

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n° 1705

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 4 Mai 2010

Par Ludovic Le TAILLANDIER de GABORY

Né le 10 Décembre 1971 à Bordeaux

Etude du comportement d'un implant BCP pour la réparation du septum nasal. Influence des nanotubes de carbone.

Membres du Jury

Pr Vincent DARROUZET, Bordeaux Président
Pr Pierre WEISS, Nantes Examineur
Pr Laurence BORDENAVE, Bordeaux..... Examineur
Pr Elie SERRANO, Toulouse Rapporteur
Pr Roger JANKOWSKI, Nancy Rapporteur
Pr Dominique STOLL, Bordeaux Directeur de thèse
Pr Jean-Christophe FRICAIN, Bordeaux..... Directeur de thèse

RESUME

Le septum nasal joue un rôle prépondérant dans la croissance de l'étage moyen de la face et la physiologie ventilatoire. Sa solidité, sa rectitude et sa position sagittale sont déterminantes pour percevoir un confort respiratoire diurne et nocturne. Vulnérable aux traumatismes de part sa projection antérieure, la destruction ou l'inefficacité de son squelette entraîne une demande de réparation fonctionnelle et esthétique. Dans les cas les plus sévères, le remplacement tissulaire fait appel à des volumineux greffons autologues pour lesquels la morbidité du site donneur et leurs imperfections propres restent un écueil. Pour les remplacer, certains biomatériaux ont été essayés de manière empirique sans donner de résultats fiables. Le premier objectif de notre travail a été d'évaluer le comportement d'un implant phosphocalcique biphasique pour la reconstruction du septum nasal afin d'éviter ces greffons tout en répondant aux objectifs biofonctionnels locaux, au contact d'un milieu septique et susceptible d'être exposé aux particules aéroportées de l'environnement. Le deuxième objectif était d'évaluer la cytotoxicité des nanotubes de carbone à double paroi sur des cellules de l'arbre respiratoire, premier organe concerné par une exposition potentielle lors de leur fabrication. Par la suite, les résultats de ces deux sujets différents ont été utilisés de manière synergique pour répondre au troisième objectif qui était, d'évaluer l'influence des nanotubes de carbone sur la cicatrisation du septum nasal en présence ou non de l'implant phosphocalcique.

MOTS CLES : biomatériau, céramique, hydroxyapatite, phosphate tricalcique bêta, cytocompatibilité, biocompatibilité, septum nasal, nez ensellé, cellule épithéliale, voie respiratoire, nanotube de carbone, nanoparticule

TABLE DES MATIERES

RESUME	3
LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DE TABLEAUX	12
INTRODUCTION GENERALE.....	13
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	19
I. LE SEPTUM NASAL	21
A. ANATOMIE COMPAREE DU LAPIN, DU MOUTON ET DE L’HOMME	22
1. La columelle.....	26
2. Le septum membraneux.....	27
3. Le septum cartilagineux.....	27
4. Le septum osseux	32
5. Le socle osseux	33
6. La vascularisation.....	34
B. HISTOLOGIE COMPAREE DU LAPIN, DU MOUTON ET DE L’HOMME	34
1. Le cartilage septal et le périchondre	34
2. La muqueuse respiratoire.....	37
a. La sous-muqueuse ou lamina propria.....	37
b. Les épithéliums de surface	38
3. Marqueurs de la différenciation cellulaire épithéliale et respiratoire.....	41
C. PHYSIOLOGIE NASO-SEPTALE VENTILATOIRE	47
1. Organisation des flux aériens lors de la respiration	47
2. Répartition et dépôts des particules inhalées	50
a. Micrométriques	50
b. Nanométriques	52
II. PATHOLOGIES NASO-SEPTALES ARCHITECTURALES.....	55
A. LE SYNDROME MORPHOLOGIQUE ET SES CONSEQUENCES.....	55
B. ETIOLOGIES.....	57
1. Ontogénétique	57
2. Traumatique	60
3. Mixte	61

C.	SITUATIONS CONCERNEES PAR LA REPARATION AVEC APPORT DE MATERIAUX ...	62
1.	Les fractures septales antérieures : verticales, horizontales, mixtes.....	62
2.	Les nez ensellés polytraumatisés, déshabités.....	63
3.	Les perforations septales.....	64
III.	ETAT DE L'ART SUR LA CICATRISATION SPONTANEE DU SEPTUM NASAL.....	65
A.	MECANISMES DE REPARATION DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE.....	65
B.	MECANISMES DE REPARATION DU CARTILAGE SEPTAL	71
C.	MECANISMES DE REPARATION DE L'OS SEPTAL.....	73
IV.	ETAT DE L'ART SUR LA REPARATION DU SEPTUM NASAL AVEC APPORT DE MATERIAUX.....	74
A.	LORS D'UN SQUELETTE SEPTAL ABSENT OU INEFFICIENT.....	74
1.	Greffes autologues	75
a.	Cartilage costal	75
b.	Os pariétal	76
c.	Os iliaque	77
2.	Matériaux	79
a.	Silicone	79
b.	Polyamide.....	80
c.	Polyéthylène	80
d.	Polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe).....	82
e.	Polydioxanone	82
f.	Acides polylactiques (PLA), acides poly-L-Lactiques (PLLA) et copolymères	83
g.	Ingénierie tissulaire cartilagineuse	84
B.	LORS DE PERFORATIONS SEPTALES	88
1.	Réparation prothétique.....	88
2.	Réparation chirurgicale	88
a.	Sans support de recolonisation épithéliale	88
b.	Avec support de recolonisation épithéliale	89
i.	Autologues.....	89
ii.	Hétérologues	91
V.	LE SUBSTITUT SEPTAL « IDEAL » : CAHIER DES CHARGES.....	92

VI.	INFLUENCE DES NANOPARTICULES DE CARBONE DANS LA COMPOSITION DE L’AIR INSPIRE	94
A.	NANOTECHNOLOGIES ET NANOMATERIAUX	94
B.	CARACTERISTIQUES ET PROPRIETES DES NANOTUBES DE CARBONE	97
C.	PENETRATION ET DEVENIR DES NANOPARTICULES DANS L’ORGANISME.....	98
D.	EFFETS SUR L’ARBRE RESPIRATOIRE DES NANOTUBES DE CARBONE	104
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE		109
RESULTATS		115
I.	Etude du comportement <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> d’un implant phosphocalcique biphasique utilisé pour la réparation du septum nasal.....	117
A.	INTRODUCTION.....	117
B.	ARTICLE	120
C.	CONCLUSION.....	121
II.	Cytotoxicité des nanotubes de carbone à double paroi sur des cellules épithéliales de l’arbre respiratoire	123
A.	INTRODUCTION.....	123
B.	ARTICLE	125
C.	CONCLUSION.....	127
III.	Evaluation du comportement d’un implant BCP pour la reconstruction du septum nasal et la fermeture des perforations septales de grande taille chez le mouton.	128
A.	INTRODUCTION.....	128
B.	ARTICLES	129
C.	CONCLUSION.....	131
IV.	Influence des nanotubes de carbone sur la cicatrisation du septum nasal en présence d’un implant BCP chez le mouton.	132
A.	INTRODUCTION.....	132
B.	MATERIEL ET METHODES.....	133
C.	RESULTATS	134
D.	DISCUSSION.....	139
E.	CONCLUSION.....	141

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	143
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	147
ENCADREMENT	151
BIBLIOGRAPHIE	153

LISTE DES ABBREVIATIONS

ANL	Angle Naso-Labial
BCP	Biphasic Calcium Phosphate
CK	Cytokératine
CLI	Cartilage Latéral Inférieur
CLS	Cartilage Latéral Supérieur
CQ	Cartilage Quadrangulaire
Cx43	Connexine 43
DWNT	Double Wall carbon Nanotube
EGF	Epidermal Growth Factor
ENA	Epine Nasale Antérieure
EO, ER, ES, ET	Épithélium Olfactif, Respiratoire, Squameux, Transitionnel
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAG	Glycosaminoglycane
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HA	Hydroxyapatite
HNEpC	Human Nasal Epithelial Cell
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferons
IL	Interleukines
LPE	Lame Perpendiculaire de l'Éthmoïde
MAP	Mitogen Activated Protein
MEC	Matrice Extracellulaire
MMPs	Matrix Métalloprotéases
MUC	Mucine
MWNT	Multiwall carbon Nanotube
NO	Monoxyde d'azote
NP	Nanoparticule
NTC	Nanotube de Carbone
OPN	Os Propre du Nez
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGA	Poly(glycolic) Acid
PHDPE	Porous High Density Polyethylene
PLA	Poly(lactic acid)
PLLA	Poly(L-lactic acid)
PM	PréMaxillaire
PTFEe	Polytetrafluoroéthylène expansé
PUF	Particule Ultrafine
ROS	Reactive oxygen species
SVF	Sérum de Veau Foetal
SWNT	Single Wall carbon Nanotube
TGF	Transforming Growth Factor
TK	Tyrosine Kinase
TCP	Triphasic Calcium Phosphate
TNF	Tumor Necrosis Factor

UEA
VEGF

Ulex Europeus Agglutinin lectin
Vascular Endothelial Growth Factor

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : anatomie et évolution phylogénétique de l'extrémité antérieure des fosses nasales.**
- Figure 2 : anatomie de la columelle chez l'homme et orientations des courants aériens en fonction de la morphologie de la pyramide nasale et de l'angle naso-labial.**
- Figure 3 : anatomie comparée du septum nasal.**
- Figure 4 : unité septo-latérale chez l'homme.**
- Figure 5 : différentes déformations septales induites par la croissance.**
- Figure 6: vue en microscopie optique du cartilage septal de lapin.**
- Figure 7 : organisation de la sous-muqueuse chez le mouton (A) et le lapin (B).**
- Figure 8 : répartition de l'épithélium respiratoire sur le septum nasal selon les espèces.**
- Figure 9 : immunomarquages des cytokératines chez le lapin (B,D) et le mouton (A,C,E).**
- Figure 10 : immunomarquages des lectines selon les espèces.**
- Figure 11 : réponse sécrétrice des cellules épithéliales de l'arbre respiratoire à une stimulation aiguë ou chronique.**
- Figure 12 : division anatomique et fonctionnelle du mur médial (A) et latéral (B) des fosses nasales.**
- Figure 13 : dépôt régional des particules dans les voies respiratoires en fonction de la taille des NPs.**
- Figure 14 : index de croissance et index prolifératif du cartilage septal humain.**
- Figure 15 : effet sur la croissance faciale de la résection du septum nasal antérieur chez le lapin.**
- Figure 16 : lésions de la pyramide nasale et du septum selon la direction et l'intensité du choc.**
- Figure 17 : lésions mixtes, fractures de l'enfance révélées par la croissance à l'âge adulte**
- Figure 18 : différents types de fractures septales.**
- Figure 19 : classification des nez ensellés**
- Figure 20 : situations de reconstruction complexes où s'associe à l'effondrement de la pyramide nasale une large perforation septale.**
- Figure 21 : comparaison du nombre de cellules épithéliales avec battements ciliaires en culture.**
- Figure 22 : étapes *in vivo* de la régénération de l'épithélium respiratoires des voies aériennes.**

Figure 23 : facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la réparation et la régénération de l'épithélium respiratoire des voies aériennes.

Figure 24 : réparation du septum nasal de lapin 8 semaines après réimplantation immédiate autologue.

Figure 25 : production de TGF β 1 par la couche externe périchondrale.

Figure 26 : pénétration, devenir des NPs inhalées et leurs effets potentiels dans l'organisme.

Figure 27 : résultats macroscopiques des implants sans et avec NTCs.

Figure 28 : pourcentage moyen de recouvrement des implants sans et avec NTCs.

Figure 29 : résultats histomorphométriques sans (A) et avec NTCs (B).

Figure 30 : résultats microscopiques des implants avec NTCs.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : répartition de l'expression des cytokératines dans les différents épithéliums humains.

Tableau 2 : éventail des applications potentielles ou déjà utilisées des nano-matériaux.

Tableau 3 : principaux facteurs qui déterminent la toxicité des NPs.

Tableau 4 : effets sur la santé documentés pour les nanotubes de carbone monoparoi.

INTRODUCTION GENERALE

Le nez est un organe d'interaction permanente avec notre environnement. Il est à ce titre polyvalent alors qu'il a longtemps été considéré comme un organe dont l'intérêt était limité en raison de la réduction de nos capacités olfactives au cours de l'évolution.

Le nez est chez l'homme un organe de la vie de relation avec l'environnement tant sur le plan olfactif, immunitaire, respiratoire, qu'esthétique et social. La fonction olfactive conditionne nos comportements et représente pour l'industrie cosmétique, des arômes et des fragrances, un marché annuel de 33 milliards de dollars américains. Il représente les trois premières barrières de défenses contre les différents agents pathogènes aéroportés grâce :

- au tapis mucociliaire qui, à ses capacités d'adsorption, allie des molécules actives antimicrobiennes (lactoferrines, lysozymes, immunoglobulines sécrétées...),
- aux cellules épithéliales qui forment une barrière étanche (tight junction apicale) et associent des capacités autocrines et paracrines (IL 1 β , 3, 6, 8, 17, GM-CSF, IFN γ , TNF α , RANTES, éotaxines...) pour déclencher le recrutement et l'activation des cellules immunocompétentes,
- et aux différents acteurs de l'immunité non spécifique et spécifique présent dans la sous-muqueuse (complément et acteurs de l'immunité humorale et cellulaire) associés à un riche réseau vasculaire.

En condition physiologique, il assure la respiration au repos et jusqu'à des efforts d'intensité modérée (de 10 à 40 L/min) (ICRP 1994). Il joue dans ce cadre deux rôles fondamentaux. Le premier est le pré conditionnement de l'air inspiré pour les voies aériennes inférieures (réchauffement, humidification et filtration). Il délivre au rhinopharynx un air à 33-34°C avec une hygrométrie de 90 à 95 % (Lindemann 2004 ; Keck et al 2000). Il absorbe les gaz et les vapeurs hydrosolubles, filtre et métabolise les particules xénobiotiques. Il est donc le premier poste d'observation de l'exposition aux différents toxiques aéroportés au sein duquel on trouve les différentes molécules responsables de la pollution atmosphérique et les nanoparticules. Le second rôle respiratoire est une fonction de sentinelle pour le sommeil. L'obstruction nasale est maintenant reconnue par tous

comme étant un des facteurs majeurs de la désorganisation et de la mauvaise qualité du sommeil. Si elle ne met pas en jeu le pronostic vital en dehors d'une participation à un syndrome d'apnées obstructives du sommeil, les conséquences socio-économiques sont non négligeables en raison de l'altération conséquente de la qualité de vie (physique, cognitive, adaptative) (Stewart et al 2004; Mondina 2009). Enfin, le nez dans sa position centrale du visage interagit au quotidien dans les rapports humains. Les relations humaines se faisant au travers du regard, le nez dans sa dysmorphose va s'interposer et constituer un obstacle à la relation.

C'est dans ce contexte de prise de conscience et d'évolution des sociétés occidentales que la demande de réparation en rhinologie a pris toute son importance ces 30 dernières années. Qu'elle soit motivée par une obstruction nasale gênante, par des troubles du sommeil (ronflements, apnées), des céphalées, des raisons esthétiques ou mixtes, cette demande concerne aujourd'hui, en consultation spécialisée, un patient sur deux. De plus, si les causes des pathologies septales étaient jusqu'à maintenant essentiellement d'origine post-traumatiques (accidents de la voie publique, domestiques, rixes, sports de contact) ou séquellaires de certaines addictions ou maladies spécifiques (cocaïne, maladie de Wegener, sarcoïdose), il semble que les demandes de réparation après chirurgie rhinologique excessive soient en augmentation. Si la plupart des situations anatomiques locales et chirurgicales sont simples, 5 à 10 % d'entre elles représentent un challenge chirurgical difficile en raison de l'inefficacité ou de l'absence de squelette de soutien de la pyramide nasale. Or, les solutions développées dans ces cas n'ont pas apporté entière satisfaction tant sur le plan des différentes sources de greffons autologues, que sur les différents biomatériaux essayés. Les premiers entraînent une morbidité du site donneur et ont leurs imperfections propres. Les derniers ont été choisis de manière empirique avec des résultats très variables sans qu'aucune donnée fondamentale spécifique à l'organe nasal ne soit disponible.

Notre travail a donc été entrepris en abordant et associant deux problématiques différentes :

- Choisir et évaluer de manière fiable et spécifique le comportement d'un biomatériau pour la reconstruction du septum nasal en situation chirurgicale et anatomique complexe,
- Evaluer la toxicité des nanotubes de carbones à double paroi sur l'appareil respiratoire, premier organe concerné par le caractère volatile des nanoparticules ;
- Et enfin combiner ces conditions afin de savoir si la reconstruction obtenue du septum nasal avec ce biomatériau est fiable y compris en présence de particules toxiques aéroportées.

Ce manuscrit de thèse présente 4 parties :

- la première partie, bibliographique, rappelle les différentes particularités anatomiques, histologiques, physiologiques et pathologiques de l'organe nasal, les conséquences respiratoires de l'apparition dans notre quotidien des différentes nanoparticules notamment des nanotubes de carbones puisqu'ils sont au centre de notre travail et, les différentes approches et solutions chirurgicales auto et hétérologues pour la reconstruction esthétique et fonctionnelle du septum nasal ;
- les objectifs généraux sont exposés dans la deuxième partie,
- la troisième partie présente les résultats sous la forme d'articles issus des travaux réalisés au cours de ces trois années de doctorat. Un article est paru, un est en cours de révision, deux autres sont soumis et le dernier est en préparation. Chaque article est accompagné d'une courte introduction et d'une conclusion. Les matériels et méthodes utilisés ne sont présentés qu'à l'intérieur des articles ;
- la dernière partie concerne la conclusion générale et les perspectives de ce travail.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE SEPTUM NASAL

Chez l'homme, l'évaluation d'un biomatériau pour la reconstruction du septum nasal nécessite la prise en compte de plusieurs spécificités locales :

- le caractère rétractile et synéchiant de la cicatrisation muqueuse qui peut naturellement aboutir à la fermeture de perforation,
- la grande plasticité de l'épithélium respiratoire qui en fonction de la matrice sous-jacente peut se différencier et aboutir à un épithélium non fonctionnel vis-à-vis du tapis muco-ciliaire,
- la faible épaisseur des tissus de recouvrement du squelette médio-facial qui peut à l'occasion des nécessités chirurgicales (exposition, dissection, exérèse) entraîner des perforations, des déchirures, des pertes de substances empêchant une couverture complète, étanche, et exposer les tissus de remplacement à un milieu septique.

Ces spécificités s'associent chez l'homme et justifient le développement d'un modèle animal avant son utilisation clinique, afin d'évaluer avec plus de sécurité son comportement au contact d'un environnement septique principal risque d'intolérance et d'extrusion et de pouvoir proposer un matériau dédié.

Cependant chez l'animal, afin d'éviter une contamination massive aéroportée et des traumatismes excessifs, il est nécessaire d'éviter les animaux aux comportements sociaux et de recherche alimentaire nasaux trop prononcés (chien, cochon). Il est nécessaire d'avoir des animaux adultes afin que la croissance ne puisse pas interférer avec les résultats d'une réparation tissulaire. Son museau doit permettre un accès facile au septum nasal antérieur et proposer une surface et des espaces de travail suffisant. Le cochon n'est pas pour ces raisons un animal adapté, trop volumineux à l'âge adulte, au comportement de fouissement trop septique et traumatisant, et possède en arrière de la columelle un os rostral.

Cependant le lapin et le mouton répondent à ces critères. Le premier semble avoir été l'espèce la plus utilisée en rhinologie expérimentale, pour laquelle on dispose de nombreuses données de comparaisons anatomiques et histologiques avec l'homme.

Il a donc été utilisé pour nos travaux comme premier modèle animal d'autant que les similitudes morphologiques en microscopie optique avec l'épithélium respiratoire nasal humain sont importantes, de telle sorte que son épithélium est parfois utilisé pour la formation des étudiants en médecine dans certaines universités (Erkhan et al 2004). Adulte il offre un bon rapport entre la taille du septum et celle des fosses nasales dans les trois plans de l'espace. La profondeur et la hauteur du septum cartilagineux permettent d'obtenir des perforations septales de taille significative sans que les processus normaux de cicatrisations n'entraînent leur fermeture spontanée.

Par contre, la physiologie respiratoire du mouton se rapproche plus de celle de l'homme que celle du lapin car il est macrosomatique. Il offre un septum cartilagineux et des fosses nasales de grandes tailles aux proportions similaires. L'espace disponible et l'épaisseur des tissus permettent d'utiliser les mêmes principes chirurgicaux que ceux utilisés chez l'homme. La taille de l'implant (longueur, largeur, épaisseur) utilisable devient proche de celle qu'on pense utiliser chez l'homme. Il fournit des surfaces septales suffisamment grandes pour permettre un modèle de perforation, plus étendues que chez le lapin, d'une taille se rapprochant de celles le plus souvent rencontrées chez l'homme en zone 2/3 de Cottle. L'agrandissement de la surface de perforations entre les deux modèles animaux, apporte un critère de validité quand aux résultats obtenus, le challenge chirurgical de fermeture étant proportionnel à la surface à recouvrir.

Cependant, le mouton a exceptionnellement été utilisé en rhinologie expérimentale et, de manière plus transversale, peu de données anatomiques et histologiques sont disponibles dans la littérature sur cette espèce concernant l'organe naso-sinusal.

Ainsi, afin de s'assurer de la pertinence de nos choix, de la validité de nos modèles, et d'augmenter la fiabilité des résultats pour être transposés à une autre espèce un premier travail d'anatomie et d'histologie comparée a été réalisé pour ces trois espèces.

A. ANATOMIE COMPAREE DU LAPIN, DU MOUTON ET DE L'HOMME.

L'organe nasal a une structure tridimensionnelle dédiée. Elle est indispensable à l'optimisation et au bon fonctionnement de ses multiples fonctions intriquées. La surface

muqueuse déployée est chez l'homme de 150 à 200 cm² soit 4 fois plus que la trachée (Guilmette 1989).

S'il existe des similitudes architecturales concernant les espaces ventilatoires des fosses nasales chez les mammifères, il existe aussi des différences spécifiques selon les espèces. L'homme a un nez relativement simple, dédié en premier lieu à la respiration (microsmatique), alors que les mammifères domestiques ont un nez plus complexe, notamment pour les structures turbinales, dédié en premier lieu à l'olfaction (macrosmatique) (Reznik 1990).

Dans le plan frontal chez tous les mammifères, le nez, organe impair et médian, est divisé en deux par le septum nasal (Fig 1). Présent de la pointe du nez jusqu'au cavum, il sert de support et de guide au cours de la croissance à la pyramide nasale (Sarnat 1970, Vetter 1984a et b) et conditionne à tous âges les qualités rhéologiques des courants aériens lors de la respiration.

Chez l'homme, le nez a été divisé artificiellement en deux dans le plan sagittal par une ligne reliant de profil le nasion au pogonion (ligne faciale), séparant le nez externe (pyramide nasale), des cavités nasales et paranasales proprement dites.

Le nez externe comporte chez l'homme 3 étages pour lesquels le septum joue un rôle fondamental statique et dynamique et qui sont, de la base vers la racine du nez (Fig 1H):

- l'étage mobile qui comprend les cartilages inférieurs latéraux (CLI),
- l'étage semi-mobile qui comporte le cartilage septo-latéral (ou unité septo-latérale) constitué du cartilage quadrangulaire et de ses expansions latérales, les cartilages latéraux supérieurs (CLS),
- l'étage fixe constitué par l'auvent des os propres du nez (OPN). Ils constituent chez toutes les espèces la limite supérieure des orifices piriformes mais chez l'animal en raison de leur morphologie ils constituent aussi la majeure partie du toit des fosses nasales constituée chez l'homme essentiellement par la base du crâne (Fig 1).

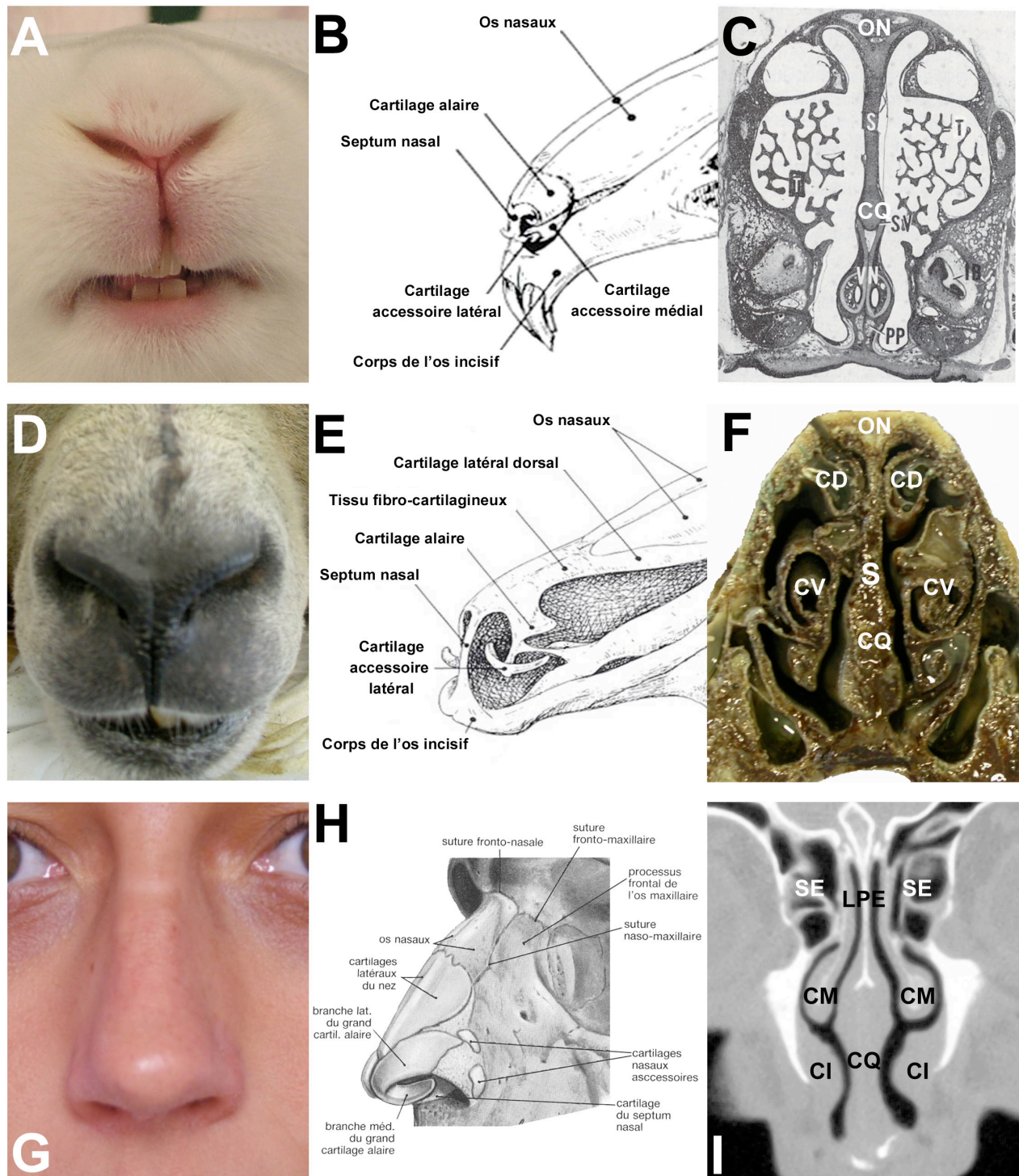


Figure 1 : anatomie et évolution phylogénétique de l'extrémité antérieure des fosses nasales.

(A-C) lapin, (D-F) mouton, (G-I) homme. (A, D, G) anatomie externe de la pyramide nasale selon les espèces, (B, E, H) charpente cartilagineuse antérieure selon les espèces. (C-I) coupes frontales passant par le milieu des Os nasaux (ON) chez l'animal et l'apophyse crista galli chez l'homme. S=septum. LPE=Lame Perpendiculaire de l'Ethmoïde. SE=Sinus Ethmoïde, CQ=Cartilage quadrangulaire. CM=corneet Moyen. CI=Corneet Inférieur. CD=Corneet Dorsal. CV=Corneet Ventral. VN=Organe Voméro-Nasal. PP=Processus Palatin du maxillaire. (Images B,E issue Barrone 1984)

Le nez externe est moins bien délimité chez les mammifères domestiques en raison du développement du massif facial. La racine du nez qui semble chez l'homme s'enclaver entre les orbites, est beaucoup plus large surtout chez les ongulés où elle se continue sans démarcation avec le front, le dos du nez et la pointe, sur laquelle s'ouvre ventro-latéralement les narines (Fig 1). Alors qu'elle est nettement saillante et bien séparée de la lèvre supérieure chez l'homme, la pointe du nez tend à se confondre avec elle chez le mammifère pour constituer le rostrum. Il correspond donc chez l'homme au revers inférieur de la pointe du nez et au bord caudal du septum nasal. Chez l'animal, les narines sont dirigées vers l'avant, elles s'étirent latéralement et dorsalement de telle sorte que l'aile du nez qui forme chez l'homme la bordure latérale et mobile de la narine, devient dorsale, voire dorso-médiale (Fig 1). Ainsi l'extrémité de l'orifice la plus antérieure chez l'homme reste médiale chez l'animal, l'extrémité postérieure devient latérale ou dorso-latérale. Il se dessine alors une fente narinaire chez le mammifère dont le bord dorsal est l'équivalent de l'aile du nez chez l'homme, convexe, mobile, tendue par une lame cartilagineuse appartenant au cartilage alaire. Il s'agit donc de l'étage mobile pour lequel le cartilage alaire est l'équivalent chez l'homme du CLI à la différence essentielle chez l'animal que la crur mésiale peut se raccourcir beaucoup (lapin) ou même disparaître complètement (Ruminants) (Fig 1B, E, H) (Barrone 1984).

L'étage semi-mobile, perceptible entre les deux narines chez l'homme est assez peu mobile chez les mammifères domestiques. Il est constitué de l'unité septo-latérale et forme de manière symétrique, une unité anatomique et fonctionnelle entre le cartilage septal et les CLSs. Elle est la clé de voûte de la partie antérieure de la fosse nasale. Le CLS chez l'homme est appelé cartilage latéral dorsal chez l'animal et correspond à une expansion formée par le bord dorsal du cartilage septal pour compléter l'os nasal qu'il déborde rostralement et sur le côté jusqu'au fond de l'incisure naso-incisive. Il est large et allongé chez les ruminants et parfois absent chez le lapin (Fig 1B, E, H).

Le septum nasal est quant à lui constitué de l'avant vers l'arrière d'une mosaïque d'éléments : membraneux, cartilagineux, osseux, recouverts d'éléments cutanés et muqueux. Ces éléments, de morphologie différente, sont adaptés aux contraintes

alimentaires, respiratoires et olfactives des espèces mais ont la même disposition anatomique générale les uns par rapports aux autres.

1. La columelle

Chez l'homme, elle va de l'extrémité supérieure du philtrum à la pointe du nez (Fig 2 A-C). Médiane, elle sépare les deux orifices narinaux. Elle est constituée de lambeaux cutanés armés par les crus médiales des CLI (Fig 2B). Elle constitue une courbe arciforme de profil qui prolonge vers le bas les reliefs du dorsum nasal et de la pointe. Elle forme l'angle naso-labial (ANL) avec la lèvre supérieure. Cet angle devient obtus dans les nez ensellés et son ouverture est un élément important pour déterminer la trajectoire des courants aériens (Fig 2). Elle est inexistante chez l'animal, la columelle étant verticale et confondue avec la lèvre supérieure (Fig 1A,D).

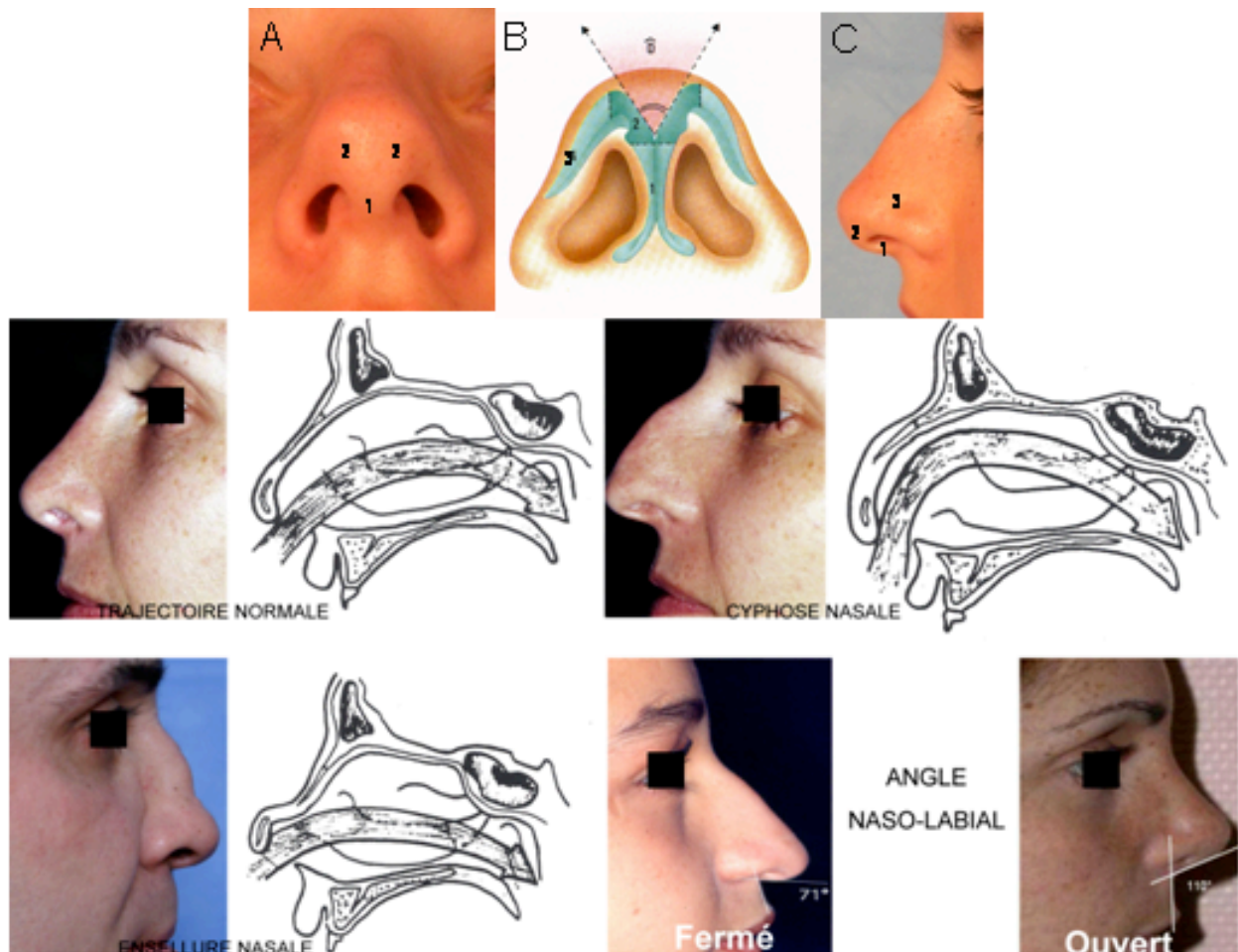


Figure 2 : anatomie de la columelle chez l'homme et orientations des courants aériens en fonction de la morphologie de la pyramide nasale et de l'angle naso-labial.

1= columelle armée des crus mésiales des CLI, 2=crus intermédiaires, 3= crus latérale, \checkmark =angle inter-dômial (schéma ventilation issus de Pasquet 1974).

2. Le septum membraneux

Situé en arrière de la columelle et en avant du septum cartilagineux, il est constitué de 2 lambeaux cutanés recouvert de vibrisses et séparés par un tissu conjonctif peu dense réalisant ainsi un plan de glissement. Il constitue la paroi interne des vestibules nasaires. Cette partie membranacée est moins distincte et moins étendue en proportion chez les mammifères domestiques que chez l'homme (Barrone 1984).

3. Le septum cartilagineux

Il est constitué du cartilage quadrangulaire (CQ) et de ses expansions latérales constituant ainsi l'unité septo-latérale. Cet ensemble est situé dans une loge dont les parois sont constituées de périchondre. Il existe entre ces deux structures un plan de clivage naturel utilisé pour la chirurgie septale.

Chez toutes les espèces, les lames périchondrales de la loge septale se prolongent sous la voûte cartilagineuse, recouvrent la partie inférieure des CLS en haut, et en bas, fusionnent avec l'étui périosté qui recouvre les éléments osseux, de telle sorte que dans toutes les directions, le périchondre est en continuité avec le périoste des os voisins.

Le cartilage septal du lapin a une épaisseur moyenne de 0,8 mm, de 4 mm chez le mouton et de 2 mm chez l'homme (Fig 3A, D, G). Il est plus épais chez l'homme en arrière qu'en avant (4 mm). Il présente aussi un épaississement à sa jonction avec la lame perpendiculaire de l'ethmoïde (sous les ON) et à son bord inférieur à sa jonction avec le prémaxillaire, le maxillaire et le vomer (Fig 3D, H).

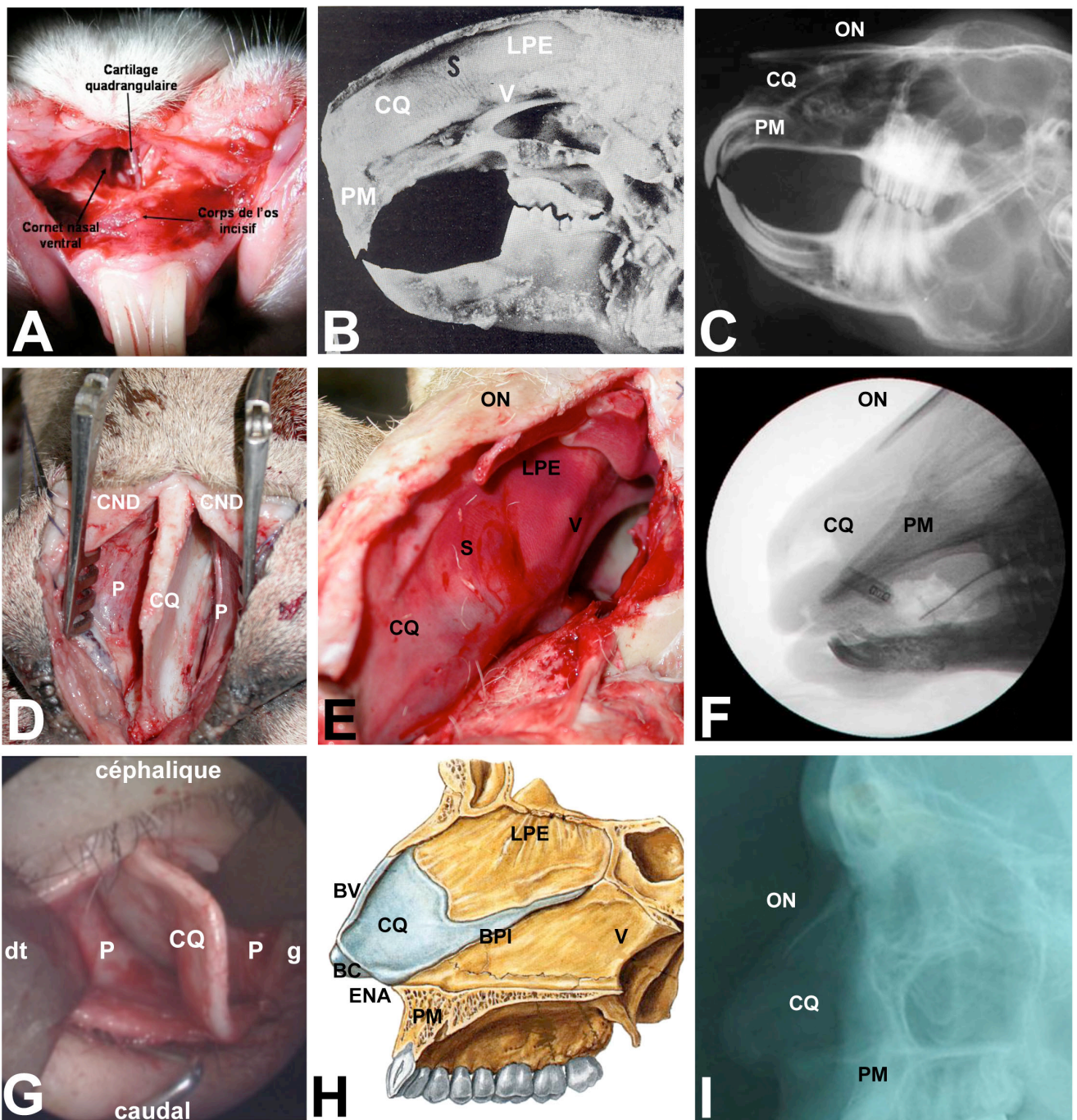


Figure 3 : Anatomie comparée du septum nasal.

Septum nasal du lapin (A-C), du mouton (D-F), de l'homme (G-I). S=septum, CQ=Cartilage quadrangulaire, LPE=Lame Perpendiculaire de l'Ethmoïde, ON=Os Nasal, V=Vomer, PM=PréMaxillaire, CND=Cartilage Nasal Dorsal, P=Périchondre, BV=Bord Ventral du CQ, BC=Bord Caudal du CQ, BPI=Bord Postero-Inférieur du CQ, ENA=Epine Nasale Antérieure. (Images B et C issues de Sarnat 1970)

Chez les mammifères domestiques et chez l'homme, le cartilage quadrangulaire présente 4 bords (Fig 3H):

- le bord antéro-supérieur ou ventral :

Il joue un rôle fondamental dans la forme et la direction de l'arête nasale cartilagineuse (tiers moyen et inférieur du dorsum). De haut en bas il présente :

- une partie fixe céphalique, de quelques millimètres de longueur, encastrée sous la partie médiane des os propres du nez (OPN) avec les CLS, sur une distance variant de 3 à 4 mm en position médiane et qui atteint 3 à 11 mm en position latérale, en fonction du degré d'absorption de la capsule nasale cartilagineuse par les os de membrane constituant les os propres du nez. Présente chez tous les mammifères, la jonction de l'unité septo-latérale à la voûte osseuse constitue une zone d'une importance capitale sur le plan de l'architecture nasale. C'est la Keystone area ou zone 'K' de Cottle, clé de voûte où convergent les différents éléments qui assurent le soutien de la pyramide nasale (Fig 4).

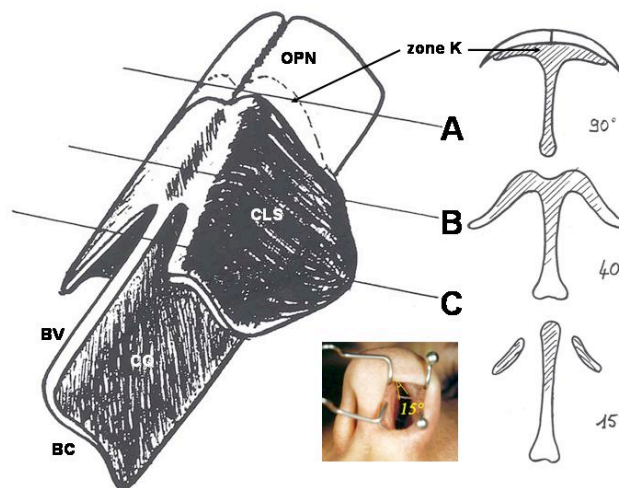


Figure 4 : Unité septo-latérale chez l'homme

Les OPN viennent recouvrir comme une tuile la partie supérieure de l'unité septo-latérale. Dessous, l'angle formé par cette voûte et le septum nasal, décroît de haut en bas et de l'arrière vers l'avant afin d'obtenir une valve nasale de 10 à 15° essentielle pour une bonne administration de l'air dans la cavité nasale.

- une partie plus longue constituant la partie moyenne de l'arête nasale cartilagineuse, lieu d'union avec les CLS
- une partie inférieure, qui répond à l'aponévrose nasale unissant le bord inférieur des CLS aux dômes et aux crus latérales des CLI.

Chez l'homme, l'angle formé par le cartilage septal et les CLS décroît de 90° à la partie céphalique fixe, vers sa partie inférieure, semi-mobile, où il est de 10 à 15° au niveau de la valve nasale. Cette valve, zone la plus étroite de la filière respiratoire nasale est constituée par le cartilage septal en dedans et le bord inférieur des CLS qui détermine un relief endonasal, la 'plica nasi' (Fig 4).

A sa partie inférieure, le bord ventral du cartilage septal se prolonge avec un angle arrondi, l'angle septal, par le bord caudal. A ce niveau le cartilage est uni par un tissu fibreux lâche aux CLI.

- le bord caudal (Fig 3H),

il va de l'angle septal en regard du lobule jusqu'à l'épine nasale antérieure (ENA). Dans sa partie supérieure, il est uni par du tissu fibreux à la partie supérieure des crus mésiales. Dans sa partie moyenne, il se projette dans l'espace compris entre les deux crus mésiales dont il reste séparé par le septum membraneux. Il est uni dans sa partie inférieure avec l'ENA.

C'est la partie du cartilage la plus exposée au traumatismes si bien que le cartilage, très mince à cet endroit apparaît fréquemment fissuré, fracturé, voire luxé dans un plan frontal par suite de traits de fractures verticaux.

- le bord postéro-inférieur

Chez l'homme, il s'agit d'une zone d'épaississement du cartilage septal qui est en rapport avec les éléments constitutifs du socle septal. Il est souvent le siège de déformations par suites des modalités de croissance, à type de fractures horizontales, de luxations du socle osseux ou des deux combinées (Fig 5).

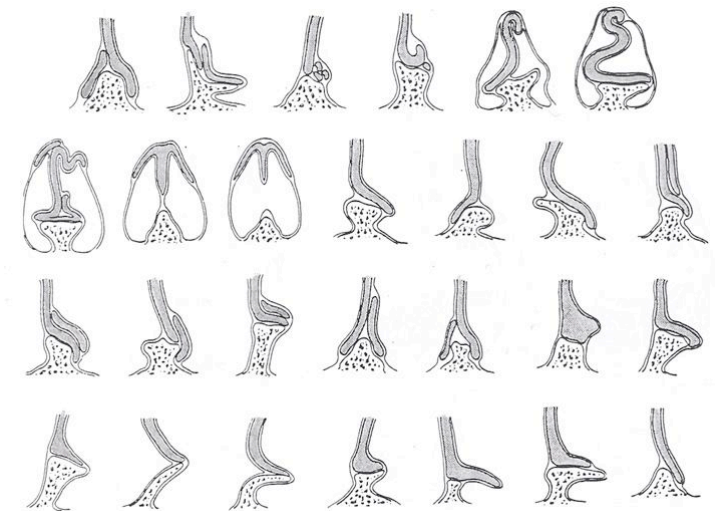


Figure 5 : Différentes déformations septales induites par la croissance.

Chez l'homme, induites par la vitesse de croissance supérieure du cartilage quadrangulaire dans son cadran osseux jusqu'à la fin de l'âge adulte entraîne des luxations et plicatures en raison du manque de place laissé par le carcan osseux (Soudant. 1989).

Il est en rapport successivement de l'avant vers l'arrière avec :

- l'ENA, qui forme une saillie proéminente médiane sur le plancher de l'orifice piriforme, prolongeant en avant les deux ailes du prémaxillaire. Elle est volumineuse chez l'homme et sert d'appui aux principales zones de croissance cartilagineuses tout au long de la croissance pour projeter le nez externe vers l'avant.
- le pré-maxillaire (PM) ou os incisif joue un rôle prépondérant notamment chez le lapin et le mouton lors de la croissance pour la projection de tout le massif facial. Il est formé de 2 ailes plus ou moins accolées surmontant la crête nasale du maxillaire et formant un rail au cartilage (Fig 3).
- Le vomer forme par son bord antéro-supérieur un rail au cartilage en arrière du pré-maxillaire.

A la jonction entre le bord postéro-inférieur du CQ, le prémaxillaire et l'ENA, les feuillets externes périchondraux et périostés sont en continuité homolatérale alors que les feuillets internes fusionnent sagittalement avec les feuillets controlatéraux à l'intérieur de l'espace médian situé entre l'ENA et le cartilage. A cet endroit la suture est élargie par cet

entrelacement périchondro-périosté. C'est au dessus de cette jonction que les vaisseaux pénètrent le cartilage.

A la différence de l'homme, le bord postéro-inférieur du cartilage septal n'est pas chez l'animal en contact direct avec son socle osseux par interposition de l'organe voméro-nasal de Jacobson (Fig 1C). Chez le mammifère les cartilages vomériens de Jacobson se trouvent quelques millimètres en arrière de l'ENA sous forme de deux lamelles. Cet organe est vestigial chez l'homme est le plus souvent absent.

- le bord postéro-supérieur

Il est uni à la LPE. A ce niveau, le périoste et le périchondre sont en continuité. Il n'y a pas de tissu conjonctif entre les deux structures. Ce bord présente un prolongement sphénoïdal surtout accusé chez l'homme, s'insinuant dans une rainure entre le bord inférieur de la lame perpendiculaire de l'ethmoïde et le vomer (fig 3H).

4. Le septum osseux (Fig 3)

Chez l'homme, le lapin et le mouton, la partie osseuse du septum nasal est composée par la LPE en haut et le vomer en bas, lieu de rencontre entre une ossification enchondrale (ethmoïde) et membraneuse (vomer).

Chez l'homme, la LPE à une forme pentagonale. Elle est limitée en haut par les lames criblées de l'ethmoïde, en arrière par la crête sphénoïdale antérieure, en avant et en haut elle se soude avec l'épine nasale du frontal et la suture médiane des os propres du nez. En avant et en bas elle est solidement imbriquée avec le cartilage septal entre les deux feuillets périchondro-périostés. En arrière et en bas elle s'unit par un dédoublement aux deux lèvres correspondantes du vomer et entre lesquelles s'insinue le prolongement postérieur du cartilage septal.

Le vomer, mince mais solide chez l'homme, s'intercale entre la lame perpendiculaire de l'ethmoïde et le cartilage septal en avant et la voûte palatine en bas. Son bord supérieur oblique en bas et en arrière est divisé en deux lamelles osseuses, les ailes du vomer, qui s'appuient sur la face inférieure du corps du sphénoïde. Son bord inférieur, horizontal, s'articule avec la crête nasale formée par la saillie supérieure de la fusion médiane des lames horizontales des palatins en arrière et des apophyses palatines des maxillaires supérieurs en

avant. Son bord antéro-supérieur, oblique en bas et en avant est creusé d'une gouttière qui reçoit la lame perpendiculaire de l'éthmoïde et le cartilage septal.

5. Le socle osseux (Fig 3).

Le socle osseux du septum nasal est constitué chez l'homme de l'avant vers l'arrière du PM, bien moins développé que chez les herbivores, des apophyses horizontales des os maxillaires et palatins. L'ensemble de cette surface osseuse est percé entre le PM et le maxillaire du foramen incisif lieu de passage de l'artère naso-palatine, et forme une surface légèrement voûtée pour constituer le toit de la cavité buccale et le plancher des fosses nasales. Les sutures médianes de ces différentes parties viennent s'évaser vers le haut de l'avant vers l'arrière pour constituer une gouttière sagittale sur laquelle le CQ est posé et fixé (Fig 3H).

Chez le lapin, le palais dur est représenté essentiellement par un pont osseux étalé entre les prémolaires et les molaires (Fig 3B,C). Immédiatement en avant la surface palatine est perforée par les foramens incisifs (symétrique), largement ouvert vers la fosse nasale. Latéralement, les palatins s'articulent de chaque côté avec le processus palatin du maxillaire réservant chacun un foramen palatin. Plus en avant le corps de l'os PM forme le reste de la surface du palais et les berges latérales des foramens incisifs. Le processus frontal du PM qui n'existe pas chez l'homme (processus frontal du maxillaire), forme une lame étroite qui longe le bord postérieur des os propres du nez et vient s'articuler en arrière avec le processus prémaxillaire de l'os frontal.

Chez le mouton, la structure palatine est différente. Si les mêmes structures osseuses que chez l'homme sont présentes, il n'existe pas d'incisives, ni de canines à la mâchoire supérieure. A leur niveau, la lame dentaire régresse puis disparaît sans produire de véritables bourgeons dentaires. Par contre, à cet emplacement se développe un fort bourrelet fibreux revêtu d'une muqueuse épaisse, le coussinet dentaire.

6. Vascularisation

La vascularisation du septum nasal provient des deux territoires carotidiens (interne et externe) fournissant respectivement : les artères ethmoïdales antérieure et postérieure pour le premier et, la branche naso-septale de l'artère sphéno-palatine et l'artère naso-palatine pour le second. La sous-muqueuse représente le lieu de passage des vaisseaux dans lequel ils s'anastomosent en un réseau complexe. Cette vascularisation est plus développée chez le mouton en raison d'un réseau de glandes séro-muqueuses plus abondant et de capacités sécrétrices supérieures que dans les deux autres espèces. Le cartilage septal n'a pas de vascularisation propre. Son homéostasie dépend de la vascularisation sous-muqueuse. Il ne peut donc garder son intégrité qu'à condition qu'au moins un des deux lambeaux muco-périchondraux soit présent.

B. HISTOLOGIE COMPAREE DU LAPIN, DU MOUTON ET DE L'HOMME

1. Le cartilage septal et le périchondre

Dans toutes les espèces, le cartilage septal est un cartilage hyalin peu différent du cartilage articulaire au sein duquel les chondrocytes, seule composante cellulaire, sont entourés d'une matrice extra-cellulaire (MEC) à prédominance de collagènes, de laminines, de fibronectine et de GlycosAminoGlycanes (GAGs). Ces chondrocytes n'ont pas entre eux de contact direct et semblent répartis en 3 couches (Popko et al 2007) (Fig 6). A la périphérie, ils apparaissent plus nombreux, aplatis, plus petits et orientés parallèlement à la surface du cartilage. Au centre du cartilage, la densité de chondrocytes est la plus faible regroupant des cellules matures sphériques, vacuolisées, mesurant 20 μm de diamètre et alignés en colonnes plus ou moins bien organisées perpendiculairement à la surface. Entre les deux, existe une zone intermédiaire dans leur nombre et leur forme (Popko et al 2007). Sur toute l'épaisseur du cartilage ces chondrocytes ont un très faible index mitotique et sont à l'origine de la MEC.

La MEC est constituée essentiellement de 77,7 % d'eau, 7,7 % de collagènes, 2,9 % de GAGs par gramme de cartilage sec contre respectivement 65 à 75 % d'eau, 15 à 20 % de collagène, 3 à 6 % de GAGs par gramme de cartilage articulaire. Par contre sa cellularité est supérieure d'environ 20 % : 24,9 million versus 14 à 18 million de cellules par gramme de cartilage sec. Son contenu hydrique et collagénique ne varie pas quantitativement avec l'âge, ce qui n'est pas le cas des GAGs (chondroïtines sulfates) qui diminuent d'environ 7,7 % par décade, et de la densité cellulaire qui décroît de 7,4 % par décade (Homicz 2003).

Les protéoglycanes sont représentées principalement par la chondroïtine-4-sulfate. Elles sont présentes dans le cytoplasme des chondrocytes et dans le microenvironnement périphérique. Il existe un gradient de laminines décroissant de la périphérie des chondrocytes vers le centre du cartilage : elles sont présentes essentiellement dans le cytoplasme des chondrocytes et immédiatement autour de la cellule. Ces deux groupes de molécules n'ont pas d'immunomarquage positif à l'intérieur de la MEC proprement dite. A l'inverse, l'immunomarquage de la fibronectine augmente de la périphérie vers le centre, et est surtout présente dans le microenvironnement périchondrocytaire (Üstünel et al 2003). Les fibres de collagènes sont essentiellement de type II (90-95 %), mais aussi de type IX et XI, présentes à la fois en périphérie et au centre de la matrice (Buckwalter et Mankin 1998, Üstünel et al 2003). Il existe un gradient de maturation des fibres de collagène de la périphérie vers le centre (Popko et al 2007). Les fibres sont alignées perpendiculairement à la surface dans la partie centrale alors que les couches sous-périchondrales présentent des fibres parallèles à la surface venant entourer les chondrocytes immatures non vacuolisés (Verwoerd-verhoef et al 1998b). Le collagène de type II est réparti sur toute l'épaisseur du cartilage avec quelques zones plus denses périphériques. Il n'y a pas, par contre de collagène de type I (Popko et al 2007).

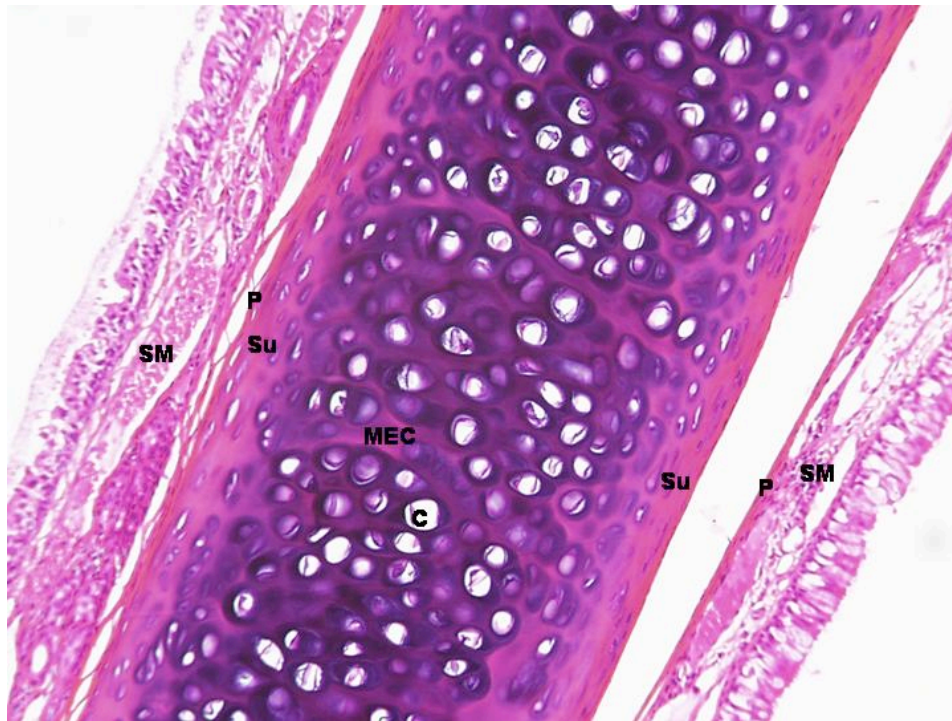


Figure 6 : vue en microscopie optique du cartilage septal de lapin.

Microscopie optique x4, coloration H.E.S. MEC= Matrice extra-cellulaire. Su=couche superficielle dans laquelle les fibres de collagènes sont parallèles à la surface entourant des chondrocytes immatures. P= périchondre. C=chondrocytes matures vacuolisés. SM=sous-muqueuse. L'épaisseur de la muqueuse est de $37,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$, du périchondre de $13,5 \pm 3,9 \mu\text{m}$ et du cartilage de $455 \pm 161,3 \mu\text{m}$ (Erkhan et al 2004).

La porosité du cartilage articulaire humain natif est d'environ 78 %, son module d'élasticité de 0,79 MPa et sa résistance aux contraintes de cisaillement de 0,68 MPa (Armstrong and Mow 1982). La résistance à la compression (module de Youngs) du cartilage septal natif est d'environ 15 N/mm^2 (Haisch et al 2005). Dans cette étude, le point de rupture du cartilage septal a été calculé en déterminant le rapport de la force maximale administrée divisée par la surface du piston et était d'environ 5 N/mm^2 . Pour Richmon et al, le module de compression du cartilage septal humain est de 0,7 MPa dans le sens antéro-postérieur, de 0,66 MPa dans le sens cranio-caudal, et de 0,44 MPa dans le sens transversal (Richmon et al 2006).

Le périchondre septal de l'homme est fait d'une seule couche dense de fibres de collagène et élastiques d'une épaisseur approximative de 150 à 200 μm chez des personnes âgées entre 68 et 87 ans (Popko et al 2007). Les fibres élastiques sont très éparses et l'essentiel du périchondre est constitué de collagène de type I. Il n'y a pas de collagène de

type II. La zone de transition avec le cartilage n'est pas bien définie. Certains auteurs parlent d'unité fonctionnelle en raison du rôle du périchondre dans la résistance mécanique du septum (Popko et al 2007). Seule, sa résistance à l'étirement est en moyenne de 1370 g, couplé à la muqueuse, elle est de 2340 g (Kim et al 2005). Ces tissus mous sont les seuls garants de la solidité du septum après septoplastie (Kim et al 2005).

2. La muqueuse nasale

Chez l'animal la région respiratoire occupe la majeure partie des cavités nasales (Barrone 1984). Elle est plus développée que chez l'homme et l'espace y est occupé par des structures turbinales complexes. Entre les deux le septum nasal, joue un rôle de guide et participe au conditionnement de l'air inspiré. Dans toutes les espèces ces cavités sont recouvertes d'une sous-muqueuse dont l'épaisseur varie et d'une muqueuse proprement dite (lame basale et épithéliums de surface).

a. La sous-muqueuse ou lamina propria

Il n'y a pas beaucoup de différence entre l'homme et les autres mammifères dans l'organisation de la sous-muqueuse. Chez les mammifères domestiques, elle est molle, spongieuse, dépourvue de papilles. Sa partie superficielle est formée de tissu conjonctif lâche, délicat, infiltré de leucocytes. Sa partie profonde se densifie progressivement en fibres conjonctives et élastiques. Elle renferme des glandes tubulo-acineuses ramifiées de types séro-muqueux (purement muqueux chez le lapin, mixtes et très abondantes chez le mouton). Elles sont regroupées en petits bouquets d'aspect lobulaire, drainés par des canaux excréteurs presque rectilignes dont le revêtement prend rapidement les caractéristiques de l'épithélium de surface. Ces glandes nasales sont généralement plus abondantes sur le septum que sur la tête des cornets. En dessous de la couche glandulaire, existe un réseau vasculaire très riche à capacité variable (plexus veineux) dont les parois sont constituées de fibres conjonctives et élastiques. Sa densité est moindre sur le septum que sur les cornets mais l'organisation est là encore peu différente entre l'homme et les autres mammifères (Fig 7) (Barrone 1984, Reznik 1990).

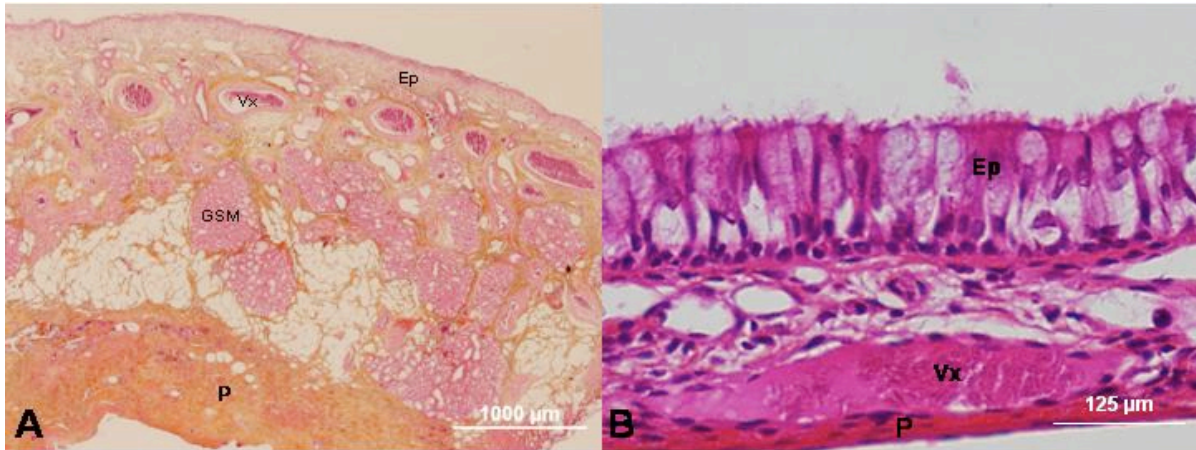


Figure 7 : Organisation de la sous-muqueuse chez le mouton (A) et le lapin (B)

(Ep) épithélium respiratoire, (Vx) réseau vasculaire de la sous-muqueuse, (GSM) glandes sous-muqueuses, (P) périchondre. Microscopie Optique, coloration H.E.S..

Chez l'homme, la lame basale directement sous l'épithélium est formée de collagène de type IV, de laminines et d'héparane sulfate. Les collagènes de types I - II - III et V sont présents dans les couches sous-jacentes, le collagène de type VI étant réservé aux zones d'ancrages de la basale (Agha-Mir-Salim et al. 1993). Ces composants de la matrice extracellulaires (MEC) jouent un rôle dans la différenciation cellulaire et notamment la ciliogénèse (Neugebauer et al. 2003). Barrone remarque que chez l'animal, l'épithélium repose sur une membrane basale plus épaisse que chez l'homme sans que l'auteur ne donne de mesures précises (Barrone 1984).

b. Les épithéliums de surface nasal

L'homme et les différentes espèces de mammifères possèdent un certain nombre de similitudes et de différences dans les épithéliums de recouvrement des cavités nasales. La principale similitude est l'existence, quelle que soit l'espèce, de 4 épithéliums : épidermoïde pavimenteux pluristratifié squameux (ES), cuboïde transitionnel (ET), cylindrique pseudostratifié cilié respiratoire (ER) et olfactif (EO) (Harkema 1991 et 2006 ; Reznik 1990). La distribution de l'ES et de l'EO est peu différente adaptée à la phylogénèse de chaque espèce. L'ES reste toujours cantonné à la lumière de l'orifice narinaire et du vestibule nasal. La position et la surface de l'EO dépendent de la position de la base du crâne et des nécessités olfactives de chaque espèce. Par contre il existe de grandes différences dans la

distribution des deux autres types épithéliaux et dans leur composition cellulaire (Harkema 1991 et 2006 ; Reznik 1990). Cinq à six types cellulaires constitutifs de ces épithéliums ont été décrit : les cellules à mucus, les cellules ciliées, les cellules en brosse (microvillosités), les cellules non ciliées (avec ou sans granules), les cellules cuboïdes (avec ou sans granules) et basales. Il semble que certaines d'entre-elles soient des états intermédiaires de différenciation de telle sorte qu'on ne retient de commun entre les espèces que 4 types cellulaires : les cellules ciliées, non ciliées cylindriques ou cuboïdes, sécrétrices séro-muqueuses et basales.

La répartition des différents épithéliums de surface des fosses nasales a été faite chez le rat, la souris, le singe et l'homme en utilisant des coupes sériées parallèles à l'axe des incisives (Figure 8A-C) (Mery et al 1994, Harkema et al 2006). A notre connaissance, cette systématisation n'est pas disponible dans la littérature concernant le lapin et le mouton. Cependant, sans avoir utilisé la même méthodologie, l'analyse histologique de la muqueuse des zones 2 et 3 de Cottle, lieux qui nous intéressent pour la réparation des perforations septales chez le lapin et le mouton, montrait que la totalité du revêtement épithélial à cet endroit était de type respiratoire dans les deux espèces (figure 7B et 8D).

Chez le rat, l'ET est limité à la zone antérieure du mur latérale des fosses nasales. Chez le singe et l'homme il est présent aussi sur le septum antérieur sur une profondeur dont la mesure n'est pas précisée (Harkema et al 1987). Chez le rat cet épithélium est composé de 1 à 2 couches et de 3 types cellulaires contre 4 à 5 couches et 5 types cellulaires chez le singe dont les cellules non ciliées et les cellules cuboïdes sont les deux populations principales (Harkema 1991)

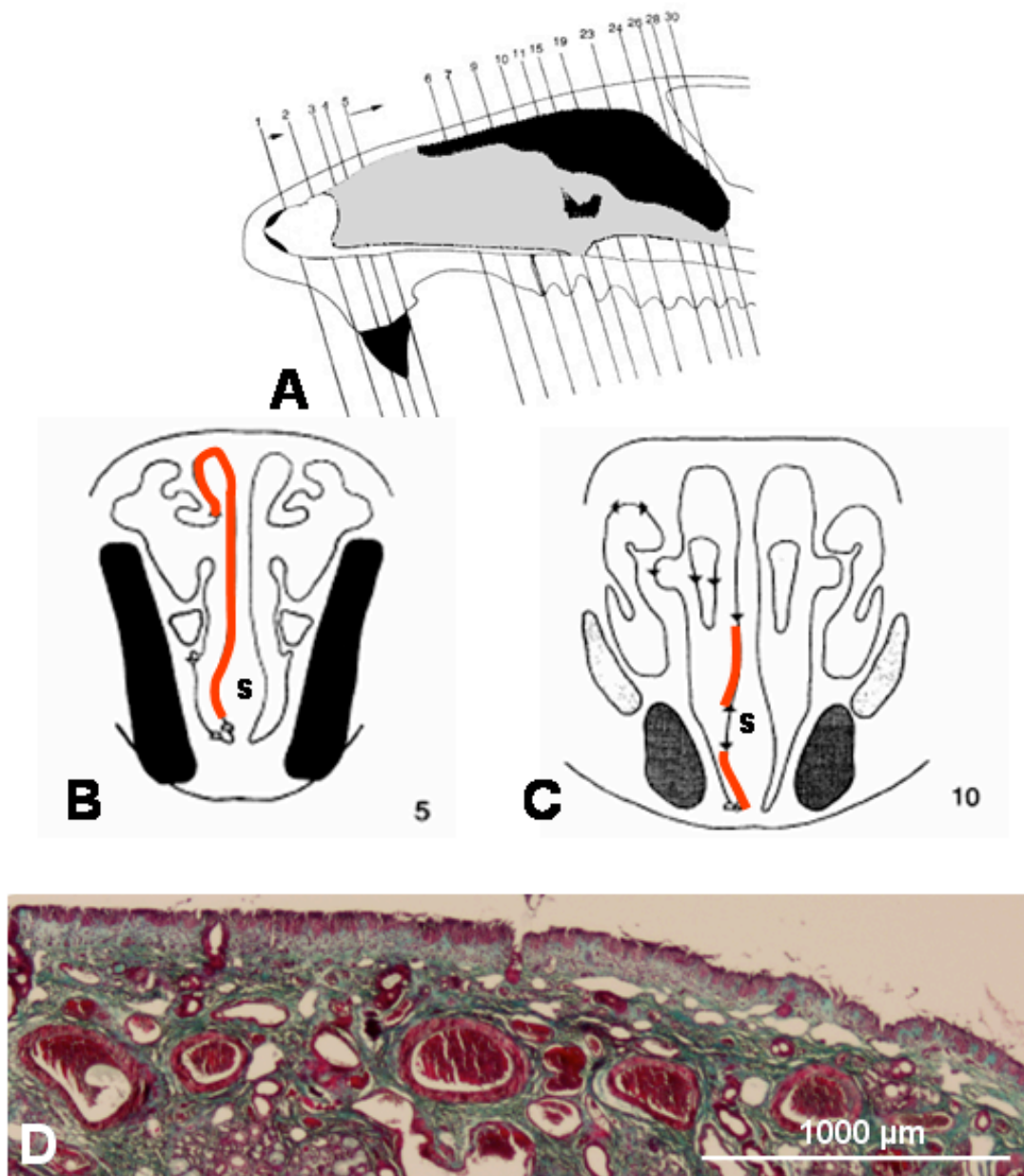


Figure 8 : Répartition de l'épithélium respiratoire sur le septum nasal selon les espèces

(A-C) Coupes sériées du septum nasal chez le rat montrant la présence d'un épithélium respiratoire pseudostratifié cilié et muqueux (traits rouges) dans les zone 2 et 3 de Cottle (Mery et al 1994), (D) épithélium respiratoire complètement différencié dans les mêmes zones chez le mouton (coloration au Pentachrome de Movat).

La même problématique existe pour l'étude de la composition cellulaire de l'épithélium respiratoire qui a bien été décrite dans la littérature chez le rat, la souris, le hamster, le singe, l'homme et le lapin mais n'a pas été décrite à notre connaissance chez le mouton. La cohabitation des cellules cylindriques ciliées et des cellules à mucus n'est pas systématique dans toutes les espèces. Les deux sont rarement ensemble chez le Hamster et le rat (Adams 1972). Pour d'autres, l'homme est l'espèce chez laquelle la surface épithéliale de cohabitation est la plus étendue (Reznik 1990). Cependant, sans avoir utilisé de

méthodologie pour une systématisation détaillée, cette cohabitation semble aussi importante chez le lapin et le mouton que chez l'homme (Figure 7B et 8D). Nos résultats pour le lapin sont corrélés à ceux obtenus par Erkhan et al qui avaient remarqué que cette cohabitation existait aussi sur le septum antérieur du lapin et que les similitudes morphologiques en microscopie optique avec l'épithélium respiratoire nasal humain étaient importantes (Erkhan et al 2004).

Sur le septum antérieur, la proportion des différents types cellulaires est chez le singe et chez l'homme : 39,5 % de cellules basales, 25 % de cellules sécrétrices séro-muqueuses, 36,5 % de cellules ciliées et en cours de différenciation et aucune cellule non ciliée avec ou sans granule de sécrétion (Harkema 1991). Reznik remarquait qu'il existait un gradient dans la répartition des différents types cellulaires (cuboïdal stratifié ou non, cylindrique faiblement cilié ou parfaitement différenciée) entre l'ES et l'EO chez les différentes espèces sur le septum et le mur latéral des fosses nasales (Reznik 1990). Chez le rat il existe une augmentation de la quantité de cellules ciliées de l'avant vers l'arrière sur le mur latéral des fosses nasales alors que leur densité est constante sur le septum nasal (Monteiro Rivier et Popp 1984). Chez le rat et le lapin, les cellules muqueuses sont prédominantes sur le septum dans sa partie proximale et à proximité du cavum (Harkema et al 1989). Chez l'homme il existe un gradient de répartition antéro-postérieur sur le septum (Morgensen et Tos 1977). Chez le mouton nous n'avons pas retrouvé de gradient.

3. Marqueurs de différenciation cellulaire épithéliale et respiratoire

Les cellules de l'épithélium respiratoire sont connues pour avoir une grande plasticité phénotypique. L'expression des molécules de surface et intracytoplasmique varie en fonction du degré de différenciation, des contraintes mécaniques (flux aérien, blessure mécanique) et de la composition de l'air respiré. La transformation métaplasique est un phénomène normal adaptatif de la muqueuse respiratoire à son environnement pour laquelle la diminution du nombre de cellules ciliées au profit des cellules à microvillosités est la première étape (Tabac, ozone, pollution...) (Torjussen 1979, Boysen et al 1986, Harkema et al 1989, Stosiek et al 1992). Par la suite l'épithélium est capable en dehors de tout

processus pathologique de passer d'une architecture pseudostratifiée à cuboïdale voire pavimenteuse de manière réversible (Gulisano et al 1996). La deuxième partie de notre travail d'histologie comparée était de savoir si les profils d'expression des cytokératines et des lectines étaient comparables entre les trois espèces avec des anticorps monoclonaux dédiés à l'immunomarquage de cellules humaines (anticorps commerciaux).

Les cytokératines (Ck) sont des filaments intermédiaires, composants essentiels du cytosquelette présent chez tous les mammifères. Leur expression cellulaire est fortement corrélée avec la voie de différenciation empruntée par la cellule et les tissus. C'est une famille de protéines codée par plusieurs gènes qui correspondent à des polypeptides fibreux intracellulaires, insolubles dans l'eau, présents dans les cellules épithéliales. Elles peuvent être séparées en fonction de leur immunoréactivité avec des anticorps monoclonaux de spécificité restrictive (Moll 1982 et 1993 ; Stosiek et al 1992) (Tableau 1).

CYTOKERATINES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Poids moléculaire (x10 ⁻³)	68	65.5	63	59	58	56	54	52.5	64	56.5	56	55	54	50	50	48	46	45	40	
pH isoélectrique	7.8	7.8	7.5	7.3	7.4	7.8	6	6.1	5.4	5.3	5.3	4.9	5.1	5.3	4.9	5.1	5.1	5.7	5.2	
Epiderme	+	(+)			+					+	+			+	(+)					
Epiderme anal	+	(+)			+	+				+	+		+	+	(+)	(+)	(+)			
glande sébacée				+	+	+				(+)	(+)			+	(+)		(+)			
Cornée			+		+							+								
Epithélium utérin	+	(+)		+	+	+							+	(+)	(+)	(+)			(+)	
Epithélium lingual				+	+	+							+	+	(+)	+	(+)		(+)	
Epithélium de l'épiglotte				+	+	+							+	+	+	+	(+)		(+)	
Epithélium œsophagien				+	+	(+)							+	(+)	(+)	(+)	(+)		(+)	
Epithélium trachéal					+	(+)	(+)	+					+	(+)	+		+	(+)	+	
Epithélium nasal							+	+											+	+
Epithélium amniotique					+	+		+						(+)			+	(+)	+	
Epithélium vésical					(+)		+	+					(+)					(+)	+	
Epithélium biliaire							+	+										+	+	

Tableau 1 : répartition de l'expression des cytokératines dans les différents épithéliums humains

(Moll et al 1982, Moll 1993 ; Stosiek et al 1992).

Les profils d'expression des différentes Cks dans les épithéliums sont maintenant bien connus chez l'homme et évoluent en fonction de la voie de différenciation choisie par les

cellules (Moll et al 1982). Les Cks 7, 8, 18, 19 sont habituellement exprimées dans l'épithélium cylindrique pseudostratifié cilié bronchique (Moll et al 1982, Moll 1993), trachéal et nasal (Bordenave et al 1992 et 1993 ; Hanamure et al 1994 ; Moll et al 1982, Moll 1993 ; Stosiek et al 1992). C'est aussi ce que nous avons observé dans les deux autres espèces pour la Ck 7 à la différence que son immunomarquage apparaît plus faible au pôle apical des cellules épithéliales et plus épars chez le mouton (Figure 9). Par contre, il est présent uniquement chez le mouton dans les glandes sous-muqueuses.

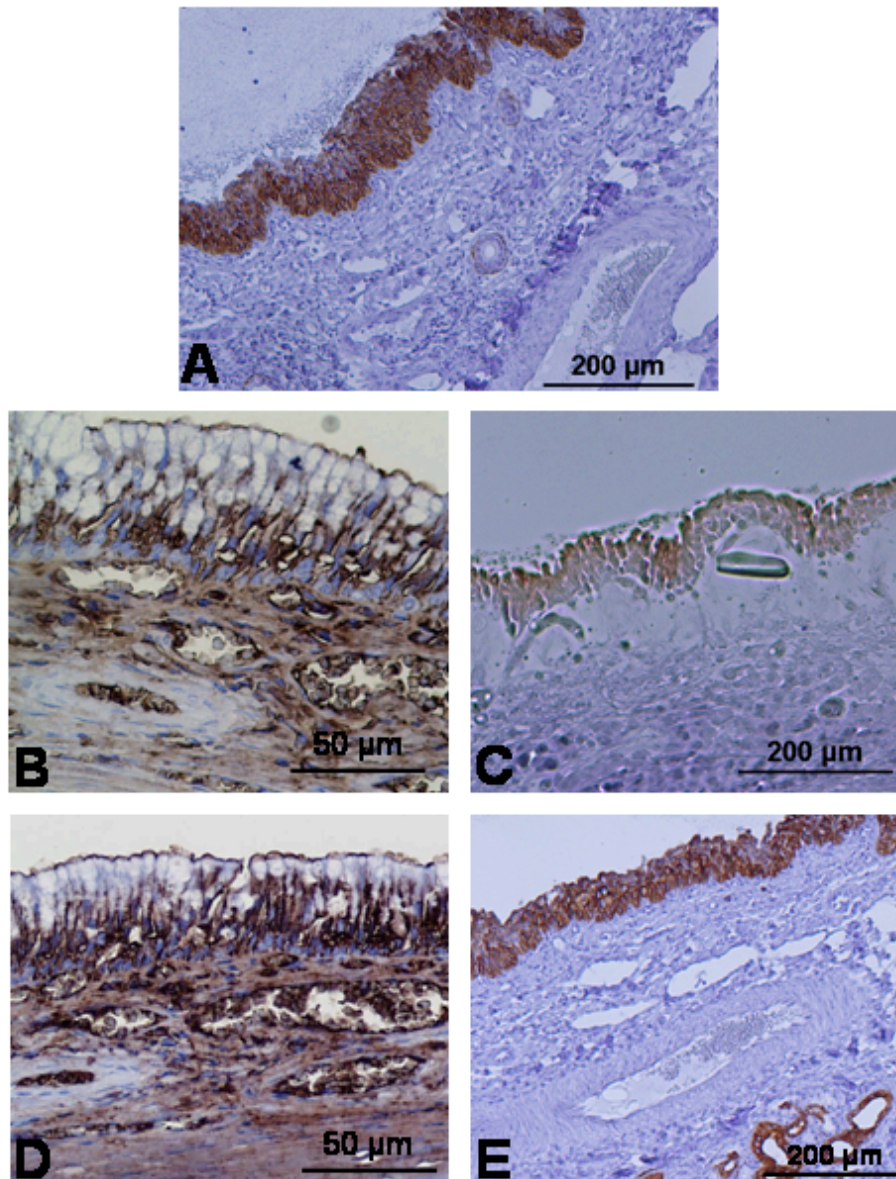


Figure 9 : Immunomarquages des cytokératines chez le lapin (B,D) et le mouton (A,C,E)

(A) Cks 5-6, (B,C) Ck 7, (D,E) Ck 903

Les cytokératines 5, 14, et 17 sont communément retrouvées dans les cellules immatures appartenant au compartiment régénératif des différents épithéliums. Cette présence dans les cellules basales ne change pas au cours des modifications phénotypiques

lors des transformations métaplasiques de l'épithélium nasal (Stosiek et al 1992). A l'inverse, les cytokératines 7, 8, 18 et 19 disparaissent lors du passage progressif d'un aspect cylindrique pseudo stratifié cilié à un épithélium épidermoïde stratifié squameux kératinisé au profit des cytokératines 5 et 6 (Stosiek et al 1992). La Ck 7 et 19 disparaissent précocement lors de la dédifférenciation de l'épithélium respiratoire. C'est aussi ce que nous avons observé pour la Ck 7 pour les deux espèces animales et particulièrement chez le mouton. Dans cette espèce comme chez l'homme, le marquage des Cks 5-6 apparaît rapidement dès le début du processus de différenciation et de métaplasie épidermoïde (Figure 9). Il est faiblement présent au pôle basal des cellules épithéliales des glandes sous-muqueuses chez le mouton. La Ck 903 (ou 34 β E12), spécifique des CKs 1, 5, 10 et 14, persiste même en cas de transformation épithéliale notamment à cause de l'expression de la Ck 14 au pôle basal des cellules basales. Cet immunomarquage correspond à la persistance de filaments intermédiaires cytoplasmiques, de desmosomes et de fibres d'ancrages de ces cellules au collagène de la lame basale (Nakajima et al. 1998). L'immunomarquage 903 semblait identique chez l'homme, le lapin et le mouton (Figure 9). Il est fortement présent dans l'épithélium des glandes sous-muqueuses chez le mouton contrairement aux deux autres espèces (Figure 8).

Les lectines sont des glycoprotéines présentes à la surface des cellules épithéliales et forment un ensemble de résidus hétérogènes d'hydrates de carbone. Elles jouent un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire et la croissance épithéliale par contact intercellulaire. Leur glycosylation aberrante est un fait commun de la transformation néoplasique : les modifications de l'antigénicité cellulaire, perturbent les communications intercellulaires, déséquilibrent les mécanismes de régulation de croissance et permettent d'échapper aux mécanismes de défenses immunologiques (Hakomori 1985).

L'Ulex European Agglutinin -I (UEA-I) est présente dans le cytoplasme et au pôle apical des cellules ciliées et des cellules à mucus. Elle est spécifique du phénotype respiratoire. Sa présence au niveau de la muqueuse nasale normale humaine et pathologique est connue (Fang and Ohyama 1997 ;Huang et al. 1994 ; Otori et al 1998). La perte de son marquage est corrélée à la perte de phénotype cilié (Ziegelaar et al 2002). Cet immunomarquage est similaire pour un épithélium respiratoire bien différencié dans les trois espèces (Figure 10A et B).

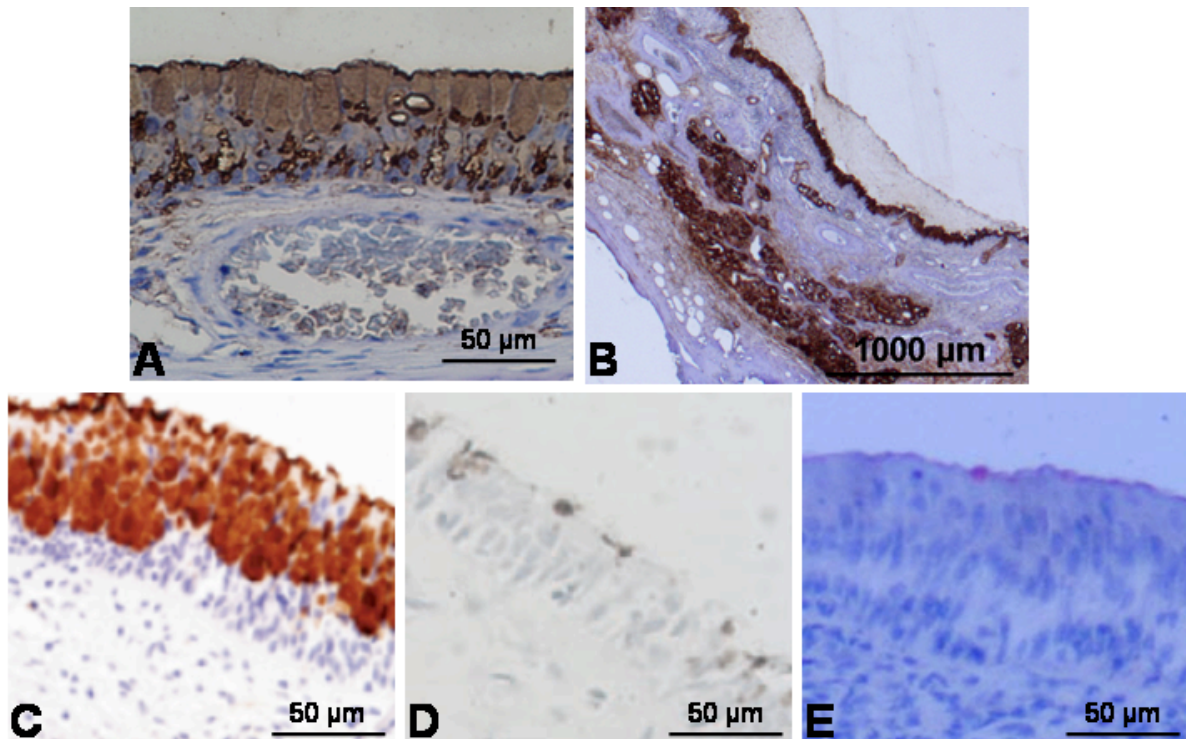


Figure 10 : Immunomarquages des lectines selon les espèces

Marquages UEA-I chez le lapin (A) et le mouton (B) ; marquages MUC5AC chez l'homme (C issue de Martínez-Antón et al 2006, D issue de Lazard et al 2009) et le mouton.

La couche de mucus recouvrant l'ensemble des voies aériennes est constituée essentiellement d'eau, d'ions, de protéines anti-microbiennes (lactoferrine, lysozyme, Ig A sécrétoire, Secretory Leukocyte Protease Inhibitor) et de mucines (MUC). Ces MUC sont des glycoprotéines fortement glycosylées, de haut poids moléculaire comprenant de nombreux résidus d'hydrates de carbone. Ce sont les principales macromolécules constitutives du mucus. Leur expression et leur relargage augmentent sous l'influence d'une large gamme de stimuli sécrétagogues (agents biologiques, produits de bactéries, cytokines, protéinases, oxydants, gaz irritants, médiateurs de l'inflammation) (Fig 11).

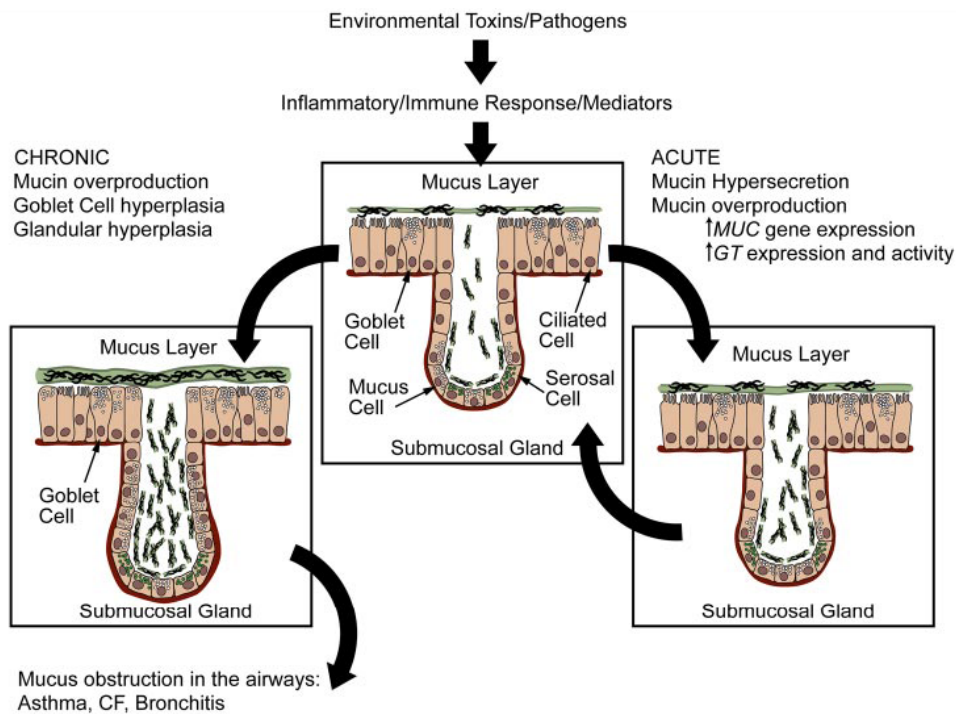


Figure 11 : réponse sécrétrice des cellules épithéliales de l'arbre respiratoire à une stimulation aiguë ou chronique.

Au cours d'une stimulation aiguë, les médiateurs de l'inflammation peuvent jouer le rôle de stimuli sécrétagogues activateur de la sécrétion de mucines par les cellules à mucus et les glandes sous-muqueuses. L'activation revenant ensuite à son niveau de base avec la fin du stimulus. Lors d'une stimulation chronique on retrouve à la fois une hypersécrétion, une hyperplasie des cellules à mucus, une hyperplasie et une hypertrophie des glandes sous-muqueuses ne revenant pas forcément à l'état basal en fin de stimulation. Hyperplasie et hypersécrétion ne sont donc pas synonymes (Rose and Voynow 2006).

Une vingtaine d'entre elles sont actuellement bien identifiées. Elles sont regroupées en mucines sécrétoires (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6-10, MUC13-16, MUC19) et en mucines membranaires possédant un domaine transmembranaire ayant un court résidu intracytoplasmique (MUC1, MUC3, MUC4, MUC11, MUC12, MUC17). MUC1- 2 - 4 - 5AC - 5B - 8 et MUC13 sont normalement exprimées dans l'épithélium respiratoire (Martínez-Antón et al 2006). Dans la muqueuse nasale du sujet sain, les mucines exprimées majoritairement dans l'épithélium sont MUC1, MUC4, MUC5AC et MUC8 alors que MUC5B et MUC8 sont préférentiellement localisées dans les glandes sous-muqueuses (Figure 10C) (Martínez-Antón et al 2006). MUC5AC et MUC5B sont identifiées comme les mucines prédominantes dans les sécrétions respiratoires de l'adulte normal (Hovenberg et al 1996, Wickstrom et al 1998, Buisine et al 1999 ; Jung et al 2000, Burgel et al 2000). Leur expression est dépendante des conditions de culture et du degré de différenciation (Bernacki et al 1999). MUC5AC apparaît être la plus spécifique des cellules à mucus de l'épithélium de surface alors que MUC5B apparaît plus volontiers dans les cellules à mucus des glandes sous-muqueuses

(Groneberg et al 2003). D'autre part MUC5AC semble être la première à être exprimée au cours de la différenciation muqueuse *in vitro* dès le septième jour de culture en submersion ou en interface air-liquide (Yoon et al 2002, Lee et al. 2005). Le degré d'expression de MUC5AC dans le cas d'un processus de redifférenciation reste toujours inférieur aux zones contrôles adjacentes lorsqu'on réalise une blessure calibrée d'une monocouche bien différenciée de cellules nasales humaines (Figure 10D) (Lazard et al 2009). Ces données *in vitro* semblent corrélées à celles obtenues *in vivo* où, son expression est diminuée dans les épithélium hyperplasiques de polypes nasaux (Martinez-Antón et al 2006). L'expression de MUC5AC chez le mouton était identique à celle retrouvée par Lazard et al dans un épithélium respiratoire nasal issu de polypes et cultivé avec une interface air-liquide (Figure 10E). A la différence de l'homme, elle est exprimée aussi dans les glandes sous-muqueuses du mouton.

C. PHYSIOLOGIE NASO-SEPTALE VENTILATOIRE

1. Organisation des flux aériens lors de la respiration

La morphologie nasale interne et externe est étroitement liée à la fonction et joue un rôle fondamental dans la physiologie. L'homme a un nez relativement simple dont la fonction principale est la respiration (microsmatique) alors que les mammifères ont un nez plus complexe dont la fonction première est l'olfaction (macrosmatique). Les cavités nasales et orales chez l'homme sont séparées permettant les deux modes respiratoires, ce qui n'est pas le cas chez les rongeurs obligés de respirer par le nez en raison de l'apposition de l'épiglotte sur le palais mou. Certaines différences anatomiques majeures ont été mises en évidence par plusieurs auteurs (Negus 1958, Harkema 1991, Schreider 1981). Les caractéristiques des flux aériens sont différentes selon les espèces de mammifères notamment en raison de la forme des structures turbinales et des espaces aériens proximaux, le vestibule et la valve nasale. Chez l'homme, les courants aériens sont pratiquement tous laminaires. Des tourbillons peuvent être générés par des changements ponctuels de la géométrie des fosses nasales mais ils sont graduellement dissipés (phénomène de friction) pour redevenir laminaire.

Chez l'homme, et chez les mammifères la trajectoire des courants aériens est conditionnée par la direction du plan occupé par les deux ouvertures narinaires. Proetz détermine dès 1951 que l'air inspiré s'élève verticalement dans un plan sagittal par l'orifice narinaire pour pénétrer dans le vestibule (dont la charpente n'est constituée que de cartilages flexibles et dont la lumière est entourée d'un épithélium stratifié pavimenteux kératinisé). Il est comparé à une chambre d'admission munie de déflecteurs : en bas et en dehors la tête du cornet inférieur, en haut et en dehors le cul de sac du vestibule situé en dehors de la plica nasi et dont le jeu est solidaire de la valve, en haut et en dedans la face endonasale des dômes, en bas et en dedans le septum membraneux. L'orientation des orifices d'entrée dans les fosses nasales est donc capitale pour déterminer la trajectoire des courants aériens et un défaut d'orientation par excès ou par défaut aura des répercussions (Fig 2, p21).

Par la suite, l'air inspiré passe au travers de la valve nasale qui représente un rétrécissement physiologique indispensable, entre le septum et les CLS (plica nasi), responsable de 50 % des résistances des voies aériennes. Elle est chez l'homme d'une section triangulaire, d'une surface de 20 à 40 mm² et son sommet forme un angle de 10 à 15° (Van dishoeck 1965) (Fig 4, p24). Lorsque le flux aérien rencontre la valve nasale, il dévie de 20 ° vers le septum (Proetz 1951). Cette valve accélère le flux aérien qui reprend une trajectoire sagittale longeant le septum : Proctor dans les années 1970 retrouvait en condition de repos, que la vitesse de l'air juste en arrière de la valve nasale était sur un modèle artificiel de fosses nasales de chat de 6 à 18 m/s contre 2 m/s dans la chambre respiratoire principale (Proctor 1960 et 1977). Ces données concordent avec les données plus récentes de vitesses et de vorticités retrouvées plus récemment par Ishikawa sur modèle artificiel de fosse nasale humaine (Ishikawa et al 2006). Lors d'un effort d'intensité modérée, l'adaptation de la valve sous l'action du muscle dilatateur des narines, synchronisée avec les mouvements respiratoires, joue un rôle dans l'adaptation des débits respiratoires (ICRP 1994). Passé cette valve, le flux aérien débouche dans l'attique, chambre aplatie de répartition vers le méat moyen au niveau de laquelle se trouve le tubercule de cloison dont les anomalies morphologiques vont jouer un rôle de déflecteurs. Le flux aérien normal décrit une trajectoire parabolique à concavité inférieure pour aboutir à la choane. Proetz distingue un courant aérien principal s'écoulant à hauteur du bord inférieur du cornet moyen et deux courants accessoires, l'un le long du cornet inférieur, l'autre vers la fente

olfactive (Proetz 1951). D'autres auteurs comme Keyhani et al ont confirmé à l'aide d'une simulation numérique que le courant aérien principal était bien situé entre le dos du cornet inférieur, le cornet moyen et le septum nasal (Keyhani et al 1995). La vitesse de l'air y est plus faible que dans le courant secondaire en dessous du cornet inférieur. Soixante sept % du volume d'air inspiré passaient par le courant aérien principal, 30 % passaient dans le courant secondaire et 3 % dans la fente olfactive (Keyhani et al 1995). Sur d'autres modèles numériques, d'autres équipes ont retrouvé la même répartition des flux respiratoires et ce, que les conditions expérimentales initiales prévoient respectivement un flux laminaire (nombre de Reynolds $R = 1300$) ou un flux turbulent ($R = 2300$) (Chometon et al 2000, Ishikawa et al 2006). L'alimentation en air des méats semblait différente entre le méat moyen et le méat inférieur : le premier est alimenté directement par le flux aérien à partir de la valve nasale, l'autre est alimenté par mise en rotation de l'air autour du cornet inférieur. Ces données ont été confirmées récemment avec les mêmes outils avant et après septoplastie (Ozlugedik et al 2008).

Parallèlement à cette organisation des flux, le jeu du vestibule et de la valve nasale et la vasomotricité des zones érectiles turbinales, interviennent pour réguler la quantité et la qualité de l'air inspiré et l'adapter aux besoins. Le cycle nasal physiologique est une alternance, en moyenne toutes les 3 heures (1 à 7 heures), d'une phase congestive dans une fosse nasale et d'une phase de rétraction contralatérale. Ce mécanisme indispensable à la perception du confort respiratoire maintient de manière constante les résistances nasales inchangées quelles que soient les circonstances.

Pendant le passage des flux, s'exercent sur l'épithélium de surface des forces de cisaillement (shear stress) qui ont été récemment évaluées. Elles varient en fonction du modèle utilisé : entre 0,5 et 1,5 dyne/cm² dans un modèle mécanique comprenant un tube rigide alimenté par un flux laminaire alors que dans un modèle anatomique de fosses nasales elles sont comprises entre 1 et 10 dyne/cm² (10 dyne/cm² = 1 Pa) (Elad et al 2006).

Les déviations de la cloison ont été rapportées comme facteur perturbant la rhéologie des flux ventilatoires par plusieurs auteurs (Chometon et al 2000, Ishikawa et al 2006, Ozluggedik et al 2008). Elles ont un retentissement fonctionnel différent selon leur siège et selon leur importance. En raison de cette relation étroite entre la morphologie et la

fonction nasale, des différents éléments concourant à déterminer la quantité et la qualité des flux aériens dans le nez, Cottle avait proposé en 1955, sur des présomptions cliniques, une subdivision de la filière nasale en 5 zones facilitant ainsi l'étude des déformations et de leur retentissement fonctionnel (Fig 12) (Cottle 1955).

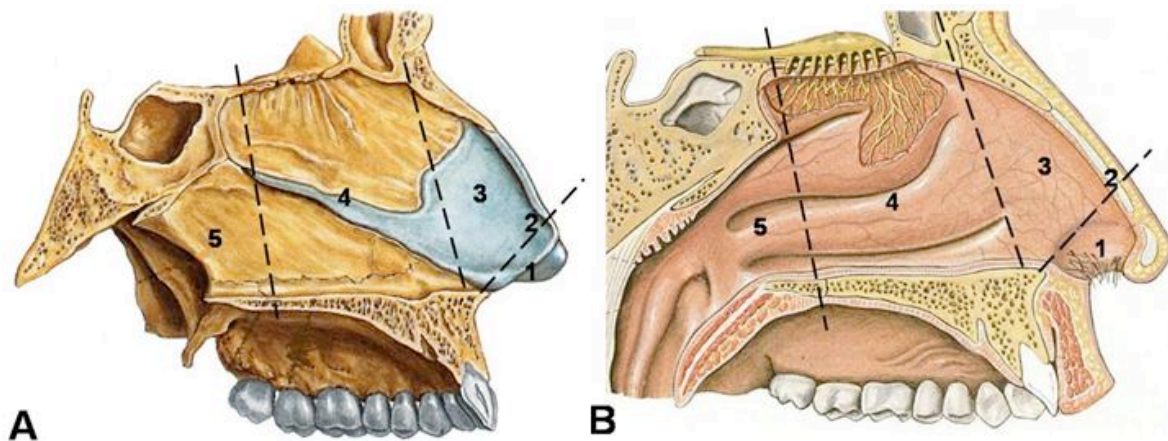


Figure 12 : division anatomique et fonctionnelle du mur médial (A) et latéral (B) des fosses nasales

(1) zone vestibulaire, (2) zone de la valve nasale où le retentissement d'une déviation septale est en général sévère, (3) zone de l'attique qui rentre peu en jeu dans le cycle nasal car dépourvue de tissu érectile mais qui représente une zone de turbulence en raison à ce niveau du changement de direction du courant aérien, (4) zone des cornets, (5) zone sphéno-palatine. L'importance des troubles fonctionnels sera fonction du siège et de l'importance des lésions, les déviations antérieures cartilagineuses étant les plus gênantes (Cottle 1955).

2. Répartition et dépôts des particules inhalées

a. Micrométries

La pénétration des particules d'aérosol dans les fosses nasales et les sinus dépend de plusieurs facteurs : du flux aérien à l'intérieur de la cavité, de la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur du sinus, de la taille des particules concernées, de leur répartition et distribution dans l'aérosol, du diamètre et de la longueur du canal naso-sinusien.

Newman et al à partir de 13 volontaires sains avec des molécules de Téflon marquées au Tc99m, ont montré que 46,5 à 57,1 % de la dose d'un spray était arrêté dans la partie toute antérieure de la fosse nasale et que ce pourcentage variait selon le volume et la largeur du cône de distribution (Newman et al 1988). Weber et al ont distribué une solution

de fluoresceine sodique à 1 % en spray chez 8 volontaires sains et 10 patients après chirurgie endoscopique des sinus pour polypose naso-sinusienne. Les vidéoendoscopies réalisées dans les premières minutes après l'administration ont montré qu'au moins 50 % du spray se déposait sur le septum antérieur et la tête du cornet inférieur et que seule une petite portion (pas de chiffre) se déposait sur la tête du cornet moyen, l'ager nasi, le bord libre du cornet moyen et le méat moyen (Weber et al 2001). Heald et al ont étudié la répartition de la triamcinolone marquée au carbone¹¹ délivrée en spray chez quatre sujets sains à l'aide du P.E.T. scan couplé à l'I.R.M : 83 % de la dose administrée était retrouvée dans les fosses nasales, 54 à 63 % dans la région turbinale sans plus de précisions, 3 à 4 % dans les sinus frontal et maxillaire ; 6 à 16 % de la dose initiale persistait dans les fosses nasales 2 heures après l'administration (Heald et al 1997).

Hyo et al ont comparé le dépôt de particules d'aérosols monodispersées de polystyrène/latex, de solution glucosée et d'eau pure d'un diamètre de 0,5 à 15,8 μm dans le sinus maxillaire d'un homme sain et sur un modèle reconstruit. Il n'y avait pas de différence de dépôts entre les modèles pour les différentes particules et seul 3 % de la dose administrée pénétrait dans le sinus pour des particules d'un diamètre de 3 à 10 μm et un gradient de pression de 10 à 15 cm d'eau (Hyo et al 1989).

Itoh et al en utilisant un modèle de fosse nasale droite reconstruit à partir de cadavre ont montré avec des particules de 4 μm de diamètre pour un flux respiratoire de 13 L/min un dépôt préférentiel au niveau de la valve nasale et du cornet moyen (Itoh et al 1985). Ces résultats ont été confirmés et détaillés plus tard par d'autres auteurs.

Chez 11 volontaires sains respirant un aérosol de particules de 1 à 30 μm , Keck et al à l'aide d'un dispositif laser mesurant les concentrations et les tailles des particules de la valve nasale jusqu'au cavum ont montré que respectivement 58, 85, 87 et 99,5 % des particules de 1-3, 4-6, 7-9 et 10-30 μm se déposaient dans les fosses nasales. Seulement 80 % des particules de 1-3 μm déposées dans les fosses nasales étaient arrêtées par la valve nasale et la tête du cornet inférieur, le reste se déposait en arrière dans la région turbinale. Par contre plus de 90 % de la totalité des particules supérieures à 4 μm déposées étaient arrêtées par la valve nasale (Keck et al 2000). La même équipe avec la même méthodologie a montré à partir de 10 autres volontaires sains que la décongestion de la muqueuse n'influçait pas la quantité et la répartition des dépôts (Keck et al 2001). Les auteurs supposaient que,

l'accumulation en regard de la valve, était probablement due à la transformation à cet endroit d'un flux aérien laminaire en un flux turbulent.

Zwartz et Guilmette ont comparé trois modèles artificiels tridimensionnels de fosses nasales construit à l'aide d'images IRM d'un volontaire sain non fumeur, au travers desquels ils ont délivré un aérosol de particules fluorescentes de 5.5 μm de diamètre à un débit respiratoire allant de 10 à 40 L/min. Il existait une augmentation du dépôt des particules de 20 à 99 % avec l'augmentation du débit. Une grande quantité était arrêtée par la valve. Mais, lorsque le flux augmentait de 20 à 40 L/min, les particules pénétraient plus en profondeur dans la cavité nasale et les quantités déposées augmentaient entre le cornet moyen et le septum. Les auteurs remarquaient qu'au niveau de la valve toutes les particules subissaient un brutal changement de direction provoquant l'impaction de celles ayant une forte inertie. En arrière les particules restantes non impactées suivaient les flux aériens. Le courant aérien principal (soit autour du cornet moyen) était le principal chemin de dépôt en arrière de la valve nasale (Zwartz et Guilmette 2001).

b. Nanométriques

Cheng et al ont montré dans une étude comparative sur trois modèles artificiels de fosses nasales de rat que le dépôt des particules de 0,2 à 0,005 μm délivrées avec un débit inspiratoire et expiratoire de 200 à 600 mL/min, était supérieur pour les particules les plus petites et diminuait avec l'augmentation de la taille et du débit respiratoire. Pour un débit inspiratoire de 400 mL/min, 40 à 70 % des particules de 0,01 à 0,005 μm se déposaient dans les fosses nasales (Cheng 1990). Pour ces auteurs les mécanismes de turbulences permettaient la diffusion et le dépôt.

Wang et al ont réalisé une étude comparative contrôlée sur la répartition et le dépôt de particules de 1nm à 50 μm , inhalées artificiellement à l'aide de flux allant de 4 à 15 L/min dans un modèle reconstruit de fosses nasales fait à partir de coupes de scanner d'un homme de 25 ans. Ils ont montré que :

- le diamètre des particules avait une influence sur les caractéristiques de dépôt,
- la quantité totale de particules micrométriques déposées augmentait avec l'augmentation du diamètre et/ou la densité des particules et/ou le débit respiratoire,
- la quantité totale de particules nanométriques déposées augmentait avec la diminution du diamètre,
- pour des particules < 15 nm, l'efficacité de déposition diminuait quand le débit respiratoire augmentait,
- les principales régions de dépôts des particules micrométriques étaient la valve nasale et la région turbinale moyenne ainsi que le septum en regard,
- les particules nanométriques avaient une répartition ubiquitaire dans les fosses nasales (Wang et al 2009).

Il ressort du rapport de l'Institut National de Recherche et de Sécurité mis à jour en juin 2009 que les nano-particules (NPs) peuvent pénétrer dans l'organisme humain par 3 voies : respiratoire, cutanée et digestive. L'appareil respiratoire constitue la principale voie de pénétration dans l'organisme (<http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf>). Cette pénétration est d'autant plus importante que l'individu pratique une activité physique ou présente des fonctions pulmonaires altérées (asthme, bronchite...). Les nanoparticules et les nanofibres, une fois inhalées, peuvent soit être exhalées, soit se déposer dans les différentes régions de l'arbre respiratoire que sont les voies aériennes supérieures (les fosses nasales, la bouche, le pharynx et le larynx), l'arbre trachéo-bronchique (la trachée, les bronches et les bronchioles) et les alvéoles pulmonaires. Ce dépôt n'est généralement pas uniforme sur l'ensemble des voies respiratoires : il varie considérablement en fonction du diamètre, des degrés d'agrégation et d'agglomération ainsi que du comportement dans l'air des nano-objets. Les particules de diamètre compris entre 10 et 100 nm se déposent ainsi majoritairement dans les alvéoles pulmonaires, dans une proportion nettement supérieure à celle des particules micrométriques. Les particules plus petites, quant à elles, se déposent principalement dans les voies aériennes supérieures et dans une moindre mesure, dans la région trachéo-bronchique (Fig 13). Aucune particule de 1 nm de diamètre n'atteint les alvéoles alors que

80 % se déposent dans le nez et le pharynx, le reste dans la trachée et les bronches. A cette dimension la rétention des nanoparticules inhalées est de près de 100 %.

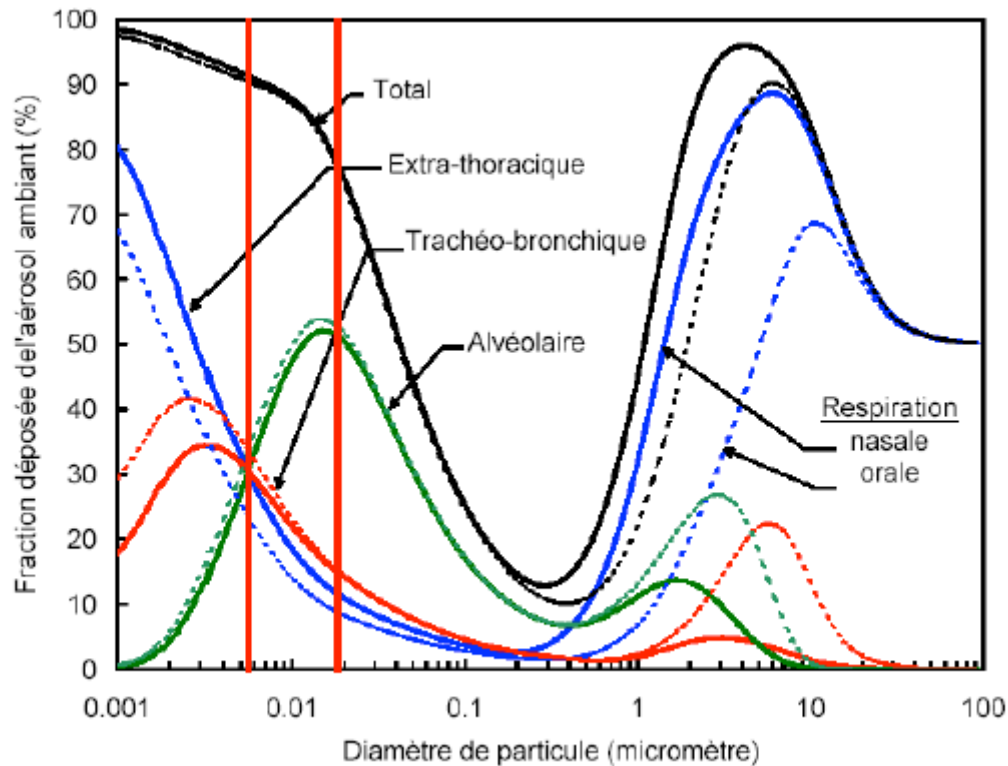


Figure 13 : Dépôt régional des particules dans les voies respiratoires en fonction de la taille des NPs

Les particules micrométriques de 5 à 10 μ m se déposent majoritairement dans le nez et peu ou pas dans le reste de l'arbre respiratoire. La décroissance du taux de dépôt dans le nez des particules micrométriques s'inverse lorsque l'on passe à l'échelle nanométrique pour retrouver les mêmes taux de dépôts pour des particules entre 1 et 10 nm (<http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf>).

Pour des particules de 5 nm (ligne verticale la plus à gauche), 90 % est retenu dans l'arbre respiratoire et celles-ci se déposent alors de façon relativement uniforme dans les trois régions. Pour des particules de 20 nm (ligne verticale plus à droite) la quantité totale déposée dans l'arbre respiratoire diminue à 80 % mais plus de 50 % des particules de l'ordre de 20 nm se déposent au niveau des alvéoles. Pour des particules de 2 nm, 98 % se dépose dans l'arbre respiratoire dont 68 % dans les fosses nasales. La granulométrie des particules a donc un impact majeur sur le site de dépôt (Witschger et Fabriès 2005a et b ; Oberdorster 2005). Pour comprendre le comportement des poussières et les phénomènes d'agrégation, il est recommandé de consulter le rapport de l'IRSST (Institut de Recherche Robert-Sauvé en

Santé et Sécurité au Travail, Québec, Ostiguy et al 2006). Compte tenu des différences importantes de surface de chacune des trois régions pulmonaires, même si la masse de particules ultrafines de 20 nm qui se déposent dans la région alvéolaire représente plus de 50 % du total, la concentration de poussières déposées, par unité de surface dans le poumon, sera plus de 100 fois supérieure dans la région nasale et plus de 10 fois supérieure dans la région de la trachée et des bronches (Oberdörster, 2005). Ces différences de distribution des NPs dans l'arbre respiratoire pourraient avoir des conséquences importantes sur la santé, sur les mécanismes de pénétration et d'élimination impliqués (Schiller et al 1988, Daigle et al 2003, Oberdörster 2005, Zhang et al 2005).

II. PATHOLOGIES NASO-SEPTALES ARCHITECTURALES

A. LE SYNDROME MORPHOLOGIQUE ET SES CONSEQUENCES

Le septum nasal participe au soutien des deux tiers inférieurs de la pyramide nasale. Solide, médian et en rectitude, il est indispensable à la projection antérieure du nez (contrairement au singe), à la mise en tension de la valve nasale dont l'angle aigu doit être compris entre 10 et 15° afin de respecter la fonction ventilatoire.

La croissance différentielle ostéocartilagineuse et les différents traumatismes possibles au cours de la vie s'opposent au maintien de son intégrité physique, soit par excès (déviation septale) soit par défaut (septum déficient ou absent) et altèrent son rôle principal de support solide.

Mais, sa solidité ostéocartilagineuse, péri-chondrale et muqueuse ne lui permet pas de résister à des contraintes mécaniques même d'intensités modérées (Kim et al. 2005). Les conséquences lésionnelles des traumatismes violents (enfouissement faciaux, fractures de Lefort) ou des traumatismes plus modérés mais multiples (apprentissage de la marche, sports d'équipes, de combat, accidents domestiques, de la voie publique, chirurgie rhinologique), peuvent s'ajouter tout au long de la vie pour rendre cette cloison inefficace sur le plan fonctionnel et esthétique.

Quelle que soit la situation du septum avec ses déformations, ses déficiences ou son absence, il devient symptomatique en raison des modifications rhéologiques et du mauvais conditionnement de l'air inspiré. Il en résulte une dysfonction muqueuse avec altération de sa capacité vasomotrice et de sa fonction mucociliaire. Plusieurs auteurs ont montré à partir de patients porteurs d'une déviation septale symptomatique, qu'il existait une augmentation statistiquement significative de la durée du transport muco-ciliaire par rapport à une population sans déviation. Ils ont montré aussi chez les patients la même différence entre le côté concave et le côté convexe de la déviation (Jang et al 2002, Yigit et al 2005). Jang et al ont montré dans la population symptomatique qu'il existait une différence significative de densité des cellules ciliées, moins importante du côté concave que du côté convexe de la déviation, une augmentation des cellules inflammatoires sous-épithéliales et une diminution des glandes sous-muqueuses du côté concave (Jang et al 2002).

Il semble que dans ce contexte le système trigéminé ait un rôle dans la génèse de la sémiologie (céphalées , rhinorrhées) mais aussi dans le caractère temps-dépendant du syndrome, dont l'aspect maximum n'est réalisé que dans les tranches d'âges 25-45 ans (Stoll et al 1990, Stoll et al 1991). D'autres auteurs ont parlé de l'existence de mécanorécepteurs à la surface des cellules (Clark et Jones 1995, Bieger-Farhan 2004).

D'autre part, la respiration durant le sommeil est chez le sujet sain exclusivement nasale (Fitzpatrick et al. 2003). L'obstruction nasale (objective ou paradoxale) est associée à une augmentation des résistances nasopharyngées durant le sommeil, entraînant l'apparition d'une respiration oro-nasale (Chabolle et al. 2006). Alors que les flux aériens nasaux auraient un effet stimulant sur la respiration (McNicholas et al. 1993) , la perte de stimulation des récepteurs nasaux sensibles à ces flux induirait une dysrégulation des cycles du sommeil (Berry et al. 1995). La création d'une obstruction nasale nocturne sur des volontaires sains provoque une augmentation des résistances supra-glottiques, de l'Index d'Apnées Hypopnées (IAH), une désaturation nocturne, une augmentation du nombre de micro éveils, et une fragmentation du sommeil (Fitzpatrick et al. 2003, Suratt et al. 1986, Armengot et al. 2008).

Ainsi, l'ensemble des conséquences physiopathologiques de l'obstruction nasale forme une association de symptômes qui ont pu être regroupés sous une même entité (de Monredon et al 1998, Cottle 1980).

Le syndrome morphologique se manifeste par 4 symptômes majeurs:

- Une obstruction nasale (99%).
- Une rhinorrhée postérieure séromuqueuse engendrant hémmage et paresthésie pharyngée.
- Des céphalées à type de pesanteur frontales en barre, matinales, de disparition spontanée en fin de matinée et sensible au paracétamol (49 %).
- Des infections rhinosinusiennes à répétitions.

A ces signes cardinaux, s'ajoutent des signes moins fréquents:

- Des bruits nocturnes qui ont une fréquence différente de celle du ronflement d'origine vélaire.
- Un sommeil non réparateur, lié à une l'existence d'une mauvaise ventilation nocturne permanente, avec respiration buccale, fatigue diurne, micro et/ou macroréveils, difficultés de réendormissements, sommeil positionnel en raison de l'interférence entre les déformations septales et le cycle nasal, des ronflements
- Des troubles de l'odorat mineurs.
- Des épistaxis et une dysperméabilité tubaire.

B. ETIOLOGIES

1. Ontogénétique

Le septum cartilagineux possède une activité de croissance qui lui est propre. Elle débute *in utero*, se poursuit jusqu'à 40 ans mais sur un mode discontinu. Dankmeijer a montré sur le septum humain :

- une croissance modérée de 0 à 6 mois,
- une absence de croissance jusque vers 6 ans,
- un pic vers 6/7 ans,
- une croissance lente jusqu'à 11 – 12 ans,
- une croissance explosive au moment de la puberté,

- suivie d'une croissance résiduelle faible mais double à celle de l'os jusqu'à la quarantaine (Dankmeijer 1968).

Après la naissance, cette croissance dépend essentiellement de facteurs héréditaires dominants (Grymer et Melsen 1989, Post 1969, Takahashi 1972). Les différentes phases (début, durée, rapidité de croissance) seront sous l'influence des hormones sexuelles et de croissance. Vetter et al ont déterminé chez l'homme quels étaient les centres de croissance du cartilage septal ainsi que les index mitotique et de croissance (Fig 14).

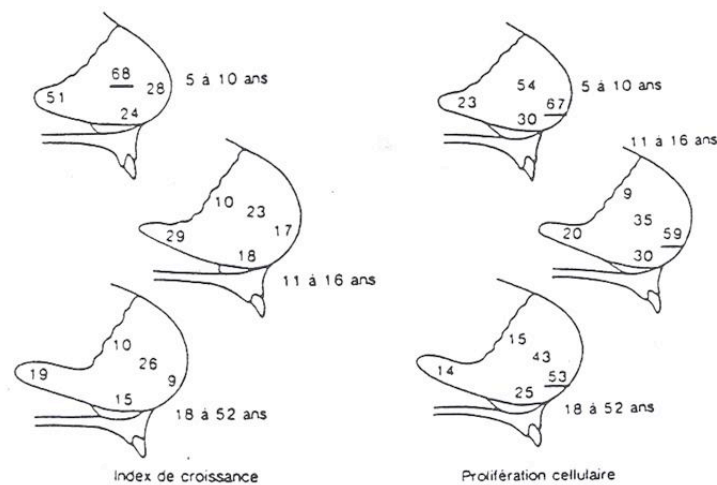


Figure 14 : Index de croissance et index prolifératif du cartilage septal humain.

Le bord antéro-inférieur présente quelque soit l'âge une forte densité et prolifération cellulaire. La région centrale présente un index de croissance plus élevé chez l'enfant et une capacité proliférative qui se maintient chez l'adulte. La région postérieure garde de façon prolongée des potentialités de croissance (Vetter et al 1984a et b).

Sarnat a bien montré chez le lapin l'importance de ces centres de croissance et du rôle du CQ comme acteur principal de la croissance de l'étage moyen de la face et de la projection antérieure de la pyramide nasale (Fig 15) (Sarnat 1970).

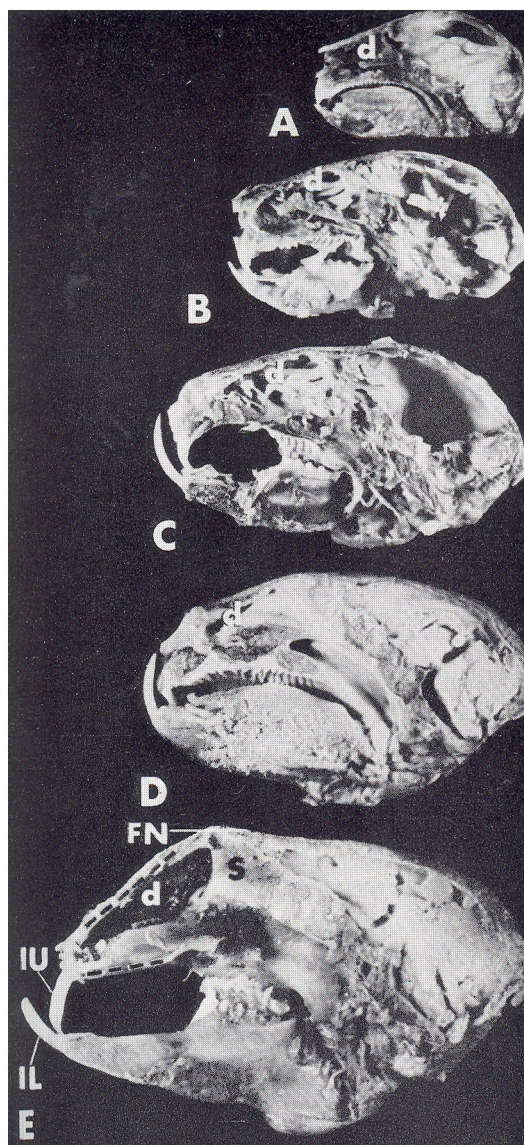


Figure 15 : effet sur la croissance faciale de la résection du septum nasal antérieur chez le lapin.
 Ablation du septum antérieur chez des lapins âgés de 14 à 21 jours. Sacrifice des animaux 4 (A) – 14 (B) – 34 (C) – 70 (D) et 101 jours (E) après l'intervention. (A) dès le 4^{ème} jour, il existe une inversion de l'articulé dentaire, le palais et les incisives supérieures (IU) deviennent progressivement plus courts. (C-E) Le jeu des incisives n'étant plus assuré, les incisives inférieures (IL) deviennent trop longues et se fracturent. (B) dès le 14^{ème} jour, le dos du nez (d) s'aplati pour progressivement s'incurver vers le prémaxillaire. (E) Il existe un raccourcissement du museau, un effondrement du dos du nez et un rétrécissement des orifices nasaires. Le dos du nez fait une rotation centrée par la berge postérieure de la résection septale et la suture fronto-nasale (FN) (Sarnat 1970).

Le caractère harmonieux de la croissance du CQ sera perturbé par les inévitables contraintes mécaniques environnantes. L'encéphale, les yeux, les muscles masticateurs, la langue et la dentition vont exercer des pressions sur le squelette membraneux facial, facilement modelable et avoir un rôle fondamental sur la croissance verticale et transversale de la face mais interviennent peu sur la pyramide nasale (Striker et Raphaël 1993). Par contre les contraintes mécaniques imposées par la croissance du socle prémaxillo-maxillo-vomérien et de la LPE vont directement être en compétition avec la croissance cartilagineuse

et interagir sur la forme et la position du CQ. Le prémaxillaire et le vomer tendent à la pousser vers le haut alors que la LPE s'ossifie vers le bas et vers l'avant et pousse la CQ dans ces directions laissant une seule possibilité de développement vers l'avant. Chez l'animal et notamment les primates cette situation n'existe pas car le septum présente des attaches relativement lâches avec la voûte osseuse, parfois séparé par une couche de tissu adipeux de son socle vomérien.

Par ailleurs, il ressort des études phylogénétiques que la déviation septale apparaît chez l'homme à l'aire de Néanderthal. Parmi les modifications anatomiques de l'hominisation, le passage à la position verticale et la nécessité de garder le regard horizontal a provoqué une plicature basicrânienne et un retrait des mâchoires. Couplées au développement cérébral, ces phénomènes ont influencé le squelette maxillo-facial entraînant une compression plus ou moins importante d'avant vers l'arrière et de haut en bas des fosses nasales et du septum, provoquant la saillie de la pyramide nasale et l'horizontalité du plan des narines (Gray 1978, McKenzie 1884, Takahashi 1997). Cette évolution permet de comprendre :

- Qu'il n'existe peu ou pas de déviation de la cloison chez l'animal ;
- Que la fréquence des déviations septales est plus importante chez les caucasiens leptorhinien au nez projeté et étroit.

2. Traumatique

Ils peuvent survenir à tout âge. Les déformations septales néonatales (1% des naissances) sont la conséquence d'une mauvaise position du fœtus in utero, d'un traumatisme lors de l'accouchement par un instrument (forceps) ou par la compression du nez pendant la descente à travers le détroit supérieur du bassin (Quante et al 1976). Incurvées en verre de montre, le plus souvent vers la droite (en raison de la prépondérance de la présentation fœtale en occipito-iliaque gauche antérieure), ces déviations vont ensuite être fixées par l'ossification progressive du cartilage.

Par la suite le septum antérieur est exposé aux agressions externes sur lequel toutes les occupations de la vie peuvent intervenir : apprentissage de la marche, sports de contact, accidents domestiques, accidents de la voie publique, rixe, agression... Ces traumatismes mêmes modérés laissent le plus souvent des fractures cartilagineuses et rarement des luxations chondro-vomériennes. Parfois visibles d'emblée, l'aggravation des contraintes due

à la croissance prémaxillo-maxillo-mérianne et chondroethmoïdale va révéler à l'âge adulte des fractures prépubaires passées inaperçues.

Les conséquences du traumatisme seront variables en fonction de la violence du choc, sa direction et sa fréquence (Fig 16). La direction du traumatisme est généralement recherchée afin de pouvoir anticiper les lésions.

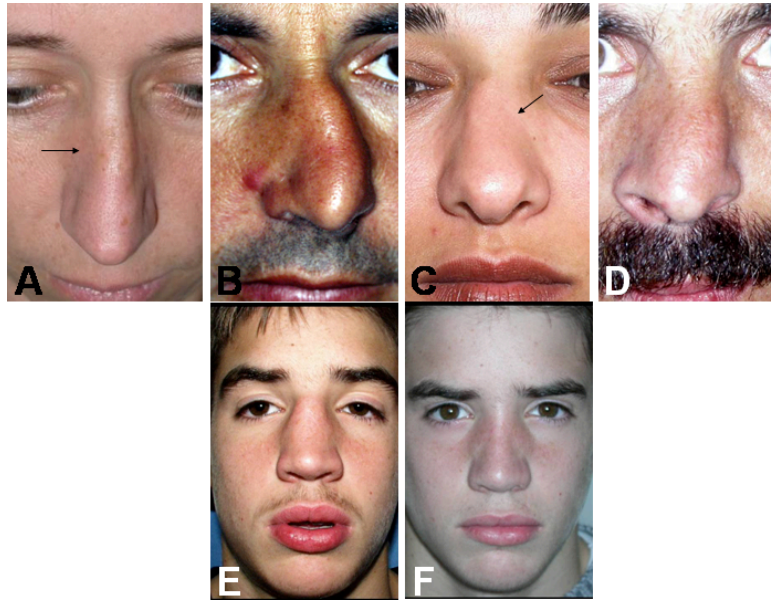


Figure 16 : lésions de la pyramide nasale et du septum selon la direction et l'intensité du choc.

(A) choc latéral modéré provoquant un enfoncement ponctuel de l'ON et réduisant le calibre de la valve nasale, (B) choc latéral violent entraînant un nez couché, (C) choc antéro-latéral modéré provoquant l'enfoncement d'un mur latéral et une fracture septale en regard, les lésions sont angulées, les foyers de fractures sont saillies, les défauts d'homogénéité sont francs, (D) choc antéro-latéral violent entraînant une fracture des murs latéraux et du septum, (E) chocs antérieurs purs répétés provoquant une fragmentation multiple du septum, un nez ensellé, déshabité nécessitant un remplacement tissulaire par des greffons de gros volume, (F) même patient que (E) après réparation par un greffon iliaque.

3. Mixte

Elles associent les deux processus lésionnel, dont l'importance de l'un par rapport à l'autre sera fonction de l'ordre d'apparition des facteurs, de la violence, de la direction et de la fréquence des traumatismes. La problématique de ces situations est la viabilité du septum cartilagineux résiduel qui sera fonction du siège et du nombre de fractures (Fig 17).



Figure 17 : lésions mixtes, fractures de l'enfance révélées par la croissance à l'âge adulte.
 (A) nez en « Z » avec déviation des trois tiers de la pyramide nasale dans des axes différents reflète de l'association d'une fracture verticale et horizontale, (B) nez « C » reflète d'une fracture verticale à grand fragment.

C. SITUATIONS CONCERNEES PAR LA REPARATION AVEC APPORT DE MATERIAUX

1. Les fractures septales antérieures : verticales, horizontales, mixtes

On décrit classiquement les fractures selon leur angulation verticale, horizontale ou associée (Fig 18). Souvent les déformations sont complexes auxquelles s'associe un épaissement périchondral, des hématomes organisés autour de multiples fragments cartilagineux. La rétraction fibreuse cicatricielle favorise et fixe les déformations.

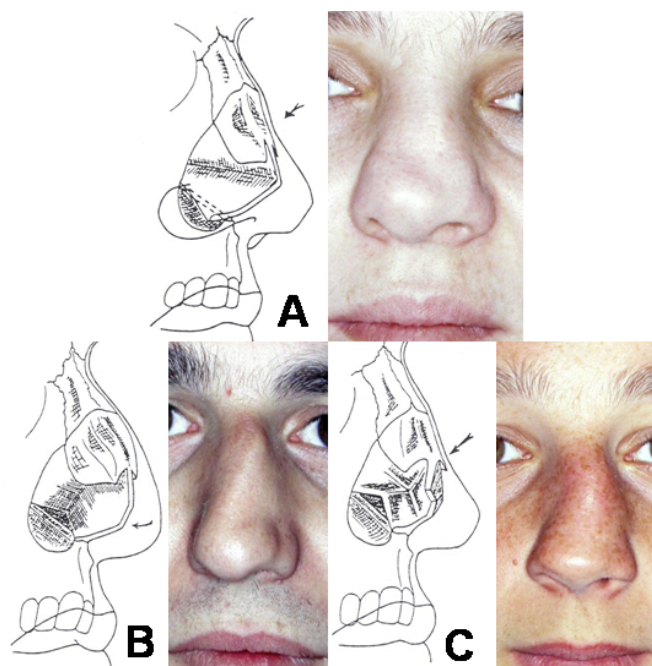


Figure 18 : différents types de fractures septales.

(A) fracture septale horizontale simple avec luxation du bord postéro-inférieur entraînant une perte de hauteur du CQ et une dépression suslobulaire, (B) fracture verticale à grand fragment frontalisé reposant encore sur l'ENA, (C) fracture mixte associant un trait horizontal et vertical avec septum antérieur inutilisable pour une reconstruction (**schéma issu Pech et Canoni 1993**).

2. Les nez ensellés, polytraumatisés, déshabités

Les défauts mineurs de hauteur de CQ qui ne rentrent pas dans le cadre de nos travaux entraînent une ensellure supra-lobulaire isolée très modérée. Ils sont la conséquence d'une septorhinoplastie excessive, d'une fracture horizontale modérée ou font suite à une luxation chondro-prémaxillo-maxillovomérienne traumatique et ontogénique. Ces anomalies sont facilement corrigées par la mise en place d'un greffon cartilagineux sus-lobulaire d'origine septale ou auriculaire. Si elle est plus importante, la dépression sus-lobulaire s'associe à d'autres anomalies morphologiques dont le nombre et le degré permettent de classer les nez ensellés et d'anticiper leur prise en charge thérapeutique (Fig 19).

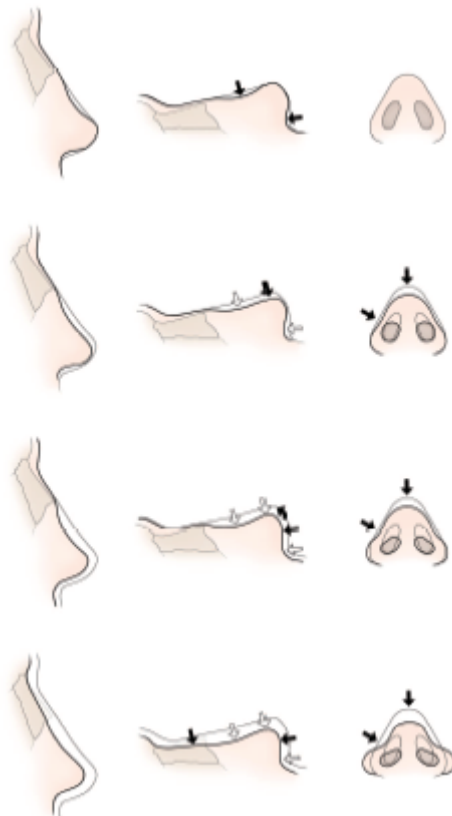


Figure 19 : classification des nez ensellés

(de haut en bas). Type I : la perte de support septal est modérée et entraîne une petite dépression sus-lobulaire et rétrusion columellaire. Type II: accentuation avec perte de projection de la pointe et arrondissement des orifices nasaux. Type III : étalement de la pointe et accentuation de l'hypoprojection transformant la zone sus-lobulaire en un méplat. Type IV : effondrement de la voûte ostéocartilagineuse et absence totale de support (Daniel 2007).

La croissance, les multiples traumatismes ou chirurgie, certaines maladies peuvent aboutir à des situations complexes où tout ou partie du support de la pyramide nasale est

inefficace voire absent. Ces situations représentent 5 à 10 % selon les équipes des septorhinoplasties de reconstruction réalisées à visée mixte esthétique et fonctionnelle (Gurley et al. 2001, Cervelli et al. 2006, Riechelman et Rettinger 2004, Paris et al 2006). La dépression sus-lobulaire profonde s'accompagne à différents degrés d'un élargissement de la racine, du dorsum, d'une pointe élargie et hypoprojetée, d'une columelle courte et rétruse, d'orifices narinaux arrondis, ballonnés et réduits, d'un élargissement de la valve nasale entraînant à son tour un désamorçage de l'accélération du flux aérien (Fig 19). Il peut exister en plus une disparition de l'épine nasale antérieure et une hypoplasie prémaxillaire perturbant l'angle naso-labial et aggravant la rétrusion columellaire. Le test du support qui consiste à presser la pointe du nez provoquant un collapsus lobulaire contre la lèvre supérieure, affirme l'absence de structure de soutien (Daniel 2007). Ce sont ces nez (type III et IV) qui nécessitent un apport de matériel de comblement supérieur au nez de type I et II et pour lesquels les réserves de cartilages septale et auriculaire ne suffisent pas.

3. Les perforations septales

On entend sous le terme de perforations septales les pertes de substance intéressant le squelette septal avec ses deux revêtements mucopérichondraux réalisant une communication pathologique permanente entre les deux fosses nasales. Elles provoquent une modification du profil de réchauffement et d'humidification de l'air intra-nasal (Lindeman et al 2001). Les conséquences cliniques sont ressenties par le patient et parfois par son entourage. Elles provoquent de manière associée ou non : une obstruction nasale paradoxale, une sensation de sécheresse, des croûtes, des épistaxis, des céphalées et des bruits respiratoires. Les causes sont identiques à celles des nez ensellés déshabités. Les traumatismes, la chirurgie septale en sont les causes principales. Leur prévention en septorhinoplastie relève de la dissection sous-périchondrale et du respect des deux lambeaux mucopérichondraux (Cogswell et Goodacre 2000). La chirurgie carcinologique, les maladies de système (Wegener, Sarcoidose) et les addictions (Cocaïne) sont des causes plus rares nécessitant l'arrêt de l'intoxication et le contrôle de la maladie avant réparation. Toutes les perforations septales ne sont pas symptomatiques notamment celles en zones 4 et 5 de Cottle (Fig 12, p46). La littérature est consensuelle sur la plus forte prévalence et sur le caractère symptomatique des perforations situées en zone 2 et/ou 3 de Cottle. En raison

des étiologies communes entre les perforations septales et les nez ensellés déshabités, les deux problématiques s'associent parfois rendant la réparation complexe, éliminant en plus de l'affaissement du nez, la loge septale et tout support sous-jacent à la pyramide nasale par la disparition des deux lambeaux mucopérichondraux (Fig 20).

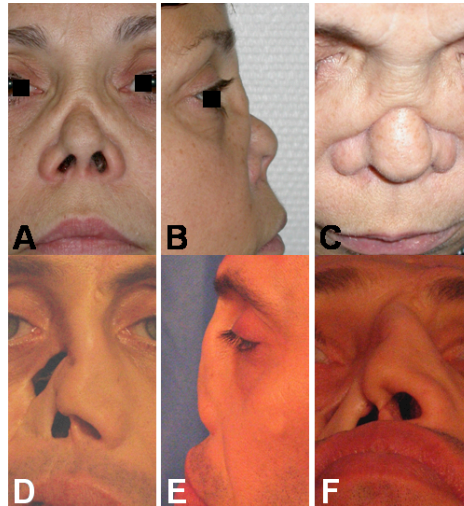


Figure 20 : situations de reconstruction complexes où s'associe à l'effondrement de la pyramide nasale une large perforation septale.

(A-C) séquelles de maladie de Wegener, rétraction cicatricielle majeure et absence de septum, (D-F) séquelles après chirurgie et radiothérapie pour un carcinome muco-épidermoïde des fosses nasales, même perte de substance endonasale que pour le patient précédent à laquelle s'associe une perte de substance paranasale droite, une lyse osseuse du prémaxillaire et une fistule bucco-sinusienne.

III. ETAT DE L'ART SUR LA CICATRISATION SPONTANEE DU SEPTUM NASAL

A. MECANISME DE REPARATION DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE

Le processus de régénération de l'épithélium respiratoire nécessite trois actions cellulaires : la migration, la prolifération et la redifférenciation. La première étape oblige à une dédifférenciation, un étalement et une migration des cellules respiratoires à partir des berges de la perte de substance sur le support constitué par la MEC. La seconde étape est sous la dépendance des facteurs de croissance. La dernière étape est la moins connue et restitue un épithélium différencié et fonctionnel. Ces trois étapes ont été mises en évidence *in vitro* et *in vivo* par plusieurs équipes.

In vitro, la régénération du tapis cellulaire a été décrite à partir de culture primaire de cellules épithéliales humaines ou de lignées cellulaires (Herard et al 1996 ; Dorscheid et al 2001). Après blessure chimique ou mécanique, les cellules entament la réparation de la lésion par une série d'événements incluant, dans un premier temps, l'étalement et la migration sur la MEC dénudée des cellules bordant la zone lésée. Puis les cellules prolifèrent avec un pic d'activité mitotique qui culmine généralement 48 heures après la lésion et ne concerne que les cellules dans la zone de réparation (Zahm et al 1997). La vitesse de migration des cellules après étalement était pour ce modèle expérimental de 35 à 45 $\mu\text{m}/\text{h}$ et diminue progressivement pour les cellules de plus en plus loin du front de cicatrisation. Cette vitesse était constante durant les 3 premiers jours puis diminuait progressivement jusqu'à recouvrement total de la perte de substance (Zahm et al 1997). Bien que la zone lésée soit réépithélialisée, l'établissement de la jonctionnalité et de l'étanchéité épithéliale n'est restaurée *in vitro* qu'après plusieurs jours (Herard et al 1996).

La régénération complète de l'épithélium, avec différenciation de l'ensemble des phénotypes cellulaires, n'est obtenue dans des modèles de culture en deux dimensions qu'en conditions de culture à l'interface air liquide (Fig 21) (Gray et al. 1996 ; Coraux et al 2005a, Yeh et al 2007) ou dans des modèles de régénération en trois dimensions (Castillon et al. 2002). Avec une interface air-liquide, l'augmentation de la différenciation ciliée va de pair avec l'augmentation du nombre de Gap junction et de la quantité de Connexine 43 (Cx 43) (Yeh et al 2007).

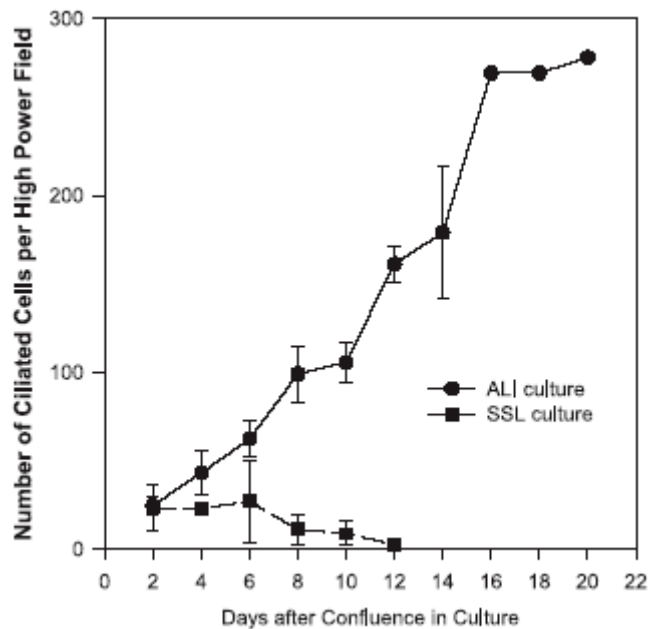


Figure 21 : comparaison du nombre de cellules épithéliales avec battements ciliaires en culture. (SSL) culture en immersion, (ALI) culture en interface air-liquide. Nombre de cellules comptées par champs sous microscope optique. Leur présence est fonction de la durée de culture après confluence (Yeh et al 2007).

Les mêmes étapes ont été mise en évidence *in vivo* : la régénération de l'épithélium trachéal après une lésion mécanique met en jeu : l'étalement des cellules bordant la lésion, la migration des cellules basales pour recouvrir la zone dénudée, le rétablissement des jonctions serrées et l'établissement d'une métaplasie malpighienne. Par la suite il existe une prolifération active avec hyperplasie des cellules basales et muqueuses suivie d'une différenciation progressive des cellules muqueuses en cellules préciliées (phénotype cellulaire mixte présentant les caractéristiques de cellules ciliées et de cellules muqueuses). Cette séquence d'événements aboutit à la reconstitution d'un épithélium pseudostratifié cilié dans un délai de quelques jours à quelques semaines, selon l'importance de la lésion (McDowell et al. 1979). De même, un modèle de trachée reconstituée « ouverte » chez la souris nude,ensemencée par des cellules respiratoires humaines, mime aussi la dynamique des événements mis en jeu lors de la régénération. Après une étape de dédifférenciation, les cellules épithéliales respiratoires ensemencées sur la trachée dénudée de son propre épithélium, adhèrent à la lame basale, s'étalement et migrent pour recoloniser la matrice hôte, prolifèrent pour former un épithélium présentant une métaplasie malpighienne, puis adoptent progressivement un phénotype différencié donnant naissance à un épithélium de surface pseudostratifié mature associé à des structures glandulaires (Dupuit et al. 2000) (Fig 22).

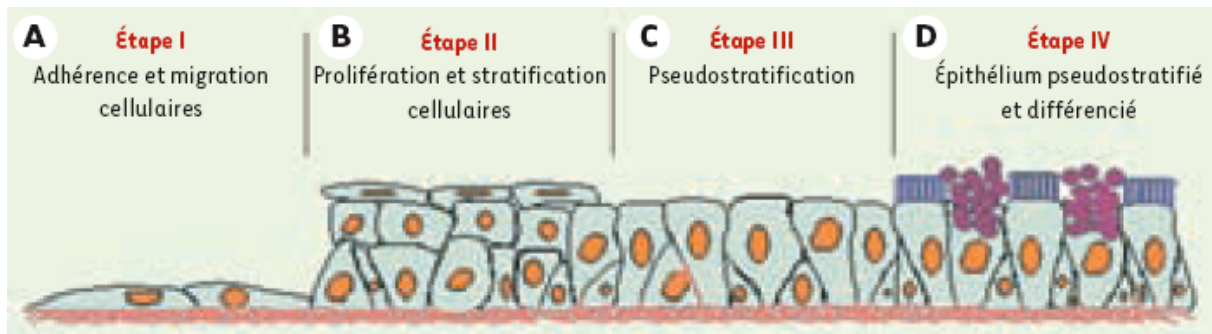


Figure 22 : étapes *in vivo* de la régénération de l'épithélium respiratoire des voies aériennes.
 (A) adhérence et migration, (B) prolifération cellulaire, (C) pseudostratification et (D) différenciation mucociliaire complète (Coraux et al 2005b).

Pendant ce temps, au pôle basal de l'épithélium, les cellules cylindriques et les cellules basales s'unissent entre elles par des desmosomes et chacune d'entre elles à la membrane basale par des héli-desmosomes et des fibres d'ancrage assurant la cohésion de l'épithélium avec les jonctions serrées situées au pôle apical (Evans et al 1989, 1992).

Les facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la réparation et la régénération de l'épithélium respiratoire sont multiples et interagissent étroitement. L'ensemble de ces protéines sont produites par les cellules épithéliales elles-mêmes, ou par les cellules du mésenchyme sous-jacent : fibroblastes, cellules inflammatoires, endothéliales ou cartilagineuses (Fig 23) (Holgate 2000, Coraux et al 2005b et c).

Lors de la première étape, les différents processus cellulaires mis en jeu sont modulés par les composants de la MEC (fibronectine, laminines, collagène IV) servant de support à la migration cellulaire puis à leur ancrage alors que les récepteurs de type intégrines (α et β) sont surexprimés au pôle basal des cellules. Ces intégrines ayant fixé leur ligand sont capables d'activer la protéine Tyrosine-Kinase FAK (focal adhesion kinase) déclenchant avec l'aide d'autres kinases une réorganisation du cytosquelette d'actine et l'activation de la voie Ras-MAP Kinase (Mitogen activated Proliferation). Paradoxalement, en plus des protéines de la MEC, il semble que le cartilage soit capable d'influencer la régénération épithéliale respiratoire : Hicks et al ont montré qu'en présence de cartilage les cellules ne s'étaient peu ou pas et exprimaient faiblement le TGF α et β , molécules qui régulent la prolifération et la migration des cellules épithéliales (Hicks et al 1999). La migration des cellules nécessite quant à elle l'existence de points d'ancrage transitoires sur la MEC pour lesquels les métalloprotéinases matricielles (MMP 3-7-9-11) interviennent pour remodeler cette matrice

en formation. Parallèlement, un certain nombre de cytokératines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance (EGF, TGF α et β , IL-1 α et β , amphiréguline, épiréguline) jouent un rôle de régulateur de la migration et de la prolifération. Certaines molécules par l'intermédiaire de leur récepteur, la molécule d'adhésion cellulaire CD44, seront présentées au Récepteur de l'EGF activant par la voie des Tyrosine Kinases, la voie STAT1-3 régulant la prolifération cellulaire mais aussi par un autre chemin intracellulaire, régulant le cytosquelette et la migration (Lackie et al 1997, Coraux et al 2005b et c).

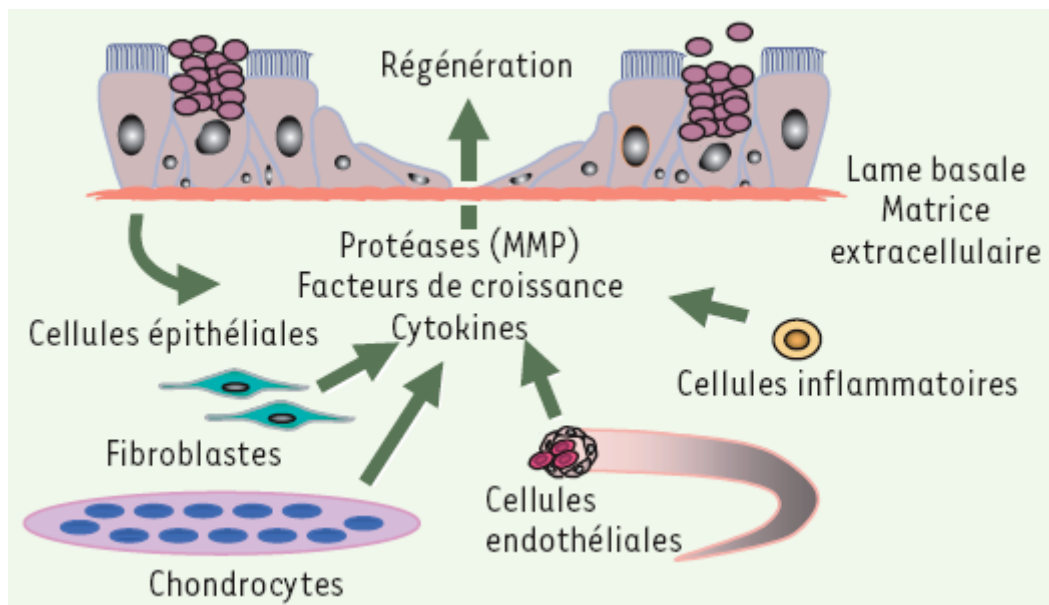


Figure 23 : facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la réparation et la régénération de l'épithélium respiratoire des voies aériennes.

La dernière étape de réparation qui concerne la redifférenciation épithéliale semble régulée par de multiples facteurs. Les cytokines pro-inflammatoires (IL 4-9-13) et l'élastase des neutrophiles semblent agir comme molécules inductrice d'une différenciation mucosécrétrice (Clark et al 1995, Burgel et al 2004, Laoukili 2001, Aarbiou et al 2004). Par ailleurs il semble exister une balance entre la présence de TGF- β sur le site de cicatrisation et le degrés de différenciation épithélial. Puddicombe et al ont montré que la transcription du TGF- β débutait 25 à 48 heures (inducteur de la production de collagène) alors que la prolifération cellulaire commençait 2 à 8 h après la blessure. Les auteurs montraient que son expression augmentait lors du blocage du récepteur à l'EGF (Puddicombe et al 2000). Plus récemment, à partir de cellules épithéliales issue de polypes nasaux cultivées en interface

air-liquide, le degré de redifférenciation muqueux (MUC5AC) et cilié (β IV-Tubuline) dépendait de la présence ou non de TGF- β 1 (Lanzard et al 2009).

Les molécules autocrines et paracrines locales ne sont pas les seuls facteurs de différenciation de l'épithélium. Plusieurs auteurs ont montré l'importance de la présence de l'interface air liquide au sommet des cellules en culture, pour lesquelles la ciliogénèse est bien meilleur que pour celles en submersion (Lee et al 2005). D'autres ont montré que non seulement la présence d'air était capitale mais que le flux aérien aussi (Even-Tsur et al 2009). Comme au niveau des vaisseaux, les flux semblent intervenir comme facteur déterminant de la différenciation. Ces auteurs ont élaboré une chambre rectangulaire en carbone dans laquelle sont aménagés des espaces permettant aux cultures air-liquide d'avoir le sommet des cellules tangentiel aux flux. Les débits administrés variaient de 12 à 48 L/min, produisant un shear stress de 0,1 à 1 dyne/cm² (simulant ainsi une respiration de repos à un effort physique d'intensité modérée). La distribution du flux aérien pendant 15 min augmentait considérablement l'expression mucosécrétoire (MUC5B) et provoquait la fragmentation de la β -tubuline de manière statistiquement significative par rapport aux cultures non exposées. Le paramètre déterminant pour l'expression mucosécrétoire semblait être la durée de l'exposition. L'intégrité de la β -tubuline semblait corrélée avec l'intensité du débit et les forces de cisaillement. Vingt-quatre heures après la fin de l'exposition les cellules retrouvaient leur niveau d'expression de départ MUC5B et l'intégrité de leur réseau de β -tubuline. L'exposition au Taxol ne modifiait pas l'expression de MUC5B lorsque le flux respiratoire était présent, ce qui sous tend l'indépendance des deux processus de différenciation. La déshydratation obtenue par l'effet de soufflerie était compensée par une hygrométrie constante de 40 % et ne modifiait pas non plus les résultats. Les cellules ne prenaient pas la direction du flux aérien à l'inverse de ce qui se passe dans les vaisseaux avec les cellules endothéliales (Even-Tsur et al 2009). Cette étude confirme l'existence de mécanorécepteurs à la surface des cellules déjà mentionnés par d'autres auteurs (Clark et Jones 1995, Bieger-Farhan 2004).

B. MECANISMES DE REPARATION DU CARTILAGE SEPTAL

Les chondrocytes dérivent des cellules souches mésenchymateuses pluripotentes, le périchondre servant de réservoir. Lors d'une lésion articulaire, les cellules mésenchymateuses migrent vers le site de cicatrisation afin de subir une différenciation médiée par les contraintes spatiales et temporelles biomécaniques locales (Pountos 2005, Silver 1995). Cependant, les capacités de régénération du cartilage septal sont faibles. Elles varient selon l'âge et le type de traumatisme. A 20 semaines post-opératoires, elle existe partiellement chez l'animal jeune (lapin de 4 semaines) alors qu'elle est inexistante chez l'animal adulte (lapins de 24 semaines). Lors d'un traumatisme chez l'animal jeune, les extrémités cartilagineuses des différents fragments perdent leur chondrocytes et leur MEC par action des macrophages et des cellules inflammatoires locales sur une zone de +/- 0.3 mm (Verwoerd-Verhoef et al 1998b). Par la suite, les zones cartilagineuses, à l'activité mitotique élevée, sont séparées des zones nécrosées par un trousseau fibreux conjonctif issue du périchondre (processus d'encapsulation). Dans l'espace laissé vide par le défaut cartilagineux, la régénération cartilagineuse est partielle (Fig 24). Dans le cas de multiples fragments, les différentes pièces cartilagineuses sont entourées d'une capsule fibreuse provenant du périchondre empêchant leur fusion, laissant des zones de faiblesses mécaniques lors de la croissance (Fig 24) (Verwoerd-Verhoef et al 1998b; Kaiser 2006). Tout se passe de la même façon lors de la remise en place immédiate d'un fragment cartilagineux septal avec ou sans suture. Il est impossible chez le même animal d'obtenir la fusion des deux extrémités de cartilage septal dont l'une des parties a été retirée et remise immédiatement en place lors d'une cicatrisation normale dans la loge septal en présence des deux périchondres (Verwoerd-Verhoef et al 1998b). Ce faible pouvoir de coalescence existe aussi chez l'homme (Calvet et al 2006). Dans les nez traumatiques, se constitue un cal fibreux qui s'interpose entre les divers fragments fracturés, les engage, épaisit le septum et maintient en position les différentes déformations. En pratique lors d'une septoplastie, il n'existe pas de néoformation cartilagineuse telle qu'on pourrait la voir pour l'os dans un foyer de fracture (Kaiser et al 2006).

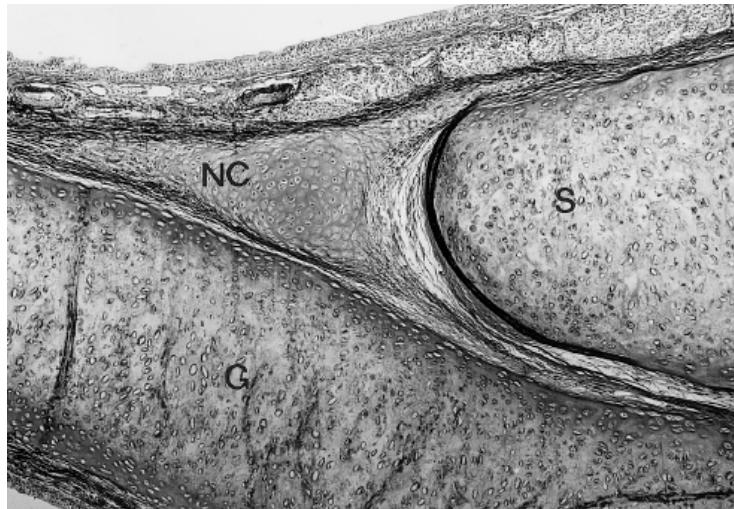


Figure 24 : réparation du septum nasal de lapin 8 semaines après réimplantation immédiate autologue.

S=septum, G=greffon, NC=nouveau cartilage. Es différents fragments sont séparés par la réaction fibreuse provenant du périchondre (bleu alcian, MO x4). (Verwoerd-Verhoef et al 1998b)

Cependant le périchondre est indispensable à la régénération cartilagineuse en cas de perte de substance (ten Koppel 2001). Mais son rôle est ambivalent dans la prolifération et la cicatrisation du cartilage: la couche externe fibreuse marquant fortement le TGF beta1 (Transforming Growth Factor beta1) et le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2). Elle croît rapidement produisant une couche fibroblastique et conjonctive dense assurant la cohésion des différents éléments cartilagineux mais empêchant leur fusion, alors que la couche interne au contact du cartilage fournit les chondroblastes assurant le renouvellement cartilagineux proprement dit (Fig 25) (Duynstee et al 2002).

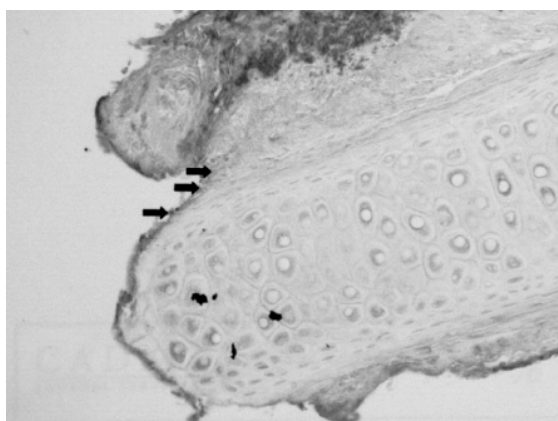


Figure 25 : Production de TGFβ1 par la couche externe périchondrale.

(flèches, Microscopie Optique x4) (Duynstee et al 2002).

C. MECANISMES DE REPARATION DE L'OS SEPTAL

Certains auteurs ont constaté que la simple surélévation de la muqueuse du plancher du sinus maxillaire suffisait pour augmenter le volume osseux à cet endroit avant chirurgie implantaire mais l'origine des cellules ostéoprogénitrices n'a pas été déterminée (Lundgren et al 2004, Palma et al 2006). Par ailleurs, peu de données sont présentes dans la littérature concernant le comportement du périoste de la cloison nasale. Les reprises de septoplastie faites initialement selon la technique de Cottle montrent qu'il n'y a pas de *restituo ad integrum* osseux dans la loge septale plusieurs années après le geste initial. Chez l'enfant, la LPE issue de la capsule cartilagineuse primitive nasale subit une ossification endochondrale de l'arrière vers l'avant alors que le vomer en arrière et en bas est un os de membrane et s'ossifie sous l'influence d'un processus aussi antéro-postérieur.

Suite aux possibilités d'augmenter la hauteur osseuse du plancher du sinus maxillaire par surélévation de la muqueuse sinusienne, Srouzi et al ont recherché quelles étaient les capacités de la muqueuse du sinus maxillaire à fournir des cellules ostéoprogénitrices (Srouzi et al 2009). A partir d'explant cultivé dans un milieu favorable à la différenciation ostéogénique, ces auteurs ont montré le marquage immunohistochimique constant pour CD 166, 73 et 105 et décroissant avec le temps des marqueurs CD146 et 71. Par ailleurs les cultures étaient positives pour la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine, la Bone-Modulin-Protein BMP-2, l'ostéopontine, l'ostéonectine et le von Kossa (Srouzi et al 2009). Par la suite ces cellules isolées de muqueuse sinusienne maxillaire ont étéensemencées sur un BCP (HA/ β TCP) puis implanté en sous-cutané chez des souris Nude entraînant la formation à partir des cellules d'origine humaine d'un os réticulé mature. Cependant, si cette étude semble montrer que la sous-muqueuse du sinus maxillaire peut fournir des cellules ostéoprogénitrices, en raison des problèmes d'inhomogénéité des populations cellulaires, cette source est possible mais non prouvée.

IV. ETAT DE L'ART SUR LA REPARATION DU SEPTUM NASAL AVEC APPORT DE MATERIAUX

A. LORS D'UN SQUELETTE NASAL ABSENT OU INEFFICIENT

La réparation de la grande majorité des septo-rhinoplasties nécessite un apport de matériau dont le volume peu important est fourni par les greffons autologues cartilagineux septaux ou auriculaires. Seules 5 à 10% des septo-rhinoplasties post-traumatiques ou post-chirurgicales nécessitent une reconstruction totale du squelette septal dépendant de l'apport d'un volume important de tissu afin d'assurer la projection et le soutien antérieur du nez et de rétablir la fonction respiratoire de manière fiable (Gurley et al. 2001, Cervelli et al. 2006, Riechelman et Rettinger 2004, Paris et al 2006). Pour cela tout un panel de greffons autologues et de matériaux a déjà été utilisé et rapporté dans la littérature.

Les greffons autologues (iliaque, pariétal ou costal) avec leur morbidité propre parfois disproportionnée, sont souvent refusés par le patient. Ils ont chacun leurs imperfections qualitatives (taux de résorption, texture, forme, déplacement secondaire) et nécessitent un façonnage per-opératoire complexe et long. Couplés au temps de prélèvement ils allongent la durée opératoire, la morbidité associée immédiate ou à distance du geste et entraînent des conséquences socio-économiques non négligeables.

Pour remplacer les greffons autologues, quel que soit le type de septorhinoplastie et le volume de tissu à apporter, plusieurs biomatériaux ont été utilisés. Les indications chirurgicales majoritairement retenues ne concernaient jusqu'à maintenant que les rhinoplasties d'augmentation à visée esthétique rarement fonctionnelle oubliant le rôle primordial du septum dans la physiologie respiratoire nasale. Aucun biomatériau n'a été validé pour des reconstructions complexes lorsque le squelette septal est inutilisable ou absent. Aucun biomatériau n'a fait la preuve de son efficacité si une perforation septale est associée.

Le choix de tel ou tel biomatériau a été fait de manière empirique. Les données fondamentales justifiant ces choix sont pauvres ou absentes et les niveaux de preuves de leur biocompatibilité nasale ne reposent que sur des études rétrospectives la plupart du temps aux effectifs réduits. Aucune donnée fondamentale n'est actuellement disponible, à notre connaissance, pour la reconstruction septale tant d'un point de vue du squelette que

dans leurs rapports avec la muqueuse respiratoire. Leur mise en place nécessite l'intégrité de la loge septale et/ou l'apport de muqueuse par des lambeaux locaux pour ne pas être exposés au contenu septique des fosses nasales.

La société Européenne des Biomatériaux (ESB) a défini lors de la conférence de Chester (UK) en 1991, puis à l'occasion de celle de Sorrento (Italie) en 2005, un biomatériau comme « un matériau conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle ». La matrice doit permettre l'adhésion cellulaire, la prolifération, la différenciation et la synthèse d'une nouvelle matrice. Dans le cas idéal, la matrice se résorbera et sera progressivement remplacée par un tissu néoformé fonctionnel jusqu'à réparation *ad integrum* du défaut.

Cependant, la biocompatibilité peut varier selon les matériaux utilisés de telle sorte que l'on distingue les matériaux :

- biotolérés : les matériaux ne sont pas rejetés, ils ne provoquent pas de réaction inflammatoire, mais il se forme à leur contact une encapsulation fibreuse le séparant des tissus environnants (ex : polyacrylique)
- bioinertes : l'interface entre le matériau et les tissus est virtuelle ; le contact est direct, mais il n'y a pas d'interaction (ex : alumine),
- bioactifs : l'interface est le siège d'interactions et d'échanges dynamiques qui favorisent la repousse tissulaire. Le matériau peut être substitué progressivement (ex : carbonate de calcium, phosphate de calcium, bioverres),
- bioinducteurs : les matériaux sont capables d'induire une néoformation tissulaire (ostéoinducteur dans le cas de l'os) y compris dans des sites d'implantation ectopiques.

1. Greffes autologues

a. Cartilage costal

Il constitue le greffon de référence pour un certain nombre d'auteurs lors de la réparation des nez ensellés de stades III et IV de la classification de Daniel (Sherris and Kern 1998, Gurley et al. 2001, Congdon et al. 2002, Riechelmann and Rettinger 2004, Daniel 2007). La satisfaction esthétique nasale et le résultat fonctionnel sont autour

respectivement de 80 et 90 % selon les études (Gurley et al. 2001, Cervelli et al. 2006). La quantité de matériel disponible est grande, le prélèvement pouvant se faire sur les côtes 7 et 8 et sur leur zone d'union (Meyer 1988). Le prélèvement se fait du côté droit pour éviter tout risque sur le péricarde sous-jacent de l'autre côté.

Malgré toutes les précautions d'usage la morbidité du site donneur n'est pas négligeable. Certains ont rapporté des infections superficielles (Riechelmann et Rettinger 2004). Le risque de pneumothorax existe lors du prélèvement mais aussi à distance de l'intervention lors d'un effort. Les douleurs thoraciques post-opératoires immédiates ne sont pas négligeables. Elles peuvent se transformer en douleur pleurale durant l'effort à distance du geste (Laurie et al 1984). La cicatrice dans le sillon sous-mammaire peut être mal acceptée notamment chez les femmes en raison de son caractère disgracieux. De plus cette cicatrice est souvent associée à des modifications des contours visibles.

L'ossification du cartilage costal chez la personne âgée rend le greffon difficile à modeler et sculpter sur table ce qui représente un désavantage majeur (Paris et al 2006). Son caractère glissant entraîne un façonnage long et délicat. Il provoque des déplacements secondaires lors des rhinoplasties d'augmentations nécessitant 20 % de reprises chirurgicales (Riechelmann et Rettinger 2004). Il peut se gauchir, se voiler à distance de l'intervention. Son degré de résorption évalué chez le lapin montrait 7,6 % pour le cartilage costal, 23 % pour le cartilage auriculaire et 30 % pour le cartilage septal à 3 mois après implantation sur le dorsum (Lattyak et al 2003). Il serait moins constant et plus imprévisible chez l'homme (Sarukawa et al 2004). Par ailleurs, des extrusions pour infection locale ont déjà été décrites (Riechelmann et Rettinger 2004).

D'autres équipes ont essayé d'utiliser du cartilage costal homologue irradié de cadavre mais le taux de complications est élevé (31 %) : 24 à 50 % du volume du greffon s'est résorbé après 3,8 mois en moyenne chez 5 patients sur 35, trois déformations tardives, une fracture et un patient insatisfait par saillie visible des contours du greffon ont été retrouvées (Song et al 2008).

b. Os pariétal

Il s'agit d'un prélèvement monocortical réalisé du côté de l'hémisphère mineur. Il ne peut pas être fait en même temps que la voie d'abord de rhinoplastie en raison de la

proximité des deux champs opératoires ce qui allonge la durée de l'intervention. La nécessité de garder une marge de sécurité à 2 cm de la suture sagittale (zone d'adhérence duremérienne) oblige à prélever latéralement un os dont la forme d'origine est courbe. Sa rigidité le rend fragile et une fracture du greffon lors du prélèvement n'est pas impossible notamment pour des greffons de plus de 2 cm de large. D'autre part l'os pariétal est d'une épaisseur totale moyenne de 7,46 mm avec des extrêmes allant de 4 à 12 mm (Pensler and McCarthy. 1985). Or le prélèvement n'emportant que la table externe, cette variabilité interindividuelle peut contre-indiquer ce greffon en raison d'une épaisseur insuffisante. Par contre, les conséquences esthétiques du prélèvement sont mineures en raison du camouflage de la cicatrice par les cheveux et il n'entraîne pas d'incapacité fonctionnelle ou d'invalidité prolongée.

Cependant, il est nécessaire de ne pas faire d'effet de levier lors du prélèvement afin d'éviter les fractures irradiées sur la corticale interne surtout en cas de faible épaisseur (Raulo and Baruch, 1990 ; Hemar et al. 1995). Mais surtout il expose aux risques de blessures méningées, de fuites de liquide céphalo-rachidien et d'hématomes extra-duraux (Posnick et al 1990 ; Hemar et al. 1995). En raison de ce risque de complications graves, il est souvent refusé par le patient.

La quantité souvent juste suffisante permet de former une attelle dorsale et columellaire en forme de 'L' mais pas de reconstruire un septum antérieur proprement dit. Sa mobilité post-opératoire comme les autres greffons autologues iliaque et costaux, a fait proposer par certains auteurs une fixation par ostéosynthèse sur le radix et/ou l'épine nasale antérieure nécessitant une incision séparée supplémentaire et une ablation de matériel à distance en raison d'extrusion, de caractère visible et palpable de la vis de fixation (Maniglia and Swim 1993 ; Demitras et al. 2006). La plupart des auteurs ne rapportent pas de résorption (Romo et al 1992).

c. Os iliaque

Le greffon autologue d'aile iliaque représente un tiers des greffons autologues prélevés aux Etats-Unis en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. Il est considéré comme le gold standard des matériaux de remplacement du squelette septal, de soutien de la

pyramide nasale et du dos du nez. Wang et al ont montré sur des biopsie de crête iliaque de femme d'un âge moyen de 65 ans que le module d'élasticité et la solidité de l'os trabéculaire était respectivement de 20,87 GPa et 0,91 GPa (Wang et al 2008). Par comparaison, une autre équipe a montré que l'os trabéculaire du col fémoral avait un module d'élasticité et une solidité de 11,4 GPa et 0,7 GPa (Zysset et al 1999). L'accès au site donneur est aisé et la quantité d'os disponible est suffisamment importante pour répondre au cahier des charges de la reconstruction nasale adaptable à toutes les tailles. C'est le seul greffon autologue qui permet de fournir à la fois un septum de remplacement et une navette dorsale de part, sa grande surface plane (corticale interne), et par la forme de la crête iliaque. D'origine endochondrale, l'os iliaque présente un meilleur potentiel de revascularisation mais il est de moindre résistance à la résorption que le greffon d'os pariétal d'origine membraneuse. Les mesures histomorphométriques chez le lapin ont montré cette différence lors de son implantation faciale (Alonso et al 1995). Il conserve 90 % de sa longueur et 70 % de sa largeur 2 ans après son implantation chez l'homme (Sarukawa et al. 2004).

Malgré tout, son prélèvement entraîne une morbidité connue. L'incision en regard de la crête iliaque mesure 6 à 7 cm. Le prélèvement nécessite la mise en place de drains et les douleurs post-opératoires immédiates de repos ne sont pas rares nécessitant des antalgiques de paliers I ou II conditionnant une hospitalisation de 4 à 5 jours (au lieu de 24 heures pour une septo-rhinoplastie). La reprise de la marche dépend du syndrome douloureux et se fait pendant les 3 premières semaines à l'aide de béquilles. L'incapacité à la marche est pour environ 80 % des patients de 3 semaines mais peut durer jusqu'à plusieurs mois (Cricchio and Lundgren 2003). L'arrêt de travail est le plus souvent d'un mois et demi notamment chez les travailleurs de forces. Une rééducation peut être parfois nécessaire. Cinq à 10 % des patients gardent une boiterie, une démarche perturbée de plusieurs mois à 2 ans (Cricchio and Lundgren 2003). Les complications possibles lors du prélèvement ou à distance sont de deux sortes :

- mineures (10%) : infections cutanées superficielles, contusions, hématomes de faible volume, cicatrices disgracieuses ou chéloïdes.

- majeures (6 %) nécessitant une reprise chirurgicale et/ou des soins prolongés en hospitalisation : hématomes profonds, infections et/ou perforations digestives, hernies

digestives, blessures des gros vaisseaux (artère glutéale supérieure), blessures nerveuses (nerf fémoro-cutané), fractures osseuses de l'aile iliaque lors du prélèvement aux ostéotomes ou fracture de l'épine iliaque antéro-supérieure à distance du geste lors d'un prélèvement trop proche par traction brutale des muscles sartorius et tenseur du fascia lata, sub-luxations des articulations sacro-iliaques ou de la symphyse pubienne (de Riu et al 2008 ; Nocini et al. 2003 ; Arrington et al 1996 ; Zijderveld et al 2004).

2. Matériaux

a. Silicone

Les implants de silicone sont non poreux et inertes. Au début des années 60 ces implants étaient rigides et à l'origine d'une réaction inflammatoire par mise en tension des tissus de revêtement médiofaciaux. Ce n'est que par la suite que des implants plus mous ont été fabriqués par les industriels limitant ce processus précoce. Ils ont été utilisés jusqu'à maintenant uniquement pour les rhinoplasties d'augmentation et dans les populations asiatiques. Dans cette population, les conditions anatomiques locales ne sont pas exactement les mêmes que dans une population caucasienne en raison de la faiblesse de la charpente cartilagineuse, de l'épaisseur des tissus mous de surface et d'une longueur réduite de la columelle. Ces implants ont été utilisés comme conformateurs de surface soit en implant dorsal seul, soit dorso-columellaire pour lesquels une augmentation de hauteur du nez au-delà de 3 à 5 mm pose des problèmes d'aspect naturel, de blancheur cutanée, de sensation de tension voire d'extrusion. Ils ne sont pas intégrés dans les tissus mais dans une coque fibreuse qui les entourent. Seules des études rétrospectives sont disponibles chez l'homme sans groupe témoin ni contrôle. Il n'y a pas non plus de données fondamentales pour justifier son choix au contact ou dans l'organe nasal. Deva et al ont retrouvé à partir de 422 patients, 8,5 % de complications précoces comprenant 13 complications mineures traitées médicalement et 23 ablations pour déplacement, hémorragie, ou pour excès de tension. Plus tard 18 ablations pour insatisfaction ont été nécessaires et 2 extrusions ont été observées. Ces auteurs remarquaient que même les implants perforés se déplaçaient (Deva et al 1998). Ces complications avaient déjà été décrites antérieurement (Hinga 1980, Ham et al 1983). Lam et Kim montraient à partir de 1000 patients que les problèmes provenaient

essentiellement d'un excès de surélévation du dorsum et de protrusion de l'implant dans la pointe limitant la hauteur de l'implant autour de 3 mm. Dans cette cohorte, 28 patients ont présenté une infection, 32 un déplacement secondaire (Lam et Kim 2003).

Aujourd'hui en raison du recul disponible par rapport aux premiers patients implantés certains auteurs ont relevé des déformations morphologiques tardives au-delà de la sixième année (Jung et al 2007). Ils ont analysé 221 reprises chirurgicales après 1 mois à 25 ans d'implantation et montré qu'il existait un processus de calcification visible en microscopie optique à partir de la quatrième année post-implantation, à l'œil nu dès la cinquième année, présent chez 50 % des patients à 9 ans et englobant une large partie de l'implant à 15 ans. Ces mêmes auteurs ont montré qu'il existait au contact des calcifications une réaction inflammatoire avec une forte composante cellulaire polynucléaire et lymphocytaire.

b. Polyamide

Des treillis de polyamide ont été utilisés dans les années 1970 comme greffon de couverture dorsale (Beekhuis 1974). C'est un matériau souple, fin, qui peut être plié et dont l'intégration dans les tissus dépend de la fibrose cicatricielle qui colonise ses mailles. Il ne peut pas être utilisé comme greffon de soutien et des extrusions ont été décrites (Stucker 2002).

c. Polyéthylène

Les polyéthylènes poreux (PHDPE Porous High Density Poly Ethylen) disponibles sur le marché ont des pores dont la taille varie entre 20-30 μm pour le Plasti-Pore© et 100-250 μm pour le Medpor© (taille optimale des pores entre 100 à 135 μm (Klawitter et al 1976)). Leur porosité est de 54 %. Ils sont rapidement colonisés par un tissu fibreux vascularisé pouvant contenir de l'os (Spector et al 1979, Berghaus et al 1984, Wellisz et al 1993). Leur biocompatibilité, leur stabilité et leurs propriétés mécaniques ont fait qu'ils sont utilisés depuis une vingtaine d'années en rhinoplastie d'augmentation, de réaxation et en reconstruction cranio-faciale par de nombreux auteurs (Bikhazi et al 1990, Golshani et al 1994, Romo et al 1998, Mendelsohn et al 2005, Gürlek et al 2006, Cenzi et al 2005). Mais ils sont non résorbables. En rhinoplastie, ils ont été utilisés comme greffon dorsal, strut

columellaire, greffon de Sheen, de renforcement de CLI et spreader graft (Romo et al 1998 et 2006, Mendelsohn et al 2005, Gürlek et al 2006, Chen et al 2010). A notre connaissance, ils n'ont jamais été utilisés seuls (en remplacement du cartilage septal) comme greffon de soutien des deux tiers inférieurs de la pyramide nasale mais toujours pour renforcer une structure cartilagineuse existante y compris dans les rhinoplasties secondaires (Romo et al 2006). Un seul cas avec un recul de 24 mois a été décrit utilisant une lame de PHDPE pour reconstruire le septum nasal en première intention lors de la réparation d'un syndrome de Binder (Seyhan et al 2009a).

Les taux de complications sont compris entre 2 et 21 % (Romo et al 1998, 2006, Ramakrishnan et al 2007, Stelter 2007, Chen 2010). Le taux d'infection est compris entre 3 et 4 % selon les auteurs (Romo et al 1998, 2006). Le taux d'extrusion est compris entre 3 et 21 % et reste possible à très long terme (7 ans) en raison de la persistance définitive de l'implant (Romo et al 2006, Ramakrishnan et al 2007, Stelter 2007, Seyhan et al 2009b). Des fractures et des déplacements secondaires ont été décrits (Öztürk et al 2002, Turegun et al 2008). Cependant, si sa biocompatibilité apparaît plus fiable que pour les autres implants inertes vu le nombre de patients implantés, plusieurs biais viennent perturber l'interprétation des résultats proposés. Tous les implants sont plongés dans une solution antibiotique (Gentamycine, rifampicine) (Mendelsohn et al 2005, Romo et al 2006, Ramakrishnan et al 2007, Seyhan et al 2009b). Les patients ont tous reçu au minimum une antibioprofylaxie pré ou per-opératoire voire une antibiothérapie pendant 7 à 10 jours (Mendelsohn et al 2005, Gürlek et al 2006, Romo et al 2006, Ramakrishnan et al 2007). Plusieurs gestes chirurgicaux ont été associés pouvant expliquer les résultats esthétiques. Seule une étude a évalué à l'aide d'une échelle analogique visuelle le résultat fonctionnel lors de la mise en place de spreader graft (taux de satisfaction ventilatoire 76 %) (Gürlek et al 2006). Aucune mesure d'épaisseur de septum n'est disponible après implantation. Les dimensions annoncées des implants ne sont pas celles affichées sur les figures (Mendelsohn et al 2005). Les critères d'inclusion sont vagues et les indications mélangées. Les durée de suivie sont très inégales entre les études, comprises entre 6 mois et plus de 5 ans (Romo et al 1998, Ramakrishnan et al 2007). D'autres matériaux ont pu être associés comme les greffes dermiques acellulaires purifiées (Alloderm©) (Romo et al 1998).

d. Polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe)

Le polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe) ou Teflon® est un polymère linéaire thermoplastique qui possède des propriétés remarquables en particulier une grande inertie chimique. Il est facilement déformable, semi-cristallin, hydrophobe et son allongement est aisé. Il présente un coefficient de friction bas et reste stable à des températures élevées (327°C). Beaucoup utilisé en chirurgie vasculaire, son caractère hydrophobe n'est pas forcément un avantage car il empêche l'adhésion des cellules endothéliales lorsqu'il est utilisé comme substitut vasculaire pour la substitution des vaisseaux de petits calibres. Rothstein et Waldman ont publié en 1989 et 1991 les premières applications en rhinoplastie d'augmentation. Plus tard, l'excellente biocompatibilité faciale sous-cutanée a permis son utilisation à plus large échelle dans cette indication. C'est une structure microporeuse (10-30 µm) permettant au tissu fibreux de pénétrer rapidement l'implant et de le stabiliser. Aujourd'hui plusieurs auteurs ont rapporté de larges séries rétrospectives avec des reculs supérieurs à 5 ans.

Il permet un gain de hauteur du dorsum nasal jusqu'à 10 mm (Godin et al 1999). Sur 309 patients implantés en sous-cutané, Godin et al ont rapporté un taux d'infection de 3,2 % dans un délai moyen de 16 mois nécessitant le retrait de l'implant (Godin et al 1999). Ces résultats sont identiques à ceux retrouvés par Conrad et Gillman pour 189 patients avec un recul moyen de 6 ans (Conrad et Gillman 1998).

Cependant, sa souplesse ne lui permet pas d'offrir un tuteur solide pour remplacer le septum nasal et servir de greffon de soutien. Il reste sensible aux infections en cas de perforation septale associée et lors des rhinoplasties secondaires (Godin et al 1999). Pour finir, son comportement vis-à-vis de l'épithélium respiratoire n'est pas connu.

e. Polydioxanone

Il a longtemps été utilisé comme substitut osseux notamment pour la reconstruction du plancher de l'orbite (Hollinger 1986). C'est un des rares biomatériaux à avoir été évalué et utilisé pour la reconstruction du septum nasal chez l'animal et chez l'homme. Sous forme de feuille, il semble que cette matrice puisse servir de tuteur à la régénération cartilagineuse septale et auriculaire complète *in vivo* chez le lapin (Boenisch 2000, 2003). Les résultats obtenus montraient un « *restituo ad integrum* » cartilagineux en microscopie optique après résection puis remise en place de la pièce cartilagineuse multifragmentée au contact de la

matrice après 25 semaines. Le temps de résorption complète du PDS est de 5 à 8 mois dans ces localisations. Cependant les zones de cartilage réséquées n'ont pas été spécifiquement cartographiées sur le septum du lapin, les feuilles de PDS ont été implantées par voie haute sous les os nasaux et non sur le septum antérieur et l'on ne connaît pas la composition du cartilage néoformé.

Il a depuis servi chez l'homme avec une certaine efficacité pour reconstruire des nez complexes, à condition que les fragments cartilagineux disponibles dans la loge septale puissent être réorganisés, retaillés et suturés à la feuille de PDS (Boenisch 2000 ; Gerlinger et al 2007; Petropoulos et al 2006). L'ensemble est alors réimplanté et fixé. Le recul maximal est de 24 mois, sans complication. La philosophie de ses auteurs concernant la réparation du septum nasal est différente de la notre concernant la remise en place de plusieurs fragments réassemblés alors que seul un fragment d'une hauteur suffisante entre les CLS et l'ENA suffit dans 80 à 90 % des septoplasties pour soutenir la pyramide et la pointe de nez, soit directement avec le septum antérieur, soit après dépose-repose ou rotation avancement du septum postérieur. Ce qui veut dire que les indications proposées dans ces études auraient pu être réparées avec une autre technique chirurgicale sans prélèvement autologue autre sans biomatériau et avec la même efficacité. Par ailleurs si ce matériau, par son caractère biodégradable, semble avoir un intérêt dans la reconstruction septale, il ne s'adresse pas aux septums dont le cartilage est multiframegmenté, encapsulé dans de la fibrose, dont la dissection sans dégradation est aléatoire, pour des fragments amincis, friables, non suturables. Il ne s'adresse pas non plus aux nez déshabités. Il est souple, la procédure d'assemblage et de mise en forme est longue, sa fixation nécessite des points trans-septaux. D'autre part, il n'a pas été évalué pour la réparation des perforations septales.

f. Acides polylactiques (PLA), Acide poly-L-lactiques (PLLA) et copolymères

Leur solidité est supérieure à celle d'une feuille de 0.25 mm de PDS mais aussi à celle de l'os et du cartilage costal (320 à 150 MPa *versus* 10 à 100 MPa) (Kontio et al 2005 ; Della Santina et Byrne 2006). Utilisés pour les reconstructions de la pyramide nasale après chirurgie d'exérèse carcinologique ayant emportée le septum et qui sera suivie d'une radiothérapie, ils sont tous résorbables et ne peuvent servir de support à une reconstruction

définitive (Della Santina et Byrne 2006). Ces auteurs l'ont utilisé comme charpente temporaire pour le soutien des tissus mous afin d'éviter la rétraction tissulaire et permettre une reconstruction par des greffons autologues dans un deuxième temps, le tout sans gêner la surveillance carcinologique. Cette stratégie a été choisie, afin de retarder la reconstruction définitive à une date où le risque de récurrence précoce est moindre tout en maintenant un résultat esthétique et fonctionnel meilleur qu'en l'absence de support de la pyramide nasale.

D'autres équipes ont utilisé un copolymère micro et macroporeux de 70 :30 poly(L-lactide-co-D,L-lactide) comme atelle septale afin de remettre en rectitude et d'assurer la solidité d'un septum antérieur toujours présent. Le délai de résorption complète est de 6 à 10 mois pendant lequel il assure la solidité de l'ensemble remplacé ultérieurement par la cicatrisation fibreuse naturelle. Deux plaques viennent prendre en sandwich le septum antérieur restant, posant un problème d'épaississement avec ses conséquences obstructives, le nombre de patient est limité et aucune donnée fondamentale et histologique ne sont disponibles (Watzinger 2008). D'autre part les patients proposés ne sont pas ceux à qui on aurait proposé un greffon autologue de gros volume.

g. Ingénierie tissulaire cartilagineuse

Les capacités propres de régénération du cartilage septal de l'adulte sont meilleures que celle du cartilage articulaire mais à la différence de l'os, elles restent faibles pour combler une perte de substance (Kafienah et al 2002). Plusieurs équipes ont essayé de produire du cartilage normal à partir de chondrocytes natifs issus du septum ou des pavillons auriculaires.

L'amplification de chondrocytes de septum nasal est possible en culture sur plastique mais les cellules subissent dès le premier passage un processus de dédifférenciation vers le phénotype fibroblastique (Homicz et al 2002). Elles poursuivent leur synthèse de collagène II et de chondroïtine-4-sulfate mais dans une moindre mesure, associée à la synthèse de collagène de types I et III (Mayne et al 1976). Plusieurs paramètres influencent la prolifération et la différenciation des chondrocytes : la densité cellulaire (effet paracrine) mais aussi la nature physico-chimique et la porosité du support (Miot et al 2005, Malda et al 2005, Moroni et al 2007). Par analogie aux travaux réalisés pour le cartilage articulaire,

plusieurs auteurs ont essayé différentes matrices de polymères biodégradables comme support de culture pour obtenir une redifférenciation des chondrocytes. Les matrices d'acide polyglycolique (PGA) n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats que sur plastique, parce que le cartilage néoformé était optiquement identique au cartilage natif mais avec une matrice extra-cellulaire en moindre quantité et de qualité médiocre : il contenait 40 fois moins de collagène et 30 fois moins de GAGs pour une cellularité supérieure au cartilage natif (Homicz et al 2002, 2003a). Rotter et al ont amplifié des chondrocytes humains de septum nasal sur un gel d'acide L-poly lactique et d'acide polyglycolique (PLA/PGA 10/90 %) puis implanté en sous-cutané chez la souris nude sans obtenir de meilleurs résultats (Rotter et al 1998). Récemment Haisch et al à partir d'une matrice non tissée de PLA/PGAensemencée de chondrocytes humain septaux puis implantée 12 semaines chez la souris, ont obtenu un cartilage optiquement comparable à celui du septum natif avec les mêmes constantes mécaniques de compression et de point de rupture (Haisch et al 2005). D'autres ont utilisé une matrice d'acide hyaluronique, du verre bioactif 45S5, obtenant un cartilage optiquement normal mais sans quantification des composés de la MEC (Naumann 2003, Asselin et al 2004). D'autres équipes se sont intéressées à des supports d'agarose ou d'alginate permettant d'obtenir une redifférenciation des chondrocytes (Aulthouse et al 1989 ; Benja and Schaffer 1978 ; Homicz et al 2003b). Même en changeant de support, la MEC restait de qualité inférieure au cartilage natif : la quantité de GAG sulfatés (S-GAG) après 14 jours de cultures sur alginate était de 246 pg G-GAG/cellule soit 20 % de la proportion retrouvée dans le septum normal humain (Homicz et al 2003b). Malda et al ont utilisé une matrice de polyéthylène glycol téréphthalate/polybutylène téréphthalate et amplifié des chondrocytes humains de septum pour n'obtenir qu'une MEC composée de seulement 288 µg de protéoglycanes/cellule soit encore 20 % de la teneur normale du cartilage (Malda et al 2003). Ainsi la première problématique de l'ingénierie du tissu cartilagineux reste d'obtenir un cartilage à la MEC et aux propriétés mécaniques identiques à celles du cartilage natif. Cependant plus récemment Wu et al ont associé la technique de culture des chondrocytes selon la méthode des macroagrégats pour fabriquer ensuite sur une matrice d'ester hyaluronique un cartilage alaire nasal de forme humaine. (Wu et al 2007). Cette technique de culture faite à partir de chondrocytes isolés du cartilage auriculaire de lapin, permet d'obtenir une feuille multicouche de chondrocytes accompagnés de leur MEC, suffisamment solide pour être détachée du support et manipulée avec des

pinces. Cette feuille est ensuite appliquée sur la trame d'ester hyaluronique et cultivée puis implantée 12 semaines en sous-cutané dans le dos du lapin. Le cartilage alaire ainsi obtenu garde sa forme et son épaisseur sans résorption mais son module de compression est plus faible que le cartilage auriculaire de lapin natif (0,7 versus 1,07) de manière significative. Par ailleurs le contenu en GAGs est aussi plus faible (85,67 versus 118,5) de manière significative. Cependant il s'agit d'un cartilage comprenant 70 % de la proportion de GAGs du cartilage contrôle (Wu et al 2007).

L'une des différences importante pour l'ingénierie tissulaire cartilagineuse à destinée du massif facial par rapport à celle réalisée pour les cartilages articulaires est la mise en forme de l'échafaudage matrice/cellules. Cependant, la facilité de modelage de certains biomatériaux a permis la reconstruction tridimensionnelle d'implants (pavillon auriculaire). Mais la troisième problématique est la résorption cartilagineuse après implantation. En clinique, ce phénomène de résorption des greffons cartilagineux autologues fait avec du cartilage septal pour régulariser le dorsum était déjà connu depuis longtemps. Le degré de résorption a été évalué à 3 mois après implantation sur le dorsum nasal du lapin et montrait 7,6 % de résorption pour le cartilage costal, 23 % pour le cartilage auriculaire et 30 % pour le cartilage septal natif (Lattyak et al 2003). Plusieurs facteurs en sont responsables : le degré d'écrasement des greffons qui compromet la vitalité chondrocytaire, la faiblesse intrinsèque du cartilage à réaliser sa propre réparation, son faible pouvoir de coalescence et les phénomènes inflammatoires locaux (Cakmak et al 2005, Verwoerd-Verhoef et al 1998b; Kaiser 2006).

En ingénierie tissulaire, ce phénomène de résorption a aussi été observé lors de l'implantation *in vivo* de néo-organe, les processus cicatriciels locaux (notamment macrophagiques) provoquant une résorption complète même pour des implants réalisés avec des chondrocytes autologues (Haisch et al 2002; Rotter et al 2005). Pour palier ce problème de résorption, certaines équipes ont donc voulu évaluer l'effet protecteur d'une encapsulation du greffon par mise en place d'une couche d'interposition protégeant sa face externe. Plusieurs auteurs ont utilisé de l'os bovin déminéralisé encapsulé avec un lambeau pédiculé de périchondre auriculaire qui a permis d'obtenir la formation de cartilage hyalin dans la majeure partie de la trame osseuse *in vitro* et *in vivo* (Verwoerd-Verhoef HL 1998a, Pirsig W 1995). D'autres ont utilisé des membranes de polyélectrolytes montrant la préservation des dés de cartilage septal implantés chez la souris nude pendant 16 semaines

lors de son encapsulation (Haisch et al 2000). Au contact des zones déchirées des membranes de polyélectrolytes existaient la même réaction cellulaire inflammatoire que celle observée sur les implants non encapsulés. Ces déchirures permettaient une infiltration du type fibroblastiques vers l'intérieur des implants.

Devant les résultats prometteurs de l'encapsulation en ingénierie tissulaire, certains rhinoplasticiens ont modifié leur choix dans la construction des greffons cartilagineux pour les rhinoplasties d'augmentation et les régularisations de dorsum. Ils drapent des dés de cartilage (septal ou auriculaire) non écrasé dans une enveloppe de fascia limitant ainsi considérablement les phénomènes de résorption (Daniel 2004, Kelly et al 2007, Guerrerosantos et al 2006). Récemment Calvert et al ont recherché les causes d'échec des patients sous corrigés dans l'augmentation de hauteur du dorsum nasal par un greffon de cartilage septal en dés entouré de surgicel et ceux sur-corrigés par un greffon entouré de fascia temporal. Ils ont montré chez 27 patients la meilleure vitalité des greffons dorsaux de cartilage septal encapsulés par du fascia temporal que celle observée lors de l'encapsulation par du surgicel® ou seul (Calvert 2006).

La quatrième problématique est l'intégration du cartilage néoformé au cartilage natif. Il est impossible chez le même animal d'obtenir la fusion des deux extrémités de cartilage septal dont l'une des parties a été retirée et remise immédiatement en place lors d'une cicatrisation normale dans la loge septal en présence des deux périchondres (Verwoerd-Verhoef HL 1998 Int J Pediatr). Récemment Pabbruwe et al ont utilisé une matrice de collagène ensemencée de chondrocytes de septum nasal bovin pris en sandwich entre deux morceaux de cartilage septal. Après 40 jours de culture il existait une migration réciproque des chondrocytes vers les différents compartiments et une fusion cartilagineuse des différentes pièces (Pabbruwe et al 2009).

B. LORS DE PERFORATIONS SEPTALES

Seules les perforations symptomatiques font appel à un traitement réparateur. Les trois attitudes proposées dans la littérature sont la réparation prothétique, les reconstructions chirurgicales de fermeture ou les procédés d'agrandissement. Elles constituent un véritable challenge chirurgical dans le rapport bénéfice/risque. Par contre, il n'existe aucun consensus sur un procédé chirurgical simple de fermeture pour les perforations supérieures à 1 cm (taux d'échec : 30 à 90 %), ce qui souligne les défauts et les manques de chaque technique (Cogswell et Goodacre 2000, Schultz-Coulon 2005). Les procédés d'agrandissement ont montré une meilleure efficacité sur la disparition des symptômes que les procédés de fermeture, mais ils ne concernent que les perforations isolées sans retentissement sur la valve et la pyramide nasale et nécessitent comme pour les procédés de fermeture une correction des déformations septales résiduelles (Eng et al 2001, de Gabory et Stoll 2008).

1. Réparation prothétique

Les obturateurs synthétiques (Silicone, résines acryliques) ont été utilisés pour combler ces pertes de substance. Mais leur usage se heurte à deux difficultés : l'exactitude du calcul de la surface du bouton obturateur qui souvent n'est pas rétentif et l'observance du patient qui l'abandonne à court/moyen terme car il est plus ou moins bien toléré et se comporte parfois comme un corps étranger (McKinstry et Johnson 1989, Kern et al 1977, Osma et al 1999, Davenport et al 1984).

2. Réparation chirurgicale

a. Sans support de recolonisation épithéliale

Les perforations inférieures ou égales à un centimètre sont faciles à obturer par le biais d'autoplasties muqueuses de voisinage (Climo 1956, Gollom 1968, Fairbanks 1980,

Meghachi et al 2004). Ces procédés font appel à des lambeaux de glissement ou de rotation, des plasties en VY simples qui ne concernent pas le sujet de ce travail.

b. Avec support de recolonisation épithéliale

i. Autologues.

Beaucoup d'études rétrospectives de faisabilité et d'efficacité sont disponibles dans la littérature concernant les techniques chirurgicales de fermeture pour les perforations supérieures à 1 cm. Ces procédés de fermeture font appel à des lambeaux locaux naso-septaux ou régionaux (cornet inférieur, vestibule buccal), cutanés (labial). Les lambeaux naso-septaux nécessitent des vastes décollements bilatéraux dans les fosses nasales, des contre-incisions de décharges, des sutures bord à bord et laissent parfois en place des espaces morts. Les lambeaux régionaux laissent parfois des cicatrices et sont pourvoyeurs de synéchies (Ohlsén 1988).

Au consensus d'expert existant dans la littérature sur l'intérêt des lambeaux larges bilatéraux s'ajoute la nécessité tout aussi consensuelle d'adjoindre un matériau d'interposition conjonctif autologue dont la source est variable selon les équipes : du fascia temporal (Mladina et Heinzl 1995, Núñez-Fernández 1998), du cartilage de conque auriculaire (Hussain et Kay 1992, Schultz-Coulon 2005, Meyer 1994), du cartilage de conque plus de la peau rétroauriculaire (Woolford et Jones 2001), du cartilage costal (Schultz-Coulon 2005), des prélèvements osseux (Goodman et Strelzow 1982, Núñez-Fernández 1998) et cutanés (Ohlsén 1988). Ces attitudes ont été justifiées pour servir de support collagénique et de guide à la muqueuse des lambeaux de couverture. Ils nécessitent tous d'être recouverts par des lambeaux de couverture bilatéraux. Cependant ces lambeaux sont parfois trop courts pour recouvrir l'ensemble de la perforation des deux côtés, les sutures doivent se faire dans des endroits exigus avec plus ou moins d'exactitude et d'efficacité et des désunions secondaires ont été décrites (Schultz-Coulon 1994). Le choix de l'un ou l'autre de ces matériaux ne se fonde sur aucune preuve et les conséquences cicatricielles endonasales et faciales de ces techniques apparaissent mal adaptées à cette chirurgie fonctionnelle.

De plus la comparaison de leurs résultats se heurte à plusieurs biais. Ils sont exprimés soit en taux de fermeture (Schultz-Coulon 2005, Meyer 1994, Olhsén 1988, Romo T 3rd et al 1995, Núñez-Fernández 1998, Meghachi et al 2004), soit en taux d'amélioration de la symptomatologie (Newton et al 2003, Fairbanks et Fairbanks 1980, Meghachi et al 2004). Certains résultats incluent les fermetures partielles (Fairbanks et Fairbanks 1980). Certaines techniques apparaissent préjudiciables pour la respiration nasale (Vuyk et Vershuis 1988, Woolford et Jones 2001).

D'autres parts, il n'existe pas de consensus sur la qualification des perforations par les auteurs (Cogswell et Goodacre 2000). Les populations étudiées sont très hétérogènes en termes d'effectif et de taille de perforations : de 4 à 403 patients (Mladina et Heinzel 1995, Schultz-Coulon 2005) , de 1,5 à 5 cm de grand axe (Schultz-Coulon 1994). Les durées de suivi post-opératoire sont très variables : de 6 à 28 mois (Woolford et Jones, Schultz-Coulon 1994) alors que des reperforations à distance ont été décrites (Ayshford et al 2003, Schultz-Coulon 1994).

Ces techniques de fermeture nécessitent souvent plusieurs interventions avant d'obtenir une fermeture complète (Romo 3rd 1995, Olhsén 1988, Vuyk et Vershuis 1988, Meyer 1994) et d'autres nécessitent la mise en place d'attelles de contention pour maintenir le montage en rectitude qui sont parfois mal tolérées (Núñez-Fernández 1998). D'autres auteurs ont proposé d'utiliser des expandeurs de muqueuse mise en place par voie de degloving ou des lambeaux libres et pédiculés dont la morbidité et les séquelles post-opératoires apparaissent démesurés par rapport au technique d'agrandissement proposée pour les perforations de grande taille (Romo 3rd 1995, Mobley et al 2001).

Une seule équipe a réellement déterminé les capacités d'une greffe de derme autologue à servir de tuteur à la muqueuse septale pour la fermeture des perforations septales sans qu'aucune autre reconstruction ne vienne isoler le greffon du milieu extérieur (Lee et al 1999). Des perforations septales chez le cochon ont été fermées par du fascia temporal et par un greffon de derme autologue rétroauriculaire. Les berges du greffon étaient placées d'un côté entre le cartilage et le mucopérichondre au-delà des berges de la perte de substance. Ses faces restaient en contact avec le milieu extérieur. Les taux de fermeture obtenus étaient respectivement de 0 et 80 % de la surface des perforations. Si ces données sont encourageantes, cette étude ne comportait que deux animaux par groupe, la

fermeture était évaluée à un mois, celle obtenue du côté controlatéral n'était ni visible ni mentionnée, l'épithélium de couverture obtenu était de type épidermoïde kératinisé. Les résultats chez l'homme avec la même technique pour des perforations < à 2 cm retrouvaient 64 % de fermeture complète, 28,5 % de fermeture partielle et 7,5 % d'échec. Pour obtenir ces résultats cette technique nécessitait un prélèvement de derme à la face interne du bras, la mise en place d'attelle de silicone pendant 10 jours, un méchage endonasal les 24 à 72 premières heures et une antibiothérapie pendant 7 à 10 jours (Lee et al 1999). Aucune photo de septum fermé chez l'homme n'est disponible ni aucune évaluation de la fonction respiratoire et sécrétrice de la muqueuse.

ii. Hétérologues

L'une des premières utilisations de matériel hétérologue fut préventive. Une seule équipe a proposé de prévenir la formation de perforation septale au court de septoplastie lors de la perforation des deux lambeaux mucopérichondraux par la mise en place d'un implant de fibrine bovine irradié afin de servir de tuteur à la repousse de la muqueuse. L'absence de groupe contrôle et le faible effectif de la cohorte ne semble pas permettre d'apprécier avec fiabilité les résultats montrant l'absence de formation d'une perforation chez 6 des 9 patients concernés (Gyeney et Kerényi 1977).

Stoor et al ont montré les faibles capacités de fixation de l'*haemophilus influenzae* et du *streptococcus pneumoniae*, principaux agents pathogènes des rhinosinusites bactériennes, sur le verre bioactif S53P4 et l'HA. Les auteurs rapportent une meilleure biocompatibilité du verre bioactif dans l'organe naso-sinusal en cas d'exposition au milieu extérieur que pour l'HA mais aucune statistique n'est disponible. Il semble par ailleurs que l'adsorption de sérum humain à la surface des deux matériaux diminue les capacités déjà faibles des deux bactéries à coloniser ces biomatériaux (Stoor et al 2001). Utilisé par la suite pour fermer des perforations septales chez l'homme, ce verre bioactif a montré un taux de fermeture proche de 100 % mais sous réserve d'un apport de muqueuse par des lambeaux de cornet inférieur pour recouvrir l'implant des deux côtés (Stoor et al 2001 et 2004). Cependant on connaît les inconvénients obstructifs du lambeau de cornet inférieur surtout

quand ils sont bilatéraux et de sa propension à produire des synéchies. Les données fonctionnelles ne sont pas clairement évaluées et la mise en place du verre S53P4 est parfois associée à un greffon cartilagineux septal autologue qui perturbe l'analyse des capacités de l'implant à servir seul de support à la muqueuse. L'implant n'a finalement pas été mis en contact avec le milieu extérieur. La procédure chirurgicale est complexe et nécessite la mise en place d'attelles en silicone pendant 10 jours ainsi qu'une antibioprophylaxie post-opératoire.

V. LE SUBSTITUT SEPTAL « IDEAL » : CAHIER DES CHARGES

Avant de pouvoir remplacer les greffons autologues dans les reconstructions complexes naso-septales, un biomatériau doit d'abord répondre à plusieurs exigences d'ordres générales et locales :

- Offrir un support tridimensionnel et une surface chimique favorisant l'attachement, la prolifération, la différenciation cellulaire et la production d'une MEC,
- avoir une structure poreuse, avec un réseau interconnecté afin de permettre la pénétration des nutriments à l'intérieur du matériau,
- être biocompatible et biorésorbable avec des produits de dégradations non toxiques,
- avoir des propriétés mécaniques de support, adaptées à l'organe dans lequel il doit être implanté,
- avoir une architecture globale permettant la formation tissulaire anisotrope au tissu d'origine,
- avoir une taille et une forme adaptable aux besoins cliniques.

A ces principes généraux s'ajoutent des objectifs locaux pour répondre aux exigences de la relation structure/fonction de l'unité septo-latérale, aux contraintes

environnementales mais aussi à la problématique chirurgicale naso-septale afin que dans l'idéal il puisse :

- Au minimum servir de tuteur à la repousse d'un épithélium respiratoire fonctionnel,
- répondre à des impératifs d'exposition liés à un environnement septique et aérien,
- assurer le maintien du septum sagittal, en rectitude,
- être suffisamment solide pour assurer le soutien des deux tiers inférieurs de la pyramide nasale,
- être facilement modelable pour être adapté aux différentes variations anatomiques locales,
- être peu ou pas résorbable ou de résorption lente (inférieure aux capacités de reconstruction tissulaire) afin de ne pas entraîner à moyen et long terme de modification morphologique,
- et permettre une mise en place par une procédure chirurgicale simple.

Jusqu'à maintenant, aucun biomatériau utilisé en clinique n'a, à notre connaissance, été évalué pour valider ces objectifs notamment pour prouver ses capacités à reconstruire un revêtement muqueux septal voire au moins à servir de tuteur à la repousse de l'épithélium respiratoire. Aucun protocole de validation n'a été proposé selon des normes standardisées (Normes AFNOR NF EN ISO 10993-5 et 6) dans cette localisation (septale) et dans ces indications. De plus toutes les études ont été réalisées sans tenir compte d'un environnement potentiellement toxique. A ce titre les nanoparticules de carbone fabriquées aujourd'hui en quantité importante par les industriels et présentes dans notre quotidien, pourrait interagir avec la muqueuse nasale au cours de la ventilation au même titre que les particules de diesel et influencer la pérennité d'un matériau implanté dans le nez par les réactions inflammatoires et toxiques provoquées.

VI. INFLUENCE DES NANOPARTICULES DE CARBONE DANS LA COMPOSITION DE L'AIR INSPIRE

A. NANOTECHNOLOGIES ET NANOMATERIAUX.

Les nanotechnologies visent à étudier, produire et manipuler des matériaux à l'échelle nanométrique qui présentent des propriétés mécaniques, optiques, électriques et magnétiques particulières associées à leur taille. L'unité de référence est donc le nanomètre ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) ce qui correspond à 1/100 de la largeur d'une molécule d'ADN, à 1/50 000 de l'épaisseur d'un cheveu humain ou à 1/500 000 de l'épaisseur d'un trait de stylo à bille.

Les nanomatériaux sont des matériaux composés ou constitués pour tout ou partie de nano-objets qui leur confèrent des propriétés améliorées ou spécifiques de la dimension nanométrique. Ils sont caractérisés par une taille inférieure à 100 nm dans au moins une dimension et sont regroupés en trois familles (Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004) :

- les nanoparticules (NPs) ou particules ultra-fines (PUFs) dont aucune des dimensions n'est supérieure à 100 nm. L'appellation « nanoparticules » (NPs) est plutôt réservée aux particules manufacturées et destinées à des usages industriels, comme les NPs connues et produites depuis déjà plusieurs années telles que le noir de carbone par pyrolyse à la flamme (IARC 1996). D'autres matériaux sont également produits à grandes échelles à des fins commerciales par des procédés à haute température : la fumée de silice, les PUFs d'oxyde de titane, des métaux ultrafins (qui représentent 95 % du marché des NPs) (Aitken et al 2004; Teague 2004) ou des NPs nouvelles comme les fullerènes. Certaines NPs sont d'origine naturelle, l'ADN avec un diamètre de l'ordre de 2,5 nm, plusieurs virus (10 à 60 nm) et bactéries (30 nm à 10 μm) alors que d'autres sont d'origine minérale ou environnementale. L'appellation « PUFs » se réfère davantage aux particules présentes depuis toujours dans l'environnement (comme la fraction fine du sable de désert, la fumée d'huile, le smog, les fumées provenant d'activité

volcanique ou de feux de forêt et certaines poussières atmosphériques) et anciennes dans le monde du travail (comme les émissions secondaires liées à certains procédés industriels : le soudage génère un panache de fumée dont les particules élémentaires, avant agglomération, ont des dimensions de 10 à 50 nm. Les procédés de combustion (diesel, essence, barbecue, charbon) produisent des NPs de 7 à 40 nm (Teague, 2004).

- les nanofibres, les nanotubes, les nanofilaments et les nanobâtonnets ont une dimension supérieure à 100 nm. Ces termes sont généralement, employés pour désigner des nano-objets longilignes dont les dimensions vont de 1 à quelques dizaines de nanomètres pour la section et de 500 à 10 000 nanomètres pour la longueur.
- les nanofilms, les nanocouches et les nanorevêtements dont deux des dimensions sont supérieures à 100 nm

Dans tous les cas, leurs dimensions sont plus petites que les longueurs critiques qui caractérisent la majorité des phénomènes physiques, ce qui leur confère des propriétés uniques électriques, physiques ou chimiques totalement différentes de celles des mêmes produits ayant une dimension plus importante. Les propriétés des nanostructures sont donc plus directement reliées à celles des molécules individuelles qu'à celles du matériau de même composition chimique mais de taille supérieure (Kohler et Fritzche, 2004; Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004). Les principes de la chimie et de la physique classique des matériaux solides doivent être remplacés par des approches quantiques, basées sur les probabilités où chaque atome, chaque molécule peut assumer un rôle important et où les interactions entre ces derniers deviennent un enjeu majeur sur le comportement de l'ensemble. Ce ne sont donc plus les paramètres mécaniques classiques des solides qui priment mais les dimensions moléculaires et atomiques individuelles et les interactions qui déterminent l'arrangement, la stabilité, la flexibilité et la fonction des nanostructures mais aussi leur rapport avec le vivant. Deux facteurs principaux peuvent être responsables des changements de propriétés observés : une surface relative par unité de masse beaucoup plus importante et une prédominance des effets quantiques. La première

étant responsable des changements de réactivité qui peut s'accroître considérablement avec une diminution de leur taille tandis que la seconde, observée pour des particules de quelques dizaines de nm, explique les changements au niveau des propriétés optique, électrique, mécanique et magnétique (Brouwer et al 2004, Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004).

Les applications sont très diverses et concernent aussi bien la chimie, l'électronique, l'industrie textile, les pneumatiques, l'hygiène, la cosmétologie, le diagnostic que la pharmacologie où les NPs pourraient être utilisées comme vecteurs de médicaments (Tableau 2).

Applications utilisant les nanotechnologies, par secteur d'activité	
Secteur d'activité	Exemples d'applications actuelles et envisagées
Automobile, aéronautique et espace	matériaux renforcés et plus légers ; peintures extérieures avec effets de couleur, plus brillantes, antirayures, anticorrosion et antisalissures ; capteurs optimisant les performances des moteurs ; détecteurs de glace sur les ailes d'avion ; additifs pour diesel permettant une meilleure combustion ; pneumatiques plus durables et recyclables
Electronique et communications	mémoires à haute densité et processeurs miniaturisés ; cellules solaires ; bibliothèques électroniques de poche ; ordinateurs et jeux électroniques ultra-rapides ; technologies sans fil ; écrans plats
Chimie et matériaux	pigments ; poudres céramiques ; inhibiteurs de corrosion ; catalyseurs multi-fonctionnels ; vitres antisalissures et autonettoyantes ; textiles et revêtements antibactériens et ultrarésistants ; membranes pour la séparation des matériaux (traitement de l'eau) ; couches ou multicouches fonctionnelles : isolation thermique
Pharmacie, biomédical et biotechnologie	médicaments et agents actifs ; surfaces adhésives médicales anti-allergènes ; médicaments sur mesure délivrés uniquement à des organes précis ; surfaces bio-compatibles pour implants ; vaccins oraux ; régénération des os et des tissus ; kits d'autodiagnostic
Cosmétique	crèmes solaires transparentes ; pâtes à dentifrice plus abrasives ; maquillage et notamment rouge à lèvres avec une meilleure tenue
Santé	appareils et moyens de diagnostic miniaturisés et nanodétection ; tissus et implants munis de revêtements améliorant la biocompatibilité et la bioactivité ; capteurs multi-fonctionnels ; analyses d'ADN ; membranes pour dialyse ; destruction de tumeurs par chauffage ; thérapie génique : nanovecteurs pour transfert de gènes ; microchirurgie et médecine réparatrice : nano-implants et prothèses
Energie	cellules photovoltaïques nouvelle génération ; nouveaux types de batteries ; fenêtres intelligentes ; matériaux isolants plus efficaces ; photosynthèse artificielle (énergie « verte ») ; entreposage d'hydrogène combustible

Tableau 2 : éventail des applications potentielles ou déjà utilisées des nano-matériaux

(<http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.nsf>).

B. CARACTERISTIQUES ET PROPRIETES DES NANOTUBES DE CARBONE

Les nanotubes de carbone constituent la troisième forme cristalline de carbone (les 2 premières étant le graphite et le diamant). Sa structure est représentée par un ou plusieurs feuillets de graphène (atomes de carbone disposés en réseau hexagonal comme un nid

d'abeille) enroulés sur eux-mêmes (Single Wall Carbon Nanotube SWNT), ou concentriques les uns autour des autres (Multi Wall Carbon Nanotube MWNT). Leur diamètre interne peut-être aussi petit que 0,7 nm et leur longueur atteindre plusieurs millimètres (Hett, 2004). Les MWNTs peuvent atteindre des diamètres de 20 nm (Aitken et al 2004). Chaque extrémité peut être ouverte ou fermée par une demi-molécule de fullerène (demi-sphère).

De par leur structure très simple et très stable (Hameed Hyder, 2003), les nanotubes de carbone possèdent des propriétés physiques, mécaniques et électriques spécifiques (Kohler et Fritzsche, 2004; Pautrat, 2003; Ratner et Ratner, 2003). Leurs propriétés semi-conductrices, selon la façon dont le feuillet de carbone est enroulé sur lui-même, leur permettent de transporter jusqu'à un milliard d'ampères par mètre carré (Pautrat, 2003, Aitken *et al.*, 2004), ce qui en font des supraconducteurs (Ratner et Ratner, 2003). Légers et flexibles, leur résistance mécanique est soixante fois supérieure à l'acier, pour un poids six fois inférieur (Ratner et Ratner, 2003, Aitken *et al.*, 2004). Ce sont par ailleurs d'excellents conducteurs thermiques (Hameed Hyder, 2003) et, leur grande surface spécifique (1300 m²/g) leur confère une forte capacité d'adsorption moléculaire (Maynard *et al.*, 2004).

C. PENETRATION ET DEVENIR DES NANOPARTICULES DANS L'ORGANISME

Peu de connaissances sont actuellement disponibles concernant la toxicité pour l'homme des nanomatériaux. La plupart des données proviennent d'études réalisées sur lignées cellulaires ou chez l'animal. Pourtant, les préoccupations vis-à-vis de la toxicité potentielle des NPs sont justifiées car elles ont une taille qui recouvre celle des PUF caractéristiques de la pollution atmosphérique et dont le caractère pathogène spécifique a déjà été démontré d'un point de vue épidémiologique (Ibald-Mulli et al., 2002), chez le rongeur (Li et al., 1999), *in vitro* (Boland et al., 1999 et 2000) et en clinique (Holgate et al., 2003). Or, ce pouvoir pathogène spécifique pourrait s'appliquer aux NPs manufacturées.

Witschger et al ont montré qu'à masse égale la diminution du diamètre des particules entraînait une augmentation du nombre de molécules à leur surface et que le rapport surface/volume augmentait de façon exponentielle avec la diminution de la taille. Pour des

NPs de 20 nm de diamètre le rapport surface/volume atteint $300\text{m}^2/\text{g}$ et la fraction de molécules présentes à la surface était d'environ 15 % alors que pour une particule de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre la fraction de molécule adsorbée était inférieure à 1 %. Plus la taille est petite et plus la réactivité de surface augmente, ce qui peut leur donner une activité biologique beaucoup plus importante que des particules de taille plus élevée et de même composition chimique. Il a été clairement établi que les objets de taille nanométrique présentent une toxicité différente de celle des mêmes composés sous forme micro ou macroscopique.

Trois voies de pénétrations des NPs dans l'organisme sont possibles : respiratoire, cutanée et digestive. L'appareil respiratoire étant la voie la plus importante (cf supra). Les particules de diamètre compris entre 10 et 100 nm se déposent majoritairement dans les alvéoles pulmonaires, dans une proportion nettement supérieure à celle des particules micrométriques. Les particules plus petites, quant à elles, se déposent principalement dans les voies aériennes supérieures.

Leur toxicité dépend en partie de ces caractéristiques de dépôt (région de l'arbre respiratoire, quantité...) mais également de la capacité de la portion de l'arbre respiratoire concernée à les éliminer partiellement ou totalement (clairance).

Deux procédés sont impliqués :

- l'élimination chimique, par phagocytose des macrophages, processus surtout actif dans les alvéoles pulmonaires. Cependant, plusieurs études semblent indiquer que les NPs non agrégées et non agglomérées, ne sont pas phagocytées de façon efficace par les macrophages à l'inverse des particules de $1\ \text{à}\ 3\ \mu\text{m}$ (Tabata et Ikada 1988, Green et al 1998). De plus les macrophages ne peuvent pas prendre efficacement en charge les fibres longues de plus de 20 micromètres.
- l'élimination physique, grâce au tapis muco-ciliaire qui transporte les NPs peu ou pas solubles vers le rhinopharynx pour être dégluties (et accéder au système digestif) ou par mouchage et éternuements vers l'extérieur. La clairance de la muqueuse normale est de 6 à 10 mm/min donnant un temps

total de traversée du vestibule narinaire au pharynx de 10 à 15 minutes en moyenne (Pennington et al 1998). Mais il existe de grandes variations inter-individuelles (Liote et al 1989). De plus, ce temps d'évacuation s'allonge, notamment lorsqu'il existe une détérioration de l'épithélium cilié, lors des transformations métaplasiques, comme c'est le cas chez le travailleur exposé à des irritants. La fréquence de la mucostase rencontrée chez ces travailleurs augmente avec la concentration en poussières inhalées (Black et al 1974) et en fonction de la durée d'exposition (Ahman et al 1996).

Cent mille fois plus petits qu'une cellule humaine (cellule nasale *in vitro* 50 à 100 μm), les NPs inhalées sont capables, contrairement aux autres poussières, de franchir les barrières biologiques : nasale et méningée, bronchique, alvéolaire et de migrer vers différents sites de l'organisme (processus de translocation). Les NPs peuvent ainsi rejoindre les tissus interstitiels du poumon (Oberdörster et al 1992 et 2002, Kreyling et Scheuch 2002, Shedova et al 2005) et ce phénomène semble plus important pour des espèces supérieures tels le chien et le singe que chez les rongeurs (Nikula et al 1997 ; Kreyling et Scheuch 2000). Elles peuvent traverser la muqueuse nasale et passer via les nerfs olfactifs vers les méninges et le cerveau. Katz et al ont décrit le transport neuronal de microsphères de 20 à 200 nm du nez vers le cerveau. L'inhalation de particules de carbone radiomarquées de 35 nm a conduit à une accumulation significative dans le bulbe olfactif de rats sept jours après l'exposition (Katz et al 1984). Ce passage de la barrière hématoencéphalique par les NPs a été confirmé par d'autres études pour des NPs d'or, à partir de fumées de soudage contenant du manganèse et de divers métaux solubles (Tjalve et Henriksson 1999, Brenneman et al 2000, Dorman et al 2002, Oberdörster et al 2004, Gao et al 2007). Ces résultats ont aussi été confirmé pour les PUFs de la pollution urbaine de Mexico sur des adultes jeunes (Calderón-Garcidueñas et al 2003 et 2008). La diffusion et l'accumulation de NPs inhalées dans l'ensemble de l'organisme pourraient jouer un rôle majeur dans le développement de certaines pathologies. Cependant, cette propriété pourrait être utilisée en thérapeutique pour administrer des principes actifs vers le cerveau via la muqueuse nasale. La figure 26 résume les effets potentiels des particules ultrafines inhalées.

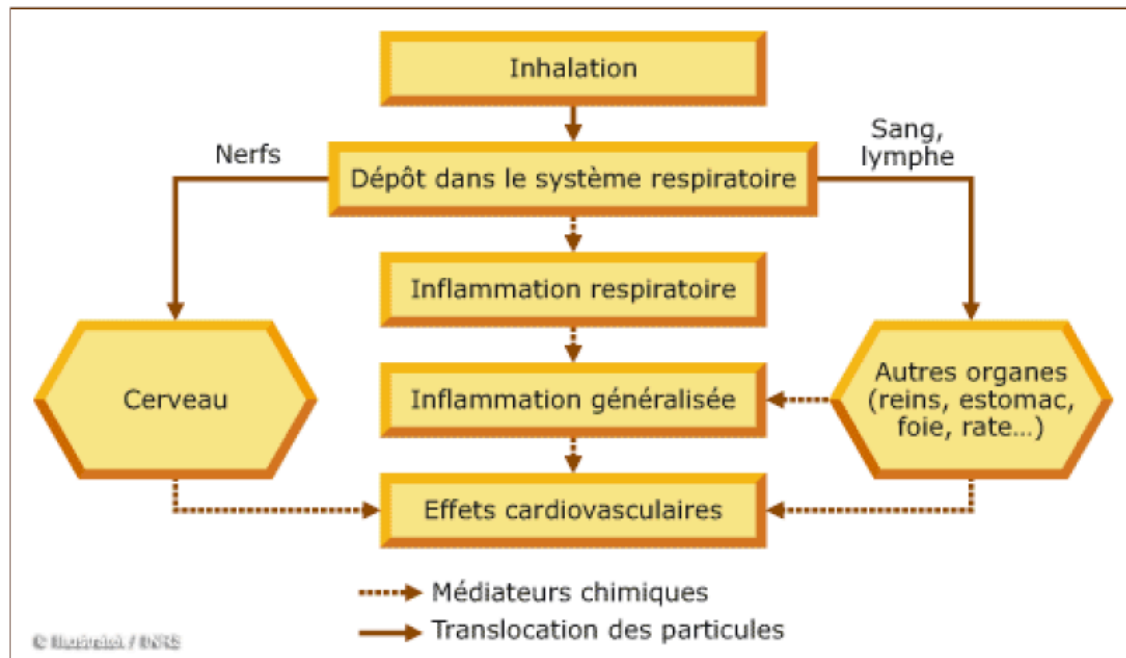


Figure 26 : pénétration, devenir des NPs inhalées et leurs effets potentiels dans l'organisme.

Les PUFs, de mêmes dimensions que les NPs, pénètrent principalement dans l'organisme via l'inhalation et se déposent dans l'arbre respiratoire, une partie pouvant se rendre directement au cerveau via les nerfs olfactifs.

Les poumons ne réussissent pas nécessairement à éliminer ces particules indésirables qui causent alors de l'inflammation pulmonaire qui peut conduire au développement de certaines maladies pulmonaires. De plus, certaines de ces très fines poussières peuvent franchir les différentes barrières de protection pulmonaire, se rendre au système sanguin et être distribuées dans toutes les parties du corps où elles pourront causer des dommages de différentes natures (www.inrs.fr).

Les principaux facteurs responsables de leurs effets toxiques potentiels ne sont pas tous connus. Les NPs sont des structures complexes et chacune possède un potentiel de toxicité qui lui est propre. Elles présentent ainsi une toxicité spécifique liée à leur nature chimique mais aussi à l'intervention parfois prédominante de paramètres physiques comme la taille, le nombre ou la surface. Elles présentent deux types de risques objectifs :

- les risques classiques liés à la toxicité propre de la matière qui les constitue qu'elle soit sous forme micro ou macroscopique,
- les risques spécifiques induits notamment par la taille proprement dite et par leur réactivité de surface.

Les principaux facteurs connus qui déterminent les effets toxicologiques des NPs sur l'organisme sont :

- liés à l'exposition : voies de pénétration dans l'organisme, importance et durée de l'exposition,

- liés à l'organisme exposé : susceptibilité individuelle, pratique d'une activité physique, sites de dépôt, évolution et translocation des NPs après pénétration dans l'organisme,
- liés aux NPs : caractéristiques physico-chimiques impliquées dans le degré de toxicité des NPs (Tableau 3).

COMPOSITION CHIMIQUE	La nature des nano-objets (notamment métallique), ainsi que la présence de composés chimiques (comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les métaux de transition : fer, nickel, etc.) adsorbés sur leur surface, sont susceptibles d'influer sur leur toxicité. En effet, les métaux de transition interviennent dans des réactions aboutissant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui ont un rôle essentiel dans le processus d'inflammation.
TAILLE	La diminution de taille favorise leur pénétration dans les cellules et le passage des barrières biologiques. La taille conditionne le site de dépôt.
SURFACE	La réactivité chimique d'une particule dépend de sa surface. La surface spécifique d'une particule est inversement proportionnelle à sa taille. Elle joue un rôle direct dans les contacts et les interactions avec les tissus, les cellules et les fluides biologiques. Elle favorise les phénomènes d'adsorption.
NOMBRE	Son augmentation favorise le passage des barrières
FORME	La toxicité semble supérieure pour la forme fibreuse (nanotube) que pour la forme sphérique (fullerène)
STRUCTURE	Elle module la toxicité (cristallinité)
SOLUBILITE	La dissolution est un paramètre critique de leur toxicité et leur devenir dans l'organisme
DEGRES D'AGGREGATION ET D'AGGLOMERATION	Les NPs ont une tendance naturelle à s'unir de façon irréversible pour donner naissance à des structures secondaires nommés agrégats. Sous certaines conditions, les agrégats peuvent à leur tour se lier pour former des structures tertiaires réversibles nommées agglomérats dont la taille peut atteindre plusieurs dizaines de micromètres. Ces deux phénomènes peuvent modifier le dépôt des nano-objets dans l'organisme, leur pénétration et leurs effets biologiques.

Tableau 3 : principaux facteurs qui déterminent la toxicité des NPs

La problématique de toutes les études de toxicologie menées jusqu'à maintenant est créée par leurs résultats qui sont souvent contradictoires et confondants. Un certain nombre d'études démontrent déjà clairement que les objets nanométriques présentent une toxicité plus grande et sont à l'origine d'effets inflammatoires plus importants que les objets micro et macroscopiques de même nature chimique.

Ferin et al. ont exposé des rats à des NPs agglomérées de TiO₂ dont les particules élémentaires avaient un diamètre moyen de 21 nm et formant des agglomérats de 250 nm et à des particules de TiO₂ de 250 nm (Ferin et al 1992). Les deux fractions (nanométrique et non nanométrique) ont induit des réactions inflammatoires aux niveaux alvéolaire et interstitiel. Par contre, la réaction causée par les particules nanométriques était 43 fois plus forte et soutenue que pour les particules micrométriques. Les deux produits ont conduit à une fibrose pulmonaire qui était beaucoup plus sévère dans le cas de la fraction nanométrique. Des dommages épithéliaux ont été rapportés pour la fraction nanométrique, mais non pour la fraction plus grossière. Sur une base massique, la clairance des nanoparticules était environ trois fois plus lente que pour les microparticules. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs équipes avec l'oxyde d'aluminium, Al₂O₃ (Oberdörster et al 1990), le cobalt métallique (Zhang et al., 2000), l'oxyde de titane, TiO₂ (Borm et al 2000 ; Heinrich et al 1995 ; Lee et al 1985 ; Oberdörster et al 1992, ;Renwick et al 2004) et le noir de carbone (Gallaher et al 2003 ; Gilmour et al 2004 ; Li et al 1999 ; Renwick et al 2004). D'autres auteurs ont montré des effets potentiels toxiques à propos des NTCs. Cherukuri et al ont montré que les nanotubes de carbone pouvaient être ingérés par les macrophages péritonéaux de la souris (Cherukuri et al 2005). Monteiro-Riviere et al ont retrouvé des NTCs dans les vacuoles cytoplasmiques de kératocytes épidermiques humains *in vitro*, conduisant à une diminution de la viabilité des cellules et une augmentation significative de l'IL-8 (Monteiro-Riviere et al 2005).

Les propriétés physicochimiques, les propriétés et traitement de surface (Oberdörster 2001), les particules résiduelles des produits catalytiques et de fort potentiel à générer des radicaux libres (Donaldson et al 1996 ; Zang et al 1998) sont autant de facteurs pouvant contribuer à une toxicité plus élevée des nanoparticules comparativement aux microparticules. Paradoxalement, Kagan et al ont montré que la concentration résiduelle en

fer dans les SWNTs ne changeait rien à la production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou d'acide nitrique par contact direct avec la lignée de macrophages péritonéaux murins RAW264.7 aux doses élevées de 0,12 à 0,5 mg/mL. Mais que par contre, ce fer résiduel participait indirectement à la toxicité des SWNTs sur la population de macrophages stimulée par du Zymozan, en augmentant le stress oxydatif extracellulaire, en provoquant une déplétion intracellulaire en molécules anti-oxydantes et l'accumulation des phospholipides hydroperoxydés (Kagan et al 2006). Pour d'autres auteurs, après contact direct sur le même type cellulaire, les SWNTs n'ont pas servi de stimulus pour la production de ROS, de cyclooxygénase-2, de NO, de Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) et IL-1 β (Shedova et al 2005, Dutta et al 2007). Konduru et al ont fonctionnalisé des SWNTs par de la phosphatidylsérine (PS), signal macrophagique pour la clairance apoptotique, et montré leur meilleure reconnaissance et pénétration dans différentes cellules phagocytaires *in vitro* (cellules gliales, macrophages RAW 264.7 et cellule HeLa) et chez la souris (Konduru et al 2009). Cette captation pouvait être inhibée par l'annexine V et la PS-binding protéine.

Plusieurs études suggèrent des effets systémiques possibles des nanoparticules (Health and Safety Executive 2004a et b; Ibalid-Mulli et al 2002). En effet, selon certains auteurs, les fractions nanométriques des particules polluantes, passeraient directement du poumon au sang, modifieraient la viscosité sanguine et seraient ainsi responsables des effets observés (MacNee et al 2000).

D. EFFETS SUR L'ARBRE RESPIRATOIRE DES NANOTUBES DE CARBONE.

Le tableau 4 résume les informations recueillies concernant les effets sur la santé reliés aux SWNTs. Il illustre bien les importantes limitations reliées au peu de connaissances actuellement existantes pour les nanotubes de carbone.

Effet	Voie			
	Inhalation ²	Cutané	Orale	Autres
Toxicocinétique				
Irritation		■ ▲		
Systemique				
Aigu	▲			
Intermédiaire				
Chronique				
Neurologique				
Immunologique		■		
Développement				
Reproduction				
Génotoxique				
Cancer				

¹ Études existantes chez l'humain (■) ou l'animal (▲). Adapté de l'Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).

² Incluant l'instillation intratrachéale.

Tableau 4 : effets sur la santé documentés pour les nanotubes de carbone monoparoi (IRSST 2006, www.irsst.qc.ca).

Peu d'études sont disponibles concernant la toxicité des NTCs sur l'organe nasal, le système broncho-alvéolaire ayant été le plus étudié. La plupart d'entre elles ont été faites avec des SWNTs, peu sont disponibles avec des MWNTS et encore moins avec des DWNTs. En raison des différents processus de synthèse, de la grande hétérogénéité de molécule et de leurs caractéristiques physico-chimiques, les informations obtenues pour un type de NTCs ne sont pas forcément transférables à un autre.

Les premières informations de toxicité ont été obtenues au départ *in vivo* sur le poumon des rongeurs. Huczko et al ont réalisé l'inhalation d'une dose unique de 25 mg de SWNTs chez le cochon d'Inde. Aucun effet sur la fonction pulmonaire (volume courant, fréquence respiratoire et résistance pulmonaire) ou le liquide de lavage broncho-alvéolaire n'aie été observé (Huczko et al 2001). Chez le rat, Warheit et al ont mis en évidence une mortalité de 15 % après instillation intratrachéale d'une préparation de SWNTs contenant de 50 à 60 % de NTCs d'environ 30 nm de diamètre, 30 à 40 % de carbone amorphe, 5% de nickel et 5% de cobalt pour une solution de concentration à 5 mg/kg (Warheit et al 2004). Un blocage mécanique des voies respiratoires supérieures, une réponse inflammatoire, une augmentation de la prolifération cellulaire pulmonaire et des granulomes à caractère multifocal semblaient être les explications de cette mortalité. Mais il n'y a eu aucun effet sur les macrophages pulmonaires.

Chez la souris, Lam et al ont étudié la toxicité pulmonaire de trois préparations de SWNTs injectées en intratrachéal contenant des nanotubes de carbone purifiés (2 % de fer résiduel), des nanotubes de carbone non purifiés (27 % de fer) de même que des nanotubes de carbone contenant 26 % de nickel et 5 % d'yttrium (Lam et al 2003). De la silice et du noir de carbone étaient utilisés comme témoins. Aucun signe clinique n'a été observé à 0,1 mg/mL pour la silice et le noir de carbone, alors qu'il existait une inflammation et des granulomes pulmonaires pour les rats exposés aux trois types de nanotubes de carbone. La mortalité était élevée pour les nanotubes contenant 0,5 mg de nickel (5 animaux/9) mais aucune pour les nanotubes de carbone contenant du fer. L'exposition à la silice à haute concentration a conduit à une réponse inflammatoire légère à modérée aux niveaux alvéolaire et interstitiel et une légère réponse granulomateuse à 7 jours de l'exposition. Ces résultats suggéraient que la formation des granulomes était associée aux SWNTs qui seraient alors cytotoxiques. Shvedova et al montraient sur un modèle de souris qu'il existait un passage interstitiel des septa alvéolaires par les SWNTs et une fibrose pulmonaire en réponse (Shvedova et al 2005).

Plus récemment, Li et al ont montré que les lésions induites dans les alvéoles pulmonaires de souris par des MWNTs étaient moins importantes lors de leur administration par inhalation que par instillation et que le modèle expérimental faisait beaucoup dans l'interprétation des résultats (Li et al 2007). A l'inverse des agrégats retrouvés lors de l'instillation, ceux retrouvés après inhalation étaient plus volumineux dans les bronches que dans les alvéoles. Ils s'accumulaient le long de la paroi bronchique sans entraîner d'inflammation pariétale. Ils ne provoquaient pas dans les alvéoles d'inflammation majeure contrairement à l'administration par instillation.

Le coût et les imperfections des modèles animaux ont orienté les équipes vers l'évaluation *in vitro* de la toxicité. Wörle-Knirsch et al retrouvaient des agrégats de SWNTs dans la lignée cellulaire carcinomateuse alvéolaire humaine A549, inclus dans des endosomes ou plus rarement intramitochondrial (Wörle-Knirsch et al 2006). Soto et al retrouvaient les mêmes résultats sur les A549 (Soto et al 2007). A l'inverse Daroven et al ne retrouvaient pas de pénétration dans les A549 exposées pendant 24 h à 1,56-800 µg/mL de SWNTs et concluaient à une toxicité aiguë faible (Daroven et al 2007). Herzog et al ne retrouvaient pas de pénétrations cytoplasmiques (Herzog et al 2007). La même année,

Kostarelos et al montraient que les SWNTs et les MWNTs pouvaient pénétrer dans le cytoplasme des cellules A549 mais aussi des cellules BALB 3T3, HeLa, Mod-K, Jurkat, des champignons cryptococcus Néoformans, des levures Saccharomyces cerevisiae et des bactéries Escherichia coli (Kostarelos et al 2007). Que cette internalisation était possible après 1 à 4 heures de contact, dans des cellules dépourvues de la fonction de phagocytose (fibroblastes), dans des organismes dépourvus d'une machinerie cellulaire d'endocytose active (Champignons, levures, bactéries). Qu'elle persistait même en inhibant l'endocytose par le NaN_3 quel que soit le groupement de fonctionnalisation des NTCs.

Jia et al retrouvaient sur des macrophages alvéolaires de cochon de Guinée une toxicité des SWNTs supérieure à celle des MWNTs du quartz et des fullerènes après uniquement 6 h d'exposition (Jia et al 2005). Cependant plus récemment Yacobi et al n'ont pas montré d'effet cytotoxique des SWNTs sur des cellules épithéliales alvéolaires de rat (Yacobi et al 2007). Encore plus récemment Rotoli et al ont évalué la cytotoxicité de formes commerciales de MWNTs (fer résiduel 0,1%) et de SWNTs (homogénéité du mélange de SWNTs > 50 %, 40 % d'autres types de NTs, 3% de carbone amorphe, traces de fer résiduel) sur des cultures de la lignées cellulaires Calu-3 (issue d'adénocarcinome de poumon humain). Ils ont montré une altération plus importante de la résistance électrique trans-épithéliale après 4 jours d'exposition à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MWNTs que pour les SWNTs (Témoin Carbon black ne montrait aucune altération). Ces données étaient corrélées au passage transmembranaire du mannitol. L'altération de la barrière épithéliale (Tight junction) était une relation temps et concentration dépendante (Rotoli et al 2008). Paradoxalement ces auteurs ne montraient pas d'altération de la viabilité cellulaire des Calu-3 par rapport à des cellules endothéliales (Human Umbilical Vein Endothelial Cells HUVECs) et des macrophages de type THP-1 pour 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MWNTs. Les mêmes mesures de potentiel transépithélial ont été réalisées en présence et absence d'IL-4 montrant qu'en présence des MWNTs le processus de restauration des jonctions serrées, n'existait pas lorsqu'on retirait de la culture l'IL-4 (Rotoli et al 2008). Les auteurs mettaient en avant la possible relation entre, la production par les lymphocytes Th2 d'IL-4 chez les patients asthmatiques, les MWNTs inhalées et la formation d'une fibrose pulmonaire. Pour valider cette hypothèse, Ryman-Rasmussen et al ont proposé de faire inhaler à des souris ayant un asthme allergique des MWNTs (Ryman-Rasmussen et al 2009). La répartition des agrégats était assez harmonieuse sur l'ensemble de l'arbre broncho-alvéolaire. L'épaisseur de la paroi alvéolaire par dépôts de

collagène augmentait progressivement après 14 jours d'inhalation entre les groupes ayant inhalé du sérum salé, de l'ovalbumine, des MWNTs seuls, et de l'ovalbumine avec les MWNTs. La stimulation pulmonaire par l'ovalbumine provoquait l'augmentation dans le lavage alvéolaire d'IL-13, de TGF β 1 et CXCL9. La stimulation par les MWNTs seuls provoquait l'augmentation de PDGF-AA (Platelet Derived Growth Factor) et des chémokines MCP-1 et éotaxine. L'association des deux stimuli provoquait par conséquent un profil de sécrétion associant essentiellement le PDGF reconnu comme étant un stimulus de la prolifération fibroblastique et le TGF β 1 reconnu comme étant un stimulus et un régulateur de la synthèse et du dépôt de collagène. Les auteurs concluaient que les MWNTs ne peuvent dans le cadre de ce modèle expérimental donner une fibrose pulmonaire que chez les patients ayant un asthme allergique préexistant.

Par ailleurs récemment Shvedova et al ont montré que le pré-traitement d'une culture de macrophage alvéolaire diminuait la phagocytose et la production de NO en réponse à une stimulation bactérienne (Shvedova et al 2008).

Même si certains auteurs ont conclu à l'effet asbestose-like des NTS injecté en masse dans le péritoine de la souris (Poland et al 2008), il n'est pas possible de savoir, en raison du peu d'études et de leurs résultats confondants, si au niveau pulmonaire les NTCs ont un caractère génotoxique et mutagène (Shvedova et al 2009).

Par comparaison avec la masse de données disponibles pour le poumon, les données concernant l'organe naso-sinusal, premier filtre de l'organisme (cf-supra), sont extrêmement pauvres quelque soit le domaine d'investigation. Une seule équipe à notre connaissance a exposé en culture des cellules humaines normales à des NTCs. Stoker et al ont exposé une coculture de cellules épithéliales et de fibroblastes bronchiques humains normaux à différentes concentrations de SWNTs (Stoker et al 2008). Ils retrouvaient une diminution de la résistance électrique transépithéliale réversible à la 6^{ème} heure d'exposition à des concentrations de 10 et 20 % de SWNTs. Parallèlement il existait une augmentation du monoxyde d'azote (NO) de manière concentration dépendante entre 24 et 72 h et une diminution d'activité mitochondriale au MTT après 48 heures de contact.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Les greffons autologues iliaque, costal ou pariétal restent le « Gold standard » de la reconstruction des nez ensellés de classe III et IV. Leur morbidité souvent sous-évaluée dans la littérature et leurs imperfections propres ont conduit certaines équipes à utiliser des biomatériaux disponibles sur le marché. Choisis de manière empirique, ces biomatériaux ont été validés dans d'autres indications et pour d'autres organes. Or, pour disposer d'un biomatériau dédié, il faut tenir compte des spécificités du contenant et du contenu de l'organe naso-sinusien.

Le premier objectif de ce travail était donc de choisir et d'évaluer le comportement d'un biomatériau avec les caractéristiques idéales pour répondre au mieux à la problématique et au cahier des charges de la reconstruction naso-septale.

Ce travail, financé par le Collège Français d'ORL et de Chirurgie Cervico-Faciale a été réalisé conjointement entre l'unité Inserm U577 Biomateriaux et Réparation tissulaire et le Département de Techniques et de Recherches Chirurgicales Appliquées (DE.TE.R.C.A.). Il a permis **la première publication** :

- L de Gabory, R Bareille, D Stoll, L Bordenave, JC Fricain. "Biphasic calcium phosphate to repair nasal septum : the first *in vitro* and *in vivo* study". Acta Biomaterialia 2010;6:909-19.

Le problème de l'exposition humaine aux NPs est de plus en plus d'actualité en raison de leur caractère fortement volatile et du rôle de la filtration nasale dans l'épuration de l'air inspiré. Cependant, nul n'est capable aujourd'hui d'affirmer si ces NPs sont toxiques pour le monde vivant tant les données publiées sont contradictoires dans leurs résultats et anticipées dans leurs conclusions, comme l'a montré la polémique soulevée par l'effet Asbestose-like des nanotubes de carbone (Poland et al 2008, Monica et Monica 2008). De plus, comme nous l'avons vu plus haut, les données concernant les cavités nasales sont pauvres. En raison de l'expertise développée en culture cellulaire et en cytotoxicologie, l'Unité Inserm 577 a été sollicitée par le Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des MATériaux (CIRIMAT) de l'Institut Carnot de Toulouse (UMR

CNRS/Université Paul Sabatier/INP 5085), pour participer au réseau de travail NTCTOX sous la coordination du Dr Emmanuel Flahaut dans le cadre du projet soutenu par l'Agence Nationale pour la Recherche ANR SEST 2006.

Le deuxième objectif de ce travail était par conséquent d'évaluer la cytotoxicité des nanotubes de carbone à double paroi (Double Wall NanoTubes, DWNTs) sur des cellules respiratoires humaines de lignée carcinomateuse bronchique et des cellules nasales normales. Ce travail financé par le projet ANR SEST 2006, a été réalisé à l'U577 et a permis une **deuxième publication** :

- **de Gabory L, Bareille R, Daculsi R, L'Azou B, Flahaut E, Bordenave L. Acute and chronic exposure of normal and malignant human airway epithelial cells to double-walled carbon nanotubes. Toxicology in vitro 2010; soumis, en cours de révision.**

La troisième partie de ce travail est directement en rapport avec le premier objectif. Elle était destinée à obtenir des données supplémentaires concernant la reconstruction du septum par l'implant de BCP dans un modèle animal et de perforation septale plus proche de l'homme.

La quatrième partie concerne par contre les deux sujets étudiés dans la première et la deuxième partie. S'ils sont issus de domaines très différents, ils nous ont paru synergiques. Parce que le nez est susceptible d'être exposé à différents xénobiotiques aéroportés, parce qu'il est en première ligne et joue son rôle de filtre de l'air inspiré, toute reconstruction endonasale par un biomatériau doit permettre aux tissus de couverture de se comporter comme les tissus épithéliaux normaux afin de résister aux agents pathogènes extérieurs. La quatrième partie de notre travail était donc destinée à obtenir des données de toxicologie supplémentaires sur les NTCs, *in vivo*, en évaluant leur influence sur la cicatrisation septale en présence ou non de l'implant BCP chez le mouton à partir d'un aérosol d'une concentration connue comme toxique *in vitro* de DWNTs.

Ces deux parties ont été financées par le collège Français d'ORL et Chirurgie Cervico-Faciale et, la Fondation des Gueules-cassées. Elles ont été réalisées au Département de Techniques et de Recherches Chirurgicales Appliquées (DE.TE.R.C.A.), en collaboration avec le CIC-IT, le service d'anatomopathologie de l'hôpital Pellegrin et le service commun de microscopie électronique de l'Université Bordeaux 2. Elles ont permis **la troisième et quatrième publication, le cinquième manuscrit étant en préparation:**

- **de Gabory L, Fricain JC, Stoll D. La résorption des greffons cartilagineux en rhinoplastie : bases fondamentales. Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord) 2010 ; soumis.**

- **de Gabory L, Delmond S, Deminière C, Stoll D, Bordenave L, Fricain JC. Assessment of BCP implant to repair nasal septum defects in sheep. Plast Reconstr Surg 2010 ; soumis.**

RESULTATS

I. Etude du comportement d'implants BCP utilisés pour la réparation du septum nasal.

A. INTRODUCTION

Les céramiques phospho-calciques sont habituellement utilisées comme substitut osseux en orthopédie et en chirurgie maxillo-faciale. Leur composition structurale et chimique est proche de celle des phases minérales du tissu osseux des mammifères (Legeros 1991). L'hydroxyapatite (HA), de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ se distingue de l'apatite biologique par sa stoechiométrie, sa moindre solubilité et sa plus lente résorption. Son caractère isostructural au cristal d'apatite biologique favorise à sa surface une croissance en continuité avec le réseau cristallin de la trame minéralisée de l'os, dans un environnement saturé en ions calcium et phosphate. Elle est à l'origine des propriétés d'ostéocoalescence, permettant le développement avec l'os d'une interface diffuse et non-individualisable. Le β -TCP, de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, est nettement plus soluble que l'HA participant à l'augmentation locale des concentrations en ions calcium et phosphate. Le taux élevé de ces ions induit une précipitation du calcium et du phosphate sous la forme d'apatite biologique, qui favorise la minéralisation de la matrice extra-cellulaire.

Les BCP sont des céramiques composées d'un mélange d'HA et de β -TCP dont les propriétés de solubilité et de résorption dépendent du rapport HA/ β -TCP permettant d'adapter le phénomène de résorption-substitution de l'implant à la cinétique du remodelage local (Yamada et al 1997, Daculsi 1990 et 1998, Bouler et al 2000). Ils possèdent des propriétés d'ostéoconduction en fournissant un support favorable à l'ostéof ormation. Ils ne sont pas considérés comme ostéoinducteur sauf en présence de cellules de moëlle osseuse autologue (Vuola et al 1997). Cependant quelques observations de néoformation osseuse ont été faites dans des implantations ectopiques et dans des modèles animaux favorables (Daculsi et al 2003, Yuan et al 1999, Habibovic et al 2008). La porosité des BCP joue un rôle prépondérant dans leurs propriétés mécaniques et biologiques. La taille de pores a vraisemblablement plus d'influence que le pourcentage (Gauthier et al 1998) : des pores $< 10 \mu\text{m}$ (microporosité) jouent surtout un rôle dans la circulation et les échanges, humoraux et ioniques, alors que des pores $> 100 \mu\text{m}$ (macroporosité) jouent un rôle dans la colonisation cellulaire. Il est apparu récemment que la taille des canaux d'interconnection des pores avait aussi leur importance dans la pénétration tissulaire (Lecomte et al 2008). De

plus il semble que la microporosité dans les macropores soit un élément déterminant vis-à-vis de leur propriété d'ostéoinduction (Habibovic et al 2005).

Les propriétés mécaniques de l'HA et du β TCP sont différentes de celle de l'os (Bouler et al 1996). Selon les techniques de synthèse et la composition, l'HA pure a un module d'élasticité de 137 à 20 GPa et un point de rupture en compression de 8 à 0,8 GPa lorsque l'on fait varier respectivement le pourcentage de porosités de 1,6 à 53,5 % (He et al 2008). Le β TCP a un module de compression de 2,6 à 3,4 MPa en fonction de la méthode de synthèse pour une porosité de 65 à 70 % avec des pores de 300 à 500 μ m (Sous et al 1998). Le ratio 75 % d'HA/25 % de β TCP avec 65 % de porosités et des pores de 500 μ m a un module de compression de 14,1 MPa (Bouler et al 1996) alors que le module d'élasticité et le module de compression d'un os iliaque d'une femme de 60 ans est respectivement d'environ 20,8 GPa et 0,91 GPa (Wang et al 2008). Leur biofonctionnalité semble plus proche du cartilage septal pour lequel les modules de compression et d'élasticité sont en moyenne de 0,7 MPa pour une porosité d'environ 78 % (cf supra).

Ces substituts osseux ont déjà été utilisés pour la reconstruction du massif facial. Cependant, les résultats disponibles dans la littérature sont variables, fonctions de leur composition chimique, de leur porosité, de leur biodégradation, de leur intégration dans le défaut osseux, de la zone du massif facial concernée et du délai attendu (Kuboki et al 1998). D'autre part, les méthodologies sont différentes, les effectifs parfois réduits, donnant des résultats histologiques osseux peu précis. Chez l'animal, les ciments résorbables d'hydroxyapatite ont montré une bonne efficacité pour fermer le sinus frontal chez le chat, le chien, le lapin et le cochon (Friedman et al 1991 ; Abe et al 1990, Peltola et al 2001, Rupprecht et al 2003). Chez l'homme, il a permis, associé à un lambeau de péricrâne vascularisé, d'exclure et de fermer 11 planchers de sinus frontal en situation post-traumatique ou inflammatoire (Petruzzeli and Stankiewicz 2002). Sous forme d'implant solide il a permis de réduire le volume des fosses nasale chez des patients atteints d'Ozène et l'hydroxyapatite est largement utilisé avec une bonne ostéoconductivité, ostéointégration et tolérance de la part de la muqueuse respiratoire dans les reconstructions de l'étage moyen de la face avec un recul moyen post-implantation supérieur à 7 ans (Reck and Aurbach 1991 ; Cottrel and Wolford 1998 ; Aitassalo and Peltola 2007). En sous-cutané, l'hydroxyapatite en gel sert de produit de comblement des tissus mous pour camoufler les

irrégularités des structures ostéocartilagineuses sous-jacentes après traumatismes cranio-faciaux ou rhinoplasties esthétiques avec une bonne tolérance (Magee et al 2004, Stupak et al 2007). Depuis plus de 20 ans l'HA macroporeux, souvent associé au β TCP, est utilisé pour la surélévation osseuse du plancher du sinus maxillaire avant la mise en place d'implant dentaire, avec une bonne fiabilité. Selon les études, en raison des ratios d'HA :TCP et des délais d'évaluation différents, les proportions de tissus néoformés dans l'implant et les taux de résorptions varient : 27 et 40 % d'os néoformé après 12 à 19 mois. Le reste de la zone implantée est occupée par des tissus mous pour un volume relatif de 21 à 41 % du volume total de la zone implantée alors que 20 à 50 % du volume est toujours occupé par le substitut osseux proprement dit (Nunes et al 1997 ; Friedmann et al 2009 ; Mangano et al 2006). L'association à des cellules souches mésenchymateuses autologues ne semble pas modifier ces résultats (Shayesteh et al 2008). Dans cette indication chez le mouton, le pouvoir ostéoconducteur et la solidité fournie par l'HA semble comparable à celle obtenue avec de l'os iliaque autologue (Haas et al 2002, 2003). De plus, les BCP semblent moins résorbables que l'os iliaque et bovin après implantation sur le plancher du sinus maxillaire chez l'homme (Papa et al 2005).

Dans toutes ces indications, aucune donnée fondamentale vis-à-vis de la muqueuse respiratoire n'est disponible dans la littérature.

Nous avons choisi pour la reconstruction du septum nasal un implant BCP car il offre :

- des échanges bioactifs avec son milieu d'implantation,
- des capacités biofonctionnelles adaptées au rôle du septum dans la ventilation et le soutien des deux tiers inférieurs de la pyramide nasale,
- une supposée excellente biocompatibilité avec l'épithélium respiratoire,
- un ratio variable d'HA :TCP permettant d'adapter le couple intégration/résorption au délai de cicatrisation de la pyramide nasale et du septum,
- une structure macroporeuse facilitant la colonisation cellulaire de surface et son intégration dans la loge septale

- une faible capacité à l'adsorption et à l'attachement des bactéries lui permettant d'être exposé au milieu semi-septique des fosses nasales (Stoor et al 2001).

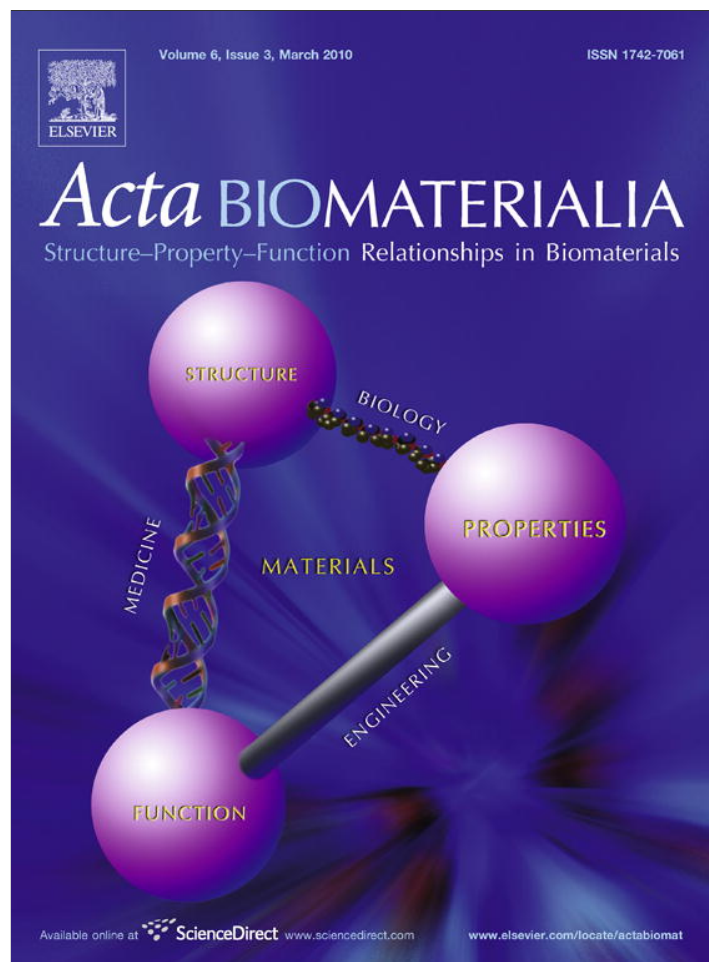
Le premier objectif de notre travail était par conséquent d'évaluer le comportement d'un implant BCP constitué de 75 % d'HA et de 25 % de β TCP, macroporeux (300 et 500 μ m) et d'une porosité de 30 % pour la réparation du septum nasal. Tout d'abord, afin de valider notre choix de matériau et notre hypothèse de cytocompatibilité, nous avons mesuré *in vitro* :

- de manière semi-quantitative les taux d'attachement, la viabilité et la prolifération de cellules nasale humaines normales au contact de l'implant,
- les capacités du support à favoriser le maintien d'une différenciation cellulaire épithéliale et respiratoire.

La deuxième partie du travail était d'étudier *in vivo* chez le petit animal adulte (lapin) la biocompatibilité épithélium/BCP dans des conditions de cicatrisations défavorables dans le cadre de la réparation des perforations du septum antérieur d'un centimètre de diamètre en zone 2 et 3 de Cottle.

B. ARTICLE

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

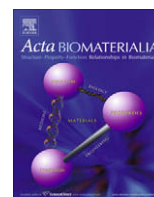
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Biomaterialia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actabiomat

Biphasic calcium phosphate to repair nasal septum: The first in vitro and in vivo study

Ludovic de Gabory^{a,b,*}, Reine Bareille^a, Dominique Stoll^b, Laurence Bordenave^{a,c}, Jean-Christophe Fricain^a

^a Unité 577 INSERM/Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo-Saignat, F-33000, France

^b ENT Department, Pellegrin Hospital, F-X Michelet Center, Place Amélie Raba-Léon, F-33076, France

^c CIC-IT CHU de Bordeaux/INSERM, Av du Haut-Lévêque, F-33604, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2009

Received in revised form 24 July 2009

Accepted 11 August 2009

Available online 14 August 2009

Keywords:

Cytotoxicity
Hydroxyapatite
Epithelial cell
Biocompatibility
Nasal septum

ABSTRACT

Our objective was to evaluate the cytocompatibility and biocompatibility of biphasic calcium phosphate (BCP) in the nasal respiratory airway. In vitro, the attachment rate was quantified on BCP disks with normal human epithelial cells at 1, 3 and 24 h by determining *N*-acetyl β -D-hexosaminidase activity. Proliferative activity of cells was indirectly assessed by MTT assay at 3, 9, 15 and 21 days. Plastic surfaces were used as positive control. In vivo, 15 rabbits underwent anterior nasal septum perforation and 10 septa were repaired with BCP disks. Five non-implanted animals were sacrificed at 3 months. Two groups of five implanted animals were sacrificed at 1 and 2 months. The surface of new airway mucosa covering BCP disks was evaluated macroscopically. During both steps, light microscopy, immunohistochemistry and scanning electron microscopy were performed. Statistical analysis was performed with the Mann–Whitney *U*-test. In vitro, at 1 and 3 h, the attachment rates were significantly better than on the plastic surface ($p < 10^{-2}$). Mitochondrial activity increased on both surfaces but began 6 days later than on plastic. After 21 days of culture, cells were confluent and formed a monolayer covering the implant even in the bottom of the pores. In vivo, no perforations in the control group closed spontaneously. The mean rate of closure was 63% in the 1 month group and 64% in the 2 month group ($p > 0.05$). Implants were invaded by inflammatory reaction covered by incomplete differentiated respiratory epithelium. Throughout the study, all immunohistochemical findings remained positive. These data suggest a good affinity between BCP and nasal epithelial cells. BCP could be used to rebuild nasal septa.

© 2009 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The anterior part of the nasal septum plays an important role in bending the nasal valve and supporting the nasal dorsum. It has an impact on the esthetic aspect, airflow patterns and respiratory comfort. Trauma, surgery or congenital malformations may lead to the cartilage framework of the nasal septum being absent or ineffective, causing conditions such as crooked nose, septal perforation, supralobular depression and saddle nose [1]. Thus, architectural abnormalities lead to nasal obstruction, nasal dryness, recurrent nasal bleeding, crusting and respiratory whistling. While septal perforation is rare, septal deformation with esthetic and functional consequences necessitating large amounts of tissue represents 5–10% of septorhinoplasty [2–5]. Autogenous sources have been classically used to repair this lack of nasal septal cartilage. Auricular or nasal cartilage harvest is sufficient only for a slight saddle deformity or

septal perforation [6,7]. At present, tissue culture of autologous chondrocytes does not make it possible to obtain a reliable support [8–12]. If larger volumes are involved or the septal skeleton is absent, autogenous iliac or calvarial bone and rib cartilage are used [7,13–15]. However, the morbidity of the donor sites is sometimes disproportional and hardly accepted by the patient for functional and cosmetic surgery. Iliac crest harvest is associated with lateral femoral cutaneous nerve injury and meralgia paresthetica, and visceral herniation through massive bone graft donor site, deep hematoma, infection, and acetabular and iliac wing fracture [4,16]. Twenty-six percent of patients had prolonged postoperative pain lasting from more than 3 weeks to several months and 11% of them still had some pain or discomfort and gait disturbance 2 years after surgery [17]. Rib harvest is associated with the risk of pneumothorax and prolonged pleuretic pain during exercise [16]. Graft warping, difficult rib carving in older patients with calcifications, and donor site morbidity are the major disadvantages of rib cartilage [2]. Moreover, iliac crest and rib cartilage have an unpredictable degree of resorption [18], while donor sites and bone contour alteration provide a lead to esthetic after-effects. Calvarial bone harvest is associated with a risk of irradiated vault fracture, menin-

* Corresponding author. Address: Unité 577 INSERM/Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, F-33000, France. Tel.: +33 5 57 57 17 54; fax: +33 5 56 90 05 17.

E-mail address: ludovic.de-gabory@chu-bordeaux.fr (L. de Gabory).

geal injury, cerebro-spinal fluid leak and extradural hematoma [19,20]. Furthermore, the thickness of the cranial vault is variable and sometimes insufficient, leading to graft fractures during harvest. Such autologous grafts lack vascularization and immunity defense, and require the integrity of the mucoperichondrial and mucoperiosteal flap on both sides of the nasal septum to prevent exposure to the septic content of the nasal cavities.

To avoid the morbidity and imperfections of bone grafting, various synthetic materials have been used to repair the nasal dorsum and/or septal perforation. Acrylic obturators for septal perforation and acrylic implants for nasal augmentation have been used without success because they produce crusts and inflammatory reactions [21,22]. Silastic® obturators and implants have the same outcome [23,24]. Moreover, this material is not integrated by the soft tissue and tends to displace it [25]. Other alloplastic options exist, including expanded polytetrafluoroethylene, porous high density polyethylene and bioplast fibrin implant [26–30]. These materials are associated with an increased risk of graft infection, extrusion and possible rejection. Moreover, none of them have been used in septal surgery because they are too supple to replace the septum skeleton.

Polydioxanone and polylactic acid have been used as septal splints in horizontal and vertical septal fractures [31,32]. These biodegradable materials are well tolerated but lead to a new septum with irregular thickness. In most cases, the strength of the new assembly is insufficient to thwart skin elasticity and to bend the nasal valve. Furthermore, the surgical procedure is time-consuming and difficult to learn for young surgeons.

To date, there has been no preclinical or clinical study focusing on resistance to infection in septic cavities, affinity and tolerance as regards the respiratory epithelium. Only the bioactive glass S53P4, which is usually used as bone substitute, has been tested with respiratory infection-associated microorganisms [33]. The initial results were encouraging, but its affinity with respiratory epithelium is poor. Even with this material, a bilateral turbinate flap is necessary to repair septal perforations [34]. In contrast, hydroxyapatite (HA), another bone substitute used in medicine and dentistry for 20 years, has shown good respiratory epithelial tolerance in maxillary graft sinus [35–40]. These clinical experiences showed that adverse effects are rare when it is used to raise the floor of the maxillary sinus [38–40].

Several conditions point to using biphasic calcium phosphate (BCP) to repair the nasal septum. The mechanical properties of HA could provide a solid foundation to support the nasal dorsum and to bend the nasal valve [41]. Its low attachment rate with sinonasal pathogen bacteria could also be an advantage in this localization [33]. Its shape and size can be modified to suit anatomic variations, and it can be fixed on the soft tissue, cartilage and bone of the nasal septum. However, BCP has never been used and assessed to repair the nasal septum.

The aim of this study was to evaluate the cytocompatibility of BCP in contact with normal human nasal epithelial cells *in vitro* and the capacity of BCP to repair critical rabbit septal perforation without a mucosal flap *in vivo*.

2. Materials

2.1. Samples of BCP

Disks of macroporous ceramic were provided by Kasios® (Z.I. La Croix, Launaguet, France, www.kasios.com). Disks were 11 mm in diameter and 1 mm in thickness. They were composed of 75% HA and 25% β -tricalcium phosphate. The mean rate of porosity was 30%. Pore size varied from 200 to 500 μm , with a mean value of 400 μm (Fig. 1). These pores were interconnected. All the disks were autoclaved (120 °C, 20 min).

2.2. Cell type and culture

Normal human epithelial cells were provided by PromoCell® (HNEpC-p, Ref C-12621, Promocell GmbH®, Sickingerstr. 63/65, 69126 Heidelberg, Germany). They were obtained from patients undergoing nasal polypectomy and were received in 25 cm² flasks. Cells were separated from the support with 0.025% trypsin/0.01% EDTA solution (DetachKit 2-30 réf: C-41202 Promocell GmbH®) and were amplified in two 75 cm² flasks. The culture medium was the airway epithelial cell growth medium provided by Promocell GmbH® (réf:C-21160). It contained 0.004 ml ml⁻¹ bovine pituitary extract, 10 ng ml⁻¹ epidermal growth factor, 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Insulin, 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ hydrocortisone, 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ephedrine, 6.7 ng ml⁻¹ triodo-L-tyrosine, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ transferrin and 0.1 ng ml⁻¹ retinoic acid. Under inverted light microscopy, confluent cells formed a uniform monolayer according to other study [42]. Each cell showed a strong immunostaining for the polyclonal anticytokeratin antibody and specifically for anticytokeratin 7, 34 β E12 and antiglycoprotein Ulex europaeus agglutinin one (UEA-I).

2.3. Animals

Three groups of five New Zealand white rabbits weighing between 2.0 and 3.0 kg were used. They were cared for according to the European Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (directive 24/11/86, 86/609/CEE). Recommendations of surgical procedures concerning animal implantation were respected [43]. None had any nasal symptoms or signs of infection, and the nasal septa were intact. The mean thickness of the rabbit nasal septum was 1 \pm 0.2 mm. All surgical procedures were carried out in the DETERCA laboratory, Bordeaux 2 University (DETERCA, 146 rue Léo Saignat F-33076, France).

3. Methods

3.1. *In vitro* study

3.1.1. Attachment test

Cell attachment assays were performed as described by Landegren [44]. To prevent attachment of cells to plastic dishes, an agarose layer (2% (v/v), 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4) was poured into 24-well plates. Thereafter, materials were placed on agarose and preincubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen®) without red phenol overnight at 37 °C. For this assay, the culture medium did not contain growth factor or fetal calf serum. Two seeding densities were used: D1 = 100,000 cells cm⁻² and D2 = 50,000 cells cm⁻². The attached cells were quantified at 1, 3 and 24 h by determining *N*-acetyl β -D-hexosaminidase activity using 180 μl of substrate buffer: *p*-nitrophenyl *N*-acetyl- β -D-glucosamide (7.5 mM of substrate, 0.1 M Na citrate, pH 5, triton 0.5% (v/v)). After 2 h of incubation in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C, 270 μl of stop-development buffer (5 mM EDTA, 50 mM glycine, pH 10.4) was added to each well in 48-well plates. The supernatant was transferred to 96-well plates. Optical density (OD) was assessed at 405 nm with a spectrophotometer (DYNEX MRX-2 Lab-système®). For each test time, six wells were used for plastic (positive control surface), agarose (negative control surface) and BCP surfaces, respectively. Two independent experiments were carried out for each test. Results were expressed as percentage of control and mean values \pm standard deviation (SD) of absorbance.

3.1.2. Cell viability and metabolic activity

The MTT assay was conducted to assess mitochondrial activity of cells according to the Mosmann [45] method. On a 48-well plate,

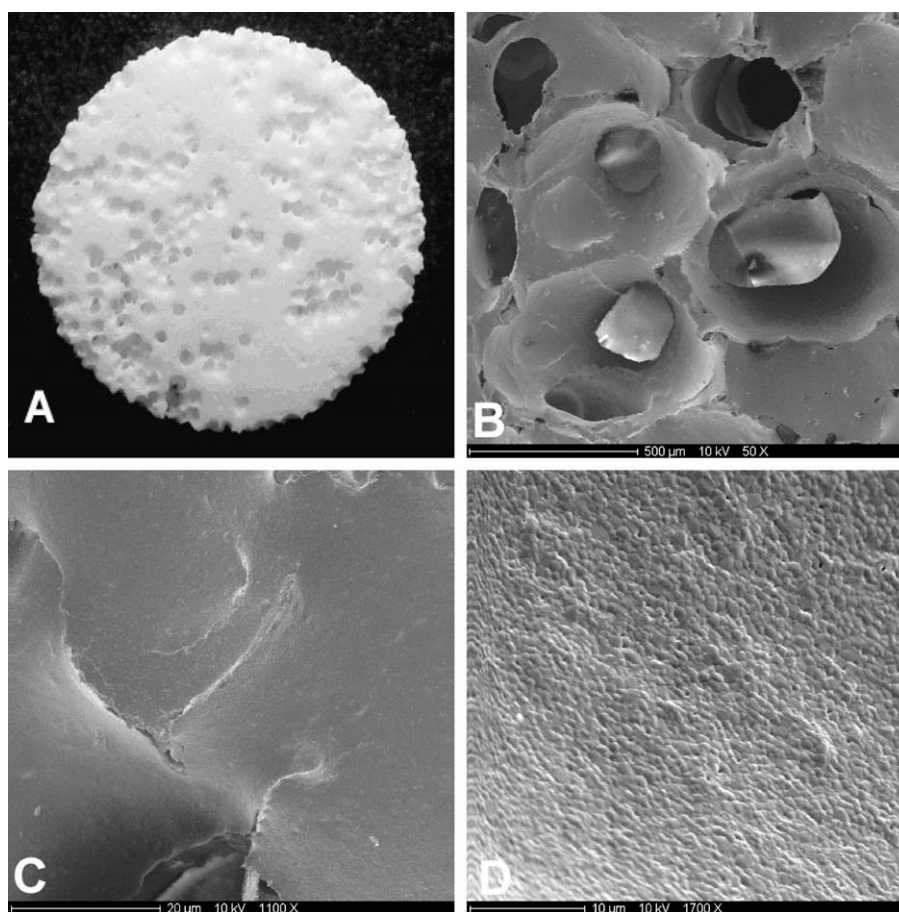


Fig. 1. (A) BCP disks with a diameter of 11 mm; (B–D) SEM micrographs of the BCP scaffold without cell at different magnifications: (B) $\times 50$, (C) $\times 1100$, (D) $\times 1700$.

six wells were used for plastic (positive control surface), agarose (negative control surface) and BCP surfaces, respectively. BCP disks were placed on pre-treated agarose wells. At day 0, the seeded density was $100,000 \text{ cells cm}^{-2}$ in each well. Metabolic activity was measured at 1, 3, 9, 15 and 21 days after seeding. At each time, the media were discarded and replaced by $375 \mu\text{l}$ of 1 mg ml^{-1} MTT solution (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide + PBS + DMEM without red phenol) and incubated for 3 h at 37°C (5% CO_2). The insoluble formazan crystals produced by the cells were dissolved by $300 \mu\text{l}$ of dimethyl sulfoxide. The plate was shaken at 240 rpm for 10 min and the supernatants were transferred to 96-well plates. Absorbance was recorded with a spectrophotometer (DYNEX MRX-2, Labsystème[®]) at a test wavelength of 570 nm vs. a reference of 630 nm. The intensity of the color obtained was directly proportional to the viability and metabolic activity of the cell population and inversely proportional to the toxicity of the material. Two independent experiments were carried out for each test. Results were expressed as percentage of control and mean values \pm standard deviation (SD) of absorbance.

3.1.3. Morphological examination

Culture cells were examined daily by scanning electron microscopy (SEM) at days 1, 3, 9, 15 and 21. For SEM studies, the BCP disks were washed twice with PBS and fixed in 2 vol.% glutaraldehyde in 0.15 M sodium cacodylate (pH 7.3) for 15 min at room temperature. The disks were washed again for 10 min with PBS. Dehydration was performed by sequential immersion in serial diluted ethanol solutions of 25, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 vol.%. The samples were kept in absolute alcohol and taken to critical point using

CO_2 . They were then sputtered with a thin gold film for SEM analysis (S 2500 scanning electron microscope, Hitachi, Japan).

3.1.4. Immunocytochemical staining

The cells were detached from culture plastic wells and BCP by trypsin action. They were transferred to Lab Tech system[®] glass slides and immediately fixed to avoid modification of the cell phenotype. Fixation was obtained by incubation for 10 min at 4°C with ethanol–acetic acid solution (100:5 v/v).

Cell differentiation was evaluated by detecting the immunostaining of cytokeratin (CK) 7, 34 β E12 and the glycoprotein Ulex European Agglutinin One (UEA-1), respectively.

Immunostaining was obtained by the immunoperoxidase technique intensified by the streptavidin–biotin complex. Endogenous peroxidase activity was blocked by using hydrogen peroxide in PBS (pH 7.5) for 4 min at 37°C . The samples were then rinsed in PBS and treated with 3 g l^{-1} bovine serum albumin in PBS for 5 min at 37°C . After washing with PBS, they were incubated with rabbit polyclonal antibodies antihuman UEA-I (DAKO A/S Co., Glostrup, Denmark) diluted at 1:800 and mouse monoclonal antibodies antihuman anticytokeratin 7 and 34 β E12 (DAKO A/S Co.) diluted, respectively, at 1:200 and 1:50. The samples were then placed in a moist chamber for 30 min at 37°C for the three antibodies. Fixation was stabilized with 30 ml of NaCl and $60 \mu\text{l}$ of glutaraldehyde for 4 min at 37°C followed by washing with PBS. Next, endogenous biotin was blocked using the AB Block Ventana[®] Kit. The samples were then incubated with universal secondary antibody + biotin for 8 min at 37°C . After washing with PBS, the samples were incubated with avidin–biotin–peroxidase complex solution (Vector Laboratories) for 30 min. Visualization was performed using a solu-

tion containing hydrogen peroxide and 3',5'diaminobenzidine in PBS. The cyto- and histochemical reactions were defined by microscopic observation of the samples for the presence of a brown precipitate. Immunostaining was done with a DAKO CYTOMATION automaton. Successive light microscopic fields of $800 \times 400 \mu\text{m}$ were observed and the number of cells positively stained was quantified and expressed as a mean percentage with regard to the total number of cells.

3.2. *In vivo* study

3.2.1. Anesthetic and surgical procedure

All rabbits were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine hydrochloride (20 mg kg^{-1}). A venous line was set up on the ear and neuroleptanalgesia was obtained with $16 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ sodium pentobarbital (3 mg kg^{-1} ; Sanofi Animal Health[®] Laboratories, France). Moreover, local anesthesia in the infra-tip lateral and dorsal nasal wall was obtained by local injection of adrenalin xylocaine 1% (Astra Zeneca Co[®]). The snout and the endobuccal cavity were prepared with polyvidone-iodine.

The animals were placed on an operating board in the supine position. The nasal septum was approached with the technique described by Sarnat [46]. An incision was made through the mucosa and the periosteum as far as the premaxilla between the upper incisors and the lip. This incision in the upper lip vestibula was made on both sides to behind the incisivomolar diastema. The tissues were raised from the premaxilla and entry was gained into the nasal cavities. The inferior part of the nasal septum was exposed in this way. To widen the operative field, the inferior part of the septal cartilage was mobilized by lifting it out of the premaxilla-maxilla groove. To obtain septal perforation, the mucosa, perichondrium and septal cartilage were removed to create a pathological communication between both nasal fossae. Specially designed forceps were used to remove the entire thickness of the nasal septum over the same surface area as the BCP disk, in order to have an equal surface between the defect and the disk. The vomer and the posterior part of the septal cartilage were left intact.

Three groups of five rabbits were used. The defect was not implanted in the control group in order to discover whether the septal perforation would close spontaneously without recourse to an implant. In the other groups, the defect was filled with BCP implant. The edges of the implant were contiguous with the edges of the removed area. The implant was not covered with a mucosal flap and both surfaces of the implant were exposed. For certain animals, the thickness of the septum was less than that of the disk (septum thickness range $0.8\text{--}1.2 \text{ mm}$). Accordingly, the implant was positioned in such a way that one of its surfaces was tangential to the mucosa while the other was raised on the outside.

The implant was fixed with one non-resorbable 6/0 suture in the columelle and an assembly pin and mortise in the premaxilla-maxilla groove. The upper vestibular incision was closed with 4/0 thread. Hemostasis was performed by electric cauterization without any nasal packing in the nasal cavity. All rabbits received one intravenous gentamycin injection to prevent post-surgical infection.

The control group animals were sacrificed after 3 months. The two groups with implanted septum were sacrificed after 1 (group BCP 1 month) and 2 months (group BCP 2 months). All the animals were sacrificed by venous injection of pentobarbital sodium (100 mg) after premedication.

The surface of the new airway mucosa covering the HA disk was evaluated macroscopically on both sides and the mean rate of closure was calculated for each rabbit. If only one side was covered, the other side was not considered for assessment. Finally, for each group, a mean percentage of closure was calculated.

3.2.2. Histological evaluation

For histological examinations, septa were resected en bloc with their insertions on palate and nasal bones, and were fixed in 5% formal solution. Formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks were prepared. The samples were cut horizontally in $5 \mu\text{m}$ serial sections. These sections were mounted on glass slides pre-treated with acid alcohol. For each animal in the implanted groups, half of the sections were stained with hematoxylin and eosin to examine morphological modifications of cells and tissue. The other parts were dried, deparaffinized in xylene and rinsed in 100% ethanol to be used for immunostaining. To study epithelial differentiation, we used the same antibodies as those in the *in vitro* part of this study.

3.3. Statistical analysis

OD values were compared between controls and BCP surfaces using the nonparametric unpaired Mann-Whitney *U*-test. The percentage of epithelium covering the BCP was compared between the non-implanted control and implanted groups by the same test. A *p*-value of <0.05 was considered as statistically significant (Statel[®] software, Adscience Society, France, www.adscience.fr).

4. Results

4.1. *In vitro* results

The attachment rates are shown in Fig. 2. The means percentages were 193%, 227% and 63% for D1 and 122%, 103% and 51% for D2 after 1, 3 and 24 h of culture, respectively. At 1 and 3 h, the attachment rates were significantly better than on the plastic surface ($p < 10^{-2}$). After 24 h, the attachment rate decreased on the material in contrast to the plastic surface. At this time, the attachment of nasal cells was better on plastic ($p < 10^{-2}$ for D1 and D2) (Fig. 2).

The metabolic mitochondrial activity observed over 21 days is shown in Fig. 3. This activity increased on both surfaces. The increase began at two different times: after 3 days on plastic and after 9 days on BCP disks. During the first period, until the third day, OD values were statistically different and better on plastic than on BCP ($p < 0.05$). After day 9 there was no statistical difference between the two surfaces ($p > 0.05$). The values on plastic surface stayed almost constant from day 3 until the end of the test, whereas they increased progressively between days 3 and 15 on the BCP disks.

By the third day, the cells had completely spread over the available surface of the BCP. The cell filopodia were strongly attached to several points of the pores. This feature was increased at day 15 and still present at day 21 (Fig. 4). At the end of the test, cells were confluent and formed a monolayer covering a large surface of implant even at the bottom of the pores.

In some cases, confluence was obtained over the entire surface of the disk after 21 days of culture. Cells were removed from the material and a strong cytoplasmic immunostaining was obtained with CK 34 β E12 antibody for 100% of cells (Fig. 5A). Positive cytoplasmic immunostaining with CK 7 antibody was obtained for $80 \pm 10\%$ per field (Fig. 5B). Likewise, $90 \pm 12\%$ of cells per field were stained by UEA-I antibody. This feature was present in the cytoplasmic and perinuclear areas (Fig. 5C).

4.2. *In vivo* results

Normal healthy rabbits did not show any inflammatory secretion, crust or epistaxis in the nasal cavities. Nasal respiration was maintained and there was no rejection. Only one rabbit in the

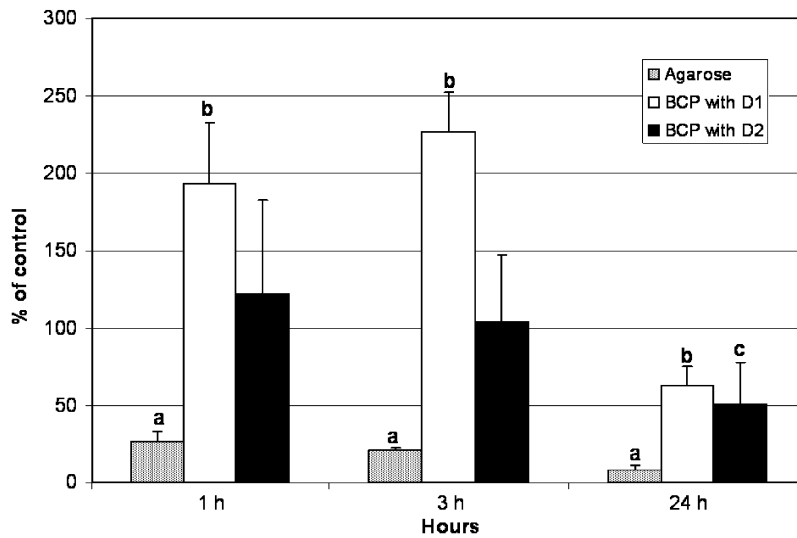


Fig. 2. Adhesion of HNEpC on surfaces. Data are expressed as percent of control \pm SD of two independent experiments (12 replicates). The positive surface control was the well plastic. The negative surface control was agarose (point bars). Nasal cells were seeded at D1 = 100,000 cells cm^{-2} (open bars) and at D2 = 50,000 cells cm^{-2} (closed bars) on BCP. ^a $p < 10^{-2}$ comparing the negative surface control with D1 and D2 on BCP and the positive control. ^b $p < 10^{-2}$ comparing D1 on BCP with the positive control surface. ^c $p < 10^{-2}$ comparing D2 on BCP with the positive surface control.

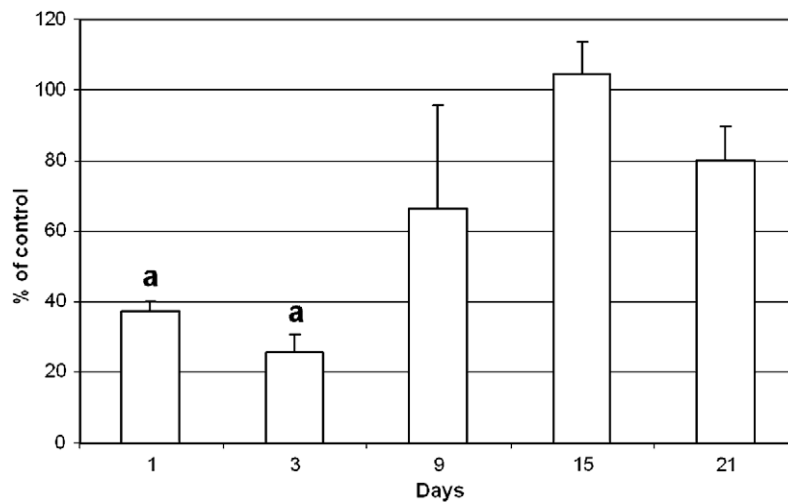


Fig. 3. Metabolic mitochondrial activity of HNEpC over 21 days on BCP disk determined by the MTT assay (six replicates). Cell were seeded only with D1 = 100,000 cells cm^{-2} . Data are expressed as percent of control mean \pm SD of two independent experiments. ^a $p < 0.05$ comparing D1 on BCP with the positive control. At 9, 15 and 21 days, no statistically significant difference was observed ($p > 0.05$).

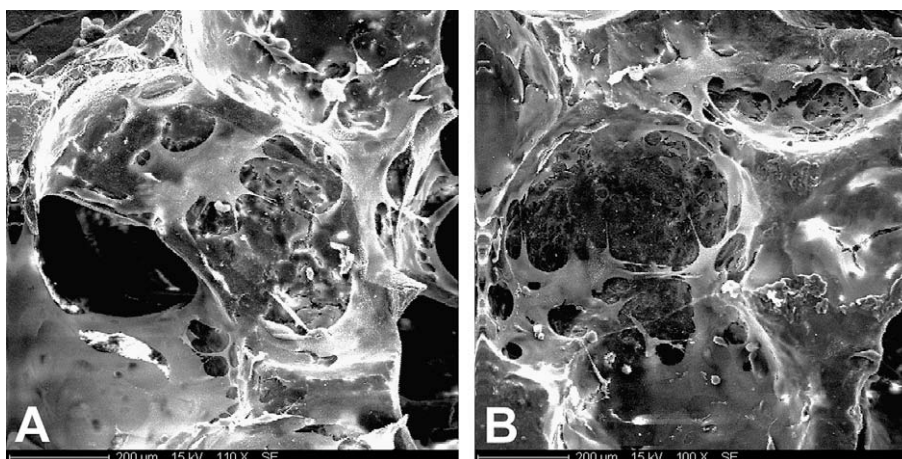


Fig. 4. SEM magnification of BCP with HNEpC (A) 3 days and (B) 21 days after seeding.

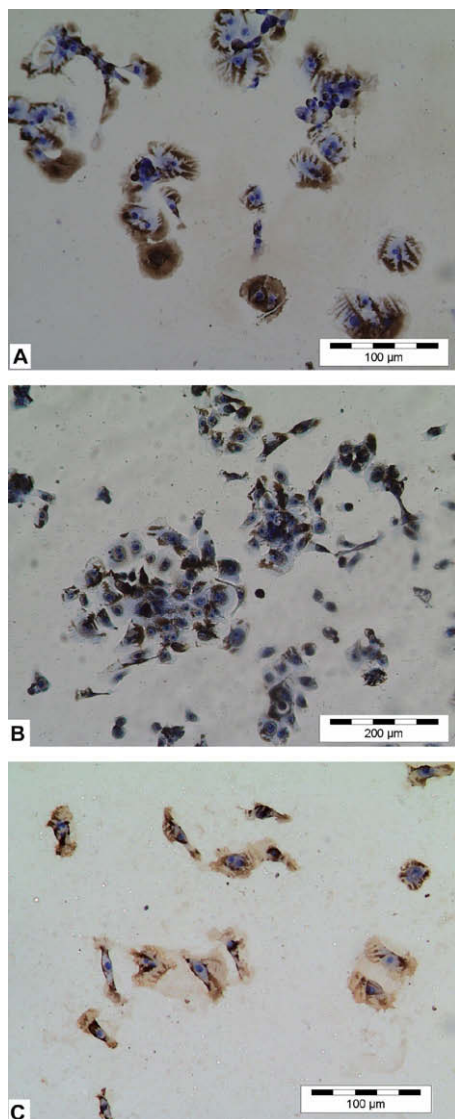


Fig. 5. Immunocytochemical observations of cytokeratin 34 β E12 (A), 7 (B) and glycoprotein UEA-I (C) in HNEpC after 21 days on BCP. (A) All cells showed strong staining in cytoplasm for ck 34 β E12. (B) 80% of cells showed strong staining for ck 7, which was localized in the cytoplasm. (C) Likewise, all the cells showed strong staining for UEA-I in the cytoplasm and further observations showed that protein was dominantly expressed in the perinuclear area.

group sacrificed after 2 months had an abscess due to the surgical approach. There was no macroscopic resorption of the implant after 2 months. No perforations in the control group closed spontaneously (Fig. 6A). In each implanted group and in two animals, respectively, both sides of the implant were partially or completely covered by mucosa (Fig. 6B, E and F). For the last three animals in each implanted group, only one side, the surface of the tangential side of the implant, was covered by mucosa (Fig. 6C and D, concerning the same animal).

In the control group, the mean rate of closure was 1.7% (range 0–4%) after 3 months (Fig. 7). In contrast, the perforations filled with implants were partially or totally closed (Fig. 6B–F), the rate of closure varying between 30% and 100%. The mean rate of closure was 63% in the 1 month group and 64% in the 2 month group. The percentage of closure for each implanted animal was significantly different from the control group (Fig. 7). On the other hand, there was no statistical difference between the mean rate of closure of both implanted groups after 1 and 2 months, respectively, ($p > 0.05$).

In the control group, the rabbit respiratory epithelium was pseudostratified (Fig. 8A). The morphological aspect of this epithelium was the same in the rabbit as in the human. Three cellular types were visible: basal cells, goblet cells and ciliary cells.

The new epithelium on BCP showed several degrees of differentiation. In a first step, inflammatory cells were infiltrating both sides and pores of the disk. The intensity of this behavior was strong according to light microscopic observation, without rhinorrhea, crusting, nasal discharge or other clinical outcomes. The local cells were stretched beyond the three-dimensional structure of the BCP (Fig. 8B–D). This inflammatory reaction was organized around vascular structures (Fig. 8C) and contained round fusiform cells resembling fibroblasts. This finding was especially noticeable in the subepithelial layer and on the pore walls (Fig. 8C and D). Cells present on the surface of the material had morphological features of epithelial cells organized in pseudostratified undifferentiated epithelium (Fig. 8C–E). During the period of healing in the two implanted groups, several degrees of differentiation were observed, as characterized by metaplastic, undifferentiated, mucous and ciliated features (Fig. 8E and F). These findings were correlated with strong cytokeratin 7, 34 β E12 and UEA-I immunostaining (Fig. 9A–F). All stainings were the same in the control group. Even with a weak degree of differentiation, the three stainings remained positive. Only for CK 7 and UEA-I did the staining disappear, in epidermoid metaplastic transformation and hyperplastic areas, respectively, (Fig. 9F). Large areas with extensive epithelial and respiratory differentiation were observed when the perforations were totally closed by the mucosa. However, we did not observe any normal and complete morphological and differentiated features of epithelium on BCP (Fig. 8F).

5. Discussion

To date, surgical techniques to repair septal perforation have involved a uni- or bilateral mucosal flap to cover the exposed biomaterial surface [33,34,47–53]. Without this procedure, the perforation remains open and the biomaterials are rejected. However, it is rather difficult for inexperienced surgeons to make and suture mucosal flaps in narrow cavities. Moreover, the endonasal scar, the formation of synechia and their consequences on nasal obstruction should be taken into account. For these reasons, the first aim of this study was to obtain data to prove that a biomaterial could be used to rebuild nasal septa without a mucosal cover.

This is the first study to provide *in vitro* and *in vivo* data on BCP biocompatibility in the nasal septum. The normal human nasal epithelial cells used to assess cytocompatibility on BCP before *in vivo* assessment seem to be a better testing rationale than permanent cell lines of human or animal neoplastic origin [54–57]. The cell model did not provide a differentiated epithelium with ciliated and goblet cells. A culture of HNEpC with an air–liquid interface should have provided a differentiated epithelium close to what is observed *in vivo* [58]. Unfortunately this method of culture was not possible in a three-dimensional system with porous HA as support, due to the impossibility of obtaining a homogeneous air–liquid interface on porous material.

There has been no other study to date to enable us to compare our attachment rate between human epithelial nasal cells and BCP. Moreover, there are no data available to compare human epithelial nasal cells and other biomaterials already used in septorhinoplasty. It is well known that final outcomes depend on culture conditions, the implant surface and the cell type. According Landegren method, the culture medium should not contain substance which is able to influence the cellular attachment on material [44]. This method has been widely used in many papers [59–61]. In this study we showed that the attachment rate with HNEpC and BCP was some-

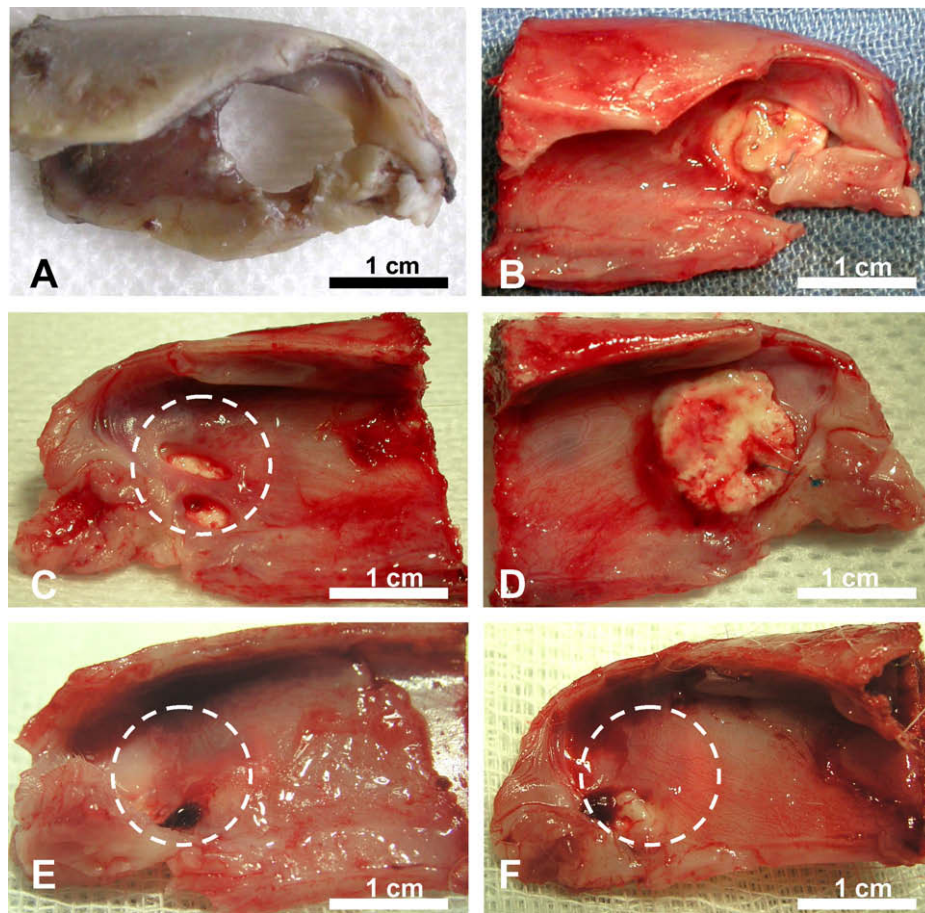


Fig. 6. Post-mortem lateral view of nasal septum. (A) Right side of the control rabbit; (B) right side of the group B rabbit with an abscess of the lateral nasal wall; (C and D) left and right sides of the same animal in group A; (E and F) 100% of closure in one rabbit from group A and one from group B, respectively. The dotted line marks the periphery of the underlying implant recovered by the new nasal epithelium.

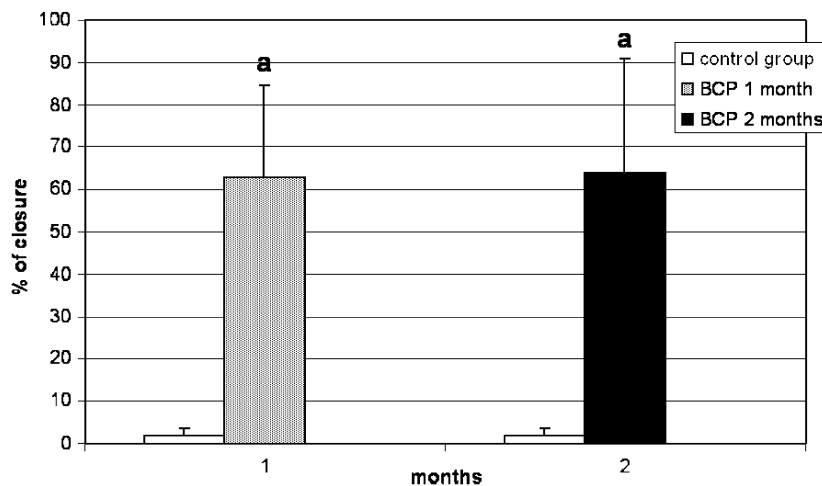


Fig. 7. Mean percentage of nasal septum closure for each group: the control group (white bar); group A, sacrificed after 1 month (point bars); and group B, sacrificed after 2 months (closed bars). The mean rates of closure were significantly different between the control group and the implanted groups ($^a p < 10^{-4}$) but not between the two implanted groups ($p > 0.05$).

times higher than that with human umbilical vein endothelial cells or murine fibroblast L929 on pre-coated expanded polytetrafluoroethylene, poly(ethylene terephthalate) and microfibrillar polyurethane [62], three biomaterials already marketed. More specifically, Attawia et al. [63] showed that the attachment rate

of osteoblasts on HA increased from 25% to 145% at 2 and 24 h, respectively. These rates were lower than ours at 1 and 3 h at both seeding densities. Okumura et al. [64], working with the human osteosarcoma line Saos2 on BCP, showed that the cell area increased rapidly from 3 to 12 h, but that the amount of HNEpC at-

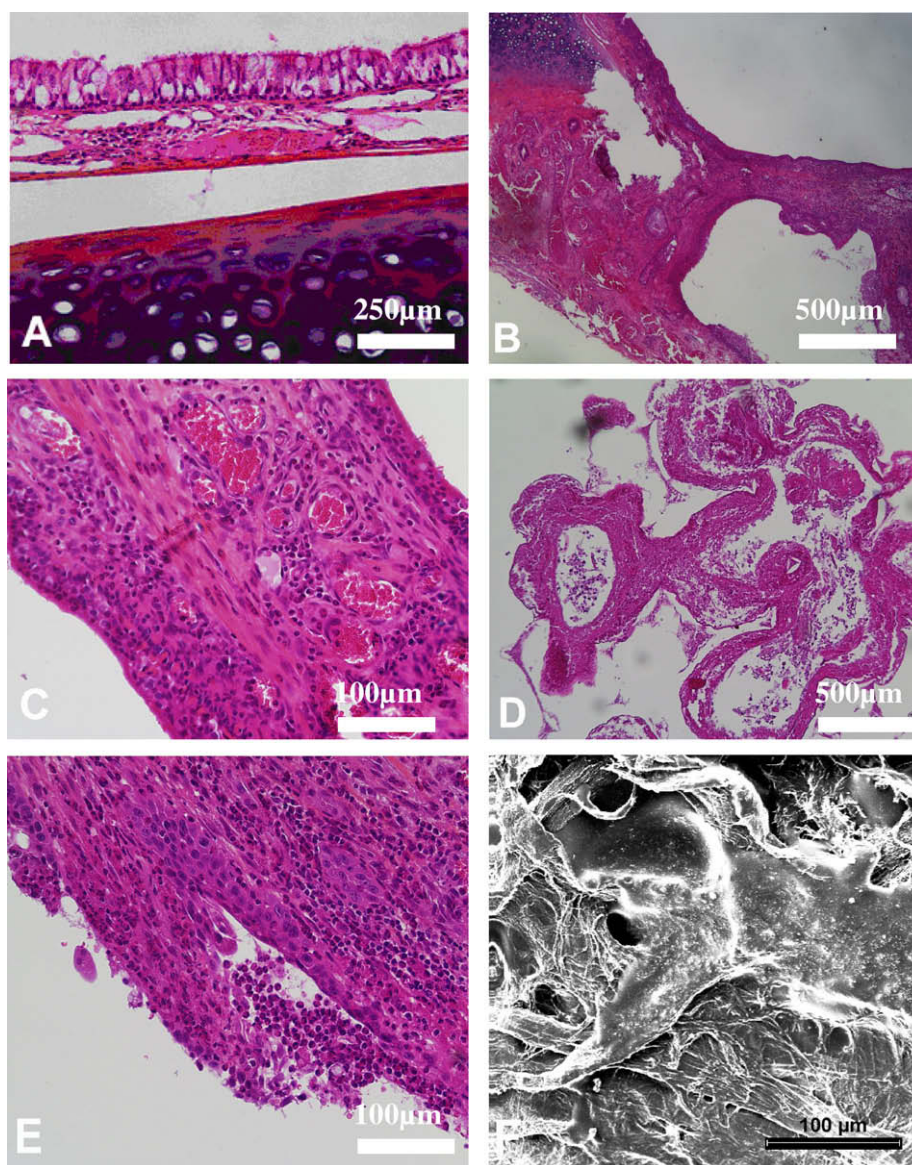


Fig. 8. (A) Control group and (B–E) implanted group light microscopic findings of nasal septal mucosa stained with hematoxylin and eosin at microscopic magnifications of (B and D) $\times 10$ and (A, C and E) $\times 100$. (F) Implanted group SEM micrograph of the mucosa surface recovered BCP scaffold at $\times 300$. (A) A normal nasal epithelium around perforation without closure. (B and D) Decalcified preparation showing inflammatory reaction surrounded by undifferentiated epithelium, which forms a bridge between the rim of cartilage and BCP (B), and covering the inner pores of BCP (D). (C) Epithelial differentiation on both sides of the implant. The morphological features of new mucosa surface as shown by light (E) and electronic scanning (F) microscopy show microvilli, pseudopolyps and the onset of ciliated differentiation.

tached on HA was higher than Saos2. Le Guillou-Buffelo et al. [65], investigating human osteoprogenitor (HOP) cell adhesion on functionalized titanium–quartz surfaces coated with HA or HA plus a specific RGD peptide sequence, found 50% and 80% of cells remaining on the materials at 3 h, respectively, whereas our attachment rate with HNEpC was 230% with D1 and 100% with D2 after the same time. While BCP or HA is usually used as a bone substitute, the attachment rate obtained with HNEpC was greater than with different sources of bone-like cells. This might explain the good clinical tolerance of HA when used in contact with respiratory mucosa [35–40]. On the other hand, we obtained only 60% attachment at 24 h, probably because the number of cells that died is greater on BCP than on plastic in the absence of growth factor or fetal calf serum in the culture medium. We could explain the difference in cell death by lower cell contact on BCP due to a specific surface more important than on plastic. Another argument should be a bad diffusion of nutrients from culture medium to the depth of BCP pores.

In another study, the amount of Saos2 cells attached on HA increased during 24 h [64]. The cell number at 21 days of culture with osteoblastic rat calvaria was over nine times that at day 1. Other authors found no statistical difference between plastic surface control and HA [66]. These results were confirmed by Gao et al. [67], who performed the MTT assay on different sources of BCP and MC3 T 3-E1 cells, and by Teixeira and Ferraz [57], who applied the MTS assay to MG63 cells derived from human osteosarcoma. We obtained a similar result with HNEpC. At 9 days, the cell number reached the level of the control plastic dishes until 21 days. After 9 days of culture, optical density was in a steady state on plastic surface, whereas it progressively increased on BCP until 21 days. This difference was probably due to the difference of available surfaces for growth cell because of the three-dimensional structure of disk.

The morphological features observed on both surfaces were the same as in other studies of primary HNEpC culture [42]. The cells grew in a monolayer with a very homogeneous epithelial-like

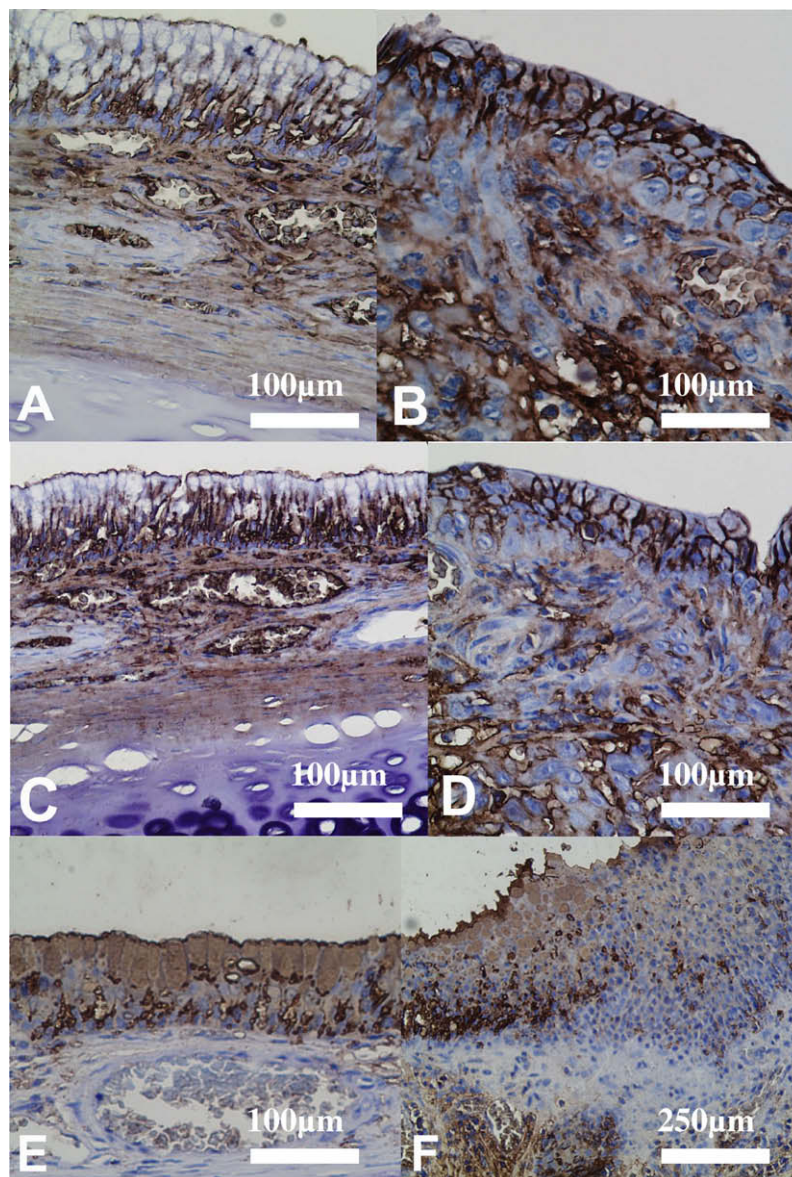


Fig. 9. Light microscopic magnification (F, $\times 100$ and A–E, $\times 250$) of immunostaining of CK 7 (A and B), CK 34 β E12 (C and D) and UEA-I (E and F). (A, C and E) Normal nasal epithelium in the control group; (B, D and F) different degrees of epithelial differentiation in the implanted group. The immunostaining of CK 7 and 34 β E12 remains strong even if the nasal epithelium shows weak differentiation (B and D). Immunostaining of UEA-I is the same as the control (E) and disappears in the hyperplastic area (E and F).

shape and cytoplasm. Each cell was prismatic and formed confluent and extensive colonies on plastic and BCP. The lack of complete ciliated and mucous differentiation is known in this method of culture [42], unlike in other methods [58,68–71]. Cytokeratins are water-insoluble intermediate filaments expressed by all epithelial cells and an epithelium can be characterized by a specific pattern of cytokeratin expression. In human respiratory epithelium, CK 5, 14 and 17 are mainly expressed in basal cells [72] and we used the antibody anticytokeratin 34 β E12, which specifically stains CK 1, 5, 10 and 14. Moreover, CK 7, 8, 18 and 19 are localized at the surface of bronchial, tracheal and nasal epithelium [56,72–74]. Accordingly, a persistent immunocytostaining of CK 7 with 34 β E12 provides strong evidence of the airway epithelial origin of cells. Moreover, UEA-I is also strongly expressed in cytoplasm and at the luminal surface of epithelial nasal cells [75,76], and persistent staining of this glycoprotein provides an additional argument for the conservation of epithelial and respiratory phenotypes on BCP.

Our *in vivo* outcomes seem correlated with our *in vitro* data, strengthening the argument for using BCP to repair nasal septa. First, nasal septal perforations do not close spontaneously in humans without some form of support, and the same healing behavior is observed in rabbit. Secondly, we did not cover the implant with a flap because we sought to evaluate the capacity of the implant to serve as a support. Thirdly, there was a large discrepancy between the rabbit nasal septum and the implant so that only one side of the implant was touching the edge of the mucosa. This protocol was designed to mimic the worst experimental conditions of healing. This is probably why some perforations were incompletely closed and that there was no significant difference between the percentage of closure after 1 and 2 months in implanted rabbits. However, closure was obtained probably due to connection with the BCP, because no closure was obtained in the control group and the edge of perforation was the only source of epithelium for the covered implant. Several animal models have shown that denudation of the airway epithelial surface leads to surrounding epithelial cell migration and prolifera-

tion [55,77–79]. In some animals the closure occurred on both sides, and it was probably the thickness of the implant that influenced the healing process because in other rabbits the respiratory mucosa was not contiguous to the rim of the BCP disk. Despite the implant in the nasal fossa being uncovered for 2 months, no nasal discharge, rhinorrhea, crusting, bleeding or extrusion was observed.

To our knowledge, no study has previously been performed with which we could compare our *in vivo* outcomes. BCP has not previously been used to support proliferative respiratory epithelial activity and to close septal perforation. In our study, the new mucosa covering the BCP showed the same light microscopic morphological features as respiratory epithelial healing after a mechanical wound in normal rabbit maxillary sinus [80,81]: basal cell differentiation coexisted with inflammatory cells, pseudostratified epithelial differentiation, hyperplasia, epidermoid metaplasia, complete mucoid and incomplete ciliated differentiation. However, there are some differences with previously published data with regard to *in vitro* and *in vivo* respiratory epithelial wound repair capacity. In cultures with normal human respiratory cells, the temporal analysis of cell migration speed during repair after a chemical wound showed speeds between 35 and 45 $\mu\text{m h}^{-1}$ [55]. Moreover, after mechanical wounding in the rabbit, the entire surface of the wound was covered by basal cells after 1 week and fully differentiated airway epithelium was obtained after 6 weeks [81]. However, our experimental conditions were different. The surface of our BCP disk was three-dimensional and larger (0.95 cm^2) than the wound surface in these studies. Colonization of network pores by inflammatory cells probably plays an important role in the capacity of the wound edge to spread on BCP. Furthermore, our implants were not coated by fibronectin, collagen or another protein layer favorable to growth and migration. It is well known that synthesis of the extracellular matrix allows interaction between proteins and cells in the migratory process during the repair of respiratory epithelium [82,83]. The defect size could be the key factor explaining why only two defects per group were totally closed. The performance of our implants could be improved by using tissue engineering. Our *in vitro* results show that BCP could be precellularized with autologous epithelial nasal cells before implantation.

In the normal process of airway respiratory healing, the flattened cells that migrate into the wound site change their phenotype and become poorly differentiated cells [79,83]. In our model, immunostaining of CKs and glycoprotein remained strongly positive even in completely dedifferentiated new epithelium in all samples. The disappearance of CK 7 and UEA-I in epidermoid metaplasia and hyperplasia areas, respectively, was sometimes observed, but this cell behavior is already known in the normal healing process in nasal epithelium [72,75,76]. Concerning morphological features, the greatest differentiation observed concerned only completely closed defects. The absence of any difference in closure rate between both implanted groups, the lack of covered area and the degree of differentiation for certain perforations may be explained by the variability in the location of the implant with regard to the edges of the perforation. Moreover, the shear strengths due to nasal movement in the rabbit may have damaged the interface between the implant and the new mucous membrane. We think that it is possible to obtain better results in man than in rabbit. The human nasal septum is sufficiently thick (5–6 mm) to dissect septal layers using a septoplastic technique to include and to fix the implant in the best conditions. Unpublished results in sheep have confirmed our hypothesis.

6. Conclusion

The good correlation obtained between the cyto- and biocompatibility of BCP in contact with nasal respiratory epithelium sug-

gests that BCP could be used to repair human nasal septum. We are currently assessing BCP implants in a prospective study to repair large (6 cm^2) nasal septal perforations in sheep without a mucosal flap.

Acknowledgements

This work was supported by the Collège Français d'Otorhinolaryngologie et de chirurgie cervico-faciale. The authors would like to thank Dr. Deminiere for assistance with pathological analysis and Dr. Ray Cooke for linguistic assistance.

Appendix A. Figures with essential color discrimination

Certain figures in this article, particularly Figures 5, 6, 8 and 9, are difficult to interpret in black and white. The full color images can be found in the on-line version, at [doi:10.1016/j.actbio.2009.08.018](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.08.018).)

References

- [1] Daniel RK. Rhinoplasty: septal saddle nose deformity and composite reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2007;119(3):1029–42.
- [2] Riechelmann H, Rettinger G. Three-step reconstruction of complex saddle nose deformities. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:334–8.
- [3] Paris J, Facon F, Thomassin JM. Saddle nose surgery: long term aesthetic outcomes of support grafts. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2006;127(1):37–40.
- [4] Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res* 1996;329:300–9.
- [5] Zijderveld SA, ten Bruggenkate CM, van Den Bergh JP, Schulten EA. Fractures of the iliac crest after split-thickness bone grafting for preprosthetic surgery: report of 3 cases and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(7):781–6.
- [6] Tardy ME, Denny III J, Fritsch MH. The versatile cartilage autograft in reconstruction of the nose and face. *Laryngoscope* 1985;95:523–33.
- [7] Boudard Ph. Autologous cartilaginous grafts in septorhinoplasties. *Rev Laryngol Otol Rhinol* 2006;127(1):31–6.
- [8] Homicz MR, Schumacher BL, Sah RL, Watson D. Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineered neocartilage composition. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;127(5):398–408.
- [9] Homicz MR, Stanley HC, Schumacher BL, Masuda K, Thonar EJ, Sah RL, et al. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. *Laryngoscope* 2003;113:25–32.
- [10] Pribitkin E, Ambro B, Bloeden E, O'Hara B. Rabbit ear cartilage regeneration with a small intestinal submucosa graft. *Laryngoscope* 2004;114(Suppl. 102):1–20.
- [11] Kafienah W, Jakob M, Démartheau O, Frazer A, Barker M, Martin I, et al. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Eng* 2002;8(5):817–26.
- [12] Malda J, Kreijveld E, Temenoff JS, van Blitterswijk CA, Riesle J. Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifferentiation. *Biomaterials* 2003;24(28):5153–61.
- [13] Tessier P, Kawamoto H, Matthews D, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, et al. Taking long rib grafts for facial reconstruction – tools and techniques. III. A 2900-case experience in maxillofacial and craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg* 2005;116(Suppl. 5):385–465.
- [14] Gurley JM, Pilgram T, Perlyn CA, Marsh JL. Long-term outcome of autogenous rib graft nasal reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2001;108(7):1895–905. Discussion, 1906–1907.
- [15] Tessier P. Autogenous bone grafts taken from the calvarium for facial and cranial applications. *Clin Plast Surg* 1982;9:531.
- [16] Laurie SW, Kaban LB, Muliken JB, Murray JE. Donor site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg* 1984;73(6):933–8.
- [17] Cricchio G, Lundgren S. Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003;5(3):161–9.
- [18] Sarukawa S, Sugawara Y, Harii K. Cephalometric long-term follow-up of nasal augmentation using iliac bone graft. *J Cranio Maxill Fac Surg* 2004;32:233–5.
- [19] Posnick JC, Seagle MB, Armstrong D. Nasal reconstruction with full-thickness cranial bone grafts and rigid internal skeleton fixation through a coronal incision. *Plast Reconstr Surg* 1990;86(5):894–904.
- [20] Hemar P, Herman D, Piller P, Kennel P, Conraux C. Results of the use of parietal bone as bone graft donor site in facial reconstruction. A propos of 71 cases. *Ann Chir Plast Esthet* 1995;40(4):349–57.
- [21] McKinstry RE, Johnson JT. Acrylic nasal septal obturators for nasal septal perforations. *Laryngoscope* 1989;99:560–3.
- [22] Dencer D. The flanged acrylic implant in nasal reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 1955;15:328.

- [23] Kern EB, Facer GM, McDonald TJ. Closure of nasal septum perforations with a Silastic® button. *Otolaryngol Dig* 1977;39:9–17.
- [24] Milward TM. The fate of Silastic and Vitrathe nasal implants. *Br J Plast Surg* 1972;25(3):276–8.
- [25] Braley SA. The use of silicones in plastic surgery. A retrospective view. *Plast Reconstr Surg* 1973;51:280.
- [26] Ham J, Miller PJ. Expanded polytetrafluoroethylene implants in rhinoplasty: literature review, operative techniques, and outcome. *Facial Plast Surg* 2003;19:331–9.
- [27] Berghaus A. Porous polyethylene in reconstructive head and neck surgery. *Arch Otolaryngol* 1985;11:154–60.
- [28] Gyeney L, Kerenyi G. Bioplast fibrin implants in nasoseptal perforation. *Arch Otorhinolaryngol* 1977;218:143–5.
- [29] Owsley TG, Taylor CO. The use of Gore-Tex for nasal augmentation: a retrospective analysis of 106 patients. *Plast Reconstr Surg* 1994;94(2):241–8.
- [30] Godin MS, Waldman SR, Johnson Jr CM. Nasal augmentation using Gore-Tex. A 10 year experience. *Arch Facial Plast Surg* 1999;1(2):118–21.
- [31] Gerlinger I, Karasz T, Somogyvari K, Szanyi I, Rath G, Moricz P, et al. Extracorporeal septal reconstruction with polydioxanone foil. *Clin Otolaryngol* 2007;32:462–79.
- [32] Watzinger F, Wutzl A, Wanschitz F, Ewers R, Turhani D, Seeman R. Biodegradable polymer membrane used as septal splint. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37:473–7.
- [33] Stoor P, Soderling E, Grénman R. Bioactive glass S53P4 in repair of septal perforations and its interactions with the respiratory infection-associated microorganisms *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *J Biomed Mater Res* 2001;58(1):113–20.
- [34] Stoor P, Grénman R. Bioactive glass and turbinate flaps in the repair of nasal septal perforation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113(8):655–61.
- [35] Petruzelli GJ, Stankiewicz JA. Frontal sinus obliteration with hydroxyapatite cement. *Laryngoscope* 2002;112(1):32–6.
- [36] Freidman CD, Costantino PD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA. Hydroxyapatite cement. II. Obliteration and reconstruction of the cat frontal sinus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;117(4):385–9.
- [37] Abe H, Manaka N, Fujii T, Kataumi H, Ogiuchi H. Histopathological observation of dense particulate hydroxyapatite consolidated in the frontal sinus of dogs. *J Nihon Univ Sch Dent* 1990;32(4):240–6.
- [38] Papa F, Cortese A, Maltarello MC, Saggiocco R, Felice P, Claudio PP. Outcome of 50 consecutive sinus lift operations. *British J Oral Maxillofacial Surg* 2005;43:309–13.
- [39] Mazor Z, Peleg M, Garg AK, Chaushu G. The use of hydroxyapatite bone cement for sinus floor augmentation with simultaneous implant placement in the atrophic maxilla. A report of 10 cases. *J Periodontol* 2000;71(7):1187–94.
- [40] Haas R, Baron M, Donath K, Zechner W, Watzek G. Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus: a comparative histomorphometric study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17(3):337–46.
- [41] Li-Hong HE, Standard O, Huang T, Latela B, Swain M. Mechanical behaviour of porous hydroxyapatite. *Acta Biomater* 2008;4:577–86.
- [42] Mattinger C, Nyugen T, Schäfer D, Hörmann K. Evaluation of serum-free culture conditions for primary human nasal epithelial cells. *Int J Hyg Environ Health* 2002;205:235–8.
- [43] AFNOR:ISO 10993-6(F). Evaluation biologique des dispositifs médicaux. Partie 6. Essais concernant les effets locaux après implantation; 1994.
- [44] Landegren U. Measurement of cells numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Application to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Meth* 1984;67:379–88.
- [45] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983;65:55–63.
- [46] Sarnat BG. The face and jaws after surgical experimentation with the septovomer region in growing and adult rabbits. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1970;268(Suppl.):1–30.
- [47] Fairbanks DNF, Fairbanks GR. Nasal septal perforation: prevention and management. *Ann Plast Surg* 1980;5:452–9.
- [48] Gollom J. Perforation of the nasal septum: the reverse flap technique. *Arch Otolaryngol* 1968;88:518–22.
- [49] Meyer R. Nasal septal perforations must and can be closed. *Aesthet Plast Surg* 1994;18:345–55.
- [50] Hussain A, Kay N. Tragal cartilage inferior turbinate mucoperiosteal sandwich graft technique for repair of nasal septal perforations. *J Laryngol Otol* 1992;106:893–5.
- [51] Vuyk HD, Vershuis RJ. The inferior turbinate flap for closure of septal perforations. *Clin Otolaryngol* 1988;13:53–7.
- [52] Woolford TJ, Jones NS. Repair of nasal septal perforations using local mucosal flap and a composite cartilage graft. *J Laryngol Otol* 2001;115:22–5.
- [53] Schultz-Coulon HJ. Three-layer repair of nasoseptal defect. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132:213–8.
- [54] Goto T, Yoshinari M, Kobayashi S, Tanaka T. The initial attachment and subsequent behavior of osteoblastic cells and oral epithelial cells on titanium. *Bio-Med Mater Eng* 2004;14:537–44.
- [55] Zahm JM, Kaplan H, Hérard AL, Doriot F, Pierrot D, Somelette P, et al. Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997;37:33–43.
- [56] Bordenave L, Bareille R, Rouais F, Lefebvre F, Amedee J, Baquay C. Human tracheal epithelial cells in culture: a suitable model for testing the cytocompatibility of materials for endotracheal use. *J Mater Sci Mater Med* 1993;4:327–36.
- [57] Teixeira S, Ferraz MP. Biocompatibility of highly macroporous ceramic scaffolds: cell adhesion and morphology studies. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:855–9.
- [58] Lee MK, Yoo JW, Lin H, Kim YS, Choi YM, et al. Air–liquid interface culture of serial passaged human nasal epithelial cell monolayer for in vitro drug transport studies. *Drug Deliv* 2005;12(5):305–11.
- [59] Pallu S, Fricain JC, Bareille R, Bourget C, Dard M, Sewing A, et al. Cyclo-D β KRG peptide modulates in vitro and in vivo behavior of human osteoprogenitor cells on titanium alloys. *Acta Biomater* 2009;5(9):3581–92.
- [60] Cognet JM, Fricain JC, Réau AF, Lavignolle B, Baquay C, Lepeticorps Y. Pinctada margaritifera (mother-of-pearl): physico-chemical and biomechanical properties, and in vitro cytocompatibility. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 2003;89(4):346–52.
- [61] Fricain JC, Alouf J, Bareille R, Rouais F, Rouvillain JL. Cytocompatibility study of organic matrix extracted from caribbean coral porites asteroids. *Biomaterials* 2002;23(3):673–9.
- [62] Feugier P, Black RA, Hunt JA, How TV. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials* 2005;26:1457–66.
- [63] Attawia MA, Herbert KM, Laurencin CT. Osteoblast-like cell adherence and migration through 3-dimensional porous polymer matrices. *Bioch Bioph Res Commun* 1995;213(2):639–44.
- [64] Okumura A, Goto M, Goto T, Yoshinari M, Masuko S, Katsuki T, et al. Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (Saos-2). *Biomaterials* 2001;22:2263–71.
- [65] Le Guillou-Buffelo D, Bareille R, Gindre M, Sewing A, Laugier P, Amédée J. Additive effect of RGD coating to functionalized titanium surfaces on human osteoprogenitor cell adhesion and spreading. *Tissue Eng A* 2008;14(8):1445–55.
- [66] Zhang Y, Fu T, Han Y, Wang Q, Zhao Y, Xu K. In vitro and in vivo tests of hydrothermally synthesised hydroxyapatite coating. *Biomol Eng* 2002;19(2–6):57–61.
- [67] Gao Y, Cao WL, Wang XY, Gong YD, Tian JM, Zhao NM, et al. Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:815–23.
- [68] Hanamura Y, Deguchi K, Ohyama M. Ciliogenesis and mucus synthesis in cultured human respiratory epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994;103:889–95.
- [69] Neugebauer P, Endepols H, Mickenhagen A, Walger M. Ciliogenesis in submersion and suspension cultures of nasal epithelial cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260(6):325–30.
- [70] Jorissen M, Van der Schueren B, Van den Berghe H, Cassiman JJ. Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. *Eur Respir J* 1991;4:210–7.
- [71] Jorissen M, Bessems A. Normal ciliary beat frequency after ciliogenesis in nasal epithelial cells cultured sequentially as monolayer and in suspension. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995;115:66–70.
- [72] Stosiek P, Kasper M, Moll R. Changes in cytokeratin expression accompany squamous metaplasia of the human respiratory epithelium. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;421(2):133–41.
- [73] Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalogue of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelial, tumors, and culture cells. *Cell* 1982;31(1):11–24.
- [74] Moll R. Cytokeratins as markers of differentiation: expression profiles in epithelia and epithelial tumors. Stuttgart: Gustav Fisher; 1993.
- [75] Fang SY, Ohyama M. Assessment of cell surface glycoconjugates in normal, benign and malignant human nasal mucosa. *Rhinology* 1997;35(4):166–70.
- [76] Huang H, Jing D, Li Z, Zhou S, Ma D. Histochemistry of glycoconjugates in nasal inverted papilloma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994;103(2):115–7.
- [77] Keenan KP, Combs JW, McDowell EM. Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury. I. Focal lesions: quantitative morphologic study of cell proliferation. *Virchows Arch* 1982;14:193–214.
- [78] Nikula KJ, Wilson DW, Giri SN, Plopper CG, Dungworth DL. The response of the rat tracheal epithelium to ozone exposure: injury, adaptation and repair. *Am J Pathol* 1988;131:373–84.
- [79] Shimizu T, Nishihara M, Kawaguchi S, Sakakura Y. Expression of phenotypic markers during regeneration of rat tracheal epithelium following mechanical injury. *Am J Respir Cell Moll Biol* 1994;11:85–94.
- [80] Shin SH, Heo WW. Effects of unilateral naris closure on the nasal and maxillary sinus mucosa in rabbit. *Auris Nasus Larynx* 2005;32:139–43.
- [81] Ohashi Y, Nakai Y, Ikeoka H, Furuya H. Regeneration of nasal mucosa following mechanical injury. *Acta Otolaryngol Suppl* 1991;486:193–201.
- [82] Hérard AL, Pierrot D, Hinrasky J, Kaplan H, Sheppard D, Puchelle E, et al. Fibronectin and its $\alpha 5 \beta 1$ integrin receptor are involved in the wound repair process of the airway epithelium. *Am J Physiol* 1996;271(5Pt1):L726–33.
- [83] Buisson AC, Gilles C, Polette M, Zahm JM, Birembaut P, Tournier JM. Wound repair-induced expression of stromelysins is associated with the acquisition of a mesenchymal phenotype in human respiratory epithelial cells. *Lab Invest* 1996;74:658–69.

C. CONCLUSION

Ce travail a permis de fournir plusieurs données publiées originales :

- *In vitro*, sur les relations possibles entre un implant de BCP et l'épithélium respiratoire nasal. Le taux d'attachement des cellules épithéliales respiratoires semble supérieur pour ce biomatériau à celui observé avec les ostéoblastes.
- *in vivo*, c'est le premier biomatériau qui a permis de fermer des perforations septales dans une situation de cicatrisation défavorable. Ce résultat a été atteint avec un biomatériau exposé au milieu extérieur sans évènement infectieux particulier.

Même si dans ces conditions expérimentales toutes les perforations n'ont pas été fermées en totalité, les résultats obtenus pourraient être directement dépendant des propriétés de l'implant à fournir un support adapté pour la migration, prolifération, et la différenciation des HNEpC alors qu'il s'agit d'un support non vascularisé et non fonctionnalisé.

La qualité de l'air inspiré intervient très probablement dans les résultats obtenus puisque le matériau est exposé au milieu extérieur. Le flux aérien et les particules aéroportées sont des facteurs stimulants de la différenciation et de la trophicité épithéliale ou inversement de la dédifférenciation et de la métaplasie. Nous pensons dans ce contexte que l'environnement (profession, loisirs, intoxication...) est un facteur important à prendre en compte si cet implant est mis en place chez l'homme.

II. Cytotoxicité des nanotubes de carbone à double paroi sur des cellules épithéliales respiratoires

A. INTRODUCTION

Actuellement, il est difficile de savoir avec précision si les NTCs ont des effets délétères sur la santé tant il y a de facteurs qui viennent perturber l'interprétation des résultats. L'industrie des nanotechnologies est depuis 20 ans en plein développement de telle sorte qu'il existe aujourd'hui une multitude de NPs disponibles sur le marché.

Pour fabriquer des NTCs, plusieurs procédés de synthèse existent, qui dépendent tous d'une source de carbone (le graphite, méthane, monoxyde de carbone...) et d'un métal qui sert de catalyseur (Cobalt, Zinc, Nickel, Fer, Yttrium, Molybdène, etc). Ces procédés laissent des quantités variables de molécules autres que des NTCs dans les échantillons dont les proportions doivent être connues avec précision car elles peuvent jouer un rôle non négligeable dans la toxicité (Vittorio et al 2009). La connaissance de l'exacte composition des échantillons testés est donc capitale. Elle ne l'est pas toujours pour les NTCs commerciaux pour lesquels la pureté des NTCs, la proportion de métaux résiduels et de particules de carbone amorphe pourra varier d'un échantillon à l'autre.

Grâce à leur important ratio surface/volume et aux forces de Van Der Waals développées, les NTCs ont la capacité de former des agrégats entre eux. Or ces agrégats ont été rapportés comme étant aussi des facteurs pouvant influencer leurs effets potentiels, toxique et inflammatoire, *in vitro* et *in vivo* (Li et al 2007, Wick et al 2007, Ryman-Rasmussen et al 2009). Les méthodes de dispersion utilisées pendant les études sont donc là aussi capitales, mais aucune d'entre elles n'a permis jusqu'à maintenant d'éliminer la totalité des agrégats pour fournir un échantillon uniquement constitué de NTCs individualisés (Donaldson et al 2006). D'autre part, la dispersion des NTCs augmente considérablement la surface disponible pour l'adsorption des molécules environnantes.

Ces capacités d'adsorption sont connues pour les protéines, les enzymes, les molécules d'ADN, certains composants des milieux de culture tel le sérum de veau fœtal (SVF) et les

colorants biologiques (Salvador-Morales et al 2006, Wörle-Knirsch et al 2006, Casey et al 2007a et b, Monteiro-Riviere et al 2009). L'adsorption de l'albumine pourrait favoriser la translocation vers le cytoplasme des cellules par l'intermédiaire du récepteur scavenger (Shvedova et al 2009). L'adsorption du SVF tendrait à diminuer la viabilité des cellules lors des tests de cytotoxicité (Casey et al 2007a). L'adsorption des colorants biologiques modifie les résultats par excès (faux-positifs) ou par défaut (faux-négatifs) selon le test utilisé (Wörle-Knirsch et al 2006, Casey et al 2007a et b, Monteiro-Riviere et al 2009).

Dans ce contexte, plusieurs auteurs s'accordent à dire que la toxicité enregistrée pour un type de NP n'est pas transposable à un autre d'autant que les mécanismes de captation cellulaire et de toxicité ne sont pas encore connus.

Par ailleurs, les études de toxicologie ont été faites à partir d'une multitude de modèles cellulaires, animal ou humain, qui sont majoritairement des cellules de lignées ou des cellules immortalisées : Raw 264.7 (lignées de macrophages murins péritonéaux), BALB 3T3 (fibroblastes murins immortalisés par le virus SV40), HaCaT (lignée humaine de kératinocyte), A549 (lignée humaine issue d'adénocarcinome alvéolaire) (Daroven et al 2006, Kostarelos et al 2007). Rares sont les études ayant utilisé des cellules normales. Il est surprenant de lire que ces choix ont été faits parce que certains auteurs considèrent que les cellules normales sont plus résistantes aux xénobiotiques que les cellules issues de populations carcinomateuses ou immortalisées (Shvedova et al 2009). D'autre part très peu d'auteurs se sont intéressés à la toxicité nasale des NTCs alors qu'il s'agit du premier organe exposé, particulièrement pour la filtration des NPs dont on a vu l'efficacité inversement proportionnelle à la taille (cf supra).

De même peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les DWNTs. L'intérêt d'une double paroi est de pouvoir inclure dans le tube intérieur un principe actif servant de réservoir et de pouvoir greffer sur le tube extérieur des molécules facilitant par exemple leur dispersion en milieu liquide, leur reconnaissance par la cellule ou leur transport vers un site cellulaire dédié, tout en conservant des propriétés physico-chimique très proches de celles d'un NTC à simple paroi. Leur procédé de synthèse décrit par le Dr E. Flahaut permet d'obtenir des échantillons dont les proportions des différents constituants sont connues et reproductibles (80 % de DWNTs) (Flahaut et al 2003).

L'objectif de notre travail dans le cadre du projet ANR SEST 2006 était :

- d'évaluer la cytotoxicité d'une source non commerciale et de composition connues de DWNTs,
- sous deux formes, brut de synthèse et fonctionnalisée par des groupements hydroxyle et carboxyle (augmentation de l'hydrophilie),
- sur des cellules humaines des deux extrémités de l'arbre respiratoire, alvéolaire A549 et nasale HNEpC (Human Nasal Epithelial Cell),
- de comparer de manière quantitative la viabilité et l'activité métabolique entre cellules de lignées (A549) et cellules normales (HNEpC),
- après une exposition *in vitro* simulant une intoxication aiguë et chronique,
- et d'évaluer les conséquences du séjour des DWNTs au contact des HNEpC (pénétration cellulaire, différenciation, stimulus sécrétagogues, stress oxydatif).

B. ARTICLE

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicology in Vitro
Manuscript Draft

Manuscript Number: TIV-D-09-00590R1

Title: Acute and chronic exposure of normal and malignant human airway epithelial cells to double-walled carbon nanotubes.

Article Type: Research Paper

Section/Category: Methods

Keywords: Keywords: in vitro, cytotoxicity, carbon nanotube, epithelial cells, airway

Corresponding Author: Pr Laurence Bordenave, Ph.D.,M.D.

Corresponding Author's Institution: INSERM / Université Victor Segalen Bordeaux 2

First Author: Ludovic de Gabory, MD

Order of Authors: Ludovic de Gabory, MD; Reine Bareille; Richard Daculsi, MD; Beatrice L'Azou, PhD; Emmanuel Flahaut, PhD; Laurence Bordenave, Ph.D.,M.D.

Abstract: The information currently available concerning carbon nanotubes toxicity is disturbing and conflicting. Here, we investigated double-walled carbon nanotube cytotoxicity (50 to 0.5 µg/mL) with three independent tests (NR, MTT, Wst-1) on normal human nasal cells after short (24-hours) and prolonged (12-days) exposure compared with malignant ones (A549). Cell differentiation function, oxidative stress, the morphological features of cells in contact with DWCNTs and the localizations of the latter were also investigated. Short-term exposure revealed a dose-dependent decrease in cell viability and metabolic activity for both cell types. In nearly all conditions, normal human nasal epithelial cells were more sensitive than A549, a finding confirmed during prolonged exposure up to 0.5 µg/mL on cell proliferation. Unlike A549 cells, nasal cells had stronger cytokeratin 7 immunostaining. In nasal cells, UEA-I immunostaining persisted, cytokeratin 19 production was increased at 25 µg/mL and mucus production was stimulated from 0.5 µg/mL. The cell plasmic membrane showed several holes and DWCNTs were present in the cytoplasm. A significant increase in Reactive Oxygen Species was observed from 25 µg/mL, indicating that the nasal cells had undergone an oxidative assault.

Covering Letter

Manuscript title : **Beware Not Only Of Assay But Also Culture Model Choice For Carbon**

Nanotube Cytotoxicity Evaluation

Corresponding author's name: Professor Laurence Bordenave

Corresponding author's mailing address: Inserm U577, University Victor Segalen Bordeaux2, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, FRANCE

Corresponding author's phone number, fax number and email address: 00 33 5 57 57 14 83, 00 33 5 56 90 05 17 Laurence.Bordenave@u-bordeaux2.fr

Comments on the manuscript significance

As far as cytotoxicity evaluation of carbon nanotubes (CNT) is concerned, it is noticeable that permanent cell lines from animal or humans are used, for short time exposure and lead to disturbing and conflicting results. Based on the assumption that the airway epithelium of respiratory tractus is considered as a first target when exposed to these volatile nanoparticles we sought to explore CNT cytotoxicity on normal human nasal epithelial cells that represent a relevant and reliable cell culture model to assess cytocompatibility. In this context, we investigated CNT toxicity on A549, as controls, and HNEpCs, as normal counterparts, the latter cells being well characterized in their differentiated function. Moreover, acute and chronic exposures were mimicked on these cell types, showing differences in cell models, that have to be taken into account.

Statement of the manuscript goals and significance:

- i) to show that human permanent cell lines do not represent a relevant and reliable cell culture model to evaluate CNT cytotoxicity, when compared with normal cells**
- ii) to use normal airway epithelial cells, well characterized towards their differentiated function (production of mucus, of cytokeratins), to reflect an exposure situation to volatile species**
- iii) to mimick acute and chronic exposure**
- iv) induced cell injury is not related to squamous metaplasia**

The strength of our results refers to the comparison between primary cells and cell lines, to the observed effects, and needs to be reviewed in a shorter time than as it would be for a regular manuscript, explaining why it is a short communication.

Pr L. Bordenave

date 2010 February 04th

Ref: TIV-D-09-00590

Dear Mr Blaauboer,

First, we would like to thank the reviewer for his constructive and pertinent comments which have allowed us to improve the manuscript. Please find below my responses:

1) As you suggested, now the manuscript is submitted as a full paper and not as a short communication

2) the title 'Beware not only of assay but also culture model choice for carbon nanotube cytotoxicity evaluation' has been changed to '**Acute and chronic exposure of normal and malignant human airway epithelial cells to double-walled carbon nanotubes**'

3) The English has been corrected by Dr Ray Cooke who is Senior Lecturer in English for Specific Purposes in our university. His contribution has been added to the acknowledgements.

I hope the modifications and answers will prove suitable and remain at your disposal for any further information you may require.

Sincerely yours

Dr Ludovic de Gabory

**Acute and chronic exposure of normal and malignant human airway epithelial cells to
double-walled carbon nanotubes**

Ludovic de Gabory^{1*}, Reine Bareille¹, Richard Daculsi¹, Béatrice L'Azou²,
Emmanuel Flahaut^{3,4}, Laurence Bordenave^{1,5}

¹Inserm, U577, Bordeaux, F-33076 France; Univ Victor Segalen Bordeaux 2, F33076 France.

²Laboratoire Biologie Cellulaire, Univ Victor Segalen Bordeaux 2, F33076 France

³Université de Toulouse; UPS, INP; Institut Carnot Cirimat; 118, route de Narbonne,
F-31062 Toulouse cedex 9, France

⁴CNRS; Institut Carnot Cirimat; F-31062 Toulouse, France

⁵CIC-IT Biomatériaux, Inserm, Pessac, F-33604 Pessac; CHU Bordeaux, Hôpital Xavier
Arnoz, Pessac, F-33604 France.

Corresponding author:

Pr. Laurence BORDENAVE

Unité 577 INSERM/Université Victor Segalen Bordeaux2, 146 rue Léo Saignat, 33076
Bordeaux Cedex, France.

Phone number: (33) 5 57 57 1754, Fax number: (33) 5 56 90 05 17,

Email: laurence.bordenave@u-bordeaux2.fr

1
2 **Acute and chronic exposure of normal and malignant human airway epithelial cells to**
3
4 **double-walled carbon nanotubes**
5
6
7
8
9

10
11 Ludovic de Gabory^{1*}, Reine Bareille¹, Richard Daculsi¹, Béatrice L'Azou²,
12
13 Emmanuel Flahaut^{3,4}, Laurence Bordenave^{1,5}
14
15
16
17
18
19
20

21 ¹Inserm, U577, Bordeaux, F-33076 France; Univ Victor Segalen Bordeaux 2, F33076 France.

22 ²Laboratoire Biologie Cellulaire, Univ Victor Segalen Bordeaux 2, F33076 France

23 ³Université de Toulouse; UPS, INP; Institut Carnot Cirimat; 118, route de Narbonne,
24
25 F-31062 Toulouse cedex 9, France

26 ⁴CNRS; Institut Carnot Cirimat; F-31062 Toulouse, France

27 ⁵CIC-IT Biomatériaux, Inserm, Pessac, F-33604 Pessac; CHU Bordeaux, Hôpital Xavier
28
29 Arnoz, Pessac, F-33604 France.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 **Corresponding author:**
43
44

45 Pr. Laurence BORDENAVE

46
47 Unité 577 INSERM/Université Victor Segalen Bordeaux2, 146 rue Léo Saignat, 33076
48
49 Bordeaux Cedex, France.
50
51

52 Phone number: (33) 5 57 57 1754, Fax number: (33) 5 56 90 05 17,
53
54

55 Email: laurence.bordenave@u-bordeaux2.fr
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

The information currently available concerning carbon nanotubes toxicity is disturbing and conflicting. Here, we investigated double-walled carbon nanotube cytotoxicity (50 to 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with three independent tests (NR, MTT, Wst-1) on normal human nasal cells after short (24-hour) and prolonged (12-day) exposure compared with malignant ones (A549). Cell differentiation function, oxidative stress, the morphological features of cells in contact with DWCNTs and the localizations of the latter were also investigated. Short-term exposure revealed a dose-dependent decrease in cell viability and metabolic activity for both cell types. In nearly all conditions, normal human nasal epithelial cells were more sensitive than A549, a finding confirmed during prolonged exposure up to 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on cell proliferation. Unlike A549 cells, nasal cells had stronger cytokeratin 7 immunostaining. In nasal cells, UEA-I immunostaining persisted, cytokeratin 19 production was increased at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and mucus production was stimulated from 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The cell plasmic membrane showed several holes and DWCNTs were present in the cytoplasm. A significant increase in Reactive Oxygen Species was observed from 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicating that the nasal cells had undergone an oxidative assault.

Keywords: in vitro, cytotoxicity, carbon nanotube, epithelial cells, airway,

Introduction

1
2
3
4 Carbon nanotubes (CNTs) could provide the nanotechnology platforms needed for enhanced
5
6 intracellular delivery of very many products (Reilly, 2007), and are now also proposed as
7
8 scaffolds in tissue engineering (Ferreira et al. 2008; Harrison and Atala, 2007). Major
9
10 concerns surrounding the use of CNTs and CNT-based materials are the impact on workers
11
12 involved in their handling, and the increased exposure of the scientific community and
13
14 probably the general public, if such promising new materials are to be introduced into the
15
16 body deliberately or not. It is imperative that the toxicity and biocompatibility of CNTs be
17
18 investigated in order to make them safe and useful for health applications.
19
20

21
22 Despite the blossoming of research activity in the field of potential devices and applications,
23
24 it is only recently that information on toxicity and biocompatibility has become available
25
26 (Smart et al. 2006) with disturbing and conflicting results (Poland et al. 2008; Monica, 2008).
27

28
29 The interaction between cells and CNTs is a critical issue that will determine any future
30
31 biomedical application of such structures, so cell culture models used to assess
32
33 cytocompatibility should be relevant and reliable.
34

35
36 To date, there have been several cell models in toxicity studies: human/rat macrophages
37
38 (Porter et al. 2007; Pulskamp et al. 2007), normal/malignant human mesothelial cells
39
40 (Pacurani, 2008; Wick et al. 2007), normal human keratinocytes (Herzog et al. 2007; Manna
41
42 et al. 2005; Monteiro-Rivière and Zhang, 2009), HaCaT cells (Herzog et al. 2007), normal
43
44 human bronchial epithelial cells (Herzog et al. 2007), human endothelial cells (Flahaut et al.
45
46 2006), human neuroblastoma cells (Vittorio et al. 2009), and the human alveolar carcinoma
47
48 cell line A 549 (Pulskamp et al. 2007; Herzog et al. 2007; Casey, 2007; Worle-Knirsch et al.
49
50 2006; Davoren et al. 2007; Kostarelos et al. 2007; Simon-Deckers et al. 2008; Choi et al.
51
52 2009) which is the most convenient cell type for studying respiratory immunotoxicity (Roggen
53
54 et al. 2006). However, multiple processes of synthesis leading to various types of CNTs
55
56 make it difficult to compare their biological effects. Moreover, the use of permanent cell lines
57
58 from a wide variety of animal species and tissues, frequently of carcinoma origin, has
59
60
61
62
63
64
65

1 demonstrated different degrees of sensitivity for the same material and identical culture
2 conditions, according to the test used. Our aim was to investigate CNT toxicity on normal and
3 malignant human airway epithelial cells. We chose to compare A549 (as controls) with
4 normal human nasal epithelial cells (HNEpCs) since i) the airway epithelium of the
5 respiratory tract is considered as a primary target when exposed to such volatile
6 nanoparticles, ii) the cells selected (A549 and HNEpCs) originate from the same organ, iii)
7 HNEpCs are considered as surrogates for bronchial epithelial cells (Mc Dougall et al. 2008),
8 and iv) normal cells can be compared with malignant ones in our protocol.
9

10 The goals of this study were to assess the cytotoxicity of Double-Walled Carbon Nanotubes
11 (DWCNTs) on A549 and HNEpCs during short and prolonged exposure mimicking acute and
12 chronic situations. Cell differentiation function, oxidative stress, the morphological features of
13 the cells and DWCNTs localizations were also investigated.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 **Materials and Methods**

32 ***Preparation of DWNTs***

33
34
35
36
37 Double-walled CNTs were prepared by Catalytic Chemical Vapor Deposition (CCVD)
38 according to Flahaut et al (Flahaut et al. 2003). Two sets were available, raw (r-DWNTs) or
39 outer wall functionalized (f-DWCNTs) by oxidation leading to the covalent grafting mainly
40 carboxylic functions (Figure 1A-C). Stock suspensions of r- and f-DWCNTs were prepared in
41 serum-free medium and sterilized at 120 °C. The suspensions were prepared by dispersing
42 an initial concentration of 1,800 µg/mL of each material by sonication with an ultrasonic tip
43 (500 W) at 70 % amplitude for 5 min.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Cell cultures and exposure conditions

1
2 A549 were kindly provided by Laboratoire de Pharmacologie Clinique et Expérimentale des
3
4 médicaments anti-cancéreux, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, cultured in
5
6 medium IMDM supplemented with 10% FCS and used in passages 80 to 84.

7
8 HNEpCs were purchased from Promocell® (Promocell GmbH®, Sickingenstr, Heidelberg,
9
10 Germany) cultured with appropriate medium and used in passages 1 to 3. Figure 1D, E
11
12 shows cell monolayers, cell characterization by cytokeratins (F, G) because of their
13
14 homogeneous expression over the entire respiratory tract (Moll et al. 1982), and cell surface
15
16 expression of the glycoconjugate Ulex European Agglutinin-I (UEA-I) (H) (Fang and Oyama,
17
18 1997).
19
20

21
22 For short exposure, cells were seeded and treated in 96-well plates (6 repeats and at least 2
23
24 experiments). Both cell types were submitted at sub-confluence for 24h to suspensions at
25
26 0.5- 2.5- 5- 25- 50 μ g/mL of r- and f-DWCNTs prepared freshly before the experiments in the
27
28 respective complete culture medium. Cell viability after short exposure was then evaluated
29
30 with Neutral Red (Flahaut et al. 2006), MTT (Flahaut et al. 2006) and WST-1 assays
31
32 (Pulskamp et al. 2007; Casey, 2007; Worle-Knirsch et al. 2006; Simon-Deckers et al. 2008).

33
34 For prolonged exposure, the following seeding densities were 5,000 and 10,000 per cm^2 for
35
36 A549 and HNEpCs, respectively in 48-well plates in quadruplicate. Cell growth in the
37
38 presence of DWCNTs (at the same 5 concentrations), renewed at each cell culture medium
39
40 and changed every 2 or 3 days, was monitored over 12 days by MTT and WST-1 assays
41
42 (Flahaut et al. 2006; Simon-Deckers et al. 2008). Untreated cells were used as positive
43
44 controls (100 % viable) for all experiments. Results are expressed as percent of controls of
45
46 two independent experiments, each carried out in 4 specimens (mean \pm SD).
47
48
49
50

Cell differentiation function

51
52
53
54 Immunostaining was classically performed by immunoperoxidase technique intensified by the
55
56 streptavidin-biotin complex after 12d exposure to 25 and 0.5 μ g/mL of r- and f-DWCNTs.
57
58
59 Cells were incubated with mouse monoclonal antibodies anti-human anticytokeratin 7 (DAKO
60
61
62
63
64
65

1 A/S Co., Glostrup, Denmark) diluted at 1:200 and rabbit polyclonal antibodies anti-human
2 UEA-I (DAKO A/S Co.) diluted at 1:800.

3
4 Intra- and extracellular released cytokeratin 19 levels were measured from 48-well plates in
5
6 triplicate using a commercial kit: ELSA-CYFRA 21-1TM (Cis bio international, Gif-sur-Yvette,
7
8 France), which is a solid-phase sandwich immunoradiometric assay. Indeed, precise
9
10 recognition of cytokeratin 19 fragment is made with two monoclonal antibodies (BM 19-21
11
12 and KS 19-1). Results (within- and between-run CV being inferior to 6%) were first expressed
13
14 as nanogram per milliliter for CYFRA and then normalized to intracellular protein content
15
16 (evaluated by the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce Science, Bezons, France).
17
18

19
20 The production of mucus is a first line of defense against inhaled foreign bodies. Thus, we
21
22 sought to detect the presence of glycosaminoglycans by alcian blue staining in cells. To
23
24 detect acid mucins, the cells were detached from culture plastic wells by trypsin. They were
25
26 transferred to Lab Tech system© glass slides and immediately fixed to avoid modification of
27
28 the cell phenotype. Alcian blue staining (pH 2.5) was carried out according to a standard
29
30 method (Gaffney, 1994)
31
32
33
34
35

36 ***Reactive Oxygen Species (ROS) assay***

37
38 Oxidative stress was investigated by Reactive Oxygen Species (ROS) generation. ROS
39
40 generation was determined with the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA,
41
42 Sigma- Aldrich) reagent as described by L' Azou et al. (2008) with some modifications.
43
44 DCFH-DA is a stable, non-fluorescent molecule that is hydrolyzed by intracellular esterases
45
46 to non-fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH), which is rapidly oxidized in the presence
47
48 of peroxides to a highly fluorescent product (dichlorofluorescein). Briefly, three days prior to
49
50 each experiment, cells were seeded in 6-well plates, then incubated for 4h or 24h with r- or f-
51
52 DWCNTs at two concentrations (25 and 0.5 µg/mL) in culture medium. After incubation, cells
53
54 were washed with HBSS (Hank's balanced salt solution) and incubated with 50µM DCFH-DA
55
56 for 15min. Subsequently, cells were washed with HBSS, scraped off, lysed by sonication and
57
58 centrifuged. Supernatants were collected and ROS levels were determined at excitation
59
60
61
62
63
64
65

1 wavelength 488 nm and emission wavelength 520 nm using a fluorimeter (Kontrol
2 Instrument, Eching, Germany). Data from at least triplicates are reported as fluorescence
3 intensity percentage and expressed as mean fluorescence ratio (fluorescence of exposed
4 cells/fluorescence of unexposed control from the same experiment) (mean \pm SD).
5
6
7
8
9

10 ***Electron microscopy***

11 For scanning electron microscopy (SEM), specimens at day 12 were fixed by immersion in a
12 mixture (1:1) of a glutaraldehyde solution (2%) and a cacodylate buffer (pH 7.3). Surfaces
13 were then washed with 0.15M cacodylate for 10 min. Samples were desiccated at room
14 temperature and finally metalized with metal using a gold target.
15
16
17
18
19
20
21

22 For transmission electron microscopy (TEM), samples were fixed with glutaraldehyde-
23 cacodylate buffer for 1 h at 4°C. Cells were then washed in 0.15M cacodylate. Post-fixation
24 with 2% (v/v) OsO₄-0.3 M cacodylate was carried out for 60 min. The samples were
25 dehydrated through a graded series of ethanol from 25 to 100%. Dehydration was completed
26 with propylene oxide treatment and then infiltration was carried out with propylene oxide
27 Epon (1:1). Finally, the samples were embedded in 100% fresh Epon and polymerized in a
28 60°C oven for 48h. Sections 1 μ m thick were cut.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 ***Statistical analysis***

41 The non-parametric Mann Whitney U test was used to assess statistically significant
42 differences between treated and untreated cells after cytotoxicity evaluation, ELSA-CYFRA
43 21-1TM measurement and ROS assays. P-values less than 0.01 were considered
44 statistically significant. Results after short exposure were expressed as the Lowest- and
45 None- Observed Adverse Effect Concentrations (LOAEC and NOAEC, respectively). The
46 former corresponds to the lowest concentration with a statistically significant difference
47 between treated and untreated cells for which a toxic effect remains. The latter corresponds
48 to the first concentration with a statistically significant difference for which no toxic effect is
49 detected.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Results

Short-term exposure (24h) revealed a dose-dependent decrease in cell viability and metabolic activity for both cell types. Depending on the test, r-DWCNTs were more (by NR, MTT assays) or less (by WST-1) toxic than f-DWCNT on cells. The LOAEC and the NOAEC for A549 ranged from 50 to 0.5 µg/mL and for HNEpC ranged from 5 to 0.5 µg/mL depending on the test and DWCNT form (Figure 2A). According to the LOAEC and NOAEC (figure 2A) HNEpCs are more sensitive (in nearly all conditions) than A549 to DWCNTs.

Prolonged exposure was conducted by a study of growth as a function of time. Concerning A549, we obtained comparable patterns with both tests (data not shown): a maximal effect with r-DWCNTs over 3 days (-45 ± 0.5 % of control for the highest concentration), followed by no longer any significant inhibition and a less marked effect with f-DWCNTs. Concerning HNEpCs, a higher sensitivity was confirmed over A549 by both tests with a concentration-dependent decrease in cell growth and a cumulative effect as a function of time over 9 days at least (figure 2B-E). The toxicity of f-DWCNTs (figure 2C, E) on HNEpCs seemed less pronounced than that of r-DWCNTs (figure 2B, D).

With regard to differentiation, cytokeratin 7 positivity almost disappeared in A549 treated with 25 µg/mL of r- DWCNTs (figure 2F) and f- DWCNTs, and diminished with 0.5 µg/mL. On the contrary, cytokeratin 7 immunostaining in nasal epithelial cells seemed strengthened at 25 µg/mL of r- and f- DWCNTs (figure 2G) in comparison with unexposed HNEpCs, and was comparable at 0.5 µg/mL. Finally, UEA-I was still present in HNEpCs exposed to 25 µg/mL of r- and f- DWCNTs (figure 2H, I). Total intra- and extracellular cytokeratin 19 expressed as ng per mg of protein content revealed a markedly increased production for r-DWCNTs only at 25 µg/mL (figure 2J). Intracellular amounts of cytokeratin 19 represented 98% of total values in all specimens. Untreated HNEpCs showed a CYFRA level of 259 ± 55 (mean \pm SD) ng per mg of protein. Moreover, figure 3A shows negative staining of alcian blue in control HNEpCs that became positive in cells exposed to 0.5 µg/mL of DWCNTs (figure 3B), without any noticeable difference between raw and functionalized CNTs.

1
2 Concerning oxidative stress, HNEpCs treated with 25 μ g/mL r-DWCNTs produced a
3 dramatic increase in ROS induction (figure 3C), contrary to a concentration of 0.5 μ g/mL and
4 f-DWCNTs.
5
6

7
8 With regard to ultrastructural modifications (figure 3D-I), SEM revealed damaged cells in
9 contact with aggregates of both types of DWCNTs, with several holes in the cell plasma
10 membrane (figure 3D, E). TEM showed that DWCNTs were internalized (figure 3F) and that
11 they occurred within vacuoles or cytoplasmic compartments resembling lysosomes. Higher
12 magnifications confirmed that DWCNTs were either isolated or aggregated (figure 3F-I), with
13 a higher proportion of the latter. We never observed any DWCNTs in the cell nuclei. The
14 same behavior was observed for both types of DWCNTs.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **Discussion**

26
27 The interaction between cells and carbon nanotubes is a critical issue that will determine any
28 future biomedical application. However, the information currently available concerning their
29 toxicity is disturbing and conflicting. Very few studies (Pacurari et al. 2008; Herzog et al.
30 2007) have investigated normal and malignant cells from the same organ exposed to CNTs.
31 We chose to use airway epithelial cells because pulmonary exposure represents one of the
32 two main routes when handling nanomaterials (Donaldson et al. 2006). Moreover, once
33 released in the environment, nanomaterials might be inhaled and cause damage. The nasal
34 epithelium is exposed first, and to a greater extent than the bronchial epithelium, to all
35 environmental agents, including CNT. The nose plays a pivotal role in the defense
36 mechanisms of the respiratory apparatus, protecting the more sensitive lower airways. For
37 these reasons and because most airway epithelial research has relied heavily on
38 commercially transformed cell lines such as A549 (alveolar adenocarcinoma), the present
39 study of airway epithelium exposure to DWCNTs was conducted with human primary
40 cultured nasal epithelial cells in comparison with A549 (epithelial-like lung cell line). It is well
41 known that primary cultured cells should be used for *in vitro* analyses because they are most
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 similar to cells *in vivo* and more sensitive to xenobiotics when compared with cell lines
2 (Pariante et al. 1998; L'Azou et al. 2005).

3
4 Carbon nanomaterials are known to interfere with a number of colorimetric indicator dyes
5 (Monteiro-Rivière and Zhang, 2009; Vittorio et al. 2009; Worle-Knirsch et al. 2006; Pfaller et
6 al. 2009). However, cell viability/metabolic activity modifications are often assessed with NR
7 (Porter et al. 2007; Monteiro-Rivière and Zhang, 2009; Flahaut et al. 2006; Casey, 2007;
8 Davoren et al. 2007), MTT (Porter et al. 2007; Pacurari et al. 2008; Wick et al. 2007; Manna
9 et al. 2005; Monteiro-Rivière and Zhang, 2009; Flahaut et al. 2006; Vittorio et al. 2009;
10 Casey, 2007; Worle-Knirsch et al. 2006; Davoren et al. 2007) and WST-1 (Pulskamp et al.
11 2007; Vittorio et al. 2009; Casey, 2007; Worle-Knirsch et al. 2006; Stosiek et al. 1992)
12 despite certain limitations. In our study after short exposure, we assessed cytotoxicity by
13 three independent tests as previously suggested (Monteiro-Rivière and Zhang, 2009; Vittorio
14 et al. 2009; Worle-Knirsch et al. 2006): Neutral Red (NR), MTT, and WST-1 dye-based
15 assays to overcome putative false negative or positive findings. The latter is considered
16 reliable (Simon-Deckers et al. 2008) for assessing interactions of CNTs with dyes. Although
17 NR assay overestimates cell viability (Monteiro-Rivière and Zhang, 2009; Flahaut et al. 2006;
18 Vittorio et al. 2009; Casey, 2007), it remains valid, according to our results, since it
19 demonstrates cytotoxicity. Because NR provides false-negative results, a positive test
20 showing toxicity underestimates the true toxicity. Concerning validity of MTT and WST-1
21 assays, the former may provide a false positive result (Pulskamp et al. 2007; Monteiro-
22 Rivière and Zhang, 2009; Vittorio et al. 2009; Casey, 2007; Worle-Knirsch et al. 2006;
23 Simon-Deckers et al. 2008) whereas the latter may (Casey, 2007) or may not (Pulskamp et
24 al. 2007; Worle-Knirsch et al. 2006; Simon-Deckers et al. 2008).

25
26 Thus, after short exposure: i) r-DWCNTs are less cytotoxic than f-DWCNTs (by NR and MTT
27 assays), and ii) r-DWCNTs are more cytotoxic than f-DWCNTs by WST-1. Even with three
28 independent assays, the artifacts generated by the adsorptive properties of CNTs cannot be
29 avoided, as shown by these confounding results. It is therefore likely that DWCNTs adversely
30 affect cell viability. However, the reliability of the tests depends on the DWCNTs

1 concentration. We performed control experiments in which we quantified adsorption. A549
2 cultured without DWCNTs were incubated with MTT or WST-1 and the dye products
3 (formazan) or the dye absorbances were measured in the presence or absence of DWCNTs.
4 High concentrations (25 and 50 $\mu\text{g/mL}$) significantly lowered absorbance readings (data not
5 shown), so we suggest that cytotoxicity should be validated in a concentration range without
6 adsorption.
7
8
9
10
11
12
13
14

15 In human respiratory epithelium, cytokeratins 5, 14 and 17 are mainly expressed in the basal
16 cells whereas cytokeratins 7, 8, 18 and 19 are localized at the surface of bronchial, tracheal
17 and nasal epithelium (Moll et al. 1982). As such, they constitute a useful marker of epithelial
18 differentiation. Persistent immunostaining of cytokeratins 7 and 19 provided strong evidence
19 of the epithelial origin of the cells. Moreover, the fact that UEA-I is strongly and persistently
20 expressed in nasal epithelial cells (Fang and Oyama, 1997) provides an additional argument
21 for the conservation of phenotypes in contact with DWCNTs. We speculate that the
22 maintenance of normal respiratory epithelial differentiation could be a sign that metaplasia
23 has not begun and that a repair process following cell injury by DWCNTs is not involved.
24 Indeed, squamous metaplasia in the tracheobronchial epithelium, as evidenced by the
25 distribution of individual cytokeratins (Stosiek et al. 1992), is considered to be an adaptive
26 response that protects the lumen from the effects of inhaled airborne pollutants. In fact, the
27 first step of the repair process requires loss of differentiation. Moreover, the first-line defense
28 against inhaled insult impinging on and damaging the epithelium is the production of mucus
29 (Rogers, 2007), thus representing an important homeostasis defense mechanism for the
30 airway epithelial cells. We speculate that the absence of dedifferentiation combined with the
31 production of mucus from 25 $\mu\text{g/mL}$ or more suggests that DWCNT-induced effects are not
32 specific to the cells that are thought to produce mucus as a response to the mechanical
33 stimulus of nanotube aggregation.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Oxidative stress plays a key role in nanoparticle biocompatibility (Pulskamp et al. 2007; Pacurari et al. 2008; Manna et al. 2005; Vittorio et al. 2009; L'Azou et al. 2008; Donaldson et al. 2006). The formation of ROS in nanotube-treated cells was not evidenced with purified CNTs (Pulskamp et al. 2007), leading the authors to the conclusion that metal traces associated with commercial nanotubes were responsible for the biological effects they found. The relation between intracellular ROS formation and the content of metal impurities is well documented (Vittorio et al. 2009) but our CNTs were not of commercial origin (Flahaut et al. 2003). Moreover, the role of ROS in the global response of airway epithelium to particulates has already been reviewed (Martin et al. 1997) and can contribute to airway pathology.

While CNT internalization was not found in A549 (Davoren et al. 2007), others showed penetration into the cytoplasm of different cell lines (Porter et al. 2007; Worle-Knirsch et al. 2006; Kostarelos et al. 2007; Simon-Deckers et al. 2008; Pantarotto et al. 2004), including A549. Such discrepancies are probably due to the large differences in the characteristics of the CNTs studied. In our experiments DWCNTs entered both normal and A549 epithelial cells. The pathways of entry of SWCNTs into cells are energy-dependent phagocytosis or endocytosis and/or passive diffusion across lipid layers (Porter et al. 2007; Kostarelos et al. 2007). While we were unable in this study to determine a mechanism responsible for cellular uptake, we can rule out the phagocytosis process restricted to specialized cells such as macrophages, monocytes and neutrophils not commonly used by differentiated HNEpCs. CNTs could be likened (Kostarelos et al. 2007) to "nanosyringes" for their propensity to penetrate through the plasma membrane as experimentally reported (Pantarotto et al. 2004) and theoretically simulated (Lopez et al. 2004).

Conclusion

1
2 This study aiming to mimic *in vitro* acute and chronic exposure to CNTs shows that: i) the
3
4 functional relevance of permanent malignant cell lines such as A549 is debatable since they
5
6 do not represent a sufficient model because normal cells are more susceptible to CNT-
7
8 induced injury; ii) however, for occupational safety purposes and environmental exposure
9
10 studies, *in vivo* inhalation studies should be conducted to corroborate the fact that *in vitro*
11
12 nasal epithelial cell cultures are an accessible surrogate for lower airway cells; iii) a true
13
14 measurement of toxicity is difficult to achieve even with WST-1, probably the most reliable
15
16 test; iv) r-DWCNTs have the most deleterious effect on chronically exposed normal
17
18 respiratory cells and the ROS they produce may play both a direct and an indirect role in the
19
20 ensuing biological responses; v) concerning the mechanism of injury, we hypothesize that
21
22 “wound healing” following exposure of CNT is not a viable hypothesis on the basis of the
23
24 absence of dedifferentiation.
25
26
27
28
29
30

Acknowledgements

31
32
33
34 The authors would like to thank the other partners within the NTCTOX network as well as the
35
36 French National Research Agency (ANR) for funding NTCTOX through the ANR SEST 2006
37
38 program. The authors also thank Dr. Ray Cooke for linguistic assistance.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 **References**
3

4 Casey, A., 2007. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled
5 carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. Carbon 45, 1425-
6 1432.
7
8

9
10 Choi, S.J., Oh, J.M., Choy, J.H., 2009. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on
11 human cancer A549 cells. Journal of Inorganic Biochemical 103, 463-471.
12
13

14 Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., Cottineau, B., Chambers, G., Byrne, H.J., Lyng, F.M.,
15 2007. *In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung
16 cells. Toxicology in vitro 21, 438-448.
17
18

19 Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G., Alexander, A., 2006.
20 Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and
21 workplace safety. Toxicological Sciences 92(1), 5-22.
22
23

24 Fang, S.Y., Oyama, M., 1997. Assessment of cell surface glycoconjugates, in normal, benign
25 and malignant human nasal mucosa. Rhinology 35(4), 166-170.
26
27

28 Ferreira, L., Karp, J.M., Nobre, L., Langer, R., 2008. New opportunities: the use of
29 nanotechnologies to manipulate and track stem cells. Cell Stem Cell 3(2), 136-146.
30
31

32 Flahaut, E., Bacsa, R., Peigney, A., Laurent, C., 2003. Gram-scale CCVD synthesis of
33 double-walled carbon nanotubes. Chemical Communications 12, 1442-1143.
34
35

36 Flahaut, E., Durrieu, M.C., Rémy-Zolghadri, M., Bareille, R., Baquey, C., 2006. Investigation
37 of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial
38 cells. Carbon 44, 1093-1099.
39
40

41 Gaffney, E., 1994. Carbohydrates. In Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., et al., eds.
42 Laboratory methods in histotechnology. Washington:Armed forces Institute of pathology,
43 149-174.
44
45

46 Harrison, B.S., Atala, A., 2007. Carbon nanotube applications for tissue engineering.
47 Biomaterials 28, 344-353.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Herzog, E., Casey, A., Lyng, F.M., Byrne, H.J., Davoren, M., 2007. A new approach to the
2 toxicity testing of carbon based nanomaterials-the clonogenic assay. *Toxicology Letters*
3
4 174(1-3), 49-60.
5

6 Kostarelos, K., Lacerda, L., Pastorin, G., Wu, W., Wieckowski, S., Luangsivilay, J., Godefroy,
7
8 S., Pantarotto, D., Briand, J.P., Muller, S., Prato, M., Bianco, A., 2007. Cellular uptake of
9
10 functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type.
11
12 *Nanotechnology* 2, 108-113.
13

14 L'Azou, B., Fernandez, P., Bareille, R., Beneteau, M., Bourget, C., Cambar, J., Bordenave,
15
16 L., 2005. *In vitro* endothelial cell susceptibility to xenobiotics: comparison of three cell types.
17
18 *Cell Biology Toxicology* 21(2), 127-137
19

20 L'Azou, B., Jorly, J., On, D., Sellier, E., Moisan, F., Fleury-Feith, J., Cambar, J., Brochard, P.,
21
22 Ohayon, C., 2008. *In vitro* effects of nanoparticles on renal cells. *Particle and Fibre*
23
24 *Toxicology* 5(22).
25

26 Lopez, C., Nielsen, S., Moore, P., Klein, M., 2004. Understanding nature's design for a
27
28 nanosyringe. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, 101(13), 4431-4434.
29

30 Manna, S.K., Sarkar, S., Barr, J., Wise, K., Barrera, E.V., Jejelowo, O., Rice-Ficht, A.C.,
31
32 Ramesh, G., 2005. Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates
33
34 nuclear transcription Factor-kB In human keratinocytes. *Nano Letters* 5(9), 1676-1684.
35

36 Martin, L.D., Krunkosky, T.M., Dye, J.A., Fischer, B.M., Jiang, N.F., Rochelle, L.G.,
37
38 Akley, N.J., Dreher, K.L., Adler, K.B., 1997. The role of reactive oxygen and nitrogen species
39
40 in the response of airway epithelium to particulates. *Environmental Health Perspectives*
41
42 105(5), 1301-1307.
43

44 Mc Dougall, C.M., Blaylock, M.G., Douglas, J.G., Brooker, R.J., Helms, P.J., Walsh, G.M.,
45
46 2008. Nasal epithelial cells as surrogates for bronchial epithelial cells in airway inflammation
47
48 studies. *American Journal Respiratory Cell and Molecular Biology* 39, 560-568.
49

50 Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, R., 1982. The catalog of human
51
52 cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31(1),
53
54 11-24.
55

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Monica Jr, J.C., Monica, J.C., 2008. A nano-mesothelioma false alarm. *Nanotechnology Law & Business*, 319-333.

Monteiro-Rivière, N.A., Zhang, A.O.I., 2009. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 234, 222-235.

Pacurari, M., Yin, X.J., Zhao, J., Ding, M., Leonard, S.S., Schwegler-Berry, D., Ducatman, B.S., Sbarra, D., Hoover, M.D., Castranova, V., Vallvathan, V., 2008. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kB, and Akt in normal and malignant human mesothelial cells. *Environmental Health Perspectives* 116(9), 1211-1217.

Pantarotto, D., Singh, R., McCarthy, D., Erhardt, M., Briand, J.P., Prato, M., Kostarelos, K., Bianco, A., 2004. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 43(39), 5242-5246.

Pariante, J.L., Bordenave, L., Bareille, R., Rouais, F., Courtes, C., Daude, G., le Guillou, M., Baquey, C., 1998. First use of cultures human urothelial cells for biocompatibility assessment: application to urinary catheters. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 40(1), 31-39.

Pfaller, T., Colognato, R., Nelissen, I., Favilli, F., Casals, E., Ooms, D., Leppens, H., Ponti, J., Stritzinger, R., Pundes, V., Boraschi, D., Duschl, A., Oostingh, G.J., 2009. The suitability of different cellular in vitro immunotoxicity and genotoxicity methods for the analysis of nanoparticle-induced events. *Nanotoxicology* DOI:10.3109/17435390903374001.

Poland, C.A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W.A.H., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., MacNee, W., Donaldson, K., 2008. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnology* 3(7), 423-428.

Porter, A.E., Gass, M., Muller, K., Skepper, J.N., Midgley, P.A., Welland, M., 2007. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nature Nanotechnology* 2(11), 713-717.

1
2 Pulskamp, K., Diabaté, S., Krug, H.F., 2007. Carbon nanotubes show no sign of acute
3 toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants.
4 Toxicology Letters 168, 58-74.
5
6 Reilly, R.M., 2007. Carbon nanotubes: potential benefits and risks of nanotechnology in
7 nuclear medicine. Journal of Nuclear Medicine 48(7), 1039-1042.
8
9 Rogers, D.F., 2007. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of
10 hypersecretion. Respiratory Care 52(9), 1134-1146.
11
12 Roggen, E.I., Soni, N.K., Verheyen, G.R., 2006. Respiratory immunotoxicity: an *in vitro*
13 assessment. Toxicology in vitro 20, 1249-1264.
14
15 Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L'Hermite, M., Herlin-Boime, N., Carrière, M., 2008.
16 *In vitro* investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular
17 accumulation in A549 human pneumocytes. Toxicology 253, 137-146.
18
19 Smart, S.K., Cassady, A.I., Lu, G.Q., Martin, D.J., 2006. The biocompatibility of carbon
20 nanotubes. Carbon 44, 1034-1047.
21
22 Stosiek, P., Kasper, M., Moll, R., 1992. Changes in cytokeratin expression accompany
23 squamous metaplasia of the human respiratory epithelium. Virchows Archiv. A, Pathological
24 Anatomy and Histopathology 421(2):133-141.
25
26 Vittorio, O., Raffa, V., Cuschieri, A., 2009. Influence of purity and surface oxidation on
27 cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes with human neuroblastoma cells. Nanomedicine
28 30.
29
30 Wick, P., Manser, P., Limbach, L.K., Dettlaff-Weglikowska, U., Krumeich, F., Roth, S.,
31 Stark, W.J., Bruinink, A., 2007. The degree and kind of agglomeration affect carbon
32 nanotube cytotoxicity. Toxicology Letters 168, 121-131.
33
34 Worle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K., Krug, F., 2006. Oops they did it again ! Carbon
35 nanotubes hoax scientists in viability assays. Nano Letters 6(6), 1261-1268.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure legends

Figure 1. Illustration of the oxidation of CNTs by HNO₃, leading to the covalent grafting of oxygenated groups mainly including carboxylic functions (A); SEM image of the CCVD product (nanocomposite powder) (B): bundles of interconnected DWNTs are clearly visible at this magnification; typical high resolution TEM image (cross-section) of a bundle of DWNTs, where the inner and outer tube can be observed clearly (C). Cell characterization before exposure to DWNTs: A549 (D) and HNEpC (E) cell monolayers at confluence; cytokeratin 7 baseline immunostaining for both cell types, respectively (F, G); cell expression of the glycoconjugate UEA-I in HNEpCs (H).

Figure 2. Results of cytotoxicity (A) after short exposure to r- and f-DWNTs. Results are expressed as LOAEC and NOAEC, respectively in $\mu\text{g/mL}$. Undeterminable (UD) refers to toxicity remaining at 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Results of HNEpC growth (B-E) in the presence of 5 concentrations of DWNTs (from 50 $\mu\text{g/mL}$ (black bar) to 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (white bar)) monitored over 12 days by MTT (B, C) and WST-1 (D, E) assays.

Cell differentiation function (F-J) after 12d exposure. Cytokeratin 7 immunostaining in A549 treated with 25 $\mu\text{g/mL}$ of r-DWNTs (F) and in HNEpCs treated with 25 $\mu\text{g/mL}$ of f-DWNTs (G); UEA-I immunostaining in HNEpCs treated with 25 $\mu\text{g/mL}$ of r-DWNTs and f-DWNTs (H, I, respectively). Cytokeratin 19 expressed as ng of CYFRA per mg of intracellular protein content (J) (*) refers to a significant difference from the control ($p < 10^{-2}$).

Figure 3: Alcian blue detection in untreated HNEpCs (A) and in HNEpCs treated with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ of f-DWNTs (B); ROS generation in HNEpCs after 4h and 24h treatment with DWNTs (C). SEM (D, E) and TEM (F-I) magnifications of HNEpCs treated over 12d with 25 $\mu\text{g/mL}$ of f-DWNTs (D-G) and r-DWNTs (H, I): injured cells in contact with f-DWNT aggregates at 1,100X (D) and higher magnification showing several holes in plasma membrane at 4,000X (E). Entire cell containing f-DWNTs in lysosome-like structures at 6,000X (F, H) and higher subsequent magnifications (G, I); free individual f-DWNTs (black arrow) and aggregates

(white arrow) in endosomes and cytoplasm (G, I), white arrow head indicating remnant catalytic carbon-coated cobalt nanoparticles.

(*) refers to a significant difference (Mann Whitney U test) with other conditions ($p < 10^{-2}$).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

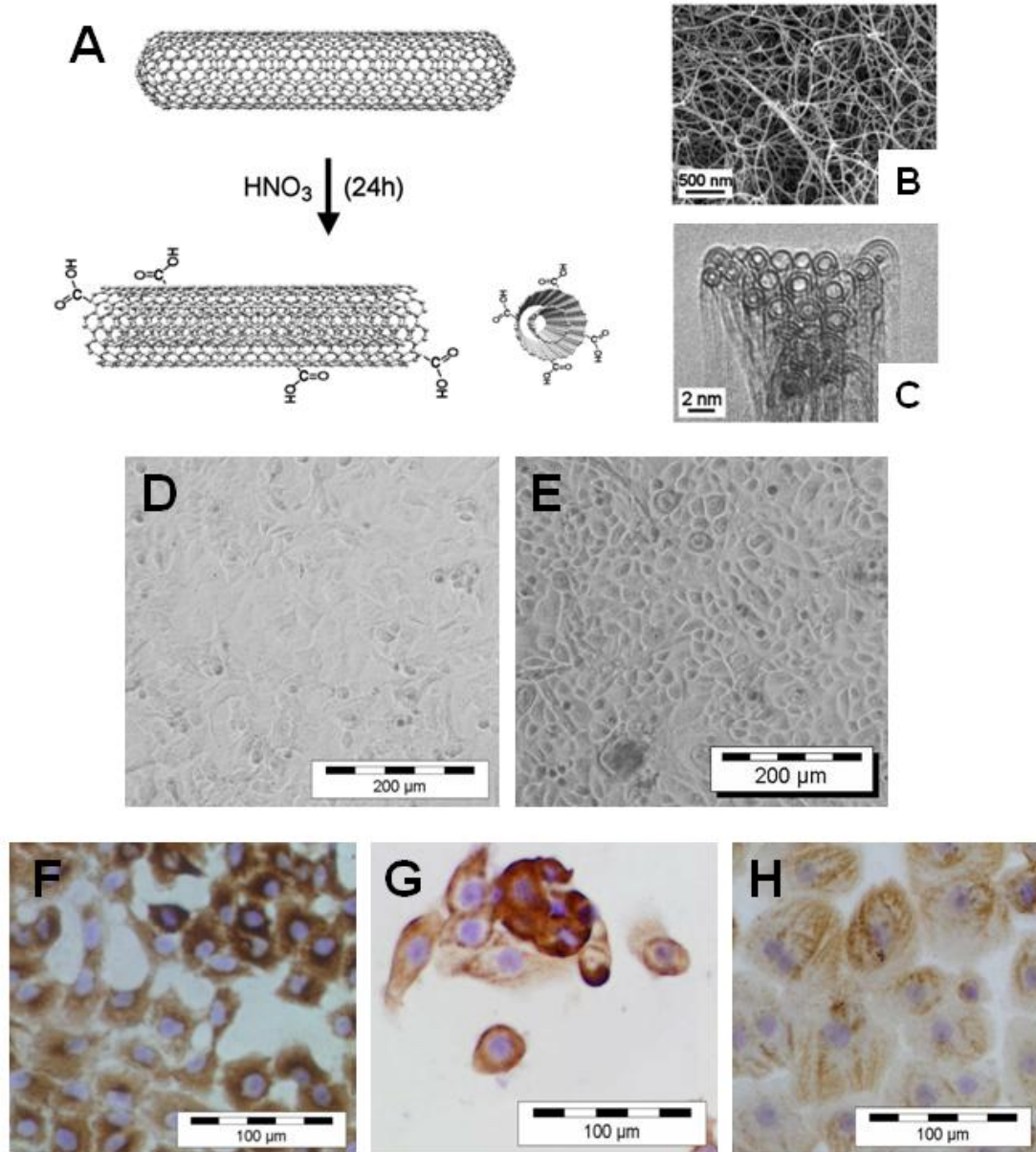


Figure 1

A		r-DWNT			f-DWNT		
		NR	MTT	Wst1	NR	MTT	Wst1
A549	LOAEC	25	25	5	0.5	2.5	50
	NOAEC	5	5	2.5	UD	0.5	25
HNEpC	LOAEC	0.5	2.5	0.5	0.5	0.5	5
	NOAEC	UD	0.5	UD	UD	UD	2.5

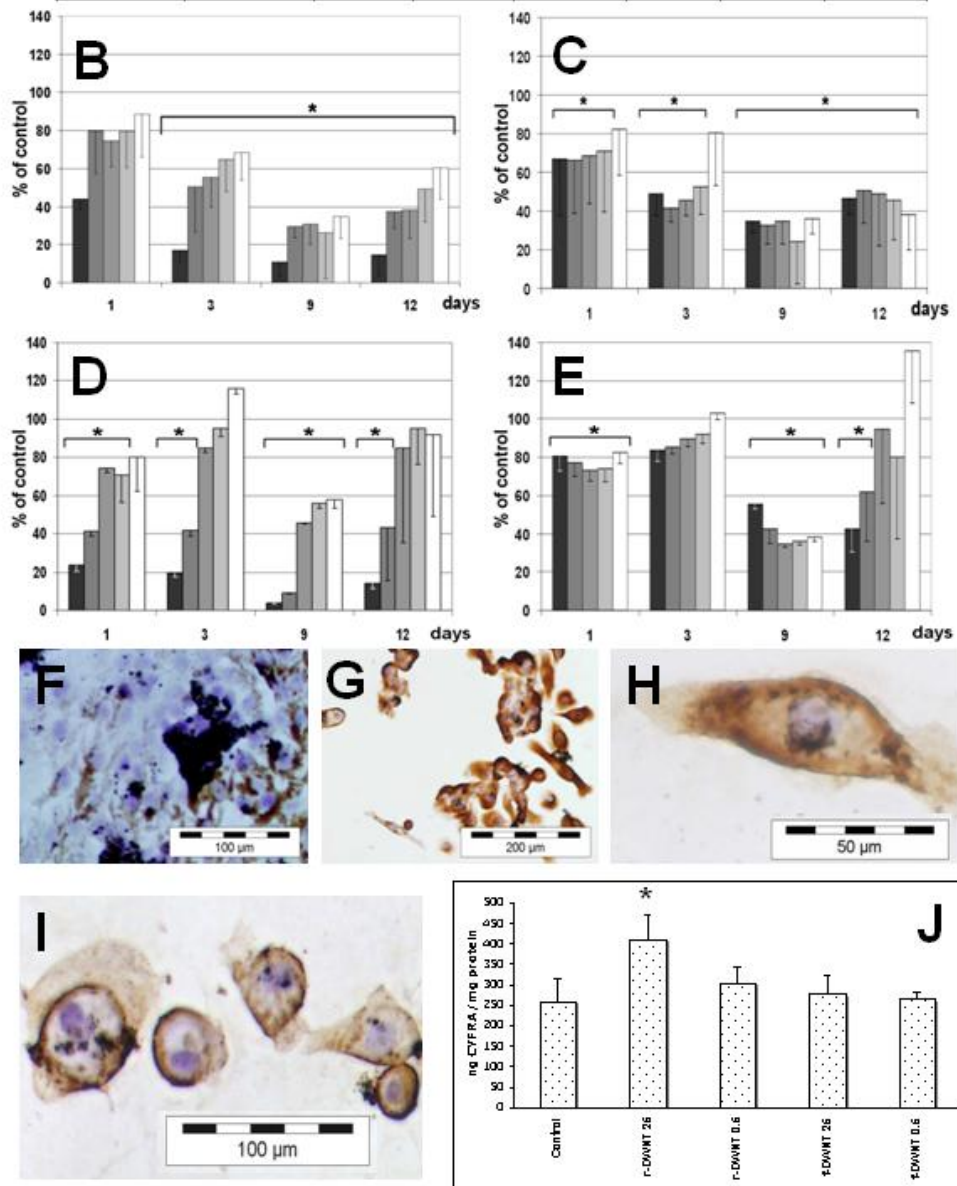


Figure 2

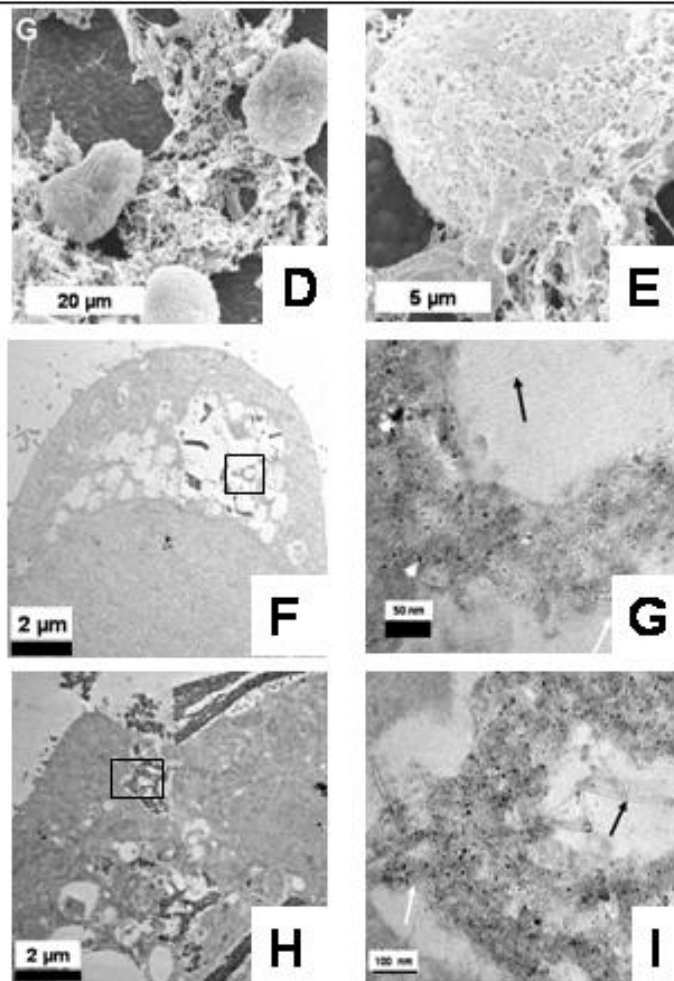
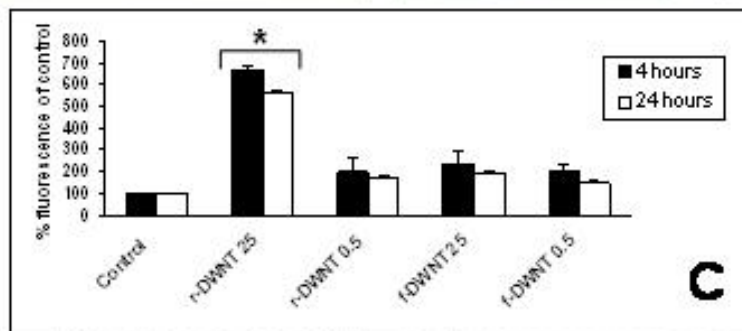
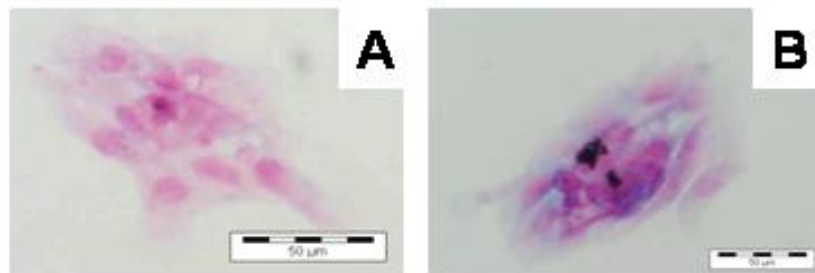


Figure 3

C. CONCLUSION

Les DWNTs sont dans nos conditions expérimentales toxiques pour les cellules des deux pôles de l'arbre respiratoire avec des effets concentrations et temps dépendant. Certains auteurs considèrent les cellules de lignées plus fragiles à l'exposition aux xénobiotiques que les cellules normales (shvedova et al 2009). Nos travaux ont été les premiers à montrer l'inverse, c'est-à-dire la plus grande sensibilité des cellules normales par rapport à des cellules de lignées à la présence des DWNTs. Cependant, les seuils précis de toxicité restent difficiles à déterminer à cause des capacités d'adsorption des NTCs qui gênent l'interprétation des tests colorimétriques même lorsque ceux-ci sont associés. Par ailleurs, plusieurs biais viennent perturber l'interprétation des résultats. Si la présence d'agrégats influe sur la toxicité et perturbe la transposition des résultats d'une étude à une autre il s'avère que ceux-ci sont inévitables y compris après sonication. L'obtention d'une solution homogène de NPs individuelles est un artifice de laboratoire. Les forces de Van der Waals présentes et inhérentes à leur constitution, existeront toujours y compris dans le milieu naturel pour favoriser la formation d'agrégats lors de forte concentration de NPs et en cas d'exposition humaine. Vouloir éliminer ce paramètre dans l'évaluation de leur toxicité *in vitro* équivaut à éliminer un paramètre de leur toxicité. D'autre part, comme l'ont souligné les derniers rapports des instituts de surveillance québécois et français, la spécificité des données de toxicologie d'une NPs ne sont pas transposables à une autre. Les caractéristiques physico-chimiques propres d'une NP interviennent dans la relation avec la cellule. Nos résultats sont donc valables pour les deux sortes de DWNTs et non pour les autres NTCs.

Il semble par contre de manière homogène entre nos résultats et ceux de la littérature que les cellules ne reconnaissent pas de manière spécifique ces matériaux et ne répondent pas ou répondent par des mécanismes de défense non spécifiques à leur contact. Si dans notre travail nous n'avons pas étudié les mécanismes de pénétration il semble que là aussi le blocage des différentes voies d'endocytoses n'aie pas d'influence sur leur pénétration apportant un argument supplémentaire pour parler d'une relation non spécifique NP/cellule (Kostarelos et al 2007).

III. Evaluation du comportement d'un implant BCP pour la reconstruction du septum nasal et la fermeture des perforations septales de grande taille chez le mouton

A. INTRODUCTION

Les résultats sur la réparation du septum nasal obtenus chez le lapin par l'implant BCP n'étaient pas suffisants pour proposer directement une utilisation chez l'homme. Nous avons utilisé un modèle animal de plus grande taille pour plusieurs raisons :

- se rapprocher au mieux de l'anatomie humaine,
- se rapprocher de la technique chirurgicale qui sera utilisée chez l'homme,
- augmenter la taille des perforations et la difficulté du challenge chirurgical de fermeture,
- travailler sur des lambeaux muco-périchondraux de taille supérieure à celle rencontré chez le lapin,
- assurer la reproductibilité des données *in vivo*.

Les données d'anatomie et d'histologie comparée montrent que le mouton est un modèle adapté. Le septum cartilagineux présente une épaisseur peu différente de celle de l'homme, une surface cartilagineuse permettant d'implanter un matériau dont la forme et la surface sera comparable à celle destinée à être utilisée chez l'homme. Les différents tissus constitutifs du septum nasal offrent les mêmes plans de dissection et permettent d'utiliser les mêmes techniques d'exposition que chez l'homme. Dans les deux modèles animaux utilisés, l'implant venait toujours combler le défaut cartilagineux. Chez le lapin, les berges de l'implant étaient mises en contact avec les berges de la zone de résection sans qu'il y ait au départ d'amorce muqueuse volontairement appliquée sur l'implant. Chez le mouton, l'implant a été positionné à l'intérieur de la loge septale. Les perforations mucopérichondrales centrées et d'une surface inférieure à celle de l'implant, permettaient de réserver une berge de tissus mous venant recouvrir la périphérie de ses faces latérales.

Les bords de l'implant étaient donc inclus dans la loge septale. Cette technique d'implantation permettait de se rapprocher de ce qui pourrait être la technique chirurgicale appliquée chez l'homme par voie externe de rhinoplastie.

Afin d'être comparable, la méthodologie utilisée pour l'analyse des résultats de fermeture des perforations et de la reconstruction tissulaire a été calquée sur celle utilisée chez le lapin. Chez cet animal, en raison de la faible cohésion entre l'implant et le nouveau revêtement muqueux, peu de données avaient été recueillies sur la colonisation de l'implant et son interface avec les tissus de couverture. D'autres techniques d'analyses histologiques (trichrome de Masson, pentachrome de Movat), immunohistochimiques (Ck 5-6, MUC5AC, Ki-67) et de microscopie électronique à transmission ont donc été associées, toujours dans le but de s'assurer de la restauration d'un épithélium fonctionnel, mais aussi pour obtenir ces données supplémentaires sur le degré de colonisation et ses caractéristiques.

B. ARTICLE

TITRE

La résorption des greffons cartilagineux en rhinoplastie : bases fondamentales.

Titre court

La résorption des greffons cartilagineux en rhinoplastie.

Auteurs : Ludovic de GABORY^{1,2}, Jean-Christophe FRICAIN², Dominique STOLL¹.

AFFILIATION :

¹ Service d'Otorhinolaryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, Centre F-X Michelet, Hôpital Pellegrin, place Amélie Raba Léon, F-33076 Bordeaux cedex, France.

² Unité mixte 577 Inserm/Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux, France.

Auteur correspondant :

Docteur de GABORY Ludovic,
Service d'Otorhinolaryngologie et Chirurgie Cervico-Faciale, Centre F-X Michelet, Hôpital Pellegrin, place Amélie Raba Léon, F-33076 Bordeaux cedex, France.

Tél : 05 56 79 56 79

06 83 70 72 06

Fax : 05 56 79 87 68

E-mail : ludovic.de-gabory@chu-bordeaux.fr

Demande de tirés à part : OUI

Nombre de pages du manuscrit : 17

RESUME

La résorption des greffons autologues cartilagineux du dorsum nasal est un problème qui concerne tous les rhinoplasticiens. Elle est évaluée entre 20 et 30 % du volume initial et survient chez certains patients sans que l'on puisse avoir d'attitude préventive. Le but de cet article était de faire le point, au travers d'une brève revue de la littérature, sur les données actuelles concernant la composition du cartilage septal, son processus de cicatrisation et les progrès de l'ingénierie tissulaire cartilagineuse afin d'adapter nos attitudes chirurgicales.

L'ingénierie tissulaire cartilagineuse ne peut pas encore fournir un cartilage septal de remplacement ayant la même composition moléculaire, les mêmes propriétés mécaniques évitant la résorption après implantation. Malgré certaines avancées, les problèmes à résoudre, laissent encore d'actualité les greffons cartilagineux autologues. Cependant pour éviter leur résorption et préserver le volume de nos greffons, il semble nécessaire d'éviter de les écraser pour ne pas compromettre la viabilité et la prolifération des chondrocytes. Découper le cartilage en dés millimétriques semble plus adapté mais reste insuffisant en raison des faibles capacités du cartilage à se réparer. Les envelopper dans un étui conjonctif avant leur mise en place, semble une solution élégante et efficiente à long terme pour assurer leur pérennité et harmoniser les contours et les irrégularités du dorsum.

Mots clés : septum nasal, cartilage septal, réparation cartilagineuse, greffons cartilagineux, ingénierie tissulaire.

ABSTRACT

The autologous cartilage graft resorption of the nasal dorsum is a problem which concerns all the rhinoplasticians. Their rate of resorption is evaluated between 20 to 30%. This loss of volume occurs at certain patients without one being able to adopt preventive attitude. The goal of this article was to take stock, through a short review of the literature, on the current data concerning the composition of the septal cartilage itself, its process of wound healing and of progress of cartilaginous tissue engineering to adapt our surgical technic.

Cartilaginous tissue engineering does not have yet the capacities to provide a septal cartilage of replacement with the same molecular composition, the same mechanical properties and without loss of volume after implantation. In spite of certain progress, the autologous cartilage grafts are always topically. However to avoid their resorption and to preserve the volume of our grafts, it seems necessary to avoid crushing them not to compromise chondrocyte viability and proliferation. To cut out of millimetre-length dices seems more adapted to preserve cellular viability but remains insufficient because of the low capacities of the cartilage to be repaired. Diced-cartilage wrapped with connective tissue seems an elegant and efficient solution in the long run to ensure their volume and to harmonize contours and the irregularities of the dorsum.

Key words : nasal septum, septal cartilage, cartilage repair, cartilage graft, tissue ingeneering.

INTRODUCTION

Les rhinoplasties et les septorhinoplasties sont dépendantes de l'utilisation de greffons cartilagineux autologues dont le cartilage septal et le cartilage auriculaire en sont les sources principales. Qu'ils soient prélevés pour combler une dépression sus-lobulaire ou pour simplement lisser les irrégularités du dorsum, leur devenir est parfois incertain. Effectivement leur pérennité est dépendante d'un phénomène de résorption imprévisible qui détériorera le résultat esthétique sur les mois ou les quelques années suivantes, sans que l'on puisse identifier de manière préventive les patients concernés. Ce degré de résorption a été évalué chez le lapin et montrait 7,6 % de perte de volume pour le cartilage costal, 23 % pour le cartilage auriculaire et 30 % pour le cartilage septal à 3 mois après implantation sur le dorsum nasal [1]. Il semble que l'écrasement des greffons soit un des facteurs prépondérant à l'origine de cette résorption en compromettant la viabilité et les capacités prolifératives des chondrocytes [2].

Le but de cette article était de faire le point au travers d'une brève revue de la littérature, sur les données actuelles dont nous disposons pour adapter nos attitudes et techniques chirurgicales en ce domaine à partir des connaissances sur la composition du cartilage septal proprement dit, sur son processus particulier de cicatrisation et des progrès récents de l'ingénierie tissulaire cartilagineuse.

METHODE

Les données bibliographiques ont été réunies à partir des bases de données PubMed et Medline (National Library of Medicine, U.S.A.). Seules les publications en langues française et anglaise ont été analysées. La période de recherche a débuté de 1975 à 2009. Les termes de recherche utilisés pour les stratégies d'interrogation ont été « nasal septum » and « cartilage »

or « hyalin cartilage », « nasal septum » and « cartilage » and « collagen » or « chondroitin sulfate » or « laminin » or « fibronectine », « nasal septum » and « cartilage transplantation », « nasal septum » and « plastic reconstructive surgery », « cartilage graft » and « tissue engineering » or « cartilage tissue engineering », « nasal septum » and « cartilage » and « biomechanics », « cartilage » or « encapsulation » and « polyelectrolyte complex membrane », « nose » and « cartilage repair », « nasal chondrocyte » and « cartilage repair ».

Chaque article sélectionné a été analysé selon les principes de la lecture critique de la littérature proposée par la Haute Autorité de Santé.

RESULTATS

1. COMPOSANTES DU CARTILAGE ET DU PERICHONDRE SEPTAL NORMAL

Le cartilage septal est un cartilage hyalin peu différent du cartilage articulaire au sein duquel les chondrocytes, seule composante cellulaire, sont entourés d'une matrice extracellulaire (MEC) à prédominance de collagènes, de laminines, de fibronectine et de GlycosAminoGlycanes (GAGs). Ces chondrocytes n'ont pas entre eux de contact direct et semblent répartis en 3 couches (Figure 1) [3]. A la périphérie, ils apparaissent plus nombreux, aplatis, plus petits et orientés parallèlement à la surface du cartilage. Au centre du cartilage, la densité des chondrocytes est la plus faible regroupant des cellules matures sphériques, vacuolisés, mesurant 20 µm de diamètre et alignés en colonnes, plus ou moins perpendiculaires à la surface. Entre les deux, existe une zone intermédiaire dans leur nombre et leur forme [3]. Ils ont un très faible index mitotique et sont à l'origine de la MEC.

Cette MEC est essentiellement constituée de 77,7 % d'eau, 7,7 % de collagènes, 2,9 % de GAGs par gramme de cartilage septal sec, contre respectivement, 65 à 75 % d'eau, 15 à 20 % de collagènes, 3 à 6 % de GAGs par gramme de cartilage articulaire sec. Par contre sa cellularité est supérieure d'environ 20 % par rapport au cartilage articulaire: 24,9 million *versus* 14 à 18 million de cellules par gramme de cartilage. Son contenu hydrique et collagénique ne varient pas quantitativement avec l'âge ce qui n'est pas le cas des GAGs (chondroïtines sulfates) qui diminuent d'environ 7,7 % par décade et de la densité cellulaire qui décroît de 7,4 % par décade [5].

Les protéoglycanes sont représentées principalement par la chondroïtine-4-sulfate. Elles sont présentes dans le cytoplasme des chondrocytes et dans leur microenvironnement périphérique. Par ailleurs, il existe un gradient de laminines décroissant de la périphérie des chondrocytes vers le centre du cartilage : elles sont présentes essentiellement dans le cytoplasme des chondrocytes et immédiatement autour de la cellule. Ces deux groupes de molécules sont absents au centre de la MEC. A l'inverse, l'immunomarquage de la fibronectine augmente de la périphérie vers le centre de la MEC et se localise dans le microenvironnement périchondrocytaire [6]. Les fibres de collagènes sont essentiellement de type II (90-95 %), mais aussi de type IX et XI, présentes à la fois en périphérie et au centre de la matrice [6, 7]. Popko et al retrouvaient un gradient de maturation des fibres de collagène de la périphérie vers le centre [3]. Ces fibres sont alignées perpendiculairement à la surface dans la partie centrale alors que les couches sous-périchondrales présentent des fibres parallèles à la surface venant entourer les chondrocytes immatures non vacuolisés [8]. Le collagène de type II est réparti sur toute l'épaisseur du cartilage avec quelques zones plus denses périphériques. Il n'y a pas, par contre de collagène de type I [3].

La porosité du cartilage articulaire natif est d'environ 78 %. Il semble que cette porosité soit dépendante de la cellularité mais, elle n'a pas été rapportée à notre connaissance dans la littérature pour le cartilage septal proprement dit. Le module d'élasticité du cartilage articulaire est de 0,79 MPa et sa résistance aux contraintes de cisaillement est de 0,68 MPa [9]. La résistance à la compression (module de Youngs) du cartilage septal natif est d'environ 15 N/mm² [10]. Dans cette étude, le point de rupture du cartilage septal a été calculé en déterminant le rapport de la force maximale administrée, divisée par la surface du piston. Elle était d'environ 5 N/mm². Pour Richmon et al, le module de compression du cartilage septal humain est de 0,7 MPa dans le sens antéro-postérieur, de 0,66 MPa dans le sens cranio-caudal et de 0,44 MPa dans le sens transversal [11].

Le périchondre septal de l'homme est fait d'une seule couche dense de fibres de collagène et élastique d'une épaisseur approximative de 150 à 200 µm chez des personnes âgées entre 68 et 87 ans [3]. Les fibres élastiques sont très éparses et l'essentiel du périchondre est constitué de collagène de type I. Il n'y a pas de collagène de type II. La zone de transition avec le cartilage n'est pas bien définie. Certains auteurs parlent d'unité fonctionnelle en raison du rôle du périchondre dans la résistance mécanique du septum [3].

Seul, sa résistance à l'étirement est en moyenne de 1370 g, couplé à la muqueuse elle est de 2340 g [12].

2) MECANISMES DE REPARATION DU CARTILAGE SEPTAL

Les chondrocytes dérivent des cellules souches mésenchymateuses pluripotentes, le périchondre servant de réservoir. Lors d'une lésion articulaire, les cellules mésenchymateuses migrent vers le site de cicatrisation afin de subir une différenciation médiée par les contraintes spatiales et temporelles biomécaniques locales [13, 14]. Cependant, que ce soit au niveau articulaire ou septal, les capacités de régénération du cartilage sont faibles. Pour le septum nasal, elles varient selon l'âge et le type de traumatisme. A 20 semaines post-opératoires, elle existe partiellement chez l'animal jeune (lapin de 4 semaines) alors qu'elle est inexistante chez l'animal adulte (lapins de 24 semaines). Lors d'un traumatisme chez l'animal jeune, les extrémités cartilagineuses des différents fragments perdent leur chondrocytes et leur matrice extra-cellulaire par action des macrophages et des cellules inflammatoires locales sur une zone de +/- 0.3 mm [8]. Par la suite, les zones cartilagineuses, à l'activité mitotique élevée, sont séparées des zones nécrosées par un trousseau fibreux conjonctif issue du périchondre (processus d'encapsulation). Dans l'espace laissé vide par la perte de substance, la régénération cartilagineuse est partielle. Dans le cas de multiples fragments, les différentes pièces cartilagineuses sont entourées d'une capsule fibreuse provenant du périchondre empêchant leur fusion, laissant des zones de faiblesses mécaniques notamment lors de la croissance (Figure 2) [8, 15]. Il est impossible chez l'animal d'obtenir la fusion des deux extrémités de cartilage septal dont l'une des parties a été retirée et remise immédiatement en place dans la loge septale, en présence des deux périchondres [8]. Ce faible pouvoir de coalescence existe aussi chez l'homme [16]. Dans les nez traumatiques, il se constitue un cal fibreux qui s'interpose entre les divers fragments fracturés, les engaine, épaisit le septum et maintient en position les différentes déformations (Figure 2). En pratique lors d'une septoplastie, il n'existe pas de néoformation cartilagineuse telle qu'on pourrait la voir pour l'os dans un foyer de fracture [15].

Cependant le périchondre est indispensable à la régénération cartilagineuse en cas de perte de substance [17]. Mais son rôle est ambivalent dans la prolifération et la cicatrisation du cartilage: la couche externe fibreuse marquant fortement le TGF β 1 (Transforming Growth Factor β 1) et le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2). Elle croît rapidement produisant une couche fibroblastique et conjonctive dense assurant la cohésion des différents éléments

cartilagineux mais empêchant leur fusion, alors que la couche interne au contact du cartilage fournit les chondroblastes assurant le renouvellement cartilagineux proprement dit [18].

3) PROGRES DE L'INGENIERIE TISSULAIRE CARTILAGINEUSE.

Les capacités propres de régénération du cartilage septal de l'adulte sont meilleures que celle du cartilage articulaire [19]. Plusieurs équipes ont essayé de produire du cartilage normal à partir de chondrocytes natifs issus du septum ou des pavillons auriculaires.

L'amplification de chondrocytes de septum nasal est possible en culture sur plastique mais les cellules subissent dès le premier passage un processus de dédifférenciation vers le phénotype fibroblastique [20]. Elles poursuivent leur synthèse de collagène de type II et de chondroïtine-4-sulfate mais dans une moindre mesure et associée à la synthèse de collagène de types I et III [21]. Plusieurs paramètres influencent la prolifération et la différenciation des chondrocytes : la densité cellulaire (effet paracrine) mais aussi la nature physico-chimique et la porosité du support [22-24]. Par analogie aux travaux réalisés pour le cartilage articulaire, plusieurs auteurs ont essayé différentes matrices de polymères biodégradables comme support de culture pour obtenir une redifférenciation des chondrocytes. Les matrices d'acide polyglycolique (PGA) n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats que sur plastique, parce que le cartilage néoformé était optiquement identique au cartilage natif mais avec une matrice extra-cellulaire en moindre quantité et de qualité médiocre : il contenait 40 fois moins de collagène et 30 fois moins de GAGs pour une cellularité supérieure [5, 20]. Rotter et al ont amplifié des chondrocytes humains de septum nasal sur un gel d'acide L-poly lactique et d'acide polyglycolique (PLA/PGA 10/90 %) puis implanté en sous-cutané chez la souris nude sans obtenir de meilleurs résultats [25]. Récemment Haisch et al à partir d'une matrice non tissée de PLA/PGAensemencée de chondrocytes humain septaux puis implanté 12 semaines chez la souris, ont obtenu un cartilage optiquement comparable à celui du septum natif avec les mêmes constantes mécaniques de compression et de point de rupture [9]. D'autres ont utilisé une matrice d'acide hyaluronique ou du verre bioactif 45S5, obtenant un cartilage optiquement normal mais sans quantification des composés de la MEC [26, 27]. D'autres équipes se sont intéressées à des supports d'agarose ou d'alginate [5, 28, 29]. Même en changeant de support, la MEC restait inférieure en qualité au cartilage natif : la quantité de GAG sulfatés (S-GAG) après 14 jours de cultures sur alginate était de 246 pg GAG/cellule soit 20 % de la proportion retrouvée dans le septum normal humain [5]. Malda et al ont utilisé une matrice de polyéthylène glycol téréphthalate/polybutylène téréphthalate et amplifié des

chondrocytes humains de septum pour n'obtenir qu'une MEC composée de seulement 288 µg de protéoglycanes/cellule soit encore 20 % de la teneur normale du cartilage [30]. Ainsi la première problématique pour l'ingénierie du tissu cartilagineux est d'obtenir une MEC de composition et aux propriétés mécaniques identiques à celles du cartilage natif. Cependant plus récemment Wu et al ont associé à la technique de culture des chondrocytes en multicouches une matrice d'ester hyaluronique pour fabriquer un cartilage alaire nasal de forme humaine [31]. Cette technique de culture faite à partir de chondrocytes isolés du cartilage auriculaire de lapin, permet d'obtenir une feuille multicouche de chondrocytes accompagnés de leur MEC, suffisamment solide pour être détachée du support et manipulée avec des pinces. Cette feuille est ensuite appliquée sur la trame d'ester hyaluronique et cultivée puis implantée 12 semaines en sous-cutané dans le dos du lapin. Le cartilage alaire ainsi obtenu garde sa forme et son épaisseur sans résorption mais son module de compression est plus faible que le cartilage auriculaire de lapin natif (0,7 *versus* 1,07) de manière significative. Par ailleurs le contenu en GAGs est aussi plus faible (85,67 *versus* 118,5) de manière significative. Cependant il s'agissait d'un cartilage ayant 70 % de GAGs dans sa MEC par rapport au cartilage d'origine dont était issus les chondrocytes [31].

La seconde problématique pour l'ingénierie tissulaire est la résorption cartilagineuse après implantation. En clinique, ce phénomène de résorption des greffons de cartilage septal autologues implantés en sous-cutané était déjà connu depuis longtemps. Évalué à 3 mois après implantation sur le dorsum nasal du lapin, le taux de résorption du cartilage costal était de 7,6 %, de 23 % pour le cartilage auriculaire et de 30 % pour le cartilage septal natif [1]. Plusieurs facteurs en sont responsables : le degré d'écrasement des greffons qui compromet la vitalité chondrocytaire, la faiblesse intrinsèque du cartilage à réaliser sa propre réparation, son faible pouvoir de coalescence et les phénomènes inflammatoires locaux [2, 7, 14]. En ingénierie tissulaire, ce phénomène de résorption a été observé lors de l'implantation *in vivo*, les processus cicatriciels locaux (notamment macrophagiques) provoquant une résorption complète même pour des implants réalisés avec des chondrocytes autologues [32, 33]. Pour palier à ce problème de résorption, certaines équipes ont donc voulu évaluer l'effet protecteur d'une encapsulation du greffon par mise en place d'une couche d'interposition protégeant sa face externe. Plusieurs auteurs ont utilisé de l'os bovin déminéralisé encapsulé avec un lambeau pédiculé de périchondre auriculaire qui a permis d'obtenir la formation de cartilage hyalin dans la majeure partie de la trame osseuse *in vitro* et *in vivo* [34, 35]. D'autres ont utilisé des membranes de polyélectrolytes montrant la préservation des dés de cartilage septal implanté chez la souris nude pendant 16 semaines [33]. Dans cette étude, les déchirures des

membranes d'encapsulation entraînaient les mêmes réactions inflammatoires que celle observées sur les implants non encapsulés, permettant une infiltration du type fibroblastique vers l'intérieur des implants.

Devant les résultats prometteurs de l'encapsulation en ingénierie tissulaire, certains rhinoplasticiens ont modifié leur choix dans la construction des greffons cartilagineux pour les rhinoplasties d'augmentation et les régularisations de dorsum. Ils drapent des dèes de cartilage (septal ou auriculaire) non écrasés dans une enveloppe de fascia limitant ainsi considérablement les phénomènes de résorption [36-38]. Récemment Calvert et al ont recherché les causes d'échec des patients sous corrigés lors des augmentations de hauteur du dorsum nasal par un greffon de cartilage septal en comparant des greffons découpés en dèes seuls à ceux entourés de surgicel ou de fascia temporal. Ils ont montré chez 27 patients la meilleure vitalité des greffons encapsulés par du fascia temporal que celle observée lors de l'encapsulation par du surgicel® ou non encapsulé [15].

La troisième problématique de la cicatrisation cartilagineuse et de l'ingénierie tissulaire est l'intégration du cartilage néoformé au cartilage natif. Il est impossible chez le même animal d'obtenir la fusion après section, de deux extrémités de cartilage septal en présence des deux périchondres [7]. Récemment Pabbruwe et al ont utilisé *in vitro* une matrice de collagèneensemencée de chondrocytes de septum nasal bovin prise en sandwich entre deux morceaux de cartilage septal. Après 40 jours de culture il existait une migration réciproque des chondrocytes vers les différents compartiments et une fusion cartilagineuse des différentes pièces [39].

CONCLUSION

Beaucoup de problèmes restent encore à résoudre avant de pouvoir bénéficier d'un cartilage de remplacement fourni par l'ingénierie tissulaire maintenant toute l'actualité sur les greffons cartilagineux autologues. Cependant pour éviter leur résorption et préserver le volume de nos greffons, il semble nécessaire d'éviter de les écraser. Le morcellement en cubes millimétriques semble plus adapté à la préservation de la viabilité et de l'activité proliférative des chondrocytes. Les envelopper dans un étui conjonctif avant leur mise en place semble une solution élégante et efficace à long terme pour assurer leur pérennité et harmoniser les contours et les irrégularités du dorsum.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Lattyak BV, Maas CS, Sykes JM. Dorsal onlay cartilage autografts. *Arch Facial Plast Surg* 2003;5:240-43.
2. Cakmak O, Buyuklu F, Yilmaz Z, et al. Viability of cultured human nasal septum chondrocytes after crushing. *Arch Facial Plast Surg* 2005;7:406-9.
3. Popko M, Bleys R, de Groot JW, Huizing EH. Histological structure of the nasal cartilages and their perichondral envelope. I. The septal and lobular cartilage. *Rhinology* 2007;45:148-52.
4. Erkhan G, Tan Ergin N, Bilezikçi B: Comparison of suture and nasal packing in rabbit noses. *Laryngoscope* 2004;114:639-45.
5. Homicz MR, McGowan KB, Lottman LM, et al. A compositional analysis of human nasal septal cartilage. *Arch Facial Plast Surg* 2003;5:53-8.
6. Üstünel I, Çayli S, Güney K, et al. Immunohistochemical distribution patterns of collagen type II, chondroitin-4-sulfate, laminin and fibronectine in humannasal septal cartilage. *Acta Histochem* 2003;105(2):109-14.
7. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage:tissue design and chondrocytes-matrix interactions. *AAOS Instructional Course Lectures* 1998;47:477-86.
8. Verwoerd-Verhoef HL, ten Koppel P, van Osch G, et al. Wound healing of cartilage structures in the head and neck region. *Int J Ped Otorhinolaryngol* 1998;43:241-51.
9. Armstrong CG, Mow VC. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration and water content. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64:88-94.
10. Haisch A, Duda GN, Schroeder D, et al. The morphology and biomechanical characteristics of subcutaneously implanted tissue-engineered human septal cartilage. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005;262:993-7.
11. Richmon JD, Sage A, Van Wong W, et al. Compressive biomechanical properties of human nasal septal cartilage. *Am J Rhinol* 2006;20(5):496-501.
12. Kim DW, Egan KK, O'Grady K, Toriumi DM. Biomechanical strenght of human nasal septal lining: comparison of the constituent layers. *Laryngoscope* 2005;115:1451-53.
13. Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 2005;36(Suppl 3):S8-S12.

14. Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound healing. An Overview. *Otolaryngol Clin North Am* 1995;28:847-64.
15. Kaiser ML, Karam AM, Sepehr A, et al. Cartilage regeneration in the rabbit nasal septum. *Laryngoscope* 2006;116:1730-34.
16. Calvert JW, Brenner K, DaCosta-Iyer M, et al. Histological analysis of human diced cartilage grafts. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:230-6.
17. Ten Koppel PG, van Osch GJ, Verwoerd CD, Verwoerd-Verhoef HL. A new in vivo model for testing cartilage grafts and biomaterials: the 'rabbit pinna punch-hole' model. *Biomaterials* 2001;22(11):1407-14.
18. Dyunstee ML, Verwoerd-Verhoef HL, Verwoerd CD, Van Osch GJ : The dual role of perichondrium in cartilage wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2002;110(4):1073-79.
19. Kafienah W, Jakob M, Démarteanu O, et al. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Engineering* 2002;8(5):817-26.
20. Homicz MR, Schumacher BL, Sah RL, Watson D. Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineered neocartilage composition. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;127:398-408.
21. Mayne R, Vail M, Mayne PM, Miller EJ. Changes in the type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:1674-78.
22. Miot S, Woodfield T, Daniels AU, et al. Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition. *Biomaterials* 2005;26(15):2479-89.
23. Malda J, Woodfield TB, van der Vloodt F, et al. The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on the composition of tissue engineered cartilage. *Biomaterials* 2005;26(1):63-72.
24. Moroni L, Hendriks JA, Schotel R, et al. Design of biphasic polymeric 3-dimensional fiber deposited scaffolds for cartilage tissue engineering applications. *Tissue Eng* 2007;13(2):361-71.
25. Rotter N, Aigner J, Naumann A, et al. Cartilage reconstruction in head and neck surgery : comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mater Res* 1998;42:347-56.
26. Naumann A, Aigner J, Staudenmaier R, et al. Clinical aspects and strategy for biomaterial engineering of an auricle based on three-dimensional stereolithography. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260(10):568-75.

27. Asselin A, Hattar S, Oboeuf M, et al. The modulation of tissue-specific gene expression in rat nasal chondrocyte cultures by bioactive glass. *Biomaterials* 2004;25(25):5621-30.
28. Aulthouse AL, Beck M, Griffey et al. Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In vitro Cell Dev Biol* 1989;25:659-68.
29. Benja PD, Schaffer JD. Dedifferentiation chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1978;30:215-24.
30. Malda J, Kreijveld E, Temenoff JS, et al. Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifférentiation. *Biomaterials* 2003;24(28):5153-61.
31. Wu W, chen F, Feng X, et al. Engineering cartilage tissues with the shape of human nasal alar by using chondrocyte macroaggregate-Experiment study in rabbit model. *J Biotech* 2007;130:75-84.
32. Rotter N, Haisch A, Bücheler M. Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005;262:539-45.
33. Haisch A, Gröger A, Radke C, et al. Macroencapsulation of human cartilage implants: pilot study with polyelectrolyte complex membrane encapsulation. *Biomaterials* 2000;21:1561-66.
34. Verwoerd-Verhoef HL, ten Koppel PGJ, van Osch GJVM, Verwoerd CDA. Induction in vivo of cartilage grafts for craniofacial reconstruction. *Am J Rhinol* 1998;12:27–31.
35. Pirsig W, Bean JK, Lenders H, et al. Cartilage transformation in a composite graft of demineralized bovine bone matrix and ear perichondrium used in a child for the reconstruction of the nasal septum. *Int J Ped Otorhinolaryngol* 1995;32:171–81.
36. Daniel RK, Calvert JW. Diced cartilage grafts in rhinoplasty surgery. *Plast Reconstr Surg* 2004;113:2156–71.
37. Kelly MH, Bulstrode NW, Waterhouse N. Versatility of diced cartilage-fascia grafts in dorsal augmentation. *Plast Reconstr Surg* 2007;120:1654–59.
38. Guerrerosantos J, Trabanino C, Guerrerosantos F. Multifragmented cartilage wrapped with fascia in augmentation rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:804–12.
39. Pabbruwe MB, Esfandiari E, Kafienah W, et al. Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials* 2009;30:4277-86.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : cartilage septal de lapin.

Microscopie optique grossissement x4, coloration H.E.S. MEC= Matrice extra-cellulaire. Su=couche superficielle dans laquelle les fibres de collagènes sont parallèles à la surface entourant des chondrocytes immatures. P= périchondre. C=chondrocytes matures vacuolisés. SM=sous-muqueuse (photo de Gabory©). L'épaisseur de la muqueuse est de $37,5\pm 0,4 \mu\text{m}$, du périchondre de $13,5\pm 3,9 \mu\text{m}$ et du cartilage de $455\pm 161,3 \mu\text{m}$ [4].

Figure 2: réparation du septum nasal chez le mouton 45 jours après ablation d'un fragment cartilagineux.

Microscopie optique, barre d'échelle 1000 μm , (A,B) coloration H.E.S. grossissement x2, (C) coloration au trichrome de Masson, grossissement x10. Les flèches blanches montrent le processus de lyse du moignon cartilagineux malgré la présence du périchondre, l'absence de coalescence des fragments cartilagineux et le processus d'encapsulation. La coloration verte au trichrome de Masson montre la nature conjonctive de l'encapsulation dont le type de fibre est différent du tissu conjonctif de la matrice extra-cellulaire (MEC) cartilagineuse. C= Cartilage septal, Ep=Epithélium respiratoire, ss-muq=sous-muqueuse, Vx=Vaisseaux, P= périchondre.

FIGURE 1

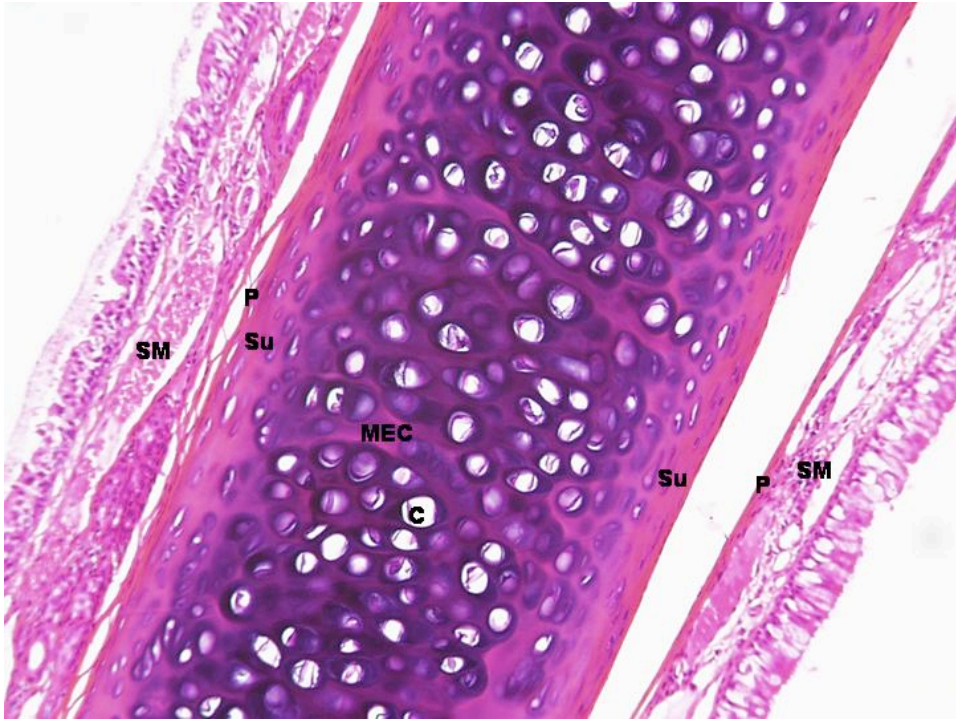
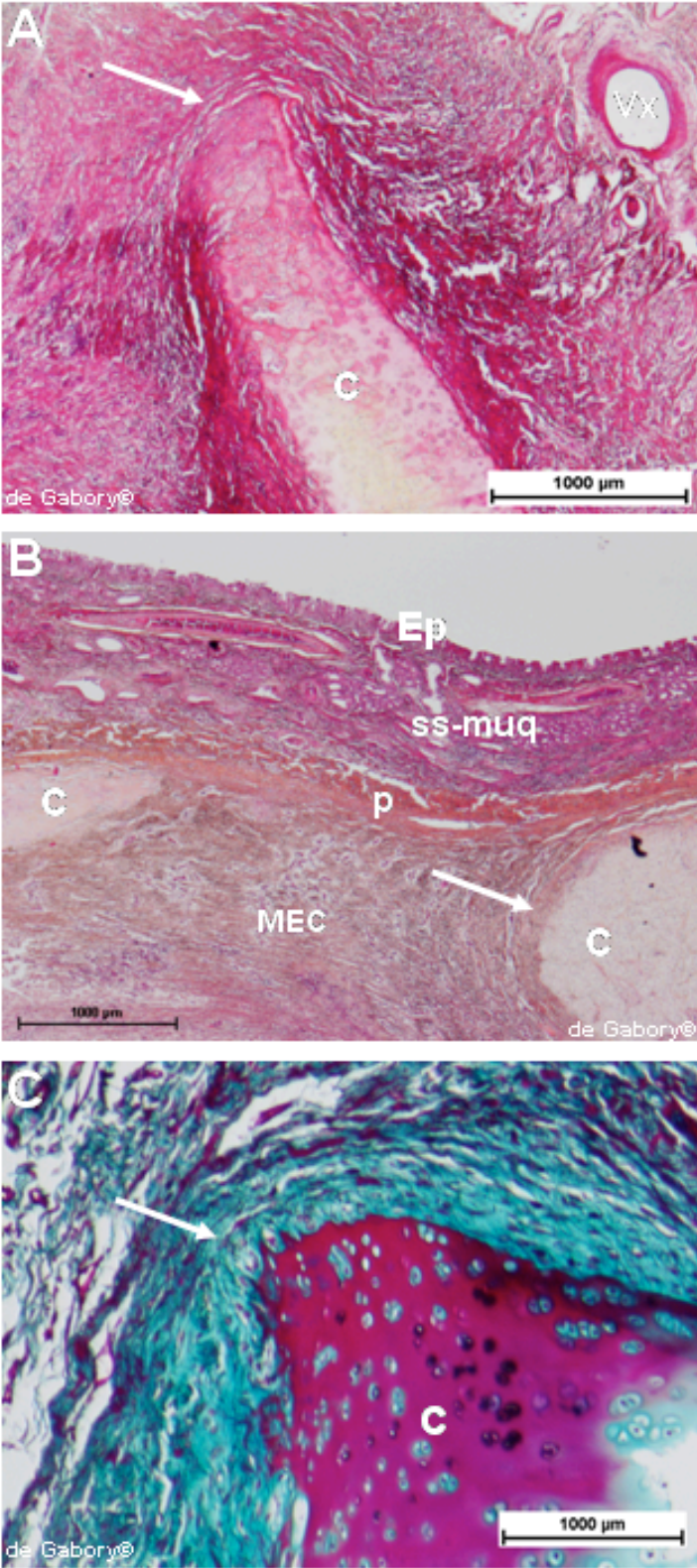


FIGURE 2



Assessment of Biphasic Calcium Phosphate to Repair Nasal Septum defects in sheep

^{1,2} Ludovic de GABORY, M.D., ³Samantha DELMOND, ⁴Colette DEMINIÈRE, M.D., ² Dominique STOLL, M.D., ^{1,3} Laurence BORDENAVE, Ph.D., M.D., ¹ Jean-Christophe FRICAIN, Ph.D., D.D.S.

¹ Unité 577 INSERM/Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo- Saignat, F-33000, France.

² Department of Otorhinolaryngology, University Hospital of Pellegrin, F-X Michelet Center, place Amélie Raba-Léon, F-33076, France.

³ CIC-IT University Hospital of Bordeaux/INSERM, Av du Haut-Lévêque, F-33604, France

⁴ Pathology Department, Pellegrin Hospital, place Amélie Raba-Léon, F-33076, France.

Meeting:

Sixth congress of International Francophone Society of Otorhinolaryngology, 14-16 May, 2010 Beirut, Lebanon.

Contribution:

Analysis: L de Gabory, S Delmond, C Deminière, JC Fricain

Data Interpretation: L de Gabory, JC Fricain, L Bordenave

Drafting: L de Gabory, JC Fricain

Revision: L de Gabory, JC Fricain, D Stoll.

Corresponding author:

Ludovic de GABORY, MD

Unité 577 INSERM/Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, F-33076, Bordeaux Cedex, France.

Phone number: (33) 5 57 57 17 54, (33) 6 83 70 72 06, Fax number: (33) 5 56 90 05 17,

Email: ludovic.de-gabory@chu-bordeaux.fr

Financial sources:

The study was funded by the French College of Otorhinolaryngology and Head Neck Surgery, and by the "Gueules-cassées" foundation.

Disclosure:

No authors have any financial interests in this research project or in any of the techniques or equipment used in this study.

ABSTRACT

BACKGROUND: Saddle nose and septal perforations are one of the most surgical challenge in nasal reconstruction. They require important volume of autologous graft and complexe surgical procedure. The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of biphasic calcium phosphate (BCP) implant in nasal septum and its abilities to repair septal perforation.

MATERIALS and METHOD: 30 sheeps underwent anterior nasal septum perforation. Only 20 septa were repaired with implant exposed to nasal content on bilateral (group 2) and unilateral (group 3) side. After 45 days of spontaneous cicatrisation, the surface of new airway mucosa covering implants and rate of closure were evaluated macroscopically. Light microscopy, histomophometry, immunohistochemistry and transmission electron microscopy were performed to assess soft tissue growth and differentiation. Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney test.

RESULTS: The mean rate of mucoperichondrial flap recovery of the implant was 66 % in group 2 and 82 % in group 3, and was significantly different from the control group ($p < 10^{-4}$). The mean rate of closure was 32 and 64 % respectively ($p < 10^{-3}$). The thickness of the perichondrium was greater than control on both sides ($p < 10^{-4}$). Vascularized soft tissues and bone formation invaded pores of implants. No pathological inflammation was observed in sub-mucosa. Moderate or well differentiated newly formed epithelium were the most frequent types observed with good correlation between immunostainings and morphologic features.

CONCLUSION: These data suggest a good biocompatibility of BCP and its ability to repair nasal septum in sheep.

KEYWORDS: hydroxyapatite, biocompatibility, nasal septum, saddle nose, biphasic calcium phosphate.

1) INTRODUCTION

Saddle nose and septal perforations are one of the most challenging deformities and functional consequences in any septoplasty and rhinoplasty surgery.¹⁻³ Saddle nose requires sometimes a large volume of replacement tissue when septal skeleton is absent or unusable.⁴⁻⁹ To date, autogenous iliac, calvarial bone and rib cartilage have been used.^{4-9,10-12} Septal perforation requires an autogenous or artificial underlying layer and bilateral mucosal flaps.^{3,13-19}

In both cases, various synthetic materials have already been used. No data is available in the literature concerning the interface between the implant and the respiratory mucosa, certain are not integrated by the soft tissue, other are too flexible, and none of these materials has been used to replace the septal cartilage entirely.²⁰⁻⁴²

In a recent study, we provided the first in vitro and in vivo data concerning the cyto and biocompatibility of BCP implant with nasal respiratory epithelium.⁴³ We showed that HA could be used to close septal perforations in rabbit. However, before using BCP implant in human, a new evaluation in a preclinical animal model similar to human is necessary. We therefore used sheep because the surgical procedure and a size of defect are similar to those in human.

The aim of this study was to assess the biocompatibility of BCP in contact with nasal mucosa and its ability to repair critical septal perforation without mucosal flap in sheep.

2) MATERIALS

2.1) BCP Samples

Macroporous ceramic implants were provided by Kasios© (Z.I. La Croix, Launaguet, France, www.kasios.com). Implants were 30 millimeters long, 20 millimeters wide and 2.8 millimeters thick (Figure 1, left). They were composed of 75% hydroxyapatite and 25% β -tricalcium phosphate. Mean rate of porosity was 70%. Pore size varied from 200 to 500 micrometers (μm) with a mean value of 400 μm . All the implants were autoclaved (120°C, 20 min).

2.2) Animals

Three groups of 10 adult female French sheep (mean age 3 years) weighing between 50 to 70 Kg were used. They were cared for according to the European Guidelines for the care and use of laboratory animals (directive 24/11/86, 86/609/CEE). Recommendations for surgical procedures concerning animal implantation were respected.⁴⁴ None had any nasal symptoms and the nasal septa were intact. All surgical procedures were carried out in the DETERCA Laboratory, (University Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat F-33076, France).

3) METHODS

3.1) Anesthetic and surgical procedure

Anesthesia was initiated by an intravenous injection of acepromazine maleate (2.5 mg/10 Kg, Vetoquinol© Laboratory, France) and ketamine hydrochloride (20 mg/Kg). A venous line was set up on the ear. Subsequently, the sheep were intubated and connected to an inhalation ventilator with a constant volume of mixture of nitrous oxide, isoflurane and oxygen. General anesthesia was obtained with sodium pentobarbital (3 mg/kg Sanofi Animal Health® Laboratories, France).

The snout was shaved and prepared with polyvidone-iodine. The nasal septum was approached via a sagittal incision along the nasal bridge and columella (Figure 1, right). The nasal dorsum was exposed and sub-perichondrial level was reached between the superior lateral cartilage and septal cartilage. In the control group, a 3 cm² septal perforation was made with a specially designed pattern. The cartilage defect was not filled up by the implant and the perforation edges were not sutured in order to know whether the septal perforation would close spontaneously without recourse to reconstruction. In the two other groups, a specially designed pattern (6 cm²) was used to remove the septal cartilage over the same surface area as the implant. Next, a mucoperichondrial perforation was made with a second specially designed pattern (3 cm²), so that the surface of each mucoperichondrial perforation represented half of the surface of the implant. In group 2, this perforation was made on both sides of the implant. In group 3, only one perforation was made on the left side, the other side remaining intact. Thus, half of one or two faces of the implant were in contact with the content of the nasal cavities. Hemostasis was performed with electric cauterization. The cartilage defect was filled by the implant in order to

have the thickness of the implant in close contact with the cut end of the cartilage. The implant was fixed with four non-resorbable 4/0 sutures to the cartilage and to the mucoperichondrial flap in order to create a stable reconstruction and close contact between the lateral faces of the implant and perichondrium. Thus, on the side of the perforation, the lateral faces of the implant were covered by a 5 mm peripheral area. Subsequently, the perichondrium and superior lateral cartilage were fixed by 4/0 Vicryl© suture onto the upper rim of the septal cartilage. The periosteum, subcutaneous and skin level of the surgical approach were closed by 3/0 Vicryl© sutures. No nasal packing or nasal splint were used in the nasal cavity. All sheep received one intravenous gentamycin injection to prevent post-surgical infection. To reduce pain after surgery, all sheep received morphine for 2 days postoperatively.

3.2) Morphologic analyses

After an implantation period of 45 days, the sheep were sacrificed by venous injection of pentobarbital sodium after premedication. Next, all septa were resected en bloc with their insertions on palate and nasal bones. Both sides of the specimen were photographed with a scale positioned at the same level to the surface of the residual perforations. For each animal, the surface of the residual perforation was assessed (NIS-Elements AR 3.00, SP7 Hotfix8©, Nikon imaging software). Next, the rate of mucoperichondrial flap cover (peripheral area and newly formed flap) was assessed on the basis of the difference between the total surface of side of the implant and the surface of residual perforation. In group 2, both sides were

considered to assess this value. In the last group, only the perforated side was included in the calculation. Finally, the mean percentage surface of the implant covered by the flaps and the rate of closure considering only the perforation was calculated for each group (mean values \pm standard deviation).

3.3) Histological evaluation

All specimens were fixed in 10 % formalin solution for at least 48 h. The samples were partially decalcified to avoid the artifacts of cuts and the disunion between soft tissues and the implant. Formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks were prepared. The samples were cut horizontally in 5 μ m serial sections. These sections were mounted on glass slides pre-treated with acid alcohol. For each animal in the implanted groups, half of the sections were stained with hematoxylin–eosin and safran (HES), Masson trichrome and Movat pentachrome to examine morphologic tissue modifications. The other parts were dried, deparaffinized in xylene and rinsed in 100 % ethanol to be used for immunostaining.

Each specimen was examined by covering tissues under light microscopy (Eclipse 80i, Nikon Co.). Mucosal inflammation was recorded as present or absent. Mucosal damage was regarded as the loss of pseudostratified columnar epithelium and replacement of this epithelium with transitional epithelium or epidermoid metaplasia. To evaluate the thickness of the epithelium, sub-mucosa, perichondrium, and implant, histomorphometric analyses were performed using a computer-based image analysis technique (NIS-Elements AR 3.00, SP7 Hotfix8©, Nikon imaging software). Quantitative measurements were performed on two different sections, with 10 measurements per section over a distance of 2000 μ m and on each side of the implant (mean value \pm standard deviation).

3.4) Immunohistochemical staining

Epithelial differentiation was evaluated as previously described⁴³ by detecting the immunostaining of cytokeratin (CK) 5-6, 7, 34 β E12, the glycoprotein Ulex European Agglutinin One (UEA-1) and MUC5AC respectively. Immunolabeling protein Ki-67 was evaluated to assess proliferative index in new covering epithelium.

Ten successive light microscopic fields (magnification x10) were observed in two different areas of newly formed mucoperichondrial flap. Proliferative index was obtained by the ratio between the number of immunopositive cells for Mib-1 antibody and the total number of cells determined by counting the nuclei in two microscopic fields at magnification x40.

3.5) Transmission electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), samples were prepared as the method previously described.⁴⁵ Ultrathin sections were observed in a FEI – Tecnai12- 120KV (FEI-Eindhoven-The Netherlands). Morphological features of the apical side of the epithelium were observed to analyze mucous and ciliated differentiation, and the quality of the epithelial barrier (tight junction, desmosomes).

3.6) STATISTICAL ANALYSIS

The nonparametric unpaired U Mann-Whitney test was used. A p value less than .05 was considered as statistically significant (Statel© software, Adscience Society, France, www.adscience.fr).

RESULTS

1) Morphologic analyses

The control group did not show any pathologic secretion, crust or epistaxis in the nasal cavities. Only two sheep in group 2 and two sheep in group 3 had an abscess due to the surgical approach seven days postoperatively. They were treated by a second surgical procedure under general anesthesia and intra-muscular antibiotic cover during one week, after which nasal endoscopy control showed the non-infected implant to be correctly positioned. After 5 days, these animals had nasal itching and their behavior led to a fracture and dislocation of the implant. They developed a supra-lobular depression. Only one of them had a moderate mucopurulent rhinorrhea at the end of the study. Other implanted sheep had no rhinologic sign throughout the study. All animals completed the 45-day observation period and were included for statistical analysis.

In control group, the mean rate of closure was 15 ± 4 % (Fig. 2, *above left*, Fig. 3). In group 2, the mean rate of mucoperichondrial flap covering the both sides of the implant was 66 ± 8.6 % (Fig. 2, *above middle and right, below left*, Fig. 3). In group 3, the non-perforated side was macroscopically normal without any sign of extrusion or tissue suffering. The mean rate of soft tissue covering the perforated side was 82.2 ± 10.4 % (Fig. 2, *below middle and right*, Fig. 3). These values were significantly different between each implanted group and the control group ($p < 10^{-4}$), and between both implanted groups ($p < 0.05$) (Fig. 3). Finally, considering only perforation, the mean rate of closure was 32.2 and 64.4 % in group 2 and 3, respectively ($p < 10^{-3}$).

2) Histomorphometric analyses

In the control group, the thickness of the epithelium, sub-mucosa and perichondrium was $120 \pm 22 \mu\text{m}$, $1350 \pm 419 \mu\text{m}$, and $498 \pm 134 \mu\text{m}$, respectively (Fig. 4). The newly formed respiratory epithelium was pseudostratified with the same morphologic aspects and cellular types than in human. There was no significant difference in epithelial and sub-mucosa thickness between the control and implanted groups. There was no increase in the number and size of the submucosal glands (Fig. 5, *above left*). On the other hand, the perichondrium was thicker on both sides of the implant than in the control group ($p < 10^{-4}$). In group 3, there was a significant difference in the thickness of the perichondrium between the newly formed perichondrium and the non-perforated side ($p < 10^{-2}$). The thickness of the implant decreased by 14.7 % ($2893 \pm 40 \mu\text{m}$ versus $2466 \pm 169 \mu\text{m}$ 45 days after) ($p < 10^{-5}$).

3) Microscopic analyses

No pathological inflammatory infiltration was evidenced in the implant and soft tissues. Most of the spaces were occupied by connective tissue consisted of fibroblast-like cells surrounded by collagen fibrils and a vascular network (Fig. 5, *below middle and right*). This invasion came arose from the perichondrium. Bone formation was observed in half of the animals and extended over the whole thickness of the implant (Fig. 5, *above*). It progressively constituted a trabecular bone network over one third of the material volume. The active bone formation surfaces were marked by osteoblasts lying immediately against the osteoid seam. They were stained deep purple and organized in palisades (Fig. 5, *below middle*). Osteocytes were found within the mineralized matrix. The mean thickness of bone formation was $63.8 \pm 32.6 \mu\text{m}$.

The interface between the perichondrium and implant showed cartilage formation in a third of the animals (Fig. 5, *above left*). It was visibly identical to the normal septal cartilage within a similar spatial organization and different degree of chondrocyte maturation embedded in the extra-cellular matrix.

The areas of active healing process showed an epithelial gradient of differentiation from the edges of perforation outwards (Fig. 6, *above left*). All steps in the epithelial differentiation process were observed. Large areas with extensive well differentiated epithelium were observed wherever the perforations were almost totally closed by the mucosa (Fig. 6, *above right, below left and middle*).

Epidermoid metaplasia was mainly localized at the edges of perforation and a few areas above the implant (Fig. 6, *above left and middle*). This metaplasia had positive cytokeratin 5-6 immunostaining and negative cytokeratin 7 immunostaining (Fig. 6, *above middle*). On the other hand, cytokeratin 5-6 immunostaining was negative in moderate and well differentiated areas. For cytokeratin 7, immunostaining was more uncertain even in well differentiated respiratory epithelium. Strong CK 903 immunostaining remained positive, whatever the degree of differentiation observed (Fig. 6, *below left*). The UEA-I staining disappeared in the areas of extensive hyperplasia. Even with a weak degree of differentiation, it remained positive in the epithelium and sub-mucosal gland at the apical side of the epithelial cells when microvilli or ciliated cells were observed (Fig. 6, *above right*). The mucous feature was highlighted by a strong staining of acid secretions by blue alcian and accurate MUC5AC immunostaining only in the apical side of cylindrical cells (Fig. 6, *below middle*). This staining was positive only in well differentiated areas and in the sub-

mucosal gland. The proliferative index ranged between 2 and 8 % of cells in epithelium and sub-mucosa.

TEM magnifications clearly showed an epithelial pseudostratification, goblet, non-ciliated and ciliated cells (Fig. 6, *below right*). Total ciliated differentiation was visible on small areas of 5 or 6 cells per field. The lateral side of the cells clearly showed a tight junction and desmosomes (Fig. 6, *below right*).

DISCUSSION

This experiment demonstrates that BCP implant was able to replace septal cartilage and to close septal perforation without reconstruction, even if its sides were exposed to nasal airflow and the septic content of the nasal cavities. To date, several autogenous connective scaffolds have already been used to repair septal perforation: fascia temporal,^{13,14} auricular conchal cartilage,^{3,15,16} auricular conchal cartilage plus retroauricular skin,¹⁷ rib cartilage,³ mastoid bone,^{14,18} skin,¹⁹ and bioactive glass S53P4.⁴⁶ The choice of most of these materials is not based on any proof. These grafts or material require bilateral mucosal flaps. However, these flaps already have collagen underlying the extracellular scaffold in the form of a basal membrane constituted by collagen IV and sub-mucosa with collagen I.⁴⁷ This addition cannot explain the increase in rate closure.

Lee et al showed the capacities of an autogenous dermal graft to close a septal perforation without mucosal flap.⁴⁸ Total and partial closure were obtained but the newly formed epithelium was an epidermoid feature and few animals and patients were concerned. It is well known that the extracellular matrix plays an important role in cellular differentiation.⁴⁹

Our protocol was designed to mimic the worst experimental conditions of healing. This is probably why the perforations were incompletely closed and why there was a significant difference between the percentage of closure in the groups with bilateral and unilateral mucoperichondrial perforations. Unlike the rabbit model, the implant was always covered by a newly formed mucoperichondrial flap on both sides.⁴³ Moreover, snout movements probably interferes with the healing process, creating shear stress at the interface between the implant and the newly formed mucoperichondrial flap. The size of the perforations was greater than previously used in rabbit and the duration of our study was probably insufficient to observe total closure.

In our study, the perichondrium seemed to be the source of healing because it clearly penetrated with vascular tissue in pores of material. It was the only layer showing an increase thickness during the repair process. It was the first layer covering the material at the edge of perforation. Colonization of network pores probably plays an important role in the capacity of the wound edge to spread on BCP and in the differentiation stimuli. Furthermore, our implants were not coated in fibronectin, collagen or any other protein layer promoting epithelial growth, and differentiation. It is well known that synthesis of the extracellular matrix supports proliferative and differentiation process during the repair of respiratory epithelium.⁴⁹⁻⁵¹ While defect size could be the key factor explaining why no perforation was totally closed, the performance of our implants could be improved by using tissue engineering. Moreover, it provided a cartilage synthesis in adult animals which it is not normally observed in this localization.⁵² Perichondrium is known to be a reservoir of mesenchymal cells,⁵³ but its capacity to repair septal cartilage is low.^{52,54}

BCP ceramics provides a good scaffold for osteogenesis but are known not to induce bone formation.^{55,56} However, some cases of bone formation have been observed when the implantation was performed in specific conditions.⁵⁷⁻⁶⁰ Here we evidenced bone formation in a localization without bone contact. This osteogenesis is probably due to osteogenic progenitor cells content in blood circulation and bringing to the site of implantation, by the postoperative hematoma and vascular ingrowth.^{61,62}

BCP implant has not previously been used in this indication. The new mucosa covering the BCP showed the same microscopic morphologic features as the respiratory epithelium observed in normal sheep nasal septum. It suggests that the newly formed epithelium forms an impervious functional barrier.⁴⁵

The pattern of human cytokeratins is well known but no data are available concerning respiratory epithelium in sheep, except for UEA-I.⁶³⁻⁶⁵ The unreliability we obtained with CK 7 seems in keeping with the antibody used and differences in epitope interspecies between human, rabbit and sheep. On the contrary, the persistent immunocytostaining of CK 34 β E12 and the positive staining of CK 5-6 in epidermoid metaplasia provides strong evidence for the epithelial origin of the cells. The persistent staining of UEA-I and MUC5AC provides an additional argument for the conservation of the epithelial and respiratory phenotype on BCP.⁶⁶⁻⁶⁸ Ck 7, MUC5AC and UEA-I disappeared in epidermoid, metaplasia and hyperplasia areas, respectively, but this cell behavior is already known in the normal healing process in nasal epithelium.^{64,66-68}

CONCLUSION

BCP scaffolds implanted in nasal septum perforations in sheep are biocompatible and seem suitable for closing septal perforation. We are currently assessing BCP implants in a prospective clinical pilot study to repair saddle nose deformities in human when the septal skeleton is absent or unusable.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the French college of Otorhinolaryngology and the “Gueules-cassées” Foundation. The authors would like to thank Dr Colette Deminiere for assistance with pathologic analysis, Dr Ray Cooke for linguistic assistance, and the Kasios© company for providing the biomaterial. The microscopy was done in the electronic microscopy facility at the Bordeaux Imaging Center –University of Bordeaux 2. The help of Mrs Sabrina Lacomme and Mr Etienne Gonthier is acknowledged.

REFERENCES

1. Daniel RK. Rhinoplasty: Septal saddle nose deformity and composite reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119(3):1029-1042.
2. Cogswell LK, Goodacre TE. The management of nasoseptal perforation. *Br J Plast Surg*. 2000;53:117-20.
3. Schultz-Coulon HJ. Three-layer repair of nasoseptal defect. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132:213-218.
4. Riechelman H, Rettinger G. Three-step reconstruction of complex saddle nose deformities. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;130:334-338.
5. Paris J, Facon F, Thomassin JM. Saddle nose surgery: Long term aesthetic outcomes of support grafts. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. 2006;127(1-2):37-40.
6. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;329:300-309.
7. Zijdeveld SA, ten Bruggenkate CM, van Den Bergh JP, Schulten EA. Fractures of the iliac crest after split-thickness bone grafting for preprosthetic surgery: Report of 3 cases and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(7):781-786.
8. Cervelli V, Bottini DJ, Gentile P et al. Reconstruction of the nasal dorsum with autologous rib cartilage. *Ann Plast surg*. 2006;56(3):256-62.

9. Gurley JM, Pilgram T, Perlyn CA, Marsh JL. Long-term outcome of autogenous rib graft nasal reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108(7):1895-1905; discussion 1906-1907.
10. Boudard Ph. Autologous cartilaginous grafts in septorhinoplasties. *Rev Laryngol Otol Rhinol*. 2006;127(1):31-36.
11. Tessier P. Autogenous bone grafts taken from the calvarium for facial and cranial applications. *Clin Plast Surg*. 1982;9:531.
12. Tessier P, Kawamoto H, Matthews D et al. Taking long rib grafts for facial reconstruction – tools and techniques: III. A 2900 cas experience in maxillofacial and craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(5 Suppl):38S-46S – discussion 92S-94S.
13. Mladina R, Heinzl B. Cross-stealing technique for septal perforation closure. *Rhinology*. 1995;33:174-76.
14. Núñez-Fernández D, Vokurka J, Chrobok V. Bone and temporal fascia graft for the closure of septal perforation. *J Laryngol Otol*. 1998;112:1167-71.

15. Hussain A, Kay N. Tragal cartilage inferior turbinate mucoperiosteal sandwich graft technique for repair of nasal septal perforations. *J Laryngol Otol.* 1992;106:893-895.
16. Meyer R. Nasal septal perforations must and can be closed. *Aethet Plast Surg.* 1994;18:345-355.
17. Woolford TJ, Jones NS. Repair of nasal septal perforations using local mucosal flap and a composite cartilage graft. *J Laryngol Otol.* 2001;115:22-25.
18. Goodman WS, Strelzow VV. The surgical closure of nasoseptal perforations. *Laryngoscope.* 1982;92:121-4.
19. Olhsén L. Closure of nasal septal perforation with a cutaneous flap and a perichondrocutaneous graft. *Ann Plast Surg.* 1988;21:276-88.
20. Boenisch M, Mink A. Clinical and histological results of septoplasty with a resorbable implant. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126(11):1373-77.
21. Boenisch M, Tamas H, Nolst Trenité GJ. Influence of polydioxanone foil on growing septal cartilage after surgery in an animal model: New aspects of cartilage healing and regeneration (preliminary results). *Arch Facial Plast Surg.* 2003;5(4):316-19.

22. Gerlinger I, Kárász T, Somogyvári K et al Extracorporeal septal reconstruction with polydioxanone foil. *Clin Otolaryngol.* 2007;32(6):465-70.
23. Petropoulos I, Nolst Trenite G, Boenisch M et al. External septal reconstruction with the use of polydioxanone foil: Our experience. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006;263(12):1105-08.
24. Lam SM, Kim YK. Augmentation rhinoplasty of the asian nose with the "Bird" silicone implant. *Ann Plast Surg.* 2003;51:249-56.
25. Jung DH, Kim BR, Choi JY et al. Gross and pathologic analysis of long-term silicone implants inserted into the human body for augmentation rhinoplasty: 221 revisions cases. *Plast Reconstr Surg.* 2007;120(7):1997-2003.
26. Bikhazi HB, Van Antwerp H. The use of Medpor in cosmetic and reconstructive surgery: Experimental and clinical evidence. Stucker F, Ed *Plast Reconstr Surg* 1990;p271.
27. Golshani S, Zhou ZY, Gade P. Applications of medpor porous polyethylene in facial bone augmentation. *Am J Cosmet Surg.* 1994;11:p105.
28. Romo T 3rd, Sclafani AP, Sabini P. Reconstruction of the saddle nose deformity using composite allo-implants. *Facial Plast Surg.* 1998;14(2):151-7.

29. Romo T 3rd, Kwak ES, Sclafani AP. Revision rhinoplasty using porous high-density polyethylene implants to reestablish ethnic identity. *Aesth Plast Surg*. 2006;30:679-84.
30. Mendelsohn M. Straightening the crooked middle third of the nose: Using porous polyethylene extended spreader grafts. *Arch Facial Plast Surg*. 2005;7(2):74-80.
31. Gürlek A, Ersoz-Ozturk A, Celik M et al. Correction of the crooked nose using custom-made high density porous polyethylene extended spreader grafts. *Aesth Plast Surg*. 2006;30(2):141-49.
32. Cenzi R, Farina A, Zuccarino L, Carinci F. Clinical outcome of 285 Medpor grafts used for craniofacial reconstruction. *J Craniofac Surg*. 2005;16(4):526-30.
33. Godin MS, Waldman SR, Johnson CM Jr. Nasal augmentation using gore-Tex. A 10 year experience. *Arch Facial Plast Surg*. 1999;1(2):118-121; discussion 122.
34. Conrad K, Gillman G. A 6-year experience with the use of expanded polytetrafluoroethylene in rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg*. 1998;101(6):1675-83.
35. Watzinger F, Wutzl A, Wanschitz F, Ewers R, Turhani D, Seeman R. Biodegradable polymer membrane used as septal splint. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(5):473-477.

36. Braley SA. The use of silicones in plastic surgery. A retrospective view. *Plast Reconstr Surg*. 1973;51:p 280.
37. Deva AK, Merten S, Chang L. Silicone in nasal augmentation rhinoplasty: A decade of clinical experience. *Plast Reconstr Surg*. 1998;102(4):1230-37.
38. Ramakrishnan JB, Danner CJ, Yee SW. The use of porous polyethylene implants to correct nasal valve collapse. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;136:357-61.
39. Stelter K, Strieth S, Berghaus A. Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: Chances and risks. *Rhinology* 2007;4(4):325-31.
40. Chen CT, Hu TL, Lai JB et al. Reconstruction of traumatic nasal deformity in orientals. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010 ;63(2) :257-264.
41. Seyhan T, Borman H, Deniz M, Kocer E. Intranasal porous polyethylene implant extrusion 7 years after insertion in a patient with Hashimoto disease. *J Craniofac Surg*. 2009;20(1):73-4.
42. Ham J, Miller PJ. Expanded polytetrafluoroethylene implants in rhinoplasty: Literature review, operative techniques, and outcome. *Facial Plast Surg*. 2003;19:331-339.

43. de Gabory L, Bareille R, Stoll D, Bordenave L, Fricain JC . Biphasic calcium phosphate to repair nasal septum: The first *in vitro* and *in vivo* study. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:909-19.
44. AFNOR: ISO 10993-6(F). Evaluation biologique des dispositifs médicaux. Partie 6: Essais concernant les effets locaux après implantation, 1994.
45. Gulisano M, Pacini S, Ruggiero M, Pacini A, Delrio AN, Pacini P. In vitro effects of some differentiation inductors in metaplastic epithelium of the human nasal cavity. *Cell Tissue Res*. 1996;285(1):119-25.
46. Stoor P, Grenman –Reider. Bioactive glass and turbinate flaps in the repair of nasal septal perforation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2004;113(8):655-661.
47. Agha-Mir-Salim P, Rauhut O, Merker HJ. Electron and fluorescence microscopic investigations on the composition and structure of the epithelial basement membrane of the human inferior nasal concha. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1993;250: 401–07.
48. Lee D, Joseph EM, Pontell J, Turk JB. Long-term results of dermal grafting for the repair of nasal septal perforations. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;120(4):483-6.
49. Neugebauer P, Endepols H, Mickenhagen A, Walger M. Ciliogenesis in submersion and suspension cultures of human nasal epithelial cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2003;260:325–30.

50. Hérard AL, Pierrot D, Hinnrasky J et al. Fibronectin and its $\alpha 5\beta 1$ integrin receptor are involved in the wound repair process of the airway epithelium. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt1):L726-33
51. Buisson AC, Gilles C, Polette M, Zahm JM, Birembaut P, Tournier JM. Wound repair-induced expression of stromelysins is associated with the acquisition of a mesenchymal phenotype in human respiratory epithelial cells. *Lab invest.* 1996;74(3):658-669
52. Verwoerd-Verhoef HL, ten Koppel P, van Osch G et al. Wound healing of cartilage structures in the head and neck region. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1998;43(3):241-51.
53. Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury.* 2005;36(Suppl 3):S8-S12.
54. Kaiser ML, Karam AM, Sepehr A et al. Cartilage regeneration in the rabbit nasal septum. *Laryngoscope.* 2006;116:1730-34.
55. Holmes RE, Wardrop RW, Wolford LM. Hydroxylapatite as bone graft substitute in orthognatic surgery: histologic and histometric findings. *J Oral Maxillofac Surg.* 1988;46:661.

56. Moroni A, Caja VL, Egger EL, Trinchese L, Chao EY. Histomorphometry of hydroxyapatite coated and uncoated porous titanium bone implants. *Biomaterials*. 1994;15(11):926-30.
57. Vuola J, Goransson H, Bohling T, Asko-Seljavaara S. Bone marrow induced osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants. *Biomaterials*. 1996;17(18):1761-6.
58. Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14(3):195-200.
59. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM et al. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005;26(17):3565-75.
60. Habibovic P, Kruyt MC, Juhl MV et al. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. *J Orthop Res*. 2008 ;26(10) :1363-70.
61. Bruder SP, Firk DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*. 1994;56(3):283-94.
62. Müller P, Bulnheim U, Diener A, Lüthen F, Teller M, Klinkenberg ED, Neumann HG, Nebe B, Liebold A et al. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med*. 2008;12(1):281-91.

63. Salazar I, Sanchez-Quintero P, Lombardero M, Cifuentes JM. A descriptive and comparative lectin histochemical study of the vomeronasal system in pigs and sheep. *J Anat.* 2000;196(Pt1):15-22.
64. Stosiek P, Kasper M, Moll R. Changes in cytokeratin expression accompany squamous metaplasia of the human respiratory epithelium. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;421(2):133-41.
65. Moll R, ed. Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors. Stuttgart, Germany: Gustav Fisher; 1993.
66. Fang SY, Ohyama M. Assessment of cell surface glycoconjugates in normal, benign and malignant human nasal mucosa. *Rhinology.* 1997;35(4):166-170.
67. Huang H, Jing D, Li Z, Zhou S, Ma D.. Histochemistry of glycoconjugates in nasal inverted papilloma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1994;103(2):115-117.
68. Lazard DS, Moore A, Hupertan V et al. Muco-ciliary differentiation of nasal epithelial cells is decreased after wound healing in vitro. *Allergy.* 2009;64:1136-43.

Figure Legends

Figure 1: (A) Measurements of the BCP scaffold; (B) site of implantation instead of the septal cartilage (white arrow implant, black arrow anterior edge of the right perforation).

Figure 2: (above left) nasal endoscopic view of unclosed perforation before sacrifice in control group. unclosed and (B) closed perforation. (above middle and right) Post-mortem lateral view of poor result in the same animal from group 2. (below left) Good result in group 2 the rate of closure in this sheep was 72 %.(below middle) Poor result in group 3. (below right) good result in group 3 with 98 % of closure. The dotted line marks the periphery of the underlying implant covered by the newly formed nasal mucosa.

Figure 3: mean percentage of implant surface covered by mucoperichondrial flap in each group. Bar represents the mean + standard deviation. (**) refers to a significant difference from the control ($p < 10^{-4}$) and (*) refers to a significant difference from both sides of implant ($p < 10^{-3}$).

Figure 4: Results of histomorphometrical and statistical analysis of layer thickness between control and group 3. Bar represents the mean + standard deviation. (**) refers to a significant difference from the control ($p < 10^{-4}$) and (*) refers to a significant difference from both sides of implant ($p < 10^{-2}$).

Figure 5: implant and interface histology. M= Material, NPS= Non-Perforated Side, PS= Perforated Side, NC= Newly formed Cartilage, C= septal Cartilage cut end, CF= Collagen Fibers, V= vessel, Arrow head = bone formation. (above left, H.E.S. staining) global result in sheep in group 3. (above right, H.E.S. staining) bone formation throughout the implant. (below left, H.E.S. staining) Junction between posterior edge of implant and cartilage cut end by a mixture of newly formed cartilage and bone (below middle, Movat pentachrome staining) and (below right, Masson trichrome staining) organization of inner pores of scaffold.

Figure 6: Soft tissue histology. Light and transmission electronic magnifications of newly formed epithelium. (above left, Movat pentachrome staining) several degrees of epithelial differentiation were observed near the edge of perforation. (above middle) epidermoid metaplasia and positive Ck 5-6 immunostaining. (above right) Well-differentiated epithelium and UEA-I positive staining. (below left) Well differentiated epithelium with basal staining of Ck 34 β E12. (below middle, Movat pentachrome staining) simultaneous goblet and ciliated cells in well differentiated area. Blue alcian clearly shows the acid mucus contained in goblet cells. This degree of differentiation is better than previous UEA-I magnification (above right). (below right) electronic microscopic magnification shows pre-ciliated status of epithelial cell, and tight junction and desmosomes (arrow head).

FIGURE 1

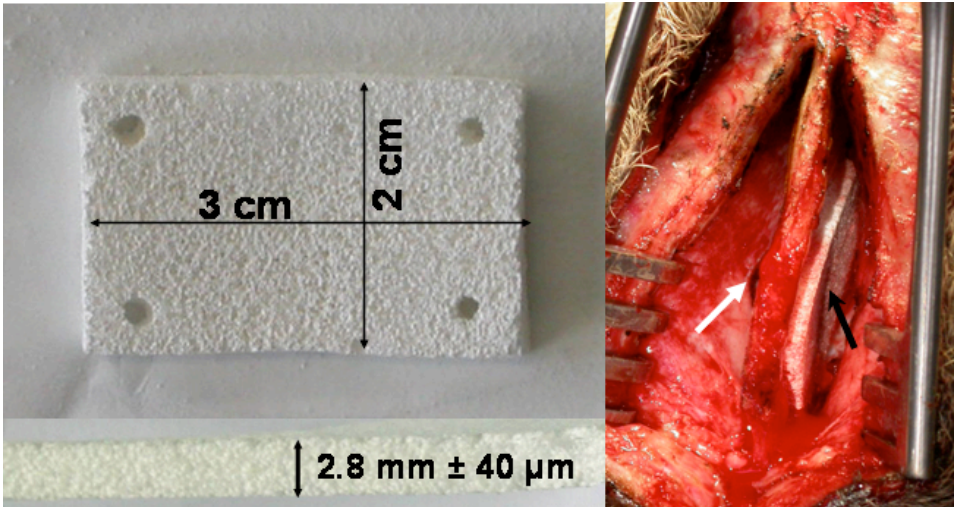


FIGURE 2

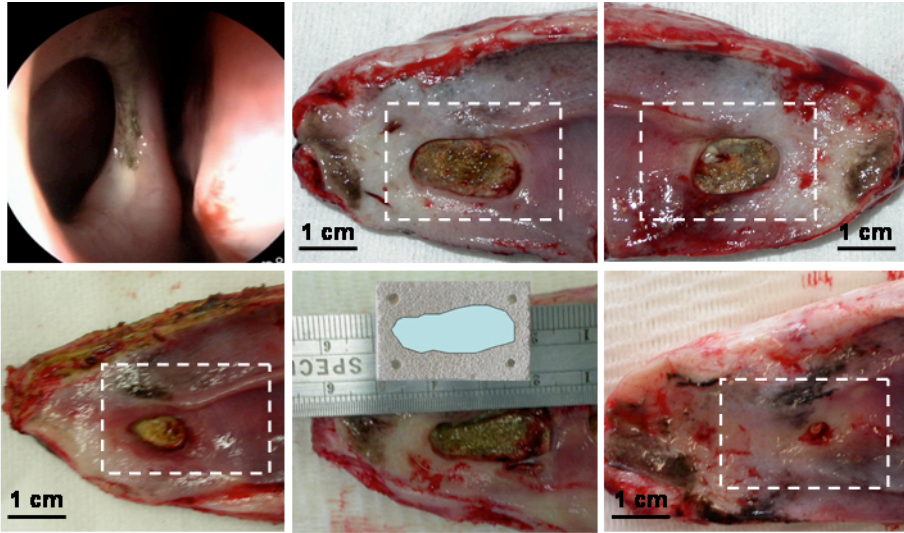


FIGURE 3

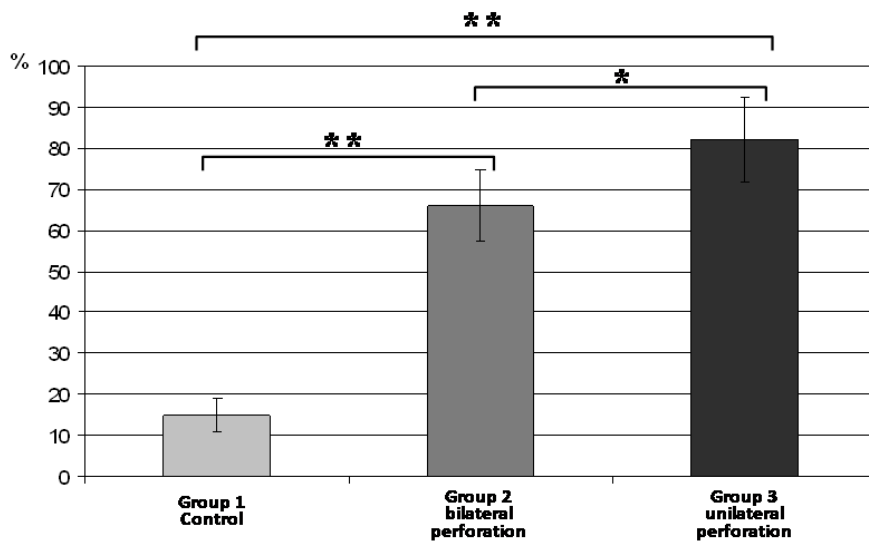


FIGURE 4

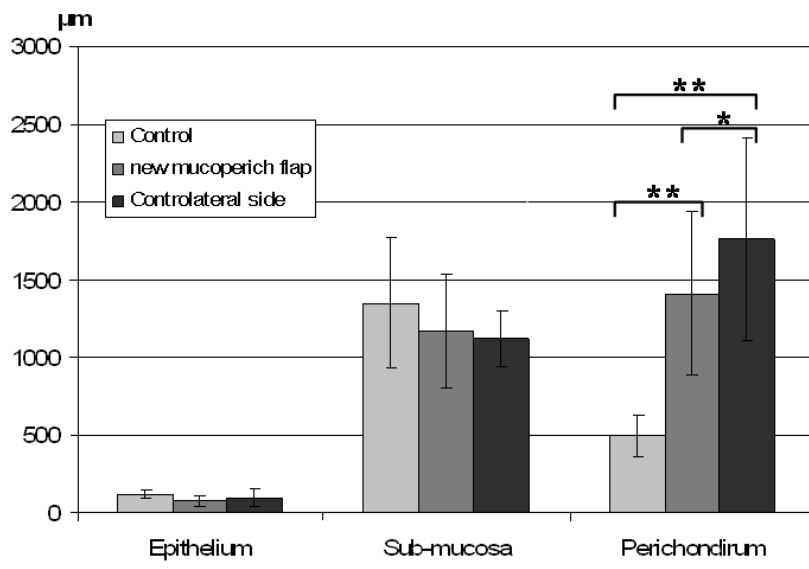


FIGURE 5

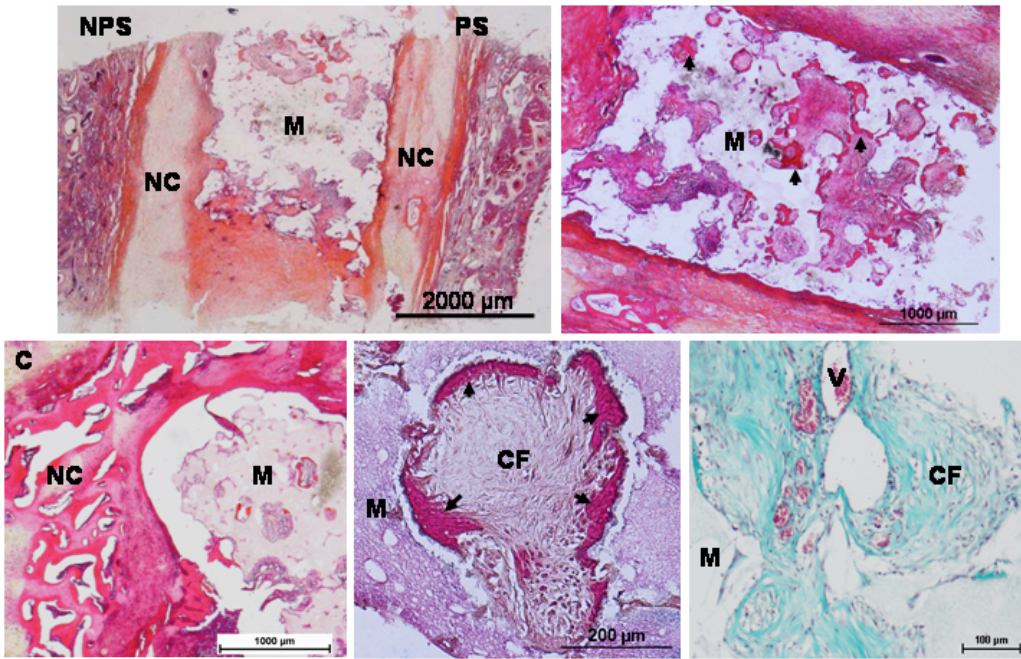
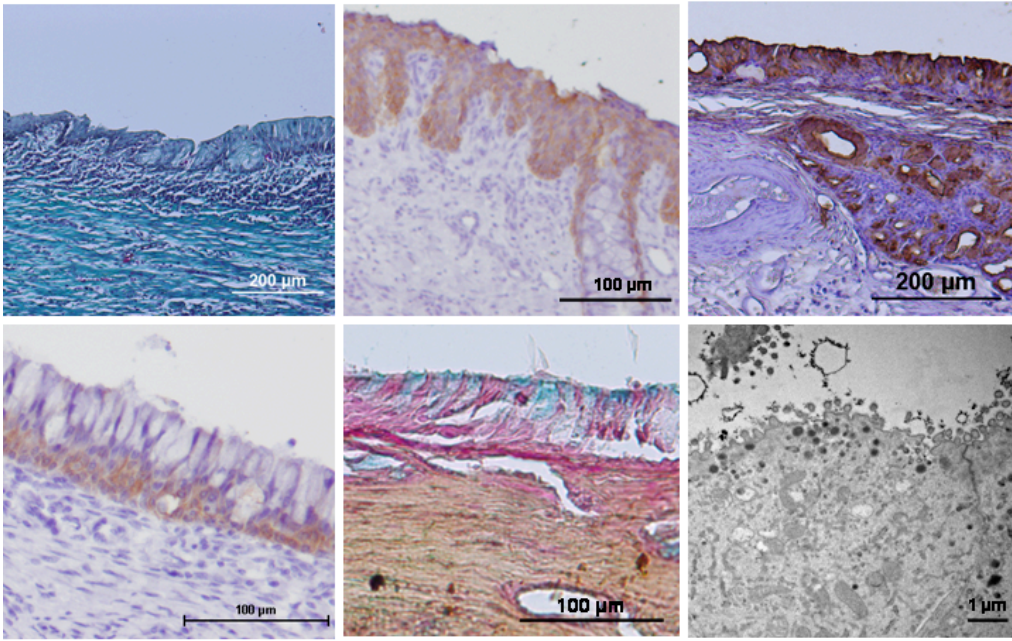


FIGURE 6



C. CONCLUSION

Même si aucune perforation septale n'a été fermée complètement dans ce modèle animal contrairement au lapin, les conditions de cicatrisation étaient volontairement défavorables pour des perforations 2 fois plus grandes et de forme différente. L'exposition au contenu des fosses nasales n'entraîne pas de formation de croûte ni de signe clinique. Ce matériau a permis, à la différence du lapin, de reconstruire trois tissus différents (périchondre, sous-muqueuse, muqueuse) optiquement identiques aux tissus normaux et recouvert d'un épithélium gardant ses caractéristiques de différenciation. Il s'agit par ailleurs du premier implant au contact duquel existe une formation cartilagineuse sans ensemencement préalable de chondrocytes et pour lequel ont été montrées des capacités de coalescence entre les berges du cartilage restant et celles de l'implant. Il semble par ailleurs que la localisation septale lui permette de développer des propriétés d'ostéoinduction.

IV. Influence des nanotubes de carbone sur la cicatrisation du septum nasal en présence d'un implant BCP chez le mouton.

A. INTRODUCTION

Les résultats des deux sujets précédents (reconstruction septale et toxicité des NTCs) au premier abord très différents, ont pu être utilisés pour établir un protocole synergique afin d'obtenir des données supplémentaires *in vivo* sur :

- la toxicité des DWNTs dans la loge septale,
- la reconstruction septale chez le mouton et l'influence que peut avoir la présence d'un agent cytotoxique.

L'exposition des moutons aux aérosols de DWNTs a posé une multitude de difficultés techniques pour obtenir une exposition efficace. L'hypothèse de travail initiale était de pouvoir distribuer un aérosol selon les mêmes modalités techniques que celles proposées chez l'homme en clinique. Le système de distribution (réservoir, espaces morts, oxygène mural avec détendeur et débitmètre) a pu être adapté au mouton à l'aide d'un masque dédié. Cependant, la formation d'agrégats malgré la sonication de la solution de NPs a empêché d'obtenir une solution suffisamment homogène. L'aérosol n'était par conséquent pas efficace en terme de pénétration en profondeur dans les fosses nasales, de dispersion (poids de gouttelettes), et de durée (1h30 pour 10 cc). Par ailleurs, le caractère hypersécrétant de la muqueuse nasale du mouton en réponse aux stimuli sécrétagogues de l'anesthésie et de la chirurgie ne permettait pas, par effet de lavage, de dépôt sur la muqueuse.

D'autres auteurs ont distribué des aérosols de MWNTs chez l'animal (Li et al 2007). Ces NTCs étaient dispersés dans l'air à l'aide d'un générateur de poudre monté en série avec deux chambres de dépôts et une chambre d'inhalation, permettant d'obtenir un empoussièrément contrôlé de MWNTs. Cette technique appliquée à la souris, pouvait difficilement être appliquée au gros animal en raison de l'infrastructure nécessaire. Cependant, afin d'obtenir des résultats synergiques entre les deux sujets initiaux de cette thèse nous avons décidé en raison de la profondeur des fosses nasales et de la surface

septale disponible chez le mouton, de mettre en place un deuxième implant sur lequel était adsorbé la concentration de 25 µg/mL de DWNTs brut. Dans le dernier groupe de mouton (implantation antérieure et perforation mucopérichondrale unilatérale), un demi-implant (3 cm²) a été placé à 1 cm en arrière du précédent, à la place d'un défaut cartilagineux de même taille et exposé au milieu extérieur sur un seul côté. Cet implant a fait l'objet des mêmes analyses que l'implant sans NTCs destiné à la réparation du septum nasal.

A la différence de notre étude *in vitro*, les DWNTs n'ont pas été déposés à la surface des cellules épithéliales mais au contact du périchondre. Cependant dans les deux cas il s'agissait de la couche cellulaire concernée par l'activité proliférative de la réparation.

B. MATERIEL ET METHODES

Le matériau et la méthode chirurgicale d'implantation ont été identiques à l'étude précédente et sont exposés au chapitre « material and method » de l'article précédent (cf supra III B. Articles). Dix moutons ont été inclus. Les animaux étaient leur propre témoin. Le septum comportait deux sites d'implantation. Un premier implant sans NTCs a été placé pour remplacer le cartilage septal antérieur conformément à ce qui a été décrit précédemment dans le groupe 3 et un deuxième demi-implant avec NTCs a été mis en arrière du précédent selon la même technique. Une bande de septum sain séparait les deux sites d'implantation. Les NTCs adsorbés sur le deuxième implant étaient des DWNTs brut à la concentration de 25 µg/mL (Figure 27 A,B). Ces deux implants ont été exposés au contenu des fosses nasales par une perforation mucopérichondrale qualifiée uniquement du côté gauche. Le lambeau mucopérichondrale controlatéral a volontairement été laissé intact. La prise en charge post-opératoire a été la même que précédemment.

Les méthodes d'analyse sont identiques à celle utilisées dans l'article précédent (cf supra III article).

C. RESULTATS

Deux moutons ont présenté une infection superficielle de la voie d'abord ayant entraîné une désunion. Ils ont été repris chirurgicalement pour parage – lavage - suture sous anesthésie générale à J7 post-opératoire et traités médicalement par une antibiothérapie IM d'aminoside. Par la suite, en raison d'un comportement de grattage du museau les animaux ont fracturé leur implant antérieur avec une tendance à l'extrusion en fin d'étude sans effet sur les implants postérieurs. Aucun autre animal n'a présenté de signe clinique rhinologique et tous les animaux ont terminé la période d'observation.

Deux tiers des implants avec NTCs ont été extrus dans la fosse nasale du côté de la perforation alors que seul les deux implants fracturés antérieurs sans NTCs ont eu cette évolution. Le côté controlatéral non perforé n'a pas montré de signe de souffrance tissulaire pour tous les implants sans NTCs alors que deux implants avec NTCs ont provoqué une perforation controlatérale et ont été extrus par les deux versant mucopérichondraux (Figure 27 C-G). Il existait un effet de lavage des sécrétions nasales emportant les NTCs adsorbés à la surface du matériau et exposé au milieu extérieur (Figure 27 D,E). Par contre, les parties recouvertes intégraient les NTCs dans les tissus mous, visibles par transparence (Figure 27 G).

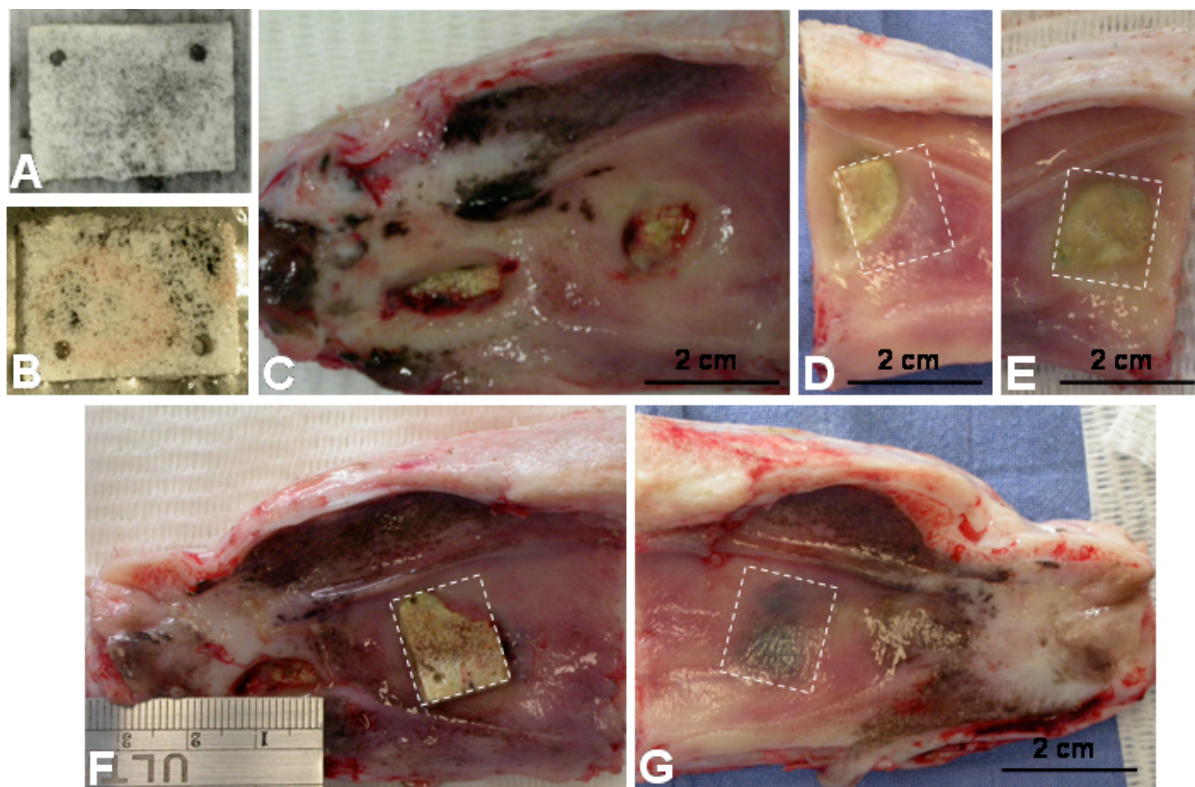


Figure 27 : résultats macroscopiques des implants sans et avec NTCs.

(A,B) Matériau après adsorption des NTCs montrant la difficulté d'obtenir une concentration homogène sur toute la surface. (C) intégration des deux implants malgré la présence des NTCs sur celui plus postérieur. (D,E) photo du même animal, extrusion bilatérale de l'implant avec NTCs alors que l'implant antérieur permet la fermeture de la perforation. (F,G) photo du même animal, montrant la fermeture de la perforation malgré une fracture horizontale (dépression sus-lobulaire) de l'implant antérieur, l'extrusion de l'implant avec NTCs du côté perforé, le côté controlatéral restant intact avec intégration dans les tissus mous des NTCs visibles par transparence.

Les taux de couverture des implants sans et avec NTCs étaient respectivement de $48,9 \pm 24,7 \%$ et $82,2 \pm 10,4 \%$ (Figure 28). Il existait une différence statistique significative entre les deux sites d'implantation ($p < 0,05$).

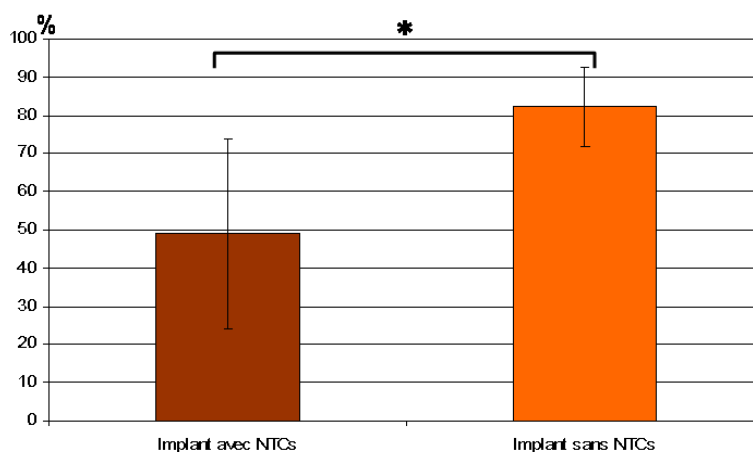


Figure 28 : pourcentage moyen de recouvrement des implants sans et avec NTCs.

* comparaison des taux de recouvrement entre les deux implants ($p < 0,05$).

Les mesures histomorphométriques ne montraient pas de différence statistique d'épaisseur de l'épithélium entre l'épithélium normal du mouton sain, l'épithélium néoformé et le côté controlatéral des implants sans et avec NTCs (Figure 29). Il n'y avait pas de différence statistique d'épaisseur de la sous-muqueuse entre un mouton sain et les deux côtés de l'implant sans NTCs. Si l'épaisseur moyenne de la sous-muqueuse semblait plus importante de part et d'autre de l'implant avec NTCs (2194 ± 1338 µm côté néoformé, 2406 ± 1764 µm côté non perforé) par rapport à la sous-muqueuse saine (1350 ± 419 µm), il n'y avait pas non plus de différence statistique. Les différences observées pour ces valeurs moyennes étaient très probablement dues à l'existence dans cette zone plus postérieure d'un réseau vasculaire sous-muqueux plus dense bien visible en microscopie optique chez certains animaux. De même s'il n'existait pas de différence statistique d'épaisseur de la sous-muqueuse entre les deux implants du côté non perforé ($p > 0,05$), il existait par contre une différence statistique hautement significative entre l'épaisseur de la sous-muqueuse des implants sans NTCs et avec NTCs du côté perforé ($p < 10^{-4}$) (Figure 29 : sans NTCs 1171 ± 392 µm *versus* avec NTCs 2194 ± 1338 µm).

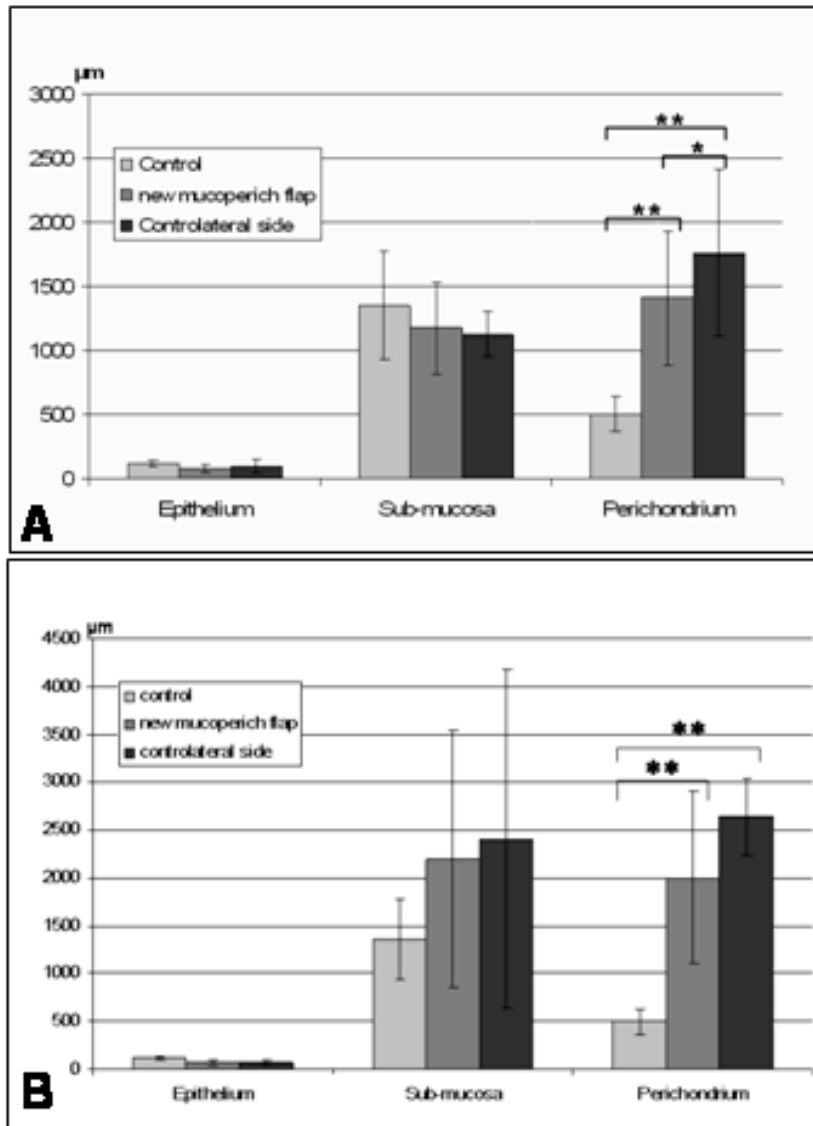


Figure 29 : résultats histomorphométriques sans (A) et avec NTCs (B).

** $p < 10^{-5}$ comparaison des épaisseurs de périchondre de part et d'autre des implants versus l'épaisseur de périchondre normale, * $p < 10^{-3}$ comparaison de l'épaisseur de périchondre du côté néoformé versus le côté non perforé des implants sans NTCs. Il n'existait pas de différence significative d'épaisseur du périchondre entre les deux côtés des implants avec NTCs

Par rapport aux deux autres couches tissulaires, seul le périchondre présentait une épaisseur supérieure à la normale avec une différence statistique hautement significative dans les deux cas et des deux côtés des implants (Figure 29). Il existait une différence statistique d'épaisseur entre le côté non perforé et néoformé autour des implants sans NTCs ($p < 10^{-3}$), mais cette différence n'existait pas autour des implants avec NTCs. Par contre, l'épaisseur du périchondre était supérieure autour des implants avec NTCs par rapport à celle observée autour des implants sans NPs notamment du côté non perforé ($p < 10^{-4}$).

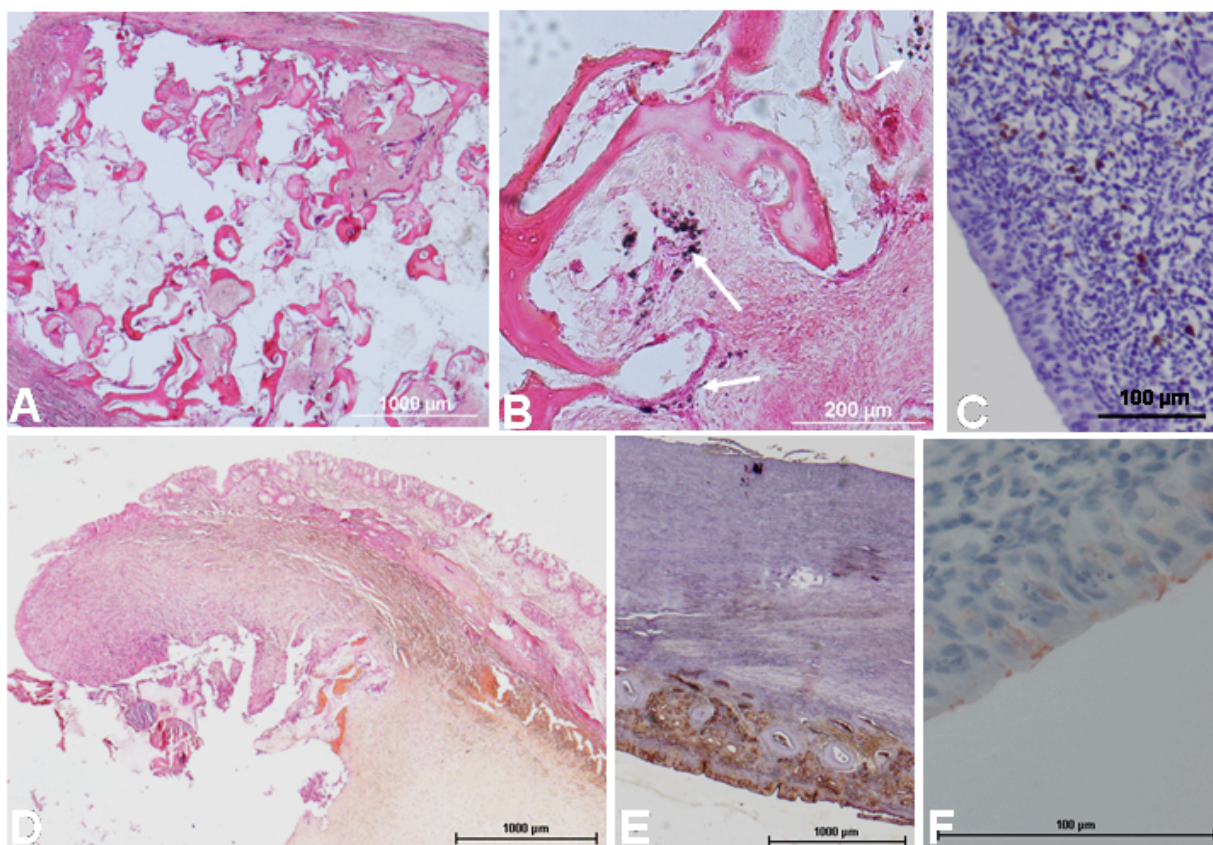


Figure 30 : résultats microscopiques des implants avec NTCs.

(A,B) Ostéoformation. Les flèches blanches montrent les amas de NTCs à l'intérieur des pores. (C) immunomarquage Mib-1 sur quelques cellules sous-épithéliales. (D) front de cicatrisation montrant la réaction périchondrale et les différents degrés de différenciation épithéliale depuis les berges de la perforation vers la périphérie. (E, F) immunomarquage UEA-I et MUC5AC positif de part et d'autre des implants avec NTCs dans les zones optiquement moyennement à bien différenciées pour le premier et bien différenciées pour le second.

Aucun infiltrat inflammatoire n'a été observé autour des implants antérieurs, mais il existait parfois un infiltrat inflammatoire modéré dans la sous-muqueuse, au contact des implants avec NTCs (Figure 30 C). Comme pour les implants sans NPs, de l'os néoformé existait sur toute l'épaisseur de l'implant (Figure 30 A). La présence des NTCs (Figure 30 B) ne semblait pas modifier la colonisation du matériau, ni entraîner une modification du contenu des pores. L'os néoformé avait le même aspect morphologique dans les implants avec ou sans NTCs. Il n'y avait pas de différence statistique d'épaisseur d'os néoformé entre les deux implants à l'intérieur des pores. Il n'y avait de formation cartilagineuse à l'interface entre le matériau et le périchondre autour des implants avec NTCs contrairement à ceux sans NTCs. Il n'y avait pas de différence des immunomarquages Ck 7, 5-6, 903, UEA-I, MUC5AC au niveau de l'épithélium entre les deux sites d'implantation. A chaque fois le comportement épithélial

était identique et un épithélium moyennement à bien différencié restait majoritaire par rapport aux zones de métaplasie ou d'hyperplasie y compris en microscopie électronique.

D. DISCUSSION

La toxicité des DWNTs brut à 25 µg/mL observée *in vitro* semble se confirmer *in vivo*. Les implants postérieurs n'auraient pas du être exclus et le taux de recouvrement des implants aurait du être identique. Cependant, vis-à-vis du tissu conjonctif et de l'ostéoformation, la présence des NTCs n'a pas entraîné de modification de colonisation des matériaux. Mais, la réaction péri-chondrale a été majorée en présence des NTCs. Il semble donc que la finalité du processus d'activation péri-chondrale change en présence ou absence des NTCs et que l'on observe un comportement tissulaire intermédiaire entre un processus de cicatrisation aboutissant à la fermeture des perforations et un processus de rejet et d'exclusion. Dans la littérature au niveau bronchique et alvéolaire, la réaction tissulaire aux NPs semble guidée, comme il a été montré avec les instillations et les aérosols, par la méthode d'administration, le volume, la concentration et le degré d'agrégation (Li et al 2007).

La réaction inflammatoire observée dans la sous-muqueuse de certains animaux pourrait être corrélée avec la production des ROS obtenue *in vitro*. Il semble cependant que cette inflammation soit non spécifique et modérée. Nous n'avons pas retrouvé d'effet sécrétagogue mais l'administration des NTCs n'a pas été faite sur l'épithélium contrairement aux précédentes conditions *in vitro* que nous avons utilisé. Il semble que la cytotoxicité s'exerce par contact direct en raison de l'hyperactivité péri-chondrale supérieure à celle observée autour des implants sans NTCs et à l'absence de toxicité épithéliale observée *in vivo* contraire aux données obtenues *in vitro* avec les HNEpC pour la même concentration.

Si au niveau du front de cicatrisation on retrouvait les différentes étapes épithéliales observables lors d'un processus de réparation, l'absence de fermeture des perforations montrait, par contre, que ce processus n'était pas engagé par les couches tissulaires sous-jacentes. L'absence de modification de la colonisation du matériau et de la constitution des tissus mous périphériques renforce l'idée retenue précédemment, que les NTCs ne sont pas reconnus par la cellule, qu'ils se comportent comme des corps étrangers inertes et que le

processus de déterision et de cicatrisation ne sont pas engagés. Il est par ailleurs étonnant que l'on n'aie pas plus observé de zones métaplasiques ou hyperplasiques par rapport au large surface d'épithélium relativement bien différencié alors qu'il existe parfois un infiltrat cellulaire inflammatoire modéré sous-jacent et que les implants ont été exclus. *In vitro*, il existait un renforcement d'immunomarquage UEA-I et CK 7 soulignant l'absence de dédifférenciation. Cette absence de dédifférenciation épithéliale, première étape du processus de réparation, semble aussi renforcer l'idée que le processus de réparation n'est pas engagé.

Les NPs n'ont pas les mêmes propriétés physiques et chimiques que les micro et les macro-objets constitués avec les mêmes matériaux (ici le carbone). C'est donc les dimensions moléculaires et atomiques individuelles et les interactions entre elles qui priment et qui déterminent leur rapport avec le vivant. (Kohler et Fritzche, 2004; Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004). Deux facteurs principaux peuvent être responsables des changements de propriétés : une surface relative par unité de masse beaucoup plus importante et une prédominance des effets quantiques (Brouwer et al 2004, Royal Society and Royal Academy of Engineering, 2004). Effectivement plus la taille est petite et plus la réactivité de surface augmente, ce qui peut leur donner une activité biologique beaucoup plus importante que des particules de taille plus élevée et de même composition chimique. Il a été clairement établi (cf supra) que les objets de taille nanométrique présentent une toxicité différente de celle des mêmes composés sous forme micro ou macroscopique. Il semble donc de manière homogène que les lois qui régissent le comportement des NPs soient différentes dans plusieurs domaines par rapport à celle de tailles supérieures : la rhéologie et leurs dépôts dans l'arbre respiratoire, les propriétés chimiques et physiques proprement dites des matériaux. Il n'est donc pas surprenant dans l'analyse du rapport qui existe entre le vivant et les NTCs de retrouver des données de toxicologie différentes de celles obtenues avec les mêmes composés de taille supérieure. Il n'est pas surprenant non plus de retrouver des données inhabituelles concernant l'inflammation, le comportement cellulaire et tissulaire. Il semble donc que les lois de la toxicologie classique ne soient pas applicables aux composés de même nature à l'échelle nanométrique. Par exemple, il n'a pas été possible pour l'instant de comprendre leur mécanisme de pénétration dans la cellule alors qu'ils sont connus pour des molécules de plus grande taille (Kostarelos et al 2007).

E. CONCLUSION

La présence des DWNTs brut à la concentration de 25 µg/mL adsorbé à la surface du matériau, a détérioré sa biocompatibilité dans la loge septale du mouton et ses capacités de support pour fermer les perforations septales.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La démarche pour valider l'implant BCP dans cette indication a suivi une stratégie classique. Il s'agit du premier biomatériau pour lequel les données de cytocompatibilité vis-à-vis de l'épithélium respiratoire et de biocompatibilité dans la loge septale ont été réunies afin de pouvoir proposer une application chez l'homme.

Grâce à ces données pré-cliniques favorables, nous avons proposé dans le cadre de l'appel d'offre 2010 DHOS/INSERM un projet de recherche clinique translationnelle qui a été accepté. Il s'agit d'une étude clinique pilote interrégionale, multicentrique, d'efficacité et de tolérance pour la réparation du septum nasal polytraumatisé chez des patients à qui on aurait proposé un greffon iliaque, pariétal ou costal. Nous avons volontairement choisi chez l'animal des indications de réparation septale offrant les plus mauvaises conditions de cicatrisation et de pérennité de l'implant. Chez l'homme, afin d'obtenir le meilleur rapport efficacité/tolérance la première indication de reconstruction retenue est la réparation de la pyramide nasale et du septum antérieur lorsque le squelette septal est inexistant, ou inutilisable mais que les parois de la loge septale sont intègres sans perforation. Les critères d'inclusion des 25 patients prévus dans l'étude sont :

- être âgé entre 18 et 60 ans,
- être non fumeur, sans autre pathologie rhinologique,
- avoir un nez ensellé déshabité (absence de squelette septal), ou multifracturé (squelette septal inutilisable) (types III et IV de la classification de Daniel) et les conséquences fonctionnelles en rapport.

Le bénéfice pour le patient sera direct évitant les risques opératoires et la morbidité des sites donneurs (cicatrice, douleurs, impotence fonctionnelle, durée d'hospitalisation et d'arrêt de travail). Parallèlement sera menée une étude médico-économique (coût de l'implant versus coût du prélèvement, des soins post-opératoires, de la durée d'hospitalisation et de l'arrêt de travail). Si le nombre de patients concernés par cet implant dans cette indication est relativement faible (environ 6 à 7 patients/an/centre de rhinoplastie), il s'agit d'une première internationale pour un projet intégralement français (chirurgiens, chercheurs, industriel) et pour lequel les indications en cas de bons résultats pourront être étendues à la réparation des perforations septales. Il s'agira alors du premier

biomatériau ayant la capacité de réparer trois couches tissulaires différentes (périchondre, sous-muqueuse et muqueuse) tout en étant exposé au milieu extérieur.

Parallèlement, si les propriétés des nanotubes de carbone peuvent faire espérer des perspectives dans le domaine médical, la toxicité observée dans les conditions choisies de notre travail, représente un obstacle aux différentes applications dans l'organisme (Janus pourrait représenter une image adaptée pour caractériser cette situation). Leur capacité de pénétration dans les cellules nasales pourrait être appliquée au traitement d'un grand nombre de pathologies locales. Les NTCs pourraient transporter un principe actif dans les cellules nasales permettant le traitement local des cancers naso-sinusiens ou des rhinosinusites chroniques. Cependant nous partons de l'hypothèse que la cellule normale nasale n'a pas la capacité de pouvoir reconnaître ces particules. Le challenge technologique est de pouvoir greffer à leur surface une molécule de reconnaissance dédiée pour la pénétration cellulaire et le site d'action du principe actif transporté. Mais, il reste à déterminer avant toute utilisation chez l'homme :

- leur seuil de toxicité,
- le mode de pénétration dans les cellules,
- les voies métaboliques de dégradation et/ou d'excrétion.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

- **de Gabory L**, Bareille R, Stoll D, Bordenave L, Fricain JC : Biphasic calcium phosphate to repair nasal septum: The first *in vitro* and *in vivo* study. *Acta Biomaterialia* 2010;6:909-19.
- **de Gabory L**, Bareille R, Daculsi R, L'Azou B, Flahaut E, Bordenave L. Acute and chronic exposure of normal and malignant human airway epithelial cells to double-walled carbon nanotubes. *Toxicology in vitro* 2010; soumis, en cours de révision.
- **de Gabory L**, Fricain JC, Stoll D. La résorption des greffons cartilagineux en rhinoplastie : bases fondamentales. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2010 ; soumis.
- **de Gabory L**, Delmond S, Deminière C, Stoll D, Bordenave L, Fricain JC. Assessment of BCP implant to repair nasal septum defects in sheep. *Plast Reconstr Surg* 2010 ; soumis.

Communications orales

- **L. de Gabory**, S. Delmond, C. Deminière, L. Bordenave, J.C. Fricain, D. Stoll. **Evaluation d'un implant phosphocalcique biphasique macroporeux pour la réparation du septum nasal**. *Société Internationale Francophone d'ORL*, Beyrouth (Liban), 14-16 Mai 2010.
- **L. de Gabory**, L. Bordenave. **NASEPT : Etude pré-clinique et validation clinique de la réparation du septum nasal du nez polytraumatisé avec un implant de BCP**. VIIIe Journée annuelle des CIC, Bordeaux (France), 24 Mars 2010.
- **L. de Gabory**, R. Bareille, M. Rémy, J.C. Fricain, E. Flahaut, L. Bordenave. **Cytotoxicity of double-walled carbon nanotubes (DWNT) on respiratory human cells**. *CARBON*, Biarritz (France), 14-19 juin 2009.
- **L. de Gabory**, R. Bareille, M. Remy, V. Datsyuk, B. L'azou, R. Daculsi, J.C. Fricain, E. Flahaut, L. Bordenave. **"Double-walled carbon nanotubes (DWCNT) have a deleterious effect on human airway epithelial cells *in vitro*"**. *Biomaterials Congress ESB*. Lausanne (Suisse), 7-11 Septembre 2009.
- **L. de Gabory** L, R. Bareille, M. Remy, J.C. Fricain, E. Flahaut, L. Bordenave. **"Cytotoxicité de nanotubes de carbone sur des cellules respiratoires humaines"**. *Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire*, Paris (France), 29-30 Mai 2008.
- **L. de Gabory**, R. Bareille, M. Remy, J.C. Fricain, E. Flahaut, L. Bordenave, D. Stoll. **"Cytotoxicité de nanotubes de carbone sur des cellules respiratoires humaines"**. *Société Française d'ORL et de Chirurgie Cervico-Faciale*, Paris (France), 12-14 Octobre 2008.

Communication affichée

- **L. de Gabory**, R. Bareille, J.C. Fricain, L. Bordenave, E. Flahaut, D. Stoll. **"Effets délétères des nanotubes de carbone sur les cellules épithéliales nasales humaines"**. *Société Française d'ORL et de Chirurgie Cervico-Faciale*, Paris (France), 04-06 Octobre 2009.

ENCADREMENT

Ce travail a servi de terrain de stage et permis d'encadrer un élève de Master 1 dont le sujet de mémoire était : « Etude de l'implantation chirurgicale chez le mouton d'un biomatériau destiné au septum nasal et mesure éventuelle des écarts avec la norme NF EN ISO 10993-6 ». Master science de la vie et de la santé, mention : Industries pharmaceutiques et produits de la santé. Université V. Ségalen Bordeaux 2.

BIBLIOGRAPHIE

Aarbiou J, Verhoosel RM, Van Wetering S, et al. Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004 ;30:193-201.

Abe H, Manaka N, Fujii T, et al. Histopathological observation of dense particulate hydroxyapatite consolidated in the frontal sinus of dogs. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1990, Dec;32(4):240-6.

Agha-Mir-Salim P, Rauhut O, Merker HJ. Electron and fluorescence microscopic investigations on the composition and structure of the epithelial basement membrane of the human inferior nasal concha. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993;250: 401–07.

Ahman M, Holmstrom M, Cynkier I, Soderman E. Work related impairment of nasal function in Swedish woodworker teachers. *Occup Environ Med* 1996;53:112-7.

Aitasalo KM, Peltola MJ. Bioactive glass hydroxyapatite in fronto-orbital defect reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2007;120(7):1963-72;discussion 1973-74.

Aitken RJ, Creely KS, Tran CL, 2004. Nanoparticles: an occupational hygiene review. Sudbury, Suffolk, Grande-Bretagne. HSE, 100p. <http://www.hse.gov.uk/research/rrpdf/rr274.pdf>.

Alonso N, et al. Cranial versus iliac onlay bone grafts in the facial skeleton: a macroscopic and histomorphometric study. *J Craniofac Surg*, 1995;6(2); 113-8; discussion 119.

Armengot M, Hernandez R, Miguel P, Navarro R, Basterra J. Effect of total nasal obstruction on nocturnal oxygen saturation. *Am J Rhinol* 2008;22(3):325-8.

Armstrong CG, Mow VC. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration and water content. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64:88-94.

Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, et al. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res* 1996;329:300-09.

Asselin A, Hattar S, Oboeuf M, et al. The modulation of tissue-specific gene expression in rat nasal chondrocyte cultures by bioactive glass. *Biomaterials* 2004;25(25):5621-30.

Aulthouse AL, Beck M, Griffey et al. Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In vitro Cell Dev Biol* 1989;25:659-68.

Ayshford CA, Shykhon M, Uppal HS, Wake M. Endoscopic repair of nasal septal perforation with acellular human dermal allograft and an inferior turbinate flap. *Clin Otolaryngol* 2003;28:29-33.

BARRONE R. L'appareil respiratoire. Anatomie comparée des mammifères domestiques. 2^e éd Paris : VIGOT, 1984, tome 3, Splanchnologie I, p 587-653.

Beekhuis GJ. Saddle nose deformity: etiology, prevention, and treatment; augmentation rhinoplasty with polyamide. *Laryngoscope* 1974;84(1):2-42.

Benja PD, Schaffer JD. Dedifferentiation chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1978;30:215-24.

Berghaus A, Mulch G, Handrock M: Porous polyethylene and Proplast: Their behavior in a bony implant bed. *Acta Otorhinol* 1984;240(2):115-23.

Bernacki SH, Nelson AL, Abdullah L, et al. Mucin gene expression during differentiation of human airway epitheli in vitro:MUC4 and MUC5B are strongly induced. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:595-604.

Berry RB, Kouchi KG, Bower JL, Light RW. Effect of upper airway anesthesia on obstructive sleep apnea. *Am J Resp Crit Care Med* 1995 Jun;151(6):1857-61.

Bieger-Farhan AK, Nichani J, Willatt DJ. Nasal septal mucosal contact points: associated symptoms and sinus CT scan scoring. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2004;29:165–68.

Bikhazi HB, Van Antwerp H. The use of Medpor in cosmetic and reconstructive surgery: experimental and clinical evidence. *Stucker F, Ed Plast Reconstr Surg* 1990:p271.

Black A, Evans JC, Hadfield EH, et al. Impairment of nasal mucociliary clearance in woodworkers in the furniture industry. *Br J Ind Med* 1974;31:10-7.

Bleys R, Popko M, de Groot JW, Huizing EH. Histological structure of the nasal cartilages and their perichondral envelope. II. The perichondral envelope of the septal and lobular cartilage. *Rhinology* 2007;45:153-7.

Boenisch M, Mink A. Clinical and histological results of septoplasty with a resorbable implant. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126:1373-77.

Boenisch M, Tamas H, Trenité G. Influence of polydioxanone foil on growing septal cartilage after surgery in an animal model. *Arch Facial Plast Surg* 2003;5:316-19.

Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, et al. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. *Am J Physiol* 1999;276(4 Pt 1):604-13.

Boland S, bonvallet V, Fournier T, et al. Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278(1):25-32.

Bordenave L, Janvier G, Bareille R, Pellet F, Rouais F, Amédée J, Bacquey Ch: An in vitro cytotoxicity study of a cuff of an endotracheal tube using human tracheal epithelial cells. *Adv Biomaterials* 1992, 10:1-6.

Bordenave L, Bareille R, Rouais F, Lefebvre F, Amedee J, Baquey C: Human tracheal epithelial cells in culture: a suitable model for testing the cytocompatibility of materials for endotracheal use. *J Mater Sc Mater Med* 1993;4:327-36.

Borm PJ, Höhr D, Steinfartz Y, et al. Chronic inflammation and tumor formation in rats after intratracheal instillation of high doses of coal dusts, titanium dioxides, and quartz. *Inhal Toxicol* 2000;12(Supp. 3):225-31.

Bouler JM, Trecant M, Delecrin J, et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of five synthesis parameters on compressive strength. *J Biomed Mater Res* 1996;32(4):603-9.

Bouler JM, Legeros RZ, Daculsi G. Biphasic calcium phosphates: Influence of three synthesis parameters on the HA/ β TCP ratio. *J Biomed Mater Res* 2000; 51(4): 680-4.

Boysen M, Solberg LA. Changes in the nasal mucosa of furniture workers. A pilot study. *Scand J Work Environ Health* 1982;8(4):273-82.

Brenneman KA, Wong BA, Buccellato MA, et al. Direct olfactory transport of inhaled manganese (54MnCl₂) to the rat brain: toxicokinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;169:238-48.

Brouwer DH, Gijsbers JHS, Lurvink MWM, 2004. Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies, *Ann Occup Hyg* 48 (5): 439-453.

Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage:tissue design and chondrocytes-matrix interactions. *AAOS Instructional Course Lectures* 1998;47:477-86.

Buisine MP, Devisme L, Copin MC, et al. Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:209-18.

Burgel PR, Escudier E, Coste A, et al. Relation of epidermal growth factor receptor expression to goblet cell hyperplasia in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:705–12.

Burgel PR, Nadel JA. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax* 2004;59:992-6.

Cakmak O, Buyuklu F, Yilmaz Z, et al. Viability of cultured human nasal septum chondrocytes after crushing. *Arch Facial Plast Surg* 2005;7:406-9.

Calderón-Garcidueñas L, Maronpot RR, Torres-Jardon R, et al. DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Tox Pathol* 2003;31:524-38.

Calderón-Garcidueñas L, Solt AC, Henríquez-Roldán, et al. Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of Amyloid β 42 and α -Synuclein in children and young adults. *Tox Pathol* 2008;36:289-310.

Calvert JW, Brenner K, DaCosta-Iyer M, et al. Histological analysis of human diced cartilage grafts. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:230-6.

Casey A, Davoren M, Herzog E, et al. Probing the interaction of single walled carbon nanotubes within cell culture medium as a precursor to toxicity testing. *Carbon* 2007a;45:34-40.

Casey A, Herzog E, Davoren M, et al. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon* 2007b;45:1425-32.

Castillon N, Hinnrasky J, Zahm JM, et al. Polarized expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and associated epithelial proteins during the regeneration of human airway surface epithelium in three-dimensional culture. *Lab Invest* 2002;82:989-98.

Cenzi R, Farina A, Zuccarino L, Carinci F. Clinical outcome of 285 Medpor grafts used for craniofacial reconstruction. *J Craniofac Surg* 2005;16(4):526-30.

Cervelli V, Bottini DJ, Gentile P, et al. Reconstruction of the nasal dorsum with autologous rib cartilage. *Ann Plast surg* 2006;56(3):256-62.

Chabolle F. *ORL et trouble du sommeil. Rapport de la SFORL* 2006.

Chen CT, Hu TL, Lai JB, et al. Reconstruction of traumatic nasal deformity in orientals. *J Plat Reconstr Aesth Surg* 2010 ;63 :257-264.

Cheng YS, Hansen GK, Su YF, Yeh HC, Morgan KT : Deposition of ultrafine aerosols in rat nasal models. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990 ;106(2) :222-33.

Cherukuri PP, Bachilo SM, Litovsky SH, Weisman RB. Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *J Am Chem Soc* 2004;126:15638-639.

Chometon F, Ebbo D, Gillieron P, et al. Simulation numérique de l'écoulement de l'air dans les fosses nasales. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 2000;117(2):98-104.

Clark AB, Randell SH, Nettesheim P, et al. Regulation of ciliated cell differentiation in cultures of rat tracheal epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:329-38.

Clarke RW, Jones AS. Nasal airflow sensation. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1995;20:97-9.

Climo. The surgical closure of a large anterior perforation of the nasal septum. *Plast Reconstr surg* 1956;17:410-14.

Cogswell LK, Goodacre TE: The management of nasoseptal perforation. *Br J Plast Surg.* 2000 Mar;53:117-20.

Congdon D, Sherris DA, Specks U, et al. Long-term follow-up of repair of external nasal deformities in patients with Wegener's granulomatosis. *Laryngoscope* 2002;112:731-37.

Conrad K, Gillman G. A 6-year experience with the use of expanded polytetrafluoroethylene in rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg* 1998;101:1675-83.

Coraux C, Nawrocki-Raby B, Hinnrasky J, et al. Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005a;32:87-92.

Coraux C, Hajj R, Lesimple P, Puchelle E. Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire. *Med Sc* 2005b;21:1063-69.

Coraux C, Martinella C, Nawrocki-Raby B, et al. Differential expression of metalloproteinases and interleukin-8 during regeneration of human airway epithelium in vivo. *J Pathol* 2005c;206:160-169.

Corley RA, Minard KR, Kabilan S, et al. Magnetic resonance imaging and computational fluid dynamics (CFD) simulations of rabbit nasal air flows for the development of hybrid CFD/PBPK models. *Inhal Toxicol* 2009;21(6):512-8.

Cottle MH. The structure and function of the nasal vestibule. *Arch Otolaryngol* 1955;62:173-81.

Cottle MH. Concepts of nasal physiology as related to corrective nasal surgery. *Arch Otolaryngol* 1960;72:11-20.

Cottle MH. A consideration of nasal, pulmonary and cardio-vascular interdependence and nasal-pulmonary function studies. *Rhinology* 1980 Jun;18(2):67-81.

Cottrell DA, Wolford LM. Long-term evaluation of the use of coralline hydroxyapatite in orthognathic surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;56:935-42.

Couet F, Rajan N, Mantovani D. Macromolecular biomaterials for scaffold-based vascular tissue engineering. *Macromol Biosci* 2007;7:701-18.

Cricchio G, Lundgren S. Donor site in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003;5(3):161-69.

Daculsi G, Passuti N, Martin S, et al. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. *J Biomed Mater Res* 1990; 24(3): 379-96.

Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 1998; 19(16): 1473-78.

Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mat Sc: Mat Med* 2003; 14: 195-200.

Daigle CC, Chalupa DC, Gibb FR, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ, 2003. Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhal Toxicol* 15 : 539-552.

Daniel RK, Calvert JW. Diced cartilage grafts in rhinoplasty surgery. *Plast Reconstr Surg* 2004;113:2156–71.

Daniel RK. Rhinoplasty: septal saddle nose deformity and composite reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007;119:1029-43.

Dankmeijer J. Some remarks on the development and anatomy of the septum nasi. *Int Rhinol* 1968;6:27-33.

Davenport JC, Brain DJ, Hunt AJ: Laboratory techniques for the construction of intranasal prosthesis. *J Prothet Dent* 1984;51:477-85.

Davoren M, Herzog E, Casey A, et al. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicology in vitro* 2007;21:438-48.

De Gabory L, Stoll D. Traitement par agrandissement des perforations septales. *Rev Laryngol Otol Rhinol* 2008;129(1) :43-8.

Della Santina CC, Byrne PJ. Initial management of total nasal septectomy defects using resorbable plating. *Arch Facial Plast Surg* 2006;8(2):128-38.

Demitras Y, Yavuzer R, Findikcioglu K, et al. Fixation of the split calvarial graft in nasal augmentation. *J Craniofac Surg* 2006;17(1):131-38.

De Monredon O, Dumon T, Stoll D. Anatomy of nasal obstruction. The recognition of the role of septum. Its application to the surgical treatment of nasal obstruction. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. 1998;119(1):29-34.

De Riu G, Meloni SM, Raho MT, et al. Delayed iliac abscess as an unusual complication of an iliac bone graft in an orthognathic case. *Int Oral Maxillofac Surg* 2008; doi:10.1016/j.ijom.2008.07.018.

Deva AK, Merten S, Chang L. Silicone in nasal augmentation rhinoplasty: a decade of clinical experience. *Plast Reconstr Surg* 1998;102(4):1230-37.

Donaldson K, Aitken R, Tran L, et al. Carbon nanotubes: areview of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sc* 2006;92(1):5-22.

Dorman DC, Brenneman KA, McElveen AM, et al. Olfactory transport: a direct route of delivery of inhaled manganese phosphate to the rat brain. *J Toxicol Environ Health* 2002;65:1493-511.

Dorscheid DR, Wojcik KR, Yule K, et al. Role of cell surface glycosylation in mediating repair of human airway epithelial cell Monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L982-92.

Dupuit F, Gaillard D, Hinnrasky J, et al. Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L165-76.

Dutta D, Sundaram SK, Teeguarden JG, et al. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. *Toxicol Sci* 2007;100:300-15.

Dyunstee ML, Verwoerd-Verhoef HL, Verwoerd CD, Van Osch GJ : The dual role of perichondrium in cartilage wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2002;110(4):1073-79.

Elad D, Naftali S, Rosenfeld M, Wolf M. Physical stresses at the air-wall interface of the human nasal cavity during breathing. *J Appl Physiol* 2006;100:1003-10.

Eng SP, Nilssen EL, Ranta M, White PS. Surgical management of septal perforation: an alternative to closure of perforation. *J Laryngol Otol* 2001;115(3):194-7.

Erkhan G, Tan Ergin N, Bilezikçi B: Comparison of suture and nasal packing in rabbit noses. *Laryngoscope* 2004;114:639-45.

Evans MJ, Cox RA, Shad SG, et al. The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989;1:463-69.

Evans MJ, Cox RA, Burke AS, Moller PC. Differentiation of anchoring junctions in tracheal basal cells in the growing rat. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;6:153-57.

Fairbanks DNF, Fairbanks GR: Nasal septal perforation: prevention and management. *Ann Plast Surg* 1980;5:452-9.

Fang SY, Ohyama M. Assessment of cell surface glycoconjugates in normal, benign and malignant human nasal mucosa. *Rhinology* 1997 Dec;35(4):166-70.

Ferin J, Oberdörster G, Penney DP. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1992;6:535-42.

Fitzpatrick MF, McLean H, Urton AM, Tan A, O'Donnell D, Driver HS. Effect of nasal or oral breathing route on upper airway resistance during sleep. *Eur Respir J.* 2003 Nov;22(5):827-32.

Flahaut E, Bacsá R, Peigney A, Laurent C. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chemical Communications* 2003 ;12 :1442-43.

Freidman CD, Costantino PD, Jones K, et al. Hydroxyapatite cement. II. Obliteration and reconstruction of the cat frontal sinus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991, Apr;117(4):385-9.

Friedmann A, Dard M, Kleber BM, et al. Ridge augmentation and maxillary sinus grafting with a biphasic calcium phosphate: histologic and histomorphometric observations. *Clin Oral Impl Res* 2009;20:708-14.

Gao X, Chen J, Tao W, et al. UEA I-bearing nanoparticles for brain delivery following intranasal administration. *Int J Pharm* 2007;340:207-215.

Gallagher J, Sams R, Inmon J, et al. Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in rat lung DNA following subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;190:224-31.

Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998;19(1-3):133-39.

Gerlinger I, Kárász T, Somogyvári K, et al. Extracorporeal septal reconstruction with polydioxanone foil. *Clin Otolaryngol* 2007;32:462-79.

Gilmour PS, Ziesenis A, Morrison ER, et al. Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;195:35-44.

Godin MS, Waldman R, Johnson CM. Nasal augmentation using Gore-Tex. A 10-year experience. *Arch Facial Plast Surg* 1999;1:118-21.

Gollom J: Perforation of the nasal septum : the reverse flap technique. *Arch Otolaryngol* 1968;88:518-22.

Golshani S, Zhou ZY, Gade P: Applications of medpor porous polyethylene in facial bone augmentation. *Am J Cosmet Surg* 1994;11:p105.

Goodman WS, Strelzow VV. The surgical closure of nasoseptal perforations. *Laryngoscope* 1982;92:121-4.

Gray LP. Deviated nasal septum. Incidence and etiology. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1978;87(Suppl 50):3-20.

Gray TE, Guzman K, Davis CW, et al. Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:104-12.

Green TR, Fisher J, Stone MH, et al. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials* 1998;19: 2297-302.

Groneberg DA, Peiser C, Dinh QT, et al. Distribution of respiratory mucin proteins in human nasal mucosa. *Laryngoscope* 2003;113:520-24.

Grymer LF, Melsen B. The morphology of the septum nasal in identical twins. *Laryngoscope* 1989;99:642-46.

Guerrerosantos J, Trabanino C, Guerrerosantos F. Multifragmented cartilage wrapped with fascia in augmentation rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:804–12.

Guilmette RA, Wicks JD, Wolff RK. Morphometry of human nasal airways in vivo using magnetic resonance imaging. *J Aerosol Med* 1989;2, 365–377.

Gulisano M, Pacini S, Ruggiero M, et al. In vitro effects of some differentiation inductors in metaplastic epithelium of the human nasal cavity *Cell Tissue Res* 1996;285:119-25.

Gürlek A, Ersoz-Ozturk A, Celik M, et al. Correction of the crooked nose using custom-made high density porous polyethylene extended spreader grafts. *Aesth Plast Surg* 2006;30(2):141-49.

Gurley JM, Pilgram T, Perlyn CA, Marsh JL. Long-term outcome of autogenous rib graft nasal reconstruction. 2001;108(7):1895-905; discussion 1906-7.

Gyenyey L, Kerenyi G. Bioplast fibrin implants in nasoseptal perforation. *Arch Otorhinolaryngol* 1977;218:143-5.

Haas R, Baron M, Donath K, Zechner W, Watzek G: Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus: a comparative histomorphometric study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002 May-Jun;17(3):337-346.

Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, et al. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 2005;26(17):3565-75.

Habibovic P, Kruyt MC, Juhi MV, et al. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. *J Orthop Res* 2008 ;26(10) :1363-70.

Haisch A, Gröger A, Radke C, et al. Macroencapsulation of human cartilage implants: pilot study with polyelectrolyte complex membrane encapsulation. *Biomaterials* 2000;21:1561-66.

Haisch A, Kläring S, Gröger A, et al. A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2002;259:316-21.

Haisch A, Duda GN, Schroeder D, et al. The morphology and biomechanical characteristics of subcutaneously implanted tissue-engineered human septal cartilage. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005;262:993-7.

Hakomori SI: Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res* 1985;45:2405-16.

Ham KS, Chung SC, Lee SH. Complications of oriental augmentation rhinoplasty. *Ann Acad Med Singapore*. 1983;12:406–62.

Hameed Hyder MA. Nanotechnology and environment: potential applications and environmental implications of nanotechnology. Master's Thesis, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2003, Allemagne. http://www.nanoforum.de/dateien/temp/HyderFinalV-NT_Thesis.pdf?03052005151941.

Hanamure Y, Deguchi K, Ohyama M : Ciliogenesis and mucus synthesis in cultured human respiratory epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994;103:889-95.

Harkema JR, Plopper CG, Hyde DM, et al. Nonolfactory surface epithelium of the nasal cavity of the bonnet monkey : a morphologic and morphometric study of the transitional and respiratory epithelium. *Am J Anat* 1987;180: 266-79.

Harkema JR, Hotchkiss JA, Henderson RF. Effects of 0.12 and 0.80 ppm ozone on rat nasal and nasopharyngeal epithelial mucosubstances: quantitative histochemistry. *Toxicol Pathol* 1989;17:525-35.

Harkema JR. Comparative aspects of nasal airway anatomy: relevance to inhalation toxicology. *Toxicol Pathol* 1991;19:321-36.

Harkema JR, Carey SA, Wagner JC. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol* 2006;34(3):252-69.

He LH, Standard OC, Huang T, et al. Mechanical behaviour of porous hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia* 2008;4:577-86.

Heald D, Berridge M, Muswick G, et al. Nasal biodistribution and pharmacokinetics of an aqueous formulation of triamcinolone acetonide utilizing positron emission tomography (PET). *Ann Allergy Asthma Immunology* 1997;78:96.

Health and Safety Executive. A review of the toxicity of particles that are intentionally produced for use in nanotechnology applications, seen from an occupational health perspective. [Sudbury, Suffolk, Great Britain] HSE,2004a :40 p.

<http://www.hse.gov.uk/aboutus/hsc/iacs/acts/watch/130105/p2annex1.pdf>.

Health and Safety Executive. Health effects of particles produced for nanotechnologies. HSE Hazard assessment document EH75/6. Sudbury, Suffolk, G.-B. HSE,2004b:37 p.

<http://www.hse.gov.uk/horizons/nanotech/healtheffects.pdf>.

Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, et al. Chronic inhalation exposure of wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black and titanium dioxide. *Inhal Tox* 1995;7:533-56.

Hemar P, Herman D, Piller P, et al. Results of the use of parietal bone as bone graft donor site in facial reconstruction. A propos of 71 cases. *Ann Chir Plast Esthet* 1995;40(4):349-56;discussion 357.

Herard AL, Zahm JM, Pierrot D, et al. Epithelial barrier integrity during in vitro wound repair of the airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:624-32.

Herzog E, Casey A, Lyng FM, et al. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials. The clonogenic assay. *Toxicol Lett* 2007;174:49-60.

Hett A, Nanotechnology: small matter, many unknowns. Zurich, Suisse , 2004a, Swiss Re, [http://www.swissre.com/INTERNET/pwsfilpr.nsf/vwFilebyIDKEYLu/ULUR68AKZF/\\$FILE/Publ04_Nano_en.pdf](http://www.swissre.com/INTERNET/pwsfilpr.nsf/vwFilebyIDKEYLu/ULUR68AKZF/$FILE/Publ04_Nano_en.pdf).

Hicks W Jr, Sigurdson L, Gabalski E, et al. Does cartilage down-regulate growth factor expression in tracheal epithelium ? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:1239-43.

Hingya Y. Complications of augmentation rhinoplasty in the Japanese. *Ann Plast Surg*. 1980;4:495-99.

- Holgate ST. Epithelial damage and response. *Clin Exp allergy* 2000;30(Suppl 1):37-41.
- Holgate ST, Devlin RB, Wilson SJ, Frew AJ. Health effects of acute exposure to air pollution. Part II: Healthy subjects exposed to concentrated ambient particles. *Res Rep Health Eff Inst* 2003;112:31-67.
- Hollinger JO, Battistone G. Biodegradable bone repair materials. *Clin Orthop* 1986;207:290-305.
- Homicz MR, Schumacher BL, Sah RL, Watson D. Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineered neocartilage composition. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;127:398-408.
- Homicz MR, McGowan KB, Lottman LM, et al. A compositional analysis of human nasal septal cartilage. *Arch Facial Plast Surg* 2003a;5:53-8.
- Homicz MR, Chia SH, Schumacher BL, et al. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginates, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. *Laryngoscope* 2003b;113:25-32.
- Hovenberg JW, Davies JR, Carlstedt I. Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochem J* 1996; 318:319-24.
- Huang H, Jing D, Li Z, Zhou S, Ma D. Histochemistry of glycoconjugates in nasal inverted papilloma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994 Feb;103(2):115-7
- Huczko A, Lange H, 2001. Carbon nanotubes: experimental evidence for a null risk of skin irritation and allergy. *Fullerene Science and technology* 9 (2): 247-50.
- Hussain A, Kay N. Tragal cartilage inferior turbinate mucoperiosteal sandwich graft technique for repair of nasal septal perforations. *J Laryngol Otol* 1992;106:893-5.
- Hoy N, Takano H, Hyo Y. Particle deposition efficiency of therapeutic aerosols in the human maxillary sinus. *Rhinology* 1989;27(1):17-26.
- IARC. Les procédés d'impression et les encres d'imprimerie, le noir de carbone et quelques composés nitrés aromatiques. International Agency for Research on Cancer (Centre international de recherche sur le cancer), 1996 ;vol 65:578 p.
- Ibald-Mulli A, Wichmann HE, Kreyling W, Peters A. Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *J. Aero Med* 2002;15:189-201.
- International Commission on Radiological Protection : Human respiratory tract model for radiological protection. *Ann ICRP Publ* 1994;66(24):1-3.
- Ishikawa S, Nakayama T, Watanabe M, Matzusawa T. Visualization of flow resistance in physiological nasal respiration: Analysis of velocity and vorticities using numeral simulation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132:1203-09.
- Itoh H, Smaldone GC, Swift DL, Wagner HN. Mechanisms of aerosol deposition in a nasal model. *J Aerosol Sci* 1985;16:529-534.
- Jackson MR, Ali AT, Bel C, et al. Aortofemoral bypass in young patient with premature atherosclerosis: is superficial femoral vein superior to Dacron?. *J Vasc Surg* 2004;40:17-23.

Jang YJ, Myong NH, Park KH, et al. Mucociliary transport and histologic characteristics of the mucosa of deviated nasal septum. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:421-24.

Jia G, Wang H, Yan L, et al. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ Sci Technol* 2005;39(5):1378-83.

Jung HH, Lee JH, Kim YT, et al. Expression of mucin genes in chronic ethmoiditis. *Am J Rhinol* 2000;14:163-70.

Jung DH, Kim BR, Choi JY, et al. Gross and pathologic analysis of long-term silicone implants inserted into the human body for augmentation rhinoplasty: 221 revisions cases. *Plast Reconstr Surg* 2007;120(7):1997-2003.

Kafienah W, Jakob M, Démarteau O, et al. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue Engineering* 2002;8(5):817-26.

Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin VA, et al. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on Raw 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicology Letters* 2006;165:88-100

Kaiser ML, Karam AM, Sepehr A, et al. Cartilage regeneration in the rabbit nasal septum. *Laryngoscope* 2006;116:1730-34.

Karnes J, Salisbury M, Schaeferle M, et al. Porous high-density polyethylene implants (Medpor) for nasal dorsum augmentation. *Aesth Surg J* 2000;20(1):26-30.

Katz LC, Burkhalter A, Dreyer WJ. Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex. *Nature* 1984;310: 498-500.

Keck T, Leiacker R, Klotz M, et al. Detection of particles within the nasal airways during respiration. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000; 257:493-497.

Keck T, Leiacker R, Kuhnemann S, et al. Detection of particles within the nasal airways before and after nasal decongestion. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2001;26(4):324-8.

Kelly MH, Bulstrode NW, Waterhouse N. Versatility of diced cartilage-fascia grafts in dorsal augmentation. *Plast Reconstr Surg* 2007;120:1654-59.

Kern EB, Facer GM, McDonald TJ. closure of nasal septum perforations with a Silastic® button. *Otolaryngology Dig* 1977;39:9-17.

Keyhani K, Scherer PW, Mozell MM. Numerical simulation of airflow in the human nasal cavity. *J Biomech Eng* 1995;117:253-63.

Kim DW, Egan KK, O'Grady K, Toriumi DM. Biomechanical strength of human nasal septal lining: comparison of the constituent layers. *Laryngoscope* 2005;115:1451-53.

Klawitter JJ, et al. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. *J Biomed Mater Res* 1976;10(2):311-23.

Kohler M, Fritzsche W. Nanotechnology, An Introduction to nanostructuring techniques. Weinheim, Germany, Wiley-VCH, 2004, 272p.

Konduru NV, Tyurina YY, Feng W, et al. Phosphatidylserine targets single-walled carbon nanotubes to professional phagocytes in vitro et in vivo. *PLoS One* 2009 ;4(2) :e4398.

Kontio R, Ruuttila P, Lindros L, et al. Biodegradable polydioxanone and poly(l/d)lactide implants: an experimental study on peri-implant tissue response. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34(7):766-76.

Kostarelos K, Lacerda L, Pastorin G, et al. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nat Nanotech* 2007;2:108-13.

Kreyling WG, Scheuch G. Chapter 7: Clearance of Particles deposited in the lungs. In: *Particle lungs interactions* (Gehr P, Heyder J, Eds), New-York – Basel: Marcel Dekker Inc,2000:p323-76.

Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, et al. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health* 2002;65(20):1513-30.

Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res* 1998;39:190-99.

Lackie PM, Baker JE, Gunthert U, Holgate ST. Expression of CD44 isoforms is increased in the airway epithelium of asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16:14-22.

Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Sciences* 2003;26: 1-21.

Lam SM, Kim YK. Augmentation rhinoplasty of the asian nose with the “Bird” silicone implant. *Ann Plast Surg* 2003;51:249-56.

Laoukili J, Perret E, Willems T, et al. IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 2001;108:1817-24.

Lattyak BV, Maas CS, Sykes JM. Dorsal onlay cartilage autografts. *Arch Facial Plast Surg* 2003;5:240-43.

Laurie SW, Kaban LB, Muliken JB, Murray JE. Donor site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg* 1984;73(6):933–8.

Lazard DS, Moore A, Hupertan V, et al. Muco-ciliary differentiation of nasal epithelial cells is decreased after wound healing in vitro. *Allergy* 2009;64:1136-43.

Lecomte A, Gautier H, Bouler JM, et al. biphasic calcium phosphate : a comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2008;84B:1-6.

Lee D, Joseph EM, Pontell J, Turk JB. Long-term results of dermal grafting for the repair of nasal septal perforations. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120:483-6.

Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;79:179-92.

Lee MK, Yoo JW, Lin H, et al. Air-Liquid Interface Culture of Serially Passaged Human Nasal Epithelial

Cell Monolayer for In Vitro Drug Transport Studies. *Drug Delivery* 2005;12:305–11.

Legeros ZR. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. *Monographs in Oral Science* ed. New-York: Karger; 1991, 201 p.

Li JG, Li WX, Xu JY, et al. Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. *Environ Toxicol* 2007;22:415-21.

Li XY, Brown D, Smith S, et al. Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* 1999;11(8):709-31.

Lindemann J, Kühnemann S, Stehmer V, et al. Temperature and humidity profile of the anterior nasal airways of patients with nasal septal perforation. *Rhinology* 2001;39:202-6.

Lindemann J, Keck T, Wiesmiller K, et al. A numerical simulation of intranasal air temperature during inspiration. *Laryngoscope* 2004;114:1037-41.

Liote H, Zahm JM, Pierrot D, Puchelle E. Role of mucus and cilia in nasal mucociliary clearance in healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1989;140(1):132-6.

Lundgren S, Andersson S, Gualini F, Sennerby L. Bone reformation with sinus membrane elevation: a new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation. *Clin Implant Dent Relat Res* 2004;6:165–73.

Magee WP Jr, Ajkay N, Freda N, Rosenblum RS. Use of fast-setting hydroxyapatite cement for secondary craniofacial contouring. *Plast Reconstr Surg* 2004;114(2):289-97.

Malda J, Kreijveld E, Temenoff JS, et al. Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifferentiation. *Biomaterials* 2003;24(28):5153-61.

Malda J, Woodfield TB, van der Vloodt F, et al. The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on the composition of tissue engineered cartilage. *Biomaterials* 2005;26(1):63-72.

Mangano C, Scarano A, Lezzi G, et al. Maxillary sinus augmentation using an engineered porous hydroxyapatite: a clinical, histological, and transmission electron microscopy study in man. *J Oral Implantol* 2006;32(3):122-31.

Maniglia AJ, Swim S. Parietal bone graft and titanium plate fixation in nasal reconstruction. *Laryngoscope* 1993;103(9):1066-72.

Martinez-Antón A, de Bolós C, Garrido M, et al. Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin Exp Allergy* 2006;36:448-57.

Maynard AD, Baron PA, Foley M, et al. Exposure to carbon nanotubes material: aerosol release during the handling of unrefined single walled carbon nanotube material. *J Toxicol Environ Health* 2004;67(1):87-107.

Mayne R, Vail M, Mayne PM, Miller EJ. Changes in the type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:1674-78.

McDowell EM, Becci PJ, Schurch W, et al. The respiratory epithelium.VII. Epidermoid metaplasia of hamster tracheal epithelium during regeneration following mechanical injury. *J Natl Cancer Inst* 1979;62:995-1008.

McKenzie M. *Manual of diseases of the nose and throat*. Churchill Ed. 1884, Londre. Vol 2: 432p.

McKinstry RE, Johnson JT. Acrylic nasal septal obturators for nasal septal perforations. *Laryngoscope* 1989;99:560-3.

McNicholas WT, Coffey M, Boyle T. Effects of nasal airflow on breathing during sleep in normal humans. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Mar;147(3):620-3.

Meghachi AS, Jankowski R, Védrine PO, Dugny O. Fermeture endoscopique des perforations septales par lambeau de rotation. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 2004 ;121(4) :222-28.

Mendelsohn M. Straightening the crooked middle third of the nose: using porous polyethylene extended spreader grafts. *Arch Facial Plast Surg* 2005;7(2):74-80.

Mercer RR, Scabilloni J, Wang L, et al. Alteration of deposition pattern and pulmonary response as a result of improved dispersion of aspirated single-walled carbon nanotubes in a mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294(1):L87–97.

Mery S, Gross EA, Joyner DR, et al. Nasal diagrams: a tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol Pathol* 1994;22(4):353-72.

Meyer R. *Secondary and fonctionnal rhinoplasty – The difficult nose*. Ed. Grüne and Stratton, New-York, 1988:p233.

Meyer R. Nasal septal perforations must and can be closed. *Aesthet Plast Surg* 1994;18:345-55.

Miot S, Woodfield T, Daniels AU, et al. Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition. *Biomaterials* 2005;26(15):2479-89.

Mladina R, Heinzl B. Cross-stealing technique for septal perforation closure. *Rhinology* 1995;33:174-76.

Mobley SR, Boyd JB, Astor FC. Repair of a large septal perforation with a radial forearm free flap: brief report of a case. *Ear Nose Throat J* 2001;80:512.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, et al.: The catalogue of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelial, tumors, and culture cells. *Cell*. 1982;31:11-24.

Moll R. *Cytokeratins as markers of differentiation: expression profiles in epithelia and epithelial tumors*. Stuttgart, Germany: Gustav Fisher; 1993.

Mondina Michel. *Evaluation de la qualité de vie après septoplastie. Etude prospective sur 1 an*, 162p. Thèse : Médecine : Bordeaux 2 : 2009, n°3092.

Monica Jr JC, Monica JC. A nano-mesothelioma false alarm. *Nanotechnology Law & Business*,2008, p 319-33.

Monteiro Rivier NA, Popp JA. Ultrastructural characterization of the nasal respiratory epithelium in the rat. *Am J Anat* 1984;169:31-43.

Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, et al. Multi-walled carbon nanotubes interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology Letters* 2005;155:377-84.

Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharm* 2009;234:222-35.

Morgensen C, Tos M. Density of goblet cells in the normal adult human nasal turbinates. *Anat Anz* 1977;142:322-30.

Moroni L, Hendriks JA, Schotel R, et al. Design of biphasic polymeric 3-dimensional fiber deposited scaffolds for cartilage tissue engineering applications. *Tissue Eng* 2007;13(2):361-71.

Nakajima Y, Kawanami O, Jin E, et al. Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways *Pathology International* 1998;48:944-53.

Naumann A, Aigner J, Staudenmaier R, et al. Clinical aspects and strategy for biomaterial engineering of an auricle based on three-dimensional stereolithography. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260(10):568-75.

Negus VE. *Comparative Anatomy and Physiology of the Nose and Paranasal Sinuses*. E&S Livingstone, Edinburgh, 1958.

Neugebauer P, Endepols H, Mickenhagen A, Walger M. Ciliogenesis in submersion and suspension cultures of human nasal epithelial cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260:325–30.

Newman SP, Moren F, Clarke SW. Deposition pattern of nasal sprays in man. *Rhinology* 1988;26(2):111-20.

Nikula KJ, Avila KJ, Griffith WC, Mauderly JL. Lung tissue responses and sites of particle retention differ between rats and Cynomolgus monkeys exposed chronically to diesel exhaust and coal dust. *Fund Appl Toxicol* 1997;37: 37-53.

Nocini PF, Bedogni A, Valsecchi S, et al. Fractures of the iliac crest following anterior and posterior bone graft harvesting. Review of the literature and case presentation. *Minerva Stomatol* 2003;52(10):441-48, 448-52.

Nunes CR, Simske SJ, Sachdeva R, et al. Long-term ingrowth and apposition of porous hydroxyapatite implants. *J Biomed Mater Res* 1997;36:560-3.

Núñez-Fernández D, Vokurka J, Chrobok V. Bone and temporal fascia graft for the closure of septal perforation. *J Laryngol Otol* 1998;112:1167-71.

Oberdörster G, Ferin J, Finkelstein G, Wade P, Corson N. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? II. Lung lavage studies. *J Aerosol Sci* 1990;21:384-91.

Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein G. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Env Health Persp* 1992;97:193-199.

Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, et al. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health* 2002;65(20):1531- 43.

Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 2004;16(6-7):437-45.

Oberdörster G. Inhaled Nano-sized Particles: Potential effects and Mechanisms. *Compte-rendu du First International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials, 2004, Buxton, Grande-Bretagne, Édité par le Health and Safety Executive, 2005, p35-46.* http://www.hsl.gov.uk/capabilities/nanosymrep_final.pdf.

Olhsén L. Closure of nasal septal perforation with a cutaneous flap and a perichondrocutaneous graft. *Ann Plast Surg* 1988;21:276-88.

Osma U, Cüreoglu S, Akbulut N, Meriç F, Topçu I: The results of septal button insertion in the management of nasal septal perforation. *J Laryngol Otol* 1999 Sept,113:823-24.

Ostiguy C, Lapointe G, Ménard L et al. Les nanoparticules : connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en santé et en sécurité au travail. Ed. IRSST, 2006, Montréal, Québec-90 p. (www.irsst.qc.ca)

Otori N, Carlsoo B, Stierna P. Changes in glycoconjugate expression of the sinus mucosa during experimental sinusitis: a lectin histochemical study of the epithelium and goblet cell development. *Acta Otolaryngol* 1998;118(2):248-56.

Ozlugedik S, Nakiboglu G, Sert C, et al. Numerical study of the aerodynamic effects of septoplasty and partial lateral turbinectomy. *Laryngoscope* 2008;118:330-8.

Öztürk S, Sengezer M, Coskun Ü, Zor F. An unusual complication of a Medpor implant in nasal reconstruction: A cas report. *Aesth Plast Surg* 2002;26:419-22.

Pabbruwe MB, Esfandiari E, Kafienah W, et al. Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials* 2009;30:4277-86.

Palma VC, Magro-Filho O, de Oliveria JA, et al. Bone reformation and implant integration following maxillary sinus membrane elevation: an experimental study in primates. *Clin Implant Dent Relat Res* 2006;8:11–24.

Papa F, Cortese A, Maltarello MC, Saggiocco R, Felice P, Claudio PP: Outcome of 50 consecutive sinus lift operations. *British J Oral Maxillofacial Surg* 2005;43:309-13.

Paris J, Facon F, Thomassin JM. Saddle nose surgery: long term aesthetic outcomes of support grafts. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2006;127(1):37–40.

Pasquet J. Conceptions actuelles en matière de chirurgie reconstructrice de la cloison nasale. Thèse médecine, Université Bordeaux 2, 1974, n°265 :p 54.

Pautrat JL. *Demain le nanomonde, Voyage au coeur du minuscule*. Paris, Fayard, 2003,250 p.

Pech A, Canoni M. *La rhinoplastie personnalisée*. Springer-Verlag Ed,Paris, 1993:229p.

- Peltola MJ, Aitasalo KM, Suonpaa JT, et al. In vivo model for frontal sinus and calvarial bone defect obliteration with bioactive glass S53P4 and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 2001;58(3):261-69.
- Pennington AK, Ratcliffe JH, Wilson CG, Hardy JG: The influence of solution viscosity on nasal spray deposition and clearance. *International journal of pharmaceuticals*, 1998; 43: 221 – 224.
- Pensler J, McCarthy JG. The calvarial donor site : an anatomic study in cadavers. *Plast Reconstr Surg* 1985;75(5):648-51.
- Petrzelli GJ, Stankiewicz JA: Frontal sinus obliteration with hydroxyapatite cement. *Laryngoscope* 2002,Jan;112(1):32-6.
- Pirsig W, Bean JK, Lenders H, et al. Cartilage transformation in a composite graft of demineralized bovine bone matrix and ear perichondrium used in a child for the reconstruction of the nasal septum. *Int J Ped Otorhinolaryngol.* 1995;32:171–81.
- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnology* 2008;3(7), 423-28.
- Popko M, Bleys R, de Groot JW, Huizing EH. Histological structure of the nasal cartilages and their perichondral envelope. I. The septal and lobular cartilage. *Rhinology* 2007;45:148-52.
- Posnick JC, Seagle MB, Armstrong D. Nasal reconstruction with full-thickness cranial bone grafts and rigid internal skeleton fixation through a coronal incision. *Plast Reconstr Surg* 1990;86(5):894–904.
- Post RH. Hereditary cause septal deviation. *Soc Biol* 1969;16:179.
- Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 2005;36(Suppl 3):S8-S12.
- Proctor DF. Airborne disease and the upper respiratory tract. *Bacteriol Rev* 1966;30:498–513.
- Proctor DF. The upper airways: nasal physiology and defense of the lungs. *Am Rev Respir Dis* 1977;115:97–129.
- Puddicombe SM, Polosa R, Richter A et al. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J* 2000;14(10):1362-74.
- Quante M, Frazen G, Strauss P. The correlation between permanent septal deformities and nasal trauma during birth. *Rhinology* 1976;14(3):141-46.
- Ramakrishnan JB, Danner CJ, Yee SW. The use of porous polyethylene implants to correct nasal valve collapse. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;136:357-61.
- Ratner M, Ratner D. *Nanotechnologies La révolution de demain*, Paris, France, Campus Press, 2003,191 p.
- Raulo Y, Baruch J. Use of the calvarium for bone grafting in cranio-maxillo-facial surgery. *Chirurgie* 1990;116(4-5):359-62.
- Reck R, Aurbach G. Therapy of ozena. *Laryngorhinootologie* 1991, Jan;70(1):21-3.

Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* 2004; 61:442-47.

Reznik GK. Comparative anatomy, physiology, and function of the upper respiratory tract. *Environ Health Perspect* 1990;85:171-76.

Richmon JD, Sage A, Van Wong W, et al. Compressive biomechanical properties of human nasal septal cartilage. *Am J Rhinol* 2006;20(5):496-501.

Riechelmann H, Rettinger G. Three-step reconstruction of complex saddle nose deformities. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:334-8.

Romo T 3rd, Jablonski RD. Nasal reconstruction using split calvarial grafts. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;107(5):622-30.

Romo T 3rd, Jablonski RD, Shapiro AL, McCormick SA. Long-term nasal mucosa tissue expansion use in repair of large nasoseptal perforations. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995 Mar;121(3):327-31.

Romo T 3rd, Sclafani AP, Sabini P. Reconstruction of the saddle nose deformity using composite allo-implants. *Facial Plast Surg* 1998;14(2):151-7.

Romo T 3rd, Kwak ES, Sclafani AP. Revision rhinoplasty using porous high-density polyethylene implants to reestablish ethnic identity. *Aesth Plast Surg* 2006;30:679-84.

Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006;86:245-78.

Rothstein SG, Jacobs JB. The use of Gore-Tex implants in nasal augmentation operations. *Entechnology* 1989:p40,42,44-5.

Rotter N, Aigner J, Naumann A, et al. Cartilage reconstruction in head and neck surgery : comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mater Res* 1998;42:347-56.

Rotter N, Haisch A, Bücheler M. Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005;262:539-45.

Royal Academy of Engineering and Royal Society. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. London, G.-B. Royal Society, 2004, 116 p. <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.html>

Rupprecht S, Merten HA, Kessler P, Wiltfang J. Hydroxyapatite cement (Bonesource) for repair of critical sized calvarian defects—an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg* 2003;31(3):149-53.

Ryman-Rasmussen, JP, Tewksbury EW, Moss OR, et al. Inhaled multiwalled carbon nanotubes potentiate airway fibrosis in murine allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;40:349–58.

Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, et al. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol* 2006;43(3):193-201.

Sarukawa S, Sugawara Y, Harii K. Cephalometric long-term follow-up of nasal augmentation using iliac bone graft. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;32:233-35.

- Schiller CF, Gebhart J, Heyder J, et al. Deposition of monodisperse insoluble aerosol particles in the 0.0005 to 0.2 μm size range within the human respiratory tract. *Ann Occup Hyg* 1988;32(suppl 1):41-9.
- Schreider JP, Raabe OG. Anatomy of the nasal-pharyngeal airway of experimental animals. *Anat Rec* 1981 ;200, 195–205.
- Schultz-Coulon HJ. Experiences with the bridge-flap technique for the repair of large nasal septal perforations. *Rhinology* 1994;32:25-33.
- Schultz-Coulon HJ. Three-layer repair of nasoseptal defect. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132:213-18.
- Seyhan T, Kircelli BH, Caglar B. Correction of septal and midface hypoplasia in maxillonasal dysplasia (Binder's syndrome) using high-density porous polyethylene. *Aesth Plast Surg* 2009a;33:661-65.
- Seyhan T, Borman H, Deniz M, Kocer E. Intranasal porous polyethylene implant extrusion 7 years after insertion in a patient with Hashimoto disease. *J Craniofac Surg* 2009b;20(1):73-4.
- Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, et al. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106(2):203-9.
- Sherris DA, Kern EB. The versatile autogenous rib graft in septorhinoplasty. *Am J Rhinol* 1998;12(3):221-27.
- Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol* 2005;289:L698–L708.
- Shvedova AA, Fabisiak JP, Kisin ER, et al. Sequential exposure to carbon nanotubes and bacteria enhances pulmonary inflammation and infectivity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38(5):579–90.
- Shvedova AA, Kisin ER, Porter D, et al. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus ? *Pharm Therapeutics* 2009;121:192-204.
- Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound healing. An Overview. *Otolaryngol Clin North Am* 1995;28:847-64.
- Song HM, Lee BJ, Jang YJ. Processed costal cartilage homograft in rhinoplasty. The asan medical center experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134(5):485-89.
- Soto K, Garza KM, Murr LE. Cytotoxic effects of nanomaterials. *Acta Biomaterialia* 2007;3:351–58.
- Soudant J. Nez déviés; in Sénéchal G, Pech A, Wayoff M, et al. Rhinoplastie esthétique, fonctionnelle et reconstructrice. Rapport de la Société Française d'ORL et de Pathologie Cervico-Faciale. Ed. Arnette, Paris, 1989 :p208-36.
- Sous M, Bareille R, Rouais F, et al. Cellular biocompatibility and resistance to compression of macroporous β -tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1998;19:2147-53.

Spector M, Harmon SL, Kreutner A: Characteristics of tissue growth into Proplast and porous polyethylene implants in bone. *J Biomed Mat Res* 1979;13:677-92.

Srouji S, Kizhner T, Ben David D, et al. The schneiderian membrane contains osteoprogenitor cells: invivo and in vitro study. *Calcif Tissue Int* 2009;84:138-45.

Stelter K, Strieth S, Berghaus A. Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: chances and risks. *Rhinology* 2007;4(4):325-31.

Stewart MG, Smith TL, Weaver EM, et al. Outcomes after nasal septoplasty: results from the Nasal Obstruction Septoplasty Effectiveness (NOSE) study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(3):283-90.

Stoll D, Dolivet G, el Hussein A. Sensitive innervation of the nasal mucosa: current concepts. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 1990;111(3):271-3

Stoll D, Dolivet G, el Hussein A. Autonomic innervation of the vessels of the nasal mucosa: current concepts. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 1991;112(3):273-5.

Stoor P, Soderling E, Grénman. Bioactive Glass S53P4 in repair of septal perforations and its interactions with the respiratory infection-associated microorganisms *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biomed Mater Res* 2001;58(1):113-20.

Stoor P, Grenman –Reider. Bioactive glass and turbinate flaps in the repair of nasal septal perforation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113(8):655-61.

Stosiek P, Kasper M, Moll R. Changes in cytokeratin expression accompany squamous metaplasia of the human respiratory epithelium. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;421(2):133-41.

Striker M, Raphaël B. Croissance crânio-faciale normale et pathologique. *Morphos Ed, Reims, 1993:580p.*

Stucker FJ, Lian T, Sanders K. Management of severe bilateral nasal wall collapse. *Am J Rhino* 2002;16(5):243-8.

Stupak HD, Moulthrop T, Wheatley P, et al. Calcium hydroxylapatite gel (Radiesse) injection for the correction of postrhinoplasty contour deficiencies and asymmetries. *Arch Facial Plast Surg* 2007;9:130-36.

Suratt PM, Turner BL, Wilhoit SC. Effect of intranasal obstruction on breathing during sleep. *Chest* 1986 Sep;90(3):324-9.

Tabata Y, Ikada Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophages. *Biomaterials* 1988;9:356-62.

Takahashi R. Malformations of the nasal septum. In: *A collection of ear, nose and throat studies.* Jekei Univ Ed (Tokyo) 1972:1-95.

Takahashi R. The formation of nasal septum deviation in human evolution. *Rhinology* 1977;XV:159-165.

Teague EC. Responsible development of nanotechnology National Nanotechnology Initiative Meeting, April 2, 2004. [S.l.] National Nanotechnology Initiative, 2004, 29 p. [http://www.nano.gov/html/res/Infocast 2004 PresentationB.pdf](http://www.nano.gov/html/res/Infocast%202004%20PresentationB.pdf).

Ten Koppel PG, van Osch GJ, Verwoerd CD, Verwoerd-Verhoef HL. A new in vivo model for testing cartilage grafts and biomaterials: the 'rabbit pinna punch-hole' model. *Biomaterials* 2001;22(11):1407-14.

Tjälve H, Henriksson J. Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *NeuroToxicology* 1999 ;20(2-3):181-96.

Torjussen W, Solberg LA, Høgetveit AC. Histological changes of the nasal mucosa in active and retired nickel workers. *BR J Cancer*. 1979;40(4):568-80.

Turegun M, Acarturk TO, Ozturk S, et al. Aesthetic and functional restoration using dorsal saddle shaped Medpor implant in secondary rhinoplasty. *Ann Plast Surg* 2008;60:600-3.

Üstünel I, Çaylı S, Güney K, et al. Immunohistochemical distribution patterns of collagen type II, chondroitin-4-sulfate, laminin and fibronectin in human nasal septal cartilage. *Acta Histochem* 2003;105(2):109-14.

Van Dishoeck HAE. The part of the valve and the turbinates in total nasal resistance. *Int Rhinol* 1965;3(1):19-25.

Verwoerd-Verhoef HL, ten Koppel PGJ, van Osch GJVM, Verwoerd CDA. Induction in vivo of cartilage grafts for craniofacial reconstruction. *Am J Rhinol* 1998a;12:27–31.

Verwoerd-Verhoef HL, ten Koppel P, van Osch G, et al. Wound healing of cartilage structures in the head and neck region. *Int J Ped Otorhinolaryngol* 1998b;43:241-51.

Vetter U, Heit W, Heinze E, et al. Growth of the human septal cartilage: cell density and colony formation of septal chondrocytes. *Laryngoscope* 1984a;94(9):1226-9.

Vetter U, Pirsig W, Helbing G, et al. Patterns of growth in human septal cartilage: a review of new approaches. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1984b;7(1):63-74.

Vittorio O, Raffa V, Cuschieri A. Influence of purity and surface oxidation on cytotoxicity of multiwalled carbon nanotubes with human neuroblastoma cells. *Nanomed NBM* 2009;xx:1-8, doi:10.1016/j.nano.2009.02.006.

Vuola J, Goransson H, Bohling T, Asko-Seljavaara S. Bone marrow induced osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants. *Biomaterials* 1996; 17(18): 1761-6.

Vuyk HD, Vershuis RJ. The inferior turbinate flap for closure of septal perforations. *Clin Otolaryngol* 1988;13:53-7.

Wang SM, Inthavong K, Wen J, Tu JY, Xue CL : Comparison of micron- and nanoparticle deposition patterns in a realistic human nasal cavity. *Resp Phys Neurobiol* 2009;166:142-151.

Wang X, Rao S, Ajdelsztajn L, et al. Iliac crest cancellous bone elastic modulus and hardness differ with bone formation rate per bone surface but not by existence of prevalent vertebral fracture. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2008;85B:68-77.

Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, et al. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* 2004 ;77:117-25.

Watzinger F, Wutzl A, Wanschitz F, et al. Biodegradable polymer membrane used as septal splint. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37:473-77.

Weber R, Keerl R, Radziwill R, et al. Videoendoscopic analysis of nasal steroid distribution. *Rhinology* 2001 Jun;37(2):69-73.

Wellisz T, Kanel G, Anooshian RV: Characteristics of tissue response to Medpor porous polyethylene implants in the human facial skeleton. *J Long-Term Eff Med Implant* 1993;3(3):223-35.

Wick P, Manser P, Limbach LK, et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology Letters* 2007;168:121-31.

Wickstrom C, Davies JR, Eriksen GV, et al. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J* 1998;334:685–93.

Witschger O, Fabries JF. Particules ultrafines et santé au travail: 1- caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *Hygiène et sécurité du travail. Cahiers de notes documentaires, INRS, 2005a ;199:21-35.*

Witschger O, Fabries JF. Particules ultrafines et santé au travail: 2 – sources et caractérisation de l'exposition. *Hygiène et sécurité du travail. Cahiers de notes documentaires, INRS, 2005b ;199:37-54.*

Woolford TJ, Jones NS. Repair of nasal septal perforations using local mucosal flap and a composite cartilage graft. *J Laryngol Otol* 2001 Jan;115:22-25.

Wörle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K., Krug, F. Oops they did it again ! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Letters* 2006;6(6):1261-68.

Wu W, chen F, Feng X, et al. Engineering cartilage tissues with the shape of human nasal alar by using chondrocyte macroaggregate-Experiment study in rabbit model. *J Biotech* 2007;130:75-84.

Yacobi NR, Phuleria HC, Demaio L, et al. Nanoparticle effects on rat alveolar epithelial cell monolayer barrier properties. *Toxicol. In Vitro* 2007;21:1373–81.

Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* 1997;18:1037-41.

Yeh TH, Tsai CH, chen YS, et al. Increased communication among nasal epithelial cells in air-liquid interface culture. *Laryngoscope* 2007;117:1439-44.

Yigit O, Akgul G, Alkan S, et al. Changes occurring in the nasal mucociliary transport in patients with one-sided septum deviation. *Rhinology* 2005;43:257-60.

Yoon JH, Moon HJ, Seong JK, et al. Mucociliary differentiation according to time in human nasal epithelial cell culture. *Differentiation* 2002;70:77–83.

Yuan H, Kurashina K, Joost De Bruijn D, et al. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1999;20:1799-1806.

Zahm JM, Kaplan H, Herard AL, et al. Cell migration and proliferation during in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997;37:33-43.

Zhang Q, Kusaka Y, Donaldson K. Comparative pulmonary responses caused by exposure to standard cobalt and ultrafine cobalt. *J Occup Health* 2000;42:179-84.

Zhang Z, Kleinstreuer C, Donohue JF, Kim CS. Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *J Aerosol Sc* 2005;36(2):211-233.

Ziegelaar BW, Aigner J, Staudenmaier R, et al. The characterisation of human respiratory epithelial cells cultured on resorbable scaffolds: first steps towards a tissue engineered tracheal replacement. *Biomaterials* 2002;23:1425-38.

Zijderveld SA, ten Bruggenkate CM, van den Bergh J, Schulten E. Fractures of the iliac crest after split-thickness bone grafting for preprosthetic surgery: report 3 cases and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:781-86.

Zwartz GJ, Guilmette RA. Effect of flow rate on particle deposition in a replica of a human nasal airway. *Inhal Tox* 2001;13:109-127.

Zysset PK, Guo XE, Hoffler CE, et al. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *J Biomech* 1999;32:1005-12.