

Caractérisation multimodale de l'ostéointégration et du remodelage osseux en fonction de l'environnement

par

Florian GUILLAUME

THÈSE PRÉSENTÉE EN COTUTELLE À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE
SUPÉRIEURE ET À L'UNIVERSITÉ PARIS-EST
COMME EXIGENCE PARTIELLE À L'OBTENTION
DU DOCTORAT EN GÉNIE
Ph.D.

MONTRÉAL, LE 30 MARS 2021

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
&
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES, INGÉNIERIE ET ENVIRONNEMENT
UNIVERSITÉ PARIS-EST



Florian GUILLAUME, 2021



Cette licence [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de mentionner l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

PRÉSENTATION DU JURY

CETTE THÈSE A ÉTÉ ÉVALUÉE

PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

Yvan PETIT, directeur de thèse
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

Guillaume HAIAT, co-directeur de thèse
Directeur de recherche CNRS, au Laboratoire Modélisation et Simulation Multi Échelle

Catherine LAPORTE, présidente du jury
Département de génie électrique à l'École de technologie supérieure

Michel BEHR, membre externe indépendant pour l'ÉTS et rapporteur pour l'UPE
Chargé de recherche à l'UGE, au Laboratoire de Biomécanique Appliquée Faculté de Médecine Nord

Heidi-Lynn PLOEG, membre externe pour l'ÉTS et rapporteur pour l'UPE
Department of Mechanical and Material Engineering at Queen's University

Éric WAGNAC, membre du jury pour l'ÉTS et examinateur pour l'UPE
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

Sophie LE CANN, membre du jury pour l'ÉTS et co-encadrante pour l'UPE
Chargée de recherche CNRS au Laboratoire Modélisation et Simulation Multi Échelle

ELLE A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 12 MARS 2021

À L'UNIVERSITÉ PARIS-EST

AVANT-PROPOS

Pour faciliter la lecture et alléger le texte, le lecteur est informé que, dans le présent document, les références citées après la fin d'une phrase font gage de référence pour tout le texte les précédant jusqu'à la dernière référence citée. Les références citées à la fin d'un paragraphe concernent, elles, tout le paragraphe.

Exemples :

1) Phrase 1 (Référence 1). Phrase 2. Phrase 3. (Référence 2) Phrase 4 facultative.

Ici, la référence 1 concerne seulement la phrase 1. La référence 2, quant à elle, concerne les phrases 2 et 3, mais ne concerne pas la phrase 1. La phrase 4 n'est pas concernée par les références précédentes.

2) Paragraphe avec ou sans référence. (Référence 3)

Ici, la référence 3 concerne l'ensemble des informations apportées dans le paragraphe.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mes deux directeurs de thèse, Yvan PETIT, professeur à l'École de technologie supérieure (ÉTS, Montréal, Canada) au laboratoire de recherche en imagerie et orthopédie (LIO, Montréal, Canada), et Guillaume HAIAT, directeur de recherche du Centre national de la recherche scientifique (CNRS) au Laboratoire de Simulation et Modélisation Multi-Échelle (MSME, Créteil, France), dans l'équipe BIOMECA.

Cette thèse est réalisée en cotutelle entre l'ÉTS et l'Université Paris-Est (UPE, Créteil, France). Dans ce cadre, j'aimerais remercier tout particulièrement Ninon LEDUC, technicienne en administration au Décanat des études de l'ÉTS, qui a veillé tout au long de la thèse au respect et à la mise à jour de la convention de cotutelle entre les deux universités. J'aimerais aussi remercier Mélissa LEVASSEUR DUPUIS et Romy SCHLEGEL, conseillères aux étudiants internationaux de l'ÉTS, pour leurs conseils pour les procédures d'immigration au Québec et au Canada, et pour leur accueil sur le territoire. Mes remerciements s'adressent aux services administratifs des deux universités, représentés à l'ÉTS par André GOYETTE, agent de gestion des études, et par le bureau du registraire, et à l'École Doctorale Sciences, Ingénierie et Environnement (ED-SIE) par Cécile BLANCHEMANCHE et Christelle BEROL, successivement assistantes en gestion administrative. J'aimerais aussi remercier Salah NAILI et Céline LÉONARD, directeurs du Laboratoire MSME, pour leur accueil dans leurs locaux.

Cette thèse a été financée par la Chaire de recherche du Canada en biomécanique des traumatismes à la tête et à la colonne vertébrale, par l'ERC via le programme de recherche et innovation de l'Union européenne Horizon 2020 (accord de subvention No 682001, projet ERC Consolidator Grant 2015 BoneImplant), et par le projet de recherche international (IRP) « Laboratoire Franco-Canadien de Recherches Ultrasonores » (LAFCUS).

Cette thèse n'aurait pas eu lieu sans l'aide précieuse apportée par Annie LEVASSEUR, doctorante diplômée de l'ÉTS, Manon FRAULOB, doctorante diplômée de l'UPE, et Sophie LE CANN, postdoctorante puis chargée de recherche du CNRS au Laboratoire MSME. Je

VIII

souhaite aussi remercier l'équipe de recherche de Julio FERNANDES et Mohamed BENDERDOUR, professeurs à l'Université de Montréal, pour m'avoir donné accès à leur laboratoire et pour leurs précieux conseils ! Remerciements aussi à Irène LONDONO, assistante de recherche au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine (Montréal, Canada), Sylvain NICHOLS, professeur à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal (Saint-Hyacinthe, Canada), à Éric MARCOUX et Simon LAFLAMME, chargés d'application technologique à l'ÉTS, pour leur contribution dans mes travaux au Canada, et à l'Institut Laue-Langevin (Grenoble, France) en la personne d'Alessandro TENGATTINI, Hanna ISAKSSON, professeure à l'Université de Lund (Suède), et sa doctorante Elin TÖRNQUIST, Hugues ALBIN LOMAMI, doctorant à l'UPE, et Céline FALENTIN-DAUDRE, maître de conférences à l'Université Paris 13 pour leur contribution dans mes travaux en France.

Cette section s'adresse aussi aux étudiants à la maîtrise, au doctorat, ainsi qu'aux postdoctorants et assistants de recherche des deux laboratoires où j'ai travaillé. Au LIO, je souhaite particulièrement remercier Marie-Hélène BEAUSEJOUR, Anne-Laure MÉNARD, Élisabeth LAROCHE, Nicolas BAILLY, Lucien DIOTALEVI et Jean-Michel DESROSIERS, ainsi qu'à Caroline LAU, anciennement responsable qualité du laboratoire. Au laboratoire MSME, ces remerciements sont particulièrement adressés à Léo LAMASSOURE, Anne-Sophie POUDREL, Yoann HERIVEAUX, Ali AGHAEI, Fakhraddin SEYFADDINI et Katharina IMMEL.

Enfin, j'aimerais remercier mes parents, ma sœur et mes amis français et canadiens pour leur soutien pendant ces quatre longues années.

Caractérisation multimodale de l'ostéointégration et du remodelage osseux en fonction de l'environnement

Florian GUILLAUME

RÉSUMÉ

Le développement du tissu osseux, en particulier au contact d'un implant (ostéointégration), est un phénomène dépendant de multiples facteurs relatifs au patient, à la chirurgie et aux propriétés de l'implant. Pour mieux comprendre l'ostéointégration et l'optimiser, de nombreuses approches ont été utilisées, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. L'objectif de cette étude est de caractériser les phénomènes d'ostéointégration. Pour ce faire, deux approches complémentaires ont été mises en œuvre afin d'étudier l'os et son interface avec l'implant tout en contrôlant l'environnement du tissu osseux.

Premièrement, une méthodologie *ex vivo* a été adoptée pour étudier le tissu osseux. Un bioréacteur à perfusion a été conçu afin de caractériser le développement d'échantillons osseux de grande taille (environ 1 cm³) sur une période de dix semaines. Une culture osseuse a été menée et analysée par microtomographie à rayons X (μ CT). L'analyse par recalage des images volumiques en début et fin de culture a permis de mettre en évidence l'importance des facteurs environnementaux pour mettre en place du remodelage osseux.

Deuxièmement, un modèle d'implant *in vivo* a consisté à utiliser une pastille en alliage de titane pour étudier l'ostéointégration. Muni d'une couronne de PTFE, formant une chambre osseuse au contact de l'implant, ce modèle permet de distinguer l'os nouvellement formé de l'os mature situé en dehors de la chambre. Le tissu osseux autour de l'implant a été caractérisé par tomographie par neutrons, afin de s'affranchir des artéfacts obtenus avec l'implant métallique lors de l'utilisation des rayons X. En premier lieu, cette technique a été comparée à l'histologie, technique de référence pour l'étude de l'interface os-implant. Un recalage d'images a été utilisé pour trouver les images 2D neutrons correspondant aux coupes histologiques. Les quantités d'os dans la chambre osseuse et au contact avec l'implant (BIC) ont été évaluées dans ces images 2D pour chacune des techniques. À la suite de cette étude comparative, la chambre osseuse, imagée par tomographie par neutrons, a été analysée en 3D afin de mettre en lumière une répartition particulière de l'os proche de l'implant. L'étude comparative avec l'histologie a confirmé la capacité de la tomographie par neutrons à distinguer le tissu osseux, avec une corrélation significative entre les deux modalités pour la quantité osseuse et le BIC. De plus, cette technique s'est aussi montrée sensible aux tissus mous, différenciables de l'os dans les images volumiques. L'analyse tridimensionnelle de la chambre osseuse a mis en évidence une répartition du tissu cohérente avec de l'ostéointégration de contact, c'est-à-dire une croissance osseuse à partir des surfaces synthétiques (ici l'implant et la couronne de PTFE).

La combinaison des approches *in vivo* et *ex vivo*, et des techniques d'analyse (histologie, tomographie par neutrons, μ CT) permet d'apporter de nouvelles clés dans la compréhension du tissu osseux et des modèles appliqués en recherche. Bien que complexe à mettre en place,

l'étude *ex vivo* permet d'isoler efficacement l'effet des facteurs étudiés. De plus, l'apport de nouvelles techniques de caractérisation de l'os, comme la tomographie par neutrons, offre de nouvelles perspectives d'étude du tissu, en particulier dans un contexte d'ostéointégration d'implants.

Mots clés : os, culture *ex vivo*, bioréacteur, implant, tomographie par neutrons, microCT

Multimodal characterization of osseointegration and bone remodeling in function of the environment

Florian GUILLAUME

ABSTRACT

Bone tissue development, particularly in the vicinity of an implant (osseointegration), is a multi-factorial phenomenon depending on the patient, the surgery and the properties of the implant. For a better understanding of osseointegration in order to optimize it, several approaches were used, both *in vitro* and *in vivo*. The objective of this study is to characterize osseointegration phenomena. To do so, two complementary approaches were adopted to study bone and its interface with an implant, while controlling the environment of bone tissue.

First, an *ex vivo* methodology was adopted to study bone tissue. A perfusion bioreactor was conceived to characterize the development of large-sized bone samples (about 1 cm³) during a 10-week period. A bone culture was carried out and analyzed with X-ray microtomography (μ CT). An analysis through registration of volume images from the beginning and the end of the culture allowed to point out the importance of environmental factors to initiate bone remodeling.

Second, an *in vivo* implant model consisted of using a coin-shaped implant in titanium alloy to study osseointegration. Dressed with a PTFE crown, creating an empty bone chamber in contact with the implant, this model allows the differentiation of newly formed bone from mature bone situated outside the chamber. Neutron tomography was adopted to characterize bone tissue around the implant, and allowed to avoid artifacts obtained with metallic implants while using X-rays. First, this technique was compared to histology, a reference technique in studying the bone-implant interface. To do so, an image registration procedure was used to find the 2D neutron images corresponding to the histologic slices. Bone quantities in the bone chamber and in contact with the implant (BIC) were evaluated in the 2D images for both techniques. Following the comparative analysis, the implant bone chamber, imaged with neutron tomography, was analyzed in 3D to highlight a specific bone repartition in the vicinity of the implant. The comparative study with histology allowed to confirm the ability of neutron tomography to discriminate bone tissue, with a significant correlation between both modalities for bone quantity and BIC. Moreover, this technique was shown as sensitive to soft tissues, which can be differentiated from bone tissue in volume images. Tridimensional analysis of the bone volume delimited by the PTFE crown and the implant highlighted a bone repartition corresponding to contact osseointegration, meaning a bone growth from synthetic surfaces (here the implant and the PTFE crown).

Combination of *in vivo* and *ex vivo* approaches with analysis techniques (histology, neutron tomography, X-ray μ CT) have brought new keys in the understanding of bone tissue and its models adopted in research. Although complex to set up, *ex vivo* study allows to effectively isolate the effect of the studied factors. Moreover, new technologies to characterize bone, as

neutron tomography, bring new perspectives to study the tissue, particularly in a context of osseointegration of implants.

Keywords: Bone, *ex vivo* culture, bioreactor, implant, neutron tomography, microCT

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	5
1.1 Le tissu osseux	5
1.1.1 L'os cortical et l'os trabéculaire	5
1.1.2 Les cellules osseuses.....	7
1.1.3 Le remodelage osseux.....	8
1.2 Étude de l'interface os-implant : techniques et connaissances	11
1.2.1 Stabilités primaire et secondaire de l'interface os-implant.....	11
1.2.2 Étude de la stabilité primaire – Étude <i>in vitro</i> de l'interface os-implant ..	12
1.2.3 L'interface os-implant <i>in vitro</i> – études cellulaires	15
1.2.4 Étude de l'interface os-implant <i>in vivo</i>	16
1.2.5 L'interface os-implant <i>ex vivo</i>	20
1.2.5.1 Les différents types de bioréacteurs.....	20
1.2.5.2 Étude du tissu osseux par méthodologie <i>ex vivo</i>	24
1.3 Caractérisation de l'interface os-implant par imagerie.....	26
1.3.1 La (micro-)tomographie par rayons X - Technique et résultats.....	26
1.3.2 La tomographie par neutrons	29
CHAPITRE 2 PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE	33
2.1 Problématique	33
2.2 Hypothèses et objectifs de recherche	35
CHAPITRE 3 CULTURE <i>EX VIVO</i>	37
3.1 Conception d'une chambre environnementale.....	37
3.1.1 Définition du cahier des charges.....	37
3.1.2 Présentation et évaluation des prototypes	44
3.1.2.1 Nombre de paliers de stimulation mécanique en compression ..	48
3.1.2.2 Surface de l'échantillon comprimée	49
3.1.2.3 Mécanisme de blocage du mouvement de l'échantillon.....	49
3.1.2.4 Volume de fluides échangés entre l'intérieur et l'extérieur du bioréacteur.....	50
3.1.2.5 Diamètre des bulles d'air dans le bioréacteur	51
3.1.2.6 Temps de renouvellement du milieu de culture	51
3.1.2.7 Volume du bioréacteur.....	52
3.1.2.8 Nombre de pièces à fabriquer	52
3.1.2.9 Pourcentage de pièces stérilisables à l'autoclave.....	53
3.1.2.10 Volume total de fluide dans la chambre	53
3.1.2.11 Rayons de courbure intérieurs	54
3.1.2.12 Nombre de mécanismes de chargement statique	54

	3.1.2.13	Nombre de côtés plans transparents.....	54
	3.1.2.14	Radio-opacité des pièces.....	55
3.1.3		Matrice de décision et sélection du concept	55
3.2		Mise en place d'une culture <i>ex vivo</i> – Matériel et Méthodes.....	59
	3.2.1	Animal et préparation des échantillons.....	59
	3.2.2	Stimulation mécanique.....	62
	3.2.3	Changement de milieu de culture et analyse cellulaire.....	62
	3.2.4	Acquisitions μ CT.....	63
	3.2.5	Fin de culture	64
	3.2.6	Traitement des images μ CT.....	64
	3.2.7	Analyse statistique	65
3.3		Résultats.....	65
3.4		Discussion.....	71
3.5		Conclusion	78

CHAPITRE 4 ÉTUDE DE L'INTERFACE OS-IMPLANT PAR TOMOGRAPHIE PAR NEUTRONS

		NEUTRONS	80
4.1		Préparation des échantillons et Imagerie	80
4.2		Comparaison entre la tomographie par neutrons et l'histologie	82
	4.2.1	Matériels et Méthodes.....	82
		4.2.1.1 Histologie.....	82
		4.2.1.2 Traitement des images neutrons.....	83
		4.2.1.3 Traitement des coupes histologiques	84
		4.2.1.4 Procédure de recalage	85
		4.2.1.5 Comparaison des deux techniques.....	86
		4.2.1.6 Analyse statistique	88
	4.2.2	Résultats.....	88
	4.2.3	Discussion.....	92
	4.2.4	Conclusion	95
4.3		Étude tridimensionnelle de l'interface os-implant.....	96
	4.3.1	Analyse des images neutrons.....	96
		4.3.1.1 Traitement des images	96
		4.3.1.2 Calcul du BIC et de la fraction volumique (BV/TV).....	97
		4.3.1.3 Analyses statistiques	98
	4.3.2	Résultats.....	98
	4.3.3	Discussion.....	100
	4.3.4	Conclusion	104

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

5.1		Originalité des travaux proposés.....	107
5.2		Limites du projet.....	108
5.3		Perspectives et recommandations	109

CONCLUSION.....

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	113
Tableau 3.1 Tableau des attributs et spécifications techniques du bioréacteur	40
Tableau 3.2 Maison de la qualité du bioréacteur	41
Tableau 3.3 Matrice de décision	56

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1	Os cortical (A) et os trabéculaire (B) (Adaptée de (Larousse, 2020a))6
Figure 1.2	Remodelage osseux (Adaptée de (Wittkowske et al., 2016))9
Figure 1.3	Études <i>in vitro</i> de la stabilité primaire d'implants filetés (A) et de chevilles (B) (Adaptée de (Okazaki et al., 2008; van Arkel et al., 2018)).....13
Figure 1.4	Études de la stabilité primaire de différentes rugosités de surfaces (Adaptée de (Le Cann et al., 2014) et (Dammak et al., 1997)).....15
Figure 1.5	Évolution du tissu proche de l'implant en fonction de la stimulation mécanique (Adaptées de (Duyck et al., 2006; Zacchetti et al., 2013))16
Figure 1.6	Modèles d'implants pour l'étude de la stimulation mécanique <i>in vivo</i> A. Chambre osseuse avec implant mobile (Adaptée de (Duyck et al., 2006)) B. Implant et support pour la stimulation mécanique (Adaptée de (Zacchetti et al., 2013)) C. Implants chargés statiquement (ressort) et contrôle (Adaptée de (Iijima et al., 2013)).....18
Figure 1.7	Bioréacteur <i>in vivo</i> à l'implantation (A) et six semaines plus tard (B) C. Échantillon après culture (à gauche) et sans culture (droite) (Adaptée de (Holt et al., 2005))21
Figure 1.8	Fiole rotative (Adaptée de (Yeatts & Fisher 2011))22
Figure 1.9	Cuve tournante (Adaptée de (Yeatts & Fisher, 2011))22
Figure 1.10	Bioréacteur à perfusion (Adaptée de (Yeatts & Fisher 2011))23
Figure 1.11	Augmentation de la rigidité apparente d'échantillons en fonction du jour de culture <i>ex vivo</i> (Adaptée de (Endres et al., 2009)).....24
Figure 1.12	Bioréacteur ZetOs® (Tirée de (C. M. Davies <i>et al.</i> , 2006))25
Figure 1.13	Schéma de la combinaison d'un scintillateur et d'une caméra dans un tomographe par neutrons (Adapté de (Paul Scherrer Institute, 2020))30
Figure 3.1	Diagramme de Pareto du bioréacteur.....42
Figure 3.2	Système de perfusion du bioréacteur (Tirée de (Levasseur, 2019))44
Figure 3.3	Prototype 1 du bioréacteur à perfusion45

Figure 3.4	Prototype 2 du bioréacteur à perfusion	46
Figure 3.5	Prototype 3 du bioréacteur à perfusion A. Configuration culture, B. Configuration μ CT.....	47
Figure 3.6	Prototype 3 dans la machine de test mécanique.....	48
Figure 3.7	Amélioration du réservoir de milieu de culture	57
Figure 3.8	Protocole de la troisième culture – Remodelage osseux sur 14 jours.....	58
Figure 3.9	Protocole de la quatrième culture – Ostéointégration sur 10 semaines	59
Figure 3.10	Préparation des échantillons pour la culture <i>ex vivo</i> . A. Extraction de la carotte. B. Fraisage des faces parallèles sur le guide de coupe. C. Coupe des échantillons	60
Figure 3.11	Échantillon osseux avec implant mis en culture dans un bioréacteur à perfusion	62
Figure 3.12	Culture osseuse. A. Chambre et échantillon - Configuration μ CT. B. Chambre et échantillon - Configuration Culture avec capot. C. Chambre et échantillon - Configuration Culture sans capot. D. Réservoir de milieu de culture. E. Flacon avec morceaux d'os.....	63
Figure 3.13	Résorption et formation osseuses par zones et échantillon complet.....	67
Figure 3.14	Comparaison entre le recalage 3D/3D et le recalage 2D/3D - Échantillon contrôle	68
Figure 3.15	Comparaison entre le recalage 3D/3D et le recalage 2D/3D - Échantillon en culture	69
Figure 3.16	Coloration du milieu de culture après 7 jours de culture	70
Figure 3.17	Microscopie (x20) des lames d'histologie du milieu de culture pour les chambres (à gauche) et pour les flacons (à droite)	70
Figure 3.18	Microscopie (x20) de l'histologie d'un flacon en fin de culture	71
Figure 4.1	Modèle d'implant. A. Photographie du modèle d'implant pendant la chirurgie d'implantation sur un tibia de lapin. B. Modèle schématique de la carotte. C. Coupe représentative (comme représentée en rouge dans B) d'une image volumique neutron	81
Figure 4.2	Évolution de la fraction surfacique BA/TA et de sa dérivée selon la hauteur Y à l'interface os-implant	84

Figure 4.3	Procédure de recalage d'images pour déterminer la coupe neutron correspondant à la coupe histologique.....	86
Figure 4.4	Sélection de la ligne de BIC dans les images neutrons.....	87
Figure 4.5	Comparaison d'une coupe histologique représentative et de sa coupe neutron correspondante. A. Coupe histologique d'un échantillon après coloration Van Gieson, colorant les tissus minéralisés en rouge. B. Coupe neutron non segmentée correspondant à la coupe histologique en A, identifiée par le recalage d'image. C. Recalage de A et B avec les ratios de correspondance associés. D. Coupe histologique colorée au bleu de Stevenel ; les tissus mous apparaissent en bleu clair.....	89
Figure 4.6	Comparaison d'une coupe histologique représentative et de sa coupe neutron correspondante, avec une quantité importante de tissus mous. A. Coupe histologique d'un échantillon après coloration Van Gieson, colorant les tissus minéralisés en rouge. B. Coupe neutron non segmentée correspondante à la coupe histologique en A, identifiée par le recalage d'image. C. Recalage de A et B avec les ratios de correspondance associés. D. Coupe histologique colorée au bleu de Stevenel ; les tissus mous apparaissent en bleu clair	90
Figure 4.7	Régression linéaire entre les résultats histologiques et neutrons du BIC et de la quantité d'os dans la chambre osseuse	91
Figure 4.8	Valeurs de BIC et de BV/TV entre les groupes Contrôle & Polymère et les groupes Fémur & Tibia.....	99
Figure 4.9	Répartition du volume osseux dans la chambre osseuse (P-I : Proche de l'implant, F-C : Fin de chambre).....	99
Figure 4.10	Identification du type d'os dans les images volumiques neutrons	102
Figure 4.11	Étoile de Siemens brute (à gauche) et segmentée (à droite) pour mesurer la résolution du scan neutron	104
Figure 4.12	Répartition de l'os dans une coupe 2D de la chambre osseuse d'un échantillon.....	104

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

2D	Deux dimensions	ED-SIE	École doctorale Science, Ingénierie et Environnement
3D	trois dimensions		
%BV	proportion de volume osseux dans une région comparé au volume osseux entier	ERC	Conseil de recherche européen (<i>European research council</i>)
&	et	<i>Et al.</i>	Et autres (<i>et alii</i>)
(μ)CT	(Micro-)tomographie à rayons X	<i>Etc.</i>	Et le reste (<i>et caetera</i>)
		ÉTS	École de technologie Supérieure
ADN	Acide désoxyribonucléique	F-Abs	Facteur d'importance absolu
ATP	Adénosine triphosphate		
BA/TA	Fraction surfacique (<i>bone area / total area</i>)	F-Alg	Facteur d'importance algébrique
BIC	Ratio du contact os-implant (<i>bone in contact</i>)	F-C	Fin de chambre
BGJb	Milieu de culture de Biggers, Gwatkin et Judah, version b	FBS	Sérum fœtal bovin (<i>fœtal bovine serum</i>)
BV/TV	Fraction volumique (<i>bone volume / total volume</i>)	H	Histologique
Card	Opérateur mathématique cardinal	HSCM	Hôpital Sacré-Cœur de Montréal
CHU	Centre hospitalier universitaire	<i>i.e.</i>	c'est-à-dire (<i>id est</i>)
CNRS	Centre national de la recherche scientifique	IRP	Projet de recherche international (<i>international research project</i>)
		LAFCUS	Laboratoire franco-canadien de recherches ultrasonores

LIO	Laboratoire d'imagerie et d'orthopédie	PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
Mds	Milliards	PSSS	Poly(styrène sulfonate) de sodium
MSME	Laboratoire de modélisation et simulation multi-échelle	PTFE	Polytétrafluoroéthylène
N N.V.	Neutron <i>Naamloze vennootschap</i> . type d'entreprise publique en Belgique	QFD	Approche de déploiement de la fonction qualité
Nb	Nombre	RANKL	Ligand kappa-B récepteur activateur de facteur nucléaire (<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>).
No	Numéro		
OPG	Ostéoprotégérine	SAXS	Diffusion des rayons X aux petits angles (<i>small-angle X-ray scattering</i>)
p.	page		
P-I	Proche de l'implant	UPE	Université Paris-Est
PBS	Solution tampon phosphate saline (<i>phosphate buffered solution</i>)	É.-U.	États-Unis d'Amérique
PGE2	Prostaglandine E2	ZTI	Zone de transition à l'interface
pH	Potentiel hydrogène	v.	Version (pour un logiciel)

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

SYMBOLE ATOMIQUE

Al	aluminium
C	carbone
Ca	calcium
D	deutérium
H	hydrogène
O	oxygène
Si	silicium
Ti	titane
V	vanadium

UNITÉS DE BASE

% pourcentage (sans unité)

Longueur

m	mètre
cm	centimètre
mm	millimètre
μm	micromètre
nm	nanomètre

Volume

cm ³	centimètre cube
mm ³	millimètre cube
mL	millilitre

Angle

° degrés

Concentration

° degré d'alcool

Température

°C degré Celsius

Masse

kg kilogramme

Temps

h	heure
s	seconde
ms	milliseconde
Hz	hertz

Électricité

kV	kilovolt
μA	microampère

Mécanique

MPa	mégapascal
N	newton

Débit

mL/h millilitre par heure

AUTRES SYMBOLES

#	grain de polissage
®	marque déposée
∩	intersection
↑	valeur cible minimale
↓	valeur cible maximale
=	valeur cible à atteindre ou égalité
±	plus ou moins
p	niveau de significativité
r	rayon
R	coefficient de corrélation de Pearson
Ra	rugosité arithmétique
X	axe horizontal
Y	axe vertical
Z	axe de profondeur

INTRODUCTION

En cas de traumatisme ou de maladie, il arrive que l'os ne puisse pas être réparé sans l'usage d'un implant qui vient soutenir ou remplacer la zone lésée. En orthopédie, les implants comme les prothèses de hanche ou de genou servent à rétablir la fonctionnalité de l'articulation fracturée ou abîmée. Les plaques d'ostéotomie permettent de rattacher deux extrémités d'un même os et sont utilisées par exemple en cas de fracture du tibia, du fémur, ou en chirurgie maxillo-faciale. En chirurgie dentaire, les implants sont employés majoritairement pour remplacer une ou plusieurs dents.

Le marché des implants orthopédiques s'élevait à 46,5 Mds (milliards) de dollars en 2018 et pourrait atteindre 64,0 Mds en 2026 (Fortune Business Insights, 2019). Malgré ce poids économique non négligeable, le risque d'échec d'implantation existe toujours. La littérature rapporte un taux d'échec de plus de 5% à partir de 7 ans post-chirurgie pour les prothèses de hanche (National Joint Registry, 2020) et de 5 à 10 % sur 10 ans d'après Eskelinen *et al.* (Eskelinen et al., 2006), 7,8 % pour les arthroplasties du genou (Sharkey, Lichstein, Shen, Tokarski, & Parvizi, 2014), et 5 à 8 % pour les implants dentaires (Moy, Medina, Shetty, & Aghaloo, 2005). Les causes mises en évidence sont les suivantes : une usure importante de l'implant, créant des débris et une augmentation de la concentration en cobalt et en chrome ce qui provoque la nécrose des tissus autour de l'implant (Langton et al., 2011) ; un descellement ou une instabilité de l'implant ; une infection (Sharkey et al., 2014) ou encore la santé et les habitudes du patient (cigarettes, diabète, ménopause...) (Moy et al., 2005). Les échecs peuvent avoir des conséquences dramatiques pour le patient et pour la société en cas de remplacement de l'implant (Kurtz, Ong, Lau, & Bozic, 2014; Kurtz et al., 2007).

Le phénomène régissant la croissance de l'os en contact avec l'implant, ou ostéointégration, est complexe. Combinaison de formation et résorption osseuses, il dépend de multiples facteurs. Tout d'abord, l'état de santé de patient, sur le plan hormonal (ménopause, diabète, *etc.* (Ajami et al., 2014; Dudeck et al., 2014)) ou la qualité de son os (Shah, Thomsen, & Palmquist 2019) influe sur la qualité de l'ostéointégration, qui peut également être modifiée

par les contraintes mécaniques appliquées à l'interface os-implant (Duyck et al., 2006; Jing et al., 2018; Zacchetti, Wiskott, Cugnoni, Botsis, & Ammann, 2013). Le succès de l'ostéointégration se joue aussi lors de l'opération chirurgicale. Les conditions aseptiques de l'implantation sont cruciales pour éviter toute infection (Anagnostou et al., 2006; Skovdal et al., 2018). D'autre part, la méthode chirurgicale utilisée et le chargement appliqué à l'implant à sa pose influencent le développement osseux (Iijima et al., 2013). Enfin, le design de l'implant constitue l'un des facteurs majeurs dans le déroulement de l'ostéointégration : son matériau (Anchieta et al., 2014), l'état de surface en contact avec l'os (Bougas et al., 2014; Rønold, Lyngstadaas, & Ellingsen, 2003), sa géométrie (Elsayed, 2019)... Tous ces paramètres ont donné lieu à une grande diversité d'implants pour optimiser, en temps de cicatrisation et qualité osseuse, l'ostéointégration. Ainsi, pour mieux comprendre la création et le développement de l'interface os-implant, il est nécessaire de développer des modèles expérimentaux dans lesquels l'environnement est contrôlé afin de pouvoir distinguer les effets des paramètres étudiés.

L'objectif de ce projet de thèse est d'étudier l'évolution du remodelage osseux, notamment dans un contexte d'ostéointégration, en fonction de l'environnement de l'os. Pour cela, ce projet s'intéresse à deux modèles complémentaires permettant d'étudier le tissu osseux et son interface avec l'implant : une approche *in vivo* utilisant un modèle d'implant standardisé avec chambre osseuse qui permet de mettre en évidence l'os nouvellement formé au contact de l'implant, et une méthode *ex vivo* qui consiste à maintenir en vie un échantillon d'os dans un bioréacteur. Pour accéder à la microstructure de l'os et ainsi étudier son évolution en fonction de l'environnement de l'échantillon, cette thèse s'intéresse à l'application de différentes techniques : l'histologie, la tomographie par rayons X et la tomographie par neutrons.

Ainsi, cette thèse se découpe en cinq chapitres. En premier lieu, une revue de la littérature a été réalisée, décrivant les techniques et connaissances sur le développement du tissu osseux, et plus particulièrement au contact avec un implant. Après une mise en évidence des objectifs de cette thèse au chapitre II, le chapitre III développe la conception d'un bioréacteur à perfusion et la mise en œuvre d'une culture osseuse *ex vivo* pour caractériser le remodelage osseux. Le

chapitre IV décrit l'étude de l'ostéointégration *in vivo* par tomographie par neutrons, une technique d'imagerie prometteuse qui permet de visualiser l'os au plus près de l'implant sans artéfacts dans les images. Enfin, une discussion générale sur les travaux menés dans cette thèse a été apportée.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le tissu osseux

L'os est le matériau de base du squelette. Il lui donne sa morphologie, mais également la capacité de se mouvoir par l'intermédiaire des muscles, et de résister aux agressions physiques de l'environnement. Il est de plus responsable du stockage des minéraux et de l'hématopoïèse, la formation des cellules sanguines. Le squelette est constitué d'une multitude d'os différents par leurs formes, mais aussi par leur fonction. Ainsi, les os du crâne ont pour fonction de protéger le cerveau des chocs tandis que les os des membres servent à soutenir le poids de l'animal et lui permettre de se déplacer. Ces différences de fonctions font que les os ont des propriétés mécaniques et structurelles différentes tant au niveau macroscopique que microscopique. (Mosley 2000; Cowin 2001; Bauer & Link 2009; Harada & Rodan 2003)

1.1.1 L'os cortical et l'os trabéculaire

On distingue deux types d'os : l'os cortical et l'os trabéculaire.

L'os cortical (Figure 1.1) est un os compact constitué notamment d'ostéons, eux-mêmes composés de lamelles organisées de manière concentrique autour du canal de Havers (Larousse, 2020b). Ce canal contient la moelle osseuse, les nerfs et les vaisseaux sanguins. L'os cortical est responsable des fonctions de support et de protection du squelette et son renouvellement est lent (John E. Davies, 2003).

L'os trabéculaire ou os spongieux (Figure 1.1) est constitué de tiges et de plaques interconnectées, les trabécules. Les espaces ainsi formés, de l'ordre du millimètre (Keaveny, Morgan, Niebur, & Yeh, 2001), sont occupés par de la moelle osseuse et de la graisse (Larousse, 2020a). Bien qu'il permette aussi de soutenir des charges, l'os spongieux a pour

rôle l'homéostasie minérale, c'est-à-dire l'équilibre des concentrations en minéraux du corps. La moelle osseuse qu'il contient possède également une fonction hématopoïétique.

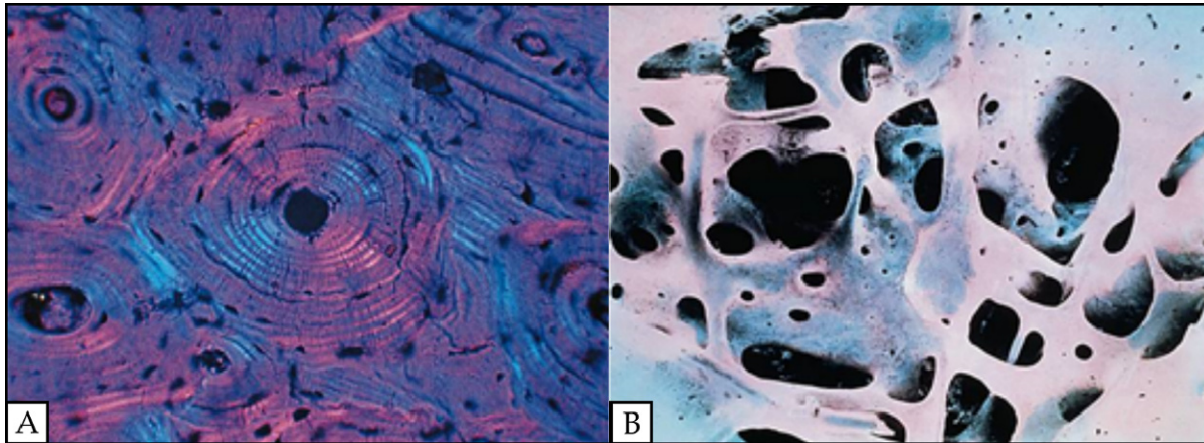


Figure 1.1 Os cortical (A) et os trabéculaire (B) (Adaptée de (Larousse, 2020a))

Lors de fracture ou pendant la croissance osseuse, l'os nouvellement formé est fibreux et composé d'une matrice de fibres de collagènes et d'ostéocytes. Ce matériau possède une activité cellulaire importante, mais il est peu rigide. D'une durée de vie limitée, il peut se résorber et être remplacé par de l'os lamellaire (ou os mature) composé de couches superposées (lamelles). Chaque lamelle a une épaisseur de 3 à 7 μm et est constituée de fibres de collagène parallèles. Sous lumière polarisée, les lamelles se différencient par l'orientation de ces fibres. L'os mature, à l'activité cellulaire moindre, est plus résistant que l'os nouvellement formé. (Cowin, 2001; C. Davies et al., 2006; Liebschner, 2004)

Les différences de structures et de comportement de ces différents tissus (os cortical/os spongieux, os mature/os nouvellement formé) induisent des comportements mécaniques différents qui ont leur importance dans le cadre de l'étude du tissu osseux et de l'interface os-implant. (Liebschner, 2004; Mathieu, Vayron, Soffer, Anagnostou, & Haïat, 2012)

1.1.2 Les cellules osseuses

Les principales cellules osseuses sont les ostéoclastes, les ostéoblastes et les ostéocytes.

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse. Leur diamètre est de 20 à 100 μm et ils sont généralement à la surface de l'os. Leur durée de vie est estimée à 7 semaines *in vivo* (Cowin, 2001). Les ostéoclastes sont issus de la lignée cellulaire des cellules macrophages monocytes, et créés dans la moelle osseuse. Leur développement peut mener à la fusion de plusieurs ostéoclastes entre eux, pouvant conduire les ostéoclastes à contenir jusqu'à 50 noyaux (Mohamed, 2008). Leurs noyaux ont une durée de vie estimée à une dizaine de jours. L'activation des ostéoclastes est notamment initiée par l'attachement de la molécule RANKL (récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B ligand), relâchée par les ostéoblastes. Le rôle des ostéoclastes consiste à détruire les composants minéraux et organiques de la matrice osseuse par la sécrétion de différentes enzymes qui viennent dissoudre les minéraux et digérer les protéines. (Cowin 2001; Harada & Rodan 2003)

Les ostéoblastes sont responsables de la formation osseuse. Ils créent les tissus ostéoïdes, une matrice non minéralisée. Le tissu ostéoïde a généralement une épaisseur de 10 μm et les minéraux s'y déposent à une vitesse d'environ 0,55 μm par jour. Les ostéoblastes participent aussi à la calcification et à la résorption osseuses par leur production de RANKL, responsable de la formation des ostéoclastes, et d'ostéoprotégérine (OPG), qui inhibe cette formation en se fixant sur les molécules de RANKL à la place des ostéoclastes (Wittkowske, Reilly, Lacroix, & Perrault, 2016). Les ostéoblastes forment une couche continue de cellules de 15 à 30 μm d'épaisseur, localisée près de la surface osseuse. Ces cellules sont différenciées des cellules souches pluripotentes de la moelle osseuse, les cellules ostéoprogénitrices (Mohamed, 2008). (Cowin, 2001)

Lorsque les ostéoblastes sont inactifs ou indifférenciés, on les trouve sous la forme de cellules allongées et aplaties, les cellules bordantes. Elles sont chargées de l'homéostasie des minéraux en jouant le rôle de barrière contre les ions. Elles peuvent aussi permettre aux ostéoclastes

d'entamer le processus de résorption osseuse en digérant la surface du tissu ostéoïde. (Cowin, 2001)

Les ostéocytes sont les cellules les plus nombreuses au sein du tissu osseux (90 % des cellules). Leur nombre est 10 fois plus important que celui des ostéoblastes. Ils sont issus des ostéoblastes emprisonnés dans l'os nouvellement formé. Ils sont alors bien placés pour ressentir les changements et la distribution des contraintes dans la matrice osseuse et y répondre. Leur rôle exact dans le tissu reste assez flou aujourd'hui. Ils semblent stabiliser le niveau minéral de l'os avec les cellules bordantes, détecter les microfractures et sont responsables des processus de restructuration et d'adaptation de l'os. Les ostéocytes sont reliés entre eux par des dendrites qui forment des canaux appelés canalicules. Ces canalicules (ou canaux de Havers) relient aussi les ostéocytes aux vaisseaux sanguins. (Cowin 2001; Brown, Sattler, & Guo 2016; Weiner & Wagner 1998)

1.1.3 Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est un phénomène continu qui se manifeste chez l'humain adulte par le remplacement de 28% de son os trabéculaire et 4% de son os cortical chaque année (Manolagas, 2000). Comme mentionné précédemment, les ostéocytes sont les cellules responsables de ce remodelage en fonction des chargements et de la distribution des contraintes dans le milieu (loi de Wolff) (Cowin, 2001).

Lors d'une contrainte extérieure (ou de la formation d'une fracture osseuse par exemple (Figure 1.2)), les ostéocytes réagissent par un relâchement d'ions calcium Ca^{2+} en premier lieu, puis d'oxyde nitrique et enfin, à plus long terme, de prostaglandine E2 (PGE2). Tous ces éléments conduisent à l'activation cellulaire des ostéoblastes et ostéoclastes environnants. Cette propagation chimique est permise grâce à la présence d'un espace entre les cellules d'environ 9 nm mis en évidence par Doty (Doty, 1981), ainsi que par des jonctions entre les ostéocytes et entre les ostéocytes et les ostéoblastes en surface de l'os mis en évidence par Yellowley *et al.* (Yellowley, Li, Zhou, Jacobs, & Donahue, 2010). L'ion Ca^{2+} est d'ailleurs

considéré comme le composant principal du réseau de communication cellulaire osseux puisqu'il provoque le relâchement d'oxyde nitrique, d'ATP (adénosine triphosphate, molécule énergétique), de PGE2 et d'ostéopontine (molécule produite par les ostéocytes et ostéoblastes et responsable de l'inhibition de la minéralisation osseuse (Hunter, Kyle, & Goldberg 1994)). L'oxyde nitrique a pour effet d'inhiber la formation des ostéoclastes et de favoriser la formation des ostéoblastes, tandis que la PGE2 stimule l'activité des ostéoblastes et favorise la formation de ces cellules.

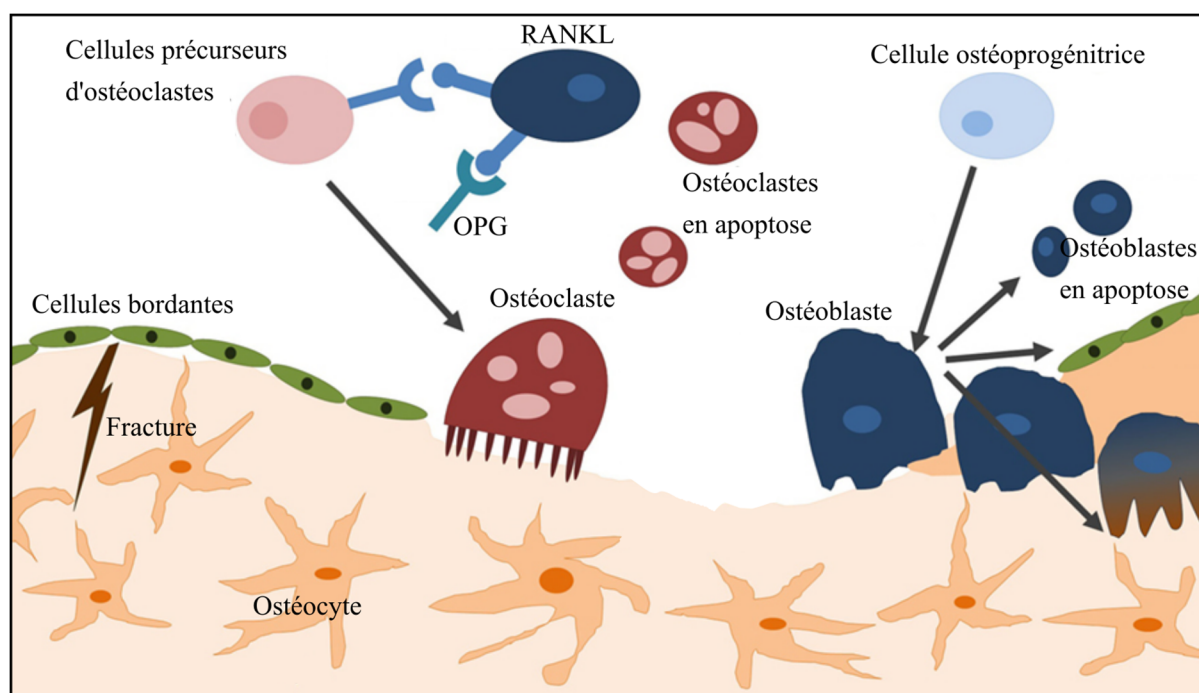


Figure 1.2 Remodelage osseux (Adaptée de (Wittkowske et al., 2016))

L'activation des ostéoclastes (et de leur formation) engendre la résorption du tissu osseux sur une période de deux à quatre semaines, avant l'apoptose des ostéoclastes (Figure 1.2). Les ostéoblastes sont ensuite recrutés, formant une matrice de collagène et participant à sa minéralisation. Durant ce processus, certains ostéoblastes restent prisonniers de la matrice et se transforment en ostéocytes. Après une période de quatre à six mois, les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes ou entrent en apoptose (Figure 1.2). Dans le cas de l'os cortical, ce remodelage prend la forme d'un cône, initié par les ostéoclastes et refermé par les

ostéoblastes, lui donnant ainsi cette structure en cylindres concentriques. (Cowin, 2001; Wittkowske et al., 2016)

D'autres facteurs comme les hormones peuvent aussi influencer le comportement osseux. Les œstrogènes inhibent par exemple la production d'ostéoclastes. La ménopause constitue donc un facteur d'ostéoporose, les œstrogènes étant alors plus faiblement produits. La testostérone inhibe également la production d'ostéoclastes, mais vient aussi inhiber l'activité de ces cellules tout en stimulant la formation osseuse. Cela explique la faible proportion d'hommes touchés par l'ostéoporose. (Bauer & Link 2009; Harada & Rodan 2003) Enfin, la génétique a en outre son rôle à jouer dans la densité osseuse et la régulation de la masse osseuse. (Harada & Rodan, 2003)

La qualité osseuse est intrinsèquement liée aux sites anatomiques, certaines régions anatomiques comme le crâne ou le sternum étant peu sollicitées mécaniquement, comparées aux membres inférieurs. Cette hétérogénéité du tissu osseux se reflète tout d'abord dans les propriétés mécaniques de l'os. L'os trabéculaire, par exemple, a un module d'élasticité de 67 MPa au niveau des vertèbres, de 445 MPa pour le tibia et jusqu'à 900 MPa pour la tête fémorale (Keaveny et al., 2001; Liebschner, 2004). Dépendamment du site anatomique, le comportement du tissu face aux contraintes est aussi différent. Ce point a notamment été mis en évidence par l'étude de David *et al.* (David et al., 2008). En soumettant des échantillons osseux de sternum et d'ulna au même chargement mécanique, de la formation osseuse n'a été mesurée que pour le sternum, les propriétés mécaniques de l'ulna restant inchangées. Les stimulations imposées aux échantillons du sternum étant trop importantes, les cellules osseuses ont été activées, amorçant un remodelage osseux pour renforcer les propriétés mécaniques de l'échantillon. Pour les échantillons d'ulna, les contraintes subies devaient correspondre aux contraintes naturelles rencontrées par l'os. Ainsi, celles-ci étaient suffisantes pour préserver les propriétés mécaniques du milieu et éviter la résorption sans toutefois engendrer un renforcement du tissu osseux.

Enfin, certaines variabilités osseuses peuvent être soulevées entre les espèces animales. Bien que les propriétés mécaniques (module d'Young, rigidité) et la densité osseuse de l'os trabéculaire et de l'os cortical soient relativement comparables entre les espèces (humain compris), leur quantité diffère fortement, les petits mammifères (rats, souris, lapins) ayant une plus faible quantité d'os trabéculaire par rapport aux gros mammifères (bœuf, chèvre, chien). Les petits mammifères montrent de plus une croissance osseuse rapide, permettant ainsi de réduire les temps d'étude du remodelage osseux. (Liebschner, 2004) Ils présentent aussi l'avantage d'un faible coût d'achat et d'une grande disponibilité pour la recherche (Abubakar *et al.* 2016; Bonucci & Ballanti 2014; Liebschner 2004). Les grands mammifères (chien, bœuf, mouton, cochon) présentent une structure et un développement osseux plus comparables à l'humain avec des canaux de Havers bien développés pour l'os cortical (Bonucci & Ballanti, 2014) et une matrice lamellaire semblable à l'humain pour l'os trabéculaire (Abubakar *et al.*, 2016).

1.2 Étude de l'interface os-implant : techniques et connaissances

Pour étudier le tissu osseux, on distingue deux grands types d'approches expérimentales : les études *in vivo* qui sont réalisées sur des animaux vivants, et les études *in vitro* qui s'appliquent en dehors de l'animal. De cette dernière famille expérimentale font partie les études sur le tissu osseux comme matériau inerte, considéré comme non-vivant, les études cellulaires et les études dites *ex vivo*. Le terme *ex vivo* est communément associé à de l'ingénierie tissulaire, dont l'objectif est de développer le tissu en laboratoire dans le but de le greffer sur un patient. Devant la complexité de la mise en place d'une interface ostéointégrée entre l'os et l'implant, chacune des catégories expérimentales présentées ci-dessus est utilisée pour l'étudier.

1.2.1 Stabilités primaire et secondaire de l'interface os-implant

Une intégration réussie de l'implant par l'os se fait par l'entremise de deux types de stabilité : la stabilité primaire qui intervient lors de la pose de l'implant, et la stabilité secondaire qui se met en place pendant la période de cicatrisation (X. Gao, Fraulob, & Haïat 2019; Biemond *et al.* 2011).

Parmi les différentes causes de révision de l'implant après la première chirurgie, le descellement aseptique en est la principale pour les prothèses totales de hanche ou les arthroplasties de genou (National Joint Registry, 2020; Ulrich et al., 2008). Ce descellement a plusieurs origines (Biemond et al., 2011). L'usure de l'implant liée à son utilisation produit des débris, responsable de la nécrose du tissu osseux autour de l'implant, notamment par le recrutement de macrophages pour éliminer ces débris, macrophages qui peuvent eux-mêmes recruter ou devenir des ostéoclastes. De plus, une mauvaise répartition des contraintes à l'interface os-implant, appelée déviation de contraintes, crée une surstimulation locale de l'os, amenant à une résorption importante, ou ostéolyse, de ce tissu, et conduisant à l'instabilité de l'implant. Enfin, les micromouvements de l'implant pendant son utilisation peuvent favoriser la formation de tissu fibreux entre l'os et l'implant, isolant ce dernier par encapsulation et rendant toute ostéointégration impossible. (Sundfeldt, V Carlsson, B Johansson, Thomsen, & Gretzer, 2006) La déviation de contraintes et l'encapsulation de l'implant sont aussi rapportées comme les causes principales du descellement aseptique des implants dentaires (El Askary, Meffert, & Griffin, 1999; Shemtov-Yona & Rittel, 2015). Ces causes sont directement associées à la stabilité primaire de l'implant, c'est-à-dire à la mise en place de l'interface os-implant dès la chirurgie.

Une fois établie, la stabilité primaire peut conduire à la stabilité secondaire de l'implant, ou ostéointégration. Ce processus consiste en la croissance et la maturation d'os néoformé au contact de l'implant, le reliant à l'os mature et limitant ainsi ses micromouvements. (Haïat, Wang, & Brunski, 2014).

1.2.2 Étude de la stabilité primaire – Étude *in vitro* de l'interface os-implant

L'étude de la stabilité primaire est principalement réalisée *in vitro*, car elle ne nécessite pas de considérer l'évolution de l'os dans le temps. Les stratégies employées pour étudier cette stabilité diffèrent selon le type d'implant : 1. les implants filetés comme les implants dentaires ou les vis pour fixer les plaques d'ostéotomie ou certains modèles de cupules de prothèse de

hanche ; 2. les implants cimentés et 3. les implants non cimentés (les catégories 2 et 3 comprenant les tiges de prothèses de hanche ou les prothèses de genou par exemple).

Dans le cas des implants filetés, la stabilité primaire peut être évaluée par des tests à la rupture en traction (Migliorati et al., 2012) ou en torsion (Okazaki et al., 2008). Ces études ont notamment pu mettre en évidence une meilleure stabilité primaire lorsqu'un couple suffisamment élevé était appliqué à l'implant pendant la phase d'insertion (Migliorati et al., 2012). L'importance de la préparation de la cavité précédant l'insertion de la vis a aussi été démontrée (Okazaki et al., 2008), la différence de diamètre entre l'implant et sa cavité, ou interférence entre leur diamètre, impactant le couple nécessaire à l'insertion et au retrait de l'implant (Figure 1.3-A). Parallèlement aux implants filetés, l'orthopédie fait également l'usage de chevilles (Figure 1.3-B) pour maintenir les implants (en arthroplastie du genou notamment). Van Arkel *et al.* (van Arkel, Ghouse, Milner, & Jeffers, 2018) étudient par exemple la stabilité d'un nouveau modèle de cheville barbelée en démontrant que, pour une force d'insertion moindre, ce modèle présente une résistance à la traction plus élevée qu'une cheville conventionnelle (Figure 1.3-B).

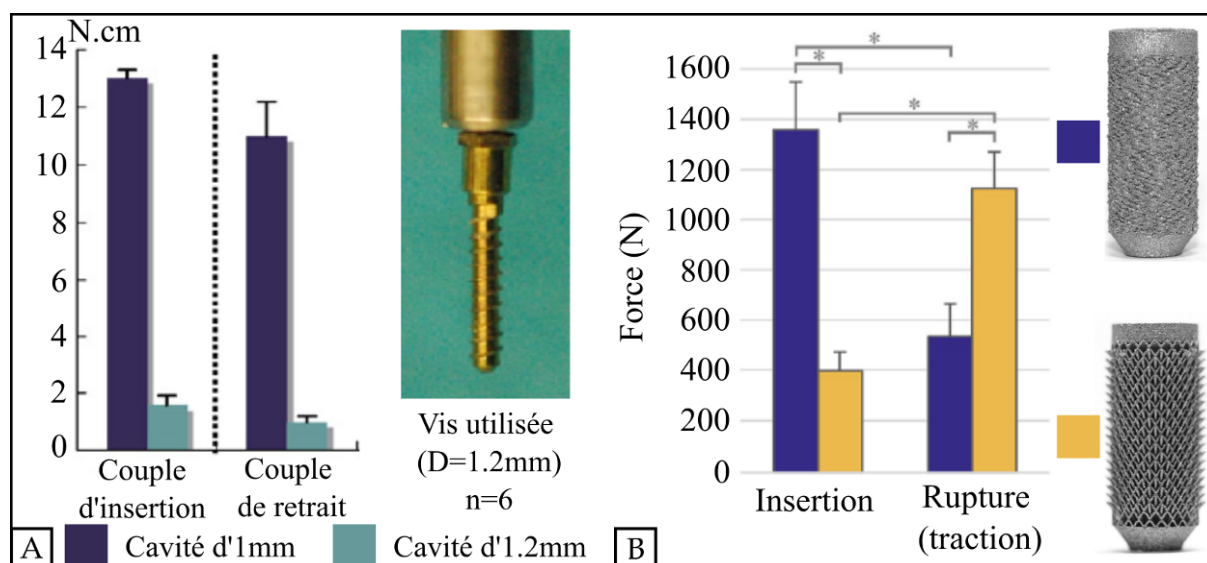


Figure 1.3 Études *in vitro* de la stabilité primaire d'implants filetés (A) et de chevilles (B)
(Adaptée de (Okazaki et al., 2008; van Arkel et al., 2018))

Dans le cas des implants cimentés, l'utilisation de ciment permet de combler les espaces entre l'os et l'implant et répartir les charges entre les deux (Chappuis & El Banna, 2008; Webb & Spencer, 2007). Par conséquent, la littérature s'intéresse essentiellement à évaluer la résistance à la fatigue des ciments en modifiant leur composition chimique et leur préparation (Lewis, 2003; Webb & Spencer, 2007).

Enfin, la stabilité primaire des implants non cimentés fait intervenir trois paramètres : l'interférence entre l'implant et la cavité osseuse créée pour l'accueillir, les efforts appliqués à l'implant lors de la pose, et la rugosité de la surface de l'implant. Le Cann *et al.* (Le Cann *et al.*, 2014) ont par exemple démontré qu'une cavité plus petite que la coupe acétabulaire augmentait sa résistance à la rupture en traction. L'insertion des cupules se faisant par impact de l'implant dans l'os, il a pu être démontré une influence significative entre la force appliquée et celle nécessaire au retrait de l'implant (Michel, Bosc, Meningaud, Hernigou, & Haiat, 2016). Concernant l'influence de la rugosité de surface, la résistance à la rupture en traction a par exemple été rapportée comme plus faible pour de fortes rugosités de surface sur des coupes acétabulaires (Le Cann *et al.*, 2014), ces tests ayant été réalisés sur de l'os et du Sawbones, un modèle synthétique de l'os (Figure 1.4-A). La rugosité de surface influence aussi les micromouvements entre l'implant et l'os, qui doivent être réduits pour permettre la mise en place de l'ostéointégration (Jahnke *et al.*, 2019). Pour ce faire, de nombreuses études ont été menées sur le frottement entre l'os et différents états de surface d'implant (Biernacki *et al.*, 2011; Damm, Morlock, & Bishop, 2015; Dammak, Shirazi-Adl, Schwartz, & Gustavson, 1997; Grant *et al.*, 2007). L'étude de Dammak *et al.* (Dammak *et al.*, 1997), notamment, étudie le frottement entre l'os et différentes surfaces d'implants : une surface poreuse, deux surfaces à maillage simple, la seconde avec des mailles plus serrées, et la quatrième présentant un maillage serré pourvu de crampons (0,5 mm) sur toute sa surface (de gauche à droite dans la Figure 1.4-B). Cette étude suggère que des surfaces plus complexes qu'une simple rugosité de surface permettent une meilleure stabilité primaire.

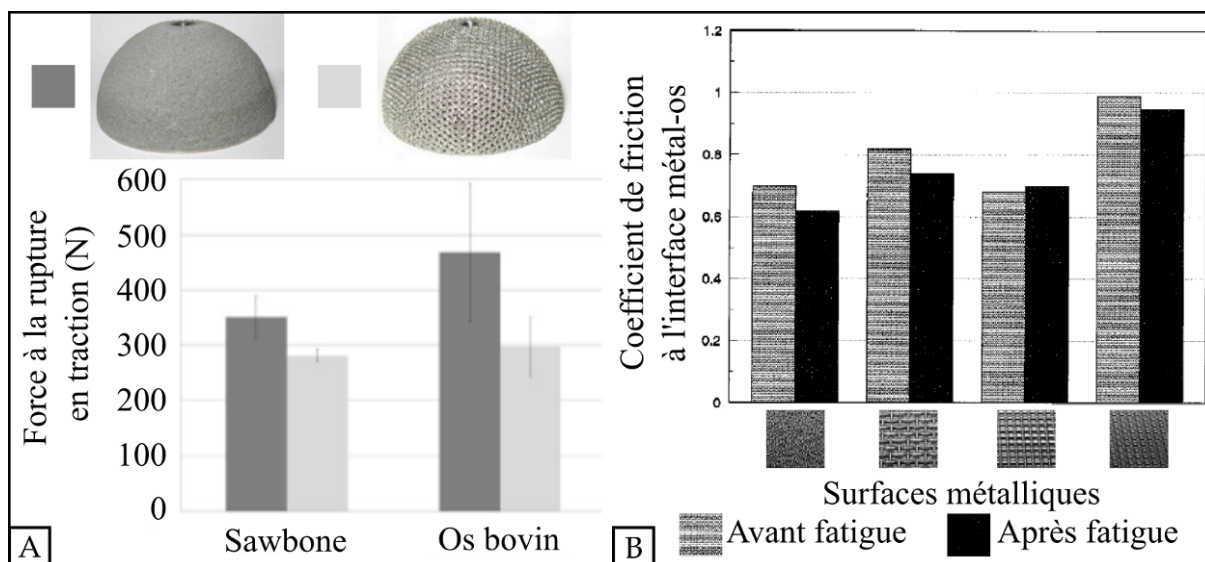


Figure 1.4 Études de la stabilité primaire de différentes rugosités de surfaces (Adaptée de (Le Cann et al., 2014) et (Dammak et al., 1997))

1.2.3 L'interface os-implant *in vitro* – études cellulaires

Les études cellulaires sont utilisées pour tester la biocompatibilité des matériaux et traitements de surface des implants. Elles permettent par exemple d'étudier l'adhésion, la survie et la maturation des cellules osseuses en contact d'une surface d'une certaine rugosité (Anselme & Bigerelle, 2014; Elter, Weihe, Lange, Gimsa, & Beck, 2011), de différents matériaux (Liu, Chu, & Ding, 2004), de ciments (Cui et al., 2017), ou de traitements de surface comme l'anodisation (Katunar et al., 2017; Liu et al., 2004), ou l'apposition de revêtements (Huang, Ouyang, Tan, Wu, & Liu, 2019; N. Li, Xu, Xiao, Zhao, & Lu, 2017; Tudor, Donaldson, Rodriguez-Elizalde, & Cameron, 2015). Elles peuvent aussi se focaliser sur le non-développement de certaines bactéries comme le staphylocoque doré (*staphylococcus aureus*), une des causes d'échec d'implantation (Alcheikh et al., 2013; Anagnostou et al., 2006; Skovdal et al., 2018). Ces études utilisent principalement des souches cellulaires dont le comportement est connu, avec des protocoles et du matériel pour lesquels le développement cellulaire est assuré avec peu de risques de contamination extérieure.

1.2.4 Étude de l'interface os-implant *in vivo*

Les études *in vivo* de l'ostéointégration consistent à mettre en relation un implant avec l'os d'un animal vivant, appelé hôte. Au bout d'un temps déterminé de cicatrisation, l'hôte est sacrifié et l'interface ainsi que l'os à proximité sont analysés.

Grâce à des approches *in vivo*, de nombreux paramètres de l'ostéointégration ont pu être étudiés.

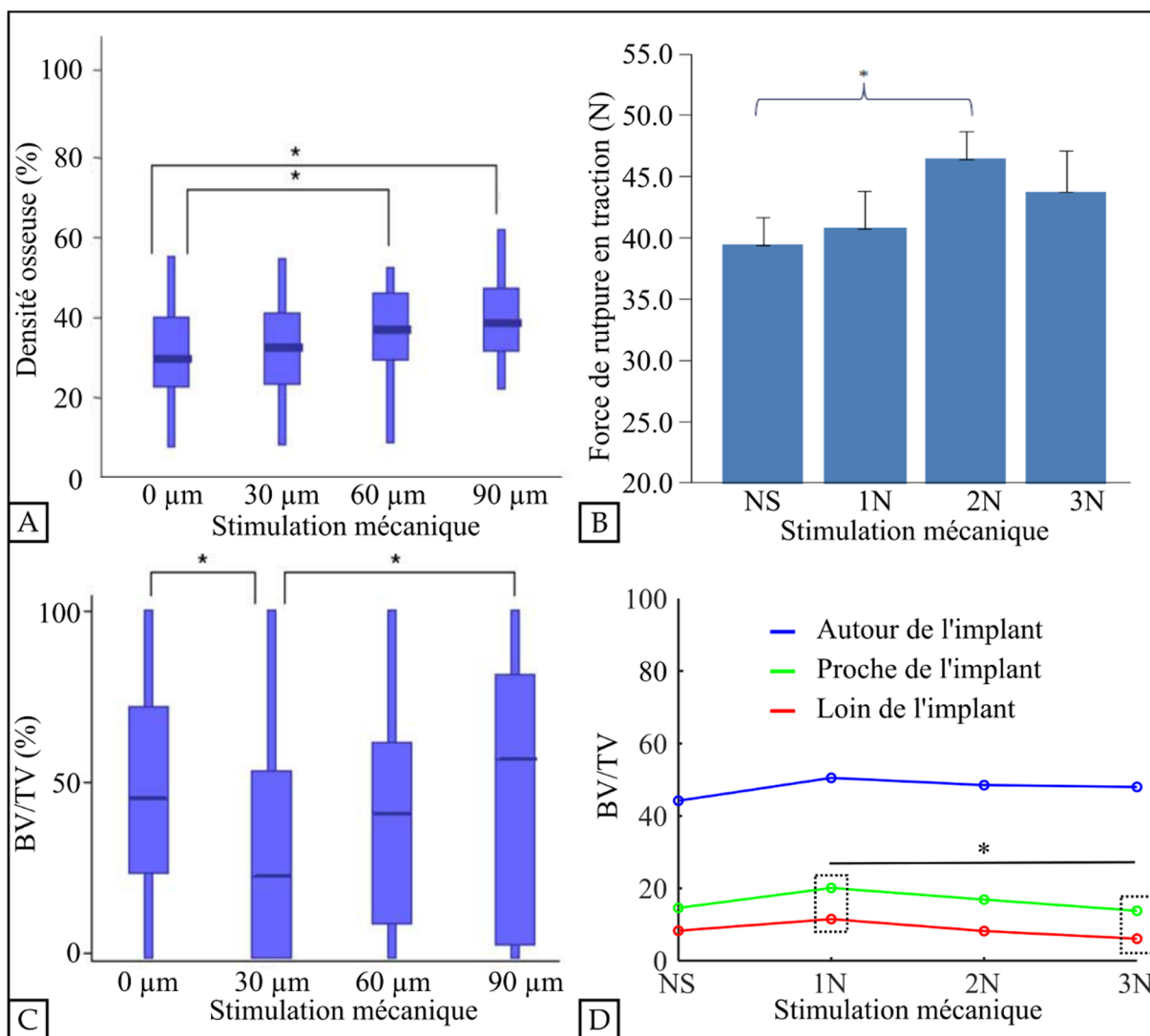


Figure 1.5 Évolution du tissu proche de l'implant en fonction de la stimulation mécanique (Adaptées de (Duyck et al., 2006; Zacchetti et al., 2013))

Tout d'abord, le mouvement de l'implant (qui induit une stimulation mécanique du tissu osseux) peut mener à une augmentation des propriétés mécaniques de l'os et de sa quantité jusqu'à un certain point, lors d'une vibration prolongée de l'implant (Jing et al., 2018) ou d'un déplacement plus lent de celui-ci (Duyck et al., 2006). Ce comportement se retrouve aussi dans le cas d'une charge statique de l'implant (Iijima et al., 2013). Ces études ont pu démontrer qu'il existe une plage de stimulation pour laquelle la quantité d'os dans les environs de l'implant (Duyck et al., 2006; Zacchetti et al., 2013), la densité osseuse (Duyck et al., 2006) et la résistance à la rupture de l'interface (Zacchetti et al., 2013) sont optimisées (Figure 1.5). La densité osseuse autour de l'implant est calculée *via* la fraction volumique (volume d'os divisé par le volume d'intérêt, notée BV/TV pour « *bone volume / total volume* »). Dans leur étude, Zacchetti *et al.* (Zacchetti et al., 2013) ont pu montrer que la fraction volumique (Figure 1.5-D) ainsi que la force de rupture de l'interface os-implant en traction (Figure 1.5-B) étaient maximisées à certaines valeurs de stimulation (1 et 2N respectivement), des stimulations mécaniques plus fortes ou plus faibles favorisant moins l'ostéointégration. Bien que Duyck *et al.* (Duyck et al., 2006) rapportent que la densité osseuse proche de l'implant augmente avec la stimulation mécanique (Figure 1.5-A), leurs résultats démontrent que cette stimulation peut aussi contrevenir à la formation osseuse (BV/TV) proche de l'implant, avec une quantité d'os minimisée pour une stimulation mécanique sinusoïdale d'une amplitude de 30 μm (Figure 1.5-C). La stimulation mécanique est donc un facteur déterminant de l'ostéointégration, mais son étude *in vivo* s'avère complexe et les stratégies employées sont diversifiées. Duyck *et al.* et Zacchetti *et al.* utilisent un implant sous forme de tige (Figure 1.6-A&B) (avec l'apport d'une chambre osseuse pour Duyck *et al.* (Figure 1.6-A)), implant qui est déplacé selon une amplitude donnée (en force ou en déplacement) à une fréquence de 1 Hz (Duyck et al., 2006; Zacchetti et al., 2013). Jing *et al.* emploient un cylindre poreux et viennent stimuler l'interface os-implant en immobilisant leurs lapins sur une plaque vibrante (Jing et al., 2018). Enfin, Iijima *et al.* viennent stimuler statiquement leur interface os-implant en reliant deux vis implantées par un ressort (Iijima et al., 2013) (Figure 1.6-C). Cette grande variabilité méthodologique rend la comparaison de ces études difficile, notamment pour déterminer des seuils de stimulation mécanique avantageux pour l'ostéointégration.

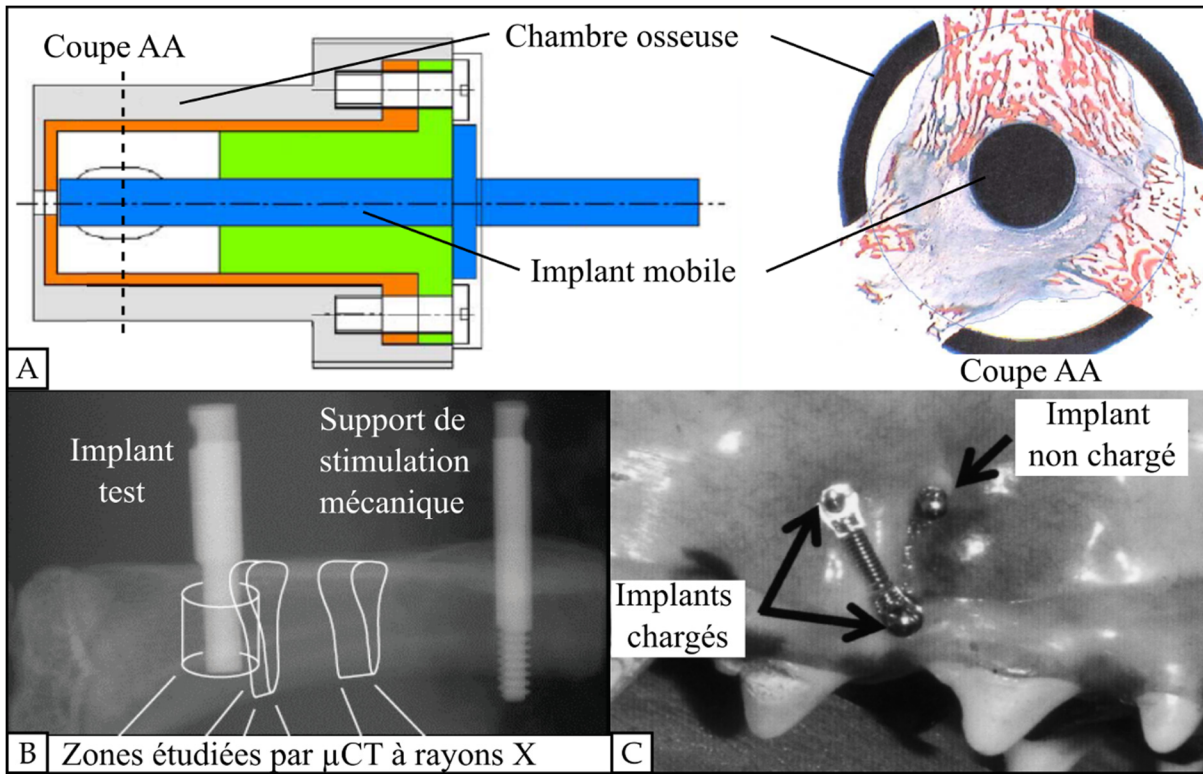


Figure 1.6 Modèles d'implants pour l'étude de la stimulation mécanique *in vivo*

A. Chambre osseuse avec implant mobile (Adaptée de (Duyck et al., 2006))

B. Implant et support pour la stimulation mécanique (Adaptée de (Zacchetti et al., 2013))

C. Implants chargés statiquement (ressort) et contrôle (Adaptée de (Iijima et al., 2013))

L'ostéointégration est également influencée par la surface de l'implant. Ainsi, la microgéométrie (Biemond et al., 2011), l'anodisation (Katunar et al., 2017), la rugosité (Rønold & Ellingsen 2002b), le matériau (Anchieta et al., 2014; Bougas et al., 2014), le revêtement chimique ou biologique (Bougas et al., 2014; Dudeck et al., 2014) peuvent favoriser le contact de l'os avec l'implant, la qualité du tissu et la résistance à la fracture de l'interface. Toutefois, la pluralité de ces facteurs et leurs déclinaisons ne permettent pas d'étudier entièrement leur influence, les études réalisées se limitant à deux ou trois modalités par facteur.

Comme pour le tissu osseux, les hormones influencent positivement l'ostéointégration (Dudeck et al., 2014; Jing et al., 2018), l'os à l'interface étant de moins bonne qualité pour un sujet diabétique ou ménopausé. Cependant, un animal ne peut se voir appliquer deux situations

hormonales différentes simultanément, ce qui augmente le nombre de spécimens sacrifiés, d'autant plus pour limiter la variabilité interspécimen qui s'ajoute à l'étude de ces facteurs.

Enfin, il a été montré que plus le temps de cicatrisation était long, plus l'ostéointégration était de bonne qualité (meilleure adhésion, meilleures propriétés mécaniques de l'os, *etc.*) (Jimbo et al., 2013; Katunar et al., 2017; Kim et al., 2016; Mathieu, Vayron, Soffer, et al., 2012; Vayron et al., 2011, 2012, 2014; Wang, Qu, & Yu, 2014; Yu et al., 2014). Cependant, il arrive que les propriétés mécaniques diminuent durant les premières semaines de cicatrisation, comme l'ont remarqué Kim *et al.* et Yu *et al.* (Kim et al., 2016; Yu et al., 2014). Cela peut être expliqué par une quantité grandissante d'os nouvellement formé, un os moins minéralisé et aux propriétés mécaniques plus faibles, comparativement à l'os mature (Kim et al., 2016). Là encore, l'étude de plusieurs stades de cicatrisation vient multiplier le nombre de spécimens, le retrait de l'implant et l'os environnant nécessitant le sacrifice de l'hôte.

Bien que la méthodologie *in vivo* permette l'étude de nombreux facteurs, plusieurs limites interviennent. Tout d'abord, une forte limitation éthique s'applique à ce type d'étude. La chirurgie d'implantation constitue un risque pour l'animal (survie à l'opération, infection). À cela s'ajoute la nécessité de sacrifier l'animal après cicatrisation afin d'étudier l'interface os-implant. Ces limitations éthiques à l'égard de l'animal ont pour conséquence de réduire le nombre de spécimens impliqués dans les études, et donc, par conséquent, le nombre d'interfaces os-implants étudiées.

Ensuite, la morphologie du squelette animal, différente de l'humain, impose parfois de modifier la géométrie des implants étudiés. Ainsi on peut trouver des études avec tiges de longueurs et diamètres variables (de 0,5 à 8 mm de diamètre, et jusqu'à 50 mm de longueur) (Biemond et al., 2011; Duyck et al., 2006; Katunar et al., 2017; Leucht et al., 2007), ou encore des implants en forme de pièce de monnaie (Rønold & Ellingsen 2002a; Mathieu, Vayron, Soffer, *et al.* 2012; Mathieu, Vayron, Barthel, *et al.* 2012). Ces modèles présentent une interface directe avec l'os lors de l'implantation, ce qui ne permet pas de distinguer aisément l'os nouvellement formé de l'os mature. C'est pourquoi différentes études ont considéré un

modèle d'implant possédant une chambre osseuse pour étudier l'ostéointégration (Ajami et al., 2014; Duyck et al., 2006). Un de ces modèles réutilise notamment les implants en forme de pièce de monnaie en ajoutant une couronne de PTFE pour créer une chambre de 200 μm de hauteur (Fraulob et al., 2020; Mathieu et al., 2011; Vayron et al., 2011, 2012, 2014).

Enfin, différents animaux sont utilisés dans les études *in vivo*. On trouve principalement le lapin et le rat, car leur vitesse de croissance osseuse est grande (Zacchetti *et al.* 2013; Rønold & Ellingsen 2002b; Bougas *et al.* 2014; Dudeck *et al.* 2014). De plus, leur petite taille permet d'avoir un nombre d'individus important plus facilement en animalerie. Ensuite viennent les plus gros mammifères comme le chien (Iijima et al., 2013; Kim et al., 2016), la chèvre (Biemond et al., 2011) ou le cochon (Anchieta et al., 2014), qui restent plus rares dans les études *in vivo*. La diversité animale engendre une variabilité dans le type d'os rencontré (un lapin ou un rat possédant moins d'os trabéculaire qu'un plus gros mammifère) et dans la biologie même de l'os étudié, la vitesse de croissance variant d'une espèce à l'autre. Enfin, cette variabilité rend l'extrapolation des résultats à l'humain plus complexe. (Pearce, Richards, Milz, Schneider, & Pearce, 2007)

1.2.5 L'interface os-implant *ex vivo*

Initialement destinée au développement de greffons osseux à partir de matrices synthétiques dans le cadre de l'ingénierie tissulaire (Bouet, Marchat, Cruel, Malaval, & Vico, 2015), la méthodologie *ex vivo* est aussi utilisée pour maintenir en vie voire développer du tissu animal pour en déterminer les propriétés et son évolution en fonction des paramètres de culture.

1.2.5.1 Les différents types de bioréacteurs

On distingue quatre types de bioréacteurs, chacun maintenant en vie un échantillon osseux par une approche différente.

Le bioréacteur *in vivo* est proposé en ingénierie tissulaire pour développer des matrices osseuses au sein d'un animal hôte en le reliant à un pédicule (ensemble de vaisseaux sanguins

et de nerfs reliés à un organe). Il est isolé du reste de l'animal par une paroi en silicone (Figure 1.7). Cependant, l'évolution de l'échantillon est dépendante de l'animal et son état de santé, sachant que le risque d'infection est élevé. De plus, l'échantillon n'est pas sollicité mécaniquement. (Holt, Halpern, Dovan, Hamming, & Schwartz, 2005)

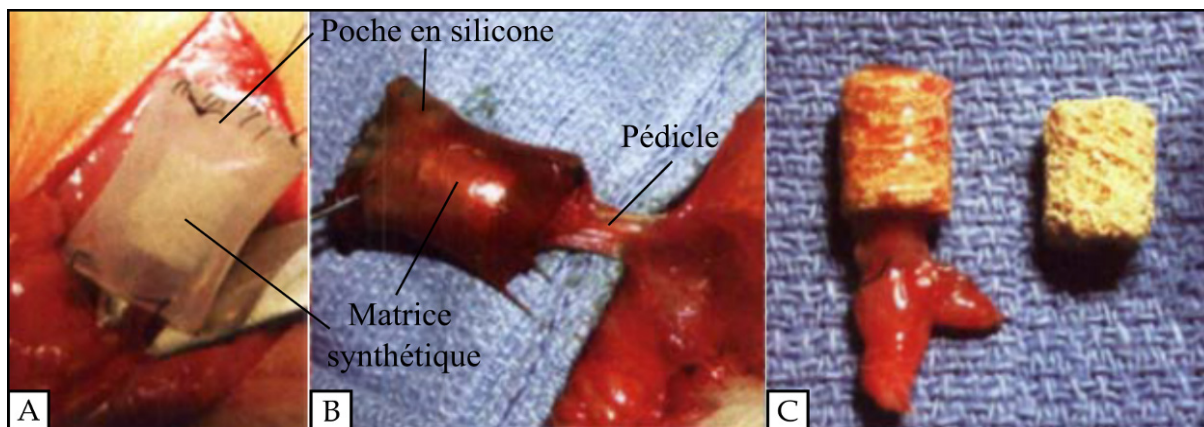


Figure 1.7 Bioréacteur *in vivo* à l'implantation (A) et six semaines plus tard (B)
C. Échantillon après culture (à gauche) et sans culture (droite)
(Adaptée de (Holt et al., 2005))

La fiole rotative (Figure 1.8) est une cuve remplie de liquide nutritif, l'échantillon étant suspendu dans ce milieu. Un agitateur magnétique est utilisé pour permettre un meilleur échange de nutriments avec l'échantillon. Cependant, la survie de l'échantillon est difficile, les nutriments ne pouvant pas pénétrer facilement au cœur de l'échantillon, ce qui entraîne généralement sa nécrose. (El Haj & Cartmell, 2010; Rauh, Milan, Günther, & Stiehler, 2011; Vetsch, Müller, & Hofmann, 2015; Yeatts & Fisher, 2011)

La cuve tournante est une cuve constituée de deux cylindres concentriques séparés par le liquide nutritif (Figure 1.9). Le cylindre intérieur permet les échanges gazeux (O_2 , CO_2) tandis que le cylindre extérieur agit le liquide nutritif pour favoriser les échanges de nutriments avec l'échantillon, laissé en libre mouvement dans le bioréacteur. Cependant, là encore, de la nécrose apparaît au cœur des échantillons. (El Haj & Cartmell 2010; Yeatts & Fisher 2011; Rauh *et al.* 2011; Vetsch, Müller, & Hofmann 2015; Zhao *et al.* 2016)

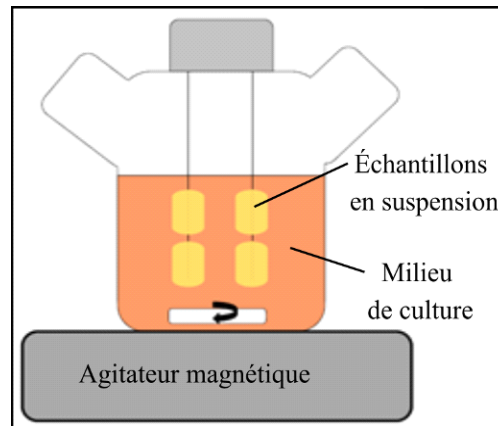


Figure 1.8 Fiole rotative
(Adaptée de (Yeatts & Fisher 2011))

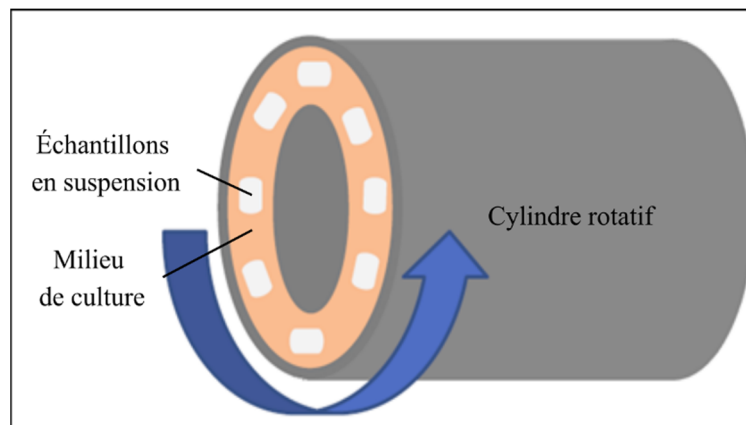


Figure 1.9 Cuve tournante
(Adaptée de (Yeatts & Fisher, 2011))

Le bioréacteur à perfusion est plus complexe à mettre en place, sa géométrie étant réduite à l'échantillon seul. Une pompe pousse le liquide dans la chambre contenant le spécimen afin d'assurer la pénétration des nutriments au cœur de l'échantillon. Le débit de cette pompe est contrôlé et permet aussi de recréer les stimulations mécaniques rencontrées *in vivo* (Figure 1.10). De plus, ce bioréacteur offre la possibilité de venir appliquer un chargement mécanique directement sur l'échantillon. (El Haj & Cartmell, 2010; Rosa, Simoes, Magalhães, & Marques, 2015; Vetsch et al., 2015; Yeatts & Fisher, 2011; Zhao et al., 2016)

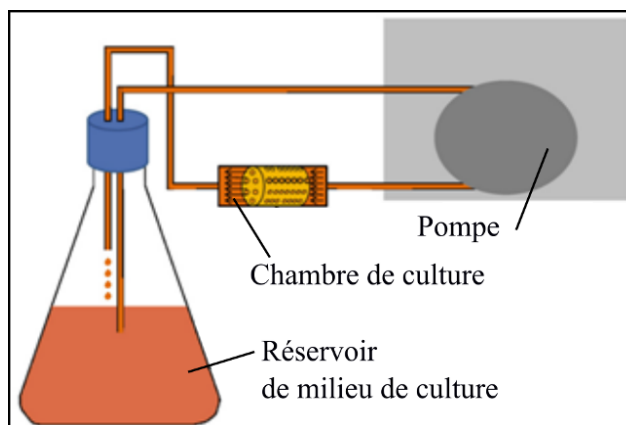


Figure 1.10 Bioréacteur à perfusion
(Adaptée de (Yeatts & Fisher 2011))

Contrairement au bioréacteur *in vivo*, la fiole rotative, la cuve tournante et le bioréacteur à perfusion maintiennent en vie un échantillon en dehors de l'animal. De fait, il n'est pas nécessaire de garder le donneur/l'hôte en vie ce qui coûte plus cher que la culture *ex vivo*.

Cependant, le maintien en vie du tissu osseux en vie en dehors de l'animal exige d'apporter à l'échantillon tout ce dont il a besoin pour sa survie. Aujourd'hui, l'ensemble des nutriments nécessaires et leur impact sur le tissu sont encore en étude. Ainsi, l'inconvénient de la culture *ex vivo* est que le tissu peut ne pas réagir correctement, car il ne lui a pas été fourni tous les nutriments essentiels à sa bonne santé. Toutefois, il s'agit aussi d'un avantage dans la mesure où un contrôle total sur ce qui est apporté à l'échantillon permet l'étude de leur influence. Parmi ces nutriments, un bioréacteur *ex vivo* étant un système ouvert, l'échange de gaz (O_2 et CO_2 notamment) peut se faire librement. (Holt et al., 2005; Nokhbatolfoghahaei et al., 2017; Rauh et al., 2011)

D'autre part, en particulier pour le bioréacteur à perfusion, d'autres facteurs peuvent être étudiés plus facilement que sur le vivant, comme la stimulation mécanique. De plus, les erreurs systématiques liées à l'animal peuvent être éliminées en augmentant le nombre de donneurs par exemple. (Holt et al., 2005; Nokhbatolfoghahaei et al., 2017; Rauh et al., 2011)

1.2.5.2 Étude du tissu osseux par méthodologie *ex vivo*

Bien que transposable aussi à l'étude du cartilage (Yusoff, Abu Osman, & Pingguan-Murphy 2011; Kleuskens *et al.* 2020), la méthodologie *ex vivo* a permis d'étudier le tissu osseux et notamment son comportement vis-à-vis de la stimulation mécanique, stimulation généralement appliquée par la compression dynamique de l'échantillon (Birmingham, Niebur, McNamara, & McHugh, 2016; Endres, Kratz, Wunsch, & Jones, 2009; Vivanco *et al.*, 2013). Une augmentation de la rigidité des échantillons osseux en fonction de l'amplitude des déformations appliquées pendant la culture a été mise en évidence (Figure 1.11). Toutefois, ce remodelage osseux est dépendant de l'origine anatomique des échantillons, comme l'a montré l'étude de David *et al.*, (David *et al.*, 2008), dont l'analyse des échantillons a été complétée par Rupin *et al.*, (Rupin *et al.*, 2010). En mettant en culture des échantillons bovins issus de sternum et d'ulna, avec une stimulation mécanique de 4000 $\mu\epsilon$, les résultats n'ont montré du remodelage osseux que pour les échantillons de sternum. L'ulna est un os soumis régulièrement à des contraintes mécaniques dynamiques au sein de l'animal. Ainsi, l'environnement mécanique créé dans le bioréacteur devait être proche de l'environnement *in vivo*, d'où l'absence de remodelage osseux pour ces échantillons.

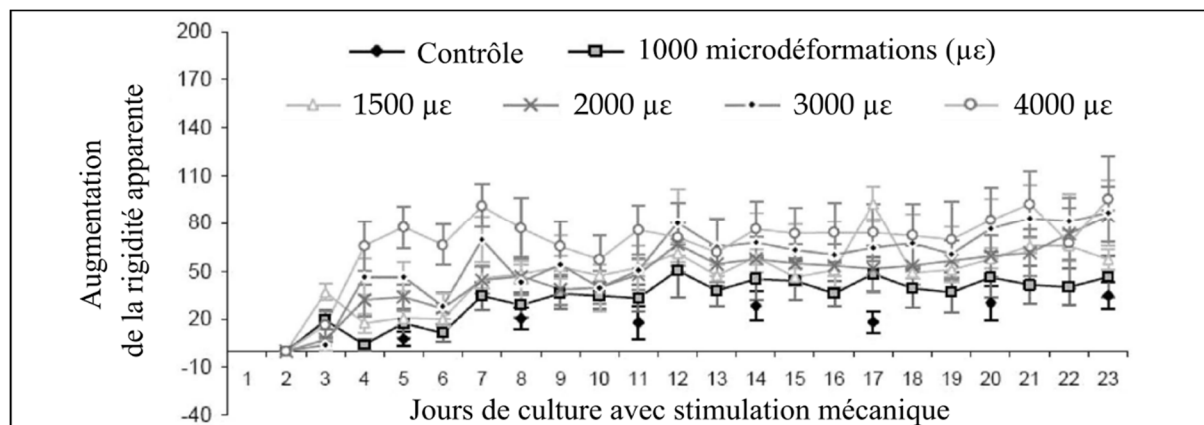


Figure 1.11 Augmentation de la rigidité apparente d'échantillons en fonction du jour de culture *ex vivo* (Adaptée de (Endres *et al.*, 2009))

Ces études ont toutes été réalisées avec un bioréacteur à perfusion, plus particulièrement le bioréacteur ZetOs, configuré pour des échantillons de 10 mm de diamètre et 5 mm d'épaisseur

(Figure 1.12). Ce bioréacteur est constitué d'un socle et une tige de compression en métal afin de réaliser la stimulation mécanique de l'échantillon (Figure 1.12-A&C), et d'une chambre de culture en plastique qui permet la circulation du milieu de culture par l'intermédiaire des entrée et sortie de perfusion (Figure 1.12-B).

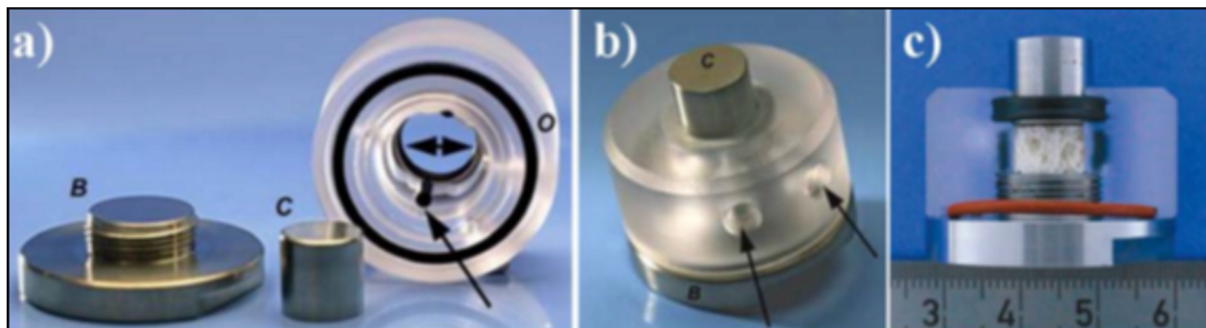


Figure 1.12 Bioréacteur ZetOs® (Tirée de (C. M. Davies *et al.*, 2006))

Seules deux études *ex vivo* du tissu osseux concernent l'interface os-implant (S. Rahman *et al.*, 2016; Schnieders *et al.*, 2013). Ces deux études ne s'intéressent pas aux propriétés mécaniques de l'interface os-implant, mais à la biocompatibilité d'un ciment (Schnieders *et al.*, 2013) ou à la capacité d'un implant (une aiguille) à relâcher un médicament dans le tissu environnant (S. Rahman *et al.*, 2016). Peu d'attention est accordée à la qualité de l'interface os-implant. Ainsi, l'intégration de l'implant dans l'étude de Rahman *et al.* (S. Rahman *et al.*, 2016) se limite à l'histologie et à l'observation au microscope électronique à balayage. Schnieders *et al.* (Schnieders *et al.*, 2013) analysent des paramètres de biocompatibilité tels que la concentration en lactate déshydrogénase (liée à la destruction du tissu) ou le pH (potentiel hydrogène), ainsi que la procédure d'inflammation avec l'expression de la cytokine (agent inflammatoire) dans les cellules.

Le faible nombre d'études à ce sujet peut être dû à la taille réduite des échantillons osseux, qui vient restreindre celles des implants utilisés. D'après (Keaveny *et al.*, 2001), l'échantillon doit avoir un diamètre compris entre 5 et 10 mm pour garder une hypothèse de milieu continu. Bien que le bioréacteur ZetOs respecte cette condition pour un échantillon osseux seul, l'ajout d'un implant en son sein, de 2-3 mm d'épaisseur, réduit l'échantillon osseux à 2 mm de hauteur ce

qui est bien trop petit pour conserver cette hypothèse de milieu continu. Il est donc nécessaire, dans le cas d'une application de la méthodologie *ex vivo* dans ce projet, de créer un bioréacteur qui correspond à nos besoins, les modèles présentés par la littérature étant insuffisants.

1.3 Caractérisation de l'interface os-implant par imagerie

Dans l'étude de l'interface os-implant, la quantité d'os en contact de l'implant (noté BIC pour « *bone in contact* ») est un des critères clés pour juger de la qualité de l'ostéointégration (Berglundh, Abrahamsson, Lang, & Lindhe, 2003; Jimbo et al., 2013). Pour déterminer le BIC, la méthode la plus utilisée, considérée comme une référence dans l'étude du tissu osseux, est l'histologie. Cependant, cette méthode détruit l'échantillon en plusieurs lames de quelques centaines de micromètres d'épaisseur pour examiner l'interface, rendant l'échantillon inexploitable pour d'autres analyses, comme un test de rupture par exemple. C'est pourquoi de nombreuses études se sont tournées vers l'imagerie, et plus particulièrement la microtomographie par rayons X (ou μ CT) pour observer le tissu osseux dans les environs de l'implant.

1.3.1 La (micro-)tomographie par rayons X - Technique et résultats

La tomographie par rayons X (ou CT – *computed tomography*) utilise une multitude de radiographies, prises à différents angles autour d'un axe passant au milieu de l'échantillon étudié, pour obtenir une image en 3D de l'objet, par l'intermédiaire d'une reconstruction par ordinateur. Cette technique est largement employée en clinique (Burghardt, Link, & Majumdar, 2011; Mazonakis & Damilakis, 2016), avec une résolution allant de 200 μ m pour le CT-scan, à quelques micromètres pour le μ CT. En recherche, certaines études recourent au synchrotron μ CT qui utilise un flux d'électrons plus important pour atteindre une résolution de moins d'une centaine de nanomètres (Bauer & Link 2009; Müller & Harry van Lenthe 2006).

L'étude de l'os par μ CT permet la mesure de nombreux paramètres d'intérêts relatifs aux propriétés osseuses. La densité apparente (densité minérale osseuse ramenée au volume de

l'échantillon) et la fraction volumique (volume osseux rapporté au volume de l'échantillon, notée BV/TV) sont rapportées comme significativement bien estimées relativement aux données mesurées physiquement (principe d'Archimède pour la fraction volumique et mise en cendre pour la densité minérale osseuse) (Aiyangar et al., 2014; Ding, Odgaard, & Hvid, 1999). La densité minérale osseuse peut particulièrement être obtenue par calibration du niveau de gris des pixels avec des densités connues (Burghardt et al., 2011). La qualité de détection du tissu osseux par μ CT a aussi pu être comparée à de l'histologie, au moyen d'un recalage 2D/3D (Stalder et al., 2014). Cette technique, en référence à l'histologie en 2D et aux images volumiques μ CT en 3D, consiste à trouver la coupe 2D de l'image volumique correspondant à l'histologie. Bien que souvent réalisé visuellement, ce recalage a été démontré comme plus précis s'il est effectué, au moins partiellement, de façon automatique (Stalder et al., 2014).

La principale force du μ CT est sa capacité à obtenir une représentation volumique des échantillons osseux, avec notamment la description de l'anisotropie du réseau trabéculaire ou l'agencement du réseau des canaux de Havers pour l'os cortical (Burghardt et al., 2011). Cette description a deux intérêts majeurs. Tout d'abord, elle permet de créer des modèles par éléments finis précis des échantillons, permettant de faire des analyses plus poussées par ordinateur (comportement mécanique, modélisation des phénomènes de remodelage osseux) (Birmingham et al., 2016; Burghardt et al., 2011). Le second intérêt de cette technologie est la possibilité de visualiser l'architecture osseuse avec un niveau d'irradiation relativement bas, ce qui permet de faire un suivi de cette architecture dans le temps via un recalage d'images (Altman et al., 2015; Schulte, Lambers, Kuhn, & Müller, 2011; Zhang, Dall'Ara, Viceconti, & Kadiramanathan, 2019). Ce recalage, qualifié de 3D/3D, consiste à superposer deux images volumiques obtenues à deux instants différents dans le but de les comparer.

L'analyse par μ CT à rayons X permet de déterminer l'évolution de la quantité d'os en contact avec l'implant (BIC), mais aussi de l'os environnant par l'intermédiaire de sa fraction volumique. De Smet *et al.* (De Smet et al., 2006) ont ainsi pu mettre en évidence que la sollicitation prématurée de l'implant après la chirurgie permettait de mieux recruter l'os entourant l'implant, avec un BV/TV significativement plus important lorsque stimulé, sans

toutefois avoir un effet significatif sur le BIC. L'effet de la stimulation mécanique sur l'os autour de l'implant a pu être démontré jusqu'à une distance de 4 mm de l'implant par Zacchetti *et al.* (Zacchetti et al., 2013), conduisant aussi à l'existence d'une sollicitation mécanique optimale pour un remodelage prononcé du tissu osseux.

Toutefois, l'inconvénient majeur de l'imagerie μ CT est la présence d'artéfacts à l'interface avec l'implant métallique due à une différence d'atténuation importante entre l'air (ou l'os) et le métal (J. Y. Li et al., 2014). Ces artéfacts sont visibles jusqu'à 60 μ m de l'interface (J. Y. Li et al., 2014) et peuvent affecter les images jusqu'à 200 μ m (Bernhardt et al., 2004; Vandeweghe, Coelho, Vanhove, Wennerberg, & Jimbo, 2013). Ces artéfacts viennent donc considérablement altérer les mesures du BIC, un paramètre essentiel de l'analyse de l'interface os-implant. Pour remédier à ces artéfacts, Dudeck *et al.* et Butz *et al.* (Butz, Ogawa, Chang, & Nishimura, 2006; Dudeck et al., 2014) proposent de calculer le BIC sur un volume de 18 à 24 μ m autour de l'implant, bien que cela mène à une surestimation du volume d'os en contact comparativement à l'histologie (Butz et al., 2006). Ainsi, de nombreuses études se sont penchées sur la diminution de ces artéfacts par différents traitements d'images et paramètres d'imagerie (Barrett & Keat, 2004; Kovacs et al., 2018; Treece, 2017). Ces artéfacts sont moins présents lors de l'utilisation d'un synchrotron, notamment du fait d'une orientation différente du flux d'électrons par rapport au μ CT clinique (Bernhardt et al., 2004). Cela permet donc une estimation plus précise du BIC (Le Cann et al., 2019), Dudeck *et al.* (Dudeck et al., 2014) ne percevant pas de différence significative avec l'histologie.

De plus, lors de multiples acquisitions μ CT ou d'une acquisition synchrotron intense, les propriétés mécaniques du tissu osseux peuvent être affectées par les rayons X (Barth et al., 2011; Peña Fernández et al., 2018; N. Rahman, Khan, & Badshah, 2018; Singhal, Deymier-Black, Almer, & Dunand, 2011). Barth *et al.* (Barth et al., 2011) démontrent notamment un endommagement des fibres de collagène dans le tissu. Cela a pour conséquence la dégradation du comportement plastique de l'os, plus particulièrement sa résistance à la rupture (60 à 80 % plus faible à hautes intensités de rayons X comparativement à de l'os non irradié). Quelques études ont aussi montré que la viabilité cellulaire pouvait être amoindrie par les rayons X

(Caraiani, Dong, Rudd, & Dietrich, 2018; Mustafy, Benoit, Londono, Moldovan, & Villemure, 2018).

1.3.2 La tomographie par neutrons

Dans l'objectif de limiter les artefacts métalliques en imagerie, d'autres alternatives en imagerie que les rayons X peuvent être utilisées, reposant sur un rayonnement ou une interaction avec la matière différents. C'est le cas de la tomographie par neutrons qui, se basant sur le même principe de tomographie que le μ CT pour accéder à la structure 3D d'un objet, permet d'imager les objets avec un flux de neutrons. Cette technique a été appliquée dans de multiples domaines (paléontologie, géologie, ingénierie, *etc.*) (Kardjilov, Manke, Woracek, Hilger, & Banhart, 2018; Tengattini, Lenoir, Andò, & Viggiani, 2020) et plusieurs études ont comparé la tomographie par neutrons et les rayons X sur différents tissus biologiques tels que des fossiles (Schwarz, Vontobel, Lehmann, Meyer, & Bongartz, 2005; Urciuoli et al., 2018) ou des perles de nacre (Micieli et al., 2018). Alors que les rayons X interagissent avec les électrons, les neutrons entrent en contact avec le noyau des atomes de l'échantillon, transmettant à ces noyaux tout ou partie de leur énergie. Par cette interaction, la tomographie par neutrons présente une influence plus faible sur l'intégrité de la matière, comparativement aux rayons X (Burca et al., 2018), bien que la technique engendre de la radioactivité ce qui la rend incompatible avec une utilisation *in vivo*. De plus, cette interaction rend les neutrons fortement sensibles aux atomes légers tels que l'hydrogène, et faiblement aux atomes lourds comme les métaux (Kardjilov et al., 2018). Cette différence de sensibilité avec les rayons X montre une complémentarité des deux techniques, la tomographie par neutrons étant particulièrement sensible aux molécules de collagène (Micieli et al., 2018) et à d'autres tissus biologiques comme le poumon (Cekanova *et al.* 2014; Watkin, Bilheux, & Ankner 2009) ou encore à différents isotopes (Urciuoli et al., 2018), permettant ainsi la distinction de plus de tissus qu'aux rayons X. La sensibilité aux isotopes a d'ailleurs été exploitée pour étudier la circulation de l'eau dans les plantes (Tötze, Kardjilov, Manke, & Oswald, 2017) en remplaçant l'eau H_2O par de l'oxyde de deutérium D_2O . La faible atténuation des neutrons par les métaux a pour conséquence que les neutrons ne créent pas d'artefacts dans les images, comme l'ont démontré Isaksson *et al.* (Isaksson et al., 2017) en imageant par tomographie par

neutrons et par rayons X un échantillon implanté d'une vis. Cette étude compare quatre acquisitions d'une interface os-implant, deux par μ CT à rayons X et deux par tomographie par neutrons, en utilisant des résolutions différentes pour évaluer l'effet de la qualité d'image sur l'analyse de l'interface os-implant. Alors que les deux acquisitions aux rayons X présentent des artéfacts autour de l'implant, les deux acquisitions par tomographie par neutrons démontrent une bonne visibilité de l'interface os-implant, sans artéfacts. Toutefois, l'étude rapporte aussi que la résolution de la tomographie par neutrons est plus faible que celle obtenue avec le μ CT à rayons X. Cela est en partie expliqué par le processus de conversion des neutrons en lumière, et donc en signal quantifiable, qui est indirect par tomographie par neutrons, contrairement aux rayons X. En effet, après leur interaction avec les atomes de l'échantillon, les neutrons doivent traverser un scintillateur (Figure 1.13) pour convertir l'énergie résiduelle des neutrons en lumière, qui est ensuite classiquement mesurée par une caméra. Cette conversion neutrons-lumière se fait par conséquent en deux étapes, contrairement à celle des rayons X qui est directe (faisceau de photons). (Paul Scherrer Institute, 2020)

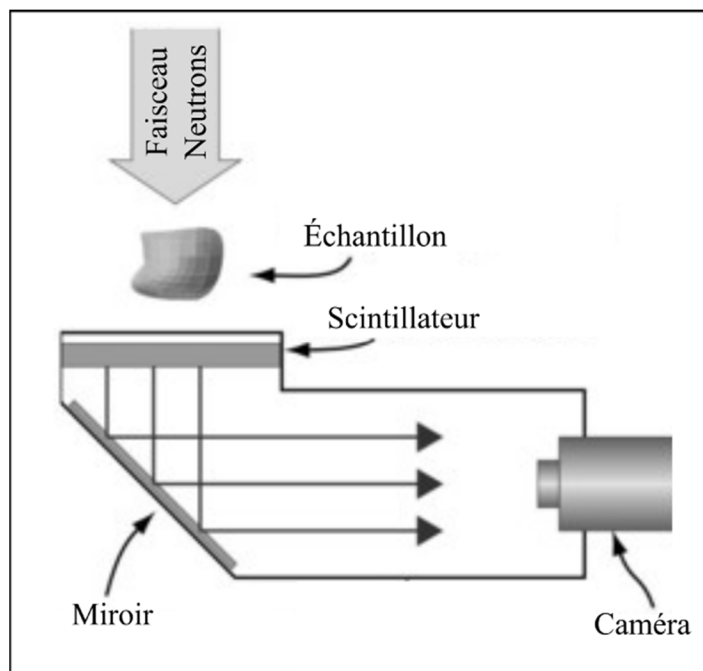


Figure 1.13 Schéma de la combinaison d'un scintillateur et d'une caméra dans un tomographe par neutrons (Adapté de (Paul Scherrer Institute, 2020))

L'absence d'artéfacts dans les images neutrons liés à la présence d'un implant ouvre des perspectives d'analyse de l'interface os-implant avec cette technique, avec la mesure du volume d'os en contact avec l'implant ou l'étude des propriétés mécaniques du tissu osseux. Le Cann *et al.* (Le Cann et al., 2017) ont par exemple utilisé la tomographie par neutrons pour suivre la rupture de l'interface os-implant. Un essai de traction a été réalisé sur deux vis implantées dans des tibias de rats en appliquant une force d'arrachement par incrément. À chaque palier, une acquisition par tomographie par neutrons était effectuée. Les images entre deux instants de chargement ont ensuite été comparées par analyse d'images (corrélation d'images volumiques ou DVC) pour mesurer les déplacements subis par l'os et en extraire les déformations du tissu osseux. Par cette étude, il a pu être démontré que la tomographie par neutrons permet une visualisation suffisante de l'os au contact de l'implant pour suivre les déformations du tissu et localiser les zones de rupture. Toutefois, l'application de cette technique à l'étude de l'ostéointégration est très récente, avec à ce jour, seulement deux applications à l'interface os-implant (Isaksson et al., 2017; Le Cann et al., 2017).

Bien que la comparaison avec le μ CT à rayons X ait pu valider la sensibilité de la technique aux tissus minéralisés (Isaksson et al., 2017; Micieli et al., 2018), aucune validation de la qualité de cette sensibilité aux tissus biologiques n'a pu être faite comparativement à l'histologie, référence dans le domaine. D'autre part, l'étude de l'interface os-implant par tomographie par neutrons n'a impliqué que des implants de type vis, qui ne permettent pas de distinguer l'os mature du tissu nouvellement formé. Ainsi, une évaluation plus approfondie de la tomographie par neutrons avec d'autres implants et comparativement à d'autres techniques permettrait de mieux appréhender ses capacités pour l'étude de l'ostéointégration.

CHAPITRE 2

PROBLÉMATIQUE DE RECHERCHE

À la suite de la revue de littérature réalisée précédemment, la problématique de recherche de ce projet doctoral est présentée ici, ainsi que les objectifs et hypothèses qui en découlent.

2.1 Problématique

L'ostéointégration, qui comprend des phénomènes de formation et résorption osseuse, est un phénomène complexe régi par de nombreux facteurs à la fois biologiques (sexe, âge, qualité de vie du patient), mécaniques (stimulation de l'os autour de l'implant, stabilité primaire de l'implant), et directement liés à la conception de l'implant (matériau, géométrie, rugosité et état de surface, *etc.*). Ces facteurs ont été en grande partie mis en évidence par des études *in vivo* qui constituent la majorité des études de l'interface os-implant (avec les études cliniques et les études *in vitro* cellulaires). Dans le cadre d'études *in vivo*, l'animal est généralement sacrifié après une période de cicatrisation déterminée afin d'observer l'interface os-implant et plus particulièrement l'os situé à quelques centaines de micromètres de l'implant. Différents modèles d'implants sont employés, tels que des vis ou des pastilles. Leur géométrie, facile à reproduire, permet de standardiser l'approche et ainsi de mieux maîtriser certains facteurs comme le matériau de l'implant ou son état de surface (rugosité, revêtement, *etc.*). Un de ces modèles consiste notamment à créer une chambre osseuse qui met en évidence de l'os nouvellement formé au contact avec l'implant. De cette manière, il est possible d'étudier l'influence des facteurs d'ostéointégration sur la formation et la maturation de l'os en contact avec l'implant. Toutefois, le nombre d'animaux sacrifiés et le nombre d'implants placés dans chaque animal sont réduits pour des raisons éthiques, ce qui limite le nombre de facteurs pouvant être étudiés. De plus, certains facteurs sont beaucoup plus complexes à étudier *in vivo*. Les facteurs liés, par exemple, à l'état de santé (tels que la ménopause, le sexe, l'âge, le diabète, *etc.*) viennent s'aligner avec la variabilité interspécimen et nécessitent donc un nombre plus important d'animaux pour étudier leurs effets. D'autre part, il reste difficile d'étudier la stimulation mécanique de l'os proche de l'implant en utilisant des modèles animaux, car cela

entraîne des procédures invasives et complexes à reproduire. Enfin, la réalisation d'études *in vivo* repose sur le choix d'un modèle animal et d'une région anatomique pour l'implantation, choix qui influence le type d'os étudié et la vitesse de croissance osseuse autour de l'implant.

Dans un contexte d'étude du tissu osseux, et plus particulièrement pour la création de greffons osseux à partir de matrices artificielles, la méthodologie *ex vivo* a fait ses preuves. Cette méthodologie consiste à maintenir en vie et à développer des échantillons d'os d'environ 1 cm³ en dehors de l'animal grâce à un bioréacteur. Ce bioréacteur permet l'étude de certains facteurs impossibles (ou difficilement réalisables) *in vivo*, la littérature s'étant notamment intéressée à l'influence de la stimulation mécanique sur le développement de l'os. L'utilisation de plusieurs échantillons provenant d'un même animal pour l'étude d'un même facteur constitue l'une des forces de cette méthodologie. Toutefois, la mise en place d'un bioréacteur reste un champ d'études important, en particulier du fait de la complexité de cette technologie.

Parallèlement à la création d'échantillons, l'étude du tissu osseux et de son interface avec un implant fait appel à de nombreuses techniques pour étudier l'interface. Parmi elles, l'histologie constitue une référence dans l'étude de l'interface os-implant, permettant l'observation et l'identification directes des tissus en contact avec l'implant. Cependant, cette technique présente le désavantage de fournir une visualisation 2D de l'interface, en plus de détruire les échantillons. La tomographie par rayons X est une technique d'imagerie qui offre une visualisation 3D des échantillons osseux. Non destructive, cette technique est largement utilisée dans la littérature, autant en recherche qu'en clinique. Bien qu'elle soit aussi considérée comme une référence dans l'étude de l'ostéointégration, une limite majeure de l'emploi des rayons X est la création d'artéfacts sur les images, liés à la présence de métal. Récemment, la tomographie par neutrons a été proposée en tant qu'alternative pour observer l'interface os-implant dans le cadre de la recherche fondamentale. Peu sensible aux métaux, cette technique permet d'obtenir des images de l'os proche de l'implant dépourvues d'artéfacts. Cependant, une identification des tissus analysés par cette méthode nécessite d'être réalisée pour mieux caractériser l'interface os-implant.

2.2 Hypothèses et objectifs de recherche

Les problématiques adressées par la revue de la littérature mettent en évidence l'hypothèse principale de ce projet de thèse qu'il est possible d'influer sur l'évolution du tissu osseux. De cette hypothèse découle la **question de recherche principale** de cette thèse :

Comment évolue le remodelage osseux, notamment dans un contexte d'ostéointégration, en fonction de l'environnement ?

Pour répondre à cette question, il est nécessaire de bien définir la stratégie employée pour étudier l'ostéointégration. Elle repose sur trois points fondamentaux :

- la méthodologie employée pour initier ce phénomène et ainsi créer des échantillons os-implant,
- la (les) technique(s) employée(s) pour étudier ces échantillons,
- la définition des facteurs étudiés.

Le choix de la méthodologie employée pour créer des échantillons os-implant est importante, car elle doit pouvoir permettre, d'une part, de créer ces échantillons de façon reproductible, et, d'autre part, de contrôler les facteurs qui pourraient influencer l'évolution de l'ostéointégration. Dans ce cadre, la méthodologie *ex vivo*, en isolant complètement l'échantillon, pourrait répondre à ces besoins. Mais, est-il possible d'initier de l'ostéointégration par méthodologie *ex vivo*, en particulier sur une grande surface d'implant ? La littérature n'offrant pas un bioréacteur suffisamment grand pour accueillir un échantillon osseux et un implant autre qu'une tige métallique, cette question révèle le **premier objectif** de ce projet : développer un bioréacteur pour étudier le remodelage osseux et l'ostéointégration dans un milieu contrôlé.

La microstructure du tissu osseux au contact de l'implant permet de juger de la qualité de l'interface os-implant. Parmi les techniques utilisées pour accéder à cette microstructure, la littérature a montré que la tomographie par neutrons présentait un avantage pertinent par rapport à la tomographie par rayons X puisqu'elle ne crée pas d'artéfacts dans les images en

présence d'objets métalliques. Mais quels sont les avantages de la tomographie par neutrons pour étudier l'interface os-implant par rapport à l'histologie, référence en la matière ? Le **second objectif** de ce projet est donc d'évaluer les performances de la tomographie par neutrons dans la caractérisation de l'interface os-implant, comparativement à l'histologie.

Enfin, parmi les nombreux facteurs influençant l'ostéointégration, il est réputé que l'usage d'un revêtement sur la surface de l'implant, influence positivement l'adhésion du tissu osseux. Parmi les différents revêtements existants, il existe un revêtement polymère qui a démontré, *in vitro*, qu'il inhibait la prolifération du staphylocoque doré, une bactérie responsable de bon nombre d'infections lors de chirurgies, et qu'il favoriserait la maturation des cellules osseuses. Ce polymère pourrait-il favoriser l'ostéointégration ? Cette question met en lumière le **troisième objectif** de cette thèse : caractériser l'influence de ce revêtement polymère sur la croissance et la répartition osseuse au sein d'un modèle standardisé d'implant mettant en évidence l'os nouvellement formé.

CHAPITRE 3

CULTURE *EX VIVO*

La méthodologie *ex vivo* permet un meilleur contrôle des facteurs régissant les phénomènes de formation et résorption osseuse par rapport aux études *in vivo*. Cette méthode est toutefois complexe à appliquer et ce chapitre vise à présenter les travaux effectués dans la mise en place de cette méthodologie. En premier lieu, la conception du bioréacteur créé durant cette thèse sera exposée. Elle sera suivie d'une étude réalisée avec ce bioréacteur.

3.1 Conception d'une chambre environnementale

3.1.1 Définition du cahier des charges

Pour pouvoir mener à bien ce projet, il est nécessaire de concevoir un bioréacteur conforme à ses besoins, la littérature ne nous permettant pas d'en trouver un déjà existant. Pour cela, un cahier des charges a été réalisé selon l'approche du déploiement de la fonction qualité (ou QFD) (ReVell, Moran, & Cox 1998). Le QFD est un outil utilisé pour convertir les besoins d'un client en une sélection de caractéristiques techniques afin de définir le produit.

En premier lieu, une définition des besoins et contraintes (ou attributs client) du bioréacteur a été effectuée. Elle s'appuie sur les bioréacteurs de la littérature et les besoins et contraintes relatives à ce projet de thèse et celui d'Annie LEVASSEUR à l'École de technologie supérieure (ÉTS). On appellera chambre le volume contenant l'échantillon ; il s'agit donc d'une partie du bioréacteur.

Dans le cadre de la thèse d'Annie LEVASSEUR, les besoins émis pour ce bioréacteur sont les suivants :

- Maintenir en vie un échantillon osseux
- Voir l'échantillon pendant la culture
- Initier du remodelage osseux grâce à de la stimulation mécanique

- Analyser l'échantillon par tomographie à rayons X pendant la culture

À ces besoins, on peut rajouter celui inhérent à ce projet de thèse concernant l'ostéointégration :

- Accueillir un échantillon osseux d'au moins 1 cm³ avec un implant

Toutefois, la culture *ex vivo* induit certaines contraintes dans son application. Les critères associés à ces contraintes se doivent d'être satisfaits dans le bioréacteur. Ces contraintes sont les suivantes :

- Le bioréacteur doit empêcher la nécrose des échantillons. Cette nécrose intervient lorsque les cellules au cœur de l'échantillon ne sont pas alimentées suffisamment. Les nutriments nécessaires sont apportés par le milieu de culture. L'étude de Davies *et al.* (C. Davies *et al.* 2006) indique qu'un débit de perfusion de 7 mL/h est nécessaire pour s'assurer que tout le volume de l'échantillon soit alimenté en milieu de culture. Ce critère va de pair avec le volume de la chambre osseuse qui doit être réduit au volume de l'échantillon afin de limiter la circulation du milieu de culture au contact de l'échantillon. Ainsi, cette contrainte impose que le bioréacteur doit permettre une perfusion de milieu de culture de 7 mL/h, et doit avoir un volume total de fluide au sein de la chambre osseuse le plus faible possible, considérant le volume de l'échantillon utilisé.
- Le bioréacteur doit empêcher l'introduction de tout contaminant (bactérie, virus, champignon) pendant la culture. Pour cela, toutes les pièces du bioréacteur doivent être stériles au début de la culture. En particulier, il serait préférable que ces pièces puissent être stérilisées à l'autoclave, afin d'être réutilisables, ce qui va influencer le choix des matériaux utilisés pour le bioréacteur. Par ailleurs, pendant la culture, aucune fuite de milieu de culture ne doit intervenir, puisque cela signifie qu'il y a un échange de fluide avec le milieu extérieur du bioréacteur, et donc la possible introduction de contaminants. Ces contaminants étant introduits par l'air, les bulles d'air au sein de la chambre osseuse doivent être évitées au maximum, et le cas échéant, doivent avoir le plus petit volume possible sans aucun contact avec l'échantillon.

- Le bioréacteur doit pouvoir être transporté entre les différentes machines utilisées pendant la culture (μ CT, incubateur, *etc.*). Cela signifie que le bioréacteur doit posséder un mécanisme pour empêcher le mouvement de l'échantillon. Plusieurs bioréacteurs pouvant être transportés simultanément, le volume de ce bioréacteur doit être le plus réduit possible avec une limite maximale de 125 000 mm³, si on se tient à la surface disponible dans l'incubateur prévu pour les cultures pour une utilisation de 6 bioréacteurs.
- Le bioréacteur doit maintenir un implant au contact de l'échantillon. Dans le cadre de l'étude de l'ostéointégration *ex vivo*, il est prévu de placer un implant sur l'échantillon. Le volume de ce dernier étant trop petit pour permettre de lui attacher cet implant, le maintien du contact entre les deux doit être réalisé par le bioréacteur. Ainsi, le bioréacteur doit posséder un mécanisme de chargement statique pour maintenir ce contact.

Les attributs clients définis par les besoins et contraintes du projet peuvent être rangés selon trois catégories : l'environnement de la chambre, la culture osseuse et les analyses de l'échantillon osseux (Tableau 3.1). Chaque attribut se voit attribuer une cote, comprise entre 1 et 5, qui détermine si cet attribut est essentiel (5) ou relève d'une faible importance (1) pour le projet d'après le client (Annie LEVASSEUR, Florian GUILLAUME et les futurs utilisateurs du bioréacteur à l'HSCM) (Tableau 3.1).

Pour chaque attribut, une à plusieurs spécifications techniques sont identifiées (Tableau 3.1). Ces spécifications sont des critères qui permettent d'évaluer la performance des différents concepts qui seront proposés pour répondre aux besoins du projet. Quantitatives, elles sont associées à une valeur à maximiser (notée \uparrow), c'est-à-dire que tout résultat supérieur à cette valeur est valide, à minimiser (notée \downarrow), où tout résultat inférieur à cette valeur est accepté, ou à atteindre (notée $=$), où le résultat doit approcher le plus possible de la cible.

Tableau 3.1 Tableau des attributs et spécifications techniques du bioréacteur

Catégorie	Attribut Client	Importance	Spécification Technique	Objectif	Cible
Environnement de la chambre	Voir l'échantillon	2	Nombre de côtés plans transparents	↑	1 côté transparent
	Accueillir un échantillon osseux + implant de taille donnée	5	Hauteur chambre intérieure	↑	13 mm
			Largeur chambre intérieure	↑	12 mm
			Profondeur chambre intérieure	↑	12 mm
	Transport de la chambre	5	Nombre de mécanismes de blocage du mouvement de l'échantillon	↑	1
	Tailles de la chambre et du bioréacteur limitées à celle de l'échantillon+implant	3	Volume total de fluide dans la chambre	↓	6 mL
			Volume du bioréacteur	↓	125000 mm ³ (50x50x50 mm ³)
Culture osseuse	Maintenir un échantillon osseux en vie	5	Nombre de pièces à fabriquer	↓	5
			Pourcentage de pièces stérilisables (autoclave)	=	100%
			Débit de perfusion en milieu de culture	=	7 mL/h
	Limitation du risque de contamination interne	5	Temps de renouvellement du milieu de culture dans la chambre	↓	1h
			Volume de fluides échangés entre l'intérieur et l'extérieur du bioréacteur (volume de fuites)	=	0 mL
			Diamètre des bulles d'air présentes dans le bioréacteur	↓	1 mm
			Rayons de courbures intérieurs	↑	0,2 mm
			Pourcentage de pièces biocompatibles en contact avec le milieu de culture	↑	100%
	Stimuler mécaniquement l'échantillon	5	Nombre de paliers de stimulation mécanique en compression pouvant être réalisés avec le bioréacteur sur l'échantillon	↑	1000, 2000 et 3000 microdéformations
			Surface de l'échantillon comprimée par le mécanisme de stimulation mécanique	=	100% de la surface de l'échantillon
			Nombre de mécanismes de chargement statique	↑	1
Analyses de l'échantillon	Mesurer le module d'Young de l'échantillon osseux	3	Nombre de mécanismes de mesure du module d'Young de l'échantillon	↑	1
	Analyse avec un scanner μ CT	3	Pourcentage de pièces du bioréacteur à faible radio-opacité	=	100%

Afin de déterminer les spécifications techniques les plus importantes, une maison de la qualité est construite (Tableau 3.2). Cette maison évalue l'impact du respect de la spécification technique sur chaque attribut client, 5 étant un effet important, 1 un effet moindre et 0 (ou vide) aucun effet. Dépendamment du respect de la spécification technique dans le sens (+) ou à l'encontre (-) de l'attribut client, un signe est associé à cette cote. Deux facteurs d'importance sont calculés : le facteur algébrique F-Alg et le facteur absolu F-Abs. Ils consistent en la somme des cotes précédentes (en valeurs absolues pour F-Abs), pondérées par l'importance de chaque attribut. Le F-Abs d'une spécification technique divisé par la somme de tous les F-Abs donne alors l'importance relative de la spécification technique, permettant ainsi de classer ces spécifications les unes par rapport aux autres.

Tableau 3.2 Maison de la qualité du bioréacteur

	Spécification Technique	Spécification Technique																			
		Nombre de côtés plans transparents	Hauteur de chambre intérieure	Largeur de chambre intérieure	Profondeur de chambre intérieure	Nombre de mécanismes de blocage du mouvement de l'échantillon	Volume total de fluide dans la chambre	Volume du bioréacteur	Nombre de pièces à fabriquer	Pourcentage de pièces stérilisables (autoclave)	Débit de perfusion en milieu de culture	Temps de renouvellement de milieu de culture dans la chambre	Volume de fluides échangés entre l'intérieur et l'extérieur du bioréacteur (volume de Diamètres des bulles d'air présentes dans le bioréacteur	Rayons de courbure intérieurs	Pourcentage de pièces biocompatibles en contact avec le milieu de culture	Nombre de paliers de stimulation mécanique en compression	Surface de l'échantillon comprimée par le mécanisme de stimulation mécanique	Nombre de mécanismes de chargement statique	Nombre de mécanismes de mesure du module d'Young de l'échantillon	Pourcentage de pièces du bioréacteur à faible radio-opacité	
Attribut Client	Importance	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	=	=	↓	=	↓	↑	↑	↑	=	↑	↑	=
Voir l'échantillon	2	5	1	1	1	1	1		-3	1				5							1
Accueillir un échantillon osseux + implant de taille donnée	5	1	5	5	5		-3	-1	3								3			1	
Transport de la chambre	5	1				5		3	1				3						5		
Taille de chambre limitée à celle de l'échantillon+implant	3	-1	-1	-1	-1	1	5	5				5			-3		-3	-5		-1	
Fabricabilité de la chambre	1	-3	3	3	3	-3	-3	-5	5		-3		-3		-5	-1	-5	-3	-3	-3	1
Maintenir un échantillon osseux en vie	5						3			5	5	5	5	3	3	5	5	3			3
Limitation du risque de contamination interne	5	-3							1	5	-3	5	5	5	5	3	-3				3
Stimuler mécaniquement l'échantillon	5			1	1	3		-1	3	1							5	5	5	3	
Mesurer le module d'Young de l'échantillon	3	1	1	1	1	5		-1	3	1					-1		3	5	1	5	
Analyse avec un scanner MicroCT	3	3	1			5	3	5	1				5				-3				5
Facteur d'importance	Algébrique	11	33	35	35	72	23	27	51	60	7	65	62	65	23	39	21	52	50	29	48
	Absolu	53	39	41	41	78	59	63	63	60	43	65	68	65	57	41	97	88	56	41	48
Importance relative		0,045	0,033	0,035	0,035	0,067	0,051	0,054	0,054	0,051	0,037	0,056	0,058	0,056	0,049	0,035	0,083	0,075	0,048	0,035	0,041
Rang		13	20	16	16	3	10	7	7	9	15	5	4	5	11	16	1	2	12	16	14

Le diagramme de Pareto (Figure 3.1) permet de visualiser ces spécifications de l'importance relative la plus élevée à la plus basse. S'ajoute à ce diagramme l'importance cumulée qui correspond à la somme de l'importance relative de chaque nouvelle spécification à celle des précédentes. Cette importance cumulée est calculée de façon à ce que la somme de toutes les importances relatives soit égale à 100. Grâce à cet indicateur, il est possible de placer un seuil à 80 %. Toutes les spécifications techniques situées sous ce seuil pour l'importance cumulée sont considérées comme prioritaires et devant être absolument vérifiées. Toutefois, les spécifications techniques restantes sont toujours prises en compte dans la recherche des solutions ; elles ne seront seulement pas évaluées.

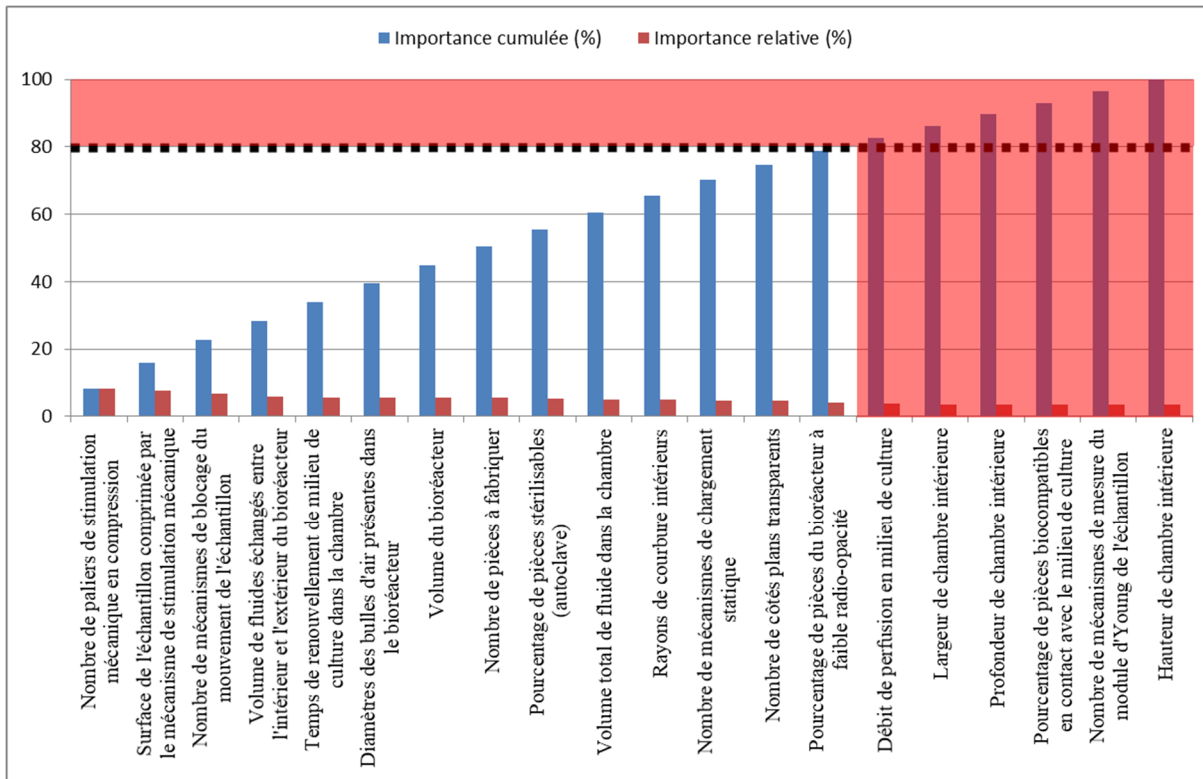


Figure 3.1 Diagramme de Pareto du bioréacteur

L'analyse du diagramme de Pareto a mis en évidence 14 spécifications techniques :

- le nombre de paliers de stimulation mécanique en compression pouvant être réalisés avec le bioréacteur sur l'échantillon. Un plus grand nombre de paliers permet d'étudier différents degrés de stimulation sur le développement de l'échantillon ;
- la surface de l'échantillon comprimée par le mécanisme de stimulation mécanique. Le but est de recouvrir 100 % de la surface afin de répartir uniformément la stimulation mécanique dans l'échantillon ;
- le nombre de mécanismes de blocage du mouvement de l'échantillon. La présence d'un tel mécanisme facilitera le transport de l'échantillon ;
- le volume de fluides échangés entre l'intérieur et l'extérieur du bioréacteur (ou volume de fuites). Un faible volume de fuites réduira les risques de contamination ;
- le temps de renouvellement du milieu de culture dans la chambre. Un renouvellement rapide assurera un apport en nutriment continu et suffisant pour la survie de l'échantillon ;

- le diamètre des bulles d'air présentes au sein du bioréacteur. Une taille réduite de bulles limitera les contaminations et assurera que l'échantillon est entièrement submergé dans le milieu de culture ;
- le volume du bioréacteur. Un bioréacteur compact aidera à son transport et à sa manipulation ;
- le nombre de pièces à fabriquer pour le bioréacteur. L'utilisation d'un grand nombre de pièces standards facilitera la fabrication ;
- le pourcentage de pièces du bioréacteur stérilisables à l'autoclave. La possibilité de stériliser à plusieurs reprises la majorité des pièces à l'autoclave limitera les risques de contamination et favorisera la survie de l'échantillon ;
- le volume total de fluide dans la chambre. Un volume réduit assurera que la perfusion permet une bonne pénétration des nutriments du milieu de culture au cœur de l'échantillon. Cette spécification technique est distincte du volume d'échantillon admis dans le bioréacteur puisque le volume total de fluide évalue la capacité du bioréacteur à limiter le volume de la chambre uniquement à celui de l'échantillon, quelle que soit sa taille ;
- les rayons de courbure intérieurs. De grands rayons de courbure limiteront l'adhésion de cellules ou de contaminants dans les coins, lieux propices de la chambre aux développements cellulaires non désirés ;
- le nombre de mécanismes de chargement statique. Il a été démontré qu'un chargement statique, c'est-à-dire durable dans le temps, pouvait influencer sur le remodelage osseux ;
- le nombre de côtés plans transparents du bioréacteur. Plusieurs côtés transparents permettront de mieux voir l'échantillon pendant la culture et notamment d'utiliser la corrélation d'images pendant la stimulation mécanique ;
- le pourcentage de pièces du bioréacteur à faible radio-opacité. Une faible atténuation des rayons X permettra d'imager les échantillons dans le bioréacteur avec une intensité de rayons X la plus faible possible.

3.1.2 Présentation et évaluation des prototypes

Trois prototypes ont été conçus sur la base du cahier des charges décrit plus haut.

Les trois prototypes sont compatibles avec la machine de test mécanique ElectroForce 3200 (TA Instruments®, É.-U.) pour réaliser la stimulation mécanique, ainsi que la mesure du module d'Young. La circulation du fluide dans le bioréacteur est accomplie, dans les trois cas, par une pompe péristaltique (Masterflex®, France) qui permet d'imposer un débit à un circuit fermé de milieu de culture (Figure 3.2). Ce circuit est constitué du bioréacteur relié par des tubes à un réservoir.

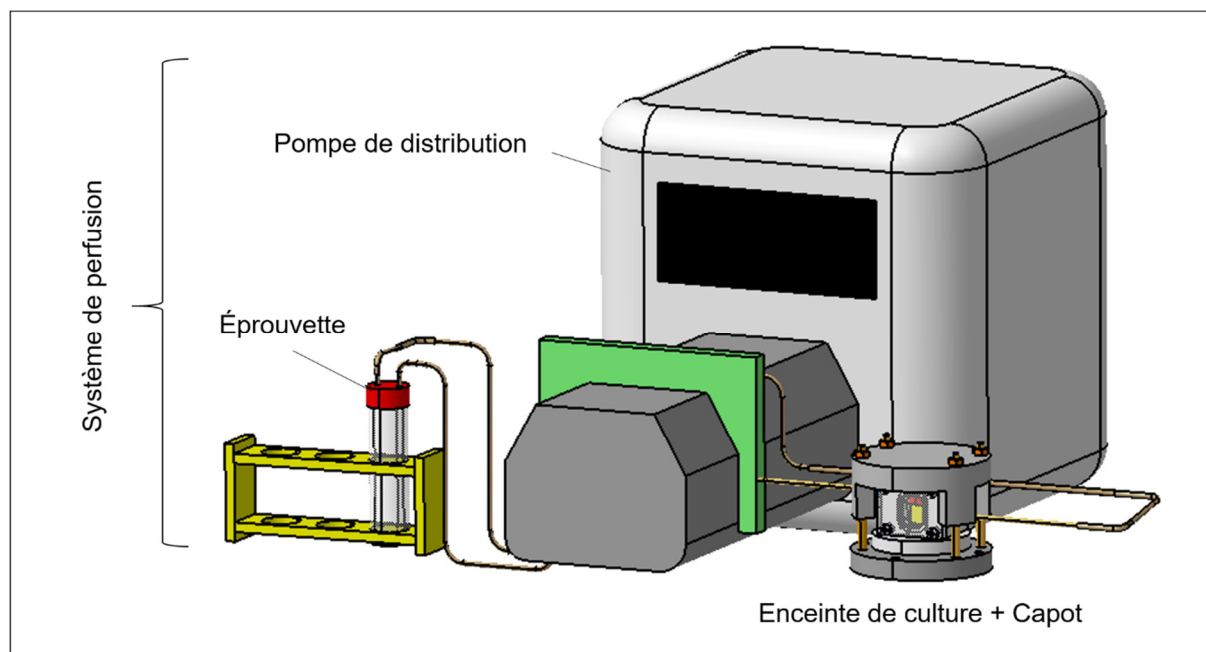


Figure 3.2 Système de perfusion du bioréacteur (Tirée de (Levasseur, 2019))

Le premier prototype (Figure 3.3) consiste en un cube de PTFE dans lequel une chambre rectangulaire a été usinée. Une entrée et une sortie de perfusion placées en vis-à-vis permettent la circulation du milieu de culture dans la chambre. La stimulation mécanique est réalisée par une tige, logée dans un bouchon qui guide sa translation et maintient l'étanchéité du bioréacteur à l'aide d'un joint torique. La tige peut être vissée à une pièce compatible avec la machine de

test mécanique. Lors de la stimulation mécanique, le bioréacteur est monté sur une plaque en PTFE pour le positionner et le stabiliser sur la machine de test. Le mouvement de la tige peut être bloqué par le serrage d'une vis placée perpendiculaire à l'axe de translation de la tige. Enfin, une vitre vient fermer le bioréacteur tout en permettant une bonne visibilité de l'échantillon. L'étanchéité de la fenêtre est assurée par un second joint maintenu dans une rainure par un serrage de la vitre avec des vis.

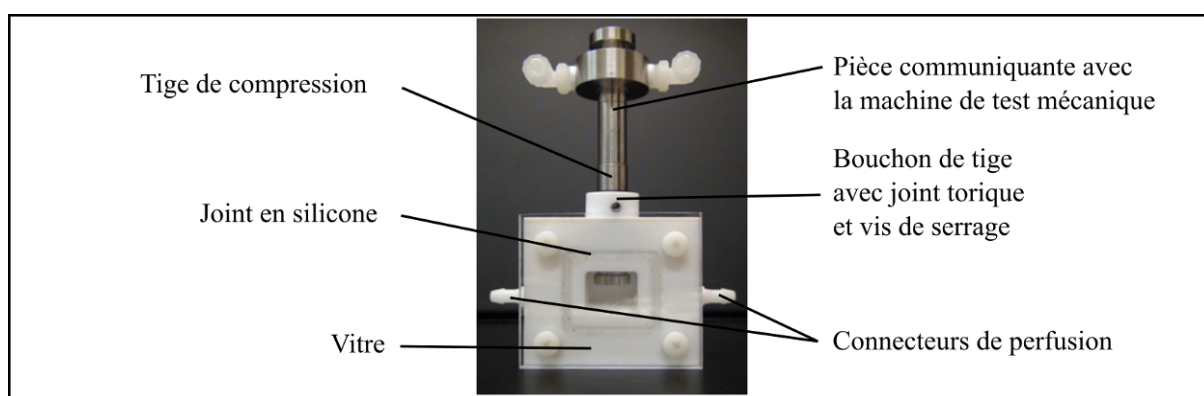


Figure 3.3 Prototype 1 du bioréacteur à perfusion

Le deuxième prototype de bioréacteur (Figure 3.4) reprend le système tige-bouchon du premier concept. Toutefois, dans ce modèle, le bouchon est maintenu en place par des vis. Le diamètre de la tige est plus petit que le passage du bouchon prévu à cet effet pour permettre une adaptation de la tige à la surface de l'échantillon. Un joint entre le bouchon et la tige assure l'étanchéité et crée un point pivot pour orienter la tige. Cette dernière est reliée à une plaque placée sur l'échantillon et qui recouvre toute sa surface pendant la stimulation. Afin de garantir l'alignement de l'axe de stimulation avec celui de la machine, une pièce à embout sphérique est montée sur la machine de test. Le contact ponctuel avec la tige de compression permet de transmettre les efforts de compression directement à l'échantillon. Tout comme dans le concept précédent, le mouvement de la tige peut être bloqué par une vis orientée perpendiculairement à son axe. Le positionnement et le maintien du bioréacteur dans la machine de test mécanique se font par l'intermédiaire d'une plaque en acier inoxydable. La visibilité de l'échantillon est garantie par une vitre fixée par des vis. Un joint assure l'étanchéité à cet endroit. L'entrée de perfusion est située au bas de l'échantillon tandis que la sortie est placée tout en haut de la

chambre, permettant de remplir la chambre complètement et faire circuler le fluide dans tout le volume disponible. Enfin, deux tiroirs dans le corps du bioréacteur sont créés afin d'accueillir des calibres osseux, utilisés dans le traitement des images μ CT pour déterminer la densité minérale de l'échantillon à partir du niveau de gris des pixels.

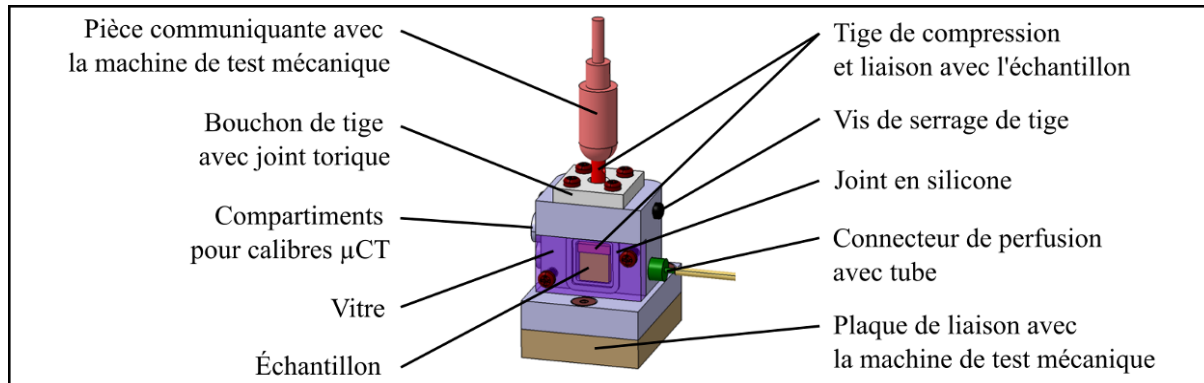


Figure 3.4 Prototype 2 du bioréacteur à perfusion

Le troisième prototype proposé consiste en une chambre en polycarbonate, un matériau biocompatible et transparent, au module d'élasticité plus élevé que le PTFE (Figure 3.5-A). Une vitre avec joint permet de voir l'échantillon tout en conservant l'étanchéité du bioréacteur. Le bioréacteur est placé sur la machine de test mécanique par l'intermédiaire d'une plaque de liaison en acier inoxydable. Une tige de compression effectue la stimulation de l'échantillon. Un joint circulaire (O-ring), dont le positionnement est réalisé par une rainure dans le corps du bioréacteur, assure l'étanchéité de la liaison mécanique tout en autorisant à la tige une inclinaison suffisante pour que toute la surface de l'échantillon soit stimulée. Le bioréacteur est muni d'un capot en acier inoxydable qui conserve une surface horizontale avec la machine de test mécanique, une bille reliant la tige (inclinaison par l'échantillon) au capot pour transmettre les efforts. Deux tiges connectent le capot à la plaque de liaison afin de guider le capot pendant la stimulation. Des écrous, vissés sur ces tiges, permettent d'appliquer un chargement statique sur le capot. Par ce système, l'échantillon osseux est maintenu en place pendant le transport. Pour la circulation du fluide, l'entrée et la sortie de perfusion sont mises en opposition dans la chambre, avec l'entrée au bas de la chambre et la sortie en haut de chambre pour un remplissage complet. Enfin, ce bioréacteur existe dans une deuxième configuration, sans pièce métallique,

compatible avec l'analyse μ CT (Figure 3.5-B). La tige, la bille et le capot sont remplacés par le capot μ CT, une pièce unique en polycarbonate maintenue au corps de chambre par une vis. Ce capot contient une chambre pour accueillir les calibres μ CT permettant d'évaluer la densité osseuse ; elle est refermée par un bouchon. La plaque de liaison en acier est, elle, remplacée par un anneau en polycarbonate. Le capot μ CT et l'anneau sont du même diamètre que le lit de l'appareil d'acquisition μ CT (Skyscan 1176, Skyscan®, N.V., Belgique) du CHU Sainte-Justine prévu d'être utilisé pendant les cultures.

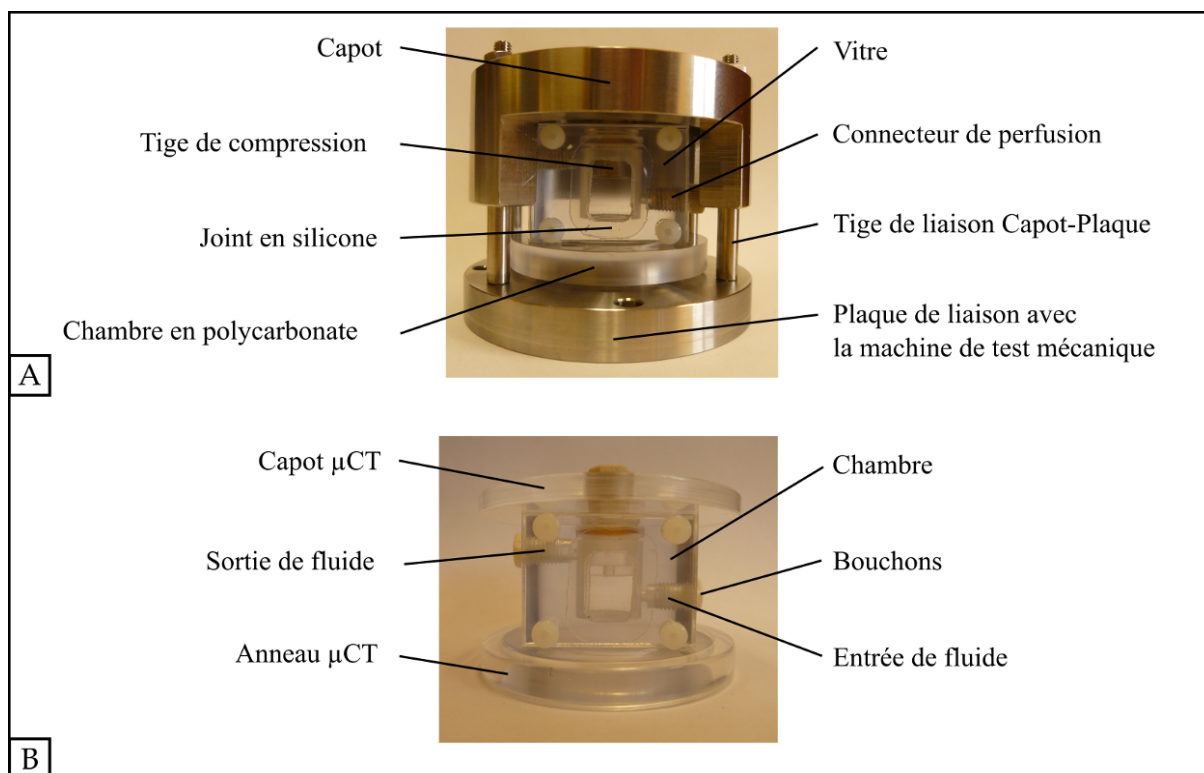


Figure 3.5 Prototype 3 du bioréacteur à perfusion
A. Configuration culture, B. Configuration μ CT

Afin de retenir le meilleur concept, chacune des spécifications techniques a été évaluée pour les trois prototypes. Cette évaluation est réalisée comparativement au bioréacteur ZetOs en s'appuyant sur la littérature (Endres et al., 2009; Jones, Broeckmann, Pohl, & Smith, 2003; Vivanco et al., 2013).

3.1.2.1 Nombre de paliers de stimulation mécanique en compression

L'utilisation de la machine de test mécanique ElectroForce 3200, une machine conventionnelle, permet de réaliser précisément des compressions jusqu'à 20 μm d'amplitude (Figure 3.6). Cela garantit donc que, pour un échantillon de 10 mm de hauteur, une compression de 2000 microdéformations (20 μm) ou plus est faisable. Toutefois, la distinction des différents paliers de stimulation mécanique (2000, 3000 voire 4000 microdéformations) est dépendante du bioréacteur.

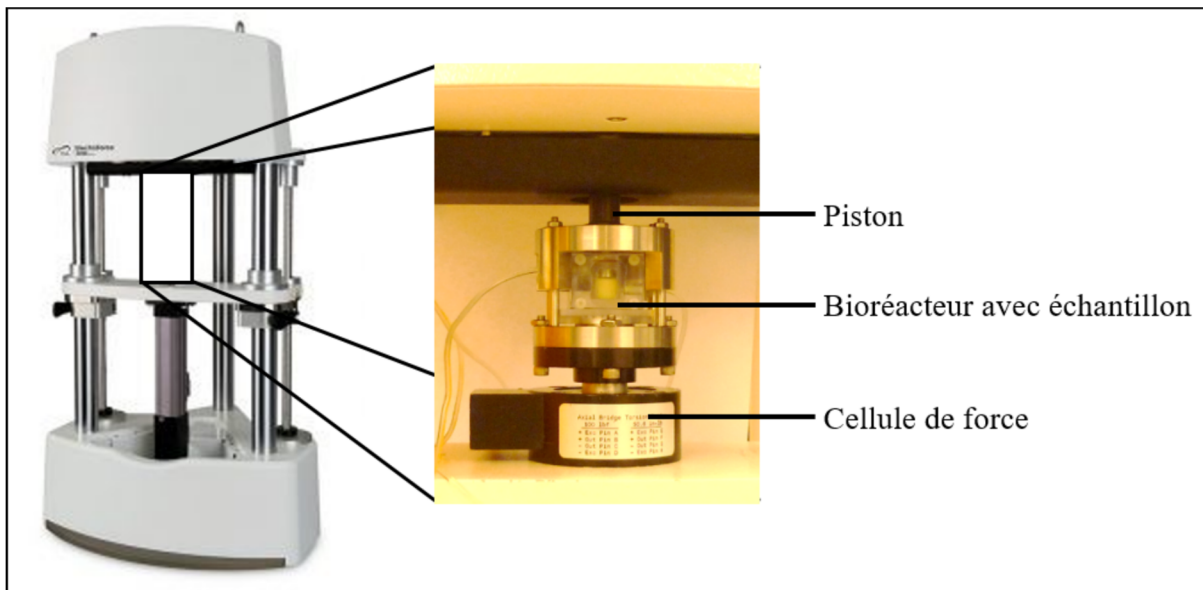


Figure 3.6 Prototype 3 dans la machine de test mécanique

Le prototype 1 et le prototype 3 (Figure 3.6) ont été testés sur la machine de test mécanique afin de déterminer comment se comportait le bioréacteur pendant la stimulation mécanique. Pour cela, plusieurs échantillons de Sawbones (Sawbones®, É.-U.), de taille comparable aux échantillons osseux prévus d'être utilisés pendant les cultures, ont été comprimés à 3000 microdéformations (environ 30 μm d'amplitude pour un échantillon de 10 mm de hauteur). La face visible des échantillons était mouchetée de peinture noire pour pouvoir suivre leur déformation par corrélation d'images (Aramis, Gom®, Allemagne). Ce test a permis de montrer que, dans le premier concept, le bioréacteur et sa plaque de fixation à la machine de

test, tous deux en PTFE, emmagasinait une partie des déformations. Cela a notamment pour conséquence de ne pas pouvoir discerner les différents paliers de compression mécanique effectivement appliqués à l'échantillon. Le second prototype, bien que non testé, est prévu d'être aussi en PTFE, ce qui engendrerait le même problème. A contrario, le troisième prototype, constitué de pièces en polycarbonate, un matériau plus rigide que le PTFE (et l'os), et en acier inoxydable, transmet beaucoup mieux les déformations souhaitées à l'échantillon.

Dans le cas du bioréacteur ZetOs, la stimulation mécanique est réalisée par un système associé au bioréacteur (Jones et al., 2003) suffisamment précis pour distinguer des amplitudes différentes de 500 microdéformations, avec une amplitude minimale de 1000 microdéformations (Endres et al., 2009). L'échantillon étant placé entre deux plaques métalliques pour la stimulation mécanique, les déformations sont entièrement transmises à l'échantillon.

3.1.2.2 Surface de l'échantillon comprimée

Pour les trois prototypes, la tige de compression a un diamètre un peu plus grand (12,7 mm) que l'échantillon prévu d'être comprimé (11 mm). Toutefois, les deuxième et troisième prototypes présentent l'avantage d'avoir une inclinaison de tige adaptable. En effet, la tige de compression peut pivoter grâce à son joint qui joue le rôle de rotule. Ce système assure qu'en cas de défaut de parallélisme dans les coupes de l'échantillon, toute sa surface est quand même en contact avec la tige de compression.

Le système ZetOs impose une inclinaison de tige fixe ce qui ne lui permet pas de s'adapter à son échantillon. La tige est toutefois d'un diamètre égal, voire supérieur à son échantillon.

3.1.2.3 Mécanisme de blocage du mouvement de l'échantillon

Pour les deux premiers prototypes, la tige peut être bloquée dans son mouvement par une vis qui vient pousser sur la tige perpendiculairement à son axe de translation. Au sein du troisième prototype, la solution proposée est plus efficace : le capot placé sur la tige (et faisant

l'intermédiaire avec la machine de test mécanique lors de la stimulation mécanique) est maintenu en position par les écrous vissés sur les tiges de liaison. Ce système permet de s'assurer qu'une force est constamment appliquée sur l'échantillon, empêchant ainsi son mouvement. Dans le cas de la configuration μ CT du prototype 3, le capot μ CT appuie sur l'échantillon par une vis vissée dans le haut de la chambre.

Dans le cas du système ZetOs, l'échantillon est limité dans ses déplacements par un volume très restreint de chambre. Toutefois, aucune solution n'est proposée pour éviter qu'il tourne sur lui-même.

3.1.2.4 Volume de fluides échangés entre l'intérieur et l'extérieur du bioréacteur

Aucune information n'étant disponible à ce sujet sur le bioréacteur ZetOs, il est considéré que le système proposé ne présente pas de fuites. Des tests préliminaires de remplissage sur les premier et troisième prototypes, combinés à des tests stimulations mécaniques, ont pu mettre en évidence des risques de fuite pendant la culture.

Les deux prototypes ont tous deux montré des soucis de fuite aux entrées et sorties de perfusion, ces fuites étant moins importantes dans le cas du prototype 3. Ces fuites sont causées dans le prototype 1 par le choix de l'embouchure de perfusion qui est non adaptée. Dans le prototype 3, les embouchures de perfusion sont agrémentées d'un joint en silicone. Lors de l'installation des embouchures, ce joint est comprimé contre la surface de la chambre, limitant considérablement le risque de fuites.

L'utilisation du prototype 1 sur la machine de test mécanique après son remplissage a montré des fuites importantes pendant la stimulation de l'échantillon. En effet, lors de la stimulation, le bouchon de la tige de compression se délogeait, permettant le passage du fluide. Ce problème n'est pas présent dans le second prototype, le bouchon étant vissé à la chambre. Toutefois, l'absence de joint entre le bouchon et la chambre dans les deux premiers prototypes crée une infiltration de fluide, qui peut être source de contamination et de prolifération de contaminants.

Dans le cas du prototype 3, un joint vient directement relier la tige à la chambre, empêchant toute circulation du fluide vers l'extérieur.

Dans les trois prototypes, le joint de la vitre prévient efficacement l'apparition de fuites à cet endroit.

3.1.2.5 Diamètre des bulles d'air dans le bioréacteur

Lors du remplissage de la chambre, le prototype 1 a montré qu'il n'était pas possible de le remplir entièrement. En effet, l'entrée et la sortie de perfusion étant situées à même hauteur en milieu de chambre, le fluide ne peut pas aller au-dessus. Ce problème n'existe pas dans les autres concepts, la sortie de perfusion étant placée tout en haut de la chambre. Toutefois, la présence de la vitre vient créer un espace pour lequel l'évacuation de l'air est plus complexe pendant le remplissage. Cette complication est corrigée par l'inclinaison de la chambre pendant le remplissage pour éliminer ces bulles d'air. Par cette méthode, seules de rares petites bulles (<1 mm de diamètre) restent au sein du bioréacteur.

Dans le cas du bioréacteur ZetOs, les deux embouchures de perfusion sont placées en haut de la chambre, ce qui assure un remplissage complet du volume. Une méthode similaire à celle proposée précédemment pour remplir la chambre permet aussi d'évacuer les potentielles bulles résiduelles du bioréacteur.

3.1.2.6 Temps de renouvellement du milieu de culture

Pour un même débit de perfusion (7 mL/h), il est attendu que le bioréacteur ZetOs voit son milieu de culture renouvelé rapidement, son volume de chambre étant plus faible que celui des concepts proposés. Étant donné que le prototype 1 ne peut pas être rempli entièrement, ce point ne peut pas être évalué pour ce concept. Le prototype 2 étant très proche de celui du prototype 3 pour ce qui est de l'agencement et du volume de la chambre intérieure, les résultats du prototype 3 peuvent lui être attribués.

La mesure du temps de renouvellement du milieu de culture pour le prototype 3 a été réalisée en utilisant deux eaux colorées (Anisi et al., 2014; Y.-B. Gao, Liang, Luo, & Yan, 2015). Une fois la chambre remplie d'une première eau, le liquide a été remplacé par l'autre teinte et le temps nécessaire pour que l'eau dans le bioréacteur change de couleur a été évalué. Ce test a permis de mettre en évidence qu'il fallait environ 45 minutes pour que tout le liquide dans le bioréacteur soit remplacé entièrement par du nouveau liquide. Cela indique donc qu'en une journée, le liquide dans la chambre est renouvelé complètement au moins 24 fois, ce qui suggère un renouvellement satisfaisant (la cible étant de 1 h par cycle).

3.1.2.7 Volume du bioréacteur

Étant donné que le bioréacteur conçu dans cette thèse est censé accueillir un échantillon plus gros (10 mm de hauteur minimum, sans compter l'ajout d'un implant) que celui du bioréacteur ZetOs (5 mm de hauteur disponible), le volume de chacun des concepts présentés est plus important que celui du bioréacteur de la littérature. Entre les trois concepts proposés, le prototype 1 est le plus volumineux, avec une largeur et une hauteur les plus grandes. Le prototype 2 est le second plus volumineux en raison de sa hauteur. Enfin vient le troisième prototype, qui possède le plus petit volume parmi les trois concepts.

3.1.2.8 Nombre de pièces à fabriquer

Le bioréacteur ZetOs possède trois pièces à fabriquer : la tige de compression, la chambre et le support de l'échantillon. Dans le cas du prototype 1, il est nécessaire d'en fabriquer six : la chambre, la vitre, son joint, la tige de compression, son bouchon et la plaque de fixation du bioréacteur à la machine de test, bien que cette pièce ne soit nécessaire qu'en un seul exemplaire, quel que soit le nombre de bioréacteurs. Dans le second bioréacteur, le nombre de pièces est encore plus grand (neuf pièces) puisque s'ajoutent les deux tiroirs pour calibres μ CT et la plaque reliant la tige et l'échantillon. Enfin, le troisième concept propose la fabrication de la chambre, les deux capots (configuration culture et configuration μ CT), deux tiges de liaison, la plaque de liaison avec la machine de test mécanique, l'anneau μ CT, la tige de compression, la vitre et son joint, soit dix pièces. Toutefois, les pièces proposées sont plus simples que dans

le second concept, notamment en ce qui concerne la chambre. De plus, parmi les 10 pièces du prototype 3, deux concernent uniquement la configuration μ CT du bioréacteur.

3.1.2.9 Pourcentage de pièces stérilisables à l'autoclave

Dans les trois concepts proposés, tous les matériaux (le PTFE et le polycarbonate de la chambre, le plexiglas des vitres) ont tous été choisis pour être compatibles avec un cycle d'autoclave, dont la température de stérilisation atteint 110 °C. Il a cependant été noté que le plexiglas des vitres ne réagissait pas correctement pendant ces cycles de stérilisation, des tâches apparaissant en surface des vitres. Le matériau a donc été remplacé par du polycarbonate, matériau transparent et plus résistant à la température.

Parallèlement, chacun des concepts présente des pièces standardisées qui sont toutes compatibles avec une stérilisation à l'autoclave. Les tubes de perfusion ne peuvent toutefois être stérilisés plus d'une fois, au risque de trop les endommager. Ils sont par conséquent considérés comme des consommables.

Dans le cas du système ZetOs, aucune information n'est donnée sur le remplacement de pièces au fil des cultures. Il est donc émis comme hypothèse que toutes ses pièces peuvent être stérilisées à plusieurs reprises, vraisemblablement à l'autoclave.

3.1.2.10 Volume total de fluide dans la chambre

Étant donné la différence de taille entre les échantillons du bioréacteur ZetOs et celui des concepts proposés, le bioréacteur ZetOs présente le plus petit volume disponible pour le milieu de culture. Entre les trois concepts, les prototypes 2 et 3 ont un volume comparable à celui de l'échantillon bien que la hauteur disponible soit plus importante que celle de l'échantillon, afin de permettre l'accueil d'un implant. Toutefois, dans le prototype 3, ce volume est occupé par la tige de compression. Dans le prototype 2, la tige a un plus petit diamètre, la liaison à l'échantillon étant faite par une plaque de faible épaisseur. Ainsi, le prototype 3 présente le

plus petit volume de fluide disponible entre les trois concepts. Le prototype 1 a une chambre intérieure très large par rapport à l'échantillon, laissant place à plus de milieu de culture.

3.1.2.11 Rayons de courbure intérieurs

Pour les trois concepts proposés, les rayons de courbure intérieurs sont compris entre 0,2 et 0,4 mm, pour un seuil minimal à 0,2 mm (Tableau 3.1). Il est supposé qu'il en est de même pour le bioréacteur ZetOs.

3.1.2.12 Nombre de mécanismes de chargement statique

Dans les deux premiers prototypes, le mouvement de l'échantillon est limité par une vis placée perpendiculairement à l'axe de la tige et qui vient maintenir sa position. Toutefois, ce mécanisme ne permet pas de réaliser un chargement statique précis sur l'échantillon. En effet, seule la friction de la vis sur la tige restreint son mouvement ce qui réduit la force qui peut être appliquée sur l'échantillon. Dans le cas du prototype 3, le serrage d'écrous sur le capot de la chambre produit directement un chargement statique sur l'échantillon. Ce chargement peut être préalablement réalisé par la machine de test mécanique puisque les écrous sont accessibles lors de la stimulation mécanique. Ainsi leur serrage permet de maintenir la position du capot correspondant à la force désirée.

Le bioréacteur ZetOs ne comporte pas de mécanisme pour appliquer un chargement statique sur l'échantillon. Toutefois, il est possible de placer des poids sur la tige de compression si un chargement statique est souhaité.

3.1.2.13 Nombre de côtés plans transparents

Chacun des concepts proposés possède une fenêtre plane permettant une visibilité parfaite d'un côté de l'échantillon. Ce concept n'existe pas dans le système ZetOs. Bien que le matériau constituant la chambre de ZetOs soit transparent, ce matériau garde une certaine opacité et sa forme cylindrique vient gêner la visibilité de l'échantillon. En plus de la fenêtre, la chambre

du prototype 3 est faite de polycarbonate ce qui permet de voir le reste de l'échantillon de la même façon que pour le bioréacteur ZetOs. Les deux autres concepts sont en PTFE, un matériau totalement opaque.

3.1.2.14 Radio-opacité des pièces

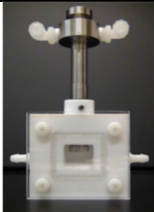
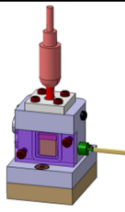
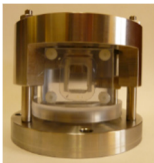
Le bioréacteur ZetOs, bien que proclamé compatible avec le μ CT, a son échantillon placé entre deux pièces métalliques. Même si le matériau constituant la chambre et entourant l'échantillon est peu radio-opaque, les pièces métalliques au-dessus et en dessous de l'échantillon vont créer des artefacts dans les images, ce qui va masquer en partie l'architecture osseuse. Dans le cas des deux premiers prototypes, la chambre est en PTFE, un matériau qui laisse bien pénétrer les rayons X. Toutefois, la tige de compression sur l'échantillon est en métal ce qui est source d'artefacts dans les images. Enfin, le prototype 3, dans sa configuration culture, est incompatible avec le μ CT, ses pièces extérieures encerclant la chambre étant toutes en acier inoxydable. Ce problème est résolu avec sa configuration μ CT qui change toutes les pièces métalliques par une pièce en polycarbonate. La tige de compression, directement en contact avec l'échantillon, est notamment remplacée par le capot μ CT. Bien que cet ajustement de configuration pendant la culture soit un risque de contamination, cette manipulation, exercée en milieu stérile (hotte biologique), permet d'obtenir un milieu parfaitement compatible pour imager l'échantillon au μ CT sans affecter sa survie.

3.1.3 Matrice de décision et sélection du concept

À la suite de l'évaluation des concepts et du système ZetOs au travers des différentes spécificités techniques, il est possible d'attribuer une note à chacun de ces concepts relativement au bioréacteur ZetOs. Pour chaque spécificité technique, une cote entre 0 et 2 est accordée au concept selon si la solution proposée est bien meilleure (+2), meilleure (+1), équivalente (0), moins bonne (-1) ou bien moins bonne (-2) que celle du bioréacteur ZetOs. L'ensemble de ces cotes sont rassemblées au sein de la matrice de décision et la note finale de chaque concept est calculée (Tableau 3.3). Cette note consiste en la somme de chacune des

cotes pondérées par le facteur d'importance absolu F-Abs associé à la spécificité technique. Pour rappel, ce facteur a été déterminé dans la maison de qualité (Tableau 3.2).

Tableau 3.3 Matrice de décision

Spécification technique	F-Abs			
Nombre de paliers de stimulation mécanique en compression	97	-2	-2	-1
Surface de l'échantillon comprimée	88	0	1	1
Nombre de mécanismes de blocage du mouvement de l'échantillon	76	1	1	2
Volume de fluides échangés entre l'intérieur et l'extérieur du bioréacteur	68	-2	-1	0
Temps de renouvellement complet du milieu de culture dans la chambre	65	-2	0	0
Diamètre des bulles d'air	65	-2	0	0
Volume du bioréacteur	63	-2	-1	0
Nombre de pièces à fabriquer	63	-1	-2	-2
Pourcentage de pièces stérilisables à l'autoclave	60	0	0	0
Volume total de fluide dans la chambre	59	-2	-1	0
Rayons de courbure intérieurs	57	0	0	0
Mécanismes de chargement statique	56	1	1	2
Nombre de côtés plans transparents	53	1	1	2
Pourcentage de pièces du bioréacteur à faible radio-opacité	48	0	0	2
Note		-712	-237	331

Six bioréacteurs correspondant au concept sélectionné ont été fabriqués et quatre cultures osseuses ont été réalisées. Les deux premières cultures, contenant respectivement un et six échantillons, avaient pour objectif de valider les protocoles de manipulation des échantillons

et des bioréacteurs : préparation des échantillons, mise en bioréacteur, analyse μ CT, stimulation mécanique des échantillons. Dans les deux cas, une contamination fongique a été détectée, associée à un réservoir de milieu de culture non adéquat. Les premiers essais utilisaient un tube à essai en guise de réservoir. L'étanchéité du tube n'étant pas garantie, la libre circulation de l'air a permis la contamination fongique. Pour répondre à ce problème, le réservoir de milieu de culture a été remplacé par une bouteille en Pyrex de 25 mL munie d'un bouchon communicant conçu pour la mise sous vide (VapLock, Cole Parmer, É.-U.) (Figure 3.7). Sur les trois ports du bouchon, deux étaient destinés à l'entrée et sortie de fluide de perfusion. Le troisième port était pourvu d'un filtre 0.2 μ m (Filtropur S 0.2, Sarstedt, É.-U.), permettant le renouvellement de l'air tout en bloquant la circulation de contaminants. Grâce à ce renouvellement au sein du réservoir, il est possible de réalimenter le milieu de culture en oxygène, grâce notamment au goutte-à-goutte du milieu de culture à la sortie de perfusion (Figure 3.7). À chaque changement de milieu de culture, étape utilisée pour renouveler le milieu usagé par du nouveau milieu de culture, un deuxième réservoir est stérilisé (autoclave), rempli de milieu de culture et vient remplacer le premier réservoir.

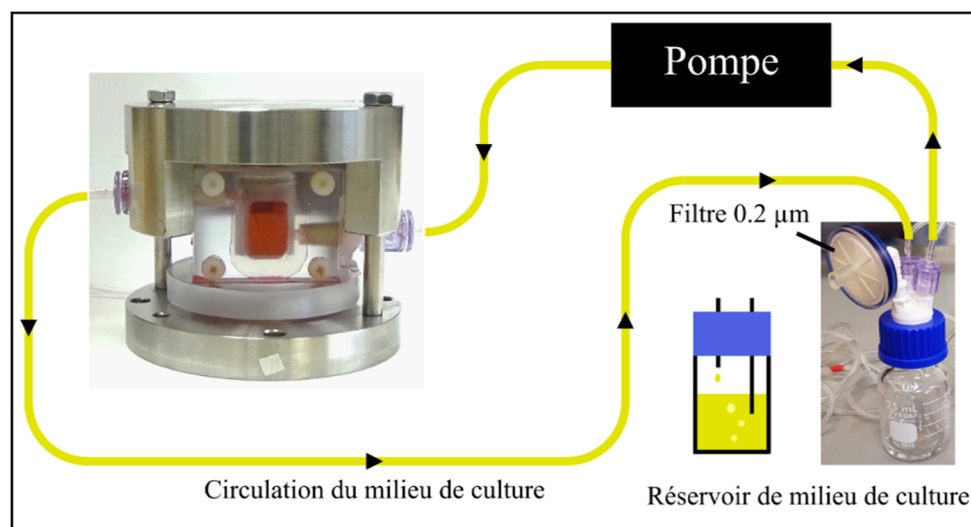


Figure 3.7 Amélioration du réservoir de milieu de culture

La troisième culture réalisée dans ce projet de thèse s'est intéressée au remodelage osseux sur les premières semaines de culture (Figure 3.8). Six échantillons ont été maintenus en vie sur

une période de 14 jours avec une sollicitation mécanique quotidienne de 4000 microdéformation en compression sur 300 cycles (sollicitation sinusoïdale, fréquence 1 Hz) (Endres et al., 2009) avec une précharge de 25 N. La précharge est utilisée afin d'assurer un contact entre toutes les pièces du bioréacteur. Cette stimulation mécanique a été appliquée sur la moitié des échantillons, l'autre moitié constituant le groupe contrôle. Une acquisition μ CT a été effectuée en début et en fin de culture (taille de pixel 9 μ m, filtre aluminium de 1 mm, 65 kV, 385 μ A, pas de rotation 0.25°, temps d'exposition 1460 ms). L'analyse de cette culture, détaillée dans la thèse d'Annie LEVASSEUR (Levasseur, 2019), a mis en évidence la capacité du bioréacteur à induire du remodelage osseux. En effet, les échantillons contrôle, n'ayant pas subi de stimulation mécanique, ont montré de la résorption osseuse après traitement des images μ CT. La stimulation mécanique a permis de prévenir cette résorption osseuse, les échantillons stimulés ayant conservé une architecture osseuse comparable au début de la culture après 14 jours de culture. Cette étude valide ainsi la capacité du bioréacteur à réaliser des études plus avancées sur le comportement du tissu osseux en fonction de son environnement.

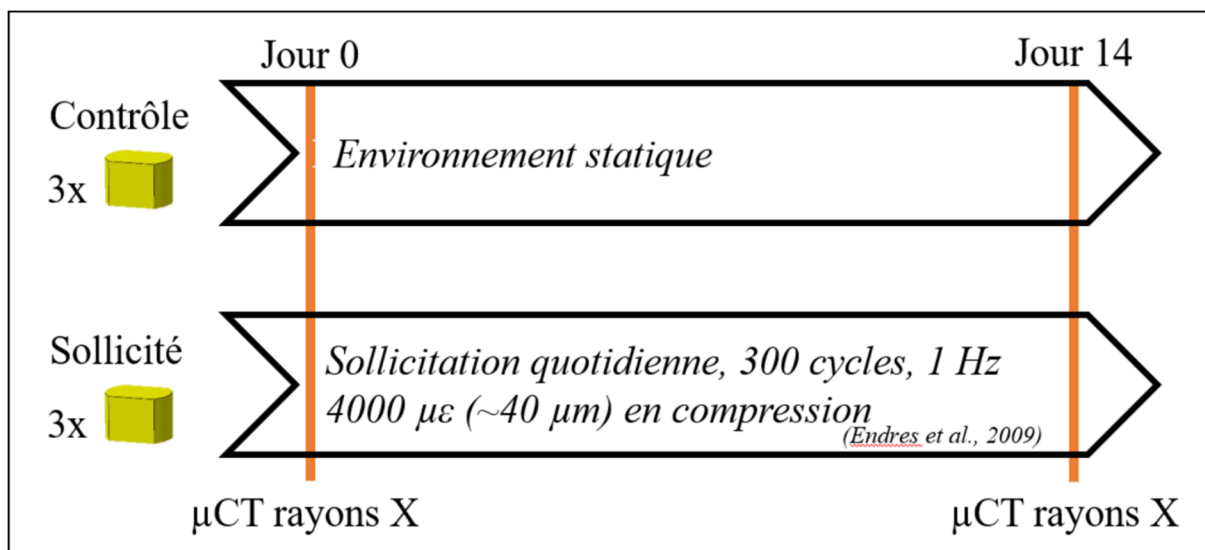


Figure 3.8 Protocole de la troisième culture – Remodelage osseux sur 14 jours

3.2 Mise en place d'une culture *ex vivo* – Matériel et Méthodes

Le bioréacteur à perfusion étant capable de garder en vie des échantillons sur une période de 14 jours et d'initier du remodelage osseux, une nouvelle culture a été réalisée afin de répondre aux questions suivantes. Quel est le comportement des échantillons sur une culture à plus long terme ? Est-il possible d'initier de l'ostéointégration au sein des bioréacteurs ? Pour répondre à ces questions, le protocole réalisé à la culture précédente a été réutilisé et amélioré (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ce nouveau protocole est détaillé ci-après.

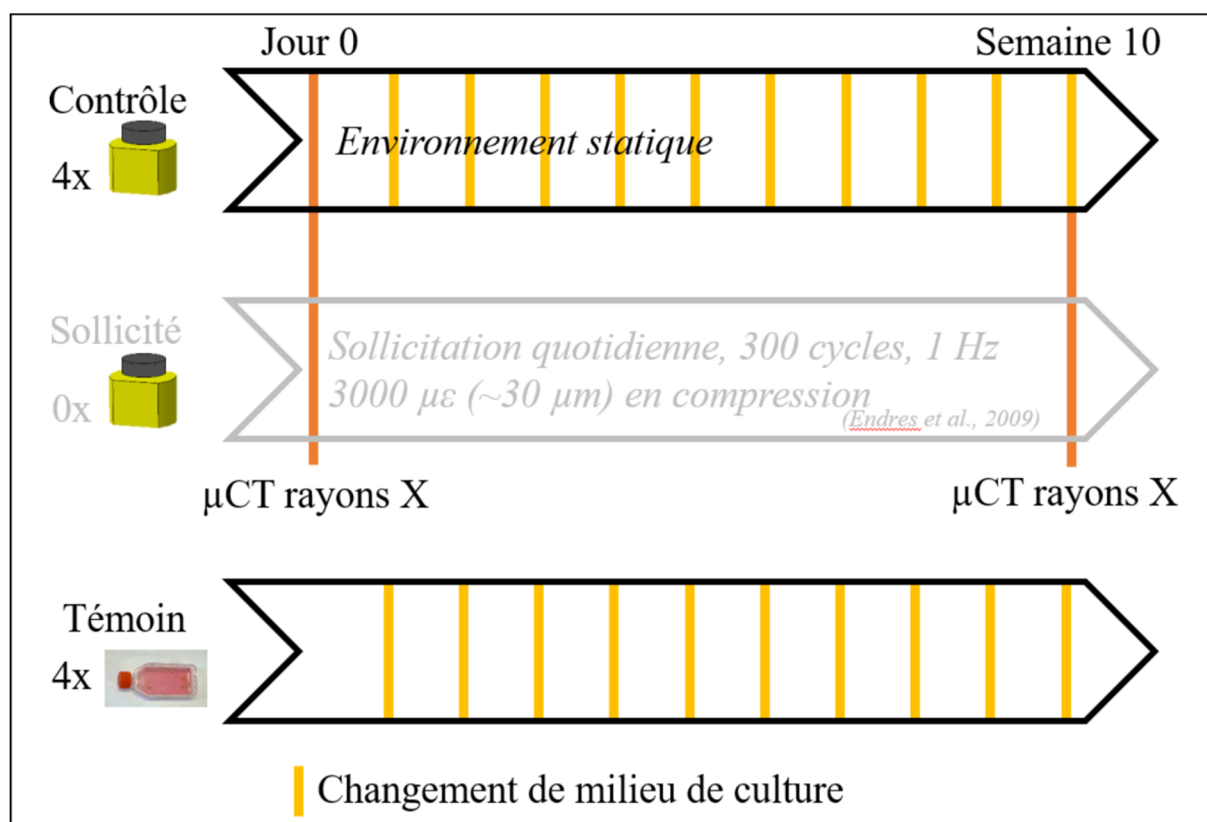


Figure 3.9 Protocole de la quatrième culture – Ostéointégration sur 10 semaines

3.2.1 Animal et préparation des échantillons

Une vache âgée de 4 ans a été sacrifiée en raison d'une pathologie médicale sans impact sur l'étude (vache à terre). Les deux iliums ont été extraits et immergés directement dans un bain de PBS + antibiotiques pour le transport. Le sacrifice et les opérations chirurgicales ont été

menés par Marco BOSA et Sylvain NICHOLS, à l'École Vétérinaire de Sainte-Hyacinthe. Les spécimens osseux ont ensuite été transférés à l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal par Annie LEVASSEUR.

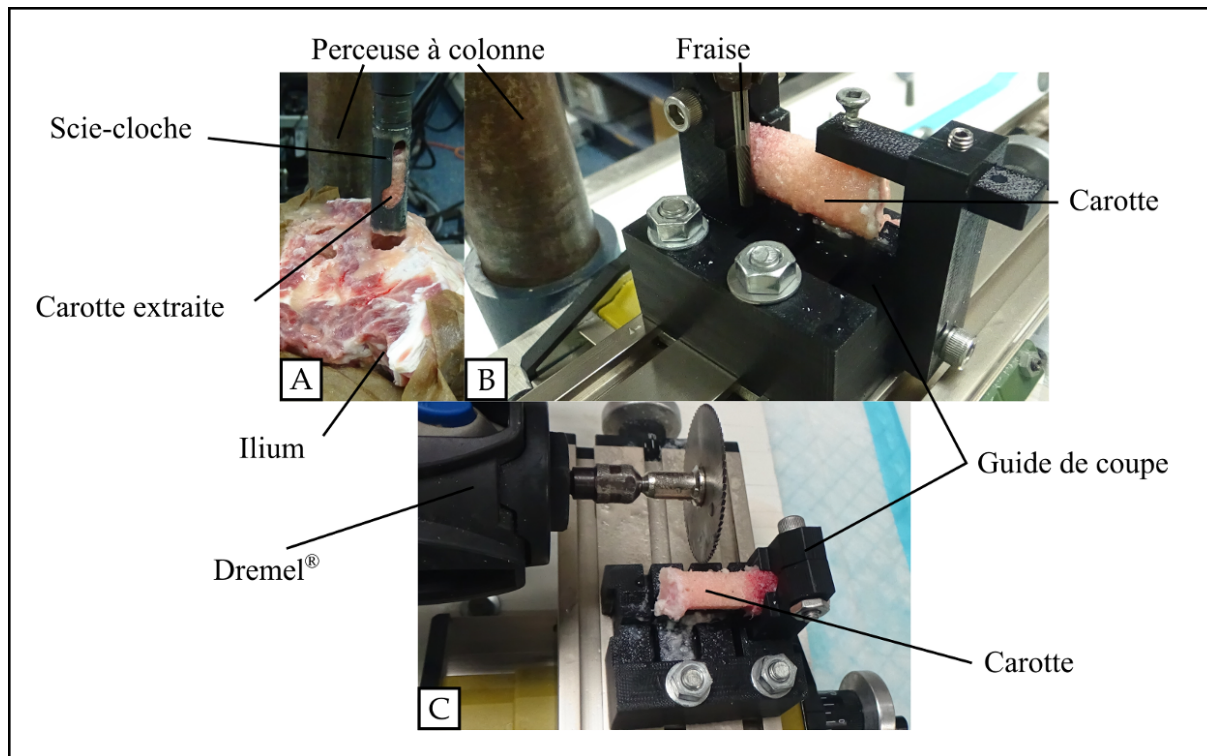


Figure 3.10 Préparation des échantillons pour la culture *ex vivo*.
 A. Extraction de la carotte. B. Fraisage des faces parallèles sur le guide de coupe.
 C. Coupe des échantillons

Des carottes ont été prélevées avec une perceuse à colonne et une scie-cloche d'un diamètre de 11 mm, sous constante irrigation au PBS stérile à 4 °C (David et al., 2008; Vivanco et al., 2013) (Figure 3.10-A). Les carottes ont ensuite été placées dans un guide de coupe sur mesure (Figure 3.10-B&C). Ce montage permet le fraisage de deux faces parallèles espacées d'au plus 10 mm (Figure 3.10-B) et la découpe des échantillons en cylindres tronqués d'une hauteur d'environ 10 mm, avec une scie Dremel® (Figure 3.10-C). Le fraisage et la coupe ont aussi été menés sous constante irrigation au PBS stérile à 4 °C (David et al., 2008; Vivanco et al., 2013). Six échantillons ont été préparés ainsi que 4 lames cylindriques de 3 mm d'épaisseur environ.

Après la coupe, les échantillons ont été nettoyés individuellement avec trois bains successifs de PBS + 5 % d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine) et 1 % d'amphotéricine B, dans lesquels l'échantillon a été agité pour éliminer tous les débris et contaminants. Puis un quatrième bain d'une heure a été effectué pour permettre aux antibiotiques et antifongiques d'agir sur les spécimens. (David et al., 2008; Vivanco et al., 2013) Après lavage, les 4 échantillons ont été placés individuellement dans une chambre de culture, en configuration μ CT, remplie de milieu de culture (Figure 3.12-A). Un implant en alliage de titane (Ti-6Al-4V), pastille de 5 mm de diamètre, 3 mm de hauteur et de rugosité surfacique de $R_a = 3,46 \mu\text{m} \pm 0,25 \mu\text{m}$, a été placé sur l'échantillon et maintenu par la tige du capot μ CT (Figure 3.11). La rugosité des implants a été obtenue, après polissage poli-miroir, par sablage avec de la poudre d'oxyde d'aluminium (grains de $250 \mu\text{m}$ – Cobra, Renfert, Hilzingen, Allemagne) pendant 30 secondes à 6 bars sur l'outil Basic Quattro (Renfert, Hilzingen, Allemagne) (implants produits par Manon FRAULOB, Laboratoire MSME). Le milieu de culture était composé de BGJb avec 10 % de sérum fœtal bovin ou FBS (pour *fetal bovine serum*), 10 % d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine) et 0,1 % d'amphotéricine B (Endres et al., 2009; Vivanco et al., 2013). Les chambres étaient reliées à leur réservoir respectif rempli de 15 mL de milieu de culture (Figure 3.12-D). Une pompe de distribution péristaltique permettait la circulation du milieu dans les chambres à une vitesse de 7 mL/h. Les lames d'os ont, elles, été placées individuellement, après morcellement en bouts d'os de quelques millimètres d'épaisseur, dans des flacons de culture cellulaire remplis de 5 mL de milieu de culture (Figure 3.12-E). Ce milieu était semblable à celui des chambres, mais avec 20 % de FBS (au lieu de 10 %). Tout le matériel a préalablement été passé à l'autoclave ou était déjà stérile et destiné à un usage unique. Toutes les étapes ont été menées sous hotte pour préserver la stérilité des échantillons. Les chambres et flacons ont ensuite été entreposés dans un incubateur à 37 °C, 5 % de CO₂.

La préparation des échantillons et la mise en culture ont été réalisées conjointement avec Annie LEVASSEUR.

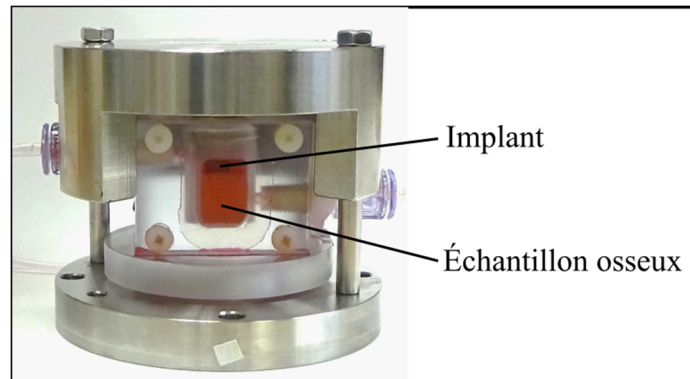


Figure 3.11 Échantillon osseux avec implant mis en culture dans un bioréacteur à perfusion

3.2.2 Stimulation mécanique

Les six échantillons étaient répartis en deux groupes : un groupe contrôle et un groupe stimulé mécaniquement, de trois échantillons chacun. Cinq jours par semaine, les échantillons du second groupe étaient stimulés mécaniquement grâce à la machine de test mécanique ElectroForce 3200 (TA Instruments®, É.-U.). Cette stimulation correspondait à un mouvement sinusoïdal en compression, d'une amplitude de 3000 microdéformations (environ 30 μm), d'une fréquence de 1 Hz et d'une durée de 300 cycles (Endres et al., 2009), avec une précharge de 25 N.

3.2.3 Changement de milieu de culture et analyse cellulaire

Le milieu de culture des chambres et des flacons était changé une fois par semaine. Le milieu usagé a été centrifugé pour dissocier tous les corps en suspension (dont les cellules) et le milieu de culture. L'amas produit à la centrifugation a été prélevé et étalé sur une lame de microscope puis coloré avec le protocole Hema 3® (Fisher Healthcare, Canada), comparable à une coloration Wright-Giemsa, avant d'être observé au microscope optique. Cette coloration permet de mettre en évidence que les cellules osseuses étaient vivantes.

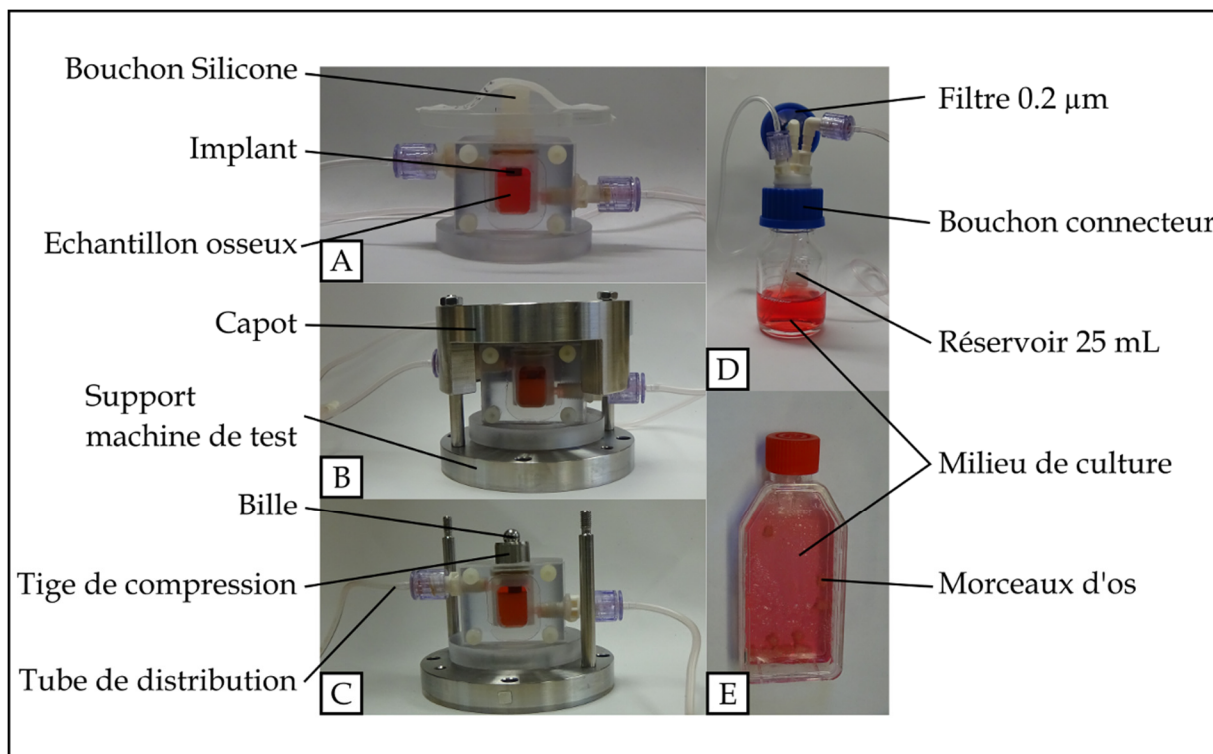


Figure 3.12 Culture osseuse. A. Chambre et échantillon - Configuration μ CT. B. Chambre et échantillon - Configuration Culture avec capot. C. Chambre et échantillon - Configuration Culture sans capot. D. Réservoir de milieu de culture. E. Flacon avec morceaux d'os

3.2.4 Acquisitions μ CT

Trois jours après la préparation des échantillons, les chambres ont été débranchées de la pompe et de leur réservoir et fermées avec des bouchons stériles (Figure 3.12-A). Elles ont alors été transportées au CHU Sainte-Justine pour être imagées par μ CT avec l'appareil Skyscan 1176 (Skyscan®, N.V., Belgique). Les acquisitions ont été réalisées avec une taille de pixel à 9 μ m, avec un filtre aluminium de 1 mm d'épaisseur, à 65 kV et 385 μ A. Le pas de rotation était de 0,25° et le temps d'exposition était fixé à 1460 ms. Les acquisitions avaient une durée de 25 minutes environ par échantillon.

Après l'acquisition μ CT, les échantillons ont été rapportés à l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal. Les chambres ont été modifiées pour leur configuration de culture, avec l'installation de la tige de compression et du capot (Figure 3.12 B&C).

Après 10 semaines de culture, les chambres ont été remises dans leur configuration μ CT (Figure 3.12-A) pour une deuxième acquisition au CHU Sainte-Justine.

Parallèlement, un échantillon non mis en culture a été imagé à deux reprises dans les mêmes conditions afin d'évaluer les méthodes de mesure et d'analyse.

3.2.5 Fin de culture

Une fois la seconde acquisition d'images μ CT effectuée, les échantillons ont été extraits de leur chambre de culture et fixés avec du formaldéhyde dilué à 4 % pendant 4 h. Ils ont ensuite été entreposés dans du PBS stérile avec 10 % d'antibiotiques à 4 °C. Les flacons vidés de leur milieu de culture ont, eux, été colorés avec le protocole Hema 3® (Fisher Scientific, Canada), et observés au microscope optique.

3.2.6 Traitement des images μ CT

Après reconstruction sur le logiciel CTAn (SkyScan®, v.1.16.4.1), les images volumiques μ CT ont été réorientées en alignant la base et la face avant des échantillons avec un plan horizontal et vertical. Pour cela, le module TransformJ (Meijering *et al.*, 2001) du logiciel Fiji a été utilisé (Schindelin *et al.*, 2012). Puis les images ont été filtrées avec un filtre moyen 3D à 3 pixels (Ollion *et al.*, 2013) et segmentées avec un seuil déterminé comme la médiane des seuils obtenus sur chaque coupe par la méthode IsoData (Ridler & Calvard 1978). Les images ont ensuite subi un traitement binaire dit ouvert (érosion puis dilatation). Une fois traitées, les images volumiques ont été coupées au plus près des échantillons, implant exclu, puis coupées en deux pour alléger les calculs. Les images au début et en fin de culture ont alors été recalées en utilisant le module Atlas Toolkit (un recalage 3D/3D par intensité (Grocott *et al.*, 2016)). Par ce recalage, les images volumiques (demi-échantillons) de début et de fin de culture ont été placées selon la même orientation. L'ensemble des pixels communs à ces deux volumes d'images étaient rassemblés au sein d'un volume consensus. Une fois recalées, les images ont de nouveau été segmentées avec un seuil fixé à 128 (sur 255, images 8-bit) pour éliminer les

pixels gris liés à la réorientation des images. En utilisant le module BoneJ Experimental, la fraction volumique BV/TV (Odgaard & Gundersen, 1993) sur tout le volume de chaque demi-échantillon a été obtenue. Par soustraction de l'image volumique consensus, il a été possible de mettre en évidence la quantité d'os résorbé et la quantité d'os formé au cours de la culture à partir des images volumiques de début et de fin de culture. Le BV/TV et la quantité d'os formé et résorbé ont aussi été calculés sur des sous-régions des échantillons, en les découpant selon trois parties égales : proche de l'implant, milieu de l'échantillon et bas de l'échantillon. L'ensemble des résultats ont été comparés à ceux calculés sur l'échantillon contrôle n'ayant pas subi de culture.

Afin de vérifier la validité des résultats du recalage 3D/3D, un second recalage 2D/3D a été réalisé sur une coupe de l'échantillon contrôle et d'un échantillon mis en culture. Pour cela, une coupe à l'état final a été sélectionnée au milieu de chaque échantillon et un recalage par intensité (Matlab R2017b, MathWorks Inc., MA, É.-U.) a été appliqué pour trouver la coupe qui lui correspond le mieux dans le volume initial de l'échantillon (pour plus de détails sur cette méthode, voir le chapitre 4.2.1.4, p.85, ce recalage ayant été utilisé pour comparer la tomographie par neutrons avec l'histologie). À la suite de ce recalage, il a été possible d'extraire la proportion de pixels liés aux adaptations osseuses de la même façon que lors du recalage 3D/3D, en isolant les pixels uniquement présents dans l'état initial (résorption) ou final (formation) de l'échantillon.

3.2.7 Analyse statistique

Les valeurs de BV/TV ont été comparées entre le début et la fin de la culture par un test non paramétrique de Wilcoxon. Le niveau de significativité était fixé à $p=0.05$. Les calculs ont été réalisés sur le logiciel R (R Development Core Team, 2005).

3.3 Résultats

Lors des premiers jours de culture, un souci technique avec la machine de test mécanique ElectroForce 3200 a imposé l'interruption de la stimulation mécanique et mené à la destruction

d'un échantillon. De plus, une fuite importante dans l'une des chambres a causé une contamination, conduisant à aussi retirer cet échantillon de l'étude. Au total, quatre échantillons et quatre flacons de culture cellulaire ont été mis en culture sur une période de 73 jours. Ainsi, la stimulation mécanique est un facteur qui a été supprimé de l'analyse, résultant à un seul groupe Contrôle de 4 échantillons avec implant (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). À la fin de la culture, aucun implant ne s'est solidarisé à l'échantillon correspondant.

Aucune différence significative n'a été mesurée en termes de BV/TV entre le début et la fin de culture. À la suite du recalage des images μ CT en début et fin de culture, les résultats de résorption et formation osseuses ont été extraits et sont décrits à la Figure 3.13 avec une ligne noire pour les résultats de l'échantillon contrôle, et un point bleu pour les demi-échantillons, chaque échantillon étant représenté par un symbole (o, +, x ou *). Comparativement aux mesures effectuées sur l'échantillon contrôle (ligne noire), les valeurs de formation et résorption de chaque échantillon (points bleus) étaient du même ordre de grandeur, soit environ 13 % du BV/TV, que ce soit pour chaque demi-échantillon complet ou par zones (Figure 3.13). Un échantillon (représenté par o) sort toutefois du lot, présentant de fortes résorption et formation osseuses (environ 30 %) dans la zone proche de l'implant, par rapport aux autres échantillons (Figure 3.13).

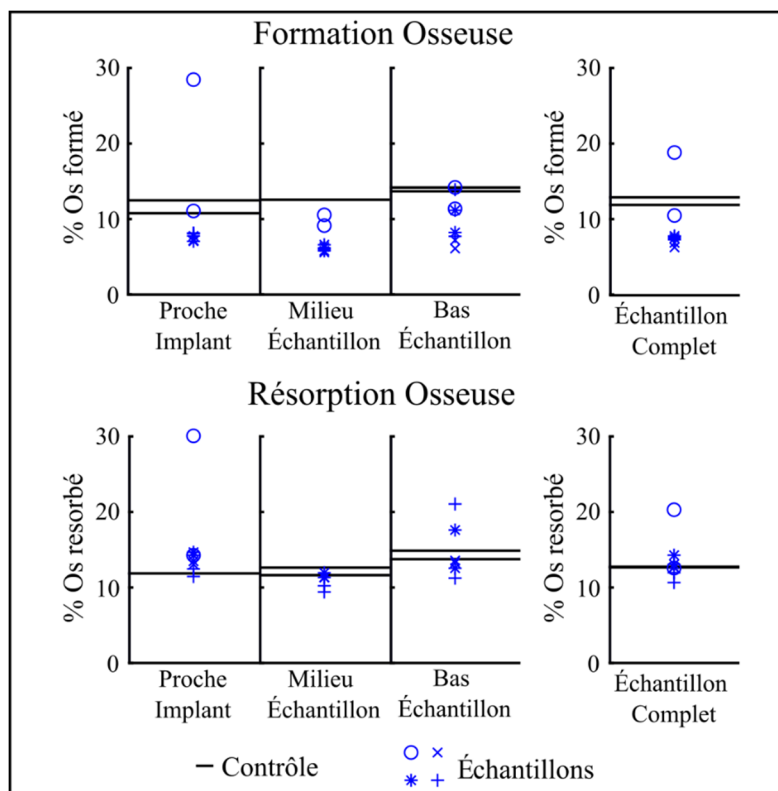


Figure 3.13 Résorption et formation osseuses par zones et échantillon complet

Les mesures réalisées sur cet échantillon (noté o dans la Figure 3.13) et sur l'échantillon contrôle ont été vérifiées à l'aide d'un recalage 2D/3D à partir d'une coupe prise sur chaque demi-échantillon (soit 4 coupes au total, 2 par échantillon). L'analyse par recalage 2D/3D sur l'échantillon contrôle a montré des résultats similaires au recalage 3D/3D, avec une erreur de détermination sur la formation et la résorption osseuse élevée (environ 8 % pour le recalage 2D/3D et 13 % pour la coupe équivalente du recalage 3D/3D) (Figure 3.14). La formation osseuse mesurée sur l'échantillon en culture était équivalente à l'échantillon contrôle sur une moitié d'échantillon, et était plus grande de 2,5 % sur l'autre moitié (Figure 3.15). Les valeurs de résorption de l'échantillon en culture étaient supérieures à celles de l'échantillon contrôle avec une différence d'au moins 3 %, autant pour le recalage 2D/3D que la coupe équivalente du recalage 3D/3D. Pour la moitié avec le plus de formation osseuse détectée, la résorption osseuse était, elle aussi, plus importante que sur l'autre demi-échantillon avec une différence par rapport à l'échantillon contrôle d'environ 5 %.

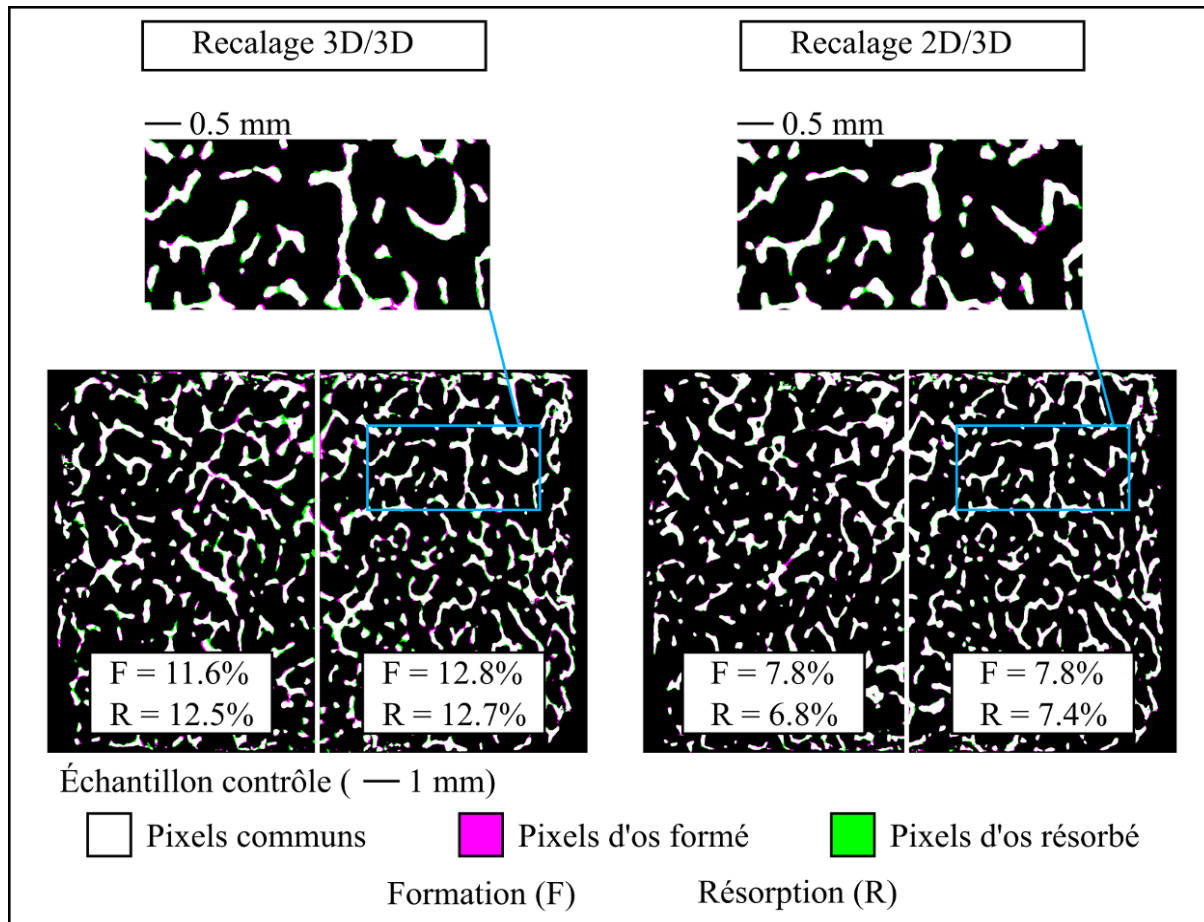


Figure 3.14 Comparaison entre le recalage 3D/3D et le recalage 2D/3D - Échantillon contrôle

Une analyse visuelle des images a révélé une répartition homogène et parsemée des pixels associés à la résorption osseuse (vert) et à la formation osseuse (fuchsia) sur toute la surface des échantillons, excepté pour le demi-échantillon avec un surplus de formation et de résorption osseuse. Pour ce demi-échantillon, une quantité importante de pixels colorés était présente en haut de l'échantillon (Figure 3.15).

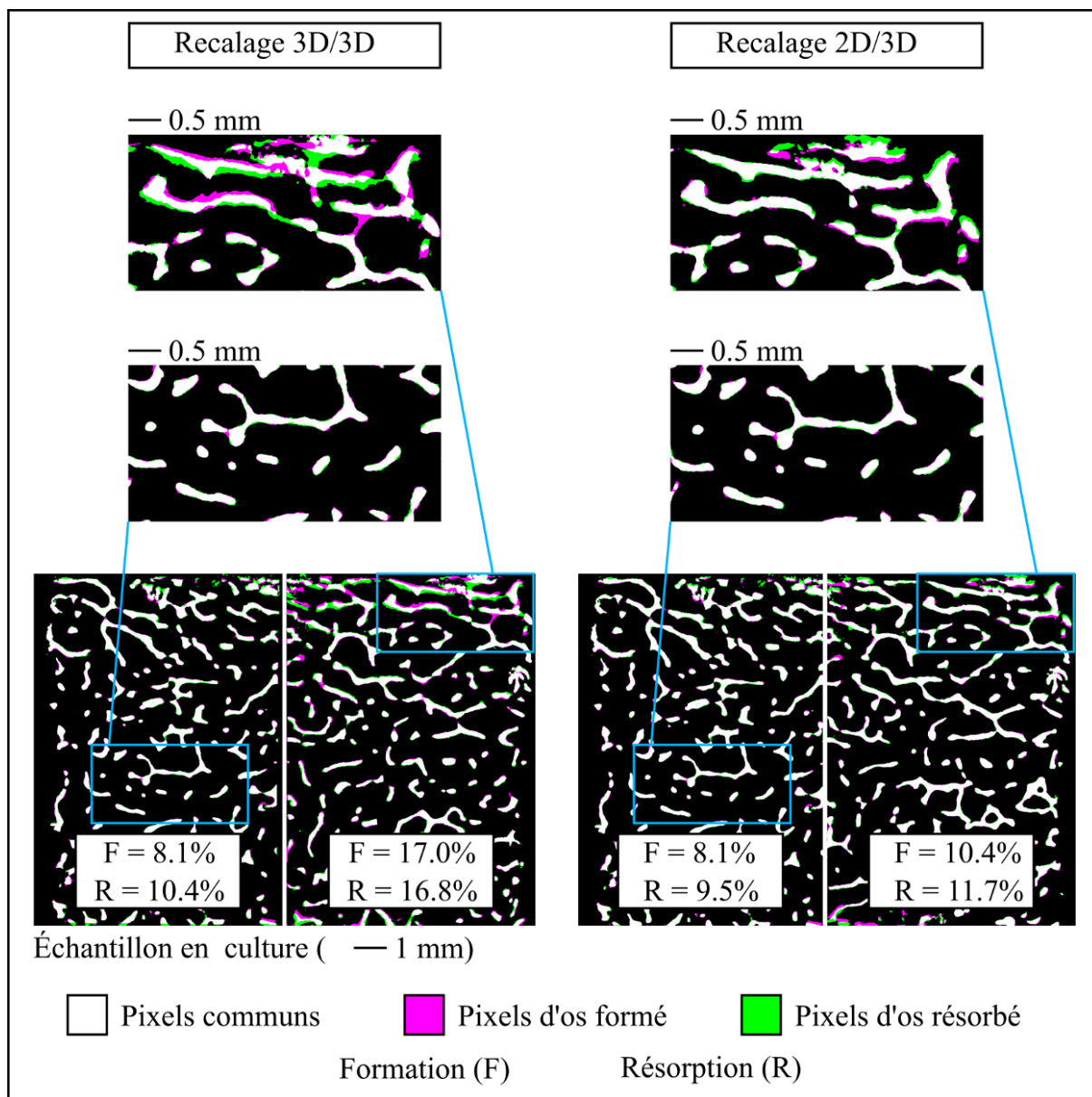


Figure 3.15 Comparaison entre le recalage 3D/3D et le recalage 2D/3D - Échantillon en culture

La comparaison hebdomadaire du milieu de culture usagé avec le nouveau milieu de culture n'a montré aucune différence de couleur pour les bioréacteurs. A contrario, le milieu de culture des flacons a présenté un jaunissement du milieu prononcé au bout de 7 jours (Figure 3.16).

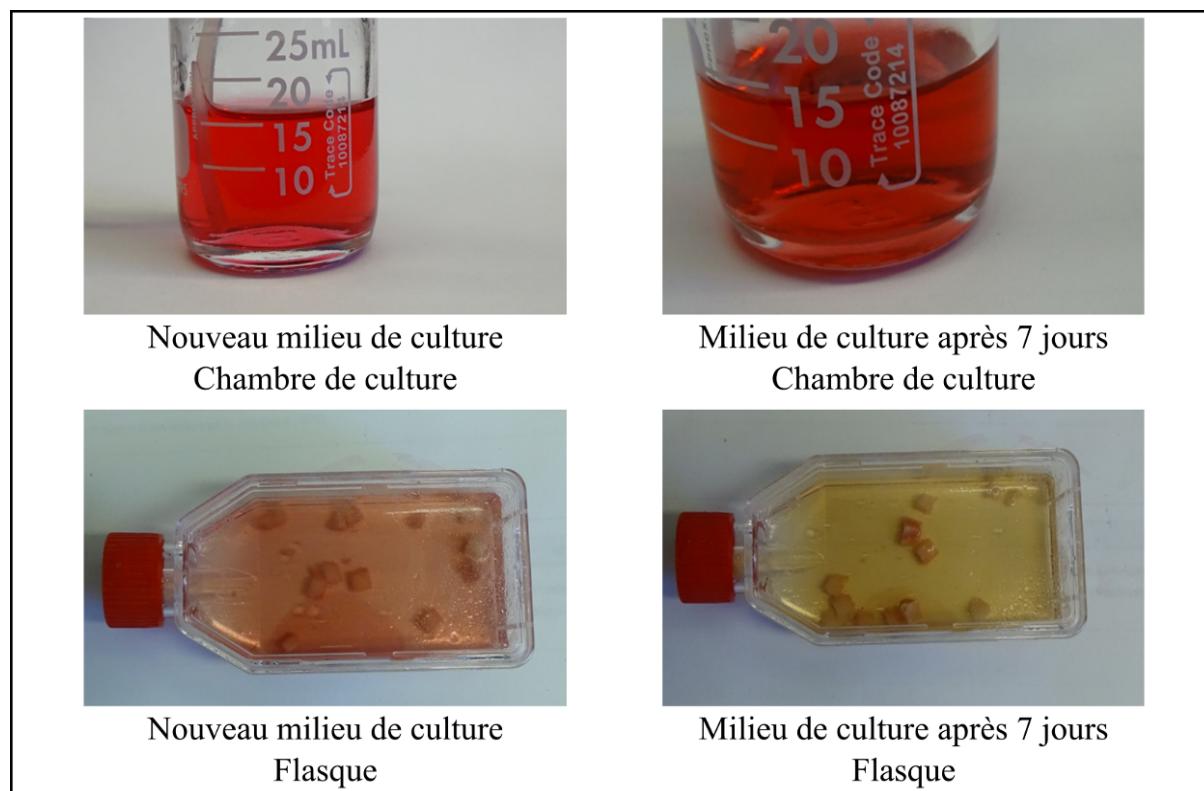


Figure 3.16 Coloration du milieu de culture après 7 jours de culture

Les lames d'histologie du milieu de culture, réalisées après chaque changement de milieu, n'ont présenté que peu de cellules flottantes dans le milieu de culture, autant pour les chambres que pour les flacons (Figure 3.17).

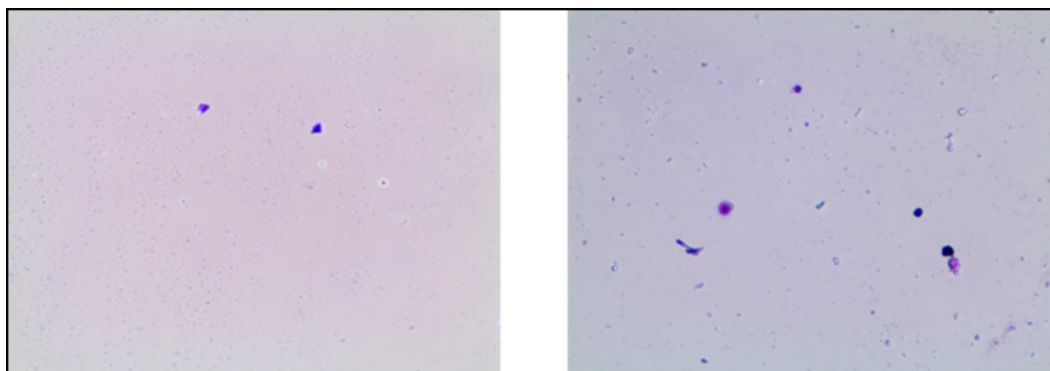


Figure 3.17 Microscopie (x20) des lames d'histologie du milieu de culture pour les chambres (à gauche) et pour les flacons (à droite)

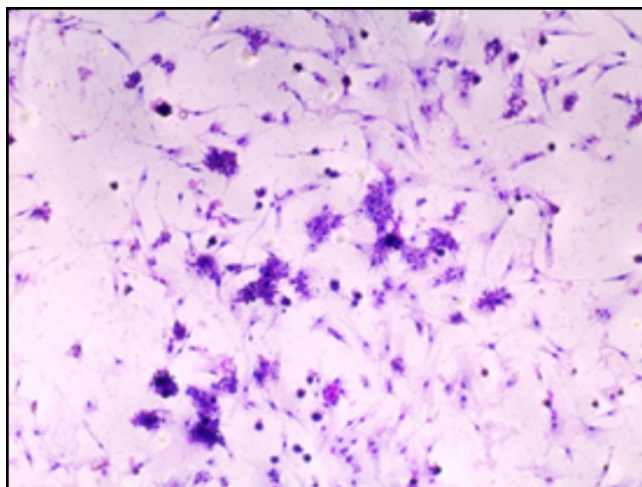


Figure 3.18 Microscopie (x20) de l'histologie d'un flacon en fin de culture

En fin de culture, l'histologie des flacons a montré de gros amas cellulaires localisés, constitués de cellules ostéoblastes en bonne santé (forme étoilée) (Figure 3.18).

3.4 Discussion

La méthodologie *ex vivo* est une méthode appliquée pour étudier le remodelage osseux en fonction de l'environnement de l'os. Dans la littérature, ces cultures sont menées sur une période de 3 à 4 semaines (Endres et al., 2009; S. Rahman et al., 2016; Vivanco et al., 2013). Une seule étude (S. Rahman et al., 2016) considérait un implant et s'intéressait à sa capacité de diffusion de médicaments dans le tissu, sans étudier la qualité de l'ostéointégration. L'étude présentée ici s'intéresse à la mise en œuvre de la méthode *ex vivo* sur des périodes plus longues, dans un contexte d'étude de l'ostéointégration.

Les analyses μ CT ont montré qu'il n'y a pas de différence significative pour le BV/TV des échantillons entre le début et la fin de culture. De plus, le recalage 3D/3D montre des taux de formation et résorption osseuses équivalentes à l'erreur de détermination apportée par l'échantillon contrôle (Figure 3.13). Ainsi, aucun remodelage osseux n'a été induit dans les échantillons pendant la culture.

L'analyse par recalage 3D/3D présente une erreur de détermination de ces taux de formation et de résorption osseuse élevée (environ 13 %). Le recalage 2D/3D rapporte une erreur, certes plus faible, mais équivalente au recalage 3D/3D. Cette différence peut être associée à la différence de dimensions des images dans l'analyse, une étude de recalage 3D conduisant à une plus grande marge d'erreur qu'une analyse 2D, plus précise. D'autre part, les valeurs de résorption et de formation osseuses rapportées par un des demi-échantillons en culture rapporte des différences comparables à l'échantillon contrôle pour les deux recalages réalisés. (Figure 3.14 & Figure 3.15).

L'échantillon en culture a été sélectionné pour l'analyse 2D/3D en raison de son comportement inhabituel dans la cohorte lors du recalage 3D/3D. En effet, un de ses demi-échantillons présentait une formation et une résorption osseuses remarquablement élevées près de l'implant (30 %) (Figure 3.13). Ce comportement a aussi été mis en évidence dans l'analyse 2D/3D, les images montrant un décalage local des tissus à cet endroit (Figure 3.15). Plusieurs points permettent de conclure que ce résultat n'est pas représentatif d'un remodelage osseux. Tout d'abord, les pixels correspondant à de la formation (fuchsia) et à de la résorption osseuses (vert) étaient équitablement répartis de part et d'autre des pixels communs aux deux états (début et fin de culture) de l'échantillon (blanc) (Figure 3.15). Cela s'est traduit par des taux de formation équivalents aux taux de résorption osseuse : environ 30 % pour le recalage 3D/3D volumique (Figure 3.13), 17 % sur une coupe du recalage 3D/3D (Figure 3.15) et 11 % pour le recalage 2D/3D (Figure 3.15). De plus, les structures osseuses en début (pixels verts et blancs) et en fin de culture (pixels fuchsias et blancs) à cet endroit sont fortement similaires et aisément superposables visuellement. L'échec du recalage pour ce demi-échantillon pourrait être rapporté à une déformation locale du tissu entre les deux acquisitions μ CT, d'autant que la zone incriminée se situe proche de l'implant. En effet, les deux recalages effectués (3D/3D et 2D/3D) reposent tous deux sur l'hypothèse que les échantillons n'ont pas été déformés entre les deux acquisitions, n'autorisant une modification des images qu'en translation, rotation voire grossissement de toute l'image. Si une modification locale des tissus avait été permise, le recalage aurait cherché à faire correspondre les tissus résorbés et les tissus nouvellement formés, impactant donc les mesures de remodelage osseux. Ainsi, on peut supposer que pour

l'une des deux acquisitions de cet échantillon en particulier, l'implant était plus fortement comprimé sur l'échantillon osseux. Cela a déformé localement la matrice, causant cette erreur dans l'estimation de la formation et la résorption osseuse.

L'absence de changement dans la matrice osseuse des échantillons peut être associée à l'absence de stimulation lors de la culture, la stimulation mécanique ayant été annulée afin de préserver les échantillons. Cette stimulation mécanique a été démontrée comme ayant une influence prépondérante sur le remodelage osseux (Endres et al., 2009; Mosley, 2000). Sans stimulation mécanique suffisante, il est attendu que l'os se résorbe (Frost, 1987). Toutefois, les taux de résorptions rapportés par les échantillons en culture sont trop proches de l'erreur estimée par l'échantillon contrôle pour indiquer un tel phénomène. De même, les taux de formation osseuse sont tous en dessous du seuil contrôle (l'échantillon déformé étant exclu de cette observation), concluant sur l'absence de formation osseuse.

Cette inactivité des échantillons en culture peut être liée à leur origine anatomique. Pour ce projet, les échantillons étaient prélevés à partir d'ilium bovin. Cet os a été sélectionné pour sa forte contenance en os trabéculaire, sa facilité d'accès pour le vétérinaire (faible risque de contamination extérieure lors de l'extraction), et sa taille suffisamment importante pour obtenir plusieurs échantillons d'un même spécimen animal. Le choix de l'animal a été réalisé relativement à la littérature. Cet animal est particulièrement utilisé en culture *ex vivo* (Endres et al., 2009; Vivanco et al., 2013) en raison de sa structure lamellaire comparable à l'os humain (Abubakar et al., 2016). Bien que plusieurs zones anatomiques différentes aient été utilisées (sternum, métacarpes, ulna, *etc.* (David et al., 2008; C. Davies et al., 2006; Endres et al., 2009; Vivanco et al., 2013)), le choix de la zone anatomique peut influencer les adaptations osseuses prévues. En effet, un os déjà fortement sollicité naturellement a moins de chance de montrer des adaptations osseuses en culture, comme démontré par David *et al.* en comparant leurs échantillons d'ulna et de sternum (David et al., 2008). Dans ce cadre, l'ilium est un os faiblement impliqué dans les mouvements de l'animal et, dans cette culture, aucun stimulus mécanique n'a été apporté à l'os. Par conséquent, les échantillons n'ont certainement pas perçu

de changement particulier dans leur environnement mécanique, d'où l'absence d'adaptation osseuse.

Toutefois, l'origine anatomique ne suffit pas à elle seule pour expliquer l'absence de résorption osseuse alors que les échantillons n'étaient pas sollicités. En effet, la troisième culture réalisée avec le prototype ((Levasseur, 2019), voir chapitre 3.1.3, p.55) montre de la résorption dans le groupe contrôle après une culture de 14 jours. La résorption osseuse est un phénomène décrit comme étant de courte durée, se déroulant sur 2 à 3 semaines, en lien avec la durée de vie des ostéoclastes (Harada & Rodan 2003). La phase de formation osseuse intervient alors et a une durée de 4 à 6 mois (Harada & Rodan, 2003; Katsimbri, 2017). La troisième culture se situe donc en pleine phase de résorption tandis que la culture présentée ici a déjà entamé sa phase de formation osseuse. Considérant l'erreur de détermination des taux de formations et résorptions osseuses de la technique (environ 13%), il est possible que du remodelage osseux soit intervenu pendant la culture, mais qu'il soit trop faible pour être perçu avec les techniques actuelles. Pour contre-valider cette hypothèse, un marquage osseux aurait pu être réalisé pendant la culture afin de mettre en évidence le tissu osseux à deux instants distincts. Cette technique a par exemple été utilisée par Birmingham *et al.* (Birmingham et al., 2016), leur permettant ainsi de calculer le taux d'apposition de tissu osseux pendant la culture par analyse histologique.

Outre la stimulation mécanique, le développement osseux peut être affecté par des hormones et autres facteurs de croissance. Les études *in vivo* ont notamment montré l'effet du diabète (Jing et al., 2018) ou de la ménopause (Dudeck et al., 2014) sur le remodelage osseux. La production d'ostéoclastes est par exemple inhibée par les œstrogènes et la testostérone. Cela a pour conséquence une prédominance de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées en raison de la diminution importante d'œstrogènes (Bauer & Link 2009; Harada & Rodan 2003). Le recrutement, l'activation et la prolifération des cellules osseuses sont aussi interconnectés, la production de facteurs comme le RANKL ou l'ostéoprotégérine par les ostéoblastes agissant sur la différenciation des ostéoclastes (Florencio-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simões, & Cerri, 2015). Le milieu de culture utilisé, BGJb, bien que privilégiant la prolifération des ostéoblastes

(Schmitt et al., 2008), ne permet pas l'activation de ces cellules, c'est-à-dire leur implication dans la formation de tissu osseux. Des travaux plus poussés pourraient s'intéresser à l'injection de tels facteurs d'activation ou de croissance (Mann, Huber, Kogianni, Jones, & Noble, 2006), voire de cellules développées *in vitro*, pour venir induire du remodelage osseux dans l'os, comme proposé par Marino *et al.* (Marino, Staines, Brown, Howard-Jones, & Adamczyk, 2016).

Bien que l'activation cellulaire soit faible dans cette culture, plusieurs témoins permettent de mettre en évidence que les cellules des échantillons étaient toujours viables en fin de culture, voire capables de se multiplier. Tout d'abord, l'histologie des flacons en fin de culture a révélé une prolifération cellulaire, en l'occurrence des ostéoblastes. Ce test est d'importance, car les échantillons dans ces flacons consistaient en des lames morcelées d'os de 3 mm d'épaisseur. Lors de la préparation des échantillons, les coupes étaient réalisées sous irrigation de PBS stérile à 4 °C (C. Davies et al., 2006; Endres et al., 2009), afin de limiter l'augmentation de température, cause de mortalité cellulaire (Fuchsberger 1988; Tawy, Rowe, & Riches 2016; Sener *et al.* 2009). Les lames ayant été obtenues dans les mêmes conditions que les échantillons dans les bioréacteurs, mais avec une épaisseur moindre, l'effet de la montée en température était plus important. La bonne santé cellulaire en flacon montre donc qu'au début de la culture les échantillons étaient viables, avec des cellules osseuses susceptibles de proliférer. Cependant, les flacons utilisés sont spécifiquement étudiés pour permettre un bon développement cellulaire et sont courants en biologie *in vitro*. Ainsi, les flacons seuls ne peuvent attester de la prolifération cellulaire dans les bioréacteurs jusqu'à la fin de la culture. De plus, l'imagerie μ CT est reconnue pour affecter la viabilité cellulaire (Caraiani et al., 2018; Mustafy et al., 2018). Toutefois, le niveau d'énergie des rayons X employé, bien qu'élevé, était ponctuel, donc suffisamment faible pour garder la viabilité cellulaire (Mustafy et al., 2018). Ce point est d'ailleurs validé par la troisième culture ((Levasseur, 2019), voir chapitre 3.1.3, p.55) qui a utilisé les mêmes paramètres d'acquisition en début de culture. L'histologie des milieux de culture a montré que, autant pour les flacons que pour les bioréacteurs, il a été possible d'avoir des cellules osseuses en suspension. Ainsi, il est pertinent d'estimer que les cellules des échantillons étaient toujours viables durant les 10 semaines de culture. Enfin,

l'absence de changement de couleur du milieu pour les bioréacteurs suggère la potentielle viabilité des cellules osseuses présentes. La couleur étant un témoin du pH du milieu, celui-ci peut être amené à jaunir ou à devenir violet. Les flacons présentent un jaunissement prononcé au bout d'une semaine. Ce comportement est lié à la forte prolifération cellulaire mentionnée plus tôt. L'absence de ce comportement dans les réservoirs des bioréacteurs peut être expliquée par la différence de volumes avec les flacons. Celles-ci contenant moins de milieu (5 mL) comparées aux bioréacteurs (15 mL), les changements de concentrations des composants organiques et donc du pH étaient plus importants pour les flacons. Le changement de couleur du milieu de culture vers le violet peut être rapporté à de l'apoptose cellulaire. Ce changement de couleur n'ayant pas non plus été perçu dans les bioréacteurs, on peut conclure à la viabilité des cellules osseuses pendant la totalité de la culture, d'autant que le volume osseux était plus important dans les bioréacteurs que dans les flacons.

Un des objectifs de cette culture était d'étudier l'ostéointégration d'implants, comme elle avait pu être démontrée par Rahman *et al.* en culture *ex vivo* (S. Rahman et al., 2016). Toutefois, cette ostéointégration n'a pas eu lieu. Outre le manque de stimulation mécanique ou biologique, l'absence d'ostéointégration peut aussi être expliquée par l'implant en lui-même. En effet, l'étude de Rahman *et al.* (S. Rahman et al., 2016) utilise un implant de la taille d'une épingle, implanté dans le cœur de l'échantillon. La localisation et la petite surface à mettre en contact ont certainement favorisé une croissance osseuse autour de l'implant. A contrario, l'implant dans cette étude était une pastille de 5 mm de diamètre, posée sur l'échantillon. La culture dans les flacons a démontré que la coupe des échantillons n'a pas affecté la viabilité cellulaire en surface. Il y aurait donc pu avoir de la croissance osseuse au contact de l'implant. Toutefois, la surface à recouvrir est bien plus importante que dans l'étude de Rahman *et al.* (S. Rahman et al., 2016). De plus, la position de l'implant au-dessus de l'échantillon induit un apport cellulaire de bas en haut pour atteindre la surface de l'implant, donc un mouvement opposé à la force gravitationnelle. Ces deux points, la surface à recouvrir et la position relative de l'os et de l'implant, viennent ainsi contrevenir à la formation d'une interface entre l'os et l'implant. D'autre part, l'étude de Rahman *et al.* (S. Rahman et al., 2016) constitue la seule étude, à la connaissance de l'auteur, faisant état d'une ostéointégration *ex vivo*.

La faible représentation de l'ostéointégration en étude *ex vivo* peut être associée à plusieurs facteurs. En premier lieu, on peut citer les questions de recherches principales de cette méthodologie. En effet, le cœur de la recherche *ex vivo* est le développement de greffons osseux pour l'implantation. Ainsi, beaucoup d'études étudient des matrices synthétiques et leur transformation en matrice osseuses (Bouet et al., 2015; Butler et al., 2009). D'autre part, les études *ex vivo* sur le tissu osseux sont complexes à mettre en place, comme en témoignent les nombreuses contaminations fongiques observées lors de l'établissement de ce projet (voir chapitre 3.1.3, p.55). L'absence de système immunitaire pendant la culture rend les échantillons sensibles à une contamination bactérienne, virale ou fongique, d'où l'utilisation d'antibiotiques dans ces études (Drexler & Uphoff, 2002). À titre d'exemple, la culture présentée faisait usage de pénicilline, de streptomycine et d'amphotéricine B afin de limiter la contamination fongique (Endres et al., 2009; Sokol-Anderson, Brajtburg, & Medoff, 1986). Ces contaminations étant irrémédiables, les résultats obtenus pour les échantillons concernés sont généralement considérés comme inexploitable, les bactéries et champignons produisant des toxines qui peuvent influencer le comportement cellulaire. Pour cette culture, la contamination fongique n'a touché qu'une seule chambre, qui n'a pas été incluse dans cette étude. Étant donné que tous les échantillons dans les flacons étaient en bonne santé en fin de culture, l'origine de cette contamination ne peut être associée à l'animal ou à la préparation des échantillons. Elle est plutôt issue du bioréacteur lui-même, qui lors des premiers jours, a subi une fuite de milieu de culture.

Les résultats μ CT ne concluant pas sur un remodelage osseux intéressant, il a été choisi de ne pas approfondir l'analyse des échantillons. Notamment, une histologie décalcifiée aurait permis de mettre en évidence les cellules osseuses présentes en fin de culture et s'assurer de la viabilité des échantillons pendant les 10 semaines. Parallèlement, l'analyse des milieux de culture collectés chaque semaine aurait pu déterminer si les cellules osseuses proliféraient, si elles entraient en apoptose, ou si des phénomènes de résorption ou formation osseuses étaient en place. En effet, ces différents phénomènes laissent des traces dans le milieu de culture (collagène, ADN, protéines, concentration en ions calcium, *etc.*) (David et al., 2008;

Gordeladze, Drevon, Syversen, & Reseland, 2002; Schnieders et al., 2013). Toutefois, la pertinence de ces expérimentations dans le cadre des résultats déjà obtenus était faible. De plus, dans le contexte international de cette thèse, ce projet de culture *ex vivo* ayant été mené au Canada, la pandémie de COVID-19 a affecté la possibilité d'exploiter pleinement l'analyse des échantillons depuis la France.

Malgré ces limitations, ce projet a fait l'objet de plusieurs points méritant d'être mentionnés.

Tout d'abord, la culture présentée constitue le quatrième essai réalisé. Cette culture a pu être conduite jusqu'au bout des 10 semaines prévues alors que les précédentes n'ont jamais pu aller au-delà de deux semaines. L'amélioration continue du prototype et des protocoles ainsi que l'apprentissage de la manipulation des matériels a permis d'aboutir à ce résultat. Toutes les études publiées à ce jour utilisant des échantillons osseux *ex vivo* ne dépassent pas 3 à 4 semaines de culture.

Ce projet de thèse a été réalisé en parallèle de la thèse d'Annie LEVASSEUR (Levasseur, 2019). Dans ses travaux, elle a mis en évidence la capacité des bioréacteurs présentés dans cette thèse à étudier les échantillons mis en culture sous plusieurs modalités : μ CT, stimulation mécanique et corrélation d'images. Elle a notamment montré qu'au bout de deux semaines de culture, la stimulation mécanique réduisait les effets de la résorption osseuse. Ainsi, la combinaison de ces deux projets de recherche révèle que le bioréacteur que nous avons conçu est apte à mener des projets de recherches plus avancés, comme l'étude de la stimulation mécanique sur une période de culture prolongée.

3.5 Conclusion

La méthodologie *ex vivo* constitue un modèle particulier de l'étude du tissu osseux, où l'ensemble des paramètres régissant son développement peuvent être contrôlés. Il est ainsi possible de ne provoquer aucun changement dans la matrice osseuse, comme l'a démontré ce projet. Par conséquent, l'implication de certains facteurs environnementaux dans le

développement osseux est susceptible d'être plus facilement remarquable dans un contexte *ex vivo* qu'*in vivo*. En particulier, il serait envisageable d'examiner l'effet isolé de stimuli chimiques (tels que le RANKL, l'ostéoprotégérine (Kostenuik, 2005), les hormones digestives comme la leptine (Gordeladze et al., 2002), *etc.*), en parallèle de stimuli mécaniques.

Bien que cette méthodologie soit applicable sur du tissu humain (C. Davies et al., 2006), les expérimentations *ex vivo* restent un modèle simplifié du vivant. Elles ne peuvent tenir compte de l'entière complexité des tissus et de leur développement, contrairement aux expériences *in vivo*. C'est pourquoi le nombre d'études sur le tissu osseux, et spécifiquement de l'interface os-implant, est beaucoup plus important *in vivo*. Ce nombre met en lumière un besoin croissant de nouvelles méthodes de caractérisation du tissu, plus particulièrement au niveau de l'implant.

CHAPITRE 4

ÉTUDE DE L'INTERFACE OS-IMPLANT PAR TOMOGRAPHIE PAR NEUTRONS

Dans le cadre des études sur l'ostéointégration *in vivo*, l'interface os-implant est en général analysée soit par histologie (Berglundh et al., 2003; Fraulob et al., 2020), soit par μ CT à rayons X (Bissinger et al., 2017; Vandeweghe et al., 2013). L'analyse histologique est la technique de référence, mais présente le désavantage de n'offrir qu'une visualisation 2D de l'interface os-implant en plus de détruire l'échantillon. La présence d'artéfacts sur les images obtenues par μ CT peut rendre difficile la visualisation des tissus au plus près de la surface de l'implant. Il a été montré récemment que la tomographie par neutrons est une technique permettant d'observer l'interface os-implant de manière tridimensionnelle et sans d'artéfacts (Isaksson et al., 2017), ce qui a permis de réaliser un suivi de rupture de l'interface par corrélation d'images (Le Cann et al., 2017). Toutefois, les performances de cette technologie pour la caractérisation de l'os autour de l'implant n'ont pas été quantifiées. L'objectif de ce chapitre est de déterminer les performances de la tomographie par neutrons pour mesurer les propriétés de l'interface os-implant en utilisant un modèle d'implant plan présentant une chambre osseuse, afin de distinguer l'os nouvellement formé à son contact. Une comparaison des résultats avec ceux obtenus par l'histologie et une étude de la répartition du tissu osseux au contact de l'implant ont été menées. De plus, cette étude s'est intéressée à l'impact d'un revêtement polymère sur l'ostéointégration.

4.1 Préparation des échantillons et Imagerie

Les implants utilisés dans cette étude consistaient en une pastille en Ti6Al4V (diamètre de 5 mm, hauteur 3 mm) avec une surface polie avec du papier sablé #1200 (LabPol-5, Struers®, Ballerup, Denmark). Un polymère PSSS (poly-(styrène sulfonâtes) de sodium) a été greffé à la surface de la moitié des implants (Chouirfa et al., 2017a, 2017b)).

Quatre lapins de race New Zealand (environ 6 mois, plus de 4 kg) ont été considérés. Quatre implants ont été posés sur leurs deux tibias et fémurs, dont deux contrôles et deux avec

polymère. Ce modèle animal a été utilisé par l'équipe du laboratoire MSME (Créteil, France) dans différentes publications (Fraulob et al., 2020; Mathieu, Vayron, Barthel, et al., 2012; Vayron et al., 2012) et la procédure chirurgicale employée est identique à celle décrite dans (Vayron *et al.*, 2014). Une couronne de PTFE a été placée autour de chaque implant pour créer une chambre osseuse d'une hauteur d'environ 200 μm entre la surface de l'implant et l'os mature. Les implants étaient maintenus à l'os par des élastiques orthodontiques et des vis (Figure 4.1-A) et la période de cicatrisation a été fixée à 12 semaines. Les chirurgies ont été approuvées par le comité d'éthique de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA, Maisons-Alfort, France). Les recommandations européennes ont été suivies pour l'élevage des lapins pendant la cicatrisation (19 °C, 55 % d'humidité, nourriture et eau *ad libitum*). Après l'euthanasie, les fémurs et tibias ont été extraits, et la zone de l'interface os-implant a été isolée en créant des carottes de 9 mm de diamètre (environ 6 mm de hauteur) autour de l'implant, à basse vitesse et sous constante irrigation à la solution saline (Figure 4.1-B). Tous les spécimens ont été conservés dans l'éthanol absolu à 4 °C.

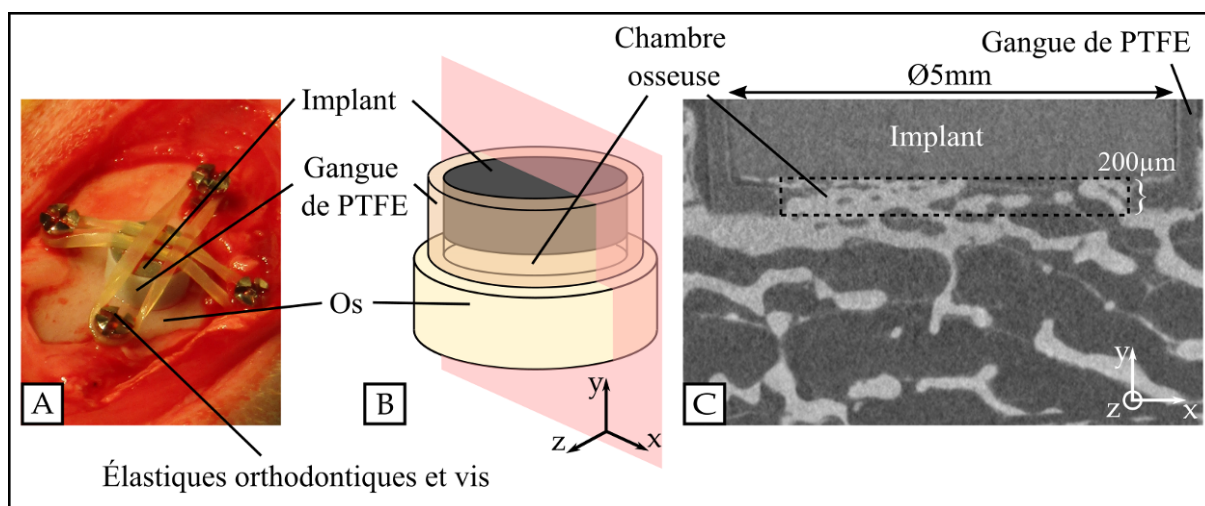


Figure 4.1 Modèle d'implant. A. Photographie du modèle d'implant pendant la chirurgie d'implantation sur un tibia de lapin. B. Modèle schématique de la carotte. C. Coupe représentative (comme représentée en rouge dans B) d'une image volumique neutron

Les douze carottes ont été imagées par tomographie par neutrons à la ligne de faisceaux neutrons D50 NeXT (Institut Laue Langevin, Grenoble, France) (Tengattini, Lenoir, Andò,

Giroud, et al., 2020). Pour éviter toute variation indésirable pendant les acquisitions (notamment par l'évaporation de l'eau, fortement visible aux neutrons), les échantillons ont été séchés à 4 °C pendant 10 heures. Les échantillons étaient alignés verticalement par groupes de 2 ou 3 dans un support personnalisé et scellé en téflon. Les blocs d'échantillons étaient scannés à une taille de pixel de 7,5 µm, utilisant 1792 projections sur une rotation de 360°. Chaque projection était exposée pendant 7 s et moyennée 3 fois, conduisant à une acquisition d'une durée de 10,5 heures. Les images volumiques ont été reconstruites sur le logiciel de reconstruction X-Act fourni par RX Solutions® (Chanavod, France) (Figure 4.1-C).

4.2 Comparaison entre la tomographie par neutrons et l'histologie

Afin de confirmer que la tomographie par neutrons pouvait être utilisée pour étudier le tissu osseux au contact d'un implant, une comparaison avec l'histologie a été réalisée. Ce chapitre a fait l'objet d'un article (Guillaume *et al.*, n/a), soumis à la revue *Physics in Medicine and Biology*, et a fait l'objet d'une première révision très positive de la part des relecteurs. En effet, l'étude présentée ci-après a été rapportée comme une avancée majeure de l'application de la tomographie par neutrons en biologie, notamment grâce à cette comparaison quantitative avec l'histologie, attendue par la communauté scientifique.

4.2.1 Matériels et Méthodes

4.2.1.1 Histologie

Quatre échantillons ont été considérés dans cette étude : deux échantillons de fémurs provenant du même animal (1 contrôle, 1 polymère) et deux échantillons de tibias extraits d'un second animal (1 contrôle, 1 polymère). Ces échantillons ont été fixés dans 10 % de formaline pendant une semaine puis déshydratés pendant 24 heures dans des bains successifs avec une concentration croissante d'éthanol (70°, 80°, 90° et 100°) et 1 h de période sous vide pour retirer les bulles d'air. Les échantillons ont ensuite été rincés dans du xylène et directement fixés dans du PMMA (poly(méthacrylate de méthyle)) (Chevallier et al., 2010; Soffer, Ouhayoun, Meunier, & Anagnostou, 2006). Trois lames de 400 µm ont été coupées au sein des

échantillons, perpendiculairement à l'interface os-implant (plan XY, voir l'orientation en Figure 4.1-B), avec une scie à coupe lente (Minitom, Struers®, Ballerup, Denmark) sous un refroidissement constant d'eau. Les coupes ont été polies au papier sablé #1200 et #2000 (LabPol-5, Struers®, Ballerup, Denmark) et de la toile de polissage avec suspension d'alumine à la taille de grain de 9 μm et 3 μm . L'histologie non décalcifiée a été réalisée avec du picro-fuchsin Van Gieson pour colorer les tissus minéralisés, suivie par une coloration au bleu de Stevenel pour révéler les tissus mous non minéralisés, et visualisée par microscope optique standard (Stemi 305, Zeiss, Chine) (taille de pixel 2,3 μm).

4.2.1.2 Traitement des images neutrons

Les images volumiques obtenues par tomographie par neutrons ont été filtrées en utilisant un filtre 3D Moyen (rayon $r = 2$ pixels) (Ollion, Cochenec, Loll, Escudé, & Boudier, 2013), mis en œuvre dans le logiciel Fiji (Schindelin et al., 2012), afin d'augmenter le ratio signal/bruit. Toutes les images volumiques ont été tournées pour aligner l'interface os-implant avec le plan XZ (Figure 4.1-B) (module TransformJ (Meijering, Niessen, & Viergever 2001)). Cet alignement est réalisé après une première segmentation des échantillons. La fraction surfacique (quantité d'os d'une surface divisée par l'aire de cette surface, notée BA/TA, équivalente à une fraction volumique BV/TV, mais réduit à une surface) a été calculée sur chaque coupe XZ et sa dérivée selon la hauteur Y de l'échantillon a été évaluée. L'évolution du BA/TA et de sa dérivée à l'interface sont illustrées en Figure 4.2 avec une image représentative d'une chambre osseuse segmentée. Après segmentation, l'implant n'est plus visible, car le niveau de gris associé à l'alliage de titane est inférieur au seuil de segmentation appliqué dans les images. Ainsi, la dérivée du BA/TA selon Y présente un maximum situé au niveau de l'interface os-implant (Figure 4.2), traduisant un passage brusque d'une ligne remplie de pixels noirs (donc sans os) à une ligne remplie de pixels blancs (l'os). Plusieurs rotations ont été appliquées aux échantillons sur les axes X et Z de façon itérative afin d'optimiser ce maximum, sa valeur maximale selon l'orientation de l'échantillon étant atteinte lorsque l'interface est correctement alignée avec le plan XZ.

Une fois les images volumiques brutes alignées, le tissu osseux a été segmenté à partir d'un intervalle de seuils. La borne inférieure de l'intervalle correspondait à la médiane de tous les seuils obtenus sur chaque coupe XZ de l'image volumique en utilisant la méthode IsoData (Ridler & Calvard, 1978) (134 ± 3 , images 8-bit). La borne supérieure pour retirer les zones plus lumineuses sur les images était sélectionnée par une inspection visuelle des images (190). Après la segmentation, tout bruit résiduel était minimisé en appliquant des combinaisons d'érosions et dilations (ouvert et fermé), sur chaque direction de l'espace ($r=1$ pixel). Après traitement, l'implant n'est plus visible dans les images.

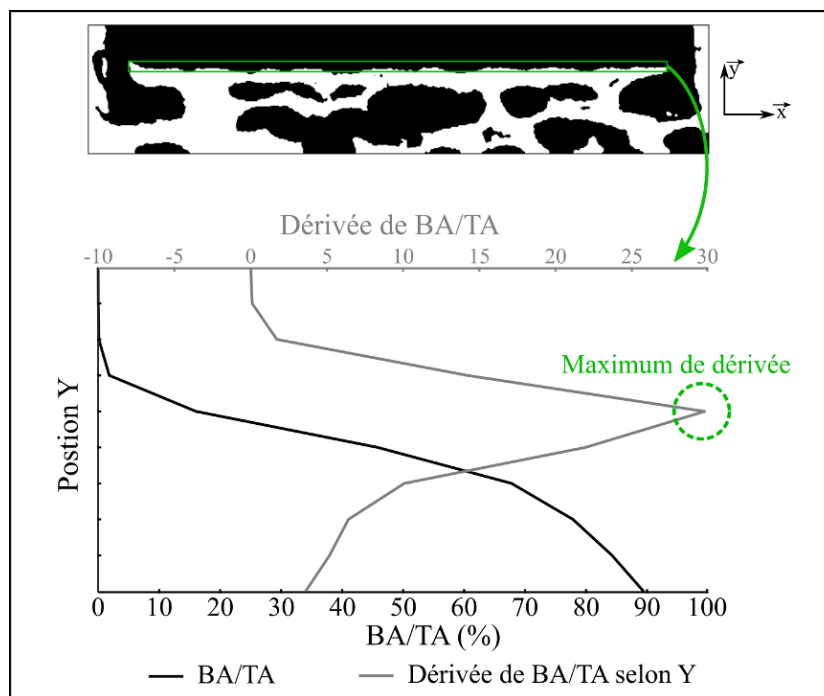


Figure 4.2 Évolution de la fraction surfacique BA/TA et de sa dérivée selon la hauteur Y à l'interface os-implant

4.2.1.3 Traitement des coupes histologiques

Les coupes histologiques colorées avec Van Gieson ont été filtrées par des filtres de couleurs rouge et vert pour isoler le tissu osseux de l'implant par segmentation manuelle (logiciel Fiji). Là encore, deux opérations binaires (ouvert et fermé) ont été appliquées pour minimiser le bruit résiduel des images.

4.2.1.4 Procédure de recalage

Une procédure de recalage d'images a été menée sur les 12 coupes histologiques afin de déterminer leur section 2D correspondante dans le volume neutron associé (Figure 4.3). Ce recalage a été réalisé sur Matlab (R2017b, MathWorks Inc., MA, É.-U.) en adoptant une méthode de recalage par intensité (Henke, Junker, Neumann, Altmann, & Gladilin, 2019). Une portion de l'image volumique neutron correspondant à l'image histologique segmentée a préalablement été sélectionnée par analyse visuelle (Volume Viewer, ImageJ). Chaque coupe histologique (taille de pixel $2,3 \mu\text{m}$) était réduite pour avoisiner la taille des images neutrons (taille de pixel $7,5 \mu\text{m}$). L'approche de recalage consistait à minimiser un « potentiel de similitude » entre les images issues des deux modalités en se basant sur une valeur scalaire nommée « *Fit* ». Cette valeur était calculée selon l'équation (4.1) où $Bone_N$ et $Bone_H$ représentent les pixels segmentés associés à de l'os dans l'image par tomographie par neutrons et dans l'image histologique respectivement. Ce paramètre *Fit* est la somme de deux ratios de correspondance spécifiques à chaque modalité, Fit_H et Fit_N , chacun évaluant le degré de superposition des pixels segmentés d'une modalité par rapport à l'autre modalité. Par exemple, un Fit_H de 100 % indique que toute l'image histologique a été trouvée dans l'image neutron. L'algorithme de recalage maximise itérativement ce potentiel de similitude en faisant varier la position relative des deux images, par translation (le long des axes X et Y), rotation (autour de l'axe Z) ainsi que par grossissement (sous une limite de 2 %) de l'image histologique segmentée, pour correspondre à l'image neutron segmentée sélectionnée (voir l'étape Recalage de la Figure 4.3). Ensuite, une seconde étape itérative améliore l'orientation et la position de la coupe neutron sélectionnée (rotation autour des axes X et Y et translation selon l'axe Z), afin d'identifier l'image neutron qui correspond le plus à l'image histologique. Pour tous les échantillons, la procédure de recalage était itérée jusqu'à ce que la rotation à appliquer à l'image volumique neutron soit en dessous de $\pm 0,2^\circ$ (axes X et Y), avec une erreur de positionnement de l'image (axe Z) de ± 1 image (taille de pixel de $7,5 \mu\text{m}$).

$$Fit = Fit_H + Fit_N$$

$$Fit = \frac{Card(Bone_N \cap Bone_H)}{Card(Bone_H)} + \frac{Card(Bone_N \cap Bone_H)}{Card(Bone_N)} \quad (4.1)$$

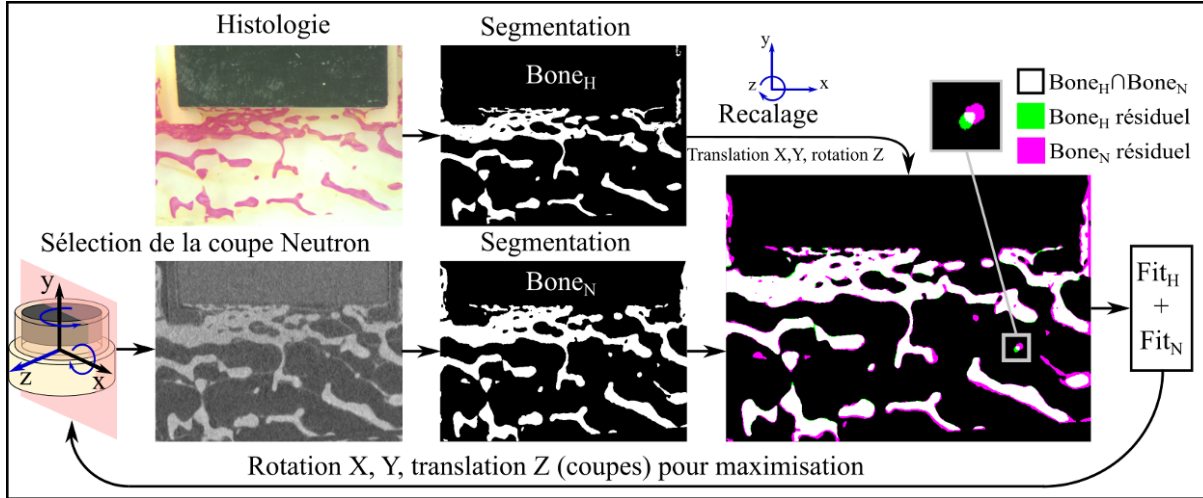


Figure 4.3 Procédure de recalage d'images pour déterminer la coupe neutron correspondant à la coupe histologique

4.2.1.5 Comparaison des deux techniques

Après le recalage d'images, chaque coupe neutron sélectionnée était quantitativement comparée à son image histologique de référence. Deux indicateurs clés pour les deux modalités sont ainsi calculés : le ratio du contact os-implant (BIC) et la quantité d'os au sein de la chambre osseuse de l'implant.

Le ratio BIC au sein de la chambre était déterminé sur une ligne à l'interface os-implant. Il était défini comme le nombre de pixels segmentés d'os (*Bone_H* et *Bone_N*) sur cette ligne divisé par le nombre total de pixels correspondant à la largeur de la chambre. Dans les images neutrons, la ligne du BIC était sélectionnée à partir de l'évolution de BA/TA et de sa dérivée à l'interface (Figure 4.4). Le maximum de la dérivée utilisé pour aligner les images (voir chapitre 4.2.1.2, p.83) permettait de discerner la section de l'image pour laquelle la distinction entre l'os et l'implant n'était pas possible (Figure 4.4). Cette section, nommée zone de

transition à l'interface (ou ZTI), était répartie de façon égale de part et d'autre de ce maximum. Elle était bornée par la première ligne détectant de l'os dans la chambre osseuse et par la ligne de BIC, soit la première ligne ne contenant pas l'implant. Pour identifier cette ligne de BIC, l'intervalle séparant la première ligne détectant de l'os et le maximum de la dérivée du BA/TA était appliqué de l'autre côté du maximum. La valeur du BA/TA à cette position était associée à la valeur du BIC recherchée.

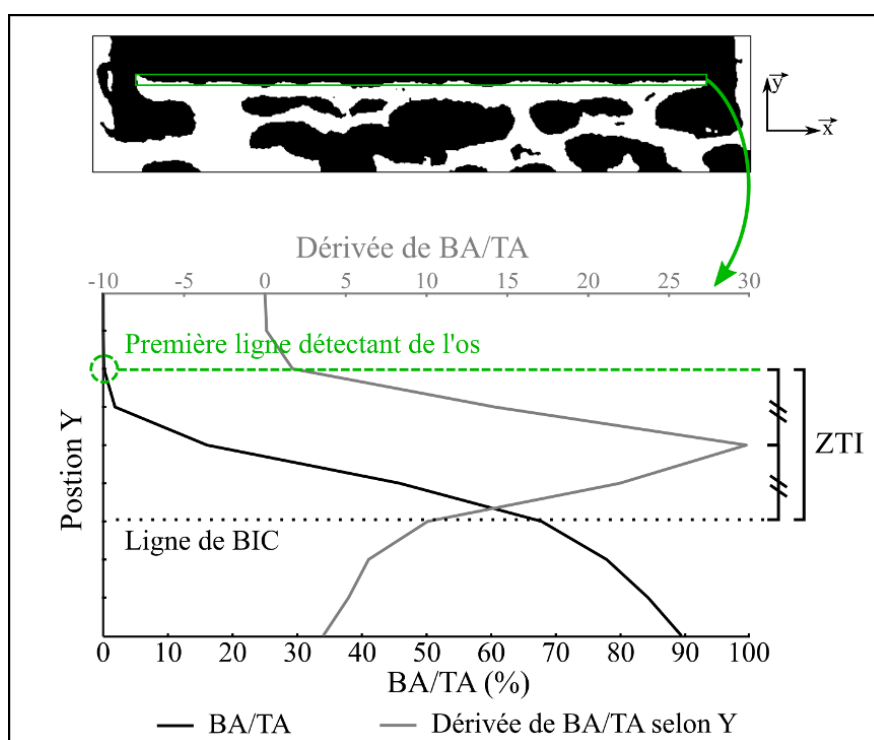


Figure 4.4 Sélection de la ligne de BIC dans les images neutrons

La quantité d'os au sein de la chambre osseuse était calculée comme le ratio entre le nombre de pixels osseux et le nombre total de pixels dans la chambre.

Une comparaison visuelle a aussi été réalisée entre l'image neutron issue du recalage et sa référence histologique colorée au bleu de Stevenel.

4.2.1.6 Analyse statistique

Les valeurs de BIC et de quantité osseuse étaient comparées entre les deux techniques en utilisant une analyse par régression linéaire déterminée par le coefficient de corrélation de Pearson (R). La distribution normale des données a été évaluée avec le test de Shapiro-Wilk avec un niveau de significativité à $p=0,05$. Les tests ont été réalisés sur le logiciel R (R Development Core Team, 2005).

4.2.2 Résultats

Le recalage par intensité a été réalisé avec succès sur les 12 coupes histologiques, identifiant ainsi leur coupe neutron correspondante.

Les résultats sont illustrés pour deux coupes histologiques typiques de la cohorte (Figure 4.6 & Figure 4.5). La majorité du tissu osseux identifié dans les coupes histologiques (coloration Van Gieson, en rouge dans les Figure 4.5-A & Figure 4.6-A) était aussi présente dans les images neutrons correspondantes (Figure 4.5-B & Figure 4.6-B), comme illustré par les valeurs importantes du ratio de correspondance histologique Fit_H avec une moyenne de $94,9 \% \pm 1,3 \%$. Dans les images recalées (Figure 4.5-C & Figure 4.6-C), peu de pixels « verts » peuvent être observés, associés aux pixels osseux segmentés résiduels laissés sans correspondance dans l'image histologie après le recalage. Cependant, la moyenne du ratio de correspondance neutron Fit_N de $74,9 \% \pm 6,8 \%$ révèle que les coupes neutrons contenaient plus de tissu segmenté que leurs correspondances histologiques. Ce résultat peut être visualisé par la quantité plus importante de $Bone_N$ résiduel (en fuchsia dans les Figure 4.5-C & Figure 4.6-C).

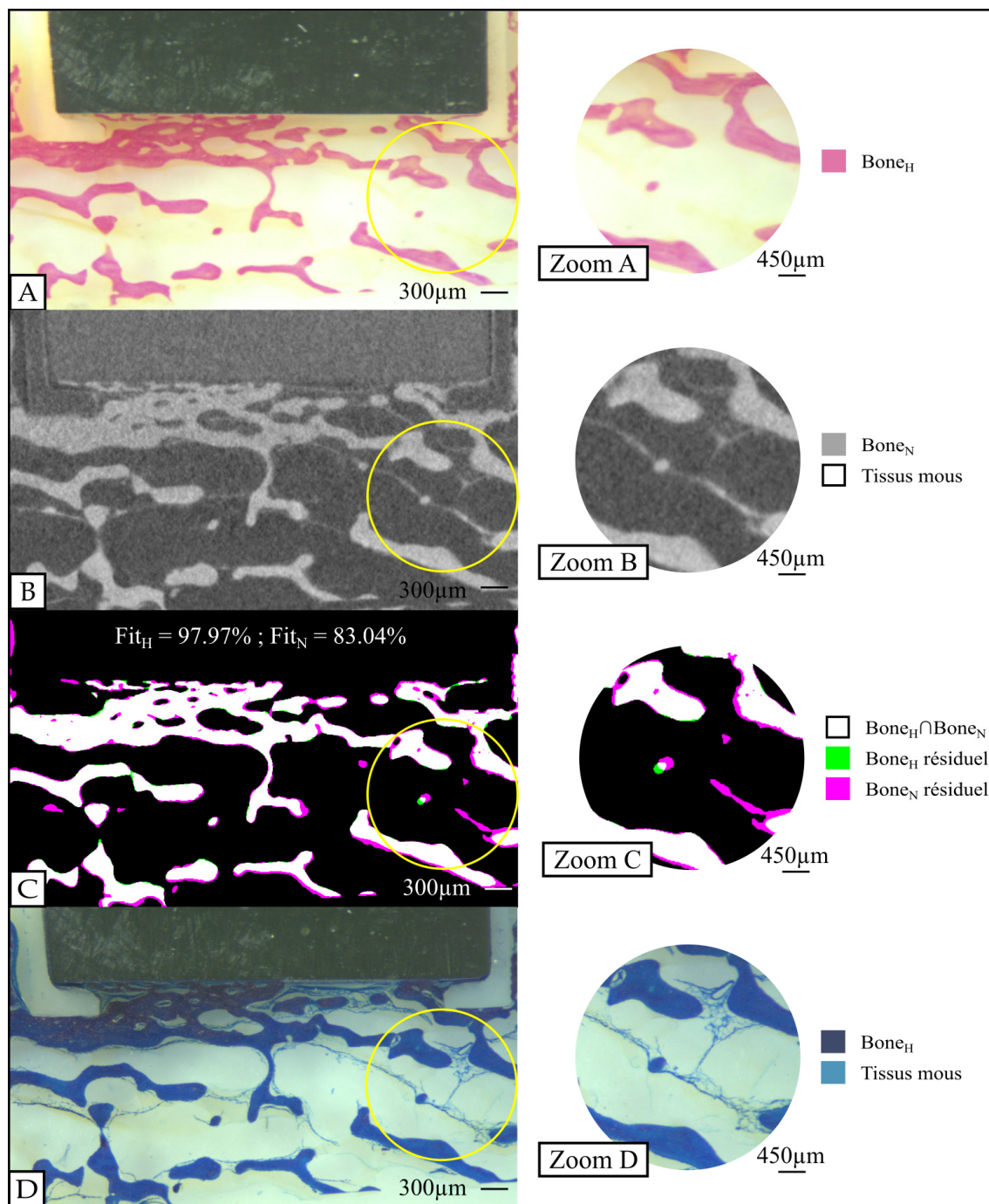


Figure 4.5 Comparaison d'une coupe histologique représentative et de sa coupe neutron correspondante. A. Coupe histologique d'un échantillon après coloration Van Gieson, colorant les tissus minéralisés en rouge. B. Coupe neutron non segmentée correspondant à la coupe histologique en A, identifiée par le recalage d'image.

C. Recalage de A et B avec les ratios de correspondance associés. D. Coupe histologique colorée au bleu de Stevenel ; les tissus mous apparaissent en bleu clair

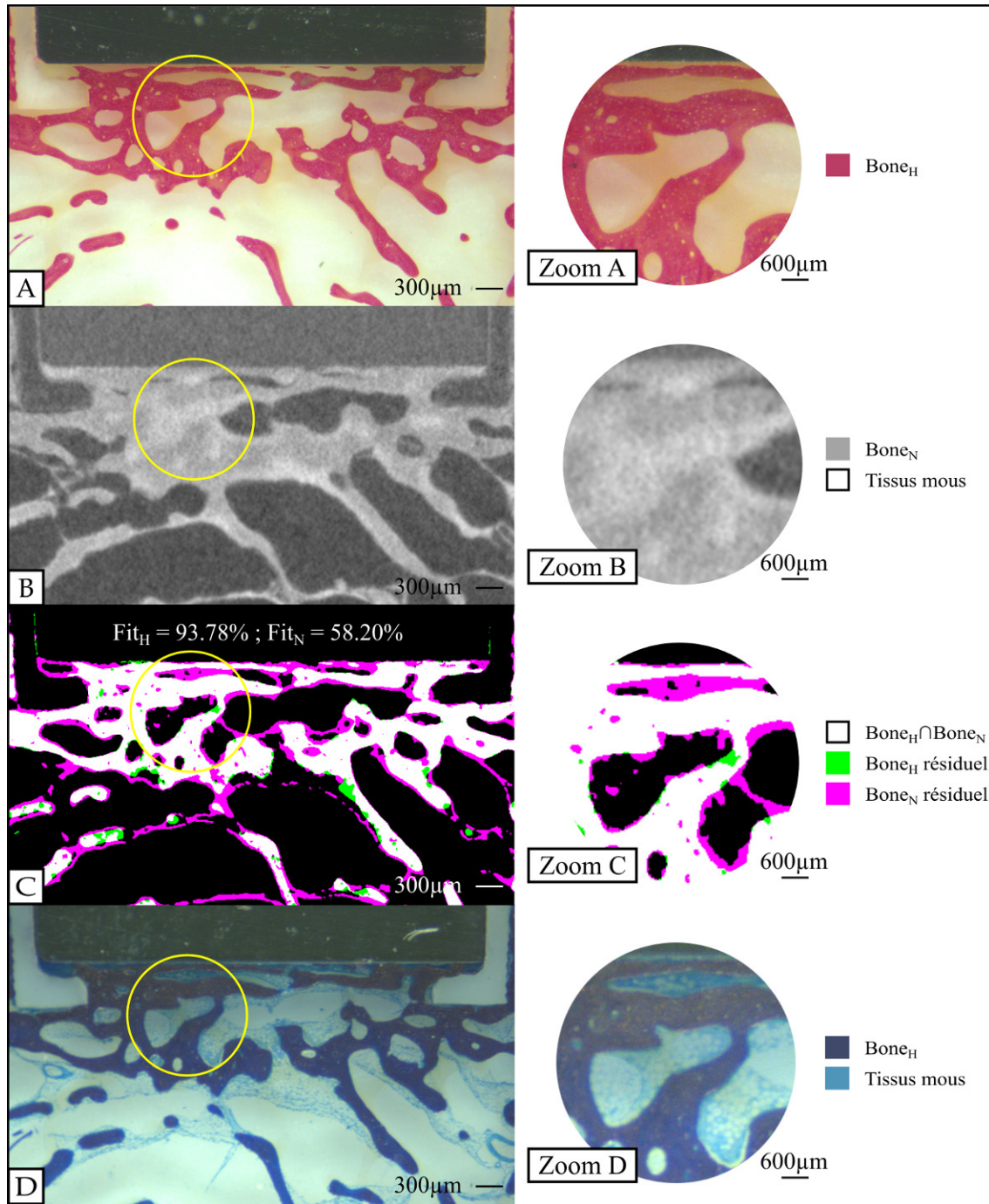


Figure 4.6 Comparaison d'une coupe histologique représentative et de sa coupe neutron correspondante, avec une quantité importante de tissus mous. A. Coupe histologique d'un échantillon après coloration Van Gieson, colorant les tissus minéralisés en rouge. B. Coupe neutron non segmentée correspondante à la coupe histologique en A, identifiée par le recalage d'image. C. Recalage de A et B avec les ratios de correspondance associés. D. Coupe histologique colorée au bleu de Stevenel ; les tissus mous apparaissent en bleu clair

La coloration au bleu de Stevenel (Figure 4.5-D & Figure 4.6-D) a identifié la présence de tissus mous, apparaissant comme des filaments (Figure 4.5-D) ou sous forme de tissus plus épais (Figure 4.6-D), dans des quantités variables selon les échantillons. Une comparaison visuelle entre les coupes histologiques colorées au bleu de Stevenel et leur coupe neutron correspondante (Figure 4.5-B & Figure 4.6-B) a révélé que, en plus des tissus minéralisés, la tomographie par neutrons est aussi sensible aux tissus mous, apparaissant en tant que pixels plus brillants. Les tissus résiduels dans l'image neutron segmentée (en fuchsia dans les Figure 4.5-C & Figure 4.6-C), laissés sans correspondance après la procédure de recalage d'image, ont également pu être associés visuellement à des tissus mous par comparaison avec les coupes histologiques colorées au bleu de Stevenel.

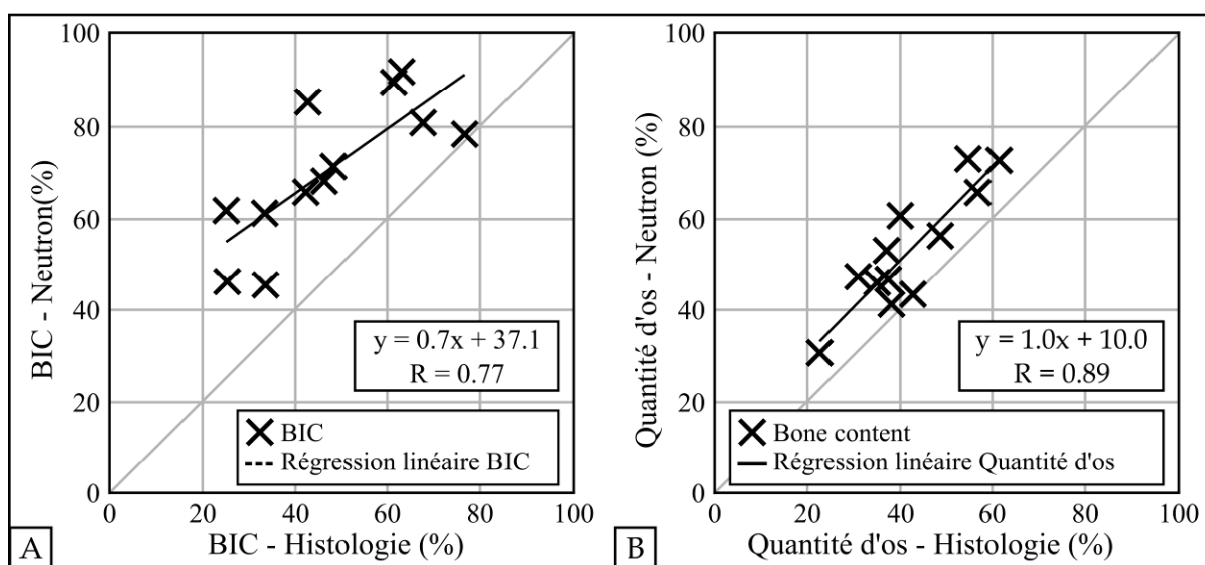


Figure 4.7 Régression linéaire entre les résultats histologiques et neutrons du BIC et de la quantité d'os dans la chambre osseuse

L'analyse par régression linéaire a indiqué une corrélation significative ($p < 0,01$) entre les deux modalités pour le ratio BIC ($R = 0,77$) et la quantité d'os ($R = 0,89$) (Figure 4.7). Les valeurs du ratio BIC et de la quantité d'os étaient systématiquement supérieures lorsque mesurées dans les images neutrons, comparativement aux coupes histologiques. Ce résultat est cohérent avec les tissus mous résiduels dans les coupes neutrons segmentées (en fuchsia dans les Figure 4.5-C & Figure 4.6-C) et avec les faibles ratios de correspondance neutrons. Les

valeurs du ratio BIC extraites des images histologiques et neutrons étaient de $47,2 \% \pm 16,8 \%$ et $70,6 \% \pm 15,5 \%$, respectivement. La quantité osseuse atteignait $42,2\% \pm 11,3\%$ dans les coupes histologiques et $53,1 \% \pm 13,0 \%$ dans les images neutrons.

4.2.3 Discussion

Des travaux récents ont montré que la tomographie par neutrons pouvait être une alternative prometteuse au μ CT à rayons X pour étudier l'interface os-implant, grâce à l'absence d'artéfacts métalliques dans les images (Isaksson et al., 2017; Le Cann et al., 2017). L'originalité de cette étude réside dans la comparaison de la tomographie par neutrons avec l'histologie, une technique de référence dans l'étude de l'interface os-implant. Un modèle standardisé d'implant avec une chambre osseuse a été analysé avec les deux techniques et une comparaison 1 : 1 a été réalisée après recalage des images obtenues avec ces deux modalités.

Le recalage d'images a été mené par la maximisation de la somme de deux ratios de correspondance, Fit_H et Fit_N , évaluant la correspondance des pixels entre les deux images, tout en variant la position et l'orientation relatives des deux images analysées. Les valeurs importantes du ratio de correspondance histologique (Fit_H) indiquaient qu'aucune meilleure correspondance contenant tout le tissu osseux inclus dans les images histologiques ne pouvait être trouvée dans les images neutrons volumiques. De plus, une corrélation significative a été obtenue entre les évaluations histologiques et neutrons du ratio BIC et de la quantité d'os dans la chambre osseuse. Ces résultats ont confirmé que la tomographie par neutrons peut être utilisée pour obtenir de l'information sur le tissu osseux dans les environs d'implants métalliques, comme précédemment observé (Isaksson et al., 2017; Le Cann et al., 2017).

Les valeurs plus faibles de ratio de correspondance neutron (Fit_N) ont indiqué que les images neutrons contenaient plus de tissus que l'histologie, et donc que la tomographie par neutrons est sensible à d'autres tissus, en plus du tissu osseux. En effet, les images volumiques neutrons présentaient des zones plus brillantes, identifiées comme des tissus mous par la coloration au bleu de Stevenel des coupes histologiques (Figure 4.6 & Figure 4.5). Par conséquent,

l'utilisation d'un unique coefficient de corrélation pour évaluer la qualité du recalage, comme c'est le cas dans la littérature (Geng et al., 2016; Turgeon et al., 2005; Vermandel et al., 2007), apparaît limitée pour attester des performances du recalage quand les images comparées contiennent des informations différentes.

La segmentation basée sur des seuils, utilisée pour retirer les tissus mous des images neutrons, n'a pas été complètement efficace, comme illustré par les tissus sans correspondances après le recalage (pixels fuchsia dans les Figure 4.5-C & Figure 4.6-C). Ceci peut être expliqué par le léger côté arbitraire permis dans le choix de la borne supérieure de l'intervalle de seuil de segmentation, proposé dans la méthode. Ces tissus résiduels ont conduit à une surestimation du ratio BIC (23%) et de la quantité d'os (11%) lorsque calculés à partir des images neutrons comparativement à l'histologie. La surestimation plus importante du ratio BIC peut être liée à la région plus petite (seulement la surface de l'implant) utilisée dans les calculs, contrairement à la quantité d'os qui était évaluée sur la totalité de la surface de la chambre osseuse de l'implant. La méthode de détermination du BIC en tomographie par neutrons est aussi limitée par la distinction entre l'os et l'implant, qui se traduit par l'épaisseur de la ZTI (environ 7 pixels répartis de part et d'autre du maximum de la dérivée). La résolution dans cette région d'intérêt a pu modifier la position de la ligne de calcul du BIC par rapport à la réalité, surestimant sa valeur par rapport à celle de l'histologie déterminée manuellement.

La tomographie par neutrons sur des perles biologiques a déjà pu mettre en évidence sa capacité à identifier du tissu formé de collagène (Micieli et al., 2018). Les tissus non minéralisés colorés avec le bleu de Stevenel dans les échantillons osseux pourraient correspondre à de la moelle osseuse et/ou du tissu fibreux (Rustom et al., 2016) et leur présence pourrait expliquer les régions additionnelles observées dans les images volumiques neutrons. En effet, la moelle osseuse a une concentration en atomes d'hydrogène élevée et les tissus fibreux sont faits de fibres de collagènes, deux composants rapportés comme ayant une atténuation des neutrons supérieure à celle de l'hydroxyapatite (Sołtysiak, Miśta-Jakubowska, Dorosz, Kosiński, & Fijał-Kirejczyk, 2018). Jusqu'à présent, la tomographie par neutrons n'a été utilisée que partiellement en recherche osseuse (Isaksson et al., 2017; Le Cann et al., 2017)

et la possibilité de séparer les tissus minéralisés et les tissus mous avec une haute résolution d'image n'a pas été clairement abordée. L'étude des tissus mous non minéralisés pendant l'ostéointégration est d'intérêt puisque la formation osseuse et le remodelage incluent une phase avec du tissu formé de collagène avant la minéralisation du tissu osseux (J.E. Davies, 1996), et la présence de tissu fibreux pendant la cicatrisation pourrait être un indicateur d'une ostéointégration échouée (Haïat, Wang, & Brunski 2014). Des travaux complémentaires sont nécessaires pour approfondir cette analyse, puisque la quantité de tissus mous est aussi dépendante du modèle animal et du site anatomique étudiés (Kuzyk & Schemitsch, 2011; Y. Li, Meng, & Yu, 2019).

Pour s'assurer d'une bonne qualité d'image par tomographie par neutrons, les échantillons ont été imagés dans un état sec, pour réduire l'atténuation associée à une forte concentration en atomes d'hydrogène (Schwarz et al., 2005), ainsi que pour maximiser la stabilité de l'image tout au long des acquisitions. Les précédentes études sur des spécimens semblables (Isaksson et al., 2017; Le Cann et al., 2017) ont proposé une immersion dans de l'eau lourde (D_2O ou oxyde de deutérium), où les atomes d'hydrogène ont été remplacés par leur isotope, le deutérium, qui a une plus faible atténuation aux neutrons. Cependant, un échange H_2O/D_2O efficace, ainsi qu'un contrôle adéquat du taux d'humidité reste difficile à atteindre, et obtenir systématiquement une qualité d'image adéquate est complexe (Le Cann et al., 2017). Imager des spécimens asséchés a donc permis dans ce contexte de s'assurer d'un contraste suffisant entre les structures des échantillons. Étant donné que l'assèchement des échantillons a condensé les tissus mous, leur contenu en atomes d'hydrogène s'est concentré en de plus petits volumes, ce qui a induit localement une plus forte atténuation des neutrons. Par conséquent, les tissus mous sont apparus avec des valeurs de gris plus élevées dans les images neutrons comparées à l'os. Cependant, la procédure de mise en résine PMMA pour l'histologie impliquait une phase de trempage dans des liquides, ce qui a affecté les tissus mous de façon hétérogène. En comparant les images neutrons aux coupes histologiques, certains tissus apparaissent plus épais avec la coloration au bleu de Stevenel (Figure 4.6-D), alors que d'autres ont conservé une structure similaire à celles des images neutrons (Figure 4.5-D). Des analyses plus approfondies sont nécessaires pour définir un protocole adéquat de préservation des tissus.

De plus, pour améliorer le contraste dans les images neutrons, des agents de contrastes pourraient être utilisés, tels que différents isotopes comme dans la recherche sur les plantes (Tötzke et al., 2017), ou des ions chargés tels que mis en place sur des batteries (Owejan et al., 2012).

La différenciation des tissus minéralisés et des tissus mous était aussi affectée par le ratio signal-bruit dans les images neutrons. Cela pourrait être amélioré autant du point de vue des paramètres d'acquisition que de l'analyse des images qui s'ensuit. Notamment, des stratégies d'analyses différentes pourraient être utilisées, comme l'analyse par double histogramme en tant que procédure alternative de recalage d'images (Stamati et al., 2020). Ces dernières années, de remarquables avancées de l'imagerie neutrons en ce qui concerne la résolution et la durée des scans ont été mises en place (Hussey, LaManna, Baltic, & Jacobson, 2017; Tengattini, Lenoir, Andò, Giroud, et al., 2020), et d'autres améliorations sont attendues dans le futur. Par exemple, par l'utilisation de détecteurs améliorés, la taille de pixel a été réduite à 7.5 μm , comparée aux 23 μm (Le Cann et al., 2017) ou aux 13.5 μm (Isaksson et al., 2017) des études précédentes.

En plus des possibles améliorations techniques discutées plus haut, l'étude se base sur quatre échantillons d'interface os-implant, provenant de seulement deux animaux. Néanmoins, le modèle d'implant pastille présentement utilisé a été validé dans de précédentes études, révélant une quantité d'os et un ratio BIC similaires calculés sur des coupes histologiques après 13 semaines de cicatrisation (Fraulob et al., 2020; Le Cann et al., 2020; Mathieu et al., 2011; Vayron et al., 2014). Par conséquent, il est cohérent d'estimer que les conclusions décrites dans cette étude puissent être généralisées malgré le fait qu'elle ne repose que sur deux animaux.

4.2.4 Conclusion

Dans cette étude, une comparaison quantitative de la tomographie par neutrons à l'analyse histologique a été réalisée pour examiner l'interface os-implant, dans l'objectif d'estimer la sensibilité des neutrons aux tissus biologiques. Cette étude a confirmé l'aptitude de la

tomographie par neutrons à obtenir des images à hautes résolutions du tissu osseux proche d'un implant métallique. Cette aptitude se fait sans les artéfacts typiques du μ CT à rayons X plus fréquemment utilisé, tout en gardant la nature non destructive et tridimensionnelle de cette technique. De plus, le potentiel de l'imagerie par neutrons pour identifier les tissus mous au sein de la matrice osseuse a été mis en évidence, ce qui pourrait être bénéfique pour l'étude de résultats clés de l'architecture osseuse. Des travaux complémentaires sont requis pour optimiser le contraste des images et améliorer la méthode adoptée pour différencier les tissus lors de l'emploi de la tomographie par neutrons, afin de compléter la recherche sur l'os et le phénomène d'ostéointégration. De telles améliorations pourraient être apportées par des techniques de préparation des échantillons adaptées, l'amélioration continue des procédures d'acquisitions, ainsi que le développement de nouvelles techniques d'analyse d'images.

4.3 Étude tridimensionnelle de l'interface os-implant

L'étude précédente a démontré que la tomographie par neutrons est une technique adaptée pour imager l'os proche d'un implant métallique. Bien que cette technique permette également de distinguer des tissus mous, il est possible de les différencier de l'os de façon suffisante pour obtenir des résultats architecturaux osseux représentatifs de l'échantillon, l'estimation de la quantité osseuse et du ratio BIC dans les images neutrons étant corrélée à celle des coupes histologiques. Ainsi, en appliquant le traitement d'images réalisé précédemment (chapitre 4.2.1.2, p.83), une analyse tridimensionnelle des 12 échantillons a pu être réalisée. Cette étude a pour objectifs de 1. évaluer l'effet d'un polymère PSSS sur l'ostéointégration, 2. déterminer un schéma de croissance osseuse au sein de la chambre osseuse.

4.3.1 Analyse des images neutrons

4.3.1.1 Traitement des images

Comme précédemment, les images volumiques neutrons ont été importés sur le logiciel Fiji (Schindelin et al., 2012) et l'interface os-implant a été alignée avec le plan XZ. Pour cela, à chaque orientation testée, l'image volumique était segmentée et la fraction volumique BA/TA

sur chaque coupe XZ calculée. L'étude de la dérivée selon Y du BA/TA mettait en évidence un maximum à l'interface, dont la valeur maximale était comparée aux orientations précédentes afin de la maximiser.

L'alignement appliqué sur les images volumiques brutes des douze échantillons, les images ont été filtrées (filtre 3D Moyen, rayon de 2 pixels – module 3D ImageJ Suite (Ollion et al., 2013)), segmentées selon l'intervalle de segmentation défini au chapitre 4.2.1.2 (p.83) (135 ± 3 à 190, images 8-bit), puis les opérations binaires ouvert et fermé, combinaisons d'érosions et de dilations, ont été appliquées sur les trois directions de l'espace.

4.3.1.2 Calcul du BIC et de la fraction volumique (BV/TV)

Comme pour l'étude en 2D (chapitre 4.2.1.5, p.86), la valeur du ratio BIC a été calculée à partir de l'estimation de la zone de transition à l'interface (ZTI). Cette zone, centrée sur le maximum de la dérivée, débute à la première coupe détectant de l'os et se termine par la coupe de BIC. L'intervalle qui sépare la première ligne contenant de l'os et le maximum était appliqué après la position de ce dernier pour localiser la coupe du ratio BIC. La valeur du BA/TA dans la chambre osseuse à cette coupe XZ était associée au ratio BIC.

La fraction volumique osseuse BV/TV était aussi calculée après définition du volume de la chambre. Ce volume était délimité par la ligne de BIC et les extrémités de la couronne de PTFE. La quantité d'os contenue dans ce volume était alors divisée par le nombre de pixels contenus dans ce volume pour déterminer le BV/TV.

Par la suite, le volume de chambre a été divisé en deux volumes concentriques (Cœur et Bord) et deux volumes superposés (Proche Implant (P-I) et Fin de Chambre (F-C)). La quantité d'os était calculée dans chacun de ces sous-volumes et divisée par la quantité d'os totale dans la chambre osseuse, calculant ainsi la répartition d'os par zones, notée %BV.

4.3.1.3 Analyses statistiques

Les valeurs de BV/TV et de BIC ont été comparés entre les groupes Contrôle et Polymère avec le test non paramétrique de Wilcoxon apparié, et entre les sites anatomiques d'implantation, fémurs et tibias, avec le test de Wilcoxon pour échantillons indépendants. Ces analyses statistiques (Wilcoxon apparié Contrôle/Polymère, et Wilcoxon indépendant Fémur/Tibia) ont aussi été appliquées pour les valeurs de répartition de l'os (%BV) dans chaque sous-région de la chambre osseuse (Cœur, Bord, P-I et F-C) et pour la différence de %BV entre les zones Cœur et Bord et les zones P-I et F-C. Un test de Wilcoxon apparié a également été appliqué sur les valeurs de %BV entre les groupes Cœur et Bord et les groupes P-I et F-C sans distinction entre les zones anatomiques ou la présence de polymère sur l'implant. Dans tous les tests réalisés, le niveau de significativité était fixé à $p=0,05$ et les calculs étaient réalisés sur le logiciel R (R Development Core Team, 2005).

4.3.2 Résultats

Douze échantillons ont été considérés dans cette étude : 4 échantillons de fémur et 8 échantillons de tibia, avec une quantité égale d'échantillons contrôle et d'échantillons polymère dans chaque groupe (soit 6 échantillons contrôle ou polymère).

Aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes Contrôle et Polymère pour les valeurs de BV/TV et de BIC ($p = 0,16$) (Figure 4.8). Une différence significative a toutefois été détectée entre les groupes Fémurs et Tibia pour le BV/TV, avec une quantité d'os plus importante pour les échantillons de fémur (Figure 4.8).

La zone de transition à l'interface, ZTI, utilisée pour détecter la coupe de BIC à partir de la première coupe XZ détectant du tissu osseux dans la chambre, avait une épaisseur de $7,2 \pm 1,0$ (intervalle 6 à 8 pixels, taille de pixel $7,5 \mu\text{m}$) sur les 12 échantillons.

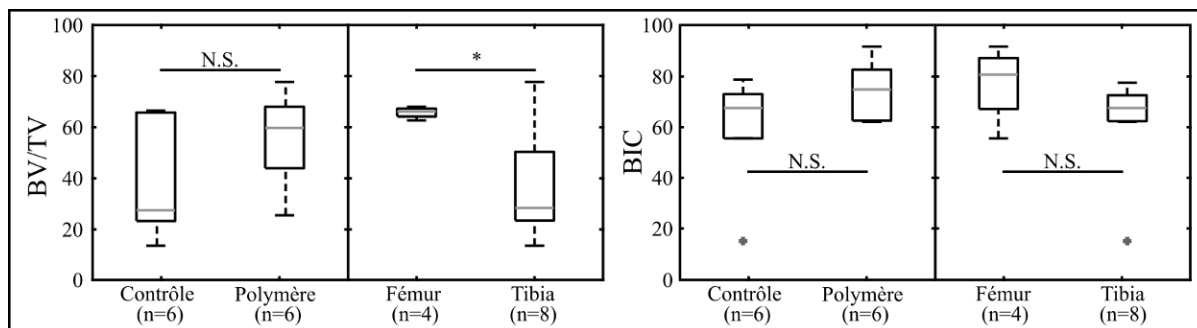


Figure 4.8 Valeurs de BIC et de BV/TV entre les groupes Contrôle & Polymère et les groupes Fémur & Tibia

Une différence significative a été mesurée pour la répartition de l'os dans la chambre osseuse pour les 12 échantillons (%BV, Figure 4.9). Les résultats présentent une quantité d'os significativement plus importante sur les bords de la chambre osseuse et proche de l'implant qu'au cœur ou sur la périphérie de la chambre. Toutefois, aucune différence significative n'a été trouvée lorsque les quantités d'os par zones ont été comparées entre les groupes Contrôle/Polymère ou Fémur/Tibia. La différence de quantité d'os entre les zones Bord et Cœur et les zones P-I et F-C n'ont pas non plus montré de différence significative quand les données sont réparties entre les groupes Contrôle/Polymère et Fémur/Tibia.

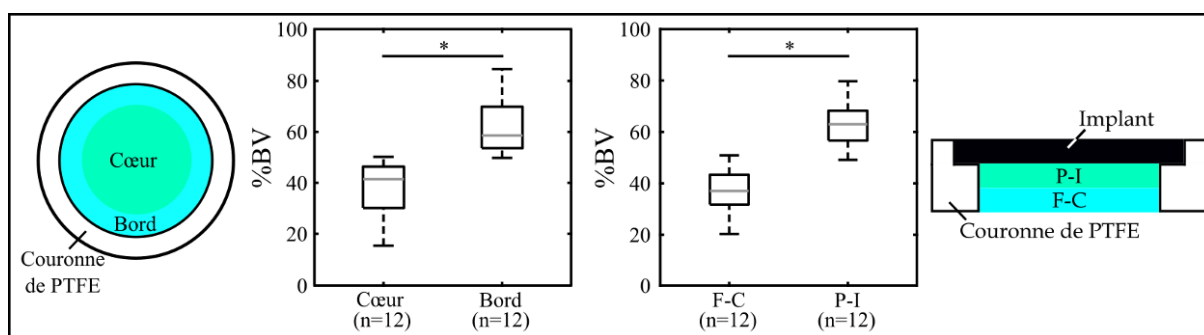


Figure 4.9 Répartition du volume osseux dans la chambre osseuse (P-I : Proche de l'implant, F-C : Fin de chambre)

4.3.3 Discussion

À travers cette étude, douze échantillons correspondant au modèle animal décrit dans le chapitre 4.1, p.80, ont été analysés par tomographie par neutrons pour mettre en évidence la répartition anatomique du tissu osseux comparativement à l'implant et l'effet de l'utilisation d'un revêtement polymère sur cette même répartition.

Deux répartitions de la quantité d'os dans la chambre ont été évaluées : l'une considérant une répartition horizontale Bord/Centre et l'autre, une répartition verticale Proche de l'implant/Fin de Chambre (P-I/F-C). Dans les deux cas, les résultats ont montré une quantité d'os significativement supérieure dans les zones en contact avec une surface synthétique (couronne de PTFE ou implant), c'est-à-dire sur le bord de la chambre et proche de l'implant. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus à partir de coupes histologiques (Fraulob et al., 2020). Par l'étude d'échantillons tibiaux utilisant le même modèle d'implant avec chambre osseuse, Fraulob *et al.* (Fraulob et al., 2020) ont mis en évidence une différence significative de la quantité d'os (BA/TA) entre les zones de la chambre osseuse lorsque la cicatrisation était relativement avancée (13 semaines). Pareillement, Le Cann *et al.* (Le Cann et al., 2020) ont démontré une quantité d'os plus importante au contact des surfaces de la chambre osseuse, plus particulièrement aux coins formés par la couronne de PTFE et l'implant. Cette observation a pu être menée sur 8 coupes histologiques (8 échantillons dont 4 à 7 semaines et 4 à 13 semaines de cicatrisation) et sur 2 échantillons (7 et 13 semaines) étudiés par synchrotron (rayons X). Cette répartition osseuse peut être expliquée par des phénomènes liés à l'ostéogenèse de contact (Han & Shen 2015; Kuzyk & Schemitsch 2011). Cette croissance osseuse se caractérise par une phase d'ostéoconduction pour amener les cellules osseuses au contact des surfaces synthétiques et y former une matrice temporaire de tissus, qui sera ensuite minéralisée (John E. Davies, 2003; Kuzyk & Schemitsch, 2011). Toutefois, Le Cann *et al.* (Le Cann et al., 2020) rapporte que la taille des cristaux d'hydroxyapatite, mesurée par la technique SAXS (« *Small-Angle X-ray Scattering* »), est plus importante proche de l'os mature situé en dehors de la chambre osseuse que proche de l'implant. Cette observation permet de mettre en évidence une ostéogenèse à distance, qui correspond à de la formation

osseuse à partir de l'os mature. Ainsi, l'ostéointégration de la chambre osseuse se ferait par la combinaison de l'ostéogenèse de contact et l'ostéogenèse à distance (Han & Shen, 2015; Le Cann et al., 2020), avec une prédominance de l'ostéogenèse de contact.

L'utilisation d'un revêtement polymère sur les implants n'a pas montré de différence significative par rapport aux implants contrôle pour la quantité d'os dans la chambre (BV/TV) et ses sous-régions (%BV) ou pour la quantité d'os en contact de l'implant (BIC). Le polymère poly-(styrène sulfonates) de sodium (Chouirfa et al., 2017a, 2017b) a pour objectif d'inhiber la prolifération bactérienne dans la zone d'implantation, notamment le staphylocoque doré, dont l'infection est l'une des causes principales d'échec d'implantation (Alcheikh et al., 2013; Anagnostou et al., 2006; Skovdal et al., 2018). Des tests *in vitro* (Chouirfa et al., 2017a) ont révélé que le polymère PSSS était non cytotoxique pour les cellules osseuses humaines et une prolifération cellulaire similaire aux implants contrôles a été remarquée pendant la première semaine de culture. De plus, les résultats ont montré une production en ATP (molécule énergétique) et en calcium plus importante après 25 jours de culture pour le groupe avec polymère, suggérant que le polymère PSSS accélérerait la différenciation des cellules et la minéralisation de la matrice osseuse. Le fait qu'aucune différence significative n'ait été observée après 10 semaines de cicatrisation *in vivo* sur des lapins pourrait s'expliquer par la différence de temps de développement accordé au tissu osseux comparativement à la littérature. En effet, il est possible que le temps de cicatrisation soit trop avancé dans la présente étude pour mettre en évidence un effet du polymère PSSS sur l'ostéointégration. De plus, cette étude utilise un nombre réduit d'échantillons par groupes (6 échantillons).

L'étude de la fraction volumique osseuse (BV/TV) dans la chambre de l'implant a montré une disparité significative entre les groupes Tibia et Fémur, bien que cette différence n'apparaisse pas dans la répartition de l'os dans la chambre (%BV). Le nombre d'échantillons entre les deux groupes est différent (4 échantillons de fémurs, 8 échantillons de tibia) ce qui vient limiter les conclusions pouvant être tirées de ces résultats. Toutefois, l'utilisation de deux sites anatomiques, fémur distal et tibia proximal, a potentiellement pu impliquer des tissus osseux différents. En effet, les images par tomographie par neutrons mettent en évidence que les

échantillons tibiaux présentaient de l'os cortical tandis que les échantillons de fémurs contenaient de l'os trabéculaire (Figure 4.10). Le type de tissu pourrait expliquer la différence de comportement entre les zones anatomiques. En effet, l'os trabéculaire est rapporté comme ayant une croissance plus rapide que l'os cortical, sa morphologie permettant un recrutement plus facile des cellules osseuses (John E. Davies 2003; Shah, Thomsen, & Palmquist 2019).

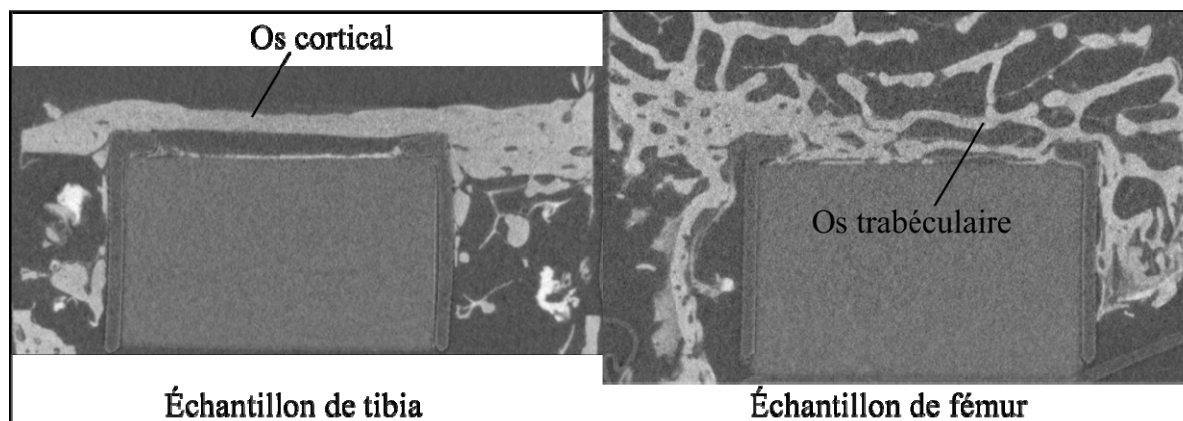


Figure 4.10 Identification du type d'os dans les images volumiques neutrons

Cette étude est la première qui analyse un modèle d'implant pourvu d'une chambre osseuse par tomographie par neutrons, conduisant à une observation tridimensionnelle de l'os nouvellement formé au contact d'un implant. La comparaison des mesures par tomographie par neutrons à celles de l'histologie (chapitre 4.2, p.82) a montré que la tomographie par neutrons est aussi sensible aux tissus mous, affectant ainsi les résultats architecturaux (BIC et BV/TV). Après une segmentation adaptée permettant de ne pas prendre en compte une certaine partie des tissus mous, une forte corrélation a été mise en évidence entre la quantité d'os mesurée par histologie et celle évaluée par tomographie par neutrons, et ce pour chaque groupe d'échantillons étudié (Polymère, Contrôle, Fémur ou Tibia). Ainsi, il est pertinent de considérer que les mesures de BIC et de BV/TV par tomographie par neutrons pour les douze échantillons de la cohorte sont représentatives de la quantité réelle d'os minéralisé dans les chambres osseuses, le traitement des images volumiques étant identique à celui utilisé dans l'étude comparative à l'histologie pour retirer les tissus mous.

Pour calculer le BIC, une Zone de Transition à l'Interface (ZTI) a été considérée avec une valeur moyenne de 7,2 pixels, soit environ 50 μm (pour une taille de pixel de 7,5 μm). Dans cette zone, il est difficile de distinguer l'os de l'implant. Cette zone de transition est donc associée à la résolution effective de la tomographie par neutrons à l'interface os-implant et dépend de plusieurs paramètres. Tout d'abord, on peut citer la résolution globale de la tomographie par neutrons qui relève des paramètres d'imagerie utilisés pour les acquisitions et de la méthode de traitement des images. Cette résolution a pu être estimée avec une étoile de Siemens (Trtik & Lehmann, 2016) à environ 20 μm , à partir du nombre de pixels (multiplié par la taille de pixel – 7,5 μm) comptés entre deux lames blanches, une fois l'étoile segmentée (Figure 4.11). Toutefois, cette résolution, mesurée seulement en 2D, correspond à des conditions idéales d'acquisitions, avec l'objet parfaitement au centre de la zone d'acquisition. La ZTI est aussi affectée par l'absorption et la diffraction des neutrons sur les tissus rencontrés, modifiant ainsi la valeur obtenue avec l'étoile de Siemens. De plus, la méthode de calcul de cette zone est fortement dépendante de la précision de l'alignement de l'interface. Celle-ci a été réalisée à partir de la détection d'un maximum dans la dérivée de BA/TA selon l'axe Y et correspondant à l'interface. La détermination de cette position repose sur deux hypothèses majeures : 1) une répartition homogène de l'os sur toute la surface de l'implant et 2) une répartition de l'os relativement homogène dans la chambre. Ces hypothèses ont pu être vérifiées lors de l'étude histologique de quatre échantillons de la cohorte, qui ont pu mettre en évidence la présence d'os à chaque hauteur de chambre, notamment au contact avec l'implant (BIC). Toutefois, au sein d'une seule image 2D, il est possible qu'aucun os ne soit présent dans certaines régions (comme illustré à la Figure 4.12). Dans ce cas, deux maximums sont alors détectés dans la courbe de la dérivée du BA/TA (ici calculé sur chaque ligne de l'image 2D) et une intervention manuelle est alors nécessaire pour bien localiser l'interface os-implant.

L'étude de la ZTI permet d'évaluer la capacité de la tomographie par neutrons à imager des tissus comparativement à d'autres techniques d'imagerie, notamment le μCT à rayons X. Les études de l'interface os-implant par rayons X rapportent des artéfacts dans le tissu osseux jusqu'à 60 μm de l'implant (J. Y. Li et al., 2014), les structures pouvant être affectées dans un rayon de 200 μm (Bernhardt et al., 2004; Vandeweghe et al., 2013). La ZTI, quant à elle, est

répartie de part et d'autre de l'interface, l'emplacement de cette dernière pouvant être assimilée au maximum de la dérivée de BA/TA. Dans cette zone, on peut considérer que l'implant et l'os sont indissociables l'un de l'autre, amenant à une mesure du BIC au-delà de la ZTI, afin de garantir que l'implant n'ait pas influencé les données. Considérant la position de l'interface os-implant au centre de la ZTI, seuls 25 μm de hauteur d'os peuvent être considérés comme impactés par l'implant, soit deux fois moins qu'au μCT . Notons que les propriétés de l'interface os-implant à une distance de 200 μm autour de l'interface sont précisément les éléments les plus importants pour la réussite chirurgicale (Haïat et al., 2014).

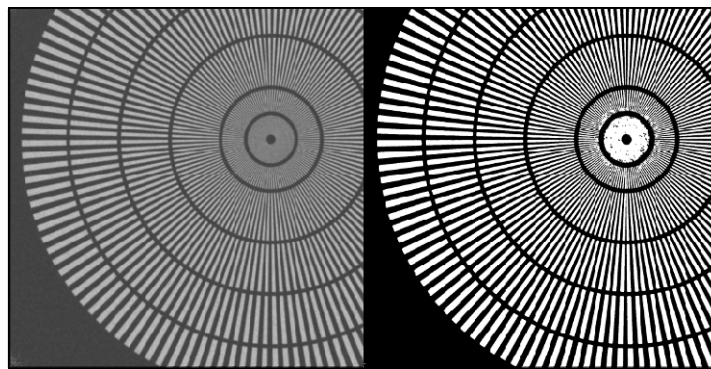


Figure 4.11 Étoile de Siemens brute (à gauche) et segmentée (à droite) pour mesurer la résolution du scan neutron

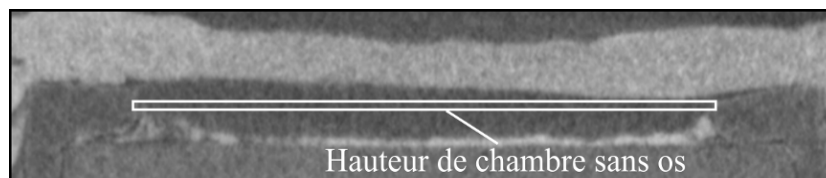


Figure 4.12 Répartition de l'os dans une coupe 2D de la chambre osseuse d'un échantillon

4.3.4 Conclusion

La tomographie par neutrons est une technique d'imagerie qui présente de forts potentiels pour l'analyse de l'interface os-implant, notamment par sa qualité d'image et l'absence d'artéfacts en présence d'implants métalliques. La visualisation tridimensionnelle de l'os au contact avec

l'implant a permis de confirmer une répartition de l'os au sein de la chambre osseuse utilisée cohérente avec de l'ostéointégration de contact. De futures études pourraient exploiter cette technologie pour étudier des géométries plus complexes d'implants (prothèses de hanche, de genou, *etc.*), pour lesquelles les rayons X causeraient de forts artéfacts métalliques sur les images. Ainsi, des essais de traction de cupules de prothèses de hanche pourraient être suivis par corrélation d'images comme cela a pu être fait sur des vis (Le Cann et al., 2017).

CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE

5.1 Originalité des travaux proposés

Ce projet de thèse s'articule autour de la caractérisation du remodelage osseux, notamment dans un contexte d'ostéointégration, en fonction de l'environnement du tissu osseux. Deux approches complémentaires ont été menées, l'une mettant en place une stratégie d'étude *ex vivo* de l'os, et la seconde analysant l'interface os-implant par une technique nouvelle dans l'étude de l'interface os-implant.

La méthodologie *ex vivo* est une technique d'étude du tissu osseux encore peu employée, comparativement à l'*in vivo* ou l'*in vitro*, bien qu'elle permette l'étude d'échantillon osseux de grande taille (1 cm³). Les quelques études la mettant en œuvre se sont principalement intéressées à l'effet de la stimulation mécanique sur le remodelage osseux intervenant sur les trois à quatre premières semaines de culture. Afin d'approfondir ce champ de recherche, ce projet de thèse s'est intéressé à développer une telle approche au sein des laboratoires de l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal. Il a notamment pu mettre en évidence la possibilité d'étudier des échantillons osseux sur une période plus longue (10 semaines). En plus des indicateurs biologiques du milieu de culture, le bioréacteur conçu dans ce projet permet l'étude des échantillons osseux sous de multiples modalités, comme l'analyse μ CT utilisée dans cette thèse, ou encore la corrélation d'images employée dans la thèse d'Annie LEVASSEUR (ÉTS) (Levasseur, 2019).

Parallèlement, l'utilisation de la tomographie par neutrons dans cette thèse a mis en évidence les capacités de cette technique à imager et analyser le tissu osseux dans un contexte d'ostéointégration. Encore peu accessible, l'utilisation de cette technique est récente. Par cette thèse, il a été démontré que cette technique est fiable dans sa détection du tissu osseux, notamment proche d'un implant, et a révélé une répartition osseuse cohérente avec de l'ostéointégration de contact.

5.2 Limites du projet

Plusieurs limites méritent d'être mentionnées.

Tout d'abord, bien que des travaux conséquents aient été réalisés pour mener à bien une culture *ex vivo*, les résultats obtenus restent limités. À la lumière des quatre cultures effectuées et des deux thèses de doctorat employées, cette technique s'est révélée complexe à mettre en place. Cela explique d'ailleurs le peu d'études utilisant cette méthode comparativement aux études *in vivo*.

La méthodologie *in vivo* nécessite de grosses infrastructures telles qu'une salle opératoire et une animalerie pour mener à bien les expérimentations animales. Malgré le coût de ces infrastructures, en plus de celui des animaux étudiés, la méthodologie *in vivo* constitue l'un des piliers de la recherche biomédicale, ce qui favorise son utilisation. La recherche *ex vivo*, de son côté, nécessite, elle aussi, une salle d'opération afin d'extraire les échantillons osseux de l'animal (et les mettre en forme au besoin). À cela s'ajoute préférentiellement une chambre stérile pour manipuler les bioréacteurs avec le moins de risque de contamination extérieure, ainsi qu'une batterie de matériels relatifs à la culture *in vitro* (incubateur, hotte biologique, etc.). En effet, la grande différence avec le modèle *in vivo* est que le système immunitaire des échantillons *ex vivo* est inexistant. Il convient donc de veiller à préserver l'intégrité des échantillons au risque de les perdre (due à une contamination bactérienne ou fongique). Cette condition est d'autant plus difficile à respecter lorsqu'une stimulation mécanique est mise en œuvre lors de la culture, puisque les manipulations des bioréacteurs et, par conséquent, les risques de contamination sont augmentés.

Toutefois, autant dans le cas de la recherche *ex vivo* que celui des études *in vivo*, la mise en place d'une étude expérimentale de l'ostéointégration reste une tâche difficile et délicate. Outre un temps de cicatrisation et de culture de plusieurs semaines, le recrutement des spécimens et les multiples analyses des échantillons sont également longs (s'étendant de quelques semaines à plusieurs mois). À titre d'exemple, pour des raisons éthiques, les vaches sacrifiées pour les

cultures *ex vivo* de ce projet de thèse ont été recrutées à l'Hôpital Vétérinaire de Saint-Hyacinthe (Canada) et seules les vaches qui ne pouvaient pas être sauvées de leur blessure ou maladie étaient éligibles. Dans l'étude présentée dans cette thèse, la vache a été sacrifiée, car elle ne pouvait plus se lever à cause d'une blessure. Dans ce contexte, la disponibilité d'un nouveau spécimen était imprévisible pouvant mener à une attente de plusieurs semaines. Dans ce même contexte, l'accessibilité à la tomographie par neutrons était limitée. Réservés plusieurs mois à l'avance, les temps d'utilisation disponibles étaient courts avec des temps d'acquisition longs, ne laissant ainsi pas de place pour des erreurs de manipulation.

5.3 Perspectives et recommandations

À l'issue de ce projet, de nombreuses perspectives de recherches peuvent être amenées.

L'étude menée *in vivo* a pu tester l'efficacité d'un polymère PSSS dans la promotion de l'ostéointégration. La comparaison des résultats obtenus avec la littérature suggère que l'effet du polymère doit se faire à un stade moins avancé de l'ostéointégration, pour un temps de cicatrisation plus court. Ainsi, d'autres études sur le sujet pourraient s'intéresser au développement du tissu osseux dans une chambre osseuse avec ce polymère à différents stades de cicatrisation. Parallèlement, l'étude de l'effet de la stimulation mécanique sur l'ostéointégration est toujours un sujet d'étude important, ainsi que le développement des différents tissus osseux (os trabéculaire ou cortical) au contact de l'implant.

La méthodologie *ex vivo* est une technique qui présente certains atouts pour évaluer ces facteurs. La capacité de cette technique à isoler des échantillons dans un environnement entièrement contrôlé, autant au niveau biologique que mécanique, est non négligeable. De plus, la technique peut être utilisée sur plusieurs échantillons provenant d'un même animal, permettant l'évaluation de certains facteurs comme le temps de cicatrisation ou l'environnement biologique (diabète, ménopause, ou autre stimulation biologique), en s'affranchissant de la variabilité interspécimen. En effet, l'étude *in vivo* de ces facteurs

nécessite d'augmenter le nombre d'animaux. Enfin, la culture *ex vivo* est compatible avec du tissu humain qui peut être prélevé par biopsies (C. Davies et al., 2006).

Dans le cadre de cette thèse, les travaux sur la méthodologie *ex vivo* ont permis de bâtir des protocoles et une expérience importante au sein de l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal et l'ÉTS pour mener à bien de nouvelles cultures qui pourront mener à des conclusions pertinentes sur le développement du tissu osseux. Cette méthodologie découlant directement des cultures *in vitro*, une expérience en culture cellulaire est fortement recommandée pour de futures études *ex vivo*, afin de réduire les erreurs de manipulation et donc les risques de contamination.

Concernant l'étude de la microstructure du tissu osseux autour d'un implant, la tomographie par neutrons est une technique qui a fait ses preuves en recherche osseuse. La diversité de ses applications et des approches employées et employables (combinaison avec les rayons X, utilisation d'agents de contrastes, *etc.*) ouvre de nouvelles perspectives pour étudier le tissu osseux. De plus, la sensibilité de la technique aux tissus mous pourrait, potentiellement, apporter de nouvelles clés dans la compréhension des phénomènes d'ostéointégration et de remodelage osseux, puisque ces tissus sont aussi impliqués dans ces phénomènes (matrice de collagène en cours de minéralisation, moelle osseuse, *etc.*).

Enfin, cette thèse a fait l'objet d'une cotutelle entre l'École de technologie supérieure, au Canada et l'Université Paris-Est et le CNRS en France, renforçant les liens entre les deux pays dans la collaboration en recherche dans un contexte international, notamment dans le cadre de l'IRP (International Research Project) LAFCUS.

CONCLUSION

L'ostéointégration est un phénomène complexe qui nécessite une étude approfondie du tissu osseux autant du point de vue de la création des échantillons os-implant que dans la caractérisation de ceux-ci.

Les approches mises en place pour créer les interfaces os-implants sont cruciales pour définir les facteurs d'étude susceptibles d'influencer l'ostéointégration (comme la stimulation mécanique), ou ceux requérant une étude plus poussée de leur impact sur ce phénomène (tels que l'état de surface des implants). Dans ce cadre, un bioréacteur à perfusion a été développé, afin d'étudier le tissu osseux et son interaction avec l'environnement dans un milieu contrôlé. Par cette étude, il a été mis en évidence que malgré sa survie cellulaire, le tissu osseux nécessite des stimuli mécaniques ou chimiques pour réagir dans un contexte *ex vivo*, *i.e.* qu'il est possible en *ex vivo* de contrôler la manière dont le tissu osseux sera amené à réagir.

L'imagerie (μ CT à rayons X, histologie) est une technique de caractérisation du tissu osseux très employée dans la littérature. Toutefois, elle reste fortement limitée pour étudier le tissu proche d'un implant métallique. Ce projet a permis de montrer que la tomographie par neutrons est une technologie adaptée pour analyser l'interface os-implant en recherche, notamment par comparaison avec l'histologie, une référence dans le domaine. Grâce cette technique, il a été mis en évidence que l'ostéointégration des implants *in vivo* correspondait à de l'ostéointégration de contact. Par ailleurs, il a été démontré que la tomographie par neutrons était sensible à la présence de tissus mous dans les échantillons, avec la possibilité de les différencier du tissu osseux.

Ainsi, ce projet de thèse a révélé de nouvelles perspectives de recherche sur l'ostéointégration et le remodelage osseux et apporté de nouvelles clés de compréhension du tissu osseux et des phénomènes régissant sa croissance.

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abubakar, A. A., Noordin, M. M., Azmi, T. I., Kaka, U., & Loqman, M. Y. (2016). The use of rats and mice as animal models in ex vivo bone growth and development studies. *Bone & Joint Research*, 5(12), 610–618. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.512.BJR-2016-0102.R2>
- Aiyangar, A. K., Vivanco, J., Au, A. G., Anderson, P. A., Smith, E. L., & Ploeg, H.-L. (2014). Dependence of Anisotropy of Human Lumbar Vertebral Trabecular Bone on Quantitative Computed Tomography-Based Apparent Density. *Journal of Biomechanical Engineering*, 136(9), 1–11. <https://doi.org/10.1115/1.4027663>
- Ajami, E., Mahno, E., Mendes, V. C., Bell, S., Moineddin, R., & Davies, J. E. (2014). Bone healing and the effect of implant surface topography on osteoconduction in hyperglycemia. *Acta Biomaterialia*, 10(1), 394–405. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.020>
- Alcheikh, A., Pavon-Djavid, G., Helary, G., Petite, H., Migonney, V., & Anagnostou, F. (2013). PolyNaSS grafting on titanium surfaces enhances osteoblast differentiation and inhibits Staphylococcus aureus adhesion. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(7), 1745–1754. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4932-3>
- Altman, A. R., Tseng, W.-J., de Bakker, C. M. J., Chandra, A., Lan, S., Huh, B. K., ... Liu, X. S. (2015). Quantification of skeletal growth, modeling, and remodeling by in vivo micro computed tomography. *Bone*, 81(1), 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.037>
- Anagnostou, F., Debet, A., Pavon-Djavid, G., Goudaby, Z., Hélarý, G., & Migonney, V. (2006). Osteoblast functions on functionalized PMMA-based polymers exhibiting Staphylococcus aureus adhesion inhibition. *Biomaterials*, 27(21), 3912–3919. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.004>
- Anchieta, R. B., Baldassarri, M., Guastaldi, F., Tovar, N., Janal, M. N., Gottlow, J., ... Coelho, P. G. (2014). Mechanical Property Assessment of Bone Healing around a Titanium-Zirconium Alloy Dental Implant. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16(6), 913–919. <https://doi.org/10.1111/cid.12061>
- Anisi, F., Salehi-Nik, N., Amoabediny, G., Pouran, B., Haghighipour, N., & Zandieh-Doulabi, B. (2014). Applying shear stress to endothelial cells in a new perfusion chamber: hydrodynamic analysis. *Journal of Artificial Organs*, 17(4), 329–336. <https://doi.org/10.1007/s10047-014-0790-0>
- Anselme, K., & Bigerelle, M. (2014). On the relation between surface roughness of metallic substrates and adhesion of human primary bone cells. *Scanning*, 36(1), 11–20. <https://doi.org/10.1002/sca.21067>

- Barrett, J. F., & Keat, N. (2004). Artifacts in CT: Recognition and Avoidance. *RadioGraphics*, 24(6), 1679–1691. <https://doi.org/10.1148/rg.246045065>
- Barth, H. D., Zimmermann, E. A., Schaible, E., Tang, S. Y., Alliston, T., & Ritchie, R. O. (2011). Characterization of the effects of x-ray irradiation on the hierarchical structure and mechanical properties of human cortical bone. *Biomaterials*, 32(34), 8892–8904. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.013>
- Bauer, J. S., & Link, T. M. (2009). Advances in osteoporosis imaging. *European Journal of Radiology*, 71(3), 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2008.04.064>
- Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N. P., & Lindhe, J. (2003). De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical Oral Implants Research*, 14(3), 251–262. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.00972.x>
- Bernhardt, R., Scharnweber, D., Müller, B., Thurner, P., Schliephake, H., Wyss, P., ... Worch, H. (2004). Comparison of Microfocus- and Synchrotron X-ray Tomography for the Analysis of Osteointegration around Ti6Al4V Implants. *European Cells and Materials*, 7, 42–51. <https://doi.org/10.22203/eCM.v007a05>
- Biemond, J. E., Aquarius, R., Verdonchot, N., & Buma, P. (2011). Frictional and bone ingrowth properties of engineered surface topographies produced by electron beam technology. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 131(5), 711–718. <https://doi.org/10.1007/s00402-010-1218-9>
- Birmingham, E., Niebur, G. L., McNamara, L. M., & McHugh, P. E. (2016). An Experimental and Computational Investigation of Bone Formation in Mechanically Loaded Trabecular Bone Explants. *Annals of Biomedical Engineering*, 44(4), 1191–1203. <https://doi.org/10.1007/s10439-015-1378-4>
- Bissinger, O., Probst, F. A., Wolff, K.-D., Jeschke, A., Weitz, J., Deppe, H., & Kolk, A. (2017). Comparative 3D micro-CT and 2D histomorphometry analysis of dental implant osseointegration in the maxilla of minipigs. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(4), 418–427. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12693>
- Bonucci, E., & Ballanti, P. (2014). Osteoporosis—Bone Remodeling and Animal Models. *Toxicologic Pathology*, 42(6), 957–969. <https://doi.org/10.1177/0192623313512428>
- Bouet, G., Marchat, D., Cruel, M., Malaval, L., & Vico, L. (2015). In Vitro Three-Dimensional Bone Tissue Models: From Cells to Controlled and Dynamic Environment. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 21(1), 133–156. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0682>
- Bougas, K., Jimbo, R., Vandeweghe, S., Tovar, N., Baldassarri, M., Alenezi, A., ... Wennerberg, A. (2014). In Vivo Evaluation of a Novel Implant Coating Agent: Laminin-1. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16(5), 728–735. <https://doi.org/10.1111/cid.12037>

- Brown, G. N., Sattler, R. L., & Guo, X. E. (2016). Experimental studies of bone mechanoadaptation: bridging in vitro and in vivo studies with multiscale systems. *Interface Focus*, 6(1), 20150071. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2015.0071>
- Burca, G., Nagella, S., Clark, T., Tasev, D., Rahman, I. A., Garwood, R. J., ... Kelleher, J. F. (2018). Exploring the potential of neutron imaging for life sciences on IMAT, 272(3), 242–247. <https://doi.org/doi.org/10.1111/jmi.12761>
- Burghardt, A. J., Link, T. M., & Majumdar, S. (2011). High-resolution Computed Tomography for Clinical Imaging of Bone Microarchitecture. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 469(8), 2179–2193. <https://doi.org/10.1007/s11999-010-1766-x>
- Butler, D. L., Hunter, S. A., Chokalingam, K., Cordray, M. J., Shearn, J., Juncosa-Melvin, N., ... Jain, A. (2009). Using Functional Tissue Engineering and Bioreactors to Mechanically Stimulate Tissue-Engineered Constructs. *Tissue Engineering Part A*, 15(4), 741–749. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0292>
- Butz, F., Ogawa, T., Chang, T., & Nishimura, I. (2006). Three-dimensional bone-implant integration profiling using micro-computed tomography. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 21(5), 687–695. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17066629>
- Caraiani, C., Dong, Y., Rudd, A. G., & Dietrich, C. F. (2018). Reasons for inadequate or incomplete imaging techniques. *Medical Ultrasonography*, 20(4), 498. <https://doi.org/10.11152/mu-1736>
- Cekanova, M., Donnell, R., Bilheux, H., & Bilheux, J.-C. (2014). Neutron imaging: Detection of cancer using animal model. In *Proceedings of the 2014 Biomedical Sciences and Engineering Conference* (pp. 1–4). IEEE. <https://doi.org/10.1109/BSEC.2014.6867752>
- Chappuis, J., & El Banna, S. (2008). The role of bone cement in orthopaedic surgery. *Revue Medicale de Bruxelles*, 29(6), 546–551. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19202710>
- Chevallier, N., Anagnostou, F., Zilber, S., Bodivit, G., Maurin, S., Barrault, A., ... Rouard, H. (2010). Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials*, 31(2), 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.043>
- Chourifa, H., Evans, M. D. M., Castner, D. G., Bean, P., Mercier, D., Galtayries, A., ... Migonney, V. (2017a). Grafting of architecture controlled poly(styrene sodium sulfonate) onto titanium surfaces using bio-adhesive molecules: Surface characterization and biological properties. *Biointerphases*, 12(2), 02C418. <https://doi.org/10.1116/1.4985608>
- Chourifa, H., Evans, M. D. M., Castner, D. G., Bean, P., Mercier, D., Galtayries, A., ... Migonney, V. (2017b). SUPPLEMENTARY DATA - Grafting of architecture controlled poly(styrene sodium sulfonate) onto titanium surfaces using bio-adhesive molecules:

- Surface characterization and biological properties. *Biointerphases*, 12(2), 02C418. <https://doi.org/10.1116/1.4985608>
- Cowin, S. C. (2001). Bone mechanics Handbook - 2nd edition. *Bone Mechanics Handbook - 2nd Edition*, 2. [https://doi.org/10.1016/0268-0033\(90\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0268-0033(90)90036-6)
- Cui, X., Huang, C., Zhang, M., Ruan, C., Peng, S., Li, L., ... Pan, H. (2017). Enhanced osteointegration of poly(methylmethacrylate) bone cements by incorporating strontium-containing borate bioactive glass. *Journal of The Royal Society Interface*, 14(131), 20161057. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.1057>
- Damm, N. B., Morlock, M. M., & Bishop, N. E. (2015). Friction coefficient and effective interference at the implant-bone interface. *Journal of Biomechanics*, 48(12), 3517–3521. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.07.012>
- Dammak, M., Shirazi-Adl, A., Schwartz, M., & Gustavson, L. (1997). Friction properties at the bone-metal interface: Comparison of four different porous metal surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 35(3), 329–336. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19970605\)35:3<329::AID-JBM7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19970605)35:3<329::AID-JBM7>3.0.CO;2-J)
- David, V., Guignandon, A., Martin, A., Malaval, L., Lafage-Proust, M.-H., Rattner, A., ... Vico, L. (2008). Ex Vivo Bone Formation in Bovine Trabecular Bone Cultured in a Dynamic 3D Bioreactor Is Enhanced by Compressive Mechanical Strain. *Tissue Engineering Part A*, 14(1), 117–126. <https://doi.org/10.1089/ten.a.2007.0051>
- Davies, C., Jones, D., Stoddart, M., Koller, K., Smith, E., Archer, C., & Richards, R. (2006). Mechanically loaded ex vivo bone culture system “Zetos”: Systems and culture preparation. *European Cells and Materials*, 11, 57–75. <https://doi.org/10.22203/eCM.v011a07>
- Davies, J.E. (1996). In vitro modeling of the bone/implant interface. *The Anatomical Record*, 245(2), 426–445. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199606\)245:2<426::AID-AR21>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2<426::AID-AR21>3.0.CO;2-Q)
- Davies, John E. (2003). Understanding Peri-Implant Endosseous Healing. *Journal of Dental Education*, 67(8), 932–949. <https://doi.org/10.1002/j.0022-0337.2003.67.8.tb03681.x>
- De Smet, E., Jaecques, S. V. N., Wevers, M., Jansen, J. A., Jacobs, R., Sloten, J. Vander, & Naert, I. E. (2006). Effect of controlled early implant loading on bone healing and bone mass in guinea pigs, as assessed by micro-CT and histology. *European Journal of Oral Sciences*, 114(3), 232–242. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00355.x>
- Ding, M., Odgaard, A., & Hvid, I. (1999). Accuracy of cancellous bone volume fraction measured by micro-CT scanning. *Journal of Biomechanics*, 32(3), 323–326. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(98\)00176-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(98)00176-6)
- Doty, S. B. (1981). Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcified*

- Tissue International*, 33(1), 509–512. <https://doi.org/10.1007/BF02409482>
- Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39(2), 75–90. <https://doi.org/10.1023/A:1022913015916>
- Dudeck, J., Rehberg, S., Bernhardt, R., Schneiders, W., Zierau, O., Inderchand, M., ... Rammelt, S. (2014). Increased bone remodelling around titanium implants coated with chondroitin sulfate in ovariectomized rats. *Acta Biomaterialia*, 10(6), 2855–2865. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.01.034>
- Duyck, J., Vandamme, K., Geris, L., Van Oosterwyck, H., De Cooman, M., Vandersloten, J., ... Naert, I. (2006). The influence of micro-motion on the tissue differentiation around immediately loaded cylindrical turned titanium implants. *Archives of Oral Biology*, 51(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2005.04.003>
- El Askary, A. S., Meffert, R. M., & Griffin, T. (1999). Why Do Dental Implants Fail? Part II. *Implant Dentistry*, 8(3), 265–278. <https://doi.org/10.1097/00008505-199903000-00008>
- El Haj, A. J., & Cartmell, S. H. (2010). Bioreactors for bone tissue engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 224(12), 1523–1532. <https://doi.org/10.1243/09544119JEIM802>
- Elsayed, M. D. (2019). Biomechanical Factors That Influence the Bone-Implant-Interface. *Res Rep Oral Maxillofac Surg*, 3(1), 1–14. <https://doi.org/10.23937/2643-3907/1710023>
- Elter, P., Weihe, T., Lange, R., Gimsa, J., & Beck, U. (2011). The influence of topographic microstructures on the initial adhesion of L929 fibroblasts studied by single-cell force spectroscopy. *European Biophysics Journal*, 40(3), 317–327. <https://doi.org/10.1007/s00249-010-0649-0>
- Endres, S., Kratz, M., Wunsch, S., & Jones, D. B. (2009). Zetos: a culture loading system for trabecular bone. Investigation of different loading signal intensities on bovine bone cylinders. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 9(3), 173–183. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19724152>
- Eskelinen, A., Remes, V., Helenius, I., Pulkkinen, P., Nevalainen, J., & Paavolainen, P. (2006). Uncemented total hip arthroplasty for primary osteoarthritis in young patients: A mid-to long-term follow-up study from the Finnish Arthroplasty Register. *Acta Orthopaedica*, 77(1), 57–70. <https://doi.org/10.1080/17453670610045704>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Fortune Business Insights. (2019). Orthopaedic implants market size, share and industry analysis by product (joint reconstruction, spinal implants, trauma implants, dental

implants, orthobiologics and others), end-user (hospitals, orthopaedic clinics, ambulatory surgical centers and others). *Market Research Report*, 1–155.

Fraulob, M., Le Cann, S., Voumard, B., Yasui, H., Yano, K., Vayron, R., ... Haïat, G. (2020). Multimodal Evaluation of the Spatiotemporal Variations of Periprosthetic Bone Properties. *Journal of Biomechanical Engineering*, 142(12), 1–34. <https://doi.org/10.1115/1.4048399>

Frost, H. M. (1987). Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal. *The Anatomical Record*, 219(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/ar.1092190104>

Fuchsberger, A. (1988). Die schädigende temperatur bei der spanendem knochenbearbeitung. *Unfallchirurgie*, 14(4), 173–183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02770032>

Gao, X., Fraulob, M., & Haïat, G. (2019). Biomechanical behaviours of the bone–implant interface: a review. *Journal of The Royal Society Interface*, 16(156), 20190259. <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0259>

Gao, Y.-B., Liang, J.-X., Luo, Y.-X., & Yan, J. (2015). A tracer liquid image velocimetry for multi-layer radial flow in bioreactors. *Biomedical Engineering Online*, 14(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12938-015-0002-z>

Geng, H., Todd, N. M., Devlin-Mullin, A., Poologasundarampillai, G., Kim, T. B., Madi, K., ... Lee, P. D. (2016). A correlative imaging based methodology for accurate quantitative assessment of bone formation in additive manufactured implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(6), 112. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5721-6>

Gordeladze, J. O., Drevon, C. A., Syversen, U., & Reseland, J. E. (2002). Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85(4), 825–836. <https://doi.org/10.1002/jcb.10156>

Grant, J. A., Bishop, N. E., Götzén, N., Sprecher, C., Honl, M., & Morlock, M. M. (2007). Artificial composite bone as a model of human trabecular bone: The implant–bone interface. *Journal of Biomechanics*, 40(5), 1158–1164. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2006.04.007>

Guillaume, F., Le Cann, S., Tengattini, A., Törnquist, E., Falentin-Daudré, C., Albin Lomami, H., ... Haïat, G. (n.d.). Neutron microtomography to investigate the bone-implant interface – comparison with histological analysis. *Physics in Medicine and Biology*, 1–12.

Haïat, G., Wang, H.-L., & Brunski, J. (2014). Effects of Biomechanical Properties of the Bone–Implant Interface on Dental Implant Stability: From In Silico Approaches to the Patient’s Mouth. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16(1), 187–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-104854>

- Han, G., & Shen, Z. (2015). Microscopic view of osseointegration and functional mechanisms of implant surfaces. *Materials Science and Engineering: C*, 56, 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.053>
- Harada, S., & Rodan, G. a. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423(6937), 349–355. <https://doi.org/10.1038/nature01660>
- Henke, M., Junker, A., Neumann, K., Altmann, T., & Gladilin, E. (2019). Comparison and extension of three methods for automated registration of multimodal plant images. *Plant Methods*, 15(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0426-8>
- Holt, G. E., Halpern, J. L., Dovan, T. T., Hamming, D., & Schwartz, H. S. (2005). Evolution of an in vivo bioreactor. *Journal of Orthopaedic Research*, 23(4), 916–923. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.10.005>
- Huang, Q., Ouyang, Z., Tan, Y., Wu, H., & Liu, Y. (2019). Activating macrophages for enhanced osteogenic and bactericidal performance by Cu ion release from micro/nanotopographical coating on a titanium substrate. *Acta Biomaterialia*, 100, 415–426. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.030>
- Hunter, G. K., Kyle, C. L., & Goldberg, H. A. (1994). Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochemical Journal*, 300(3), 723–728. <https://doi.org/10.1042/bj3000723>
- Hussey, D. S., LaManna, J. M., Baltic, E., & Jacobson, D. L. (2017). Neutron imaging detector with 2 μm spatial resolution based on event reconstruction of neutron capture in gadolinium oxysulfide scintillators. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 866(May), 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.nima.2017.05.035>
- Iijima, M., Nakagaki, S., Yasuda, Y., Handa, K., Koike, T., Muguruma, T., ... Mizoguchi, I. (2013). Effect of immediate loading on the biomechanical properties of bone surrounding the miniscrew implants. *The European Journal of Orthodontics*, 35(5), 577–582. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjs055>
- Isaksson, H., Le Cann, S., Perdikouri, C., Turunen, M. J., Kaestner, A., Tägil, M., ... Tudisco, E. (2017). Neutron tomographic imaging of bone-implant interface: Comparison with X-ray tomography. *Bone*, 103, 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.07.022>
- Jahnke, A., Bott, C. C., Fonseca Ulloa, C. A., Jahnke, G. W., Rickert, M., Ishaque, B. A., & Ahmed, G. A. (2019). In vitro examination of the primary stability of three press-fit acetabular cups under consideration of two different bearing couples. *Medical Engineering & Physics*, 67, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2019.03.008>
- Jimbo, R., Anchieta, R., Baldassarri, M., Granato, R., Marin, C., Teixeira, H. S., ... Coelho, P.

- G. (2013). Histomorphometry and Bone Mechanical Property Evolution Around Different Implant Systems at Early Healing Stages. *Implant Dentistry*, 22(6), 596–603. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e31829f1f4b>
- Jing, D., Yan, Z., Cai, J., Tong, S., Li, X., Guo, Z., & Luo, E. (2018). Low-1 level mechanical vibration improves bone microstructure, tissue mechanical properties and porous titanium implant osseointegration by promoting anabolic response in type 1 diabetic rabbits. *Bone*, 106, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.10.001>
- Jones, D. B., Broeckmann, E., Pohl, T., & Smith, E. L. (2003). Development of a mechanical testing and loading system for trabecular bone studies for long term culture. *European Cells and Materials*, 5, 48–60. <https://doi.org/10.22203/eCM.v005a05>
- Kardjilov, N., Manke, I., Woracek, R., Hilger, A., & Banhart, J. (2018). Advances in neutron imaging. *Materials Today*, 21(6), 652–672. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2018.03.001>
- Katsimbri, P. (2017). The biology of normal bone remodelling, (June), 1–5. <https://doi.org/doi.org/10.1111/ecc.12740>
- Katunar, M. R., Gomez Sanchez, A., Santos Coquillat, A., Civantos, A., Martinez Campos, E., Ballarre, J., ... Cere, S. (2017). In vitro and in vivo characterization of anodised zirconium as a potential material for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 75, 957–968. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.139>
- Keaveny, T. M., Morgan, E. F., Niebur, G. L., & Yeh, O. C. (2001). Biomechanics of Trabecular Bone. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 3(1), 307–333. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.3.1.307>
- Kim, D.-G., Elias, K. L., Jeong, Y.-H., Kwon, H.-J., Clements, M., Brantley, W. A., ... Han, J.-S. (2016). Differences between buccal and lingual bone quality and quantity of peri-implant regions. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 60, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.12.036>
- Kleuskens, M. W. A., Donkelaar, C. C., Kock, L. M., Janssen, R. P. A., & Ito, K. (2020). An ex vivo human osteochondral culture model. *Journal of Orthopaedic Research*, (March), jor.24789. <https://doi.org/10.1002/jor.24789>
- Kostenuik, P. (2005). Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(6), 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.06.005>
- Kovacs, D. G., Rechner, L. A., Appelt, A. L., Berthelsen, A. K., Costa, J. C., Friberg, J., ... Aznar, M. C. (2018). Metal artefact reduction for accurate tumour delineation in radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, 126(3), 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.09.029>
- Kurtz, S. M., Ong, K. L., Lau, E., & Bozic, K. J. (2014). Impact of the Economic Downturn

- on Total Joint Replacement Demand in the United States. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 96(8), 624–630. <https://doi.org/10.2106/JBJS.M.00285>
- Kurtz, S. M., Ong, K. L., Schmier, J., Mowat, F., Saleh, K., Dybvik, E., ... Lau, E. (2007). Future Clinical and Economic Impact of Revision Total Hip and Knee Arthroplasty. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 89(suppl 1), 144–151. <https://doi.org/10.2106/JBJS.G.00587>
- Kuzyk, P., & Schemitsch, E. (2011). The basic science of peri-implant bone healing. *Indian Journal of Orthopaedics*, 45(2), 108. <https://doi.org/10.4103/0019-5413.77129>
- Langton, D. J., Jameson, S. S., Joyce, T. J., Gandhi, J. N., Sidaginamale, R., Mereddy, P., ... Nargol, A. V. F. (2011). Accelerating failure rate of the ASR total hip replacement. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 93-B(8), 1011–1016. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.93B8.26040>
- Larousse. (2020a). Os. Retrieved from <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/os/15009>
- Larousse. (2020b). Os cortical. Retrieved from http://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Os_cortical/1007532
- Le Cann, S., Galland, A., Rosa, B., Le Corroller, T., Pithioux, M., Argenson, J.-N., ... Parratte, S. (2014). Does surface roughness influence the primary stability of acetabular cups? A numerical and experimental biomechanical evaluation. *Medical Engineering & Physics*, 36(9), 1185–1190. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2014.07.003>
- Le Cann, S., Törnquist, E., Silva Barreto, I., Fraulob, M., Albin Lomami, H., Verezhak, M., ... Haïat, G. (2020). Spatio-temporal evolution of hydroxyapatite crystal thickness at the bone-implant interface. *Acta Biomaterialia*, 116, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.021>
- Le Cann, S., Tudisco, E., Perdikouri, C., Belfrage, O., Kaestner, A., Hall, S., ... Isaksson, H. (2017). Characterization of the bone-metal implant interface by Digital Volume Correlation of in-situ loading using neutron tomography. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 75(June), 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.07.001>
- Le Cann, S., Tudisco, E., Turunen, M. J., Patera, A., Mokso, R., Tägil, M., ... Isaksson, H. (2019). Investigating the mechanical characteristics of bone-metal implant interface using in situ synchrotron tomographic imaging. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(JAN). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00208>
- Leucht, P., Kim, J., Wazen, R., Currey, J. A., Nanci, A., Brunski, J. B., & Helms, J. A. (2007). Effect of mechanical stimuli on skeletal regeneration around implants. *Bone*, 40(4), 919–930. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.10.027>
- Levasseur, A. (2019). *Approche multimodale d'analyse des adaptations osseuse ex-vivo*. École

de technologie supérieure.

- Lewis, G. (2003). Fatigue testing and performance of acrylic bone-cement materials: State-of-the-art review. *Journal of Biomedical Materials Research*, 66B(1), 457–486. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10018>
- Li, J. Y., Pow, E. H. N., Zheng, L. W., Ma, L., Kwong, D. L. W., & Cheung, L. K. (2014). Quantitative analysis of titanium-induced artifacts and correlated factors during micro-CT scanning. *Clinical Oral Implants Research*, 25(4), 506–510. <https://doi.org/10.1111/clr.12200>
- Li, N., Xu, W., Xiao, G., Zhao, J., & Lu, Y. (2017). A bioactive coating with submicron-sized titania crystallites fabricated by induction heating of titanium after tensile deformations. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 75(July), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.06.028>
- Li, Y., Meng, Y., & Yu, X. (2019). The Unique Metabolic Characteristics of Bone Marrow Adipose Tissue. *Frontiers in Endocrinology*, 10(FEB), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00069>
- Liebschner, M. A. K. (2004). Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*, 25(9), 1697–1714. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00515-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00515-5)
- Liu, X., Chu, P., & Ding, C. (2004). Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 47(3–4), 49–121. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2004.11.001>
- Mann, V., Huber, C., Kogianni, G., Jones, D., & Noble, B. (2006). The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 6(4), 408–417. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1847464&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 21(2), 115–137. <https://doi.org/10.1210/er.21.2.115>
- Marino, S., Staines, K. A., Brown, G., Howard-Jones, R. A., & Adamczyk, M. (2016). Models of ex vivo explant cultures: applications in bone research. *BoneKey Reports*, 5(June), 1–18. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2016.49>
- Mathieu, V., Fukui, K., Matsukawa, M., Kawabe, M., Vayron, R., Soffer, E., ... Haiat, G. (2011). Micro-Brillouin Scattering Measurements in Mature and Newly Formed Bone Tissue Surrounding an Implant. *Journal of Biomechanical Engineering*, 133(2), 1–6. <https://doi.org/10.1115/1.4003131>

- Mathieu, V., Vayron, R., Barthel, E., Dalmas, D., Soffer, E., Anagnostou, F., & Haiat, G. (2012). Mode III cleavage of a coin-shaped titanium implant in bone: Effect of friction and crack propagation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 8, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.12.012>
- Mathieu, V., Vayron, R., Soffer, E., Anagnostou, F., & Haiat, G. (2012). Influence of Healing Time on the Ultrasonic Response of the Bone-Implant Interface. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 38(4), 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2011.12.014>
- Mazonakis, M., & Damilakis, J. (2016). Computed tomography: What and how does it measure? *European Journal of Radiology*, 85(8), 1499–1504. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2016.03.002>
- Meijering, E. H. W., Niessen, W. J., & Viergever, M. A. (2001). Quantitative evaluation of convolution-based methods for medical image interpolation. *Medical Image Analysis*, 5(2), 111–126. [https://doi.org/10.1016/S1361-8415\(00\)00040-2](https://doi.org/10.1016/S1361-8415(00)00040-2)
- Michel, A., Bosc, R., Meningaud, J.-P., Hernigou, P., & Haiat, G. (2016). Assessing the Acetabular Cup Implant Primary Stability by Impact Analyses: A Cadaveric Study. *PLOS ONE*, 11(11), e0166778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166778>
- Micieli, D., Di Martino, D., Musa, M., Gori, L., Kaestner, A., Bravin, A., ... Gorini, G. (2018). Characterizing pearls structures using X-ray phase-contrast and neutron imaging: a pilot study. *Scientific Reports*, 8(1), 12118. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30545-z>
- Migliorati, M., Benedicenti, S., Signori, A., Drago, S., Barberis, F., Tournier, H., & Silvestrini-Biavati, A. (2012). Miniscrew design and bone characteristics: An experimental study of primary stability. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 142(2), 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2012.03.029>
- Mohamed, A. M. (2008). An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 15(1), 4–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22589609>
- Mosley, J. R. (2000). Osteoporosis and bone functional adaptation: mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review. *Journal of Rehabilitation Research and Development*, 37(2), 189–199. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10850825>
- Moy, P. K., Medina, D., Shetty, V., & Aghaloo, T. L. (2005). Dental implant failure rates and associated risk factors. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 20(4), 569–577. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16161741>
- Müller, R., & Harry van Lenthe, G. (2006). Trabecular bone failure at the microstructural level. *Current Osteoporosis Reports*, 4(2), 80–86. <https://doi.org/10.1007/s11914-006-0007-4>
- Mustafy, T., Benoit, A., Londono, I., Moldovan, F., & Villemure, I. (2018). Can repeated in

vivo micro-CT irradiation during adolescence alter bone microstructure, histomorphometry and longitudinal growth in a rodent model? *PLOS ONE*, 13(11), e0207323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207323>

National Joint Registry. (2020). 17th Annual Report, (December 2019). Retrieved from <https://reports.njrcentre.org.uk/downloads>

Nokhbatolfoghahaei, H., Rad, M. R., Khani, M.-M., Shahriari, S., Nadjmi, N., & Khojasteh, A. (2017). Application of Bioreactors to Improve Functionality of Bone Tissue Engineering Constructs: A Systematic Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 12(7). <https://doi.org/10.2174/1574888X12666170822100105>

Okazaki, J., Komasa, Y., Sakai, D., Kamada, A., Ikeo, T., Toda, I., ... Etoh, T. (2008). A torque removal study on the primary stability of orthodontic titanium screw mini-implants in the cortical bone of dog femurs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 37(7), 647–650. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2008.04.007>

Ollion, J., Cochenne, J., Loll, F., Escudé, C., & Boudier, T. (2013). TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics*, 29(14), 1840–1841. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt276>

Owejan, J. P., Gagliardo, J. J., Harris, S. J., Wang, H., Hussey, D. S., & Jacobson, D. L. (2012). Direct measurement of lithium transport in graphite electrodes using neutrons. *Electrochimica Acta*, 66, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.01.047>

Paul Scherrer Institute. (2020). Neutron Imaging Detectors. Retrieved November 9, 2020, from <https://www.psi.ch/en/niag/neutron-imaging-detectors>

Pearce, A., Richards, R., Milz, S., Schneider, E., & Pearce, S. (2007). Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *European Cells and Materials*, 13(0), 1–10. <https://doi.org/10.22203/eCM.v013a01>

Peña Fernández, M., Cipiccia, S., Dall'Ara, E., Bodey, A. J., Parwani, R., Pani, M., ... Tozzi, G. (2018). Effect of SR-microCT radiation on the mechanical integrity of trabecular bone using in situ mechanical testing and digital volume correlation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 88(December 2017), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.08.012>

R Development Core Team. (2005). R: A language and environment for statistical computing. In *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria. Retrieved from <http://www.r-project.org>

Rahman, N., Khan, R., & Badshah, S. (2018). Effect of x-rays and gamma radiations on the bone mechanical properties: literature review. *Cell and Tissue Banking*, 19(4), 457–472. <https://doi.org/10.1007/s10561-018-9736-8>

Rahman, S., Gulati, K., Kogawa, M., Atkins, G. J., Pivonka, P., Findlay, D. M., & Losic, D.

- (2016). Drug diffusion, integration, and stability of nanoengineered drug-releasing implants in bone ex-vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(3), 714–725. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35595>
- Rauh, J., Milan, F., Günther, K.-P., & Stiehler, M. (2011). Bioreactor Systems for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(4), 263–280. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0612>
- ReVell, J. B., Moran, J. W., & Cox, C. A. (1998). *The QFD handbook*.
- Ridler, T. W., & Calvard, S. (1978). Picture Thresholding Using an Iterative Selection Method. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 8(8), 630–632. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1978.4310039>
- Rønold, H. J., & Ellingsen, J. E. (2002a). Effect of micro-roughness produced by TiO₂ blasting—tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants. *Biomaterials*, 23(21), 4211–4219. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00167-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00167-9)
- Rønold, H. J., & Ellingsen, J. E. (2002b). The use of a coin shaped implant for direct in situ measurement of attachment strength for osseointegrating biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 23(10), 2201–2209. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00353-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00353-2)
- Rønold, H. J., Lyngstadaas, S. P., & Ellingsen, J. E. (2003). Analysing the optimal value for titanium implant roughness in bone attachment using a tensile test. *Biomaterials*, 24(25), 4559–4564. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00256-4)
- Rosa, N., Simoes, R., Magalhães, F. D., & Marques, A. T. (2015). From mechanical stimulus to bone formation: A review. *Medical Engineering & Physics*, 37(8), 719–728. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2015.05.015>
- Rupin, F., Bossis, D., Vico, L., Peyrin, F., Raum, K., Laugier, P., & Saïed, A. (2010). Adaptive Remodeling of Trabecular Bone Core Cultured in 3-D Bioreactor Providing Cyclic Loading: An Acoustic Microscopy Study. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 36(6), 999–1007. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.03.004>
- Rustom, L. E., Boudou, T., Lou, S., Pignot-Paintrand, I., Nemke, B. W., Lu, Y., ... Wagoner Johnson, A. J. (2016). Micropore-induced capillarity enhances bone distribution in vivo in biphasic calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 44, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.025>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmitt, S. C., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Kuschnierz, J., Al-Ahmad, A., Huebner, U., Schmelzeisen, R., & Gutwald, R. (2008). Comparative in vitro study of the proliferation and growth of ovine osteoblast-like cells on various alloplastic biomaterials manufactured

for augmentation and reconstruction of tissue or bone defects. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(3), 1441–1450. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3238-8>

Schnieders, J., Gbureck, U., Germershaus, O., Kratz, M., Jones, D. B., & Kissel, T. (2013). Ex Vivo Human Trabecular Bone Model for Biocompatibility Evaluation of Calcium Phosphate Composites Modified with Spray Dried Biodegradable Microspheres. *Advanced Healthcare Materials*, 2(10), 1361–1369. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200390>

Schulte, F. A., Lambers, F. M., Kuhn, G., & Müller, R. (2011). In vivo micro-computed tomography allows direct three-dimensional quantification of both bone formation and bone resorption parameters using time-lapsed imaging. *Bone*, 48(3), 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.10.007>

Schwarz, D., Vontobel, P., Lehmann, E. H., Meyer, C. A., & Bongartz, G. (2005). Neutron tomography of internal structures of vertebrate remains: A comparison with X-ray computed tomography. *Palaeontologia Electronica*, 8(2).

Sener, B. C., Dergin, G., Gursoy, B., Kelesoglu, E., & Slih, I. (2009). Effects of irrigation temperature on heat control in vitro at different drilling depths. *Clinical Oral Implants Research*, 20(3), 294–298. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01643.x>

Shah, F. A., Thomsen, P., & Palmquist, A. (2019). Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. *Acta Biomaterialia*, 84, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.018>

Sharkey, P. F., Lichstein, P. M., Shen, C., Tokarski, A. T., & Parvizi, J. (2014). Why Are Total Knee Arthroplasties Failing Today—Has Anything Changed After 10 Years? *The Journal of Arthroplasty*, 29(9), 1774–1778. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2013.07.024>

Shemtov-Yona, K., & Rittel, D. (2015). An Overview of the Mechanical Integrity of Dental Implants. *BioMed Research International*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/547384>

Singhal, A., Deymier-Black, A. C., Almer, J. D., & Dunand, D. C. (2011). Effect of high-energy X-ray doses on bone elastic properties and residual strains. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(8), 1774–1786. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.05.035>

Skovdal, S. M., Jørgensen, N. P., Petersen, E., Jensen-Fangel, S., Ogaki, R., Zeng, G., ... Meyer, R. L. (2018). Ultra-dense polymer brush coating reduces *Staphylococcus epidermidis* biofilms on medical implants and improves antibiotic treatment outcome. *Acta Biomaterialia*, 76, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.002>

Soffer, E., Ouhayoun, J. P., Meunier, A., & Anagnostou, F. (2006). Effects of autologous

- platelet lysates on ceramic particle resorption and new bone formation in critical size defects: The role of anatomical sites. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 79B(1), 86–94. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30516>
- Sokol-Anderson, M. L., Brajtburg, J., & Medoff, G. (1986). Amphotericin B-Induced Oxidative Damage and Killing of *Candida albicans*. *Journal of Infectious Diseases*, 154(1), 76–83. <https://doi.org/10.1093/infdis/154.1.76>
- Sołtysiak, A., Miśta-Jakubowska, E. A., Dorosz, M., Kosiński, T., & Fijał-Kirejczyk, I. (2018). Estimation of collagen presence in dry bone using combined X-ray and neutron radiography. *Applied Radiation and Isotopes*, 139(March), 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2018.03.024>
- Stalder, A. K., Ilgenstein, B., Chicherova, N., Deyhle, H., Beckmann, F., Müller, B., & Hieber, S. E. (2014). Combined use of micro computed tomography and histology to evaluate the regenerative capacity of bone grafting materials. *International Journal of Materials Research*, 105(7), 679–691. <https://doi.org/10.3139/146.111050>
- Stamati, O., Andò, E., Roubin, E., Cailletaud, R., Wiebicke, M., Pinzon, G., ... Birmpilis, G. (2020). spam: Software for Practical Analysis of Materials. *Journal of Open Source Software*, 5(51), 2286. <https://doi.org/10.21105/joss.02286>
- Sundfeldt, M., V Carlsson, L., B Johansson, C., Thomsen, P., & Gretzer, C. (2006). Aseptic loosening, not only a question of wear: A review of different theories. *Acta Orthopaedica*, 77(2), 177–197. <https://doi.org/10.1080/17453670610045902>
- Tawy, G. F., Rowe, P. J., & Riches, P. E. (2016). Thermal Damage Done to Bone by Burring and Sawing With and Without Irrigation in Knee Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*, 31(5), 1102–1108. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2015.11.002>
- Tengattini, A., Lenoir, N., Andò, E., Giroud, B., Atkins, D., Beaucour, J., & Viggiani, G. (2020). NeXT-Grenoble, the Neutron and X-ray tomograph in Grenoble. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 968(April), 163939. <https://doi.org/10.1016/j.nima.2020.163939>
- Tengattini, A., Lenoir, N., Andò, E., & Viggiani, G. (2020). Neutron imaging for geomechanics: A review. *Geomechanics for Energy and the Environment*, 20, 100206. <https://doi.org/10.1016/j.gete.2020.100206>
- Tötzke, C., Kardjilov, N., Manke, I., & Oswald, S. E. (2017). Capturing 3D Water Flow in Rooted Soil by Ultra-fast Neutron Tomography. *Scientific Reports*, 7(1), 6192. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06046-w>
- Treece, G. (2017). Refinement of clinical X-ray computed tomography (CT) scans containing metal implants. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 56, 11–23.

<https://doi.org/10.1016/j.compmedimag.2017.01.005>

- Trtik, P., & Lehmann, E. H. (2016). Progress in High-resolution Neutron Imaging at the Paul Scherrer Institut - The Neutron Microscope Project. *Journal of Physics: Conference Series*, 746(1), 012004. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/746/1/012004>
- Tudor, F. S., Donaldson, J. R., Rodriguez-Elizalde, S. R., & Cameron, H. U. (2015). Long-Term Comparison of Porous Versus Hydroxyapatite Coated Sleeve of a Modular Cementless Femoral Stem (SROM) in Primary Total Hip Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*, 30(10), 1777–1780. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2015.04.031>
- Turgeon, G.-A., Lehmann, G., Guiraudon, G., Drangova, M., Holdsworth, D., & Peters, T. (2005). 2D-3D registration of coronary angiograms for cardiac procedure planning and guidance. *Medical Physics*, 32(12), 3737–3749. <https://doi.org/10.1118/1.2123350>
- Ulrich, S. D., Seyler, T. M., Bennett, D., Delanois, R. E., Saleh, K. J., Thongtrangan, I., ... Mont, M. A. (2008). Total hip arthroplasties: What are the reasons for revision? *International Orthopaedics*, 32(5), 597–604. <https://doi.org/10.1007/s00264-007-0364-3>
- Urciuoli, A., Zanolli, C., Fortuny, J., Almécija, S., Schillinger, B., Moyà-Solà, S., & Alba, D. M. (2018). Neutron-based computed microtomography: *Pliobates cataloniae* and *Barberapithecus huerzeleri* as a test-case study. *American Journal of Physical Anthropology*, 166(4), 987–993. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23467>
- van Arkel, R. J., Ghouse, S., Milner, P. E., & Jeffers, J. R. T. (2018). Additive manufactured push-fit implant fixation with screw-strength pull out. *Journal of Orthopaedic Research®*, 36(5), 1508–1518. <https://doi.org/10.1002/jor.23771>
- Vandeweghe, S., Coelho, P. G., Vanhove, C., Wennerberg, A., & Jimbo, R. (2013). Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: A comparison with histomorphometry. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 101(7), 1259–1266. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32938>
- Vayron, R., Barthel, E., Mathieu, V., Soffer, E., Anagnostou, F., & Haiat, G. (2011). Variation of biomechanical properties of newly formed bone tissue determined by nanoindentation as a function of healing time. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 14(sup1), 139–140. <https://doi.org/10.1080/10255842.2011.593770>
- Vayron, R., Barthel, E., Mathieu, V., Soffer, E., Anagnostou, F., & Haiat, G. (2012). Nanoindentation Measurements of Biomechanical Properties in Mature and Newly Formed Bone Tissue Surrounding an Implant. *Journal of Biomechanical Engineering*, 134(2), 1–6. <https://doi.org/10.1115/1.4005981>
- Vayron, R., Matsukawa, M., Tsubota, R., Mathieu, V., Barthel, E., & Haiat, G. (2014). Evolution of bone biomechanical properties at the micrometer scale around titanium implant as a function of healing time. *Physics in Medicine and Biology*, 59(6), 1389–

1406. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/59/6/1389>

- Vermandel, M., Betrouni, N., Gauvrit, J., Pasquier, D., Vasseur, C., & Rousseau, J. (2007). Intrinsic 2D/3D registration based on a hybrid approach: use in the radiosurgical imaging process. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 52(6), 44–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17543209>
- Vetsch, J. R., Müller, R., & Hofmann, S. (2015). The evolution of simulation techniques for dynamic bone tissue engineering in bioreactors. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(8), 903–917. <https://doi.org/10.1002/term.1733>
- Vivanco, J., Garcia, S., Ploeg, H. L., Alvarez, G., Cullen, D., & Smith, E. L. (2013). Apparent elastic modulus of ex vivo trabecular bovine bone increases with dynamic loading. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 227(8), 904–912. <https://doi.org/10.1177/0954411913486855>
- Wang, G., Qu, X., & Yu, Z. (2014). Changes in the mechanical properties and composition of bone during microdamage repair. *PLoS ONE*, 9(10), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108324>
- Watkin, K. L., Bilheux, H. Z., & Ankner, J. F. (2009). Probing the Potential of Neutron Imaging for Biomedical and Biological Applications (pp. 253–264). https://doi.org/10.1007/978-0-387-78693-3_14
- Webb, J. C. J., & Spencer, R. F. (2007). The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 89-B(7), 851–857. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.89B7.19148>
- Weiner, S., & Wagner, H. D. (1998). THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. *Annual Review of Materials Science*, 28(1), 271–298. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.28.1.271>
- Wittkowske, C., Reilly, G. C., Lacroix, D., & Perrault, C. M. (2016). In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4(NOV). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00087>
- Yeatts, A. B., & Fisher, J. P. (2011). Bone tissue engineering bioreactors: Dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone*, 48(2), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.09.138>
- Yellowley, C. E., Li, Z., Zhou, Z., Jacobs, C. R., & Donahue, H. J. (2010). Functional Gap Junctions Between Osteocytic and Osteoblastic Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(2), 209–217. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.2.209>
- Yu, Z., Wang, G., Tang, T., Fu, L., Yu, X., Cao, L., ... Qiu, S. (2014). Production and repair of implant-induced microdamage in the cortical bone of goats after long-term estrogen deficiency. *Osteoporosis International*, 25(3), 897–903. <https://doi.org/10.1007/s00198->

013-2496-1

- Yusoff, N., Abu Osman, N. A., & Pinguang-Murphy, B. (2011). Design and validation of a bi-axial loading bioreactor for mechanical stimulation of engineered cartilage. *Medical Engineering & Physics*, 33(6), 782–788. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2011.01.013>
- Zacchetti, G., Wiskott, A., Cugnoni, J., Botsis, J., & Ammann, P. (2013). External Mechanical Microstimuli Modulate the Osseointegration of Titanium Implants in Rat Tibiae. *BioMed Research International*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/234093>
- Zhang, Y., Dall'Ara, E., Viceconti, M., & Kadirkamanathan, V. (2019). A new method to monitor bone geometry changes at different spatial scales in the longitudinal in vivo μ CT studies of mice bones. *PLOS ONE*, 14(7), e0219404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219404>
- Zhao, J., Griffin, M., Cai, J., Li, S., Bulter, P. E. M., & Kalaskar, D. M. (2016). Bioreactors for tissue engineering: An update. *Biochemical Engineering Journal*, 109(January), 268–281. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.018>