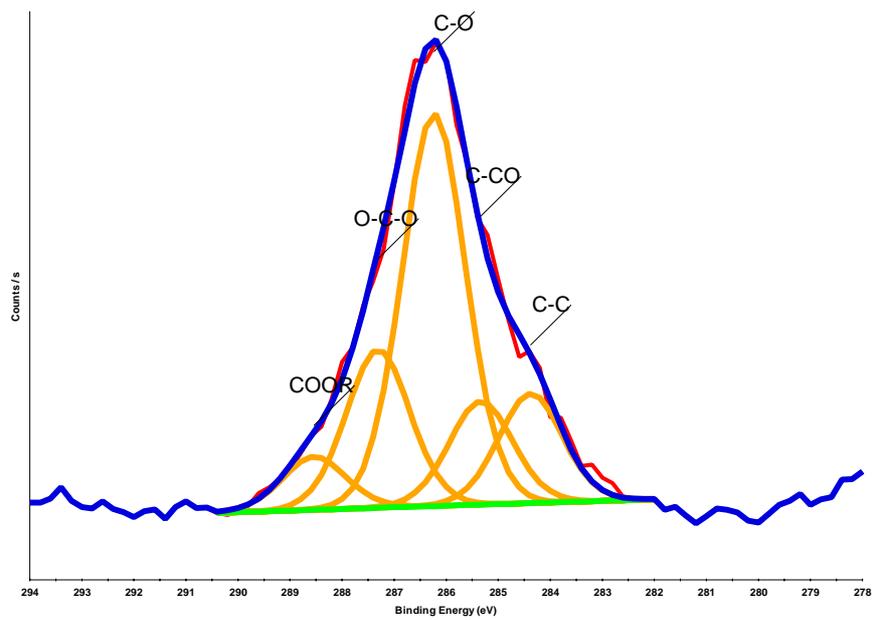


Figure 78 : Spectres XPS C1s de la cellulose vierge sur le matériau poreux.

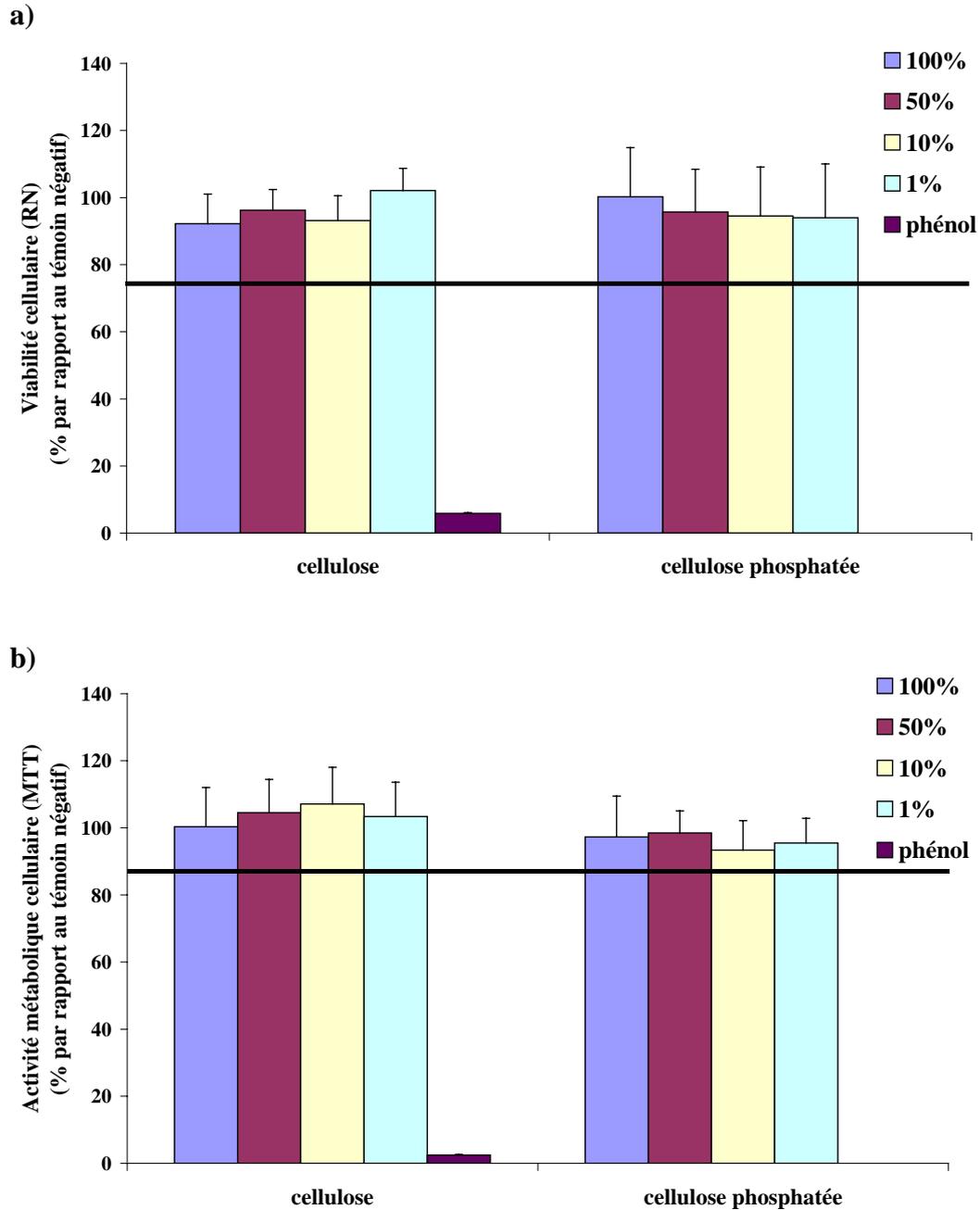


Figure 79 : Cytotoxicité de la cellulose poreuse vierge et phosphatée.

a) Viabilité d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif et b) activité métabolique d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif (milieu de culture non dilué incubé dans les mêmes conditions que les matériaux) évaluée par le test au Rouge Neutre. Les extraits du matériau sont utilisés purs (100 % v/v) et à différentes dilutions (50 % v/v, 10 % v/v, 1 % v/v). Le témoin positif est une solution de phénol à une concentration finale de 6,4 g/l. (n = 5).

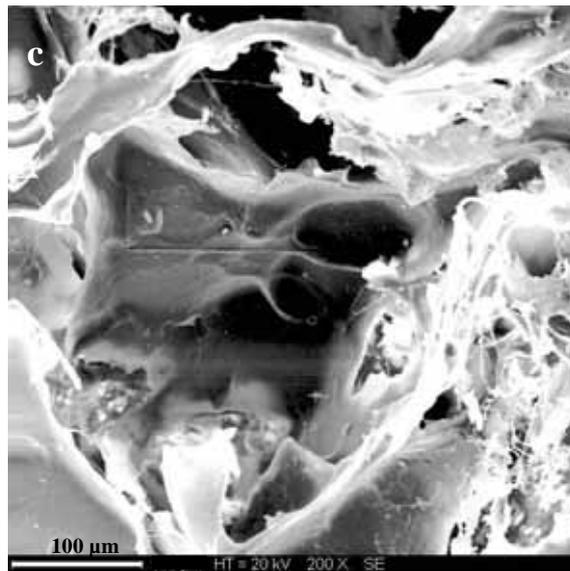
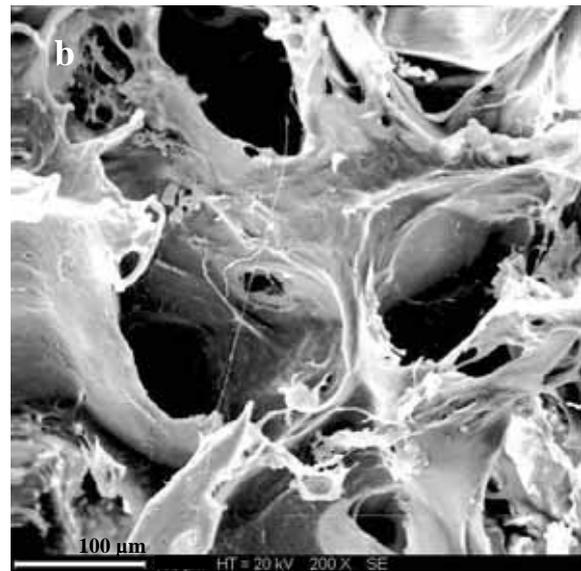
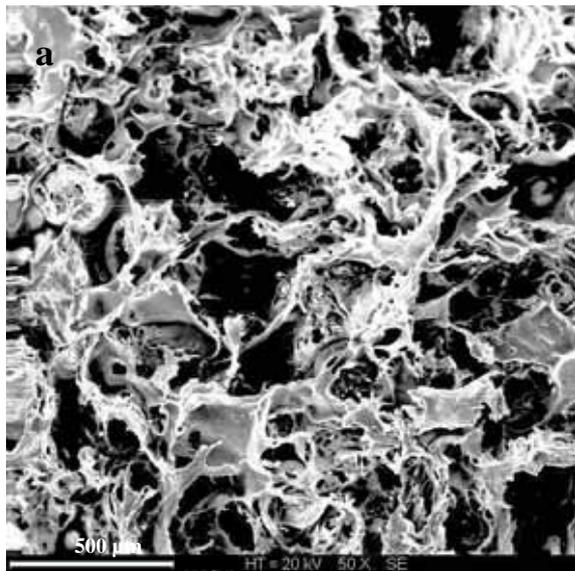


Figure 80 : Observation au MEB à un grossissement de a) 50, b) 200 et c) 200 de la surface des échantillons de cellulose oxydée à 0.5 M.

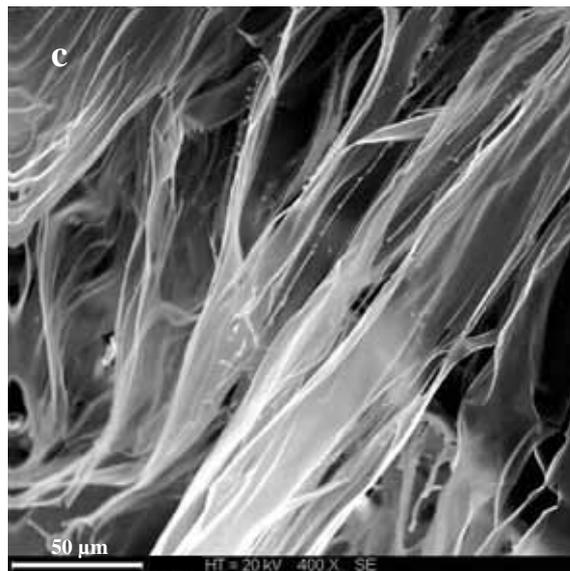
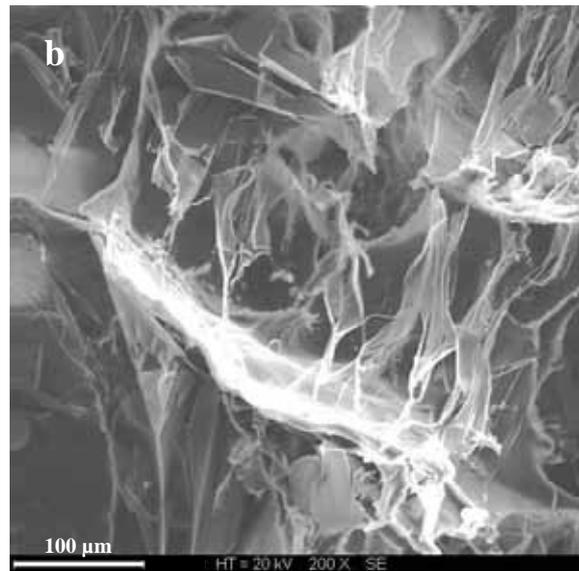
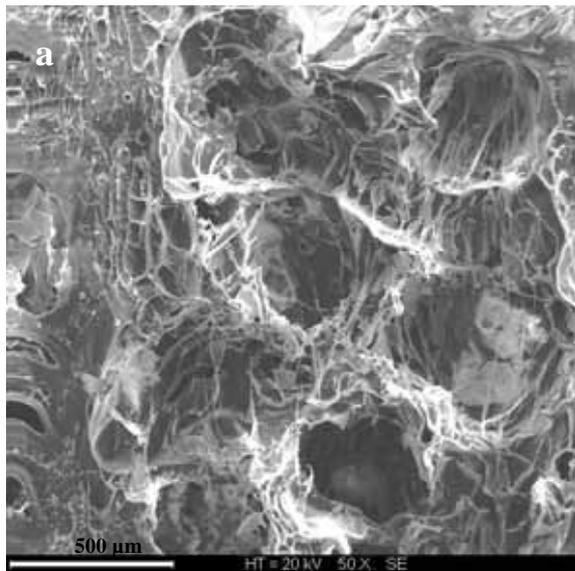


Figure 81 : Observation au MEB de la surface des échantillons de cellulose oxydée à 0.5 M et réticulée par de l'albumine à un grossissement de a) 50, b) 200 et c) 400.

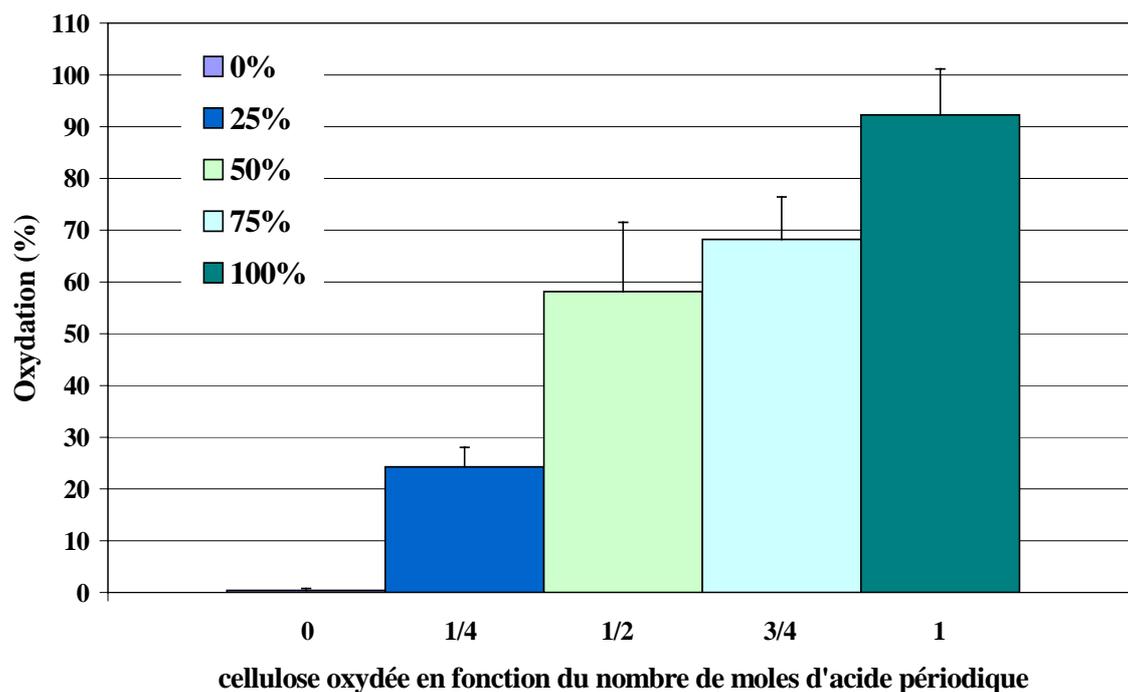


Figure 82 : Oxydation des matériaux déterminée par le dosage des aldéhydes en fonction du nombre de moles d'acide périodique utilisées pour oxyder la cellulose à 0 %, 25 %, 50 %, 75 % et 100 % : 1 mole de HIO_4 oxyde 1 unité glucose (soit 100 % d'oxydation).

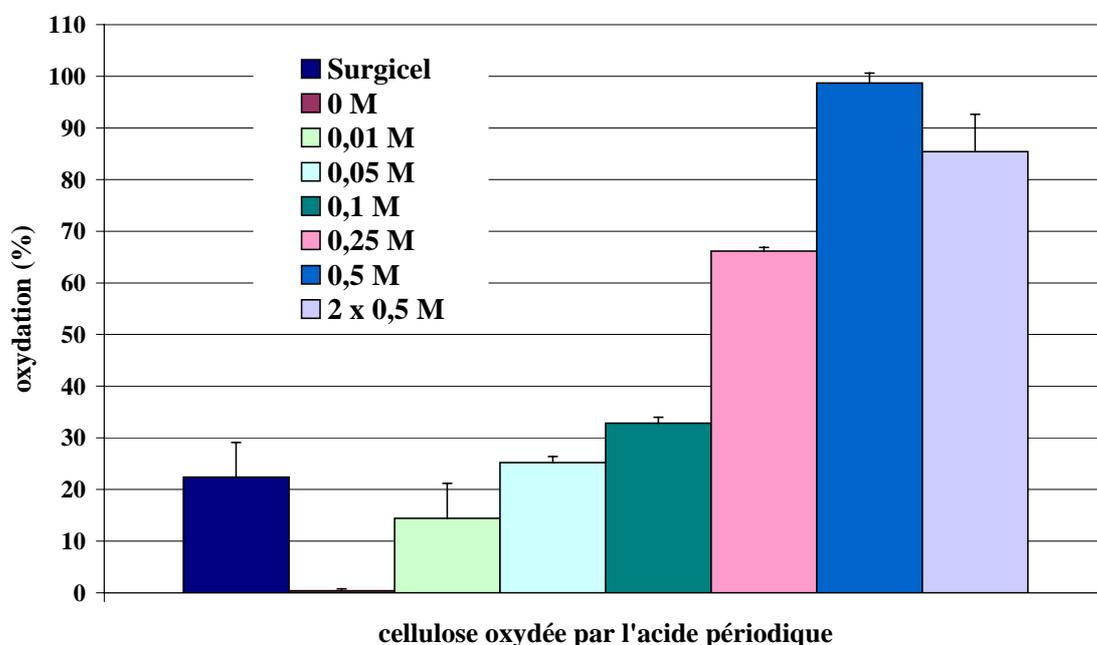


Figure 83 : Oxydation de la cellulose déterminée par le dosage des aldéhydes en fonction de la concentration d'acide périodique utilisé. Le lot (2 x 0.5 M) correspond à des matériaux oxydés une première fois à 0.5 M, puis immergés une deuxième fois dans une solution d'acide à 0.5 M.

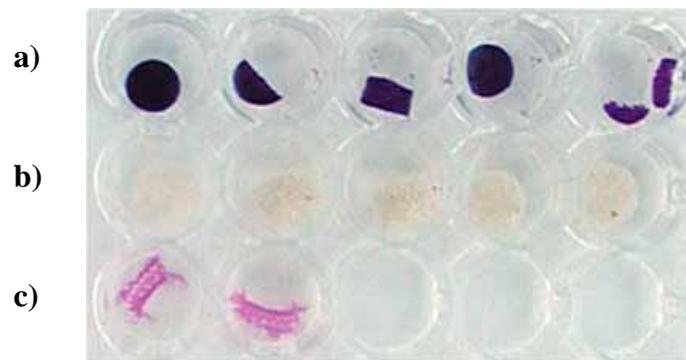


Figure 84 : Immersion dans du réactif de Schiff de : a) cellulose oxydée à 100 % ; b) cellulose non oxydée ; c) Surgicel[®] (cellulose oxydée entre 16 et 24 %).

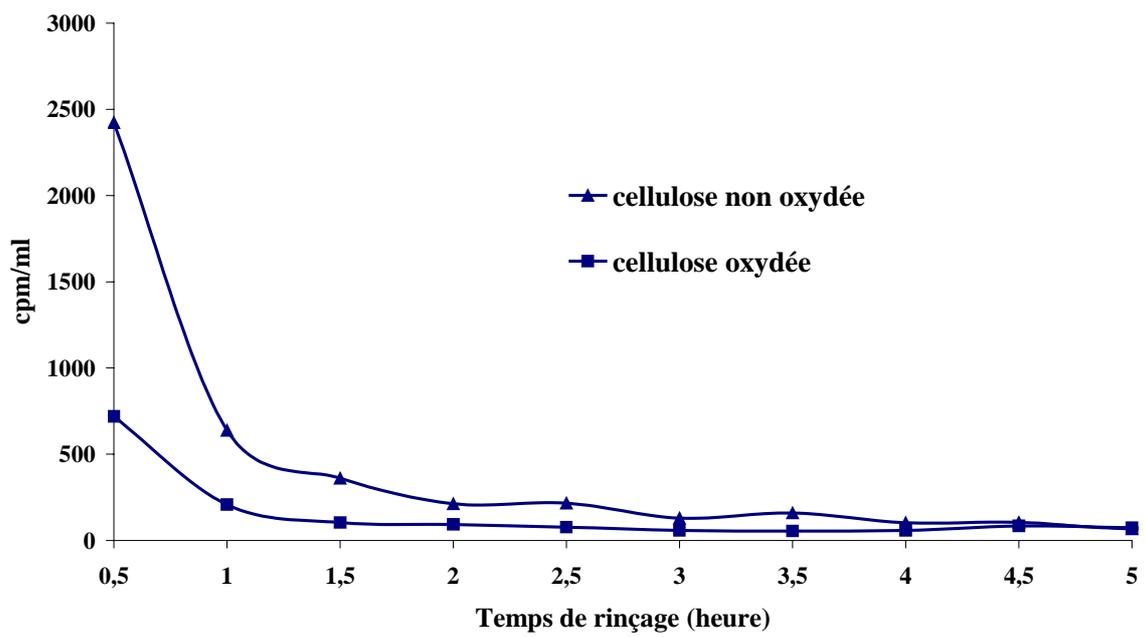


Figure 85 : Réticulation de la cellulose avec l'albumine : contrôle de la radioactivité volumique contenue dans les eaux de lavage.

matériaux	avant rinçage	après rinçage et avant échange		après échange	
	albumine absorbée, adsorbée ou/et greffée (mg/g de cellulose)	albumine adsorbée ou/et greffée (mg/g de cellulose)	albumine absorbée et adsorbée (mg/g de cellulose)	albumine adsorbée non échangée ou/et greffée (mg/g de cellulose)	albumine adsorbée échangée (mg/g de cellulose)
non oxydés	139 ± 23 100 %	13 ± 2 9 %	126 ± 21 91 %	10 ± 1 77 %	3 ± 1 23 %
oxydés	154 ± 12 100 %	93 ± 13 60 %	61 ± 19 40 %	88 ± 15 95 %	5 ± 1 5 %

Tableau 24 : Quantités d'albumine retenue (en mg/g de cellulose et en %) sur les matériaux de cellulose non oxydée et oxydée, avant et après le rinçage, et après l'échange avec l'albumine froide.

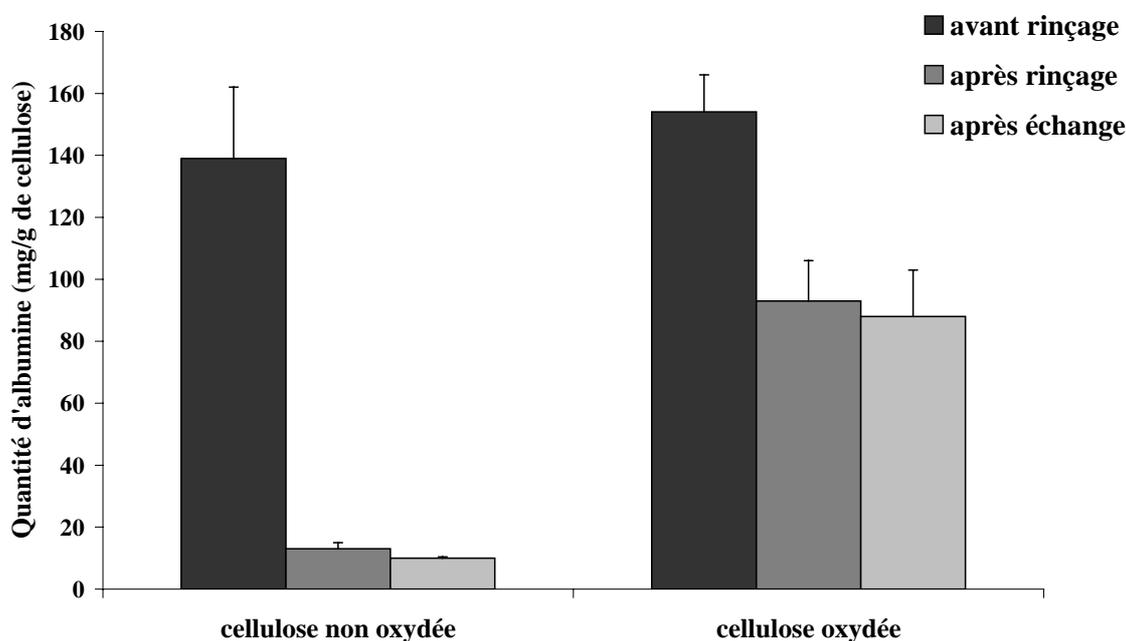
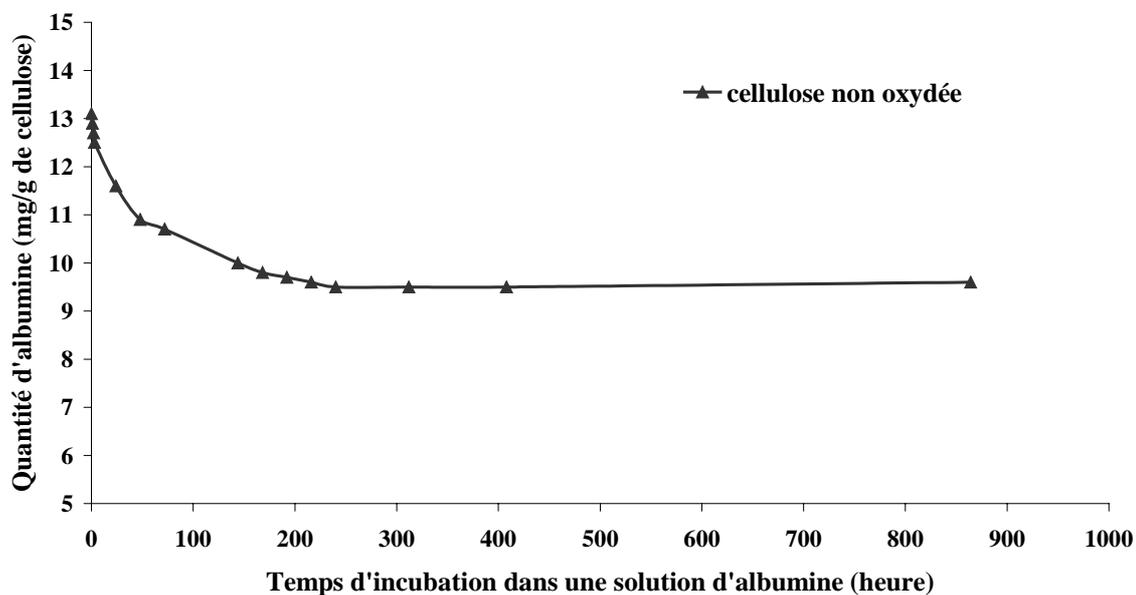


Figure 86 : Quantités d'albumine retenue (en mg/g de cellulose) sur les matériaux de cellulose non oxydée et oxydée, avant et après le rinçage.

a)



b)

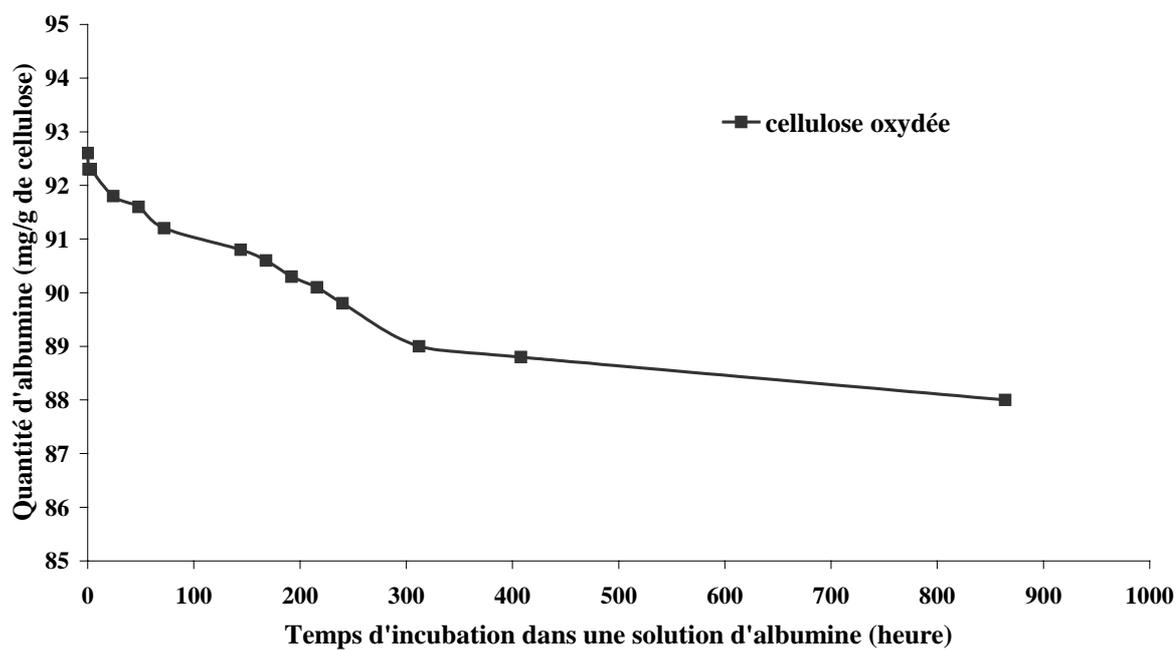


Figure 87 : Etude en fonction du temps d'échange entre l'albumine en solution et l'albumine adsorbée sur la cellulose a) non oxydée et b) oxydée.

%	C	O	N	S
Cellulose	57.2 54.5	42.8 45.5	-	-
Cellulose oxydée	54.0 54.5	46 45.5	-	-
Cellulose + albumine	62.2	21.7	13.9 15.9	2.3 2.0

Tableau 25 : Compositions atomiques **théoriques** et expérimentales (en %), obtenus par XPS des surfaces de cellulose macroporeuse vierge, oxydée et réticulée avec de l'albumine.

Liaisons	Cellulose	Cellulose oxydée	Cellulose + albumine
C-C	16.3	10.6	44.4
C-CO	14.5	10.1	7.2
C-N	-	-	22.0
C-O	45.7	45.9	4.2
O-C-O	18.8	28.6	-
N-C=O	-	-	17.4
COOR	4.7	4.8	4.8

Tableau 26 : Composition expérimentale des liaisons chimiques (en %) obtenus par XPS à partir des déconvolutions du spectre C1s, des surfaces de cellulose nettoyée, oxydée et réticulée avec de l'albumine.

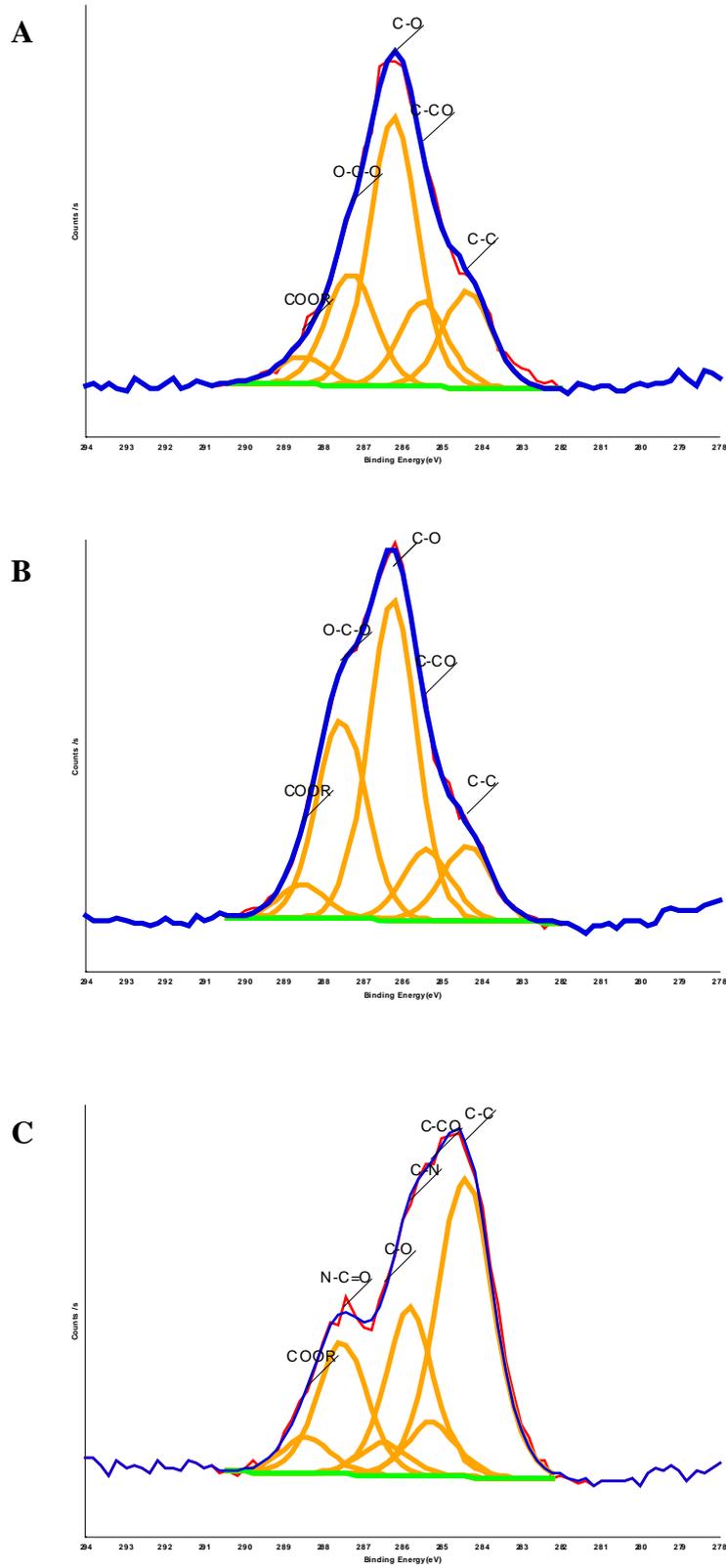


Figure 89 : Spectre XPS C1s sur la cellulose macroporeuse : (A) nettoyée ; (B) oxydée ; (C) réticulée avec de l'albumine.

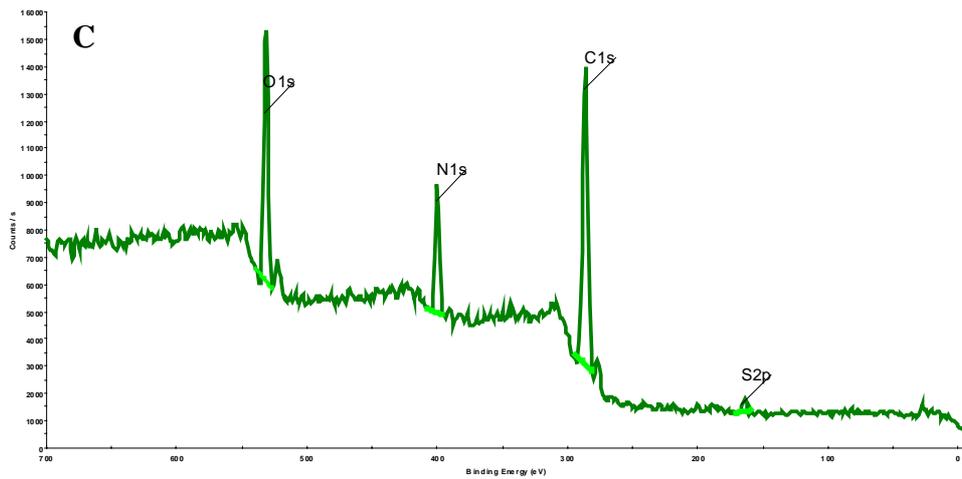
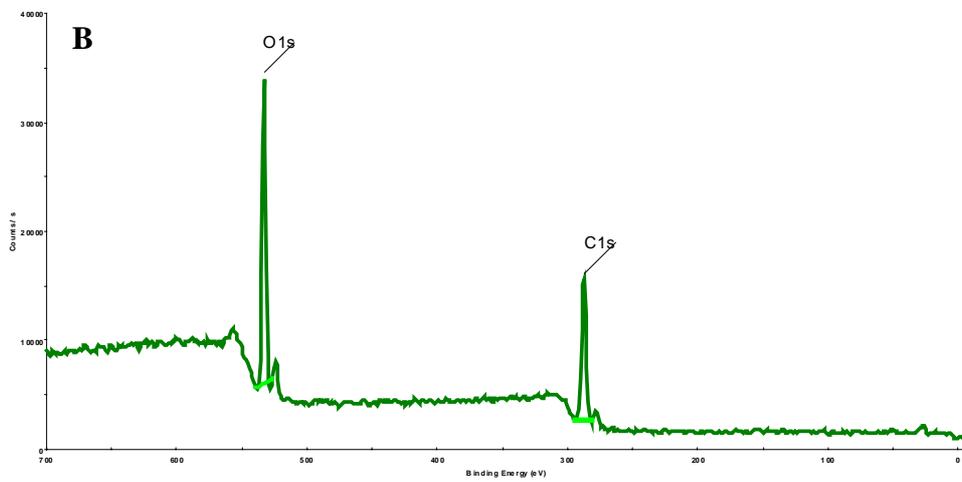
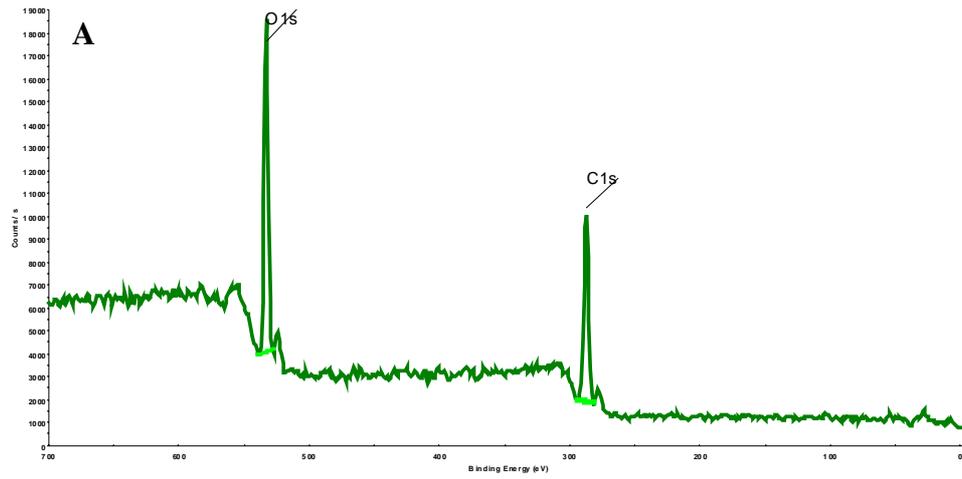


Figure 88 : Spectre généraux XPS sur la cellulose macroporeuse : (A) nettoyée ; (B) oxydée ; (C) réticulée avec de l'albumine.

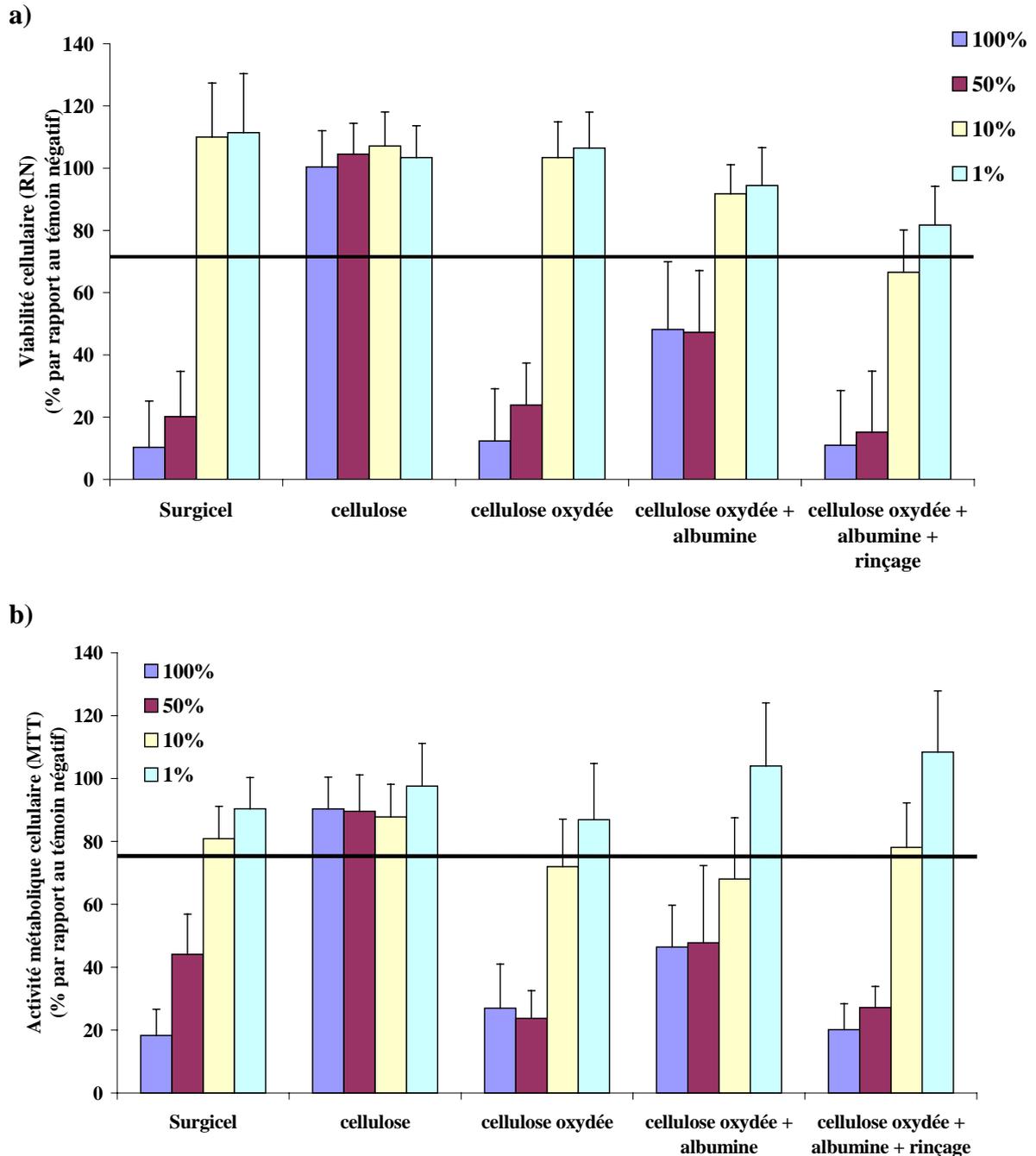


Figure 90 : Cytotoxicité du Surgicel et de la cellulose macroporeuse vierge, oxydée, réticulée avec de l'albumine, réticulée avec de l'albumine et rincée.

a) Viabilité d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif et b) activité métabolique d'ostéoblastes humains exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif (milieu de culture non dilué incubé dans les mêmes conditions que les matériaux) évaluée par le test au Rouge Neutre. Les extraits du matériau sont utilisés purs (100 % v/v) et à différentes dilutions (50 % v/v, 10 % v/v, 1 % v/v). Le témoin positif est une solution de phénol à une concentration finale de 6.4 g/l. (n = 5).

Caractérisation et modification de viscocellulose macroporeuse en vue de son utilisation comme matériau de comblement osseux

Les pathologies ostéo-articulaires dégénératives, les tumeurs de l'appareil locomoteur et le vieillissement des populations nécessitent à des degrés variables des greffes osseuses.

La cellulose macroporeuse pourrait représenter une solution intéressante au comblement des défauts osseux : c'est un matériau biocompatible, ostéoconducteur et dont l'hygroscopie entraîne une expansion volumique du matériau *in situ*, permettant un comblement adapté au défaut mais aussi une fixation aux tissus osseux.

La stratégie retenue pour ce travail a donc été de réaliser tout d'abord un matériau cellulosique macroporeux avec une architecture proche de celle de l'os : avec une taille de pores et un volume poreux appropriés afin de fournir un échafaudage pour la régénération du tissu osseux.

Ensuite la capacité d'intégration de ces implants a pu être améliorée en associant à sa surface des facteurs biologiques aptes à réguler ses relations avec le milieu vivant.

Des méthodologies de greffage de molécules bioactives d'une part et de réticulation du matériau avec des protéines humaines d'autre part, ont été développées afin d'accroître l'affinité des cellules pour le matériau. En effet, un implant associé à des peptides ou à des protéines humaines, pourrait mimer une matrice extracellulaire en exposant des séquences peptidiques reconnaissables par les récepteurs membranaires impliqués dans l'adhésion cellulaire. L'immobilisation covalente de ces séquences à la surface de l'implant devrait assurer un succès sur le long terme de l'interface cellule/matériau. L'efficacité d'un tel revêtement biomimétique a été confirmée par l'étude de l'attachement d'ostéoblastes humains sur la cellulose greffée.

D'autre part la phosphorylation de la cellulose a été envisagée. Grâce à son affinité avec le calcium, la cellulose phosphorylée a montré sa capacité de minéralisation en surface et au cœur des implants lorsque ceux-ci sont immergés dans une solution simulant les fluides biologiques interstitiels (SBF).

Characterization and modification of a new candidate biomaterial for bone filling: macroporous regenerated cellulose

Although bone tissue possesses the capacity for regenerative growth, the bone repair process is impaired in many clinical and pathological situations. Ideally, scaffolds for bone replacement should act as frameworks to direct cell growth and extracellular matrix formation according to a 3D pattern. To design them, several parameters can be adjusted: appropriate pore size and pore structure are necessary to ensure nutrition of cells within the scaffold, and to provide room for tissue regeneration.

As bulky regenerated cellulose has been shown to be biocompatible and osteoconductive, and a macroporous version of this material could bring an interesting solution for bone filling. Another asset of this material is its hygroexpansivity which enable cellulosic implants to absorb aqueous liquids like blood, and to swell in the bone defect in order to occupy any available space around them and to lead to their self-anchoring.

In order to elaborate a new generation of bone implant, the purpose of this work has been to immobilize by covalent grafting onto cellulose surface, either active peptides containing the –Arg-Gly-Asp– sequence, or human proteins, in order to increase cell-material attachment as well as osteogenesis. The covalent immobilization of these target molecules is crucial to assure the long-term success of a cell-surface interface as it better prevents the peptidic material from denaturation than a simple coating. Finally, the efficiency of this biomimetic modification was investigated by studying human osteoprogenitor cells interactions with peptide functionalized surfaces.

Next, cellulose was chemically modified by phosphorylation. It seemed that phosphorylated cellulose has been able to promote the formation of calcium phosphates at the surface and in the bulk of the material, when macroporous implants were immersed into simulated body fluid (SBF).