



École doctorale : Sciences du Mouvement Humain – ED463  
Institut des Sciences du Mouvement Étienne-Jules MAREY  
UMR 7287 (Aix-Marseille & CNRS)

## THÈSE DE DOCTORAT

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur  
Discipline : **Sciences du Mouvement humain**  
Spécialité : **Biomécanique**

Par

**Flavy Roseren**

# Caractérisation et amélioration de l'os en cours de régénération : application à la distraction ostéogénique

Soutenue le 09/04/2021 devant le jury :

<b>Thierry HOC</b>	PR, École Centrale de Lyon	Rapporteur
<b>Hervé PETITE</b>	DR, Université Paris Diderot	Rapporteur
<b>Patrick CAÑADAS</b>	MCF, Université de Montpellier	Examinateur
<b>Franck LAUNAY</b>	PUPH, Aix-Marseille Université	Examinateur
<b>Martine PITHIOUX</b>	DR, Aix-Marseille Université	Directrice de thèse
<b>Sandrine ROFFINO</b>	MCF, Aix-Marseille Université	Invitée

Numéro national de thèse/suffixe local : 2017AIXM0001/001ED6

# Résumé

La distraction ostéogénique (DO) est une technique chirurgicale utilisée dans divers cas cliniques, permettant la correction de discordance de membres d'origine pathologique ou non, autorisant un gain de taille chez des patients atteints d'achondroplasie ainsi que la correction de défauts osseux importants à la suite de traumatismes ou d'excision de tumeur osseuse. Ce protocole est organisé en trois phases distinctes. La première phase dite de latence débute après la chirurgie d'ostéotomie, avec la mise en place du fixateur externe et l'induction de fracture. S'ensuit une phase de distraction active où le fixateur externe est actionné éloignant ainsi les segments osseux l'un par rapport à l'autre. Une fois l'allongement désiré atteint, la phase de consolidation débute permettant au régénérat osseux de se développer et se minéraliser. À l'heure actuelle, le processus de DO est un protocole complexe, long et qui entraîne de multiples complications telles que des infections, des pseudarthroses, des luxations, des contractures, des non-unions osseuses et des fractures itératives ou des déformations osseuses après ablation du fixateur externe. Autour de la DO gravite un grand nombre d'interrogations que ce soit sur les principes sous-jacents liés à l'ostéogenèse par l'interaction de phénomènes de vascularisation et de formation osseuse, ou sur la caractérisation des propriétés mécaniques des divers tissus présents au sein du cal osseux.

Pour cette thèse, deux aspects de recherche ont été définis : la caractérisation des propriétés mécaniques des tissus minéralisés au cours de la DO et l'amélioration du processus de régénération. Nous avons établi un modèle expérimental de distraction du fémur chez le rat en développant un fixateur externe ainsi qu'une ancillaire. Ce protocole nous a permis d'obtenir un régénérat osseux fonctionnel validé par l'analyse des propriétés architecturales et mécaniques de ce dernier.

L'analyse des propriétés mécaniques à l'échelle microscopique via des essais d'indentation, nous a permis d'observer une augmentation des paramètres mécaniques dans la phase de consolidation traduisant une évolution temporelle. De plus, les paramètres étudiés étaient également dépendants des zones observées (cal périosté ou endosté), montrant aussi des variations d'un point de vue spatial du cal osseux.

Le second aspect s'est porté sur l'analyse des effets d'une faible dose systémique du facteur de croissance G-CSF sur la consolidation osseuse. Celui-ci joue un rôle sur la mobilisation des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques (CSPH), des cellules progénitrices endothéliales (CPE) et des cellules stromales mésenchymateuses (CSM). La néovascularisation et la minéralisation ont été surveillées longitudinalement à l'aide de la tomographie par émission de positons et de la scintigraphie. Une analyse histologique a été effectuée et le nombre de CSPH, CPE et CSM circulantes a été étudié par cytométrie de flux. Les données obtenues nous indiquent que le G-CSF accélère la régénération osseuse et module la mobilisation des cellules souches/progénitrices pendant la DO.

**Mots-clés :** Ingénierie tissulaire, Microindentation, Cellules souches/progénitrices, G-CSF, Distraction ostéogénique

# Abstract

Distraction osteogenesis (DO) is a surgical technique used in various clinical cases, to correct discrepancies of limbs (pathological or non-pathological origin), allowing a gain in size in patients with achondroplasia as well as the correction of important bone defects following trauma or bone tumor excision. This protocol is organized in three distinct phases. The first so-called latency phase starts after osteotomy surgery, with the placement of the external fixator and the induction of fracture. Then, an active distraction phase in which the external fixator is activated, moving the bone segments away from each other. Once the desired elongation is reached, the consolidation phase begins, allowing the bone regeneration to develop and mineralize. At present, the DO process is a complex, lengthy protocol that involves multiple complications such as infections, pseudarthrosis, dislocations, contractures, bone non-union and iterative fractures, or bone deformations after removal of the external fixator. Many questions still revolve around the DO, whether on the underlying principles related to osteogenesis via the interaction of vascularization and bone formation phenomena or on the characterization of the mechanical properties of the various tissues present within the callus.

Thus, during this thesis two aspects of research were defined: the characterization of the mechanical properties of mineralized tissues during DO and the improvement of the regeneration process. We have established an experimental model of femur distraction in the rat by developing an external fixator and an ancillary device. This protocol allowed us to obtain a functional bone regeneration validated by the analysis of its architectural and mechanical properties.

The analysis of the mechanical properties at the microscopic scale via indentation tests allowed us to observe an increase in the mechanical parameters in the consolidation phase, reflecting a temporal evolution. Moreover, the observed parameters were also dependent on the areas examined (periosteal or endosteal callus), also showing variations from a spatial point of view of the bone callus.

The second aspect concerned the analysis of the effects of a low systemic dose of G-CSF growth factor on bone consolidation. This affects the mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC), endothelial progenitor cells (EPC) and mesenchymal stromal cells (MSC). Neovascularization and mineralization were monitored longitudinally using positron emission tomography and scintigraphy. Histological analysis was performed and the number of circulating HSPC, EPC and MSC was studied by flow cytometry. The data obtained indicate that G-CSF accelerates bone regeneration and modulates stem/progenitor cells mobilization during DO.

**Key words:** Tissue engineering, Microindentation, Stem/progenitor cells, G-CSF, Distraction osteogenesis

*« Les joies intellectuelles ne s'obtiennent pas au rabais, on ne peut pas les provoquer artificiellement. Elles sont forcément le résultat d'un combat que l'on mène pour comprendre des idées, des phénomènes ou des concepts. Je les comparerais volontiers à la joie qu'éprouve l'alpiniste qui pose son pied sur un sommet. Celle-ci n'a rien à voir avec celle d'un touriste qui aurait été déposé là-haut en hélicoptère. Les deux contemplant au bout du compte le même panorama, mais avec des émotions différentes. »*

***Etienne Klein***

# Remerciement

Ce travail de recherche a été mené au sein de l'école doctorale 463 « Science du Mouvement Humain » au sein de l'équipe GIBOC appartenant à l'Institut des Sciences du Mouvement. De multiples collaborations ont été mises en place au cours de ces travaux, c'est pourquoi je vais profiter de ces quelques lignes pour exprimer ma reconnaissance. Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement ma directrice de thèse, Mme la Directrice Martine Pithioux, de m'avoir soutenue pendant toutes ses années. Notre histoire a débuté dès ma troisième année de Licence où j'ai pu découvrir l'équipe GIBOC ainsi que les différents axes de recherche qu'elle proposait. C'est en assistant à des essais d'arrachement de vis dans le cadre d'un projet portant sur l'optimisation d'un nouvel implant rachidien que j'ai pu connaître Martine. Par la suite, dans mes années de Master, j'ai pu développer mes connaissances scientifiques, allant de la mise en place d'essai in vivo à des essais de caractérisation mécanique du tissu, en passant par de l'analyse histologique, grâce au fait que tu es bien voulu de moi comme stagiaire. Je te remercie également d'avoir cru en moi en me donnant l'opportunité de participer au concours de l'école doctorale sans quoi je ne serais pas là où j'en suis à présent. Je te remercie d'avoir été à l'écoute pendant toutes ses années, du soutien, des bons moments passés ensemble et de m'avoir laissé une liberté dans ma recherche, me permettant ainsi de faire des collaborations qui je l'espère perdureront sur le long terme. Je tiens également à remercier le Professeur Patrick Chabrand qui est un homme de grande ressource et bienveillant. En dehors de l'aspect intellectuel, Patrick tu as été pour moi aussi quelqu'un de bon conseil qui m'a appris à prendre du recul et je t'en remercie pour cela. Je tiens à remercier Mme la docteure Sandrine Roffino, pour ses conseils, son implication dans mes travaux, et sa disponibilité pour le bon déroulement de ces derniers. Par la même occasion, je tiens à remercier Cécile Genovesio pour sa douceur et son aide dans ces travaux. Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes de l'équipe GIBOC en odontologie, Charlotte pour ta bonne humeur et réactivité notamment lorsque j'avais besoin de cellules pour mes pré-essais et le M. le Professeur Imad About pour les agréables discussions et la mise en disponibilité des outils. Concernant, l'équipe GIBOC sur Sainte Marguerite Dromel, je remercie Jean-Marie, Jean-Louis, Virginie, Cécile, Martine, Patrick, Sophie tous grandement pour ces moments d'amusement passés à table (quand c'était encore possible) et tous ces souvenirs qui se sont créés avec les années. Je tiens à remercier particulièrement Sophie Seguinél qui est le rayon de soleil du laboratoire. Merci Sophie pour ces moments de rigolade, ton implication à n'importe quel temps et ta rapidité d'exécution pour trouver des solutions, donc un grand merci et attention de ne pas te fourvoyer. Enfin, je tiens à

remercier les anciens doctorants Jean-Baptiste pour ton humour dont je ne me lasserai jamais et Marie Semaan pour ses discussions et les prises de tête sur la machine d'indentation. Je remercie également les nouveaux doctorants : Meysam, Maryama, Sandra et Claire, je vous souhaite que de la réussite pour l'avenir. Bien évidemment, je remercie Gaëtan Aüllo-Rasser, que de moments passés ensemble depuis le Master, on a commencé ensemble et on a fini ensemble. Je suis très heureuse d'avoir pu être ta compère de thèse, on aura bien rigolé et réfléchi ensemble, une belle amitié s'est formée et je suis certaine qu'elle durera encore longtemps. Et je vais remercier grandement Barthélemy Faudot, mon deuxième compère de thèse. Ce fut une des plus belles rencontres de cette thèse. Dès le départ le contact est bien passé et avec les années il n'a fait que grandir. Je suis heureuse d'avoir fait ta connaissance, et je te remercie aussi pour tous ces moments de joie et de rigolade. Et je me souviendrais, je pense, toute ma vie de cette période de rédaction de mémoire avec toi. On a été dans le même bateau, il y a eu des moments de folie, de fatigue, de rigolade, avec des cycles délétères. Donc merci à vous deux pour toutes ses aventures, on n'aura hélas pas pu finir ce tournoi de ping-pong, mais ce n'est que partie remise. Pour finir, je tiens également à remercier ma famille qui m'a supportée toutes ces années, merci papa (Ludovic Roseren) et maman (Maria Roseren) d'avoir toujours été là pour moi, de votre amour et de m'avoir aidé à travers ces années. Un grand merci à mon frère (Fabiano Roseren) pour son soutien permanent et ses moments de complicités qui n'ont fait que croître depuis des années. Merci de m'avoir aidé et logé je m'en souviendrais toute ma vie. Je tiens également à remercier profondément Romaric Burtschell, qui a toujours été là pour moi, qui m'a accompagné pendant cette thèse et m'a soutenu même lorsque j'étais stressée. Notre amour en est ressorti plus grand donc merci à toi, tu as été mon petit échappatoire quand je n'avais pas le moral, mais tu as aussi été mon coach pour me pousser à aller plus loin donc merci beaucoup et je t'aime plus que tout. Enfin, je vais remercier Mme. la Docteure Marielle Cantillon pour son soutien, les moments de joie et ses conseils au fil des années. Et je la remercie grandement pour son aide dans la relecture de ce manuscrit. Merci à M. le Professeur Yves Burtschell pour les moments de rigolade passés ensemble, son humour incontournable et les souvenirs créés depuis quelques années qui perdureront encore longtemps.

Merci à M. le Professeur Thierry Hoc de l'École Centrale de Lyon et M. le Directeur Hervé Petite de l'Université Paris Diderot d'avoir pris le temps d'évaluer et critiquer mon travail de thèse. Merci à M. le docteur Patrick Canadas de l'Université de Montpellier, à M. le Professeur Franck Launay et Mme. la Docteure Sandrine Roffino d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de critiquer ces travaux.

# Abréviation

<b>AMM</b> : -----	Autorisation de mise sur le marché
<b>Ang</b> : -----	Angiopoïétines
<b>ANSM</b> : -----	Agence Nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
<b>Arg</b> : -----	Arginine
<b>Asp</b> : -----	Aspartique
<b>BA/TA</b> : -----	Fraction surfacique osseuse
<b>BMP</b> : -----	Bone morphogenetic protein
<b>BV/TV</b> : -----	Fraction volumique osseuse
<b>Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub></b> : -----	Cristaux d'hydroxyapatite
<b>CD</b> : -----	Cluster de différenciation
<b>CMF</b> : -----	Cytométrie en flux
<b>CPE</b> : -----	Cellules progénitrices endothéliales
<b>CS</b> : -----	Cellules souches
<b>CSA</b> : -----	Aire de la section transverse
<b>CSH</b> : -----	Cellules souches hématopoïétiques
<b>CSM</b> : -----	Cellules stromales mésenchymateuses
<b>CSPH</b> : -----	Cellules souches/progénitrices hématopoïétiques
<b>Ct.Th</b> : -----	Épaisseur corticale
<b>CXCR4</b> : -----	CXC motif chemokine Receptor 4
<b>DO</b> : -----	Distraction ostéogénique
<b>E</b> : -----	Module d'Young
<b>Er</b> : -----	Module réduit
<b>F3P</b> : -----	Flexion trois-points
<b>F4P</b> : -----	Flexion quatre points
<b>FGF</b> : -----	Fibroblast growth factor
<b>FIZ</b> : -----	Interzone fibreuse
<b>FSW</b> : -----	Forward angle Scatter
<b>G-CSF</b> : -----	Granulocyte colony Stimulating factor
<b>GAG</b> : -----	Glycosaminoglycanes
<b>Gly</b> : -----	Glycine
<b>GPa</b> : -----	Giga Pascal
<b>H</b> : -----	Dureté
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b> : -----	Hypoxia inducible factor1- $\alpha$
<b>HMDP</b> : -----	Hydroxyméthylène diphosphonate
<b>IL</b> : -----	Interleukines
<b>IGF</b> : -----	Insulin-like growth factor
<b>M-CSF</b> : -----	Macrophage colony-stimulating factor
<b>MCF</b> : -----	Zone de formation de microcolonne
<b>MEC</b> : -----	Matrice extracellulaire
<b>Micro-CT</b> : -----	Microtomographie aux rayons X

<b>MMA</b> : -----	Méthacrylate de méthyle
<b>MMP</b> : -----	Métalloprotéases
<b>MO</b> : -----	Moelle osseuse
<b>MPa</b> : -----	Méga Pascal
<b>OPG</b> : -----	Ostéoprotégérine
<b>PDGF</b> : -----	Platelet-derived growth factor
<b>PMF</b> : -----	Zone du front de minéralisation primaire
<b>R</b> : -----	Rigidité
<b>RANK</b> : -----	Récepteur pour l'activation du facteur de transcription NF-kB
<b>ROI</b> : -----	Région d'intérêt
<b>SCF</b> : -----	Stem cell factor
<b>SDF-1</b> : -----	Stromal cell-derived factor 1
<b>SSC</b> : -----	Side-angle scatter
<b>Tb.Th</b> : -----	Épaisseur trabéculaire
<b>TEP</b> : -----	Tomographie par émission de positon
<b>TGF-β</b> : -----	Transforming growth factor
<b>TNF-α</b> : -----	Tumor necrosis factor-α
<b>TRAP</b> : -----	Tartrate resistant acid phosphatase
<b>TWS</b> : -----	Trainable Weka Segmentation
<b>vBMD</b> : -----	Densité minérale osseuse volumique
<b>VCAM-1</b> : -----	Vascular cell Adhesion molecule-1
<b>VEGF</b> : -----	Vascular endothelial growth factor
<b>VLA-4</b> : -----	Very late antigen-4
<b>VM</b> : -----	Vésicules matricielles
<b>VOI</b> : -----	Volume d'intérêt
<b>ZI</b> : -----	Zone intraosseuse
<b>ZP</b> : -----	Zone périostée
<b>ZE</b> : -----	Zone extraosseuse



# Table des matières

Résumé.....	I
Abstract .....	II
Remerciement .....	IV
Abréviation .....	VI
Introduction générale.....	- 5 -
Chapitre 1 : Etude bibliographique .....	- 9 -
Partie 1 : Le tissu osseux.....	- 9 -
I.    Physiologie du tissu osseux .....	- 9 -
II.   Morphologie des os long .....	- 10 -
III.  Histologie du tissu osseux .....	- 11 -
1.  Organisation structurale du tissu osseux .....	- 11 -
2.  Organisation selon l'échelle d'analyse .....	- 14 -
IV.  La composition du tissu osseux .....	- 15 -
1.  Les cellules osseuses .....	- 15 -
1.1.  Ostéoblastes .....	- 15 -
1.2.  Ostéoclastes .....	- 17 -
1.3.  Ostéocytes .....	- 19 -
2.  La matrice extracellulaire .....	- 20 -
2.4.  Phase organique .....	- 21 -
2.5.  Phase inorganique .....	- 21 -
Partie 2 : La distraction ostéogénique.....	- 24 -
I.    Histoire .....	- 24 -
II.   Les paramètres qui contrôlent la régénération osseuse.....	- 25 -
1.  Les cellules souches (CS) .....	- 25 -
1.1.  Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) .....	- 26 -
1.2.  Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) .....	- 27 -
1.3.  Les cellules progénitrices endothéliales (CPE) .....	- 28 -
1.4.  La mobilisation des CS .....	- 30 -
2.  Les mécanismes moléculaires .....	- 31 -
2.1.  Les cytokines pro-inflammatoires .....	- 32 -
2.2.  Les facteurs de croissance et de transcription .....	- 32 -
3.  La vascularisation .....	- 37 -
3.1.  L'angiogenèse .....	- 38 -
3.2.  La vasculogenèse .....	- 39 -

3.3.	L'artériogénèse.....	- 40 -
III.	Le principe de la distraction .....	- 41 -
1.	Cas clinique d'application.....	- 41 -
2.	Fracture induite.....	- 42 -
3.	La phase de latence .....	- 42 -
4.	La phase de distraction active .....	- 44 -
5.	La phase de consolidation .....	- 47 -
6.	La phase de remodelage .....	- 48 -
7.	La mécanotransduction.....	- 49 -
7.1.	Modèle de mécanotransduction dans la régénération osseuse .....	- 49 -
7.2.	Rôle des molécules mécanosensibles dans la signalisation cellulaire.....	- 50 -
7.3.	Effort mécanique sur la différenciation cellulaire.....	- 51 -
8.	Complication.....	- 51 -
IV.	Conclusion .....	- 53 -
Chapitre 2 : Mise en place du modèle animal.....		- 55 -
I.	Objectif de l'étude.....	- 55 -
II.	Méthodologie de l'expérimentation 1 .....	- 56 -
1.	Modèle animal.....	- 56 -
1.1.	Choix de l'espèce animal .....	- 56 -
1.2.	Influence de l'âge .....	- 57 -
1.3.	Influence du genre.....	- 58 -
2.	Création du dispositif médical.....	- 59 -
2.1.	Développement du fixateur externe.....	- 60 -
2.2.	Développement de l'ancillaire.....	- 64 -
3.	Protocole expérimental.....	- 67 -
3.1.	Traitement per-opératoire .....	- 67 -
3.2.	Protocole chirurgical.....	- 68 -
3.3.	Protocole de distraction ostéogénique .....	- 69 -
3.4.	Le traitement post-opératoire.....	- 75 -
3.5.	Le prélèvement des échantillons osseux.....	- 76 -
3.6.	La technique de conservation .....	- 76 -
4.	Techniques de validation du protocole.....	- 77 -
4.1.	Suivi du processus de régénération via la radiographie.....	- 77 -
4.2.	Analyse des paramètres architecturaux via la micro-tomographie aux rayons X.....	- 80 -
4.3.	Caractérisation mécanique de la structure osseuse : la flexion trois points.....	- 85 -
III.	Résultat.....	- 89 -

1.	Analyse du processus de régénération par la radiographie.....	- 89 -
2.	Caractérisation des paramètres architecturaux du cal distracté.....	- 91 -
3.	Caractérisation mécanique du régénérat nouvellement formé.....	- 94 -
IV.	Discussion.....	- 95 -
V.	Conclusion.....	- 99 -
Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation.....		- 100 -
I.	Introduction.....	- 100 -
1.	Objectif.....	- 101 -
II.	Méthodologie.....	- 101 -
1.	Préparation des échantillons.....	- 101 -
2.	Histologie.....	- 103 -
2.1.	Principe.....	- 103 -
2.2.	Coloration topographique.....	- 104 -
2.3.	Protocoles des colorations.....	- 105 -
3.	La micro-indentation.....	- 105 -
3.1.	Principe.....	- 105 -
3.2.	Protocole d'acquisition des données.....	- 110 -
3.3.	Région d'intérêt.....	- 112 -
3.4.	Traitement des données.....	- 114 -
4.	Statistiques.....	- 115 -
III.	Résultats.....	- 116 -
1.	Évolution temporelle des tissus minéralisés du régénérat distracté.....	- 116 -
2.	Évolution spatiale du tissu lamellaire en formation du cal distracté.....	- 120 -
IV.	Discussion.....	- 123 -
V.	Conclusion.....	- 128 -
Chapitre 4 : Amélioration du processus de régénération osseuse au cours de la DO.....		- 129 -
I.	Introduction.....	- 129 -
1.	Le G-CSF.....	- 130 -
1.1.	Généralités.....	- 130 -
1.2.	Application Clinique.....	- 131 -
1.3.	Effet secondaire.....	- 132 -
1.4.	Mobilisation de cellules souches/progénitrices par le G-CSF.....	- 133 -
1.5.	Mobilisation des CSH par le G-CSF.....	- 134 -
1.6.	La mobilisation des CPE par le G-CSF.....	- 135 -
1.7.	La mobilisation des CSM par le G-CSF.....	- 135 -
1.8.	Le G-CSF dans des modèles de régénération osseuse.....	- 136 -

2.	Objectif de l'étude.....	- 137 -
II.	Caractérisation du processus de régénération .....	- 138 -
1.	Modèle animal.....	- 138 -
2.	Protocole d'injection du facteur de croissance : G-CSF .....	- 140 -
2.1.	Préparation des aliquotes de G-CSF.....	- 140 -
2.2.	Protocole d'injection .....	- 140 -
3.	L'imagerie nucléaire au profit du suivi de la régénération .....	- 141 -
3.1.	La tomographie par Émission de Positons .....	- 142 -
3.2.	La scintigraphie planaire.....	- 145 -
4.	Histologie et immunohistochimie .....	- 147 -
4.1.	Coloration topographique .....	- 147 -
4.2.	Coloration histo-enzymologique .....	- 151 -
5.	Mobilisation des cellules ostéo et vasculo-progénitrices par la cytométrie en flux.....	- 154 -
5.1.	Principe.....	- 154 -
5.2.	Les paramètres analysés .....	- 157 -
5.3.	Protocole du marquage pour la CFM .....	- 158 -
5.4.	Acquisition des données cellulaires .....	- 161 -
5.5.	Traitement des données.....	- 161 -
6.	La caractérisation mécanique à l'échelle macroscopique.....	- 164 -
6.1.	Protocole des essais mécaniques de flexion trois points.....	- 165 -
7.	Statistique.....	- 165 -
III.	Résultats .....	- 166 -
1.	Le G-CSF a modifié le profil cinétique de mobilisation des CSPH.....	- 166 -
2.	Le G-CSF n'a pas eu d'effet sur le profil de mobilisation des CPE .....	- 166 -
3.	Le G-CSF a modifié le profil cinétique de mobilisation des CSM.....	- 167 -
4.	Le G-CSF tend à augmenter le dépôt d'hydroxyapatite à 3 semaines de consolidation. -	169 -
5.	Le G-CSF induit une forte modification temporelle de la vascularisation du régénérat distracté.....	- 170 -
6.	Le G-CSF induit des modifications dans le profil de régénération osseuse .....	- 172 -
7.	Le G-CSF influe sur l'activité ostéoclastique de manière ROI-dépendante.....	- 174 -
8.	Le G-CSF semble impacter les propriétés mécaniques du régénérat.....	- 174 -
IV.	Discussion .....	- 176 -
V.	Conclusion .....	- 185 -
	Conclusion générale et perspectives.....	- 186 -
	Bibliographie.....	- 197 -

# Introduction générale

1951, le monde est en crise, frappé par une guerre silencieuse faisant rage entre les peuples. Pourtant, c'est à cette époque que le génie humain découvre le principe de la distraction ostéogénique. Ce protocole clinique, qui à l'heure actuelle est fortement sollicité en chirurgie orthopédique, révèle la plasticité osseuse dans toute sa splendeur. En effet, le tissu osseux est un organe vivant capable de s'adapter face aux sollicitations mécaniques qu'il subit. Sa capacité, à se remodeler pour venir pallier les microtraumatismes quotidiens, est connue des chercheurs et des médecins. Pour ce faire, un ensemble de phénomènes physiologiques travaillant en synergie permet la conservation de la structure osseuse et assure ainsi le maintien de ces différentes fonctions. De plus, il a été constaté que cet organe était apte à se régénérer à la suite de traumatismes conséquents lors de lésions complètes de sa structure, si un environnement mécanique stable lui était imposé. Ce dernier est apporté par la mise en place de fixateurs externes, qui sont des dispositifs autorisant un alignement parallèle des segments osseux et empêchant l'apparition de contrainte de cisaillement nuisant à la régénération osseuse. Les analyses biomécaniques ont démontré que la réponse cellulaire du tissu en régénération pouvait être altérée en fonction du chargement appliqué à celui-ci. À titre d'exemple, les efforts en cisaillement favorisent la formation de tissu cartilagineux et non osseux. Le tissu osseux est donc très répondant face aux sollicitations mécaniques et est capable de s'adapter en fonction de celles-ci, soit en augmentant le volume osseux soit en le diminuant. Partant de ce constat, une idée a émergé, celle de l'allongement osseux ou distraction ostéogénique. Son principe de guérison est basé sur les capacités du tissu osseux à se régénérer et à être stimulé par les contraintes mécaniques. L'allongement osseux ou distraction ostéogénique, consiste en la création d'une fracture induite chirurgicalement et la pose d'un fixateur externe. S'ensuit une phase dite de latence où les premières étapes de la réparation osseuse se produisent. Par la suite, une phase d'allongement du tissu osseux en formation est appliquée via l'activation du fixateur externe. C'est au cours de cette phase que la plasticité osseuse intervient ainsi que son lien étroit avec l'environnement mécanique. Des forces de traction vont alors être appliquées, éloignant ainsi les segments osseux les uns des autres. Cette action va être perçue par un ensemble de cellules osseuses et vasculaires engendrant des réponses favorisant la création de tissu osseux. À la suite de cet allongement, le fixateur est maintenu, mais n'est plus activé afin de laisser évoluer la structure nouvellement formée vers un tissu de plus en plus rigide pour enfin obtenir une structure osseuse nouvelle et en continuité avec l'ancienne. La distraction ostéogénique est

donc une résultante de la capacité osseuse à répondre à des stimuli mécaniques et à corriger des défauts de structure, ceci montre finalement la grande plasticité du tissu osseux.

L'utilité de ce protocole clinique a de nombreux avantages. Tout d'abord, il permet la correction de discordance des membres inférieurs dont l'origine peut être multiple. Cette différence de longueur est courante, on recense environ 1/3 de la population ayant des inégalités membranaires allant de 0.5 à 1.5cm et 1/1000 personnes ont dû se voir prescrire des semelles compensatrices pour venir corriger les défauts de longueurs. Cependant, certaines personnes sont atteintes d'inégalité supérieure à 2cm dont l'origine peut être pathologique ou non et c'est là qu'entre en jeu la distraction ostéogénique. Le corps humain est normalement symétrique pour permettre une bonne répartition des charges lors de la position bipède et pour favoriser la mise en marche. Un désaxement induit par une discordance peut engendrer des douleurs chroniques voire de graves pathologies notamment articulaires telles que de l'arthrose. Ces problèmes proviennent d'une mauvaise transmission des forces transitant par le corps humain, entraînant ainsi des zones de surcontraintes. Par ailleurs, l'utilisation de ce protocole a été étendue à d'autres cas cliniques comme pour les personnes atteintes de petite taille, des comblements osseux à la suite d'une résection de tumeur osseuse et des défauts traumatologiques entraînant de grosses pertes osseuses. Néanmoins, il est important de stipuler qu'un ensemble de complications grave autour de ce protocole et que ce dernier est long et contraignant. Il faut s'imaginer que chez l'enfant l'indice de guérison est estimé à 1mois/cm, ce qui signifie que pour 1cm d'allongement, il faut attendre 1 mois de consolidation. Cet indice augmente grandement chez l'adulte passant de 2 à 3 mois/cm. De plus, l'apparition d'infections, de douleurs, de retards de consolidation, de pseudarthrose, de contracture, de luxations, de problèmes nerveux ou vasculaire, fait que le chemin avant d'atteindre un nouvel os fonctionnel est compliqué et dur. Les complications biologiques ont été énumérées, mais il faut également penser aux complications psychologiques induites via une impossibilité de travailler ou d'aller à l'école et d'avoir une pratique sportive pendant le temps du traitement.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux complications liées à la formation osseuse dans l'optique de pallier les défauts de formation et le manque de consolidation osseuse. Il a été démontré que dans 3 à 50% des cas cliniques, à la suite du retrait du fixateur externe, des fractures ou des déformations de l'os traité sont apparentes. Sachant que, ces effets peuvent apparaître directement après le retrait du fixateur externe ou dans les semaines / mois qui suivent l'ablation. L'apparition de ces symptômes traduit une mauvaise consolidation osseuse.

Le travail développé dans cette thèse est double et rassemble deux aspects complémentaires, le théorique et l'applicatif. Le premier objectif était orienté vers la compréhension du tissu en régénération d'un point de vue mécanistique. Une analyse de l'évolution de la microstructure osseuse a été effectuée permettant d'obtenir des données quantitatives des paramètres mécaniques de l'os en formation. Ceci a mis en lumière l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la structure. Le second objectif s'inscrit dans une volonté d'améliorer le processus de distraction ostéogénique pour pallier les complications liées à la régénération et à la consolidation osseuse. Cette première étape d'investigation nous a permis d'étudier les effets bénéfiques du G-CSF, un facteur soluble, au cours d'un protocole d'allongement osseux en stimulant l'ostéogenèse pour induire un processus de régénération efficient.

Le chapitre 1 est divisé en deux parties. La première partie est destinée à présenter la structure osseuse dans son ensemble en incluant des aspects structuraux, architecturaux et mécaniques. Il sera également présenté le type et la fonction des cellules composant le tissu osseux dans le maintien de son fonctionnement. Dans une deuxième partie, le processus de distraction ostéogénique sera développé. Cette partie permettra de détailler une vue d'ensemble du protocole clinique afin d'obtenir une compréhension générale sur les processus de régénération osseuse induits. Ainsi la complexité du processus de régénération, faisant appel à des phénomènes de vascularisation et d'ostéogenèse (formation du tissu osseux), sera mise en lumière.

Le chapitre 2 présente le développement du modèle expérimental. Ce dernier englobe la création d'un fixateur externe unilatéral pour le fémur de rat. On y retrouve également le développement de l'ancillaire, outil utilisé pendant la chirurgie de callotaxis (pose du fixateur). Ce guide favorise le positionnement de l'insertion des tiges dans le tissu osseux afin de conserver un alignement des os tout au long du traitement. Enfin, une étude portant sur la validation du protocole expérimental a été présentée par la caractérisation des paramètres architecturaux et des paramètres mécaniques à l'échelle macroscopique de la nouvelle structure formée.

Le chapitre 3 soulève la problématique liée à la qualité osseuse, via l'analyse des propriétés mécaniques de la structure nouvellement formée lors de la distraction. L'utilisation de la microindentation nous a permis d'examiner localement les variations des paramètres liées à la rigidité grâce à l'obtention du module d'Young. Les paramètres concernant la résistance mécanique des tissus sont représentés par la dureté et ont pu être obtenus en simultané. La

récupération de structure osseuse distractée à différentes périodes de la phase de consolidation nous a permis d'observer l'hétérogénéité des tissus minéralisés et de mettre en évidence des variations spatiales et temporelles des paramètres mécaniques. Ces informations sont des ressources importantes pour l'implémentation de données dans les modèles d'éléments finis d'os évolutif appliqué à la mécanobiologie. Cela peut également servir à la conception de matériaux du biomédical et ainsi optimiser les propriétés mécaniques des biomatériaux pour qu'ils soient mieux adaptés au milieu d'implantation.

Enfin, le dernier chapitre concerne, l'amélioration du processus de régénération au cours de la distraction ostéogénique. Lors de cette étude, une quantification des effets de l'ajout d'un adjuvant a été étudiée. Les processus liés à la vascularisation ainsi qu'à l'ostéogenèse ont été étudiés et évalués puisque ces deux phénomènes se produisent lors de la régénération osseuse. L'adjuvant utilisé était le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), un facteur de croissance dont l'effet a déjà été établi dans des modèles de régénération vasculaire ou osseux. Cependant, son effet n'a pas encore été quantifié dans les modèles de distraction ostéogénique. Le premier axe de cette étude était de voir si ce dernier induisait ou non un effet notable sur le processus de régénération. Le second axe était orienté vers le mécanisme d'action de ce dernier. En effet, même si celui-ci a été utilisé dans des modèles de régénération, aucune étude ne s'est intéressée aux mécanismes d'action du G-CSF. Étant donné son rôle dans la mobilisation de cellules souches, notre analyse s'est donc portée sur les profils cinétiques de mobilisation de trois populations de cellules souches/progénitrices, cellules ayant une capacité de différenciation importante.



## Chapitre 1 : Étude bibliographique

### Partie 1 : Le tissu osseux

#### I. Physiologie du tissu osseux

Chez les vertébrés, l'os représente le principal tissu calcifié du corps, sans compter le tissu dentaire et le cartilage calcifié. Il a été démontré que l'os est un tissu vivant, capable de répondre aux sollicitations externes. C'est pourquoi ce tissu est en perpétuelle formation et remodelage. D'ailleurs dès 1892, J. Wolff établit une loi stipulant que « toute modification de la forme et de la fonction de l'os ou de leur seule fonction est suivie de modifications définitives de l'architecture interne de l'os et d'une modification tout aussi définitive de sa conformation externe, conformément aux lois mathématiques » [1]. L'idée primaire de cette loi nous décrit que l'os est capable d'adapter ses propriétés mécaniques et architecturales lorsqu'il est stimulé mécaniquement. Celui-ci tend vers un remodelage de sa structure pour venir supporter les forces externes en apposant de la matière osseuse ou inversement si celui-ci est dans un milieu appauvri en stimulation mécanique.

Il a été décrit dans la littérature que les os remplissent diverses fonctions importantes maintenant une stabilité de l'organisme. Tout d'abord, du fait de leurs rôles protecteurs vis-à-vis de nos organes vitaux, ils ont été considérés comme étant la charpente du corps humain. Ils représentent également le support de l'organisme et sont un site d'attachement des muscles squelettiques via les tendons permettant ainsi la locomotion du système. Ils remplissent également une fonction métabolique, en étant une réserve en minéraux et plus précisément en calcium, en phosphate et autres ions. Enfin, les os jouent un dernier rôle dans l'immunoprotection et l'oxygénation des tissus via la production de leucocytes (lymphocytes, monocytes, éosinophiles, basophiles, neutrophiles) et d'érythrocytes (globule rouge) [2].

L'apparence anatomique des os est très variée dans le corps et est en lien avec leur fonction. Cette variété permet de définir cinq types d'os. On retrouve les os longs tel que le fémur, les os courts (ex. : les phalanges), les os plats (ex. : la scapula), les os dits irréguliers comme les vertèbres et enfin les os sésamoïdes (ex. : patella). Cependant, quel que soit le type d'os, il est composé d'une région périphérique dure dénommée os cortical qui est mécaniquement résistante, ainsi que de l'os dit trabéculaire qui lui se trouve au sein de la structure osseuse et est mécaniquement moins résistant. À titre d'exemple, une vertèbre est constituée d'un rapport

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

os cortical sur os trabéculaire de 25 :75, alors que pour la diaphyse radiale (zone centrale des os longs) ce même rapport sera de 95 :5 [3].

Tout au long de cette thèse, notre centre d'intérêt se portera sur les os longs. Ce type d'os joue un rôle de soutien, participe à la locomotion du système et à l'immunoprotection via la présence de moelle osseuse en leurs extrémités. C'est au niveau du squelette dit appendiculaire qu'ils sont majoritaires et sont localisés à l'échelle du membre supérieur (humérus, ulna et radius) et du membre inférieur (tibia, fibula et fémur).

## II. Morphologie des os longs

La structure des os longs est délimitée en trois parties (conf. Fig.1). La zone présente dans les extrémités est définie comme étant l'épiphyse des os longs et est constituée majoritairement d'un réseau osseux de type trabéculaire entouré par une fine couche d'os cortical. Au sein de ce réseau trabéculaire, la moelle osseuse (MO) rouge y est présente renfermant un ensemble de cellules ayant un potentiel de différenciation important : les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses. Ensuite, si l'on se déplace de manière centripète, la zone métaphysaire est présente. Cette zone de jonction est constituée principalement d'os trabéculaire. C'est à l'interface de ces deux zones (épiphyse/métaphyse) que l'on retrouve la plaque de croissance cartilagineuse chez les enfants. En revanche à l'âge adulte cette zone est absente puisqu'il y a eu ossification de cette dernière. Enfin, la partie centrale, nommée diaphyse, est la partie la plus étendue des os longs et de forme quasi cylindrique et est constituée d'os cortical. La cavité médullaire y est située en son centre contenant de la moelle jaune constitué de tissu adipeux (cellule grasseuse).

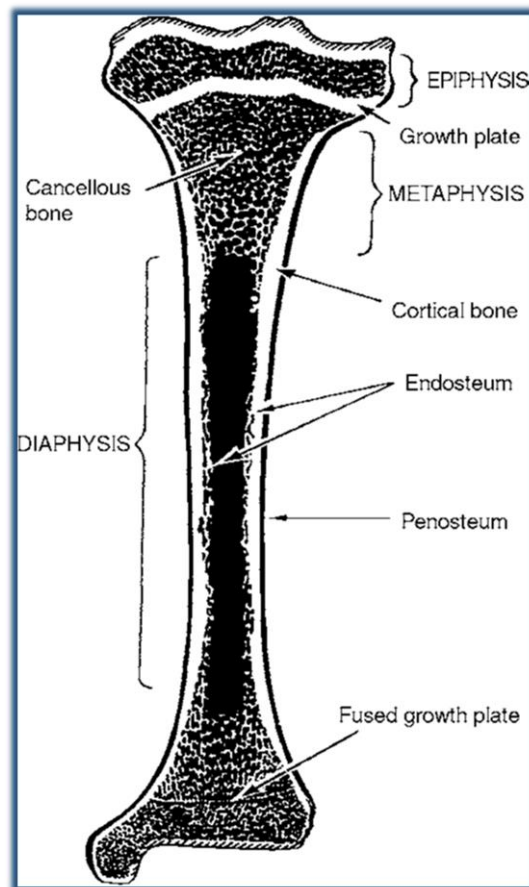


Figure 1 : Représentation schématique d'un os long (tibia) provenant de S.C. Cowin, Bone Mechanics Handbook, 2001)

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

La description anatomique des os longs ne serait pas complète si l'on ne décrivait pas la présence de deux membranes, une externe et une interne, présente dans les structures osseuses. Celles-ci jouent un rôle essentiel notamment lors de la croissance, des processus de régénération de l'os et du remodelage osseux.

La première membrane se nomme le périoste. Ce dernier peut être caractérisé comme un tissu superficiel externe fortement vascularisé entourant la majorité des os. Cependant, la présence de cette membrane fibreuse n'est pas apparente au niveau des surfaces articulaires, des insertions tendineuses et des os de type sésamoïde (ex. : la patella). Cette membrane est composée d'une couche externe fibreuse dans laquelle la matrice extracellulaire est constituée de fibres de collagènes et de fibres élastiques. Des cellules fibroblastiques y sont également présentes, mais leurs rôles restent encore à être déterminés. La deuxième zone est une couche profonde proliférative appelée couche cambiale. Cette dernière représente une niche cellulaire importante dont le potentiel de régénération osseuse est induit par des cellules souches multipotentes mésenchymateuses [4], des cellules ostéoprogénitrices et des ostéoblastes. Simpson et al [5] ont mis en évidence un réseau vasculaire dense interposé entre ses deux couches. La fixation de cette membrane au tissu osseux se fait via des fibres de Sharpey. Enfin, au sein de ce tissu, une forte vascularisation est présente, permettant un apport en oxygène et nutritionnel suffisant de la membrane ainsi que de la partie superficielle de l'os cortical.

La seconde membrane, dénommée endoste, tapisse la cavité médullaire de la diaphyse : on parle alors d'endoste cortical. Qui plus est, cette dernière est plus fine que le périoste et a une composition moins complexe que celui-ci. En effet, l'endoste est composée d'une seule couche de fibres de collagène de type III enrichie en cellules ostéoclastiques et en cellules ostéoprogénitrices aplaties capables de participer à l'ostéogenèse [6]. On retrouve aussi la présence d'une membrane endosté au sein des ostéons formant l'os cortical. Cependant, cette membrane contient principalement des nerfs et des vaisseaux sanguins. Tout comme le périoste, cette membrane joue un rôle important lors de la formation osseuse dans des cas de régénération et lors de la croissance osseuse.

## III. Histologie du tissu osseux

### 1. Organisation structurale du tissu osseux

L'organisation structurale du tissu osseux, au sein des 213 os du squelette, permet de classer deux types d'os : l'os cortical et l'os trabéculaire. Ces derniers sont présents dans le corps en des proportions différentes. En effet, l'os cortical représente 80% du squelette alors

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

que l'os trabéculaire seulement 20% [7]. De plus, ils sont tous les deux formés d'os dits lamellaires. Les lamelles sont formées par des faisceaux de collagènes de type I et des cristaux d'hydroxyapatite. Et c'est notamment par l'organisation spatiale de cette trame collagénique que ces deux tissus ont des fonctions et propriétés mécaniques différentes.

L'os cortical est un matériau dense et compact. Les lamelles le composant sont organisées de manière concentrique s'enroulant les unes autour des autres dans lesquelles les fibrilles de collagène sont disposées selon des orientations alternées favorisant ainsi les propriétés mécaniques du tissu cortical. Le tout forme des unités appelées ostéons qui constituent le système haversien (conf. Fig. 2). L'os cortical est ainsi constitué de plusieurs ostéons de forme cylindrique avec une longueur moyenne de 400 $\mu$ m et une épaisseur moyenne de 200 $\mu$ m chez l'homme [7]. L'alignement des ostéons suit l'axe de contrainte principale (sens longitudinal). Au centre et entre chaque ostéon, un système de canaux est présent permettant ainsi la vascularisation du tissu osseux et l'insertion des nerfs : les canaux principaux de Havers situés au centre des ostéons et le canal intermédiaire de Wolkmann situé entre deux ostéons [8].

L'os trabéculaire, quant à lui, est constitué de lamelles organisées parallèlement et dessine une structure en forme de nid d'abeille [9]. En effet, la matrice osseuse est formée de

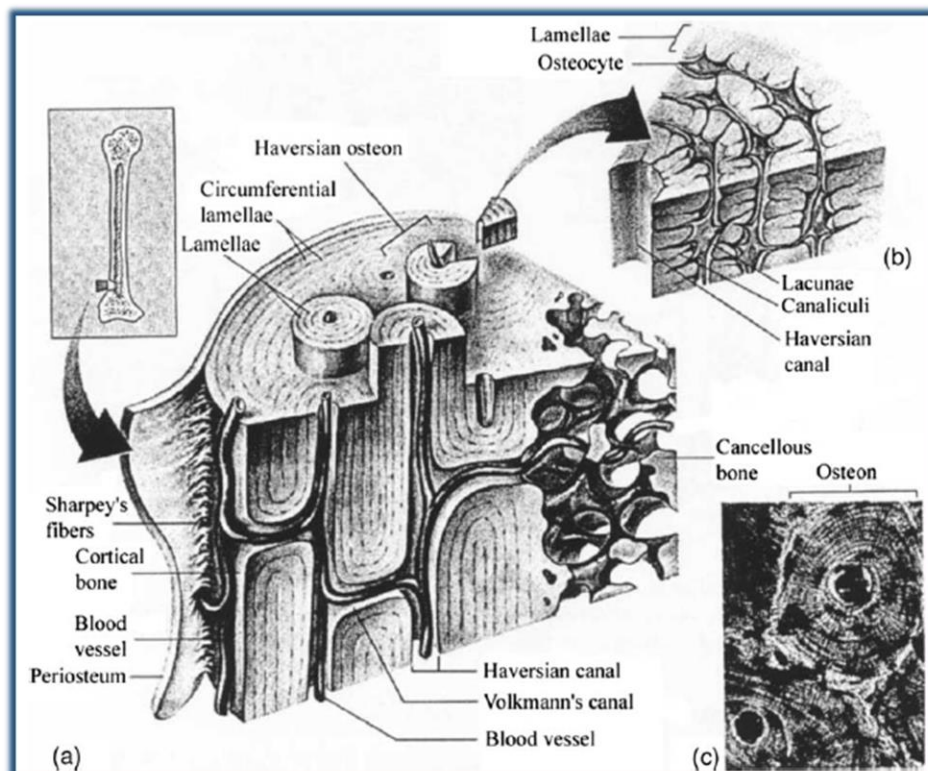


Figure 2 : Microstructure de l'os cortical (Doblaré et al, 2004). **A.** Représentation de l'organisation spatiale des ostéons et des canaux de Havers et Wolkmann. **B.** Organisation des lamelles constituant l'ostéon. **C.** Micrographie du système d'Havers.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

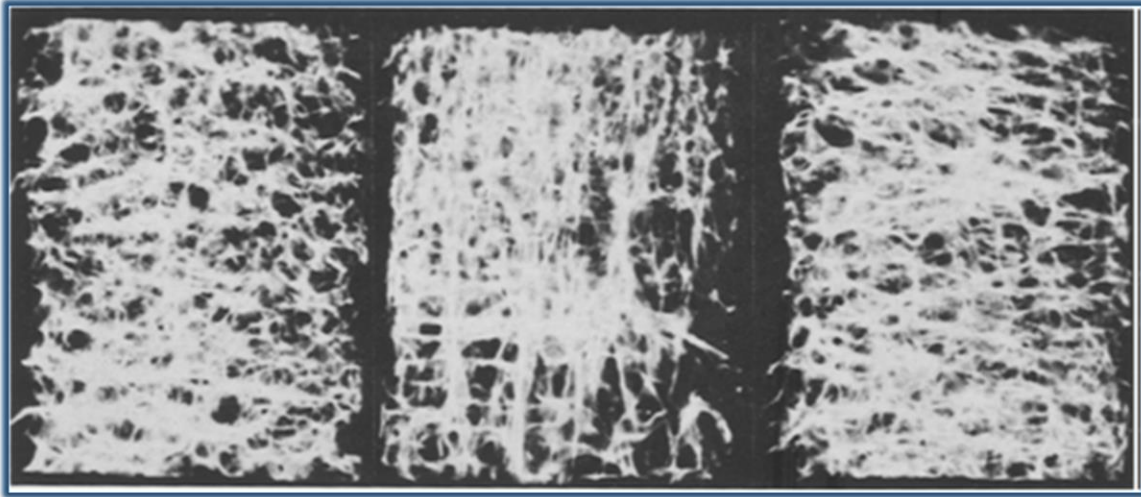


Figure 3 : Échantillon osseux découpé sur des vertèbres humaines (Galante et al 1970). Sur ces images on peut constater l'orientation des trabécules selon le plan de coupe. De gauche à droite : plan frontal, plan transverse et plan sagittal.

lamelles en forme de plaques et d'entretoises qui individuellement sont appelées trabécules, et ont comme épaisseur environ  $200\mu\text{m}$ . L'agencement spatial des travées permet de diriger les forces mécaniques subies en direction de l'os cortical (conf. Fig. 3). Cette structure a une porosité élevée (de 50 à 95%) et est comblée par la moelle rouge (vaisseaux sanguins, cellules souches formant les tissus conjonctifs et les cellules sanguines) au niveau des épiphyses et de la moelle jaune (tissu adipeux majoritairement) au niveau de la diaphyse [8].

Une dernière structure osseuse, appelée os immature ou tissé est également présente dans le corps humain, mais de manière transitoire. En effet, ce tissu osseux est formé dans des cas de croissance ou de régénération osseuse et tendra vers une structure d'os lamellaire lors de son remodelage, dans l'optique d'en augmenter ses propriétés mécaniques. Il est composé majoritairement d'ostéocytes (ostéoblaste mature) et de fibrilles de collagène. À l'inverse de l'os lamellaire, où les lamelles sont constituées de fibrilles de collagènes très orientées et denses, l'os immature n'a aucune organisation particulière [10] (conf. Fig. 4.). Néanmoins, il a été constaté que les fibrilles de collagène présentent un certain degré d'orientation parallèle à l'axe longitudinal de l'os.

Concernant la phase minérale du tissu osseux immature, les cristaux d'hydroxyapatite sembleraient se différencier seulement au niveau de leurs tailles et non de leurs morphologies comparées à l'os lamellaire.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

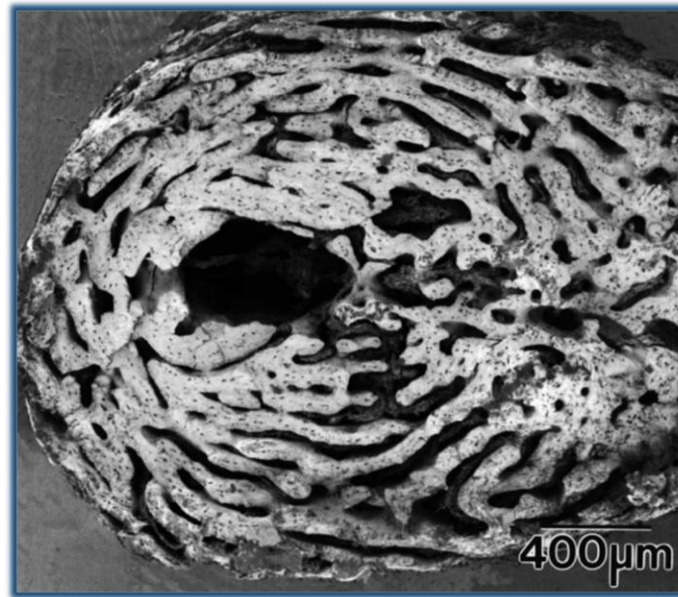


Figure 4 : Image morphologique de l'os tissé au niveau de diaphyses fémorales moyennes d'un fœtus humain de 19 semaines (Su et al, 2003). Les couches de travées osseuses sont séparées par du vide. Au sein de la matrice, on remarque la forte porosité ostéocytaire.

## 2. Organisation selon l'échelle d'analyse

L'organisation structurelle du tissu osseux est donc complexe et hiérarchisée. Grâce aux travaux de Rho et al [11], cette organisation a été décomposée en cinq sous parties en fonction de l'échelle d'observation (conf. Fig. 5). Le premier niveau correspond à l'échelle macroscopique dont l'ordre de grandeur varie du centimètre au millimètre. On y retrouve un tissu osseux de type cortical ainsi que de l'os trabéculaire. L'échelle microscopique constitue le second étage et englobe le système Haversien (ostéons), ainsi que les trabécules simples.

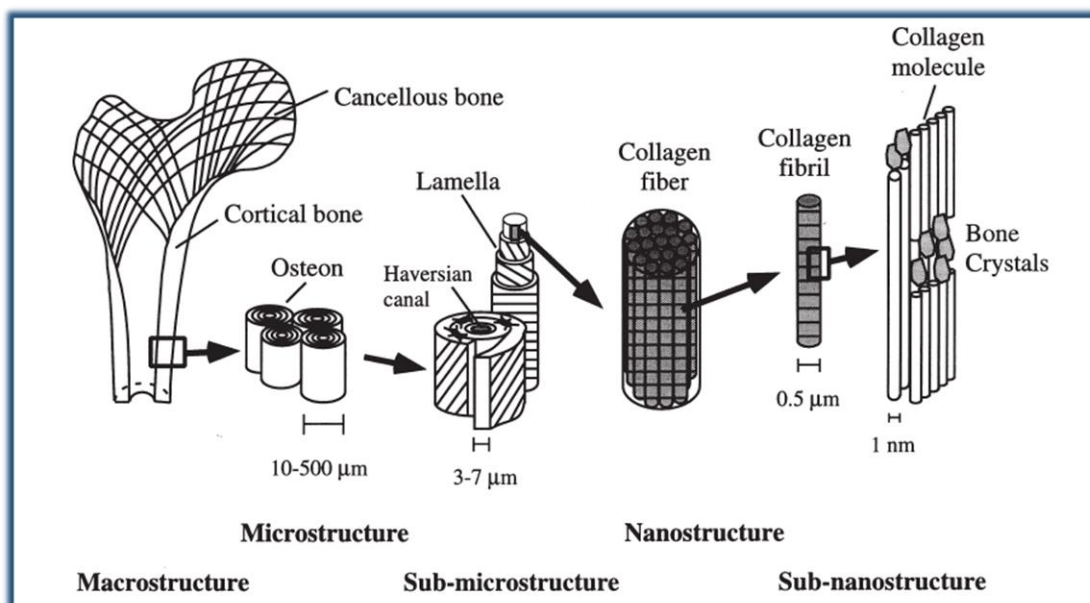


Figure 5 : Représentation de la structure multiéchelle du tissu osseux tiré de l'article de Rho et al en 1998.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

L'ordre de grandeur est le micromètre ( $\mu\text{m}$ ). Ensuite, on retrouve le niveau submicroscopique (en dessous de  $10\mu\text{m}$ ), constitué des lamelles osseuses. Puis, on observe des éléments appartenant à l'échelle nanoscopique (nanomètre, nm) et subnanoscopique qui constituent les principaux composants de la matrice extracellulaire avec les fibres de collagène, elles-mêmes formées de fibrilles de collagène composé de collagènes de type I et de cristaux d'hydroxyapatite.

## IV. La composition du tissu osseux

### 1. Les cellules osseuses

L'os est donc composé de diverses cellules qui vont venir synthétiser ou résorber la matrice extracellulaire (MEC). Les ostéoblastes et les ostéocytes dérivent de cellules primitives mésenchymateuses appelées cellules stromales mésenchymateuses (CSM) et jouent un rôle dans l'apposition tissulaire. Les cellules ostéoclastiques participent à la résorption osseuse et dérivent d'une seconde population cellulaire : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Cet ensemble de cellules non différenciées se retrouve au sein de diverses niches permettant ainsi leur maintien tout au long de la vie. Les CSH sont présentes au sein de la moelle osseuse située dans les épiphyses du tissu osseux et au sein de l'endoste [12]. Ces cellules multipotentes ont pour fonction de former toutes les cellules constituant le sang. Les origines des CSM sont multiples. En effet, leur rôle est de former toutes les cellules des tissus conjonctifs allant de l'os au muscle, en passant par le tissu adipeux et le tissu cartilagineux : c'est pourquoi dans la majorité de ces tissus, différentes niches y sont ancrées [13,14].

#### 1.1. Ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules qui vont venir apposer l'ostéoïde (tissu osseux) et forment une grosse partie la MEC via la production de protéines collagéniques (collagènes de type I) et non collagéniques (ostéocalcine, ostéopontine...). Ils participent également à la minéralisation du tissu par la formation de cristaux d'hydroxyapatite. Les ostéoblastes dérivent des CSM (cellules multipotentes et ayant une capacité d'autorenouvellement) qui, sous l'influence de facteurs de transcription spécifique (Runx2), vont tendre vers une différenciation selon la lignée ostéoblastique (étape de détermination). Ces cellules ostéoprogénitrices vont proliférer et se différencier pour acquérir un potentiel ostéoblastique via la formation d'un ostéoblaste mature et fonctionnel. Tous ces processus sont régis par la présence de facteurs de croissance et d'hormones dans le milieu environnant (conf. Fig. 6).

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

De plus, au cours de la différenciation cellulaire, plusieurs marqueurs seront exprimés de manière séquentielle. La présence de marqueurs précoces tels que *runx2* est associée à une phase de prolifération alors que la phosphatase alcaline est caractéristique de la phase de maturation des cellules ostéoprogénitrices. Enfin, la présence de marqueurs tardifs comme l'ostéocalcine permet de définir un ostéoblaste mature en phase de minéralisation de la MEC.

Lors de la formation osseuse, les ostéoblastes vont dans un premier temps venir sécréter la matrice collagénique puis, dans un second temps, un phénomène de minéralisation se produit généralement entre l'espace créé par les cellules ostéoblastiques et le front de minéralisation. Il a été montré qu'il existe un délai de 24h à 72h lors de la formation du tissu immature dans les processus de régénération osseuse [2]. Cette minéralisation se produit en deux temps, avec une première phase de nucléation des cristaux de phosphate de calcium, suivi de la croissance de ce dernier au sein des fibrilles de collagènes.

Les vésicules matricielles (VM) sont de petites particules (20-200nm) produites par les ostéoblastes et sembleraient être le premier composant de la calcification du tissu osseux. Elles proviennent d'un bourgeonnement de la membrane des ostéoblastes avant les premières étapes de minéralisation de la matrice. Les ostéoblastes et les VM vont interagir afin de réguler la concentration extracellulaire en calcium ( $Ca^{2+}$ ) et en phosphate ( $PO_4^{3-}$ ). La concentration ionique est également modulée par la présence de protéine non collagénique de la MEC et de pyrophosphate inorganique (PPi). En effet, ce dernier est un inhibiteur de la minéralisation à faible concentration, alors qu'à forte concentration il stimule ce processus. D'ailleurs, le rôle des VM dans la maintenance du ratio entre le phosphate et le pyrophosphate inorganique n'est plus à démontrer, puisque la présence de deux enzymes (NPP1 et TNAP) permet d'augmenter ou de diminuer la concentration de chacune [15].

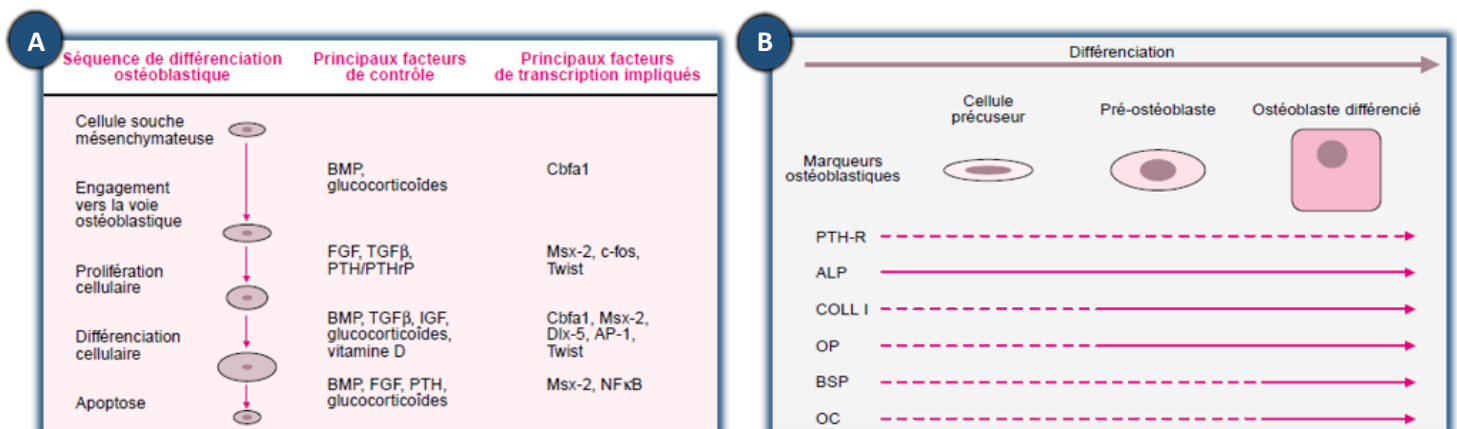


Figure 6 : Représentation de la différenciation des CSM en ostéoblastes matures (Marie, 2001). **A.** Différenciation des CSM vers un type cellulaire sous la direction de facteurs de croissance et de transcriptions particuliers. **B.** Expression de divers marqueurs en fonction du niveau de différenciation des cellules ostéoprogénitrices.



# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

Concernant la nucléation du minéral, ce dernier point reste encore discuté au sein de la communauté, mais il paraîtrait que le concept de nucléation hétérogène est le plus probable comparé à celui de nucléation homogène. La nucléation homogène entraînerait une formation des cristaux via une sursaturation de l'environnement local en ions et la formation pourrait se produire dans le lumen des VM via l'utilisation de pompes ioniques pour augmenter les concentrations internes en calcium et phosphate. Le second serait la nucléation hétérogène où la formation des cristaux se produirait directement à la surface du collagène par l'intermédiaire de protéine non collagénique telle que l'ostéonectine ayant une forte affinité avec le calcium et l'adsorption (phénomène chimique de fixation d'ion sur une surface) du phosphate par le collagène [2]. À la suite de la nucléation, un premier précipité de phosphate de calcium amorphe est formé qui sera ensuite converti en cristaux d'hydroxyapatite. Les cristaux grossissent rapidement et leurs tailles sont dépendantes de l'espace présent entre les molécules de collagène et de la présence d'inhibiteurs chimiques (liaisons compétitives avec les protéines non collagéniques liées aux molécules de collagène) [2].

## 1.2. Ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des macrophages spécialisés qui sont responsables de la résorption osseuse via des processus de phagocytose du tissu osseux. Ils sont également capables de dégrader le cartilage hypertrophique formé lors des processus de régénération osseuse. Ils proviennent des CSH, cellules primitives ayant la capacité de se différencier en deux progéniteurs communs, soit les myéloïdes ou les lymphoïdes. Les ostéoclastes dérivent des cellules myéloïdes progénitrices qui elles-mêmes vont se différencier en monocytes. Ces mêmes monocytes, sous certaines conditions notamment grâce à CSF-1 (facteur de stimulation des colonies de macrophages) et RANK-L, le ligand du récepteur RANK (récepteur pour l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B), vont pouvoir former des précurseurs ostéoclastiques [16]. Ces derniers vont fusionner entre eux de manière asynchrone et former les ostéoclastes qui sont donc des cellules multinucléées (conf. Fig. 7).

De façon intéressante, le CSF-1 et RANK-L sont soit produits par les ostéocytes, les ostéoblastes et par les CSM, sous forme soluble, ou soit présentes sous forme de récepteur membranaire à la surface de leur membrane cytoplasmique [17]. Donc ici, on a un rôle majeur de l'ostéoblastogenèse sur l'ostéoclastogenèse (conf. Fig. 8). L'activation de RANK (une protéine transmembranaire) via RANK-L semble être la voie préférentielle pour l'activation de la différenciation. En effet, il a été démontré que RANKL semblerait suffisant pour la différenciation complète des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures dans un milieu

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

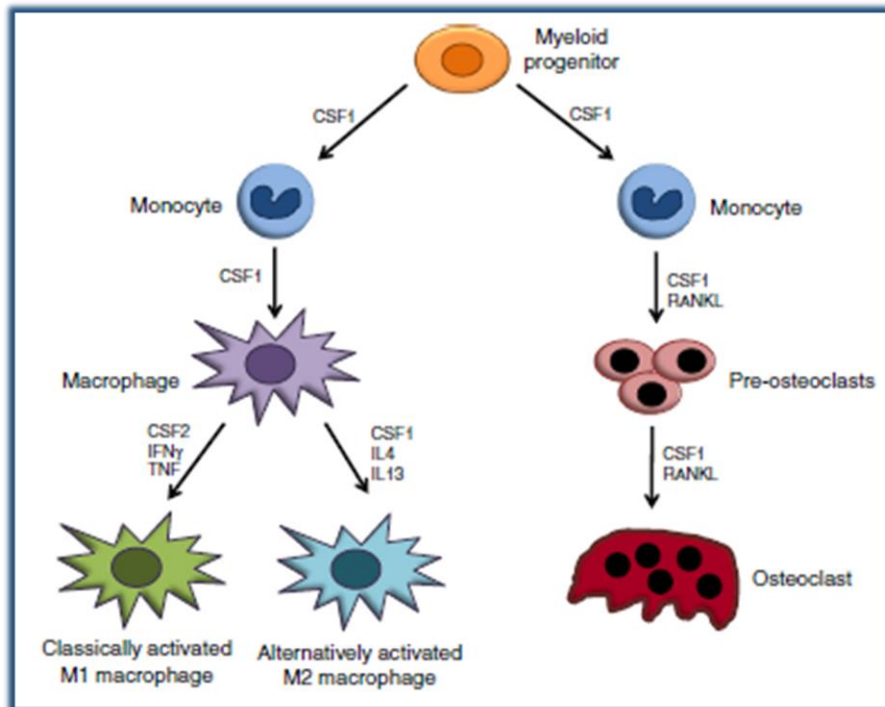


Figure 7 : Schéma des voies de différenciation des progéniteurs myéloïdes en macrophage ou en ostéoclaste proposé par L. Endo-Munoz, 2012. Les progéniteurs myéloïdes dérivent des cellules souches hématopoïétiques. RANKL induit une différenciation vers la lignée ostéoclastique tandis que CSF-1 induit une différenciation vers un des deux phénotypes de macrophage existant : M1 et M2. L'impact des cytokines présentes dans le milieu étudié induira cette différenciation.

appauvri en CSF-1 [18]. Concernant la régulation de la formation ostéoclastique, elle est également contrôlée par les cellules précédemment citées via la sécrétion de l'ostéoprotégérine (OPG), qui est un facteur soluble capable d'inhiber complètement la différenciation ostéoclastique en se fixant au RANKL [19].

La décomposition des protéines de la matrice osseuse, ainsi que la décalcification de cette dernière, se produit via la libération d'enzymes protéolytiques telles que la cathepsine K (CtsK), la métalloprotéinase P (MMP-9) et de l'acide chlorhydrique (composé d'ions hydrogène et d'ions chlorure). Ils sécrètent également un certain nombre d'enzymes spécifiques aux ostéoclastes, comme la phosphatase acide tartrate résistante (ACP5) et l'anhydrase carbonique II (CAII) [16]. Pour se faire, les ostéoclastes vont s'attacher à la matrice osseuse pour former une zone d'étanchéité grâce à la formation de podosomes contenant des intégrines et protéines d'adhérence. Cette accroche spécifique est cruciale et permet de délimiter en son centre une zone de résorption (bordure en brosse) où dans un premier temps, la dégradation des cristaux d'hydroxyapatite se produira via l'acidification du milieu, puis dans un second temps les enzymes et métalloprotéases (MMP-9, TRAP, CtsK) sécrétées viendront dégrader les protéines de la MEC osseuses [17].

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

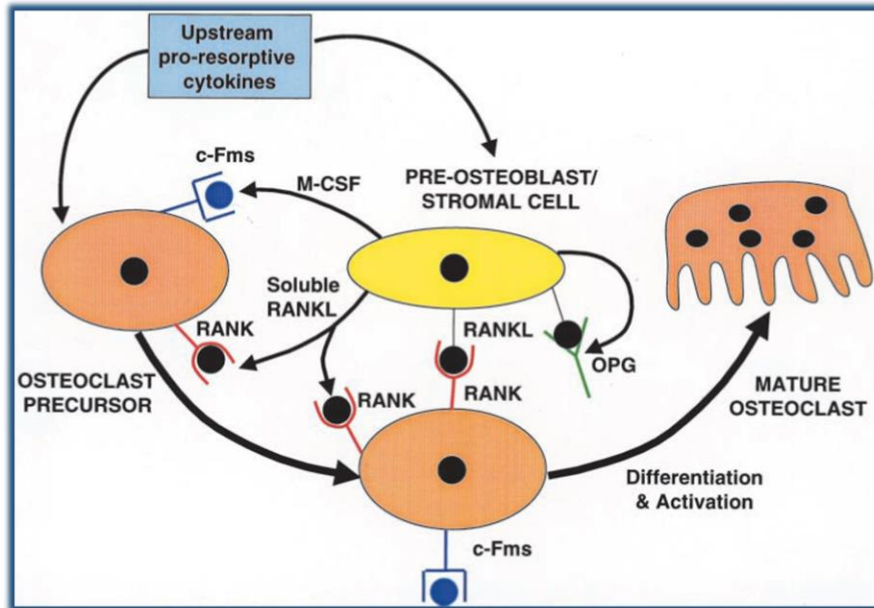


Figure 8 : Système d'activation des ostéoclastes par les cellules pré-ostéoblastique. La régulation de l'ostéoclastogénèse par le système RANK/RANKL/OPG.

## 1.3. Ostéocytes

Les cellules ostéocytaires représentent le type cellulaire le plus abondant au sein du tissu osseux mature. En effet, elles constituent à hauteur de 90-95% des cellules osseuses du squelette adulte [20]. Les ostéocytes sont ancrés de manière régulière dans la matrice osseuse au cours de l'ostéogénèse (formation des tissus osseux). En effet, lors de la formation osseuse et avant minéralisation du tissu ostéoïde, une partie des ostéoblastes vont s'incorporer dans la matrice au sein de lacunes appelées ostéoplastes [21]. Ces ostéoblastes vont se différencier en un phénotype plus mature pour devenir des ostéocytes. La création de canalicules anastomosés permettra aux ostéocytes de communiquer entre eux via la formation de processus dendritique. Grâce à la création de ce réseau ostéocyttaire (conf. Fig. 9), les ostéocytes jouent un rôle

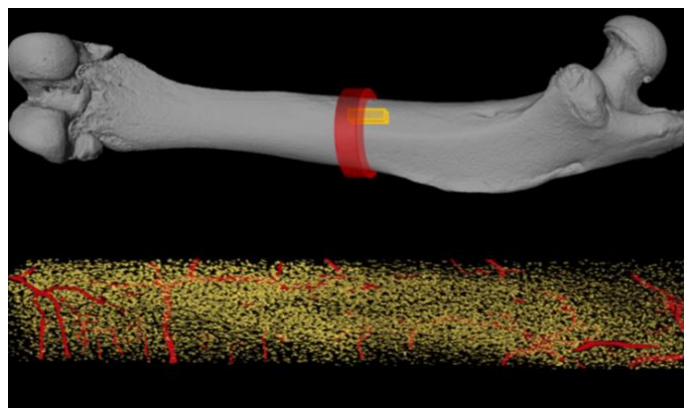


Figure 9 : Microtomographie du réseau ostéocyttaire du fémur de rat (Wittig et al, 2016). En haut représentation 3D du fémur de rat. En bas, mise en évidence des lacunes ostéocytaires (en jaune) et du réseau vasculaire (en rouge)

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

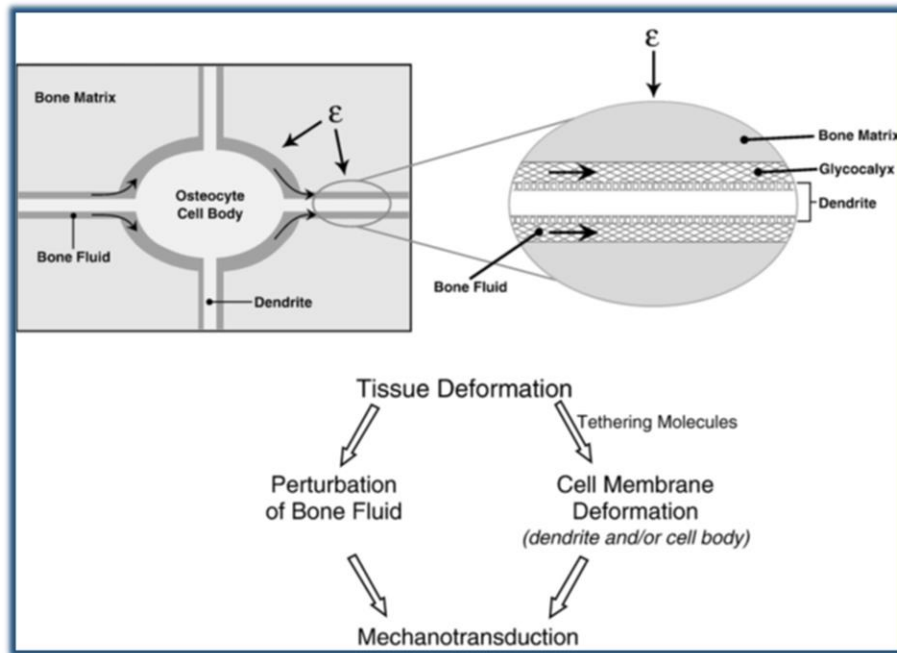


Figure 10 : Diagramme simplifié des processus de mécanotransduction produits par les ostéocytes via les perturbations du fluide interstitiel osseux (Bonewald et al, 2008).

fondamental dans l'homéostasie osseuse. Les processus dendritiques communiquent avec les cellules en surface du tissu osseux (périoste) et sont donc capables de recruter des précurseurs ostéoclastiques pour induire les processus de résorption osseuse, mais également réguler la différenciation des CSM [22]. Les ostéocytes sont les mécanosenseurs du tissu osseux et participent donc à la mécanotransduction puisqu'ils sont capables de détecter des contraintes mécaniques et de les traduire en signaux biochimiques aux cellules environnantes. La capacité des ostéocytes à générer une réponse selon l'environnement mécanique est possible grâce à la présence d'un fluide interstitiel au sein du réseau lacuno-canaiculaire. Assurément, lors d'une déformation locale (flexion ou compression) de la matrice osseuse entourant les ostéocytes, des perturbations du fluide interstitiel vont se propager et créer des effets de cisaillement au niveau des ostéocytes (conf. Fig. 10).

## 2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) du tissu osseux correspond à 30% de la masse totale et est constituée d'une partie organique (35%) et d'une partie inorganique (65%). Dans la phase organique, on retrouve en majorité des fibres de collagènes de type I (82%). Le reste des pourcentages représentent des protéines non collagéniques qui pour la plupart sont sécrétées par les ostéoblastes (10%), des lipides (3%) ainsi qu'une substance fondamentale et des protéoglycanes (5%). Concernant la partie inorganique, elle est essentiellement composée de cristaux d'hydroxyapatite,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

## 2.4. Phase organique

Les molécules de collagènes peuvent être définies, selon Van der Rest et Garrone [23] comme étant des macromolécules structurales de la MEC. Parmi les quinze types de collagènes existants, c'est le collagène de type I qui est majoritaire au sein de la matrice osseuse. Ce collagène est composé de deux chaînes  $\alpha 1$  et d'une chaîne  $\alpha 2$  enroulée l'une autour de l'autre pour former une triple hélice intitulée tropocollagène. L'assemblage de plusieurs sous-unités de tropocollagène va former une fibrille de collagène et c'est par la liaison de multiples fibrilles de collagène que la fibre de collagène se forme.

Le second composant de la MEC est les protéines non collagéniques. Elles ont un rôle dans les processus de régénération osseuse, et plus particulièrement dans les processus de minéralisation de la matrice. Parmi ces protéines non collagéniques, on retrouve l'ostéonectine qui permet la liaison entre le collagène de type I et le calcium, l'ostéopontine qui participe à l'adhésion des ostéoblastes, et l'ostéocalcine qui régulerait la minéralisation de la matrice osseuse [24]. Un autre composant minoritaire de la MEC est la substance fondamentale. Cette matière a une consistance de gel et est composée de glycosaminoglycanes (GAG) qui pour la plupart sont agrégées à un noyau protéique pour former un protéoglycane. Ce gel participe à la résistance en compression [7].

D'un point de vue mécanique, cette phase organique est responsable du comportement plastique du matériau osseux. Cette phase débute une fois que la limite d'élasticité est dépassée et des déformations permanentes peuvent alors apparaître allant jusqu'à rupture du matériau (conf. Fig. 11.A). L'os se comportera de manière ductile en étant capable d'absorber une énergie importante avant rupture ou bien l'os se comportera comme étant un matériau fragile de par son incapacité à répartir efficacement les contraintes subies à travers le tissu osseux [25] (conf. Fig. 11.C).

## 2.5. Phase inorganique

La phase minérale de la MEC est composée de cristaux d'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  en majorité. Il est vrai que la présence en faible quantité de carbonate et de magnésium est également perçue au sein de la MEC. Les cristaux formés sont de très petites tailles, mesurant environ 20nm dans leurs plus grandes dimensions et sont plus solubles que les cristaux d'hydroxyapatite géologique [7].

De plus, les propriétés mécaniques telles que la force ou la rigidité du tissu osseux proviennent justement de cette phase minérale (conf. Fig. 11.B). Dans des conditions respectant

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

les limites élastiques de l'os, ce dernier est capable de se déformer et les microdommages apparents peuvent alors être régénérés sans induire de fragilité permanente. Le module d'Young ou d'élasticité est une grandeur intrinsèque du matériau. Il est défini en Giga Pascal (GPa). Pour le tissu osseux, et cela est vrai pour les tissus minéralisés présents dans le corps humain, ce paramètre mécanique sera grandement influencé en fonction de la teneur en minéraux du tissu [26].

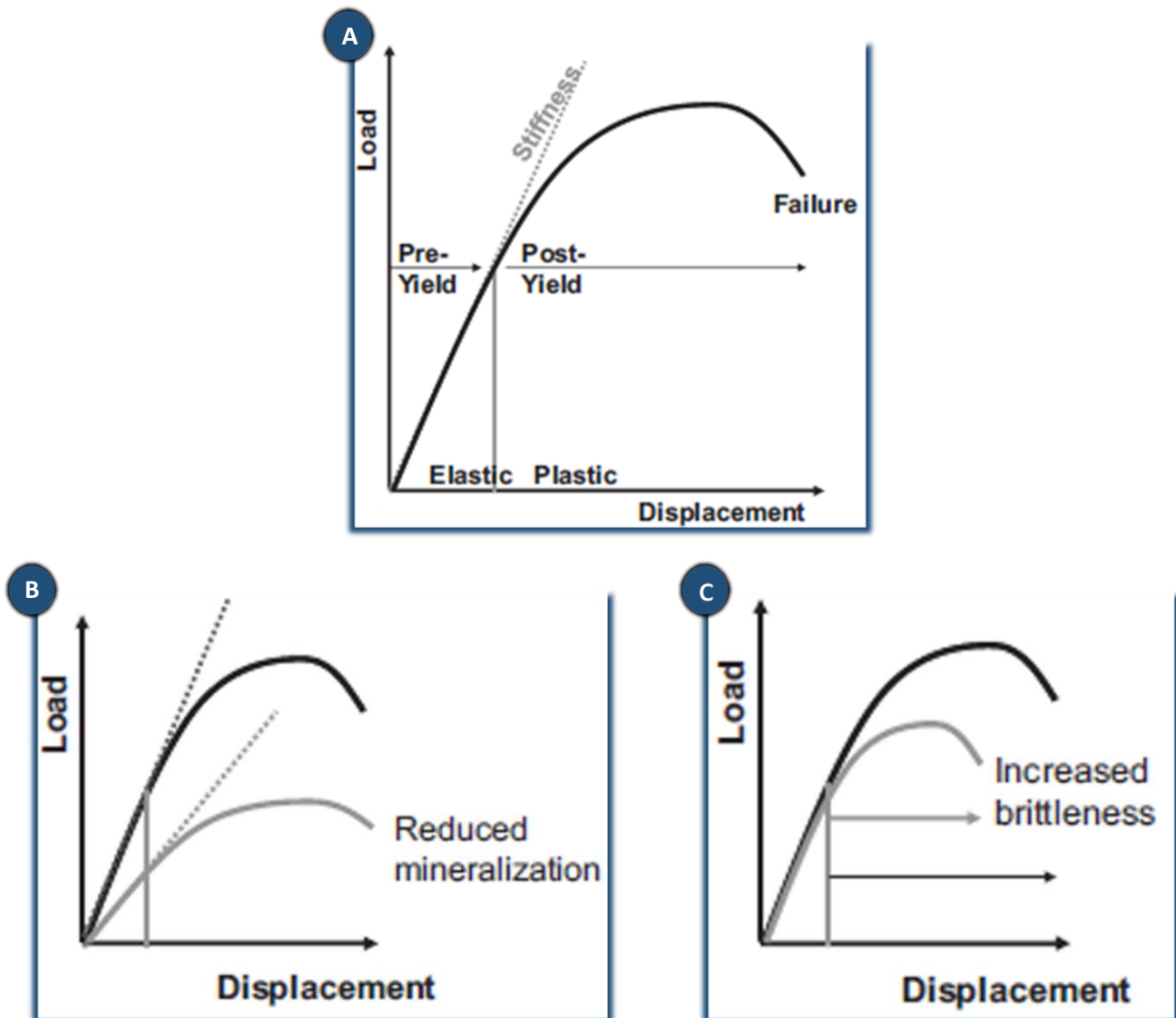


Figure 11 : Représentation hypothétique des courbes de charge en fonction de la composition osseuse (Alford et al, 2015). **A.** Courbe force-déplacement. La première phase de la courbe correspond au domaine élastique du matériau, celui-ci a un comportement linéaire et aucun dommage n'est perceptible dans cette zone. Le second domaine débute après la limite élastique du matériau. Dans cette zone les dommages apparents sont permanents. On constate que le matériau va se déformer jusqu'à atteindre un maximum, cette zone représente la ductilité du matériau. Au-delà, des effets de striction sont apparents et se traduisent par une diminution de la force jusqu'à atteindre un point de rupture du matériau. **B.** Effet de la teneur en minéraux de l'os. Une diminution de la minéralisation entraîne un changement d'un point de vue mécanique par une diminution de la rigidité. **C.** Si la structure osseuse n'arrive pas à répartir correctement les charges subies alors le matériau devient fragile. Il n'y aura pas ou peu de déformation plastique et le point de rupture est donc apparent à des déformations moins importantes.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

Cette première phase d'introduction nous a démontré que l'os est un organe en perpétuel renouvellement ayant des capacités de réparation face aux microtraumatismes quotidiens qu'il subit, grâce notamment aux réseaux ostéocytaires. En plus de sa capacité de réparation, il est avéré que l'os est capable de se régénérer à la suite de traumatismes importants induits ou non. En effet, cet organe est très répondant de l'environnement mécanique qu'il perçoit, mais si ces contraintes sont trop importantes, une déchirure du tissu peut survenir, perturbant ainsi les fonctions de ce dernier. Cependant, il a été constaté par les cliniciens que l'os était apte à se régénérer spontanément si un environnement stable lui était offert, et ce via la pose de dispositifs médicaux tels que les fixateurs externes. Chez l'homme, les processus de régénération osseuse surviennent à la suite de traumatismes accidentologiques, de fractures de fatigue ou dans des pathologies. Son processus est complexe, passant par une phase de création et d'augmentation du volume osseux.

La distraction ostéogénique (DO) ou allongement progressif est un processus clinique induit et contrôlé se basant sur les capacités de régénération du tissu osseux. Son principe repose sur la mise en place d'un dispositif externe pouvant effectuer un éloignement des segments osseux après une induction de fracture par le chirurgien. Ce procédé chirurgical est appelé chirurgie de callotaxis et c'est par l'induction de forces mécaniques qu'un ensemble de réponses biologiques et physiologiques vont se produire, permettant ainsi la formation d'un cal osseux (structure créée au sein du gap), qui avec le temps se consolidera pour donner un nouvel os.

## Partie 2 : La distraction ostéogénique

La pratique d'allongement osseux, en chirurgie orthopédique, touche différentes tranches d'âge allant de l'enfant à l'adulte (jusqu'à 60 ans) en passant par l'adolescent [27,28]. Cette technique est appliquée dans divers cas cliniques ayant de multiples origines. En effet, la DO est destinée à corriger des inégalités et/ou des déformations de membre, à réparer des défauts osseux (problème de cicatrisation à la suite d'une fracture), à traiter des états pathologiques (ostéomyélites/tumeur osseuse), à corriger une malformation congénitale du squelette (déficience dans la structure squelettique) et à compenser des petites tailles dans des cas d'achondroplasie par exemple.

### I. Histoire

Dès 1831, le premier fixateur externe a été décrit par J. Emsberry. Par définition, un fixateur externe est un dispositif médical qui a été conçu afin de traiter des blessures articulaires et/ou osseuses tout en corrigeant les déformations du squelette. Son fondement repose sur la fixation de l'os à un dispositif externe stabilisant ainsi le membre blessé [29]. L'engouement concernant l'utilisation des fixateurs externes en chirurgie orthopédique se développa au cours des années suivantes. Et c'est en 1905 que A. Codivilla, un médecin orthopédiste italien, a décrit pour la première fois la procédure de DO en appliquant des forces de traction de manière soudaine et non répétée à la suite d'une fracture induite du fémur [30]. En revanche, la compréhension de l'ostéogénèse et le rôle des tissus mous environnants (vaisseaux, nerfs, muscles) dans le processus d'allongement étaient très limités, entraînant ainsi de nombreuses complications pour le patient. C'est pourquoi il n'était pas rare de voir apparaître des lésions nerveuses, des pseudarthroses (manque de consolidation), des cals vicieux (défaut d'alignement lors de la cicatrisation), des douleurs liées à un défaut d'anesthésie et même le décès sur la table opératoire [31].

Néanmoins, ce sont les travaux menés par le médecin russe G. A. Ilizarov en 1951 qui font qu'à l'heure actuelle ce dernier est considéré comme le pionnier de la DO. Ses recherches ont démontré l'influence des contraintes mécaniques sur le processus de régénération osseuse et sur les tissus mous environnants en attestant que le taux et la fréquence de distraction sont des paramètres critiques à l'ostéogénèse [32]. Il remarqua également que la stabilité du dispositif médical est tout aussi importante pour favoriser la formation osseuse [33]. Prenant en compte tous les aspects biologiques induits par la distraction, Ilizarov a mis au point un fixateur externe



# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

(qui de nos jours porte son nom) ainsi qu'un protocole reproductible permettant de diminuer le nombre de complications observées par ces prédécesseurs, sans pour autant faire disparaître leurs occurrences.

Dans les années suivantes, la DO est principalement appliquée lors de traitement des os longs : fémur, tibia/fibula. En effet, on retrouve son utilisation dans un large spectre d'application en chirurgie orthopédique que ce soit pour la correction des inégalités de membres d'origine congénitale ou acquise, post-traumatique voir post tumoral.

## II. Les paramètres qui contrôlent la régénération osseuse

### 1. Les cellules souches (CS)

Les cellules souches (CS) sont caractérisées par leurs habilités à s'autorenouveler. Ce principe consiste en la création d'une copie cellulaire afin de conserver un pool de CS génétiquement identique. Une seconde caractéristique des CS est leurs capacités à se différencier. La différenciation détermine un concept biologique où les cellules sont capables de se spécialiser en un type cellulaire. D'ailleurs, les CS ont été classées en quatre catégories distinctes selon leurs aptitudes à produire des cellules différenciées :

- *Les cellules souches totipotentes* : elles ont une capacité de différenciation très élevée, capable de donner un organisme entier et sont observées seulement au stade zygote jusqu'au stade morula, soit pendant les 4 premiers jours après la fécondation de l'ovule par les spermatozoïdes.
- *Les cellules souches pluripotentes* : elles peuvent se différencier en tous les types cellulaires dérivant des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme). En 2012, Shinya Yamanaka a reçu le prix Nobel de médecine grâce à ses travaux portant sur la reprogrammation cellulaire. En effet, il a réussi à induire une CS pluripotente en reprogrammant des cellules somatiques adultes.
- *Les cellules souches multipotentes* : si elles sont capables de se différencier en donnant naissance à divers types cellulaires, elles sont cependant déjà engagées dans une lignée de différenciation. Ces cellules se retrouvent au sein des diverses niches tissulaires permettant ainsi d'assurer leurs homéostasies tout au long de la vie.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

- *Les cellules souches unipotentes* : elles ont un potentiel de différenciation très amoindri puisqu'elles ne peuvent générer qu'un seul type cellulaire. Néanmoins, elles conservent leurs capacités d'autorenouvellement.

Au sein du corps humain, on retrouve trois types de CS qui permettent de maintenir l'homéostasie cellulaire du système et qui permettent de générer des cellules lorsque celui-ci subit des attaques ou lésions.

## 1.1. Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM)

Les CSM sont des cellules souches multipotentes, cette dénomination ayant été introduite par Caplan en 1991 [34]. Ces cellules sont logées dans divers endroits du corps permettant ainsi d'augmenter leurs disponibilités. Elles ont la capacité de se différencier en tous les types de cellules formant le tissu conjonctif. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle on les retrouve dans le tissu osseux (MO et le périoste), le tissu musculaire, le tissu épithélial, le tissu cardiovasculaire et le tissu adipeux [4,35–38]. Néanmoins, la source principale de CSM se trouve au sein de la MO, juxtaposée aux régions périvasculaires des niches de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Leur présence au sein de la MO est extrêmement rare puisqu'elle ne représente que 0.001% à 0.01% de la cellularité totale de la moelle [39]. Selon la société internationale de la thérapie cellulaire (SITC) [34], les CSM sont définis via trois caractéristiques intrinsèques. La première stipule qu'elles doivent être adhérentes au plastique. Le second critère se réfère à leur capacité de différenciation (a minima) conformément aux trois lignages suivants : ostéoblaste, chondroblaste et adipocyte. En effet, les CSM possèdent un potentiel de différenciation bien plus important que ces trois lignées [40] (conf. Fig. 12). Le dernier critère se rapporte à l'expression de protéines surfaciques au niveau de leur membrane cytoplasmique, permettant ainsi leurs isolations parmi un ensemble de cellules. La SITC a stipulé que ces cellules devaient exprimer positivement le CD90, le CD73 et le CD105 et négativement le CD45, le CD34, le CD14, le CD11b, le CD79. Cependant, au fur et à mesure des années, d'autres marqueurs ont été observés tels que Stro-1, CD13, CD29, CD44, CD63, CD166 et CD271 (liste non exhaustive) [41–43]. Si certains marqueurs sont spécifiques aux CSM, d'autres sont cependant présents sur un grand nombre de types cellulaires [44]. À titre d'exemple, le CD44 est une glycoprotéine de surface participant à l'adhésion et à la migration cellulaire, c'est pourquoi lors d'une caractérisation il est fortement conseillé d'utiliser plusieurs marqueurs simultanément.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

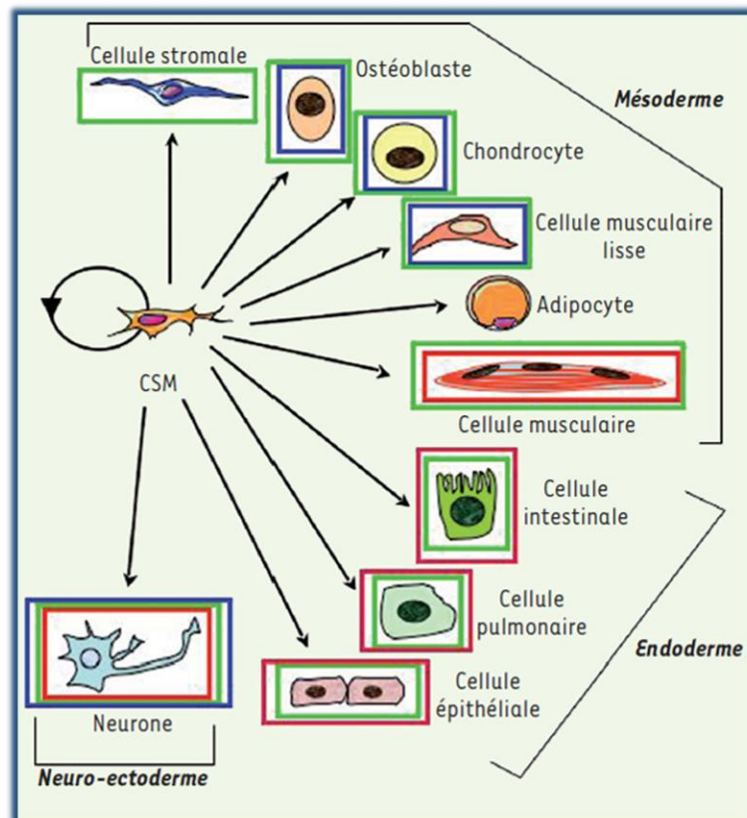


Figure 12 : Illustration des voies de différenciation des CSM (Charbord et Casteilla, 2011)

## 1.2. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

C'est Alexander Maximov qui a suggéré l'existence de telles cellules capables de migrer via le réseau vasculaire et de se différencier selon une lignée spécifique [45]. Ces cellules ont la capacité de se différencier en toutes les cellules sanguines et régulent donc les processus d'hématopoïèse. Un total d'une dizaine de voies de différenciation est possible : les érythrocytes, les plaquettes, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes, les lymphocytes T, B et NK et les cellules dendritiques (conf. Fig. 13). Les CSH se trouvent au sein de la moelle rouge des os longs, mais, tout comme leurs confrères CSM, elles sont des événements rares et ne représentent que 0.01% des cellules formant la moelle. Cependant, ces cellules ont une forte capacité de prolifération et de différenciation. Par exemple, il a été montré qu'en condition normale, il est produit environ  $10^{10}$  érythrocytes et  $10^9$  leucocytes (globules blancs) [43], le tout en maintenant une certaine proportion vis-à-vis des concentrations cellulaires de chaque lignée.

Grâce aux travaux menés dans les domaines de l'hématologie et de l'oncologie, l'identification de marqueurs surfaciques a permis également d'isoler et de caractériser les cellules selon leurs degrés de différenciation et donc d'engagement dans une lignée spécifique.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

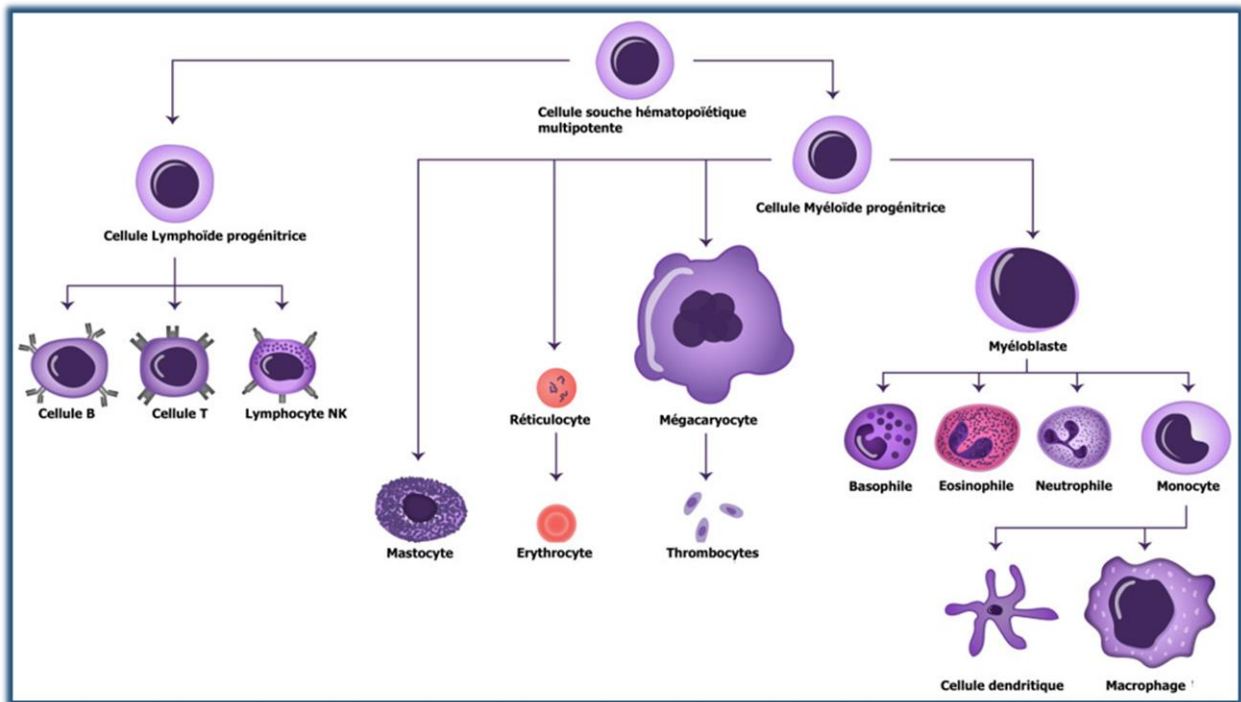


Figure 13 : Représentation des voies de différenciation des CSH.

C'est le CD34 qui a été déterminé comme le premier marqueur de cellules hématopoïétiques primitives. Et à l'heure actuelle, il reste le marqueur le plus utilisé lors d'isolation de CSH en clinique ou en recherche. Ce marqueur est intéressant, car son expression disparaît lorsque ces dernières se différencient [46]. Par ailleurs, les CSH n'expriment pas les marqueurs CD38, CD45 et CD71 qui eux sont exprimés rapidement par les progéniteurs lors de la différenciation dans les lignées hématopoïétiques. C'est pourquoi l'utilisation d'un marqueur négatif tel que CD45 en combinaison de CD34 (marqueur positif) permet d'isoler ces cellules au phénotype immature [47].

## 1.3. Les cellules progénitrices endothéliales (CPE)

Les CPE sont des cellules progénitrices comme leur nom l'indique. C'est-à-dire que leurs capacités de différenciation sont limitées par rapport aux cellules souches. Cette population a été découverte grâce aux travaux de Asahara et al en 1997 [48]. Pour ce faire, ils ont isolé les cellules positives au marquage CD34 présentes dans le sang périphérique et les ont cultivées de manière *in vitro*. Ils ont pu constater que ces cellules pouvaient se différencier en un phénotype de type endothélial (les cellules endothéliales forment la paroi des vaisseaux sanguins ; elles en sont la couche la plus profonde). Grâce à cette découverte, la mise en évidence d'un nouveau processus de vascularisation postnatal a pu être établie. Ce processus est appelé vasculogénèse et son principe sera détaillé dans une section plus bas. La source primaire de ces cellules serait la MO, mais tout comme les CSH et les CSM, leur nombre reste

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

relativement restreint et serait estimé à moins de 10 cellules pour  $10 \times 10^5$  de cellules mononuclées [43].

Concernant leur origine, la théorie qui semble se dessiner serait que les CSH et les CPE dériveraient d'un précurseur commun appelé hémangioblaste [46,49,50] (conf. Fig. 14). En effet, il a été constaté que ces deux populations cellulaires partagent des marqueurs surfaciques en commun : CD309 (ou Flk-1 ou VEGFR2), Tie 2, c-Kit, Sca-1, CD133 and CD 34. Cependant, il a été défini [48,49,51] que les CPE sont des cellules qui expriment positivement les marqueurs AC133 et CD309, parmi les cellules exprimant positivement le CD34 (conf. Fig.14). En effet, les cellules souches/progénitrices, lorsqu'elles débutent leurs engagements vers une voie de différenciation, n'expriment plus AC133 et CD309. Donc ici, AC133 est un marqueur qui différencie les CPE immatures (présentes dans la moelle) des CPE circulantes (dans le sang) [50]. Et le CD309 permet de différencier les CEP circulantes des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques (car ces dernières ne l'expriment plus). Par conséquent, les CPE sont isolées grâce aux marqueurs CD34, CD309 et/ou Ve-cadhérine [46,48]. Si l'on souhaite caractériser des CPE plus immatures, alors l'utilisation de marquage par l'AC133 semble nécessaire [49]. Par la suite, les CPE en circulation vont continuer à se différencier et vont donc exprimer des marqueurs de la lignée endothéliale tels que la VE-cadhérine ou la selectine E.

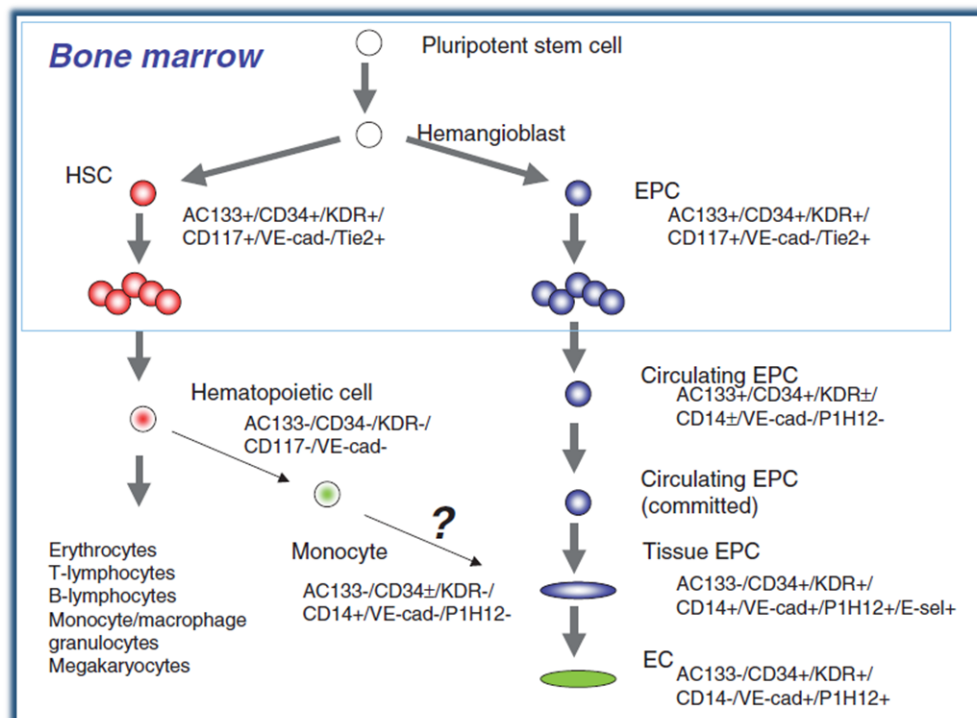


Figure 14 : Représentation théorique de la voie de différenciation des CPE avec la mise en évidence d'un précurseur commun aux CSH et aux CPE (Eguchi et al, 2007). Sur cette illustration, sont également représentés les profils d'expression des marqueurs surfaciques des cellules en fonction de leur engagement dans une lignée de différenciation.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

## 1.4. La mobilisation des CS

La mobilisation de CS de la MO au sang périphérique nécessite la perturbation de leurs systèmes d'adhésion. Ce processus de relargage implique l'orchestration d'une série d'évènements : tout d'abord, la perturbation des molécules d'adhésion entre les CS et la MEC, puis la migration et enfin la sortie des cellules à travers l'endothélium au niveau du site d'intérêt. Parmi l'ensemble des systèmes jouant un rôle dans la rétention des CS, il semblerait que le plus important soit le complexe SDF-1/CXCR4 [44]. Et cela est vrai pour chacune des cellules souches citées précédemment. Ce complexe est formé d'un ligand, ici SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) ou appelé également CXCL12, qui est une chimiokine participant à la mobilisation cellulaire. Le récepteur de cette dernière, nommé CXCR4, est présent sur les CS [43]. À l'heure actuelle, SDF-1 serait le seul ligand à être reconnu par CXCR4. Ce phénomène est intéressant, car parmi la grande famille des chimiokines composés de 19 récepteurs et de 50 ligands, tous ont la capacité de reconnaître plusieurs récepteurs et inversement. Ce qui fait que CXCR4 reste un récepteur unique [52].

Cette capacité des CS à pouvoir sortir de leurs niches pour rentrer dans la circulation sanguine a été appelée mobilisation. La présence d'un gradient de concentration de SDF-1 entre la niche et le milieu extérieur permettrait la production de ce phénomène. D'ailleurs, Aiuti et al [53] ont montré *in vitro* la réponse des CSH face à SDF-1 en utilisant une chambre de Boyden pour quantifier la chimiotaxie induite par ce dernier. Ils ont constaté que dès l'application de faibles concentrations de SDF-1 (30 ng/ml), les CD34<sup>+</sup> induisaient une réponse positive. Ils ont également montré que la concentration optimale semble être aux alentours de 300 ng/ml.

De plus, la mobilisation est également orchestrée par la sécrétion de certaines enzymes protéolytiques telles que cathepsine G et élastase qui clivent une partie du récepteur CXCR4, inactivant ainsi SDF-1 [54]. D'autre part, les métalloprotéases (MMP) inactivent le signal de SDF-1 et joueraient donc un rôle dans la mobilisation des CS. De surcroît, la sécrétion de MMP-9 et MMP-2 semble être en partie médiée par SDF-1 [55]. Au niveau de l'industrie pharmaceutique, il existe une multitude de produits permettant d'induire la mobilisation de CS, en se basant sur la perturbation de SDF-1/CXCR4 via notamment le G-CSF.

Dans des modèles de régénération, il a été montré que SDF-1 est rapidement sécrété au niveau du site lésé que ce soit dans des modèles d'ischémie [56] ou de distraction ostéogénique [57]. Le rôle de SDF-1 est double dans la migration cellulaire, comme expliqué précédemment,

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

mais également au niveau du homing des CSM, qui correspond à l'entrée des cellules dans le tissu lésé [58] ainsi que lors de la régénération osseuse [59].

Concernant les CPE, leur mobilisation est aussi affectée par le complexe CXCR4/SDF-1 [60]. En effet, la production de SDF-1 augmente rapidement au niveau de site ischémique, mais un deuxième stimulateur spécifique est le VEGF. L'interaction entre le récepteur VEGFR et le ligand VEGF induirait une production de MMP-9 contribuant au relargage d'un facteur soluble sKitL, qui augmente la mobilité des CPE et stimule la migration de ces dernières vers le sang périphérique [61,62].

## 2. Les mécanismes moléculaires

Il a été montré que le processus de régénération osseuse, notamment lors de la DO, est régi par l'implication de divers facteurs solubles (conf. Tableau 1). Les mécanismes moléculaires produits lors de la DO englobent un ensemble de protéines ou glycoprotéines synthétisées par des cellules actives, pour induire une réponse des cellules cibles. C'est pourquoi elles peuvent être caractérisées comme des médiateurs chimiques. En effet, à la suite d'un stimulus, la cellule active est amenée à sécréter des molécules et c'est par leur fixation à des récepteurs membranaires spécifiques qu'elles vont venir réguler l'activité de la cellule cible. Étant donné le nombre important de molécules existantes impliquées dans le processus, une classification a été définie selon leurs fonctions et leurs structures chimiques. On retrouve donc les cytokines inflammatoires, les facteurs de croissance et de différenciation ainsi que les hormones [63]. De manière générale, les facteurs solubles induisent des signaux d'activation, de prolifération et de différenciation, voire d'apoptose (mort cellulaire).

De plus, on distingue trois types d'effet possible en fonction de leurs distances d'action : autocrine, paracrine et endocrine. Une activation autocrine correspond à une autorégulation de la cellule, c'est-à-dire que la cellule va venir produire des molécules dont la cible est la cellule sécrétrice. Pour l'activation paracrine, la cellule sécrétrice aura comme champ d'action les cellules environnantes. Et enfin, on trouve le mode d'activation de type endocrine, pour lequel les molécules vont migrer dans la circulation sanguine pour atteindre des cellules cibles éloignées.

Au cours de la DO, les stimuli qui entraînent une réponse biologique endogène du tissu lésé sont induits par l'ostéotomie (processus inflammatoire et premières étapes de la réparation osseuse), ainsi que par l'induction des efforts mécaniques. En effet, au sein de la littérature, il a été décrit que l'application de force de traction génère des phénomènes de « mécano-

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

transduction » stimulant la formation osseuse [64]. C'est pourquoi la production du tissu régénéré dans le protocole de DO est différente de celle obtenue dans des cas de réparation fracturaire. En revanche, les signaux moléculaires induits qui contrôlent le processus de régénération des deux phénomènes sont similaires [65]. Les variations observées dépendent de l'intensité d'expression des molécules ainsi que du moment de leur présence au cours du processus de régénération (notion de temporalité).

De manière générale, le processus biologique de régénération implique un mécanisme complexe de molécules qui entraîne des facteurs locaux et systémiques et qui eux-mêmes interagissent avec une variété de cellules au niveau du cal osseux. Cet ensemble de réponses biologiques activées participera soit à l'ostéogenèse via la formation tissulaire et la minéralisation soit aux processus de vascularisation du tissu nouvellement formé.

## 2.1. Les cytokines pro-inflammatoires

Au sein de cytokines inflammatoires, on retrouve les interleukines 1(IL-1), les interleukines 6 (IL6) et TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ). Il-1 et Il-6 sont régulés positivement à la suite de la fracture induite puisqu'elles jouent un rôle important lors de l'initiation de la cascade réparatrice en augmentant la synthèse extracellulaire, en stimulant la vascularisation et en permettant le recrutement de cellules inflammatoires [65]. Ces molécules sont sécrétées par diverses cellules telles que les CSM, les macrophages et les cellules inflammatoires. Au cours de la DO, les interleukines sont fortement présentes pendant les premières heures suivant l'ostéotomie puis leurs expressions diminuent rapidement. Cependant, il a été constaté un deuxième pic d'expression pour les Il-6 au cours de la phase de distraction, période où les segments osseux sont éloignés les uns des autres. Leurs expressions sont particulièrement marquées au niveau de la zone centrale du régénérat osseux et leurs fonctions permettraient d'augmenter le processus de différenciation des cellules ostéoblastiques et chondrocytaires. À la suite de l'arrêt des forces de traction, le niveau d'expression deviendrait nul. TNF- $\alpha$ , quant à lui, joue un rôle dans la régulation des fonctions immunitaires et inflammatoires. Son expression est présente qu'à des temps tardifs du processus de consolidation. Ceci suggère qu'il participerait au remodelage osseux uniquement au cours du processus de consolidation de la DO [66].

## 2.2. Les facteurs de croissance et de transcription

Les facteurs de croissance présentés ne sont pas exhaustifs, mais représentent les facteurs les plus influençant sur les processus d'ostéogenèse et de vascularisation. Dans un premier temps



# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

seront présentés les facteurs en lien avec l'ostéogenèse (TGF- $\beta$ , BMP, IGF, b-FGF) puis ceux en lien avec l'angiogenèse (b-FGF, VEGF, Ang, HIF-1 $\alpha$ ).

- TGF- $\beta$  (Transforming growth factor) [63,65,67,68]:

TGF- $\beta$  existe sous trois formes : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3. Cependant, c'est TGF- $\beta$ 1 que l'on retrouve en plus grande quantité dans la matrice osseuse. Il serait la forme déterminante dans les processus de régénération osseuse. Les cellules inflammatoires, l'endothélium, la MEC, les chondrocytes ainsi que les ostéoblastes sont les sources majeures du TGF- $\beta$ . Ces derniers sont de puissants chimiotractants envers les CSM et les cellules inflammatoires (macrophages), c'est-à-dire qu'ils impactent leurs migrations. De plus, ces molécules ont un effet mitogénique (prolifération) sur les précurseurs ostéoblastiques et jouent un rôle dans la création de la MEC osseuse, en stimulant la production de collagène et en régulant positivement l'expression de cellules non collagéniques de la MEC impliquées dans des processus de minéralisation. Enfin, TGF- $\beta$  permet également de contrôler l'expression phénotypique différenciée des CSM, des chondrocytes, des ostéoblastes. Dans la littérature, l'expression de TGF- $\beta$  a pu être définie au cours des trois phases du processus de DO. Cette molécule est présente dès la phase de latence et notamment au temps tardif de cette période, montrant son implication dès les phases précoces du processus de régénération osseuse. Pendant la phase de distraction, il a été montré que l'expression de TGF- $\beta$ 1 est régulée positivement jusqu'à trois fois plus par rapport à son niveau basal. Par ailleurs, les cellules exprimant TGF- $\beta$ 1 pendant cette période sont les ostéoblastes, les CSM et les tissus conjonctifs environnants le régénérat osseux. Lammens et al [67], dans un modèle de DO chez le chien, ont constaté une corrélation négative entre la production d'ostéocalcine (marqueur des ostéoblastes matures) et l'expression de TGF- $\beta$ . Ceci expliquerait le rôle et la forte concentration de TGF- $\beta$  au sein du régénérat. Ce dernier bloquerait la maturation des ostéoblastes en retardant leurs différenciations et en stimulant leurs proliférations. Après l'arrêt des forces de traction, une diminution de son expression est perceptible, pour complètement disparaître à des temps tardifs.

- BMP (Bone morphogenetic protein) [24,63,65,66,68] :

Les BMP sont des facteurs de croissance appartenant à la superfamille des TGF- $\beta$ . Au sein de la littérature, une vingtaine de BMP ont été décrits. Cependant, seuls BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 et BMP-9 ont un rôle ostéoinductif et participent donc au processus d'ostéogenèse. Dans les processus de DO, la participation de BMP-7 et 9 est négligeable voir absente. Grâce à un modèle de souris knockout pour le BMP-2 dans un modèle de DO, Alam et al [69] ont mis en évidence le rôle important de ce dernier sur le processus de régénération osseuse lors de

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

l'allongement. En effet, ils ont observé un retard de consolidation au temps tardif malgré la mise en place d'une stratégie compensatoire en surexprimant le BMP-7. Les BMP sont sécrétés par les CSM, les cellules ostéoprogénitrices, les ostéoblastes, les chondrocytes et sont ancrés dans la MEC. Lors de processus de régénération osseuse, il a été montré que ces facteurs de croissance stimulent la prolifération et la différenciation des CSM selon la lignée ostéoblastique et promeut la formation de la matrice osseuse par les ostéoblastes matures. Ces molécules régulent les processus cellulaires en fonction de la concentration extracellulaire, c'est-à-dire qu'elles vont induire des comportements différents sur leurs cellules cibles en fonction d'une certaine concentration. À faible dose, les BMP favorisent la chimiotaxie (motilité cellulaire) et la prolifération (mitose), alors qu'à de fortes concentrations, leurs actions porteront sur la différenciation cellulaire et l'induction de la matrice osseuse. L'analyse de l'expression des BMP au cours de la distraction ostéogénique a été étudiée par Sato et al [70], dans un modèle de DO chez le rat, permettant ainsi de tracer la cinétique d'apparition de ces dernières selon les trois périodes du protocole de distraction. Durant la première phase du processus de DO (phase de latence), BMP-2, BMP-4 et BMP-6 sont exprimés, jouant un rôle sur la différenciation des cellules progénitrices, ostéoblastiques et chondroblastiques. Les BMP-6 sembleraient favoriser la formation de matrice cartilagineuse, car dans les temps tardifs, leur expression n'est plus apparente. Pendant la phase d'activation, les forces de traction produites corréleront positivement avec l'augmentation de l'expression de BMP-2 et 4. À l'inverse, lorsque les stimulations mécaniques stoppent, pendant la phase de consolidation, une diminution progressive est perçue jusqu'à disparition complète à des temps tardifs.

## - IGF (Insulin-like growth factor):

IGF est présent sous différentes formes dans le corps humain : IGF-I et IGF-II. Ces molécules proviennent des cellules endothéliales, des CSM, des ostéoblastes et des chondrocytes. On en retrouve également au sein de la MEC osseuse. De manière générale, IGF-I contrôle le métabolisme cellulaire en régulant le cycle cellulaire via la croissance et la prolifération des cellules ostéoprogénitrices et leurs différenciations. Ce contrôle a pour effet indirect d'augmenter le nombre d'ostéoblastes fonctionnels. De plus, lors de protocoles d'allongement [71], il a été signalé que IGF-I était présent en forte quantité dans le régénérat osseux et qu'il y aurait aussi un lien positif entre son expression et l'application de force de traction en promouvant la différenciation selon la lignée ostéoblastique des cellules ostéoprogénitrices. Une fois l'arrêt des stimulations mécaniques, une diminution graduelle de la concentration est perçue.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

## - FGF (Fibroblast growth factor) [68,72–74] :

FGF est constitué de sept polypeptides et ces molécules jouent un rôle dans la migration, la prolifération, la différenciation et la vascularisation (angiogenèse). Parmi les FGF, ce sont les FGF acides (a-FGF) et basiques (b-FGF) qui sont les plus abondants. Cependant, il semblerait que la forme basique soit celle qui participe le plus à la régénération osseuse lors de la DO. De plus, b-FGF est sécrété par diverses cellules telles que les fibroblastes, les ostéoblastes et les cellules endothéliales. C'est un facteur de croissance ayant des actions autocrines et paracrines puisque les cellules qu'il cible sont également les fibroblastes et les cellules endothéliales. En se liant avec les cellules endothéliales, il promeut l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'anciens). De manière intéressante, b-FGF a un deuxième site d'action localisé sur les cellules ostéoblastiques. En effet, toujours de manière autocrine et paracrine, b-FGF induit la prolifération de cellules ostéoprogénitrices ainsi que leurs différenciations selon la lignée ostéoblastique. Il a d'ailleurs été démontré qu'il existerait un lien intime entre TGF- $\beta$  et la production de b-FGF au sein des ostéoblastes. De surcroît, b-FGF régulerait l'ostéoclastogenèse en contrôlant la production de RANK-L notamment. Au cours de la DO [72,74], plusieurs études ont démontré que son niveau d'expression est en lien direct avec les stimuli mécaniques induits pendant la phase de distraction. D'ailleurs son niveau d'expression diminue lors de la phase de consolidation, phase dans laquelle les forces de traction sont nulles. Donc b-FGF semblerait être un facteur important pour l'ostéogenèse, mais également pour l'angiogenèse puisqu'il est capable de stimuler les cellules endothéliales.

## - VEGF (Vascular endothelial growth factor) [74–77]:

Comme son nom l'indique, VEGF joue un rôle dans les processus de vascularisation et plus particulièrement dans l'angiogenèse et la vasculogenèse (ces deux points seront détaillés plus bas). La famille de VEGF est constituée de six membres : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et de PlGF. De manière générale, les cinq premiers membres jouent un rôle sur les cellules endothéliales en agissant sur leurs migrations et leurs proliférations. La perméabilité des vaisseaux sanguins est également accrue en présence de VEGF [72]. Les cellules ostéoblastiques sont également impactées par le VEGF, un effet positif sur la chimiotaxie des CSM et des ostéoblastes a été constaté. Au cours de la régénération osseuse s'effectuant dans des processus de DO, il a été montré que les ostéoblastes et les ostéoclastes expriment VEGF-A, stimulant ainsi la formation de vaisseaux sanguins au sein du régénérat osseux. De plus, une des sources primaires de VEGF pendant la distraction proviendrait des CSM et des muscles environnants. Dans des modèles d'allongement du tibia chez le rat, il a été

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

démontré que VEGF est fortement exprimé pendant le processus de DO, notamment lors de la phase de distraction active. De plus, les chercheurs ont constaté une correspondance entre la localisation d'expression de BMP-2 et 4 avec VEGF : ceci renforce le lien important entre l'ostéogenèse et la vascularisation.

- Angiopoïétine [24,74,75]:

Les angiopoïétines sont les seconds facteurs de croissance participant à l'angiogenèse avec VEGF. Elles sont au nombre de deux : angiopoïétine 1 (Ang-1) et angiopoïétine 2 (Ang-2). La cible d'Ang-1 se réfère à la survie des cellules de l'endothélium (membrane interne des vaisseaux sanguins) tout en promouvant leurs intégrités. En revanche, Ang-2 a des effets destructeurs sur les vaisseaux sanguins. Mais si Ang-2 est en présence de VEGF, alors sa fonction change. En effet, il aura alors un impact dans la promotion de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en jouant sur le remodelage de la lame basale (mince feuillet entourant l'endothélium) et en stimulant la migration des cellules endothéliales. Au cours de la DO, le niveau d'expression de ces deux facteurs angiogéniques a été décelé et une temporalité d'expression a pu être définie avec l'apparition de Ang-1 puis de Ang-2, suivi de l'expression maximale de VEGF [74].

- HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor1- $\alpha$ ) [68,73,77]:

C'est un facteur de transcription, régulé et sécrété dans des milieux hypoxiques c'est-à-dire en absence d'oxygène. Son action principale est d'activer l'expression de facteurs angiogéniques pour favoriser la vascularisation. Ce facteur de transcription joue un rôle important lors de la DO, puisque pendant la phase d'activation du fixateur la microcirculation est perturbée, entraînant des zones d'hypoxie pouvant induire des effets délétères sur le processus de régénération osseuse. Il a été constaté que son niveau d'expression augmente pour venir stimuler la formation de vaisseaux afin de pallier le manque d'oxygène. De plus, le taux d'oxygène a un impact direct sur les cellules ostéoblastiques. En condition normoxique, les ostéoblastes produisent de la matrice osseuse, en revanche dans des conditions hypoxiques ces derniers se différencient en cellules ostéoblastiques. De plus, il a été constaté que l'HIF-1 $\alpha$  régule l'expression génique de facteur angiogénique tel que VEGF et Ang-1.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

Tableau 1 : Niveau d'expression des facteurs de croissance solubles pendant les différentes phases du processus de DO. (Runyan et Gbrick, 2016)

Signaling Molecules	Latency		Active Distraction		Consolidation	
	Early	Late	Early	Late	Early	Late
Cytokines						
IL-1 <sup>59</sup>	+++					
IL-6 <sup>98</sup>	+++		+++	+++		
TNF- $\alpha$ <sup>59</sup>						+++
RANKL/OPG ratio <sup>59</sup>		++	+++	+++	+	
TGF- $\beta$ superfamily						
BMP-2 <sup>99,101,103</sup>	++		+++	+++	+	
BMP-4 <sup>99,101,103</sup>	++		+++	+++	+	
BMP-6 <sup>99,101,103</sup>		+++	++	+		
TGF- $\beta$ <sup>99-101,103</sup>	+	++	+++	+++	+	
Angiogenic factors						
VEGF A <sup>104</sup>			+++	+++	+	
VEGF B <sup>104</sup>			+	+	+	
VEGF C <sup>104</sup>	++		+	+	+	
VEGF D <sup>104</sup>		++	++	+		
Angiopoietin 1 <sup>104</sup>		++	+	+		
Angiopoietin 2 <sup>104</sup>			++	+		
HIF-1 $\alpha$ <sup>105</sup>			+++	+++		
Other osteogenic factors						
FGF-2 (bFGF) <sup>99,101,103</sup>			++	++	+	+
IGF <sup>99,101,103</sup>			++	++		
Collagen I <sup>100,101</sup>	—	—	—		+	+++
Osteocalcin <sup>92,100,101,106</sup>	—	—	—	+	+	+
Osteopontin <sup>92,102</sup>			-/++++ <sup>102</sup>	+++	?	?

## 3. La vascularisation

En amont de la description des différents phénomènes de vascularisation, une présentation du réseau vasculaire et de la structure de ce dernier semble importante. Le système vasculaire est composé de cinq types de vaisseaux : les artères, les artérioles, les veines, les veinules et les capillaires (ici classés du plus gros diamètre au plus petit). Chacun est constitué de trois couches distinctes, à l'exception des capillaires qui ne sont caractérisés que par une seule couche. L'adventice est la paroi la plus externe et est constituée de tissus conjonctifs lâches, de fibres élastiques ainsi que des fibres nerveuses. Ensuite, la seconde couche, appelée media, est composée d'élastine, de collagène et de fibres musculaires lisses. Enfin, la couche la

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

plus interne, l'intima, est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales qui forment l'endothélium vasculaire entouré par une membrane basale constituée de péricytes (cellules contractiles).

Le développement et le maintien du système vasculaire chez les mammifères proviennent de trois processus distincts dont la résultante est la formation de vaisseaux sanguins. Ces trois processus sont les suivants : l'angiogenèse, la vasculogenèse et l'artériogenèse.

## 3.1. L'angiogenèse

Le phénomène d'angiogenèse (conf. Fig. 15) consiste en la création de nouveaux capillaires sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant via des étapes de bourgeonnement et de maturation. Il a été noté que lors de la formation de ces nouveaux capillaires, il n'y aurait pas de cellules musculaires lisses [78]. Tout d'abord, l'environnement hypoxique créé à la suite d'une lésion engendre la sécrétion de HIF, qui stimule l'expression de VEGF par notamment les ostéoblastes [79]. Les facteurs solubles présents dans le milieu, tels que VEGF, vont se lier à leurs récepteurs spécifiques et déclencher la prolifération et la

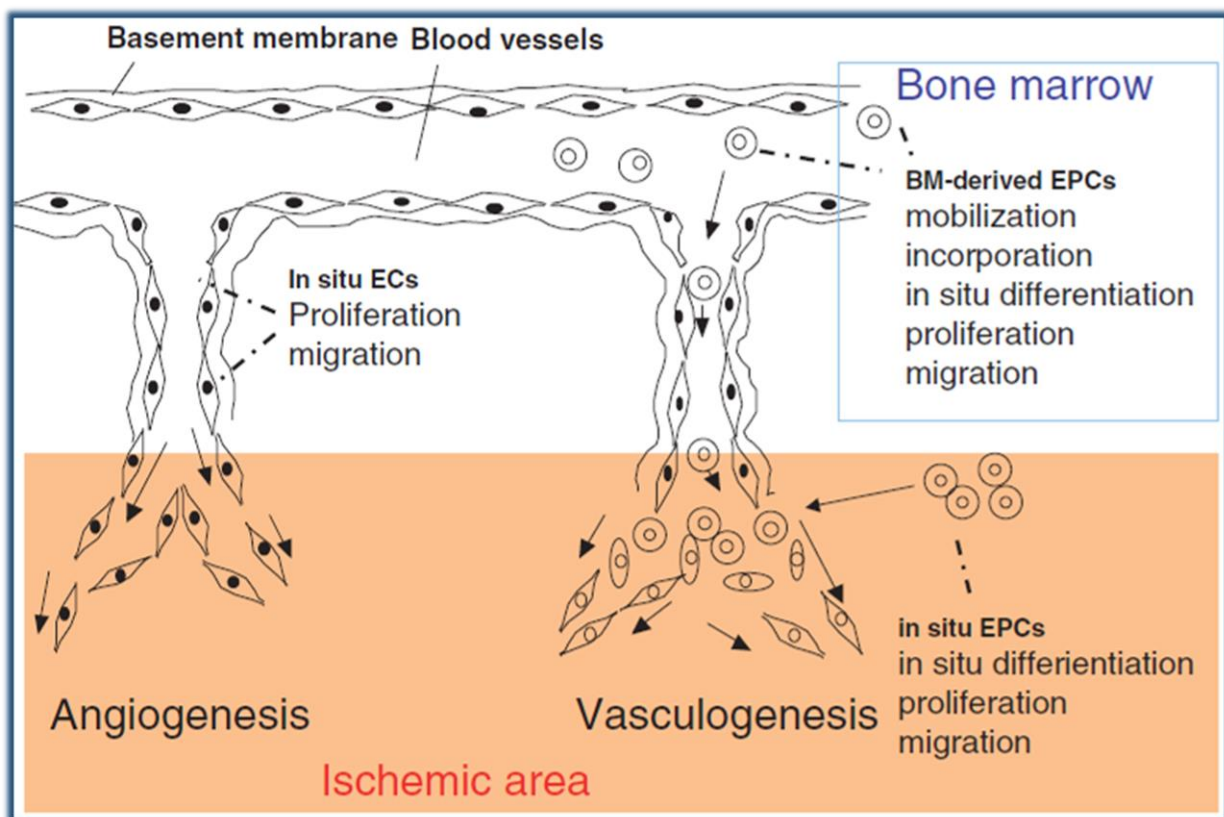


Figure 15 : Néovascularisation postnatale à la suite d'une lésion via les processus d'angiogenèse et de vasculogenèse (Eguchi et al, 2007). L'angiogenèse et la vasculogenèse sont provoquées respectivement par les cellules endothéliales (losange sur le schéma) et par les CPE (rond).

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

migration de cellules endothéliales préexistantes ainsi qu'un remodelage de la paroi vasculaire. Ce processus biologique a été le plus étudié dans les modèles de régénération et particulièrement dans des modèles de DO [74,80–82]. En effet, le rôle de l'angiogenèse dans la formation osseuse au cours de la DO a été décrit de manière intéressante via l'utilisation d'agents inhibant la prolifération endothéliale [81]. Les résultats sont probants puisqu'aucune formation n'est apparente. Plus tard, Matsubara et al [83] ont montré que le système vasculaire autour et au sein du régénérat osseux était une source importante de BMP-2. En résumé, l'angiogenèse promeut la migration cellulaire au site lésé, l'apport en oxygène, et stimule l'ostéogenèse via la sécrétion de BMP-2 par les cellules endothéliales.

## 3.2. La vasculogénèse

La vasculogénèse (conf. Fig. 16) est un phénomène différent, mais complémentaire à l'angiogenèse. Son principe se base sur la mobilisation des CPE qui vont migrer et se différencier en cellules endothéliales directement au niveau du site lésé [61]. L'activation de ce processus permet de former de nouveaux vaisseaux sanguins à l'inverse de l'angiogenèse qui, elle, permet le prolongement de vaisseaux sanguins préexistants. Le processus de vasculogénèse est donc généré par une première phase de mobilisation, phénomène où les cellules quittent leurs niches et passent dans la circulation sanguine, une phase de homing, qui correspond à l'entrée des cellules présentes dans le sang au sein du site d'intérêt et une dernière phase de différenciation et d'incorporation qui permet la création de nouveaux capillaires sanguins. Ce processus est contrôlé par une myriade de facteurs solubles : VEGF, Ang, SDF-1, EPO (érythropoïétine, facteur de croissance des précurseurs des érythrocytes) [49]. Il est intéressant de stipuler que les CPE peuvent également libérer du VEGF au sein du site lésé et donc créé également un environnement angiogénique local [61].

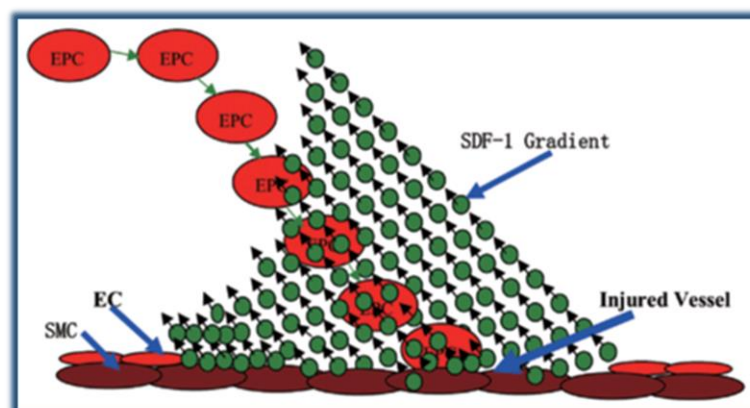


Figure 16 : Illustration du stimulus migratoire via SDF-1 après une perturbation des vaisseaux sanguins (Li et al, 2012). C'est via un gradient de concentration de SDF-1 que les CEP migrent au niveau du site lésé.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

Dans des modèles d'ischémie [46,84,85], il a été montré que les CPE sont capables d'être mobilisées du fait de l'environnement hypoxique créé via la formation d'un gradient de concentration de SDF-1 (conf. Fig. 15). Étant donné que lors de la DO, des phénomènes d'hypoxie locale ont été mis en lumière par la sécrétion de HIF, Lee et al [86] se sont donc intéressés à la mobilisation de CPE au cours de ce processus de régénération. Ils ont pu constater une augmentation de la concentration en CPE au cours de la phase de latence (mise en place du cal) et une seconde fois lors d'induction des forces de traction sur le régénérat osseux. Par ailleurs, cette mobilisation a persisté après cessation des forces de traction.

De plus, Cetrulo et al [85] ont confirmé la capacité de ces cellules à « homer » dans le régénérat osseux lors de la DO via l'utilisation de CPE fluorescente. Les cellules préalablement marquées ont été injectées juste avant l'application des forces de traction et les observations ont montré l'insertion de ces cellules dans le régénérat osseux au cours de la DO et notamment pendant les phases précoces de la consolidation (plus de stimuli mécaniques).

## 3.3. L'artériogénèse

L'artériogénèse est le développement et la maturation rapide d'artéριοles collatérales préexistantes [78]. Ces vaisseaux nouvellement créés sont constitués de l'endothélium, d'un feuillet interne élastique et d'une ou deux couches de cellules musculaires lisses. Il a été également constaté que le flux sanguin détermine la taille des artères et que la pression affecte l'épaisseur de la paroi. Chez l'homme, la réponse du réseau vasculaire face à une modification du flux sanguin se traduit par un changement de structure [78]. Des études [87] ont montré que la sécrétion de molécules par les cellules endothéliales serait médiée par l'effet de force de cisaillement induit par le sang. Sachant que les contraintes de cisaillement induites par le fluide

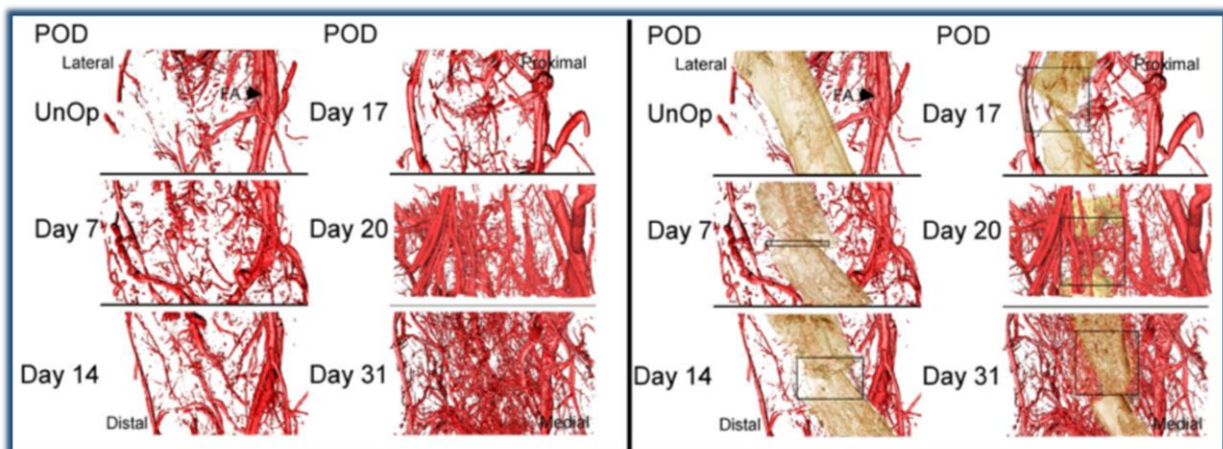


Figure 17 : Illustration du réseau vasculaire au cours de la DO dans un modèle de souris (Morgan et al, 2012). À gauche on a une représentation du réseau vasculaire coloré en rouge et à droite cette même représentation, mais avec la présence du tissu osseux et du régénérat.



# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

sont proportionnelles à la vitesse du flux sanguin. Il existerait donc un effet de mécanotransduction au niveau du système vasculaire puisque les stimuli mécaniques entraînent une croissance vasculaire. Concernant les facteurs solubles contrôlant les phénomènes d'artériogenèse (surtout de prolifération cellulaire), il n'y a pas encore de consensus entre les chercheurs. En effet, les facteurs angiogéniques VEGF et FGF n'ont pas pu encore être définis comme étant les acteurs majeurs de ce processus.

Étant donné que l'artériogenèse est en lien proche avec les contraintes mécaniques, Morgan et al [88], se sont intéressés aux phénomènes d'artériogenèse dans le processus de DO (conf. Fig. 17). À travers leur étude, ils ont cherché à quantifier la morphogénèse temporelle et spatiale des vaisseaux sanguins au sein du régénérat osseux ainsi que dans les tissus mous environnants. Ils ont constaté que lors de la DO un processus d'artériogenèse se produit dans le tissu musculaire en amont des processus d'angiogenèse, au sein et aux alentours du régénérat osseux.

## III. Le principe de la distraction

### 1. Cas clinique d'application

Certains critères doivent être respectés avant d'envisager la chirurgie de callotasis. En effet, la taille du différentiel de longueur entraînant des inégalités membranaires est un facteur critique pour la mise en place ou non du protocole de DO. La chirurgie de callotasis est préconisée lorsque les écarts de plus de 4cm sont perceptibles. En revanche, pour des différences allant jusqu'à 2cm, il existe des mesures conservatrices telles que des orthèses, des prothèses et des semelles orthopédiques. Pour les disparités de 2 à 5cm, ces types de solutions et autres (épiphysiodèse) sont également discutés dans des cas où le membre raccourci ne présente pas de déformation axiale. En effet, ces aides orthopédiques peuvent entraîner un coût financier non négligeable, la biomécanique du corps reste déficiente, la capacité de travail et de sport peut être limitée et d'un point de vue esthétique des souffrances psychologiques peuvent émerger [27].

Concernant les patients de petite taille, les chirurgiens autorisent la pratique d'allongement pour des sujets dont la taille est comprise entre 1m20 et 1m50 [89]. Pour les patients se situant dans les extrémités de cette gamme, c'est au chirurgien de décider (avec l'accord du patient) en estimant si la qualité de vie du patient sera grandement impactée [89]. Pour des tailles supérieures à 1m51 chez les filles et 1m63 chez les garçons, la programmation de la chirurgie n'est pas envisagée, car considérée comme étant d'ordre esthétique.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

Il est important de souligner que la chirurgie de callotasis n'est pas sans contraintes et ce d'un point de vue financier, psychologique et médical. En effet, des complications de diverses origines peuvent survenir tout au long du processus et seront discutées plus tard.

## 2. Fracture induite

Deux méthodes d'induction de fracture sont connues : la corticotomie et l'ostéotomie. La première technique permet de conserver la vascularisation médullaire puisque seul l'os cortical est sectionné. La seconde technique qui consiste à effectuer une ostéotomie, section bi corticale de l'os, est de nos jours la plus pratiquée par les chirurgiens. L'important durant cet acte chirurgical est qu'il doit être effectué de manière à minimiser les dommages thermiques, donc de préférence à faible énergie et sous irrigation abondante [90]. Plusieurs outils peuvent être utilisés pour effectuer cette tâche : la scie de Gigli, un ostéotome, une scie oscillante ou par l'application de plusieurs trous dans le tissu finalisé par un ostéotome ou une rupture manuelle [27].

Un point fondamental à respecter pendant la phase d'induction de fracture est la préservation de la membrane périostée. Kojimoto et al [91] ont relayé dans un modèle d'allongement chez le lapin que, lors du retrait du périoste, la formation du cal osseux externe a été tant perturbée que l'exécution de la phase de distraction active n'a pu être aboutie. Ils ont également mis en évidence un rôle ostéogénique supérieur, dans la formation du cal, du périoste comparé à la moelle située dans l'endoste du tissu osseux. En effet, le groupe d'animaux dont la moelle a été retirée, mais dont le périoste a été conservé n'a pas montré de différence significative avec le groupe contrôle où toutes les structures ont été préservées.

De plus, le rôle biologique du périoste dans la création du cal externe ou cal périosté lors du processus de régénération est réalisé par le décollement de la membrane entraînant ainsi une cascade d'évènements cellulaires et moléculaires induisant des processus de prolifération des cellules ostéoprogénitrices [92]. Enfin, le périoste est l'une des sources principales d'approvisionnement en sang, donc le préserver permet de maintenir un apport en oxygène et nutritionnel suffisant.

## 3. La phase de latence

Cette période débute dès le lendemain de la chirurgie de callotasis et se termine avant que les premières forces de traction soient appliquées au système osseux. En clinique, cette période varie entre 3 à 10 jours [27,93]. C'est une phase importante, car elle permet d'établir les

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

premières étapes du processus de régénération via la formation d'un hématome au sein du gap nouvellement formé qui par la suite sera transformé en un tissu de granulation.

L'induction de la section transverse du tissu osseux par le chirurgien entraîne une réponse inflammatoire aiguë au cours des 24 à 48h post fracture. La première structure mise en place est un hématome fracturaire constitué d'un réseau de fibrines provenant de l'extravasation du sang dans le gap nouvellement formé. Un ensemble de signaux créés par le milieu hypoxique, les cellules nécrotiques et par les plaquettes libérées dans l'hématome, induit un recrutement des neutrophiles circulants en son sein [94]. En effet, divers stimuli inflammatoires vont impacter la rétention des neutrophiles de la moelle osseuse. Par conséquent, ces derniers sont relargués dans la circulation sanguine et vont être recrutés au sein de l'hématome afin de phagocyter les tissus ou débris nécrotiques et les agents pathogènes microbiens présents [95]. Ensuite, les neutrophiles apoptotiques induisent le recrutement de la deuxième vague d'infiltration des cellules inflammatoires sur le site lésé à savoir les macrophages. Leurs rôles consistent en la résorption du réseau de fibrines anciennement formé et à la phagocytose des cellules apoptotiques. En parallèle, des ostéoclastes sont activés par les cellules stromales du tissu osseux via l'activation du système RANK/RANKL afin de nettoyer les extrémités fragmentaires du tissu osseux lésé [94].

Les cellules de l'inflammation et les macrophages vont sécréter des cytokines telles que IL- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et vont promouvoir l'angiogenèse en activant les cellules endothéliales résidentes des vaisseaux sanguins environnant via le relargage de VEGF. De plus, les macrophages sécrètent également des facteurs angiogéniques tels que VEGF. Étant donné ces informations, le processus angiogénique produit lors de cette phase est donc médié par les macrophages et l'activation des cellules endothéliales.

De surcroît, la sécrétion de médiateurs chimiotactiques, notamment SDF-1, IL-6 et IL-1 $\beta$ , vont avoir un effet sur le recrutement des cellules stromales mésenchymateuses et les cellules ostéoprogénitrices des différentes niches locales : périoste, moelle osseuse et péricytes [94]. Enfin, la production de multiples facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , BMP-2 et 4, PDGF et FGF-2) provenant des plaquettes, des macrophages, et de la dégradation de la MEC osseuse stimule la prolifération, la différenciation et la production d'une matrice au sein du gap par les cellules ostéoprogénitrices. À la fin de cette phase, la création du tissu de granulation entre les segments osseux permet de former un régénérat ou cal osseux mou. Ce dernier se forme dans le gap osseux (on parlera alors de cal endosté) et autour du gap créé (on parlera alors de cal périosté)

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

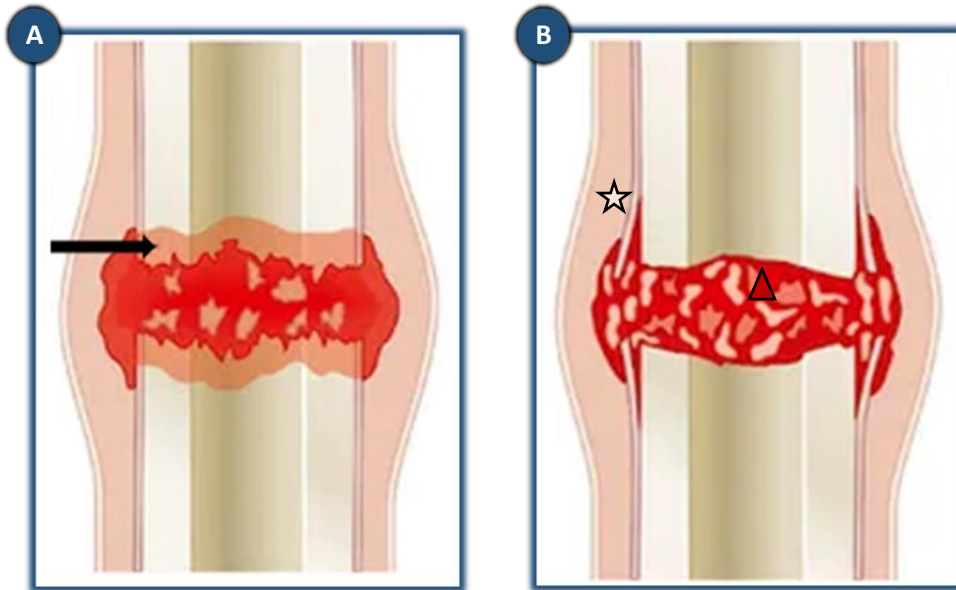


Figure 18 : Représentation schématique de la phase de latence au cours de la DO. **A.** Formation de l'hématome au sein du gap osseux. Au sein de l'hématome se trouve des cellules sanguines, des neutrophiles et des facteurs de croissance tel que VEGF. La flèche noire représente la zone de résorption du tissu nécrosé. **B.** Représentation du tissu de granulation. Ce tissu est rempli de précurseurs ostéoblastiques, de capillaires sanguins et de cellules inflammatoire. L'étoile représente le cal périosté et le triangle, le cal endosté.

(conf. Fig. 18). Enfin, ce tissu est constitué de cellules inflammatoires, d'une matrice collagénique, de capillaires, de fibroblastes et de cellules ostéogéniques [96].

## 4. La phase de distraction active

La phase de distraction active est régie par l'application de force de traction sur le régénérat osseux nouvellement formé. Au cours de cette dernière, un ensemble d'évènements ostéogéniques et vasculaires se produit (conf. Fig. 19). De manière générale, des phénomènes de prolifération de cellules progénitrices ostéoblastiques sont perçus, ainsi qu'une augmentation du flux sanguin via une croissance vasculaire importante [96]. L'ensemble des phénomènes sont contrôlés par une régulation positive de facteurs de croissance nécessaires à la formation osseuse. De plus, le mode de formation osseuse privilégié lors des processus d'allongement semblerait être la formation intramembranaire, c'est-à-dire que les cellules osseuses minéralisent directement le collagène sans qu'une phase cartilagineuse soit apparente [93,96–99].

Les données histologiques ont permis de démontrer que les processus d'ostéogénèse lors de la phase de DO sont organisés spatialement et temporellement. Au centre du régénérat osseux, une première zone peut être discriminée et est généralement appelée « zone inter fibreuse » (FIZ). Cette région est riche en chondrocytes, fibroblastes, en cellules progénitrices ostéoblastiques et également en cellules ayant une morphologie ovale qui sembleraient être

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

l'intermédiaire entre des fibroblastes et des chondrocytes [77,96,97]. D'ailleurs, c'est dans cette région (FIZ) que les contraintes mécaniques sont les plus importantes et c'est cet environnement mécanique qui maintient les cellules dans un état de prolifération. Il a été démontré qu'à de faibles sollicitations mécaniques, la réponse cellulaire se traduit par une progression vers un état plus différencié. Cet effet a été analysé dans les cellules ostéoblastiques, pour lesquelles la sécrétion en alcaline phosphatase augmente lorsqu'elles sont soumises à de faibles contraintes (faible déformation). Sachant que l'alcaline phosphatase est un marqueur de la maturation des cellules ostéoblastiques [96].

Ensuite, de part et d'autre de cette zone, on trouve une région intitulée « front de minéralisation primaire » (FMP). Des ostéoblastes en forte concentration y sont présents et sont dans un état de prolifération.

Cette zone est suivie par la zone de « formation de micro-colonne » (FMC) typique à la DO. Dans cette zone, on constate une croissance vasculaire importante et l'apposition du tissu ostéoïde le long des faisceaux de collagène s'amorce. L'importance de la vascularisation est mise en lumière dans cette région. En effet, les capillaires vasculaires nouvellement formés par les processus de vascularisation (angiogenèse et vasculogenèse) sont les sites à partir desquels l'apposition tissulaire débute [75]. Durant la phase de distraction, une augmentation importante de l'apport sanguin et des taux de circulation sanguine aux sites de formation osseuse est observée dans les régions MCF et PMF. Par la suite, le tissu ostéoïde dans la zone MCF commence à se minéraliser, toujours dans les régions proches du système vasculaire (capillaire) [98]. Le premier type d'os à apparaître est bien évidemment l'os immature (os tissé). De plus,

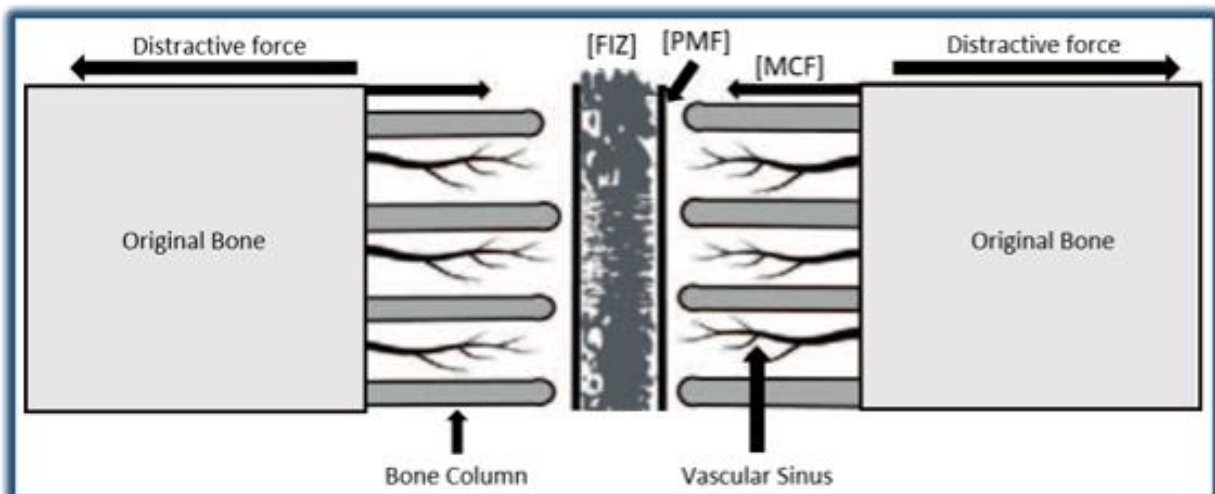


Figure 19 : Schéma du processus de régénération osseuse lors de la DO (Runyan et Gabrick, 2017). Au centre est représentée la zone inter fibreuse (FIZ), suivie de la zone nommée front de minéralisation (FMP) et la zone de formation de microcolonne (FMC) où l'orientation du tissu osseux suit l'axe des forces de distraction active.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

l'intitulé de cette zone provient de l'orientation particulière du tissu osseux nouvellement formé et du réseau vasculaire. En effet, on constate la formation de colonnes osseuses orientées selon l'axe des forces de traction. De plus, l'expression des facteurs de croissance ostéogénique (IL-6, BMP-2, BMP-4, BMP-6, TGF- $\beta$ ) qui pour la plupart étaient déjà présents lors de la phase de latence est en forte augmentation. Cette observation est également juste pour les facteurs angiogéniques suivants : VEGF, angiopoïétine 1 et 2, HIF-1 $\alpha$ . Cette phase est donc caractérisée par la formation de vaisseaux sanguins (angiogenèse et vasculogenèse), le recrutement d'ostéoblastes et donc la formation du tissu osseux [100].

En clinique, le protocole de distraction standard est défini par un taux de 1mm par jour à une fréquence de 4 fois par jour résultant sur des phases d'incrémentations de 0.25mm [93,99]. Concernant la longueur totale d'allongement, cette dernière est corrélée aux complications qui peuvent survenir, au niveau du tissu osseux et des tissus mous environnants. C'est pourquoi les allongements des membres inférieurs sont aux alentours de 6-7cm en moyenne malgré un manque de consensus entre les chercheurs et cliniciens [99]. Cependant, lors de la distraction active, des examens radiologiques ainsi qu'une attention clinique sont maximaux, car le taux et le rythme peuvent influencer le processus de régénération résultant soit sur une non-union du régénérat, soit sur une consolidation précoce de ce dernier et donc l'allongement désiré ne sera pas atteint [97].

À propos du type d'ossification, bien que la formation de type intramembranaire semble être privilégiée, deux autres modes d'ossifications ont été perçus lors de la DO [101–103]. La formation de type endochondrale peut être observée lors de la phase de latence, de distraction et pendant la phase précoce de la consolidation. Au temps tardif, le processus de formation intramembranaire est cependant privilégié [65,77].

L'ossification intramembranaire est un processus caractérisé par une invasion de capillaires, permettant la migration de CSM au site lésé et dont la différenciation se fera en cellules ostéoblastiques matures. Ces derniers sont dans la capacité d'apposer le tissu ostéoïde qui conduira à la formation de spicules osseux qui en se développant formeront des trabécules. Leur nombre et leur taille augmentent au fur et à mesure, laissant apparaître le tissu osseux tissé ou immature. Ce tissu osseux deviendra par la suite un tissu osseux lamellaire bien plus résistant mécaniquement [104].

Quant à l'ossification endochondrale, elle comprend plusieurs étapes : la maturation du cartilage, la dégradation de celui-ci, la vascularisation et l'ostéogenèse. Les CSM vont se

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

différencier en cellules chondrocytaires qui vont sécréter une matrice riche en collagènes de type II et protéoglycanes formant ainsi le tissu cartilagineux. Par la suite, les chondrocytes vont s'hypertrophier et libérer des phosphatases alcalines qui induisent un processus de minéralisation de la matrice. Ce phénomène génère un cartilage dit calcifié et se caractérise par des logettes vides du fait de la dégénérescence des chondrocytes. Les vaisseaux sanguins envahissent ces logettes et les ostéoclastes viennent résorber cette matrice calcifiée pendant que les ostéoblastes nouvellement arrivés commencent à former le tissu osseux.

Cependant, un troisième type de mode d'ossification a été constaté : la formation osseuse transchondroïde. Ce mécanisme permettrait la formation d'un os chondroïde entre le cartilage et le tissu osseux. Via des techniques d'hybridation in situ, Yasui et al [102], ont montré un changement de phénotype des cellules comprises au sein de ce tissu. En effet, les cellules exprimeraient temporairement de l'ARNm pour le collagène de type II et les analyses histologiques ont montré que ces cellules n'avaient pas un aspect de cellules chondrocytaires, mais étaient considérées comme des chondrocytes en voie de différenciation cellulaire vers un phénotype ostéoblastique. Des études précédentes ont mis en évidence un phénomène de transdifférenciation par les chondrocytes hypertrophiés en cellules de type ostéoblastique. Selon Yasui et al, la formation transitoire de cet os chondroïde permettrait d'augmenter la résistance mécanique du cal osseux, favorisant ainsi le processus de régénération osseuse.

## 5. La phase de consolidation

Une fois l'atteinte de l'allongement désirée, la phase de consolidation débute. Les forces de distraction s'arrêtent, mais le fixateur est quant à lui maintenu en place jusqu'à ce que le régénérat ponte complètement et se consolide. La minéralisation du régénérat osseux s'exécute de manière centripète. En effet, le processus commence aux extrémités de l'os cortical natif vers le centre du régénérat [90]. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle la zone FIZ sera la dernière région à être minéralisée. L'implication de l'endoste et surtout celle du périoste sont importantes. Au cours du processus, cette zone centrale se réduira et disparaîtra progressivement laissant apparaître un réseau dense d'os trabéculaire. Au fur et à mesure que l'on avance dans le processus de consolidation, l'ensemble des facteurs de croissance participant à la régénération osseuse diminuera pour laisser place aux facteurs jouant un rôle dans le remodelage osseux notamment TNF- $\alpha$  [99].

Cette phase de consolidation est la plus longue du processus. Il faut considérer environ un mois de consolidation pour chaque centimètre allongé. C'est pourquoi en moyenne cette

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

phase dure de 2 à 24 mois. De plus, cette période est dépendante de l'âge du patient et de la mise en marche de ce dernier [90]. La mise en marche est un facteur primordial permettant de maintenir la masse osseuse de régénérat osseux et de minimiser la perte osseuse des os corticaux existants.

L'une des problématiques à laquelle les chirurgiens orthopédiques sont confrontés est qu'il n'existe pas d'outils diagnostiques pour définir le jour du retrait du fixateur. En général, ce dernier est effectué à l'aide d'un diagnostic radiologique. Pour ce faire, des radiographies selon le plan frontal et sagittal sont analysées, et si l'apparition de trois corticales, dont l'épaisseur de 2mm, est visible alors le fixateur externe est retiré. Cette technique respecte les principes de Fischgrund [28,105–107]. Un second critère, défini par Aldegheri et al, est utilisé par les chirurgiens pour définir une limite du port du fixateur : c'est l'index de guérison, qui correspond à la durée du port du fixateur. Ce dernier est exprimé en nombre de jours divisé par le nombre de centimètres obtenus, sachant que la limite maximale de cet index de guérison est de 45 jours/cm [28,108].

Le moment du retrait reste à l'heure d'aujourd'hui encore une préoccupation pour les chirurgiens. D'ailleurs, certains médecins optent pour le retrait du fixateur, mais conservent l'insertion des tiges dans l'os cortical pendant une semaine supplémentaire. Passé ce délai, si des signes d'instabilité sont présents alors le cadran du fixateur externe sera repositionné.

## 6. La phase de remodelage

Une fois que le régénérat est suffisamment consolidé, le fixateur externe est retiré (conf. Fig. 20). Le patient peut alors reprendre une vie normale et s'adonner à des activités quotidiennes. Cependant, le processus de cicatrisation est toujours en cours et le tissu osseux continuera à se remodeler jusqu'au rétablissement des corticales et de l'espace médullaire [93].



# Chapitre 1 : Étude Bibliographique



Figure 20 : Radiographie représentant les différentes phases du protocole de distraction ostéogénique (Alzahrani, 2014). De gauche à droite. Mise en place du fixateur externe et visualisation de l'ostéotomie au niveau diaphysaire. Ensuite imagerie de la phase de distraction à un temps tôt et en fin de distraction. Enfin, les trois dernières radiographies représentent la phase de consolidation jusqu'à consolidation du régénérat osseux. La dernière radiographie représente une imagerie de contrôle après le retrait du fixateur externe.

## 7. La mécanotransduction

Ilizarov est l'un des premiers à avoir posé les bases sur la capacité des tissus et plus particulièrement des cellules à émettre une réponse à la suite d'un stimulus mécanique. En effet, il a suggéré via le principe de « l'effet des forces de traction » que, lors de la DO, le tissu osseux était capable de sentir et surtout de traduire les efforts mécaniques en signaux moléculaires conduisant à l'ostéogénèse [32]. D'ailleurs, à l'heure d'aujourd'hui, plusieurs études sur la mécanotransduction sont menées à travers des protocoles d'allongement. En effet, le système créé lors de la DO peut s'apparenter à un bioréacteur. Ce dernier correspond à un système dans lequel les conditions sont contrôlées permettant ainsi l'induction ou non de certains comportements des tissus/cellules. Et c'est donc par l'environnement mécanique qui est créé au cours de la DO que ce dernier peut être caractérisé comme un bioréacteur vivant.

### 7.1. Modèle de mécanotransduction dans la régénération osseuse

Dans les années 90, Prendergast et al [109] se sont intéressés aux principes de différenciation tissulaire en émettant l'hypothèse que si l'environnement mécanique était modifié, alors les stimuli biophysiques engendreraient le remplacement d'une population cellulaire par une autre. Ils ont donc proposé un modèle de mécanotransduction à l'aide d'un modèle numérique permettant de prédire la différenciation tissulaire au niveau de l'interface os/implant. Le modèle était basé sur un environnement mécanique biphasique qui intégrait des contraintes de cisaillement en fonction de l'écoulement fluide (conf. Fig. 21). Plus tard, ce modèle a été repris et amélioré afin de pouvoir représenter la différenciation cellulaire au cours

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

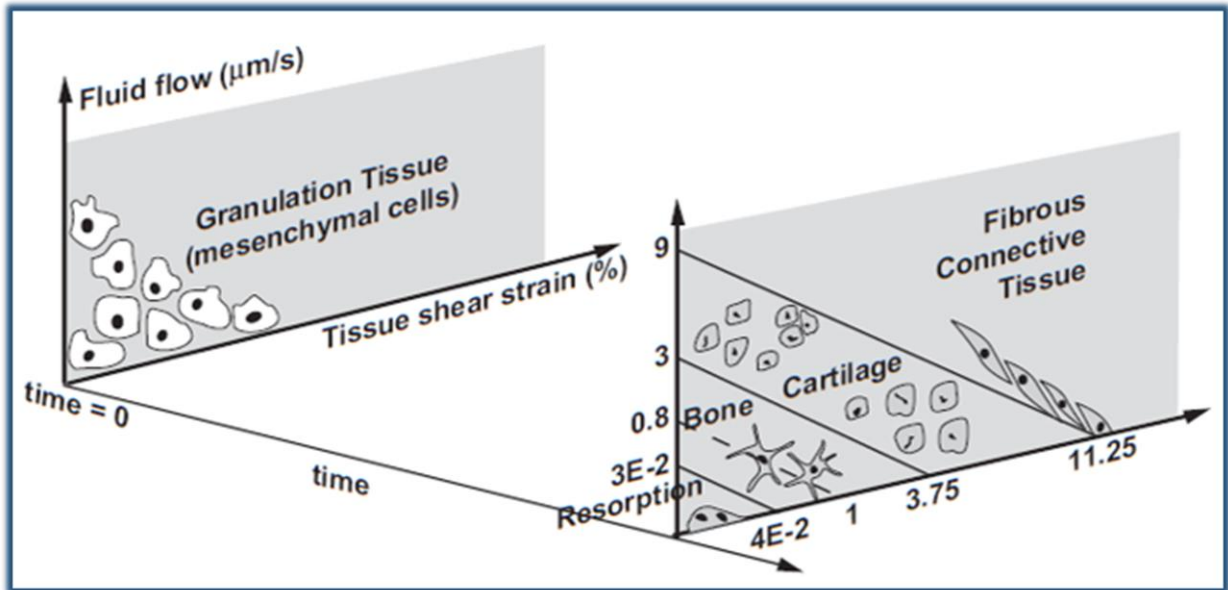


Figure 21 : Modèle de mécanotransduction mis au point par Prendergast et al. Les stimuli physiques sont représentés par une contrainte de cisaillement en x et la vitesse relative entre le fluide et le solide.

d'une fracture [110]. Bien évidemment, des approximations ont été effectuées du fait que les propriétés mécaniques des tissus participant à la régénération n'étaient pas (et d'ailleurs ne le sont toujours pas) complètement déterminées. Ils ont pu en conclure que l'ossification d'une région peut être déterminée par l'apparition de tissus différenciés plus rigides permettant de créer un environnement à faible contrainte. D'ailleurs, lors de l'ossification d'une fracture, c'est le cal périosté qui commence à ponter en premier, permettant de maintenir un environnement à faible contrainte au sein du cal endosté. Concernant la distraction ostéogénique, Isakson et al [111] ont réussi à développer un modèle de mécanotransduction reflétant le processus de régénération osseuse au cours d'un allongement. Pour se faire, ils ont utilisé le modèle biphasique de Prendergast et l'ont adapté au processus de DO où des forces de traction sont appliquées.

## 7.2. Rôle des molécules mécanosensibles dans la signalisation cellulaire

Les intégrines sont des protéines transmembranaires situées au niveau du cytosquelette des cellules et participent à l'adhésion cellulaire. Actuellement, elles sont considérées comme des mécanosenseurs puisque lorsque la MEC est soumise à des contraintes mécaniques, ces dernières changent de conformation résultant sur un relargage de molécules spécifiques à la mise en charge telles que les enzymes ERK [66]. Ces enzymes sont présentes notamment au sein de cellules ostéoblastiques et participent à la division cellulaire, à la croissance et à la prolifération [112]. Il a été d'ailleurs constaté que l'augmentation de ERK ne se produit que

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

lorsque le régénérat osseux est soumis à des forces de traction [66]. De plus, parmi cette famille d'intégrine, c'est la FAK (focal adhesion kinase) qui semble être la régulatrice principale puisque sa présence est exclusive au processus de régénération lors de la DO [113].

## 7.3. Effort mécanique sur la différenciation cellulaire

Les efforts mécaniques lors de la phase d'allongement induiraient des réponses de différenciation cellulaire des CSM vers la lignée ostéoblastique [66]. C'est une des raisons qui explique que l'ossification pendant la phase de distraction est majoritairement intramembranaire alors qu'en début de consolidation une formation cartilagineuse est souvent présente. Cette induction de différenciation serait en partie due à une régulation positive de l'expression de BMP-2 [66] et de TGF- $\beta$ 1 [114]. D'ailleurs, la validation du protocole de distraction, qui opte pour une fréquence d'activation élevée, est en lien avec la mécanotransduction. En effet, lorsque de faibles forces de traction sont appliquées au régénérat, la formation osseuse est favorisée. À l'inverse, lors de fortes forces de traction, la formation de tissu fibreux sera présente [32].

De plus, les effets de mécanotransduction sont également ressentis par les cellules ostéoblastiques matures. Mehrara et al [115] ont mis en évidence que l'application de force de traction dans un modèle de DO chez le rat induit une augmentation de la production d'ARNm codant pour des protéines non collagéniques de la MEC (ostéocalcine) et stimule de la production de collagène de type I par les ostéoblastes.

Les principes de mécanotransduction ne sont pas encore résolus. Beaucoup d'interrogations sont encore en attente concernant les mécanismes de signalisation et les mécanismes par lesquelles les réponses du point de vue intracellulaire et extracellulaire sont induites.

## 8. Complication

Le protocole de DO est un outil puissant, permettant de corriger de multiples cas cliniques incluant des défauts osseux (tumeur, excision [116], trauma [117]), des corrections de différence de longueur de membres (congénitale [105] ou acquise [105]) ainsi que la correction de petite taille dans des pathologies de type achondroplasie [108]. À l'heure actuelle, et malgré une intense utilisation de ce protocole en chirurgie orthopédique, la durée du port du fixateur externe est longue, entraînant nécessairement des complications, et ce à tout temps du protocole voire post-protocole.

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

En effet, d'un point de vue général, l'allongement osseux est capable de compenser des longueurs d'os de manière remarquable. Cependant, si l'on inspecte plus précisément cette procédure, on constate que le temps de traitement est long, douloureux et les complications qui peuvent survenir sont nombreuses. De plus, le taux d'apparition ne fait pas exception de l'éthologie du raccourcissement/défaut du ou des membres, du sexe, de l'âge, du type de fixateur utilisé, de la zone ostéotomisée (métaphyse ou diaphyse) ainsi que du type d'os (malgré un taux plus élevé pour le fémur que pour le tibia) [28,105,108,118]. Chaque intervention est sujette à développer des complications qui peuvent être plus ou moins graves en fonction de la nécessité ou non de replanifier une chirurgie.

Les complications induites par le protocole de DO ont donc permis d'établir différents systèmes de classification permettant de quantifier la gravité de ces dernières, tous validés par la communauté médicale. Paley et al [119] ont mis au point le système de classification suivant : la première catégorie, intitulée « problèmes », correspond à des difficultés qui apparaissent, mais qui peuvent être traitées par voie médicamenteuse ou sous anesthésie locale ; la seconde, dénommée « obstacle », comprend des complications accompagnées nécessairement d'une chirurgie. Enfin, la troisième catégorie, appelée « séquelle », correspond aux cas où les complications sont temporaires, voire permanentes, et peuvent donc persister après ablation du fixateur externe. Parmi ces trois catégories, les complications que l'on retrouve sont les suivantes : infections, raideurs articulaires, subluxations articulaires, kystes, pseudarthroses, consolidations précoces, lésions neurologiques, retard de consolidation, fractures post-ablation du fixateur [119]. Antoci et al [118] ont mis en évidence une corrélation positive entre l'augmentation de la distance d'allongement et l'augmentation du taux de complication. À titre d'exemple, la survenue de complications neurologiques augmente dès 5% d'augmentation de la longueur des os, elles sont de 20% pour 15% de gain de longueur et pour 40% d'augmentation de longueur, les taux de complications atteignent 60%. Cette même logique a été démontrée pour les complications suivantes : les déformations résiduelles axiales, le cassage des fiches, les contractures articulaires et l'hypertension.

Dans notre cas, les points qui nous préoccupent sont ceux où la régénération osseuse n'est pas optimale (non-union, pseudarthrose) et plus particulièrement les cas de fracture post-ablation. Au sein de la littérature, il a été recensé que 3 à 50% des segments allongés contracteraient une fracture à la suite du retrait du fixateur externe [105,120]. Simpson et al [120] ont d'ailleurs mis au point une classification des différents types de fractures pouvant apparaître à la suite du retrait du fixateur externe. Cette classification a été effectuée selon le pattern, le temps de la

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

fracture et le site (conf. Fig. 22). En général, les fractures apparaissent dans les six semaines suivant l'ablation du fixateur, mais des déformations en flexion de l'os peuvent apparaître petit à petit et mener à une fracture des mois après le retrait du fixateur externe.

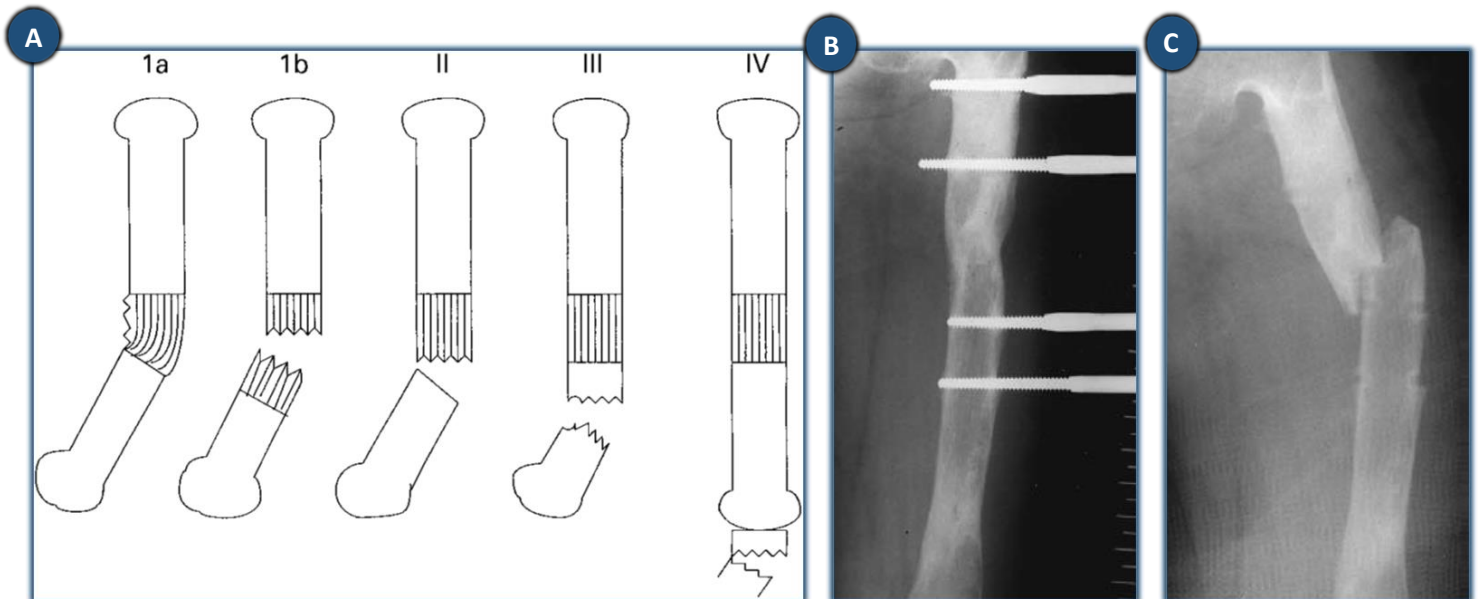


Figure 22 : Classification des types de fracture selon Simpson et al, 2008. **A.** Pattern des fractures observables après retrait du fixateur externe. Fractures 1a et 1b apparaissent au niveau du régénérat osseux. Les fractures de type II sont au niveau de la jonction régénérat-os natif. Les fractures de type III proviennent de l'insertion des vis et la fracture de type IV apparaît à un site éloigné de la distraction. **B-C.** Radiographie d'un patient atteint d'un fémur congénitalement court. **B.** Radiographie montrant une bonne consolidation. **C.** Fracture de type 1b après ablation du fixateur externe.

## IV. Conclusion

Le processus d'allongement osseux est un protocole clinique complexe dépendant de multiples facteurs internes et externes. Malgré un nombre important de paramètres étudiés, plusieurs mécanismes restent encore mal connus, notamment vis-à-vis de la mécanotransduction, des propriétés des matériaux des tissus qui composent le régénérat et les principes sous-jacents à l'ostéogenèse via l'interaction de phénomènes de vascularisation et de formation osseuse.

Le processus de DO a ses avantages lorsque l'on souhaite étudier la régénération osseuse. À titre d'exemple le régénérat fracturaire s'apparente à une mixture hétérogène de tissus ayant des propriétés biologiques et mécaniques différentes. À l'inverse, le régénérat formé pendant la distraction est constitué par un ensemble de tissus organisés temporellement et spatialement au cours du processus d'allongement. Donc ce modèle est propice à l'analyse des propriétés matériaux du cal osseux au niveau microscopique ou nanoscopique. Cependant, très peu d'analyses sur les propriétés matériaux sont effectuées et souvent les informations utilisées dans les modèles de modélisation se basent sur des propriétés de tissus similaires voire

# Chapitre 1 : Étude Bibliographique

sur la composition tissulaire [110]. De plus, les variations régionales entre ces différents tissus ne sont pas encore connues et semblent être une voie de recherche intéressante, notamment dans le domaine de l'ingénierie lors de la fabrication de biomatériaux et dans le domaine de la modélisation.

D'un point de vue plus clinique, l'ensemble des problématiques résultantes des diverses complications induites par le protocole de DO reste un point de recherche important. L'un des problèmes majeurs porte sur la consolidation. À l'heure actuelle, la récurrence de fractures après ablation du fixateur, dès les premières semaines ou au cours des mois suivants, met en évidence des problèmes de diagnostics évidents. De plus, le protocole de distraction étant très long, avoir à traiter une fracture post-traitement peut induire des problèmes psychologiques qui peuvent être déjà apparus au cours du protocole ainsi qu'un coût financier non négligeable.

Donc autour du protocole de DO gravitent encore un grand nombre d'interrogations. Afin d'optimiser le protocole de DO, il est nécessaire d'obtenir des informations sur les différents matériaux ainsi que sur le développement de stratégie thérapeutique. Sous le terme « optimisation », la réflexion se porte sur la diminution du temps nécessaire à la consolidation osseuse via une accélération du processus tout en conservant la qualité osseuse. D'ailleurs, un double enjeu se dessine, car en diminuant la durée du port du fixateur, les autres complications seront indirectement impactées telles que les infections. Enfin, la compréhension de ce processus à travers la compréhension des mécanismes et des matériaux pourra peut-être mener vers une stratégie d'aide au diagnostic concernant la date du retrait du fixateur externe.

## Chapitre 2 : Mise en place du modèle animal

### I. Objectif de l'étude

Le principe de régénération osseuse au cours de la distraction ostéogénique pourrait s'apparenter à un bioréacteur *in vivo*, c'est pourquoi son étude a suscité un fort intérêt dans le monde de l'ingénierie tissulaire osseuse. Dans la littérature, on retrouve une multitude d'expérimentations s'intéressant aux divers processus biologiques [70,121–123] et mécaniques [124–126] induits lors de la DO. L'intention commune des chercheurs est la compréhension du système biologique en cours de régénération par l'examen de l'ostéoblastogenèse et de l'ostéoclastogenèse. L'autre aspect scientifique est de promouvoir des stratégies thérapeutiques via l'application de biomatériaux adaptés (chargés ou non) [127–130], l'ajout d'adjuvants locaux ou systémiques [131–133], l'optimisation de l'environnement mécanique [111,134–136] et la thérapie cellulaire [137–139]. L'objectif majeur de tous ces travaux est d'améliorer et réduire le temps de consolidation nécessaire à la régénération osseuse, qui actuellement reste l'une des problématiques les plus préoccupantes [139].

Découlant de ces axes de recherche, plusieurs modèles animaux ont été développés afin d'analyser le processus de régénération osseuse au cours de la DO. Au sein de la littérature, de multiples sujets expérimentaux allant de la souris au mouton sont utilisés. Cependant, un modèle très exploité est le modèle animal de rat. En effet, les modèles rongeurs sont appropriés pour l'étude des processus de régénération et d'adaptation musculaire. Nombre de ces études utilisent des fixateurs externes déjà commercialisés chez l'Homme, et qui sont normalement dédiés à l'allongement de phalanges (Orthofix<sup>®</sup>, Dentaurn comp<sup>®</sup> et autre). Le problème résultant de cette utilisation est que les fixateurs externes ne sont pas adaptés à l'anatomie du fémur de rat et surtout aux contraintes qui leur sont appliquées. Concernant les autres études qui utilisent un système « fait maison », seuls certains fixateurs ont démontré l'efficacité et peu d'entre elles détaillent leur dispositif ainsi que leurs protocoles afin d'obtenir un os régénéré fonctionnel.

De surcroît, la période de consolidation analysée dans la majorité des études utilisant des modèles de DO comprend des phases de consolidation précoce et non des temps longs. Ces observations découlent d'une analyse bibliographique des modèles expérimentaux d'allongement osseux chez le rat a été effectuée à l'aide de la base de données de la bibliothèque américaine de médecine : PubMed<sup>®</sup>, entre 1992 et 2017. Pour ce faire, différentes combinaisons

# Chapitre 2 : Modèle expérimental

de mots-clés ont été utilisées comme "distraction ostéogénèse", "modèle de rat", "allongement des membres", "consolidation osseuse", "distraction du cal", "fémur" et "cal osseux". En amont du lancement de la recherche, un filtre a été appliqué excluant les protocoles d'allongement chez l'Homme. Au total, 255 articles ont été trouvés. Après avoir exclu de l'analyse les publications concernant l'allongement des membres supérieurs ou la distraction mandibulaire, nous avons retenu un total de 54 articles qui portaient sur l'allongement des membres inférieurs dans un modèle de rat. Parmi cette sélection, seulement 8 études [131,140–146] ont mené leurs expérimentations sur des temps égaux ou supérieurs à 7 semaines de consolidation soit 49 jours de consolidation.

De plus, une des problématiques spécifiques à la DO est que les protocoles sont nombreux et variés : temps de latence différent, taux d'allongement variable, période de consolidation longue ou courte et autres... Chaque paramètre du protocole d'allongement peut entraîner des variations lors de la réparation du système biologique étudié. Ceci entraîne une difficulté de comparaison entre les diverses études menées.

L'objectif de cette première étude était donc de développer un système permettant d'analyser le processus de distraction ostéogénique en allant jusqu'à la consolidation complète permettant une locomotion de l'animal après retrait du fixateur. Et ce, de manière reproductible via la création d'un fixateur externe adapté à la morphologie du fémur de rat permettant ainsi une régénération osseuse optimale de la patte distractée.

## II. Méthodologie de l'expérimentation 1

### 1. Modèle animal

Les expériences animales ont été menées en accord avec les directives européennes 2010/63 [147]. En effet, toutes les procédures décrites lors de ce projet ont été approuvées par le Comité Institutionnel de Soins et d'Utilisation des Animaux de l'Université Aix-Marseille et par le Ministère de la Recherche Française. Elles ont assurément été réalisées au sein d'une animalerie conventionnelle de la faculté de médecine de Marseille.

#### 1.1. Choix de l'espèce animale

L'utilisation de rongeur de type rat est grandement présente dans les études de régénération osseuse et plus particulièrement lors d'essais d'allongement osseux. Ce modèle expérimental est pertinent puisqu'il a été démontré que le pattern histologique de la formation osseuse lors de la DO est similaire entre le chien, le lapin, le rat, la souris et l'Homme [148].



# Chapitre 2 : Modèle expérimental

Les avantages liés à l'utilisation de petits animaux sont multiples que ce soit d'un point de vue pratique ou économique. En effet, ces animaux sont plus faciles à manipuler que les espèces plus grandes [149] et leur génome est bien défini [150]. Ainsi, avec un modèle animal de petite taille, des données précieuses peuvent être récoltées. Par ailleurs, grâce au nombre conséquent d'études utilisant ce modèle, le processus métabolique chez le rat est suffisamment décrit, allant de la description du processus de régénération aux facteurs solubles impliqués lors de ce processus incluant par exemple les facteurs de croissance.

Concernant l'hébergement, celui-ci est plus simple et moins onéreux, ce qui permet d'investir financièrement dans des analyses plus coûteuses comme la cytométrie ou l'immunohistologie. En effet, ces deux méthodologies sont basées sur l'utilisation d'anticorps dont le coût peut être rapidement élevé. À titre d'exemple, un anticorps monoclonal dirigé contre VEGFR2 (récepteur spécifique) coûte 456€ pour 100µl : avec un dosage de 2µl par analyse, la tarification peut vite augmenter !

Lors de nos analyses, nous nous sommes donc dirigés vers une souche consanguine intitulée Sprague Dawley pour deux raisons. La première est relative à l'espèce elle-même puisqu'elle est considérée comme « docile » et étant donné le nombre élevé de manipulation nécessaire du fait du protocole d'allongement, il était préférable de s'orienter vers cette souche. Le deuxième point englobe un aspect scientifique. Cette espèce est largement étudiée dans la littérature, ce qui permettra une meilleure comparaison des résultats.

## 1.2. Influence de l'âge

Au cours des années, il a été démontré que l'âge est un facteur limitant dans le processus de régénération osseuse que ce soit chez l'homme, le rat ou autres espèces. Les rongeurs ont une espérance de vie beaucoup plus courte que la nôtre : 2 voire 2.5 ans maximum. Il est donc important de définir leur échelle temps pour mieux comprendre le vieillissement de cette espèce. La puberté chez le rat se déroule entre le premier et deuxième mois d'existence. Dès le troisième mois, les animaux sont considérés comme étant de jeunes adultes [151]. Ensuite, à partir de 4 à 9 mois les rats sont catégorisés comme des adultes [148].

Bak et al [151] ont utilisé un modèle de réparation fracturaire pour mettre en évidence l'altération des propriétés mécaniques et le retard considérable du processus de réparation après 80 jours de consolidation chez les rats âgés (2 ans) comparés aux jeunes adultes (3 mois). Les auteurs en concluent que cette variation proviendrait des cellules ostéoprogénitrices dont la

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

capacité de différenciation serait moins efficace avec le temps en raison d'une diminution du nombre absolu de cellules progénitrices disponibles.

Cette constatation a été par la suite analysée et confirmée dans le processus de DO. En effet, le processus de régénération osseuse lors de la distraction est d'autant plus demandant en nombre absolu et en concentration de cellules prolifératives que d'autres modèles. Cette demande vient du fait de la création considérable de la masse osseuse produite pour combler le gap osseux. Aronson et al [148] ont pu constater chez le rat que la formation du cal distracté est affecté par l'âge de l'animal. Bien qu'il n'y ait aucune différence dans la formation du cal périosté entre les groupes jeunes et âgés, les auteurs ont remarqué des différences dans la formation du cal endosté. Par la suite, ils ont réitéré leur démarche sur des souris en cours de distraction et ont pu déterminer un déclin du taux de minéralisation et de formation osseuse pendant ce protocole [152].

Donc, dans notre étude, nous nous sommes orientés vers des rats dont l'âge correspondait à de jeunes adultes. L'intérêt était de minimiser les variations induites par le facteur âge (ni trop jeune, ni trop âgé). C'est pourquoi au jour de l'opération les animaux avaient 12 semaines, soit 3 mois d'existence.

### 1.3. Influence du genre

Une pathologie très connue, l'ostéoporose, est fortement présente chez les femmes post-ménopausées. Il a été constaté que lors de la ménopause, la diminution d'œstrogène (rentrant dans la famille des stéroïdes) entraîne une diminution de la masse osseuse en augmentant la résorption osseuse [153]. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action, des modèles ont dû être établis. L'utilisation de rats comme modèles d'étude a été développée et validée par la communauté scientifique [153,154]. Parmi ces études, on retrouve également des modèles de régénération osseuse chez le rat ostéoprotique [155].

Les expérimentations ont pu définir que l'œstrogène agit autant sur les ostéoblastes que sur les ostéoclastes. Concernant les ostéoblastes, cette dernière va induire des effets positifs sur la formation osseuse via l'activation et l'induction de protéines de la MEC [156] ainsi que sur la sécrétion d'IGF-1 [157] et de TGF- $\beta$ 3 [158]. Pour la régulation de l'activité des ostéoclastes, l'action de l'œstrogène s'effectue soit de manière directe via la stimulation d'OPG soit indirecte via l'inhibition de la production d'IL-6 jouant un rôle sur le recrutement des ostéoclastes. Cette hormone induit donc des effets anti-résorptifs du tissu osseux [156]. En prenant en compte toutes ces informations, l'utilisation du genre masculin dans nos études nous a semblé la plus

# Chapitre 2 : Modèle expérimental

adaptée. L'intention était d'éviter la production de phénomènes non contrôlés par des variations du taux d'hormones dans le corps de l'animal, pouvant ainsi induire des altérations intra et/ou inter-groupes et donc venir biaiser nos résultats.

Pour résumer, au cours de ces travaux de thèse nous avons utilisé des rats mâles de race Sprague-Dawley (éleveur Janvier, France), âgés de 12 semaines au jour de l'opération et pesant environ 500g avec une variation de plus ou moins 20g.

## 2. Création du dispositif médical

Pour rappel, un fixateur externe est le dispositif permettant de maintenir les segments osseux dans leurs positions anatomiques tout en conservant l'alignement parallèle de ces derniers. Le dispositif est généralement composé d'un cadran externe, ainsi que de tiges et de broches, fixées à l'os [126].

L'utilisation de fixateurs externes en chirurgie orthopédique apporte de multiples avantages comparés à d'autres systèmes de fixation. Behrens et al [159] ont établi une liste des attributs positifs et négatifs liés à ces dispositifs. Côté positif, leurs utilisations permettent une stabilisation du système osseux tout en minimisant l'interférence avec les articulations adjacentes, un accès facile au site lésé lors de l'opération et l'accessibilité du cadre pour autoriser des manipulations dans des cas de déformation ou d'allongement osseux. Néanmoins, des complications liées à leurs utilisations sont souvent présentes notamment au cours de protocoles longs tels que la DO et l'émergence de ces dernières peuvent avoir des effets délétères sur le processus de guérison. Le premier niveau de ces effets négatifs concerne les tissus mous environnants (muscles, vaisseaux, nerfs) qui peuvent être endommagés soit lors de la mise en place du dispositif (d'où l'importance d'avoir une connaissance exhaustive du système anatomique dans lequel le dispositif sera implanté), soit lors d'application de protocoles cliniques tels que la DO. Le second niveau concerne l'apparition d'infection locale (tractus des broches) ou plus profonde via la survenue d'ostéite (inflammation osseuse entraînant une nécrose du tissu osseux). Le troisième et dernier niveau comprend le descellement possible des broches au système osseux.

Dans le milieu médical orthopédique, une variété de fixateurs externes existe, dans laquelle on retrouve les fixateurs uniplanaires (unilatéral ou bilatéral) et les fixateurs biplanaires (circulaire ou hybride), chaque type possédant des caractéristiques mécaniques propres. Cependant, une lignée commune entre ces différents dispositifs est établie et respectée. Lors de

# Chapitre 2 : Modèle expérimental

leurs conceptions, les systèmes doivent permettre une faible quantité de mouvement selon l'axe longitudinal (direction axiale) et empêcher l'apparition de mouvements de flexion, de torsion et de cisaillement. En effet Chao et al [160] ont établi que la plupart des fixateurs externes ont une rigidité axiale faible et que lors de la mise en marche, les dispositifs autorisent un mouvement cyclique axial de 0.5 à 1mm. Le fait d'autoriser ce type de micromouvement provient d'études empiriques qui ont montré l'effet bénéfique de ces derniers sur le processus de formation osseuse. De plus, Ilizarov [161] a rapporté que, si la charge axiale normale d'un os était manquante alors que le flux vasculaire reste constant, un phénomène de résorption osseuse prévaudrait sur les processus de régénération physiologiques.

Le processus de DO utilise justement des fixateurs externes afin de promouvoir la régénération osseuse au sein du gap que ce soit lors d'études précliniques ou en clinique. Généralement, lors des protocoles d'allongement, deux types de fixateurs sont utilisés [105,108]. Le fixateur dit circulaire (comme celui d'Ilizarov) est composé de deux cadres cylindriques (voire plus) reliés entre eux à l'aide de tiges de connexion et fixés à l'os par des vis de type Kirschner. Le second est de type unilatéral, composé d'un ou de deux cadres rectangulaires, positionnés sur le côté du membre et reliés à l'os par des broches de type Kirschner également. Les facteurs mécaniques, tels que la stabilité ou l'alignement axial, liés à l'utilisation de fixateurs, impactent la qualité et la quantité d'os régénérés [32].

Dans notre étude, lors de la rédaction des spécificités techniques, recueillies dans le cahier des charges, plusieurs paramètres ont dû être considérés afin d'optimiser au maximum les performances futures de notre dispositif. Celles-ci prenaient en compte la stabilité du système, la rigidité du dispositif, la mise en marche de l'animal (géométrie, poids, articulation libre), l'accessibilité de manipulation sans sédation de l'animal et bien évidemment la biocompatibilité et la stérilisation du dispositif.

## 2.1. Développement du fixateur externe

Il est important de préciser que la mise en place d'une étude préclinique nous a permis de modifier la structure de certaines pièces du fixateur externe, optimisant ainsi le processus de régénération. En effet, une première version du dispositif engendrait soit un blocage du système soit une récurrence de cassure des tiges du fait d'un diamètre trop faible (0.6mm) et d'une longueur de filetage trop importante (10.2mm). Une analyse par éléments finis (modèle numérique) nous a permis de confirmer les analyses radiologiques témoignant de ces problèmes de cassure. Les changements engendrés sur les broches ont permis d'augmenter la résistance et

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

d'améliorer la répartition des contraintes. Au vu des études reportées dans la littérature, la rigidité ainsi que le type de fixateur semblent être deux variables influençant le résultat clinique lors du processus de régénération osseuse [160]. De plus, la rigidité et la stabilité sont également induites par l'orientation parallèle des tiges. C'est pourquoi deux dispositifs, le fixateur externe et l'ancillaire, ont dû être développés de manière à optimiser ces deux paramètres (conf. Fig. 23).

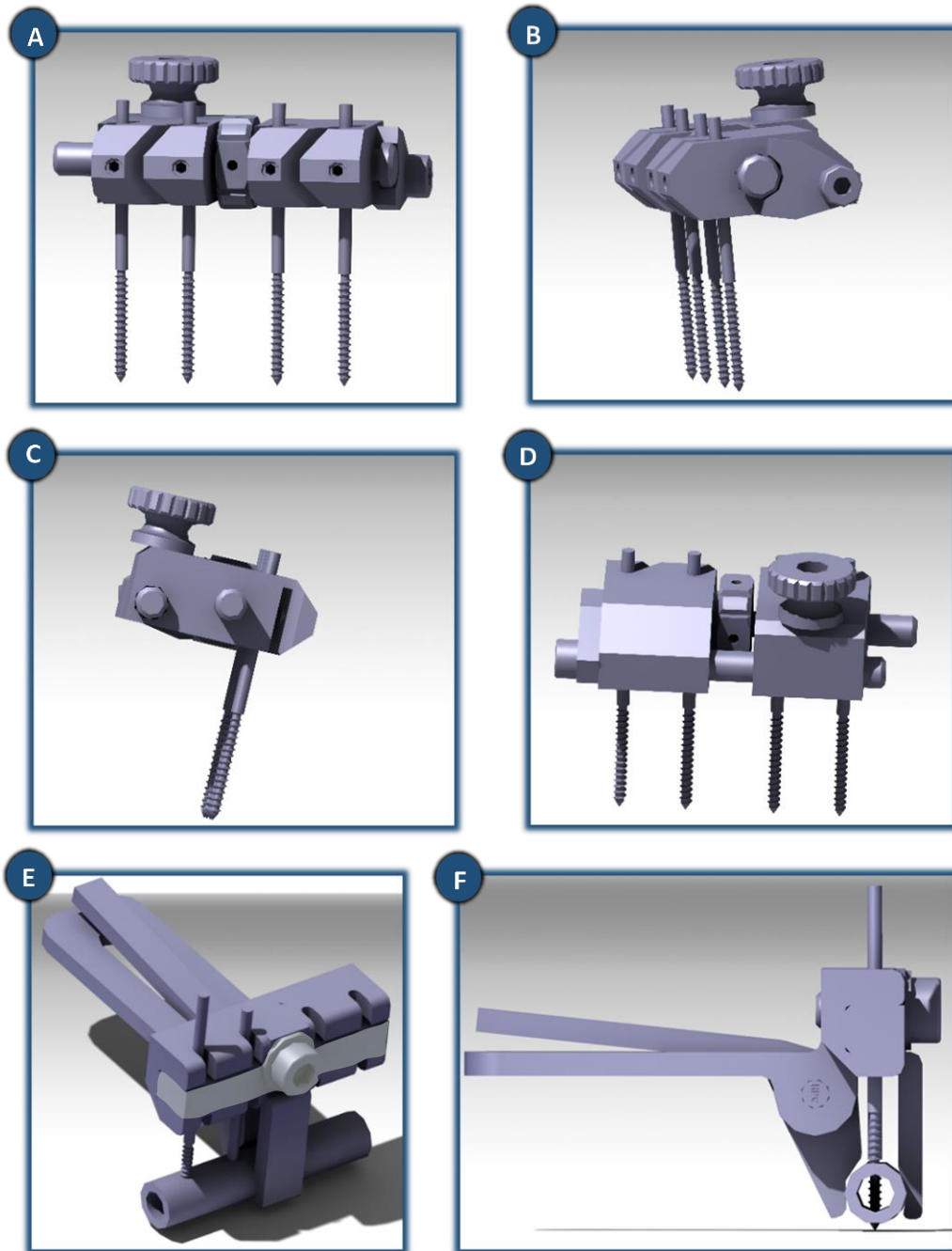


Figure 23 : Représentation DAO (Dessin Assisté par Ordinateur, CAO en anglais) du fixateur externe développé. A-D. Dispositif développé pour l'allongement du fémur de rat. Représentation selon le plan frontal et le plan sagittal. E-F. Ancillaire permettant l'insertion parallèle des broches. La partie surlignée en gris clair est amovible, permettant ainsi l'insertion des broches de manière parallèle sans la nécessité de retirer le guide de coupe.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

Dans un premier temps, le choix du type de fixateur a été sélectionné. Les obstacles pour le développement du fixateur étaient une très faible masse tout en supportant les contraintes mécaniques imposées par le poids de l'animal et la géométrie anatomique. Du fait de considérations anatomiques du fémur du rat (volume musculaire important) [162], nous nous sommes orientés vers un fixateur externe de type unilatéral (conf. Fig.24). D'ailleurs, la majorité des études d'allongement osseux du fémur de rat s'orientent vers ce type de fixateur. À l'inverse, dans des cas d'allongement du tibia, les fixateurs circulaires sont plus souvent sollicités [141].

Un fixateur externe de type unilatéral est intéressant puisqu'il nous a permis de garder le membre fonctionnel et donc de permettre les mouvements articulaires de la jambe (hanche et genou) du rat. La taille du système représentait un volume total de  $7723\text{mm}^3$  avec des dimensions de  $32\text{mm} \times 19\text{mm} \times 12.7\text{mm}$ . Ces mesures permettaient d'obtenir une longueur du système inférieure à la longueur du fémur et une largeur inférieure à celle de la cuisse. De plus, le fixateur que nous avons développé ne perturbait pas le patron de marche de l'animal étant donné sa géométrie et son faible poids de 13g (sans les broches).

Le dispositif mis en place consistait en l'assemblage de 9 pièces distinctes ayant toutes un rôle fonctionnel (conf. Fig. 25). On définit deux blocs A et B en aluminium, du fait de la faible densité de ce matériau ( $2.7\text{g/cm}^3$ ). Pendant la phase de distraction active, le bloc A se déplaçait par rapport au bloc B. Chaque bloc était constitué de deux rainures permettant ainsi le maintien de 4 broches de fixation. Ces deux blocs ont été reliés entre eux grâce à deux barres coulissantes en acier dont l'une constituait l'axe de manœuvre. L'utilisation de plusieurs barres nous a permis d'augmenter la rigidité et la stabilité du système [163], mais également la

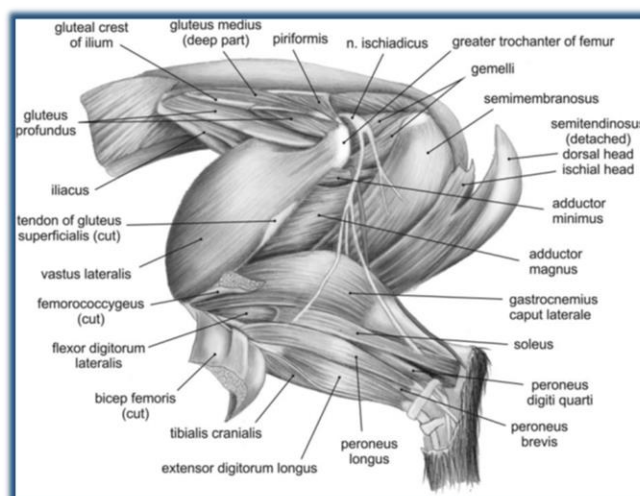


Figure 24 : Vue latérale dans le plan sagittal du membre inférieur gauche du rat. Illustration provenant de Garcia-Esponda, 2016.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

possibilité d'allonger le membre sans perdre l'axe de l'os. Concernant l'axe de manœuvre, il était composé d'une partie filetée insérée dans le bloc A, permettant ainsi le déplacement du bloc, ainsi que d'une partie non filetée dans le bloc B. L'allongement se faisait à l'aide du bloc central de l'axe de manœuvre, nous autorisant ainsi un contrôle de la longueur d'allongement. La rotation d'un demi-tour dans le sens antihoraire autorisait un déplacement du bloc A de 0.25mm par rapport au bloc B. En amont de la rotation, la vis de blocage en acier située sur la face supérieure du bloc A était dévissée. D'ailleurs, cette vis ainsi que la cale de translation en aluminium et la vis de la cale en acier permettaient d'accroître la stabilité du système. L'ensemble des blocs et des barres de stabilité ont été placés dans le même plan que les forces appliquées au système pour justement augmenter la stabilité de ce dernier [126]. De plus, la facilité de rotation du système nous a permis d'effectuer le protocole de distraction sans sédation de l'animal.

Le dernier composant du fixateur externe comprend les broches en titane. Les essais pré-tests nous ont permis de modifier le diamètre ainsi que la taille du filetage des tiges. La rigidité en flexion est dépendante du diamètre des broches et en augmentant celui-ci, nous avons pu accroître la rigidité du système. Nous sommes donc passés d'un diamètre de 0.6mm à un diamètre de 1.2mm au niveau de la partie non filetée et d'un diamètre de 0.8mm à 1 mm sur la partie filetée. Ce changement nous a permis de diminuer fortement le nombre de tiges cassées à toutes les étapes du processus de distraction (latence, distraction active, consolidation).

De surcroît, les tiges implantées en proximal (bloc A) avaient une longueur de filetage de 6mm, alors que les broches insérées en distale (bloc B) bénéficiaient d'une longueur de filetage de 8mm. Cette différence de longueur se base sur la morphologie du fémur de rat. En effet, celui-ci est plus évasé côté genou, et de ce fait une zone de filetage trop courte ne nous permettait pas d'insérer les broches de manière bicorticale. Enfin, la sécurisation des tiges au fixateur externe a été effectuée à l'aide de vis de blocage.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

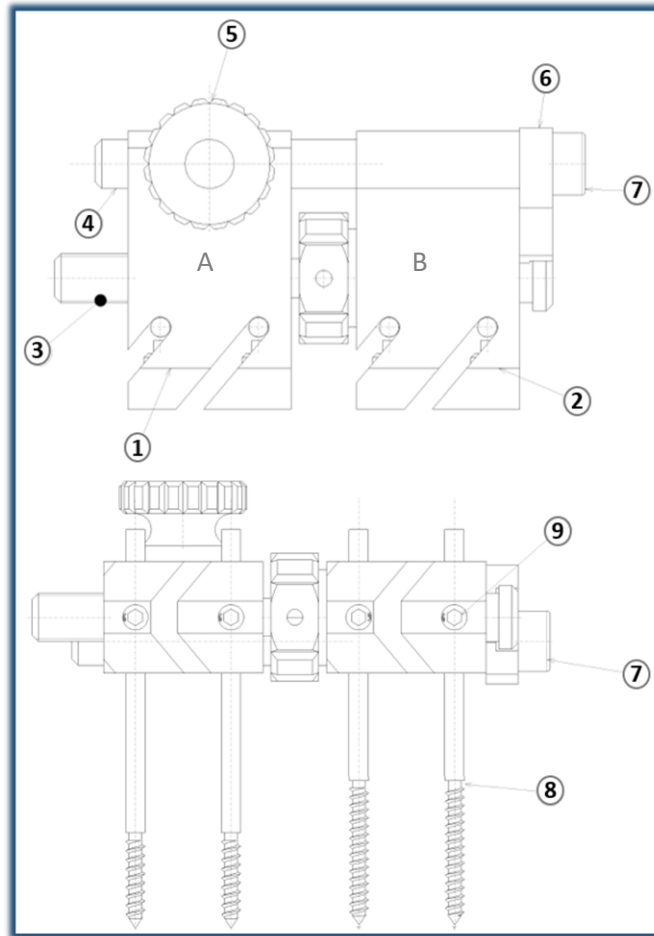


Figure 25 : Schéma du distracteur. 1) Bloc mobile. 2) Bloc fixe. 3) Axe de manœuvre. 4) Barre de stabilisation. 5) Vis de blocage. 6) Cal de translation. 7) Vis. 8) Broches. 9) Vis de blocage des tiges.

### 2.2. Développement de l'ancillaire

L'ancillaire est un dispositif qui peut s'apparenter à un système de guide, permettant d'optimiser l'ancrage des vis à l'os et par la même occasion au fixateur externe. Ce dispositif permet de perfectionner la technique de mise en place des broches en la rendant reproductible lors des différentes chirurgies. En effet, que ce soit le positionnement du fixateur selon les axes de l'os ou le positionnement des tiges dans le tissu osseux, les conditions mécaniques vues par l'os peuvent être fortement impactées et par conséquent induire des réponses physiologiques différentes de la part du système étudié [126]. C'est pourquoi on retrouve dans la littérature un grand intérêt entre l'utilisation des fixateurs externes et l'environnement mécanique produit. Klein et al [164] ont étudié l'effet du positionnement du fixateur externe chez le mouton dans un cas de régénération fracturaire. Pour ce faire, ils ont analysé les réponses biologiques via l'histomorphométrie et les réponses mécaniques grâce à une plateforme de force et des essais de torsion du site lésé, en implantant les fixateurs externes selon deux axes différents : médial ou antéro-médial. Leurs résultats sont sans appel, le positionnement du fixateur induit des



## Chapitre 2 : Modèle expérimental

variations mécaniques et biologiques. En effet, le groupe dont la position suivait l'axe antéro-médiale a subi des mouvements interfragmentaires plus importants au niveau du site lésé que le groupe médial. Par conséquent, les taux de formation et de maturation tissulaire ont été impactés et la présence d'un cal plus développé et rigide était percevable dans le groupe antéro-médiale. De plus, le fait que les résultats obtenus par la plateforme de force n'aient présenté aucune différence entre les deux groupes nous conforte dans l'idée que les changements mécaniques sont induits par la position du fixateur et non par la mise en marche de l'animal.

Concernant l'ancrage des tiges par rapport au tissu osseux, un ensemble d'études a démontré que la stabilité du système proviendrait du placement des tiges, de leur nombre et de l'espacement des broches [126,163]. C'est pourquoi lors de la création de l'ancillaire, nous avons fait en sorte de maximiser l'espacement des broches les unes par rapport aux autres avec un espacement de 6mm (conf. Fig. 26). De plus, 4 tiges sont insérées lors de la mise en place du dispositif dont deux de chaque côté du gap, permettant ainsi un maintien stable des segments osseux.

Enfin, la stratégie mise en place pour obtenir un alignement parallèle des segments osseux a été réfléchi et optimisée. L'ancillaire comprenait deux systèmes. La première pièce était fixe et était divisée en deux sous-parties. L'arrière permettait une fixation temporaire du guide à l'os via un système de pince. Et à l'avant, on retrouvait au niveau de la face supérieure 4 trous de 1.3mm de diamètre autorisant l'insertion des tiges à l'os. La seconde pièce se situait quant à elle à l'intérieur de la partie avant de la pièce 1 et était amovible. Au niveau de la face supérieure, on y retrouvait 4 trous, respectant un espacement de 6mm et dont le diamètre était de 0.9mm. L'utilité de cette pièce nous permettait d'effectuer une perforation de l'os tout en étant perpendiculaire à celui-ci. Cette deuxième pièce nous assurait donc une coïncidence entre le placement des broches et la géométrie du fixateur externe. Une fois les trous effectués, il nous suffisait de retirer cette pièce en desserrant complètement la vis de fixation, et de suivre les trous de la pièce 1 pour l'insertion des tiges.

La mise en place de l'ancillaire nous a donc permis de contrôler le positionnement du fixateur externe par rapport à l'os et d'obtenir un protocole reproductible entre les animaux, minimisant ainsi les effets induits par le dispositif. De plus, l'ancillaire nous a permis d'optimiser le parallélisme des tiges permettant ainsi une bonne stabilité et rigidité du système. Ces deux derniers paramètres sont déterminants pour la mise en charge lors de la marche de l'animal. En effet, si le système ne permet pas une ambulation, il est possible que des variations

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

dans le processus de régénération au cours de la DO soient induites. D'ailleurs, plusieurs études ont montré l'importance de la mise en marche sur la formation osseuse lors de la DO [3,135,165]. Ces études tendent toutes à dire que la mise en marche favorise l'ostéogenèse et la vascularisation du cal distracté.

L'ensemble des matériaux utilisés nous ont permis d'effectuer une stérilisation des deux dispositifs avant chaque opération tout en respectant le critère de biocompatibilité. La biocompatibilité se réfère à l'utilisation de matériau qui ne génère pas de réactions néfastes avec le milieu biologique dans lequel ils sont implantés.

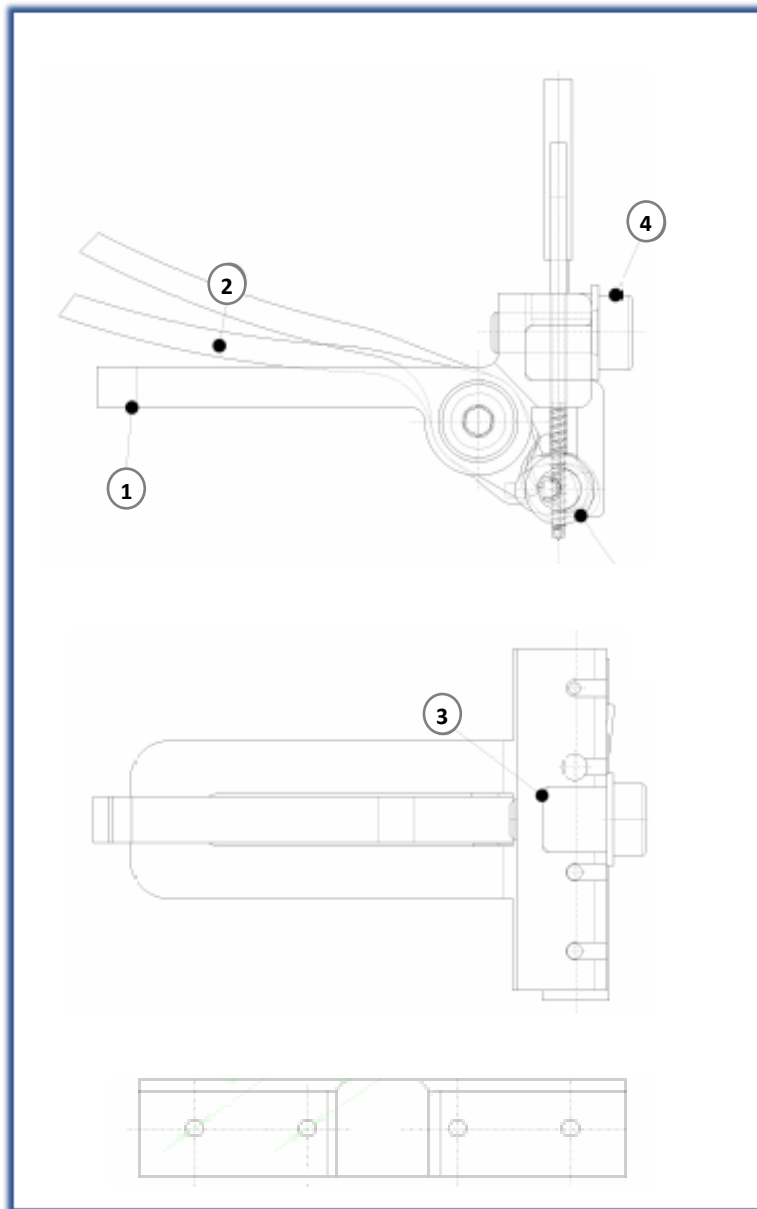


Figure 26 : Schéma de l'ancillaire. 1) Pièce 1 fixe. 2) Pince. 3) Vis de maintien de la pièce 2. 4) Pièce 2 amovible.

# Chapitre 2 : Modèle expérimental

## 3. Protocole expérimental

En tout, quatre animaux ont été monitorés tout au long du processus pour s'assurer de leur bien-être et de l'absence de souffrance. Pour cela, une grille d'évaluation de la souffrance a été mise en place. Si le score final était faible, l'ajout d'analgésie était administré, en revanche si le score était élevé, la mise à mort était réalisée. L'animalerie était maintenue à 22°C avec un cycle circadien de lumière / obscurité durant 12 heures chacune. De plus, un système de lumière rouge était à disposition afin de ne pas perturber l'animal si des manipulations devaient être exécutées pendant la période d'activité de l'animal soit dans l'obscurité. Les rongeurs ont été nourris *ad libitum* par un régime standard de laboratoire. Ils ont été hébergés individuellement dans des cages de 43cm\*27cm\*18cm (Tecniplast®) pour éviter un arrachement accidentel du fixateur externe. Enfin, une période d'acclimatation de deux semaines a été réalisée avant chaque chirurgie programmée afin que l'animal puisse s'habituer à son nouvel environnement.

### 3.1. Traitement per-opératoire

Tout d'abord, il est important de stipuler que l'environnement opératoire et le matériel utilisés ont été préalablement aseptisés. Par conséquent, les instruments chirurgicaux (un scalpel, une rugine, deux écarteurs, un porte-aiguille Mayo-Hégar, un micro-porte-aiguille Olsen-Hégar et des ciseaux Mayo), l'ensemble des pièces du fixateur externe, l'ancillaire, les broches, les forets (Beutelrock®), la pointe du système d'implantologie Chiropro 980 (Bien Air®) ainsi que le cordon et l'insert de la microscie (Piézotome®) ont pu être stérilisés via l'utilisation d'un autoclave avec un cycle de type B. Cette stérilisation a suivi les recommandations de la directive NF EN 554. Les outils nécessaires ont par la suite été mis à disposition sur des champs stériles afin d'optimiser au mieux le déroulement des opérations.

Les animaux (n= 4) ont été pesés en amont de la chirurgie afin de préparer les solutions analgésiantes et anesthésiantes. La solution analgésique comprenait une injection en sous-cutanée de buprénorphine (Buprécare®, 0.3mg/ml) à un dosage de 0.03mg/kg, qui a été réalisée 20 minutes avant l'opération pour prévenir de toute souffrance pendant l'opération et au réveil de l'animal. Concernant la solution anesthésiante, celle-ci était composée d'un mélange de médétomidine (Medetor®, 1mg/ml) à 0.15mg/kg et de kétamine (Ketamine Renaudin®, 50mg/ml) à un dosage de 75mg/kg. Ce mélange anesthésique nous a permis d'effectuer une sédation efficace en induisant une narcose de l'animal tout en ayant une action sur le système nerveux sympathique, responsable notamment de la nociception, en stimulant les récepteurs adrénergiques  $\alpha_2$ . À la suite de l'administration anesthésique en intrapéritonéale, la jambe

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

droite du rat a été rasée et désinfectée en utilisant deux substances de lavage chirurgical : de l'alcool isopropylique à 70% et de la povidone iodée (Bétadine® dermique 10%, flacon jaune). Cette étape a été répétée trois fois et de manière unidirectionnelle.

Enfin, l'animal a été positionné latéralement sur le champ stérile pour permettre le positionnement du fixateur externe suivant l'axe médian. L'ajout d'un protecteur oculaire (Ocry-gel®) sous forme de gel nous a permis d'éviter un assèchement des globes oculaires le temps de l'opération.

### 3.2. Protocole chirurgical

Une incision cutanée à l'aide d'un scalpel monté d'une lame 23 (Swann-Morton®) suivant l'axe longitudinal du plan sagittal a été effectuée, en partant de la partie distale du fémur (genou) jusqu'à la partie proximale (hanche). Afin d'exposer entièrement le fémur, il nous a fallu sectionner des tissus musculaires comprenant le *biceps femoris* et le *vastus lateralis*. Pour faciliter cette découpe et minimiser les dommages musculaires, il nous a fallu suivre l'aponévrose présente entre ces deux muscles [162] (conf. Fig. 27-A).

Une fois la mise en évidence de l'os fémoral, nous avons utilisé la rugine pour venir détacher les tissus musculaires de l'os fémoral. Sachant que le périoste (fine membrane composée de trois couches riches en cellules ostéoprogénitrices entourant les os longs) participe à la régénération osseuse, il nous a fallu être vigilants pour éviter un endommagement supplémentaire de celle-ci lors du détachement des tissus mous environnants.

Avant la pause de l'ancillaire, une vérification de l'espace créé au niveau de l'os fémoral a dû être pratiquée. Pour cela, nous avons inséré les broches proximales et distales dans le fixateur externe et nous l'avons positionné de manière à nous assurer que l'étendue créée était suffisante.

Par la suite, la mise en place de l'ancillaire a été effectuée de façon que son centre coïncide avec celui de l'os fémoral (conf. Fig. 27-B). En suivant le guide de coupe, nous avons pu réaliser les quatre trous de diamètre 0.9mm à l'aide d'un système d'implantologie. Assurément, une irrigation constante était utilisée afin d'éviter des dommages thermiques pouvant entraîner une nécrose du tissu et donc un descellement futur des broches. La partie amovible de l'ancillaire a été retirée, nous permettant ainsi d'introduire les tiges de diamètre 1.2mm dans le tissu osseux de manière bicorticale, et ce en respectant l'alignement parallèle de celles-ci.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

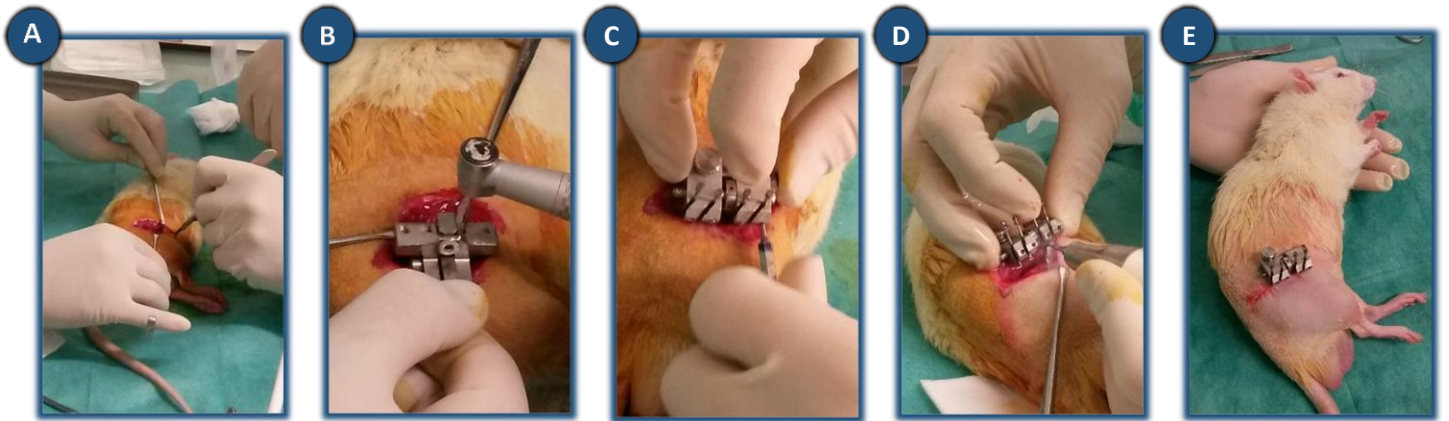


Figure 27 : Chirurgie de callotaxis au niveau du fémur droit. A. L'os est mis en évidence à la suite de la section des tissus musculaires. B. Insertion des broches à l'aide de l'ancillaire fait maison. C. Le fixateur externe est sécurisé aux broches via des vis de sécurité. D. Ostéotomie de l'os fémoral droit. E. Représentation de l'animal en fin d'opération.

Le fixateur externe a pu être sécurisé aux broches à l'aide des vis de serrage (conf. Fig. 27-C). Une distance de 6mm entre l'os fémoral et la partie inférieure du fixateur était assignée. Ce choix nous a permis d'obtenir conjointement une bonne rigidité du système [163] et une bonne accessibilité à l'épiderme lors des sutures.

L'ostéotomie a pu être pratiquée entre les broches centrales du fixateur externe, toujours sous irrigation constante (conf. Fig. 27-D). Le choix d'une ostéotomie a été privilégié afin de produire une géométrie uniforme de la fente de distraction et empêcher la survenue de fractures obliques présentes lors de corticotomie [166]. Pour finir, une suture intradermique réalisée avec du fil de suture résorbable (Ethicon Vicryl<sup>®</sup>, 4/0) a permis la fermeture de la plaie (conf. Fig. 27-E). Une radiographie de contrôle via le système Softys Imaging<sup>®</sup>, nous a permis de vérifier le bon alignement et l'enfoncement des broches en bicorticales.

### 3.3. Protocole de distraction ostéogénique

Comme précisé dans l'introduction générale, la technique chirurgicale de la DO comporte trois phases temporelles. La phase de latence, la phase de distraction active ainsi que la phase de consolidation. L'ensemble de ces phases sont contrôlées par une variété de paramètres non exhaustive pouvant induire des réponses physiologiques différentes. En outre, les expérimentations animales ont permis de mettre en évidence l'importance des paramètres suivants : le nombre de jours consacrés à la phase de latence, le taux et le rythme de la distraction, l'application d'une distraction continue ou graduelle, l'importance de préserver les tissus mous environnants, le temps de consolidation... C'est pourquoi lors de la mise en place de notre modèle de distraction (conf. Fig. 28), il nous a fallu être vigilants vis-à-vis de ces différents paramètres.

# Chapitre 2 : Modèle expérimental

## a. La phase de latence

Cette phase est comprise entre la chirurgie de callotasis et la phase de distraction où l'on débutera l'application des forces de traction. Longtemps critiquée, la période de latence suscitait de fortes interrogations quant à son utilité. Dorénavant, ses bénéfices sont connus puisqu'elle permet l'organisation de l'hématome, la vascularisation de la matrice fibreuse nouvellement formée au sein du gap et permet le recrutement de CSM [65,167]. Dès les années 90, White et al [168] se sont intéressés à l'influence de la phase de latence sur la structure du cal osseux distracté. Pour ce faire, ils ont utilisé un modèle de DO sur le tibia de lapin adulte. Un groupe présentait une phase de distraction retardée alors que le second groupe ne disposait d'aucun délai, la distraction étant directement appliquée post opération. Les paramètres histologiques ont montré que la formation du cal osseux était plus importante pour le groupe retardé que pour le groupe immédiat avec l'apparition d'un cal plus volumineux, plus de chondrocytes en prolifération, une intense ostéogénèse et une forte vascularisation du cal. De manière intéressante et du fait de l'utilisation d'une jauge de contrainte, les forces de traction subies par le cal osseux ont été analysées. Les résultats montrent que la force de traction quotidienne était de 25N pour le groupe immédiat, alors que pour le groupe retardé il fallait appliquer une force de 100N pour un allongement de 0.5mm. Il en a été conclu que cette différence provenait justement de la nature et de la structure différentes des tissus présents au sein du gap. On pourrait également considérer que les processus de mécanotransduction ont été plus stimulés pour le groupe retardé favorisant ainsi les différences obtenues entre ces groupes.

On peut en conclure que cette phase est importante pour optimiser le processus de régénération osseuse. D'ailleurs, en orthopédie vétérinaire il est actuellement recommandé de respecter une période de 2 à 3 jours pour les animaux immatures et de 5 à 7 jours chez les animaux matures [167]. C'est pourquoi lors de notre étude, nous avons décidé de respecter une période de latence de 7 jours.

## b. La phase de distraction active

La phase de distraction active est régie par 2 variables : le taux et la fréquence d'activation. L'ensemble de ces paramètres a une influence directe sur le processus de régénération via l'influence des effets de la force de traction, mais également sur l'ensemble des tissus mous environnants [169].

Le taux de distraction correspond à l'allongement total effectué par jour. Aujourd'hui, on retrouve une multitude d'expérimentations dont l'intérêt porte sur l'effet du taux

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

d'allongement lors du processus de DO sur l'ostéogenèse [123,141,166,170]. Dans ces études, la comparaison se fait entre des taux qui sont considérés comme « lents » (tels que 0.3mm par jour) ou « rapides » (2mm par jour). Cependant, c'est grâce aux travaux d'Iizarov que l'importance de ce paramètre a été mise en lumière pour la première fois. L'étude expérimentale conséquente qu'il a mise en place portait sur l'analyse de la formation osseuse dans un modèle canin d'allongement osseux au niveau du tibia. Il a pu démontrer que pour un taux de distraction « lent », l'ostéogenèse dépassait la vitesse de distraction et résultait sur une consolidation précoce du cal osseux. À l'inverse, dans le groupe dont le taux était considéré comme « rapide », un retard du processus de formation était présent, voire une non-union totale du cal osseux distracté était présente. De plus, via l'analyse de la structure du fascia qui est une membrane fibro-élastique entourant les muscles, il a pu corrélérer négativement les effets d'un taux de distraction rapide avec les effets produits sur la structure membraneuse. Iizarov a donc conclu que l'utilisation d'un taux intermédiaire de 1mm par jour était la plus optimale. D'ailleurs, durant les années suivantes, les études utilisant d'autres modèles animaux et qui ont analysé ce paramètre sont arrivées à la même conclusion. Ces dernières préconisent l'utilisation d'un taux de distraction intermédiaire.

Au sein de la littérature, on retrouve également des études s'intéressant aux effets du taux d'allongement sur la vascularisation du cal osseux [123,170]. Toutes les études tendent à dire que l'application d'un taux de distraction rapide entraîne une inhibition du processus angiogénique au centre du régénérat osseux en plus d'une perturbation de la formation osseuse. Ces modifications dans des cas de distraction rapide proviendraient de la perturbation de la séquence de signalisation angiogénique notamment via une diminution de plusieurs facteurs de croissance angiogénique (PDGF, VEGF et FGF-2). Et par conséquent, une diminution de la formation de vaisseaux est observée à travers la diminution du marquage CD31 (indicateur de la formation de nouveaux vaisseaux) au sein du régénérat distracté.

Concernant l'impact du taux d'allongement sur les tissus mous environnants, les conclusions tirées dans les études s'y intéressant vont dans le même sens [121,169,171]. En effet, plusieurs rapports ont montré une augmentation de la survenue de contractures articulaires et de déformations angulaires du fait d'une incapacité d'adaptation des muscles environnants face à l'environnement mécanique induit par la force de traction [166]. Les muscles ne s'étireraient pas de manière adéquate.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

Parmi les tissus mous environnants impactés, on retrouve également les nerfs qui sont eux aussi soumis aux forces de traction lors de la distraction. Skoulis et al [121] se sont intéressés à cette problématique dans un modèle de distraction chez le rat via l'utilisation de différents taux de distraction. Leurs expérimentations ont permis de démontrer que les propriétés de conduction étaient affectées en fonction du taux d'allongement. En effet, une diminution de la vitesse de conduction et une variation de la structure intra neurale ont été observées pour le groupe ayant un taux d'allongement rapide. La conclusion de cette étude est que les nerfs ont la capacité de s'allonger et de changer de morphologie (jusqu'à un certain degré) durant la phase de distraction active si le taux de distraction est adapté. C'est ainsi qu'il a été mis en évidence qu'un taux de 1mm par jour représentait le taux le plus rapide et le plus sûr vis-à-vis des nerfs périphériques. Bien évidemment, en deçà de ce taux l'impact sur les nerfs est minime.

Prenant en compte toutes ces recommandations, nous avons choisi d'effectuer un taux d'allongement de 0.5mm par jour, valeur sollicitée dans les modèles d'allongement chez le rat. D'ailleurs, Aronson et al [141] ont mis en évidence que ce taux intermédiaire était mieux supporté par les animaux et permettait une meilleure minéralisation du cal distracté à des temps tardifs (sept semaines de consolidation).

Concernant la longueur d'allongement finale créée sur les fémurs de rat, nous nous sommes orientés vers les applications cliniques. En clinique, la longueur d'élongation des os du membre inférieur est en moyenne de 6cm [99,105] à 8cm [172], ce qui représente un allongement total de 12,7% à 17% de la longueur totale de la jambe respectivement. En revanche, il est déconseillé d'aller au-delà de 25% de la longueur totale du fémur (en raison d'une augmentation de la douleur et de la fonction) [99]. C'est pourquoi la longueur de l'allongement final choisi a été de 5mm, représentant ainsi une élongation totale de 12.5%. Ainsi, la durée de la période d'allongement a été définie à 10 jours.

Le second paramètre en lien avec le taux de distraction concerne la fréquence ou le rythme d'activation. Ce paramètre correspond au nombre d'incrémentations effectuées pour un taux donné par jour [167]. Dans la même logique que pour le taux d'allongement, ce paramètre est considéré comme influençant la qualité et la quantité du tissu nouvellement formé au sein du régénérat osseux.

Ilizarov s'est également intéressé à ce paramètre lors de son étude sur le modèle canin cité précédemment. Il a constaté que l'application d'une plus grande fréquence à un taux



## Chapitre 2 : Modèle expérimental

d'allongement similaire entraînait un meilleur résultat sur le processus de régénération osseux. Pour ce faire, il a appliqué une distraction de 1mm par jour à une fréquence de 0.25mm toutes les six heures ou une fois toutes les 24 heures. Il a été constaté que sur les animaux ayant subi de multiples incréments, la formation du nouveau tissu osseux était beaucoup plus avancée que pour le groupe n'ayant subi qu'une seule incrémentation par jour. D'ailleurs, dans ce dernier groupe, le gap distracté n'était pas complètement rempli par de l'os nouveau comparé au groupe multiple. Cette analyse s'est étendue au fascia également (tissu mou), où il a été observé que la structure de cette membrane était complètement étirée et endommagée pour le groupe dont la fréquence d'activation était unique. La conclusion qu'Ilizarov en a tiré est qu'une élévation à 1mm par jour et à une fréquence de 4 fois par jour (0.25mm toutes les 6 heures) permettait d'obtenir un résultat satisfaisant vis-à-vis du processus de régénération ainsi que des tissus mous environnants. À l'heure actuelle, ce protocole est toujours sollicité par les cliniciens lors de la mise en place du protocole de distraction sur les membres inférieurs (os long). Bien évidemment, en fonction de la réponse du patient, les chirurgiens peuvent modifier en cours de route le protocole de distraction en fonction de la tolérance du patient et des résultats observés par le suivi médical.

Cependant, les mécanismes d'action sur l'efficacité de l'utilisation d'une fréquence élevée au cours du processus de DO restent encore inconnus. Grâce à l'analyse de plusieurs études, Ji et al [173] ont pu mettre en lien les effets bénéfiques de l'application de haute fréquence sur la vascularisation et la formation osseuse. Pour cela, ils ont rassemblé différentes études portant sur les réponses cellulaires face à une stimulation mécanique, notamment dans des cas de distraction dite continue (système automatisé) ou discontinue (activation manuelle). Ils ont mis en évidence que l'environnement mécanique prolongé dans les cas de haute fréquence d'activation génère un effet bénéfique sur la formation osseuse et sur le réseau vasculaire. En effet, il a été montré dans la littérature une corrélation positive entre la régulation positive de l'expression génique des facteurs ostéogéniques et angiogéniques et l'application de force de traction. Ce phénomène est appelé mécanotransduction et induit une stimulation des fonctions cellulaires, via une augmentation de la prolifération et de la synthèse de ces dernières [82]. Donc, dans des cas d'incrémentation multiple (haute fréquence), l'environnement mécanique créé par les forces de traction persiste plus longtemps et de ce fait, la stimulation et les phénomènes biologiques liés le sont également. Il en résulte une croissance du régénérat distracté plus importante et un réseau vasculaire moins perturbé. C'est pourquoi, actuellement,

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

il a été convenu que lors de l'application d'un protocole de DO en chirurgie vétérinaire, un rythme de 2 à 4 jours doit être respecté [167].

Pour notre étude, nous nous sommes donc orientés vers une fréquence d'activation du fixateur externe à hauteur de deux fois par jour, espacé de 12 heures entre chaque incrémentation.

En résumé, le protocole d'allongement osseux développé lors de cette thèse était :

- Un taux de 0.5mm par jour ;
- Une fréquence de 12h soit 0.25mm toutes les douze heures ;
- Une durée de 10 jours pour obtenir une longueur d'allongement de 5mm.

### c. La phase de consolidation

La dernière phase du processus de distraction ostéogénique correspond à la période de consolidation. Le fixateur est mis en position bloquée, mais n'est pas retiré pour permettre la croissance du régénérat osseux ainsi que sa minéralisation. En effet, au cours de cette phase, l'interzone fibreuse se minéralise et les colonnes trabéculaires nouvellement formées remplacent l'os immature (tissu osseux réticulaire) précédemment apposé.

Comme précisé dans l'introduction générale, il n'y a pas de systèmes définitifs permettant aux cliniciens de définir une date du retrait du fixateur externe. En effet, plusieurs facteurs externes et internes peuvent influencer le processus de consolidation. Malgré cela, il est préférable d'estimer la période nécessaire pour atteindre l'objectif souhaité. Cela permet au patient de se projeter et de mieux appréhender le processus. Pour rappel, les cliniciens se basent sur l'index de guérison. Dans l'étude clinique de Prince et al [174], l'indice de guérison était en moyenne de 1.31mois/cm pour un allongement de 5cm et le temps total moyen de port du fixateur externe était de 206 jours. L'intérêt des études menées au cours de cette thèse porte sur la phase de consolidation du tissu osseux. La problématique s'inscrit dans la caractérisation mécanique des tissus et la mise en place de stratégie thérapeutique. Pour cela, il nous fallait choisir une date suffisamment longue pour autoriser l'étude de la minéralisation osseuse. Au vu de la littérature, et malgré une diversité des protocoles d'allongement, une période de sept semaines de consolidation semble satisfaisante pour permettre la formation d'une structure osseuse suffisamment rigide et donc consolidée. En conséquence, nos animaux seront mis à mort soixante-six jours après le jour de l'ostéotomie. Sachant qu'au 64eme jour, le fixateur externe a été retiré. Ce qui fait que les régénérats osseux ont subis des charges mécaniques liées à la mise en marche de l'animal pendant deux jours.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

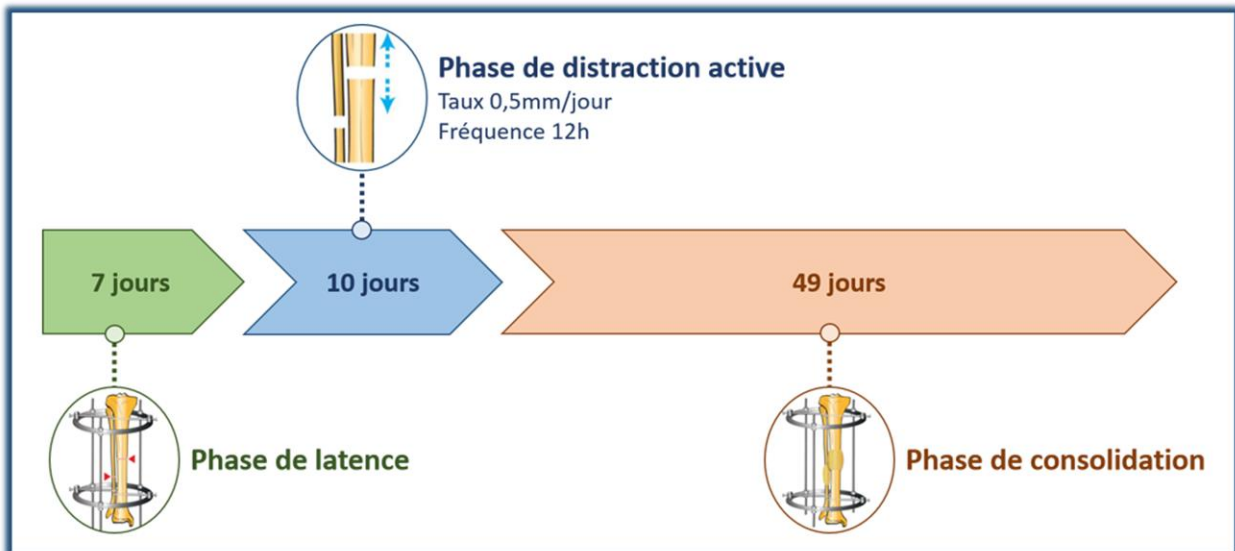


Figure 28 : Frise chronologique représentant les différentes phases de DO du protocole établi. Trois phases sont présentes. La phase de latence a une durée de 7 jours, pendant laquelle le fixateur externe n'est pas activé. Ensuite vient la phase de distraction active, où le fixateur est activé à un taux de 0.5mm par jour à raison de deux fois par jour (0.25mm/12h) pour un allongement total de 5mm. La dernière étape correspond à la phase de consolidation avec maturation de régénération osseuse (pontage et minéralisation). Cette étape dure 7 semaines et donc se termine 66 jours après l'opération.

### 3.4. Le traitement post-opératoire

Une fois les radiographies effectuées, les animaux ont été placés sous une lampe chauffante permettant un contrôle de la température, évitant ainsi une mort prématurée par hypothermie. Les animaux ont ensuite reçu une injection sous-cutanée de 2ml de sérum physiologique, afin de combler les pertes de fluide dues à la chirurgie. Avant le réveil induit des animaux, la plaie opératoire a été nettoyée et un spray de guérison (Aluspray, Vétoquinol®) a été appliqué pour favoriser la propreté de la plaie et diminuer le temps de cicatrisation. Par la suite, une solution d'atipamézole (Revertor®, 5mg/ml) à un dosage de 0.2mg/kg a été injectée en sous-cutanée pour revêtir l'anesthésie. Les rats ont ensuite été monitorés jusqu'à leur réveil.

Un suivi analgésique post-opératoire, à base de buprénorphine (Buprécare®, 0.3mg/ml) a été administré quotidiennement à raison de deux fois par jour pendant les trois jours suivants la chirurgie de callotasis. Ces injections ont été effectuées en sous-cutanée et à un dosage de 0.05mg/kg. La double dose quotidienne d'injection vient du fait que le temps moyen de demi-vie du produit utilisé est de 8 heures.

L'ajout d'une couverture antibiotique lors de la première semaine post-opératoire a également été réalisé pour minimiser les infections. Le produit qui a été utilisé est de l'amoxicilline (Synulox®, 50mg/ml) sous forme de gouttes appétentes contenant 2.5mg d'amoxicilline potentialisés par de l'acide clavulanique. Les recommandations préconisées lors

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

de son usage pour les animaux de petite taille sont de 5 gouttes/kg. Afin d'éviter des manipulations supplémentaires qui peuvent engendrer un stress, nous avons choisi de dissoudre le contenu antibiotique directement dans le biberon à raison de 8 gouttes dans 300ml d'eau stérilisée. Évidemment en fonction des scores obtenus par les grilles d'évaluation, il nous a fallu modifier ou rallonger la période des soins post-opératoires.

### 3.5. Le prélèvement des échantillons osseux

Les quatre fémurs droits distractés ainsi que les quatre pattes controlatérales gauches ont été prélevés en fin de protocole pour permettre l'étude des paramètres mécaniques via des essais de flexion trois-points et architecturaux grâce à la microtomographie. La mise à mort des animaux a été effectuée en respectant la directive européenne 2010/63 de l'article 6 [147] stipulant que l'acte doit être fait sans douleur, sans angoisse et sans souffrance, réalisé par une personne compétente et dans un établissement utilisateur.

Une sédation via une anesthésie gazeuse halogénée (isoflurane avec une induction à 5% et une phase de maintien à 1.5%, Isoflurin<sup>®</sup>) a été effectuée avant l'injection d'Euthasol<sup>®</sup>. Ce dernier est une solution de pentobarbital permettant une dépression du système nerveux central et un arrêt respiratoire. L'injection a été faite par voie intraveineuse à une dose de 140mg/kg. Par la suite, dans un milieu stérilisé, une incision de la peau partant du haut de la hanche jusqu'au genou a été réalisée à l'aide d'un bistouri. Le biceps fémoral ainsi que le vaste latéral ainsi apparents, il nous a suffi de couper entre les deux pour atteindre le fémur. Lors de cette opération, il est important de détacher le plus possible de muscles attachés à l'os afin de faciliter les prochaines étapes du prélèvement. Au niveau du genou, une ténotomie et une syndesmotomie ont été accomplies, libérant ainsi le genou de son articulation. Côté hanche, il nous a suffi de couper la capsule articulaire et de venir disloquer la tête fémorale. Une fois l'échantillon récolté, pour les fémurs distractés, nous avons pu retirer le fixateur externe ainsi que les 4 tiges. Tous les échantillons ont été nettoyés des tissus mous les entourant comprenant les tissus musculaires squelettiques et les tendons.

### 3.6. La technique de conservation

De manière générale, la conservation ne doit pas ou peu altérer la composition du tissu. La finalité est donc de maintenir un état homéostatique relatif au milieu naturel en gardant au mieux la MEC, les cellules qui la composent et le contenu minéral. Température et assèchement sont deux paramètres pouvant altérer les propriétés mécaniques ou biologiques du tissu. Pour

# Chapitre 2 : Modèle expérimental

l'analyse mécanique de flexions trois-points, la conservation par congélation a été favorisée puisqu'elle n'induit aucune modification des éléments constituant la structure osseuse cités plus haut. Les échantillons ont été entourés d'une gaze imbibée de sérum physiologique puis conservés au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'aux acquisitions d'imagerie par microtomographie aux rayons X et jusqu'aux essais mécaniques de flexion trois-points.

## 4. Techniques de validation du protocole

### 4.1. Suivre du processus de régénération via la radiographie

#### a. Principe

La radiographie à rayon X est une technique utilisée très couramment en clinique de par sa rapidité d'exécution et son coût relativement faible comparé à d'autres techniques d'imagerie (entre 25€ et 300€). Ce système d'imagerie est basé sur les propriétés intrinsèques des rayons X. En effet, ces derniers sont des ondes électromagnétiques capables de traverser des objets (solide, liquide, gazeux) et surtout capables d'être absorbés par la matière qu'elle parcourt. C'est pourquoi le système de radiographie est plutôt simple puisqu'il est constitué d'un tube à rayon X et d'un détecteur [175].

Le tube à rayon X est constitué d'une cathode (pôle négatif) et d'une anode (pôle positif) et est caractérisé comme étant des convertisseurs d'énergie puisqu'ils consomment de l'énergie électrique pour générer des radiations électromagnétiques (rayon X) (conf. Fig. 29) [176]. Il est important de stipuler que la majorité de l'énergie créée au sein du tube est de la chaleur à 99% et seulement 1% sont des rayonnements X. Au sein du tube, les électrons produits par la cathode

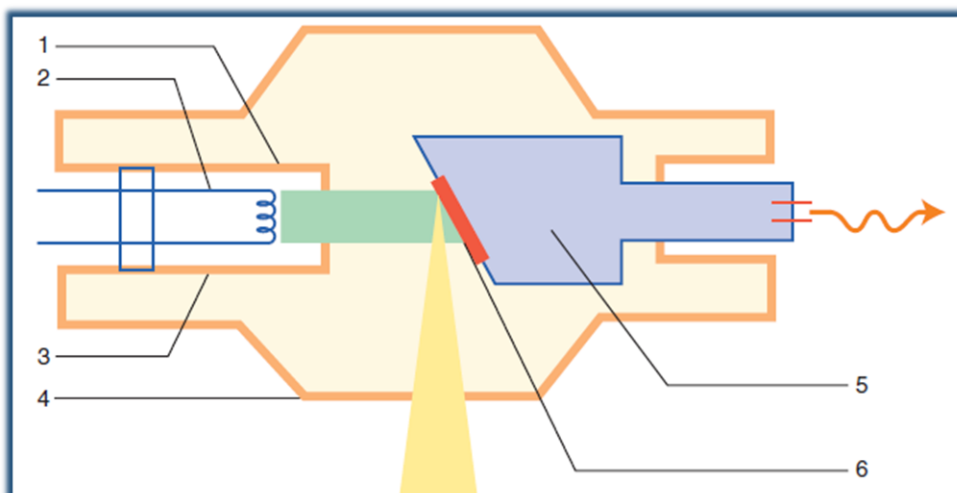


Figure 29 : Représentation d'un tube à rayon X (Régent et al, 2013). Ce système (4) est composé d'une cathode (à gauche) et d'une anode (à droite). La cathode (3) est constituée d'un filament (2) et d'une pièce de concentration (1), qui produit un faisceau électronique dirigé vers l'anode (5). Cette dernière est composée d'une plaque de tungstène (6) qui va freiner le faisceau et produire ainsi les rayons X et de la chaleur. Le bloc de cuivre quant à lui sert à évacuer cette chaleur produite.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

accélèrent rapidement vers l'anode du fait de la surchauffe du filament qui la constitue : cet effet est appelé processus d'émission thermo-ionique [176]. D'ailleurs, le nombre de photons X (rayon X) émis est dépendant du nombre d'électrons qui traversent le tube et est représenté par l'intensité en milliampères (mA). Le courant électronique traversant le tube est unidirectionnel. Une fois le faisceau électronique produit, il est dirigé vers l'anode grâce à la pièce de focalisation. L'anode quant à elle est composée d'une petite plaque de tungstène permettant la création de rayons X via une décélération brutale des électrons (transformation d'énergie cinétique en énergie thermique). Cette plaque est fixée à un bloc de cuivre, permettant d'évacuer la chaleur produite [176].

Lors d'une acquisition, la source va émettre un faisceau de rayons X qui sera traversé par le patient et les rayons résiduels seront enregistrés par des détecteurs électroniques. La résultante de cet outil est une image de projection en deux dimensions [175]. Les structures traversées pourront être discrétisées du fait que chaque tissu a un degré différent d'absorption. À titre d'exemple, les tissus osseux ont une capacité d'absorption très élevée, ce qui fait que leurs structures sont bien représentées. Globalement, plus la capacité d'absorption est élevée, plus l'intensité de l'image sera forte (pixel de couleur blanche).

En imagerie clinique, on distingue quatre niveaux de gris apparent : la densité calcique (os et tissu calcifié), la densité hydrique (tissu mou et liquide), la densité grasseuse et la densité aérique. Cependant, la résolution obtenue par la radiographie reste faible, à l'exception des structures dont l'absorption est extrême (positivement comme les tissus durs ou négativement tel que l'air) (conf. Fig.30). De ce fait, effectuer une discrimination des tissus mous reste compliqué, voire impossible. À l'heure actuelle, pour pallier ce défaut, l'utilisation d'agents de contraste est souvent préconisée si l'examen médical le demande [175].

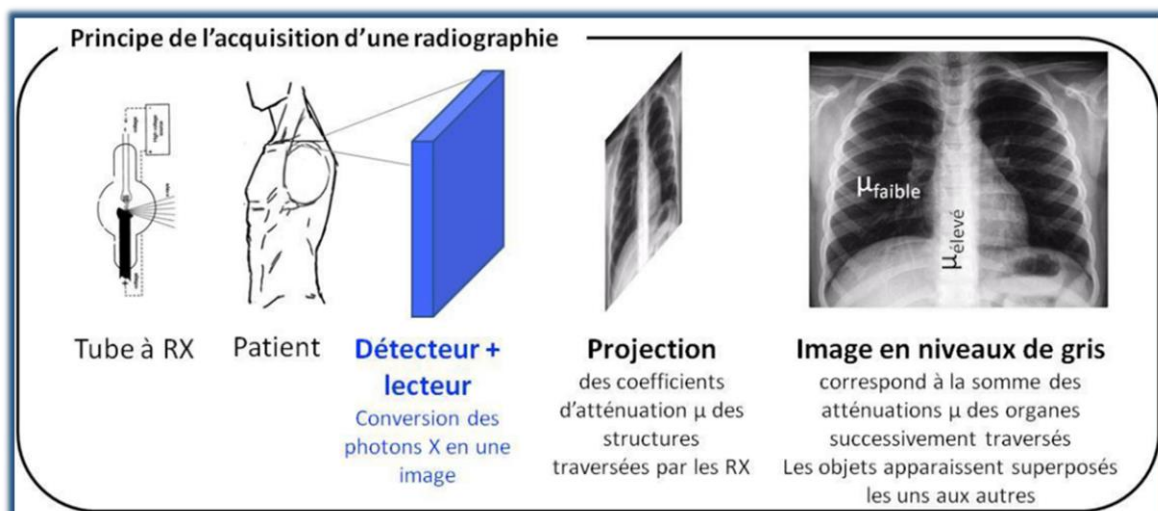


Figure 30 : Etape permettant d'obtenir une radiographie. (Poirier-Quinot, 2019).

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

### b. Acquisition des images

Cette technique d'imagerie nous a permis d'obtenir un suivi longitudinal sur l'évolution du régénérat osseux de nos quatre animaux en cours de distraction. Pour ce faire, les acquisitions radiographiques ont été effectuées à différents temps : J0 (jour de la chirurgie), J7 post-opération (fin latence), J17 post-opération (fin distraction active), J45 post-opération (milieu consolidation), J64 post-opération (retrait du fixateur externe), J66 post-opération (mise à mort de l'animal).

En amont de chaque imagerie, une sédation minimale de l'animal a dû être effectuée afin que ce dernier ne puisse se mouvoir lors de l'acquisition. Pour ce faire, une seringue contenant de la médétomidine (Medetor<sup>®</sup>, 1mg/ml) à 0.25mg/kg a été utilisée pour l'injection en intrapéritonéale. Néanmoins, si l'animal ne parvenait pas à s'endormir, une seconde injection de kétamine (Kétamine Renaudin<sup>®</sup>, 50mg/ml) à un dosage de 40mg/kg en intrapéritonéale était alors effectuée. Une fois, la sédation effective, les animaux ont été placés dans le système de radiographie de sorte que le plan sagittal de la patte soit face au détecteur (conf. Fig. 31). Il est important de notifier que l'appareil utilisé était conforme aux normes puisque les parois internes étaient recouvertes de plomb, évitant ainsi la propagation de rayon X. De plus, il y avait à disposition un dosimètre afin de contrôler le taux de radiation. Lors des acquisitions, une télécommande nous permettait de sortir de la pièce et d'actionner à distance le système. Nous pouvions récupérer les images radiographies par le logiciel Softys Imaging<sup>®</sup>, avant de les enregistrer dans un dossier correspondant à l'animal. Une fois les radiographies effectuées, les

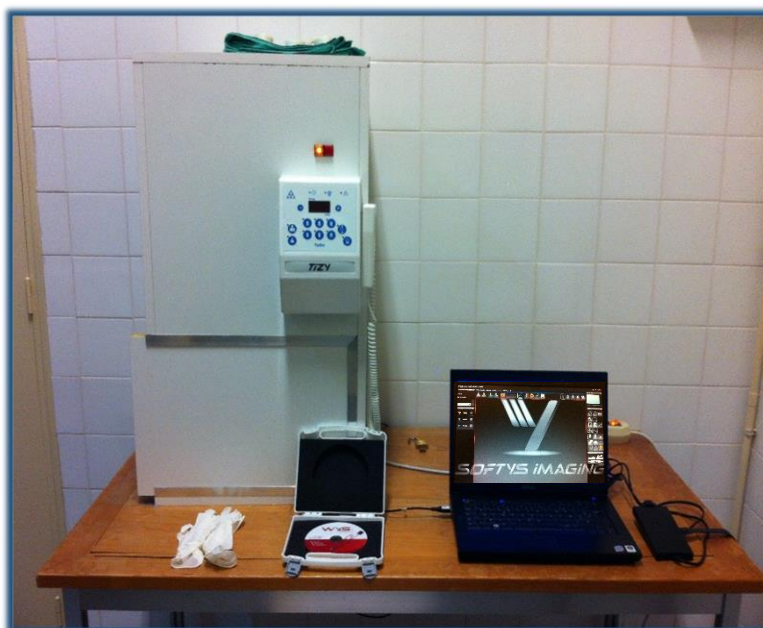


Figure 31 : Appareil de radiographie ainsi que le logiciel d'acquisition des images

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

animaux ont reçu une solution d'atipamézole (Revertor<sup>®</sup>, 5mg/ml) à un dosage de 0.2mg/kg en sous-cutanée pour revertir l'anesthésie. Grâce à cela, les animaux se réveillaient dans les deux minutes suivantes.

### 4.2. Analyse des paramètres architecturaux via la microtomographie aux rayons X

#### a. Principe

La microtomographie (micro-CT) est une technique d'imagerie également basée sur l'absorption des rayons X. Cependant, cette dernière permet d'obtenir un modèle en trois dimensions (3D) monochromes des structures analysées. En effet, cet outil est composé d'un système rotatif où un émetteur (tube à rayon X) et un détecteur (multi-barrettes) sont diamétralement positionnés. Le principe de cette méthode consiste à déposer un sujet d'analyse entre la source de rayon X et le détecteur (conf. Fig. 32). En se déplaçant, le système récolte des projections bidimensionnelles, appelées coupes. Du fait d'un mouvement de rotation par le système et de translation par le lit où est placé le sujet d'étude, on parle de coupe hélicoïdale [177]. Cet ensemble de coupes peut être par suite reconstruit grâce à des logiciels spécifiques d'analyse d'images. Deux types de configuration sont alors possibles : soit l'objet d'étude effectue une rotation alors que la source à rayon X et les détecteurs sont stationnaires lors du balayage ; soit c'est l'objet d'étude qui est stationnaire tandis que la source à rayon X et le détecteur effectuent une rotation autour de ce dernier. Cette deuxième configuration est appliquée lors d'essais cliniques ou précliniques *in vivo*. Lors de notre expérimentation, nous nous sommes orientés vers la première conformation qui est plus adéquate pour des essais *ex vivo*.

Le nombre de rangées de ces détecteurs est en constante augmentation, ce qui permet ainsi d'en augmenter la qualité d'image. La micro-CT a une résolution spatiale beaucoup plus

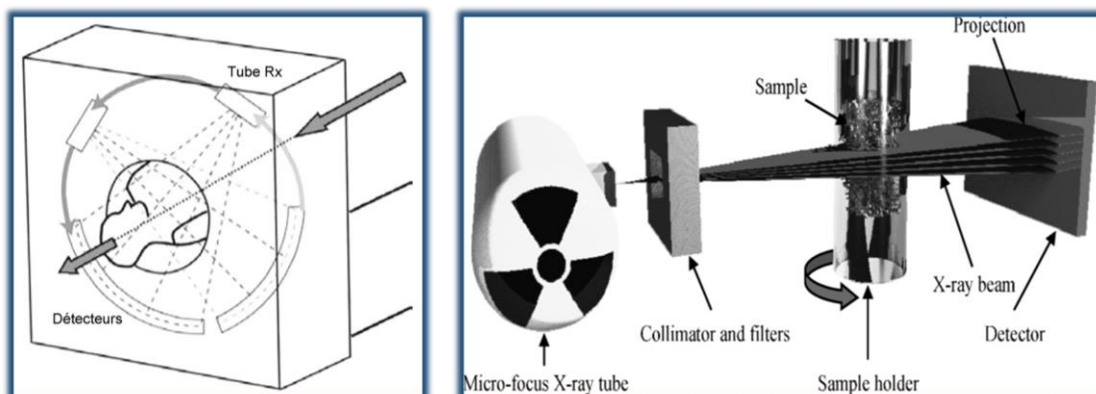


Figure 32 : Représentation de l'acquisition d'images par microtomographie (Jankowski et al, 2010 et Bouxsein et al, 2010).



## Chapitre 2 : Modèle expérimental

élevée que les systèmes de radiographie ou CT standard : celle-ci varie en effet de 1 à 100 $\mu\text{m}$  et la taille des voxels est de l'ordre de 0.3 à 100  $\mu\text{m}$  (voxels isotropiques) [177]. L'amélioration de la résolution spatiale permet actuellement d'étudier l'évolution de la microarchitecture osseuse lors des processus d'ostéogenèse au sein d'une vaste étendue de modèles. À titre d'exemple, la taille des trabécules composant le tissu osseux chez la souris gravite autour de 30 à 50  $\mu\text{m}$  [177]. Autre point intéressant, la micro-CT apporte la possibilité de caractériser la densité minérale des tissus. Ce point est particulièrement intéressant à analyser dans le domaine de la calcification des tissus. En utilisant des objets dont le contenu minéral est connu, il est possible de déterminer les variations de densité entre et au sein d'un même tissu. De plus, cette méthode de quantification est non destructive, ce qui permet de multiplier les analyses au sein d'un même échantillon, telles que des caractérisations sur les propriétés mécaniques. Par conséquent, cet outil permet, à travers les études scientifiques, d'établir les liens entre les phénomènes biologiques complexes et les propriétés mécaniques dans des modèles où les conditions physiologiques sont définies. La résultante est une meilleure compréhension du système lors de processus de régénération via le développement du savoir sur les relations structure-fonction [178–180].

De surcroît, cette technique d'imagerie peut être couplée à des logiciels 3D sophistiqués. En effet, les reconstructions 3D des images obtenues par micro-CT peuvent être exportées dans des logiciels de modélisation (de type Abaqus<sup>®</sup>) enrichissant ainsi les modèles d'étude par éléments finis. L'étude de l'architecture osseuse peut donc être analysée numériquement grâce à l'application de loi physique sur ces structures géométriques importées [181]. Néanmoins, la qualité de l'image obtenue peut être impactée par des artefacts dont l'origine est multiple. On retrouve notamment des artefacts de type « beam hardening » qui proviennent directement des systèmes métalliques implantés dans le corps (tel que les fixateurs externes, prothèses...), des artefacts causés par un sous-échantillonnage, des artefacts liés aux bruits (« poisson noise, gaussian noise »), des artefacts appelés « ring artifact » souvent présents lorsque l'échantillon est imagé dans de l'eau... [182,183].

### b. Acquisition des images

En amont des acquisitions, chaque échantillon (n=4) a été placé au sein d'un tube (Eppendorf<sup>®</sup>) de 1.5ml ou 2.5ml (en fonction de la taille du cal distracté) préalablement rempli d'eau pour limiter la déshydratation du tissu osseux. Ils ont par la suite été placés dans le faisceau conique micro-CT (Phoenix Nanotom 180s). La position de l'échantillon corroborait avec l'axe de rotation du système, c'est-à-dire que l'axe longitudinal du fémur (dimension la

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

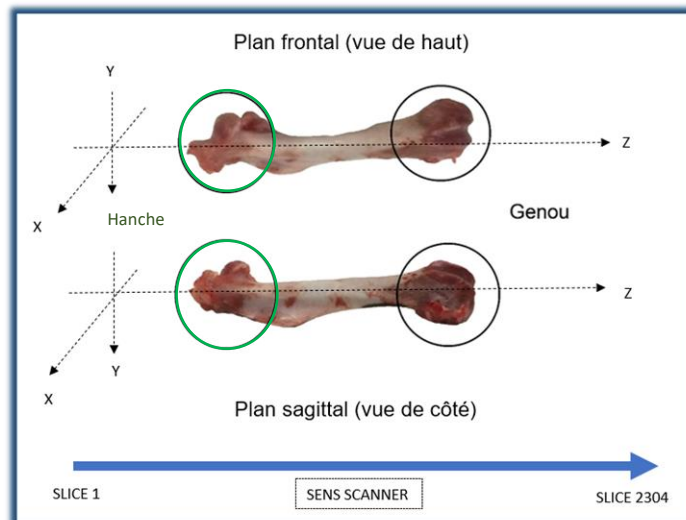


Figure 33 : Représentation de l'orientation spatiale du fémur de rat lors des acquisitions micro-CT.

plus grande) était aligné avec l'axe de rotation de la machine (conf. Fig. 33). Étant donné la géométrie de l'échantillon, qui n'est pas droit et plan, la colinéarité n'était pas parfaite.

Les paramètres d'acquisition du détecteur étaient les suivants : une tension de 90kV, un courant de 120 $\mu$ A, 2400 pas de rotation (0.15°) sur 360°, un temps d'exposition de 500ms, avec une moyenne de 3 images par palier de rotation, 2400 images acquises pour chaque essai et donc un temps d'acquisition total de 20min (comprenant le montage, calibration et acquisition). Les images ont été reconstruites par le logiciel Pheonix datos X2 et ont été sauvegardées dans un format 16 bits en niveau de gris. La taille des voxels était constante pour chaque échantillon et la résolution était de 10 $\mu$ m.

### c. Traitement de l'image

L'ensemble des images reconstituées ont été importées dans le logiciel NIH image software (ImageJ/Fiji) [184]. Afin de pouvoir mesurer les différents paramètres de la microarchitecture osseuse, il nous a fallu binariser l'image volumique de chaque échantillon.

Pour cela, dans un premier temps, une sélection du volume d'intérêt (VOI) a été effectuée. Pour ce faire, seul l'ensemble des coupes appartenant au régénérat osseux a été conservé en partant de la dernière image où la corticale proximale était apparente jusqu'à la première image de la corticale distale, pour ne comptabiliser que la zone distractée.

Ensuite, un filtre permettant de soustraire le bruit de fond (« subtract background ») a été appliqué afin de lisser une partie du bruit de l'image. En amont de la segmentation finale, les images ont été dupliquées et ont été converties en 8-bits, afin de changer la plage de niveau de gris. Le changement peut être vérifié à l'aide de l'histogramme, où dorénavant les valeurs sont comprises entre 0 et 255. Une segmentation légèrement surestimée des tissus minéralisés

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

a été réalisée sur les images 8-bits, transformant ainsi les niveaux de gris en 0 ou en 255. Cette transformation s'appelle binarisation. Ces images ont été divisées par 255, remplaçant ainsi les valeurs des pixels par 1 ou 0. L'ensemble du stack d'images a été multiplié par l'image originale, nous permettant ainsi d'obtenir un fond complètement noir facilitant les prochaines segmentations et sélections de zones d'intérêt (conf. Fig. 34). Cette pré-étape a été effectuée pour chaque animal.

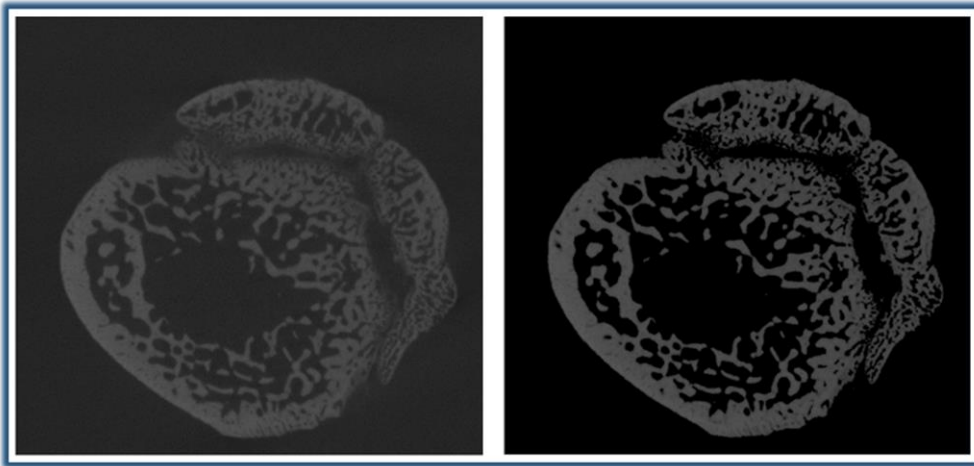


Figure 3 : Première étape de segmentation permettant de rendre le fond noir. À gauche, l'image originale (16-bits) et à droite l'image (16-bits) obtenue post-traitement.

Pour pouvoir calculer les paramètres architecturaux, il nous a fallu réaliser une binarisation de l'image. Parmi les différentes méthodologies existantes, la binarisation des images a été effectuée via la méthode d'Otsu [185] (conf. Fig. 35). Cette méthode est basée sur

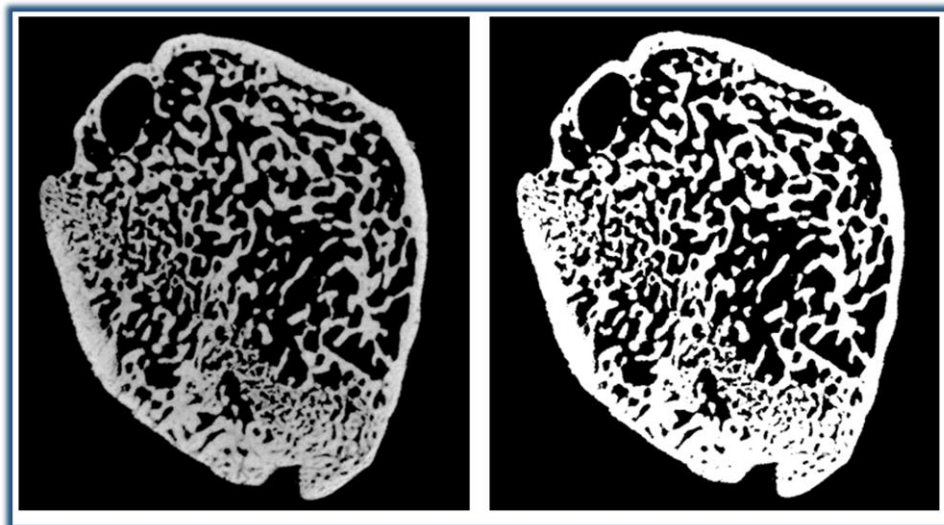


Figure 4 : Image binarisée via la méthode d'Otsu.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

l'histogramme de l'image. L'algorithme va scinder l'image à binariser en deux classes de pixels : les pixels d'intérêt ayant un niveau maximal (255) et les pixels de l'arrière-plan ayant un niveau minimal (0).

Ensuite, une sélection de la zone d'intérêt a dû être effectuée pour ne contenir que le régénérat osseux. Cette délimitation a été réalisée sur les images 2D des sections transverses de l'os. La création des régions d'intérêt (ROI) dans des cas de régénération est beaucoup plus fastidieuse que celle effectuée sur des os non fracturés [178,180]. En effet, la taille et la forme peuvent varier de manière extrême pour un même cal et entre les cals. De plus, les espaces vides apparents sur les images CT ne représentent pas du vide et sont généralement des tissus mous non minéralisés (moelle, cartilage, tissu fibreux.). C'est pourquoi il faut être vigilant à ne pas sous-estimer le ROI du régénérat osseux (conf. Fig. 36).

La mesure des paramètres architecturaux a pu être réalisée grâce au plugin BoneJ [186]. Ces derniers comprenaient :

- La fraction volumique osseuse (BV/TV), représentant le volume d'os minéralisé (l'ensemble des voxels en noir) par unité de volume de l'échantillon (totalité des voxels contenus dans la zone délimitée par notre ROI), exprimée en pourcentage (%).
- L'aire de la section transverse (CSA), exprimée en mm<sup>2</sup>.
- L'épaisseur corticale (Ct.Th) de la nouvelle corticale formée au sein du cal périosté, exprimée en µm.

La densité minérale osseuse volumique (vBMD, exprimée en mg HA/cm<sup>3</sup>) est un paramètre architectural ne dépendant pas du volume osseux. C'est la raison pour laquelle cette



Figure 5 : Représentation de différentes coupes pour un même régénérat osseux distracté. L'ensemble de ces images 2D montre les variations de formes et de tailles du régénérat. En jaune sont représentés les ROI corrigées permettant d'estimer les paramètres architecturaux.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

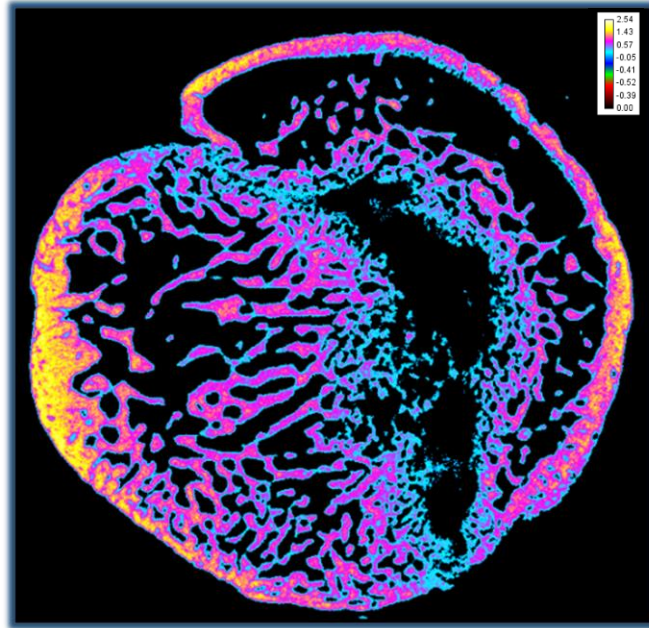


Figure 37 : représentation d'une coupe transverse d'un régénérat osseux calibré grâce à l'utilisation des phantoms.

dernière a été calculée sur les images non binarisées, mais dont le fond a été supprimé et sans la nécessité d'un ROI. En revanche, l'utilisation de deux « phantoms » d'hydroxyapatite de calcium, dont le contenu minéral, est connu ont été utilisés lors de la calibration de nos échantillons (conf. Fig. 37). Le premier était de  $800\text{mg HA/cm}^3$  et le second de  $1750\text{mg HA/cm}^3$ .

### 4.3. Caractérisation mécanique de la structure osseuse : la flexion trois-points

#### a. Principe

Dans les modèles de régénération osseuse, les analyses mécaniques ex vivo de type flexion sont grandement sollicitées [187–192]. En effet, il est possible de mesurer et de quantifier la rigidité du cal osseux nouvellement formé en cours de régénération et en fin de processus. Il est également possible de détecter des variations de la structure osseuse de par un traitement différent entre les groupes d'animaux. Au sein de la littérature, et particulièrement dans des modèles chez le petit animal, la flexion est le plus souvent sollicitée du fait de sa simplicité de mise en place comparée à des essais de traction ou de compression [192–194]. Par exemple, l'alignement de l'os avec l'appareil de mesure est plus compliqué et peut induire des erreurs de mesures non négligeables. De plus, la flexion peut être pilotée via deux types de configurations soit la flexion trois points (F3P), c'est-à-dire avec un seul appui de charge, soit la flexion quatre points (F4P), avec deux appuis de charge. L'utilisation majoritaire de la F3P vient du fait que cette configuration fournit une répartition des charges internes plus proche de

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

la physiologie du tissu, en particulier au niveau de la zone centrale [193]. Cependant, l'apparition de force de cisaillement proche de sa section centrale est un inconvénient. Ce paramètre est en partie induit par l'espacement entre les deux appuis fixes où repose l'échantillon. En effet, cet espace doit être suffisamment grand pour garantir la validité du test. L'ensemble des données empiriques ont montré que si l'espace est insuffisant, alors la majorité du déplacement est induit par des forces de cisaillement et non par de la flexion. Turner et al [195], ont défini que la longueur de l'espacement devait être au moins 16 fois plus grande que l'épaisseur de l'échantillon. Bien que ce ratio ne puisse pas être atteint dans des modèles utilisant des petits animaux, il a été néanmoins convenu que la longueur des appuis devait être d'au moins 20mm pour le fémur de rat pour garantir 90% du déplacement dû à la flexion de l'os. Par ailleurs, des recommandations en fonction de l'espèce animale ont été définies (conf. Fig. 38) [193].

Le déroulement d'un essai de flexion trois-points consiste à positionner l'os sur deux appuis simples dont l'étendue est fixée. Un troisième appui va descendre à une vitesse constante et appliquer une charge vers le bas et au centre de l'échantillon. Au cours de cet essai, l'os va subir des efforts en traction et en compression simultanément. En effet, lors du chargement, des contraintes de compression vont apparaître d'un côté de l'axe neutre (côté de l'appui mobile) alors que de l'autre côté de l'axe neutre, des contraintes en traction seront perçues par l'os (côté des deux appuis fixes) [193]. Au niveau de l'axe neutre, il n'y a pas de déformation ou de contraintes normales. La flexion trois-points se produit lorsque trois forces agissant (trois appuis) sur un os produisent deux moments égaux (conf. Fig. 38). Il est à noter que l'os est mécaniquement plus faible en tension qu'en compression, c'est l'une des raisons pour laquelle

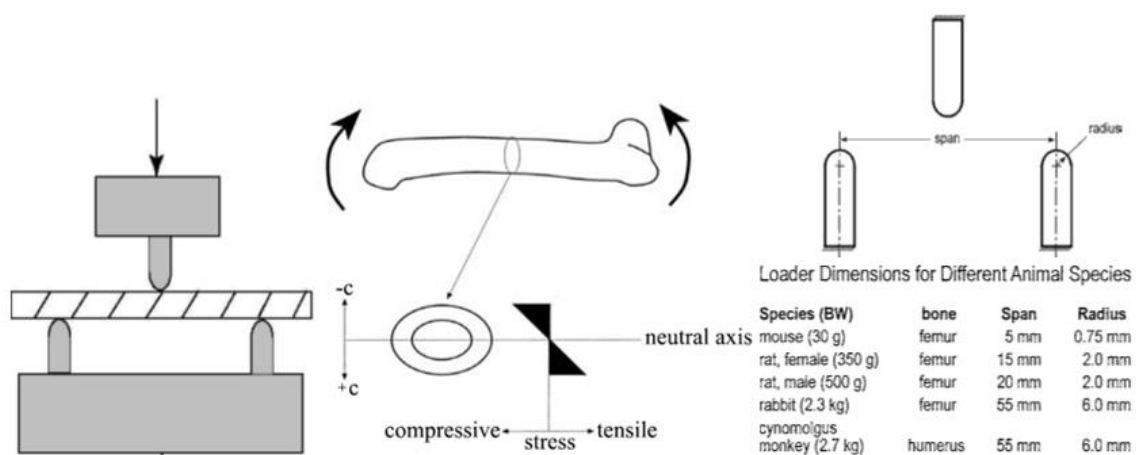


Figure 38 : Représentation et recommandation d'un essai de flexion trois-points. À gauche, schéma représentant le système de F3P avec l'échantillon posé sur les deux appuis fixes ainsi que la cellule de charge contenant l'appui mobile (Wang et al, 2010). Au milieu, la représentation des forces de compression et de traction perçue pendant l'essai de flexion trois points. À droite, recommandation concernant l'espacement entre les deux appuis fixes et le rayon de ces derniers.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

lors des essais jusqu'à rupture, la fracture se fait généralement du côté en tension [195]. Au cours de l'essai, la cellule de charge est directement reliée à un ordinateur permettant de récolter les données en force (en Newton, N) et en déplacement (en millimètre, mm), nous permettant ainsi de tracer les courbes force-déplacement avec la force en ordonnées et le déplacement en abscisses.

Plusieurs paramètres peuvent être calculés à la suite d'un essai de flexion trois-points. Cependant, des hypothèses concernant le tissu osseux doivent être établies en amont : le tissu est considéré comme une poutre droite, avec une section transversale ne variant pas sur sa longueur ; le matériau est considéré comme isotrope, homogène linéairement élastique. Bien que ces hypothèses ne soient pas conformes à l'os, les données obtenues permettent de fournir des informations sur la structure et sont donc un outil de comparaison entre les études [193].

Lors des essais de flexion trois-points sur le cal osseux du fémur de rat, la force maximale obtenue ( $F_m$ , en N) représente la plus grande valeur en force atteinte avant rupture. La raideur ( $k$ , en N/mm) est mesurée sur la courbe force-déplacement dans la partie linéaire de la phase élastique du matériau et est obtenue en traçant la pente de la courbe. De plus l'énergie nécessaire à la rupture ou à la force max, appelée travail ( $W$ , en mJ ou Nmm), est calculée en estimant l'aire sous la courbe force-déplacement [196,197] (conf. Fig. 39).

Grâce à la théorie des poutres, les propriétés des matériaux du cal en régénération peuvent également être déterminées : le module d'élasticité ou module d'Young (en Méga Pascale, MPa), la contrainte maximale (en MPa) et la déformation (en %) [198]. Le calcul de la dureté n'est pas recommandé lors des essais de flexion puisque les hypothèses émises

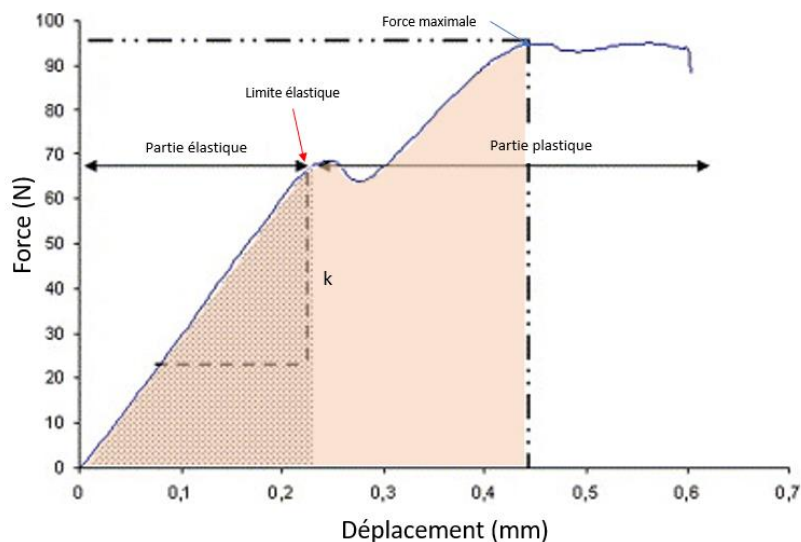


Figure 39 : Courbe hypothétique d'un essai de F3P (Beaupied et al).

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

préalablement sont applicables seulement dans la phase linéaire du matériau. Étant donné que la ténacité correspond à la capacité de résistance à la prolongation d'une fissure, alors les calculs de ce paramètre impliquent inévitablement la phase de plasticité et donc un comportement non linéaire [196].

Pour calculer la contrainte, il faut préalablement calculer le moment de flexion ( $M_f$ ), selon l'équation (1) et le moment quadratique ( $M_Q$ ) selon l'équation (2) :

$$M_f = (F \times L / 4) \quad (1)$$

Avec  $M_f$  le moment de flexion (en N\*mm), F la force appliquée, L la longueur entre les deux appuis simples.

$$M_Q = (\pi \times D^4 / 64) \quad (2)$$

Avec  $M_Q$  le moment quadratique ( $\text{mm}^4$ ) et D le diamètre (en mm), le cal osseux étant représenté par une section circulaire et pleine de diamètre D

Donc grâce aux équations (1) et (2), l'équation de la contrainte est :

$$\sigma = \left( \frac{(M_f \times r)}{M_Q} \right)$$

Avec  $\sigma$  la contrainte (en MPa),  $M_f$  le moment de flexion (en N\*mm), r la distance par rapport au centre de masse ( $r = D/2$ ),  $M_Q$  est le moment quadratique.

La contrainte maximale est obtenue via :

$$\sigma_{max} = \left( \frac{(M_{f_{max}} \times r)}{M_Q} \right)$$

Le module d'Young se calcule conformément à l'équation suivante :

$$E = \left( \frac{R \times L^3}{48 \times M_Q} \right)$$

Avec E le module d'Young (en MPa), R la rigidité (en N/mm), L la distance entre les appuis (en mm) et  $M_Q$  le moment quadratique.

### b. Protocole d'essais

Les propriétés mécaniques des régénérats distractés (n=4) ainsi que des pattes controlatérales (n=4) ont été mesurées via des essais de F3P à la suite des essais d'imagerie micro-CT. En effet, cette technique d'imagerie est non destructrice pour les échantillons, qui



## Chapitre 2 : Modèle expérimental

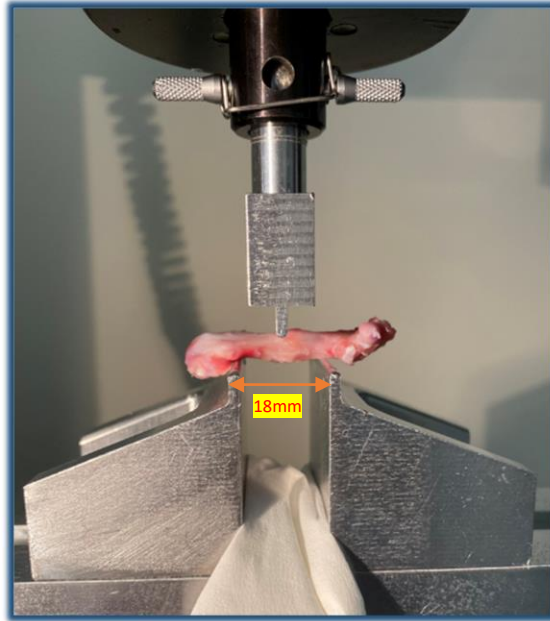


Figure 40 : Représentation du dispositif de F3P mis en place pour les caractérisations des fémurs distractés et controlatéraux.

étaient dans du sérum physiologique pendant l'imagerie. Le système utilisé était une machine Instron 5565A (INSTRON®), dont l'erreur relative du capteur de force utilisé 1000N est de 0.1% en traction/compression et la résolution est de 0.0025N (conf. Fig. 40). En amont de la caractérisation mécanique, les tissus osseux ont été décongelés à température ambiante. Afin d'éviter une déshydratation des tissus, lors de la décongélation et pendant l'essai de F3P, les échantillons ont été conservés dans une gaze contenant une solution saline.

L'espacement défini entre les deux appuis fixes était de 18mm tout au long des essais et le diamètre des appuis était de 2mm. Concernant l'orientation des échantillons sur les appuis, il a été convenu que la tête fémorale était positionnée à droite vis-à-vis des deux appuis fixes et que le fémur était positionné horizontalement avec la surface antérieure vers le haut, centré sur les supports. La charge appliquée était dirigée verticalement au milieu de l'échantillon. L'orientation est restée la même pour chaque échantillon. Ensuite, grâce au logiciel Blue Hill 3 nous avons pu paramétrer la vitesse de déplacement à 0.5mm/min. Une pré-charge de 5N nous a permis de stabiliser l'échantillon avant le début de l'essai. L'ensemble des données force/déplacement ont été récupérées et traitées sur Matlab (conf. Fig. 40).

### III. Résultat

#### 1. Analyse du processus de régénération par la radiographie

Les images radiographiques post-chirurgie (J0) confirment le bon ancrage des broches dans le tissu osseux, le respect du parallélisme entre ces dernières ainsi qu'un espacement

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

correct des broches. On constate également la ligne d'ostéotomie au centre des deux broches centrales créant un petit gap d'1mm environ (conf. Fig. 41-A).

À la fin de la période de latence (J7), aucune zone calcifiée n'était visible au sein du gap osseux (conf. Fig. 41-B). Au dix-septième jour, soit à la fin de la phase de distraction active, les radiographies ont montré un début de calcification du cal endosté à proximité des corticales natives et une légère minéralisation du cal périosté. Cependant, la zone distractée était majoritairement radio-transparente (conf. Fig. 41-C), ce qui montre que la zone n'est pas encore minéralisée.

Les radiographies prises en milieu de consolidation (J45), plus précisément 4 semaines après la cessation des forces de traction, montrent que le processus de consolidation était toujours actif et que l'espace créé pendant la phase de distraction active s'était réduit (conf. Fig. 41-D). En effet, au niveau du cal endosté, la radio-opacité était plus importante même si la zone centrale présentait toujours une forte radio-transparence. Quant au cal périosté, sa minéralisation était percevable via la formation d'une seconde corticale externe (conf. Fig. 41-D).

Après 47 jours de consolidation (J64), les zones radio-transparentes avaient quasiment disparu, malgré la persistance de la ligne d'ostéotomie au centre du régénérat osseux. L'avancement de la minéralisation des tissus des cals périosté et endosté ont permis le pontage du régénérat osseux. Effectivement, la fusion des tissus de manière centripète a permis d'observer une continuité entre le côté proximal et distal (conf. Fig. 41-E).

Les radiographies prises à la fin de la période de consolidation (J66) mettaient en évidence la structure osseuse nouvellement formée après deux jours de mise en charge physiologique des animaux. La radio-opacité n'avait pas évolué par rapport à la date du retrait, le pontage osseux était toujours visible et il n'y avait pas de signes de fracture osseuse. Cependant, on constatait un léger affaissement de la structure osseuse avec un décalage par rapport à l'alignement de départ (conf. Fig. 41-F).

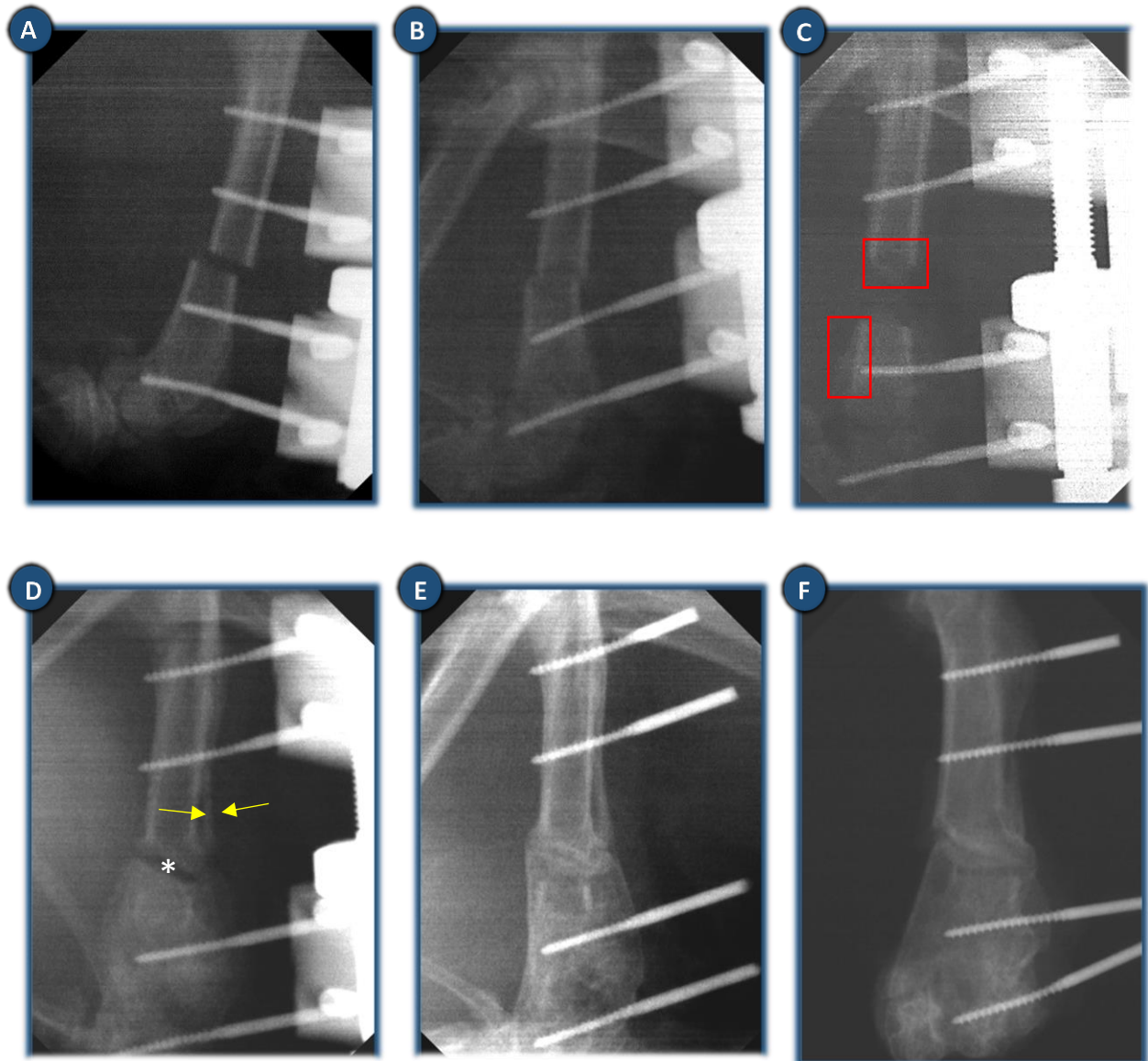


Figure 41 : Suivre radiographiques du processus de régénération au cours de la DO. **A.** J0, radiographie post-chirurgie. **B.** Radiographie après 7 jours de latence. **C.** Cliché radiographique réalisé en fin de distraction présentant des points de calcification dans le cal endosté et périosté (zone en rouge). **D.** Après 28 jours de consolidation, diminution de la zone radio-transparente, malgré la présence d'une zone radio-transparente dans la région centrale du gap (étoile). La formation d'une seconde corticale au niveau du cal périosté était visible (flèche jaune). **E.** Pontage du régénérat osseux à J64 post-chirurgie. **F.** Radiographie prise après 49 jours de consolidation (66 jours post-opération) incluant deux jours de mise en charge physiologique. Pas de fracture présente malgré un affaissement de la structure.

### 2. Caractérisation des paramètres architecturaux du cal distracté

La reconstruction tridimensionnelle des images acquises par micro-CT a permis de mettre en évidence que les extrémités proximales et distales étaient toujours pontées après le retrait du fixateur externe et une mise en charge physiologique de l'animal pendant deux jours

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

(conf. Fig. 42). Cependant, l'allongement moyen des os était de 3.5mm à la fin de l'étude, ce qui traduit un affaissement final après le retrait du fixateur externe sans induction de fracture. La formation d'une nouvelle corticale extérieure a pu être mise en évidence. Cette dernière entoure le régénérat osseux, et était présente tout autour de la structure nouvellement formée (conf. Fig. 42 A-D). Ce nouvel os périosté ressemblait à de l'os compact au vu de l'organisation du tissu osseux. Les résultats sur la densité moyenne volumique (vBMD) confirmeront cette affirmation et seront détaillés plus bas. Suivant l'axe longitudinal du cal osseux, un réseau de travées osseuses dense et connecté comblait l'entièreté du régénérat osseux en cours de consolidation. De plus, après 49 jours de consolidation, soit 66 post-chirurgie, l'ensemble des reconstructions présentaient une zone centrale moins minéralisée au centre par rapport au reste du régénérat osseux, ce qui reflète la présence d'os immature connecté au réseau lamellaire l'entourant (conf. Fig. 42 E-F).

Les paramètres architecturaux obtenus par les essais de micro-CT ont indiqué une fraction volumique moyenne (BV/TV) de  $54\% \pm 15$  pour les fémurs distracté. Cette valeur représentait 55% de la fraction volumique moyenne de la patte controlatérale (conf. Tableau 2). La densité moyenne volumique (vBMD) pour le régénérat osseux était en moyenne de  $775\text{mg}/\text{cm}^3 \pm 25$ . Les mesures de la section transversale (CSA) étaient plus élevées pour la patte distractée que pour la patte controlatérale et valaient  $17.3\text{mm}^2 \pm 9.3$  et  $9.4\text{mm}^2 \pm 1.2$  respectivement. Enfin, l'épaisseur de la nouvelle corticale formée a été comparée à la corticale native. Les données obtenues montrent que cette dernière était plus fine ( $0.317\text{mm} \pm 1.2$ ) que la corticale native du fémur controlatéral ( $0.6\text{mm} \pm 0.05$ ) (conf. Tableau 2).

Tableau 2 : Paramètres architecturaux mesurer sur les fémurs distracté et controlatéraux

Paramètres	Régénérat osseux distracté				Fémur controlatéral			
	Fémur 1	Fémur 2	Fémur 3	Fémur 4	Fémur 1	Fémur 2	Fémur 3	Fémur 4
BV/TV (%)	40	50	75	50	99	98.6	95.3	98.5
CSA (mm <sup>2</sup> )	10.78 ± 2	13.48 ± 0.82	31.16 ± 9.03	13.68 ± 2.08	8.37 ± 1.05	9.84 ± 1.29	11.01 ± 1.15	8.76 ± 1.17
Ct.Th (mm <sup>2</sup> )	0.26 ± 0.09	0.32 ± 0.08	0.36 ± 0.1	0.33 ± 0.06	0.62 ± 0.06	0.58 ± 0.05	0.54 ± 0.06	0.67 ± 0.09
vBMD (mg/cm <sup>3</sup> )	770	750	810	770	NAN	NAN	NAN	NAN

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

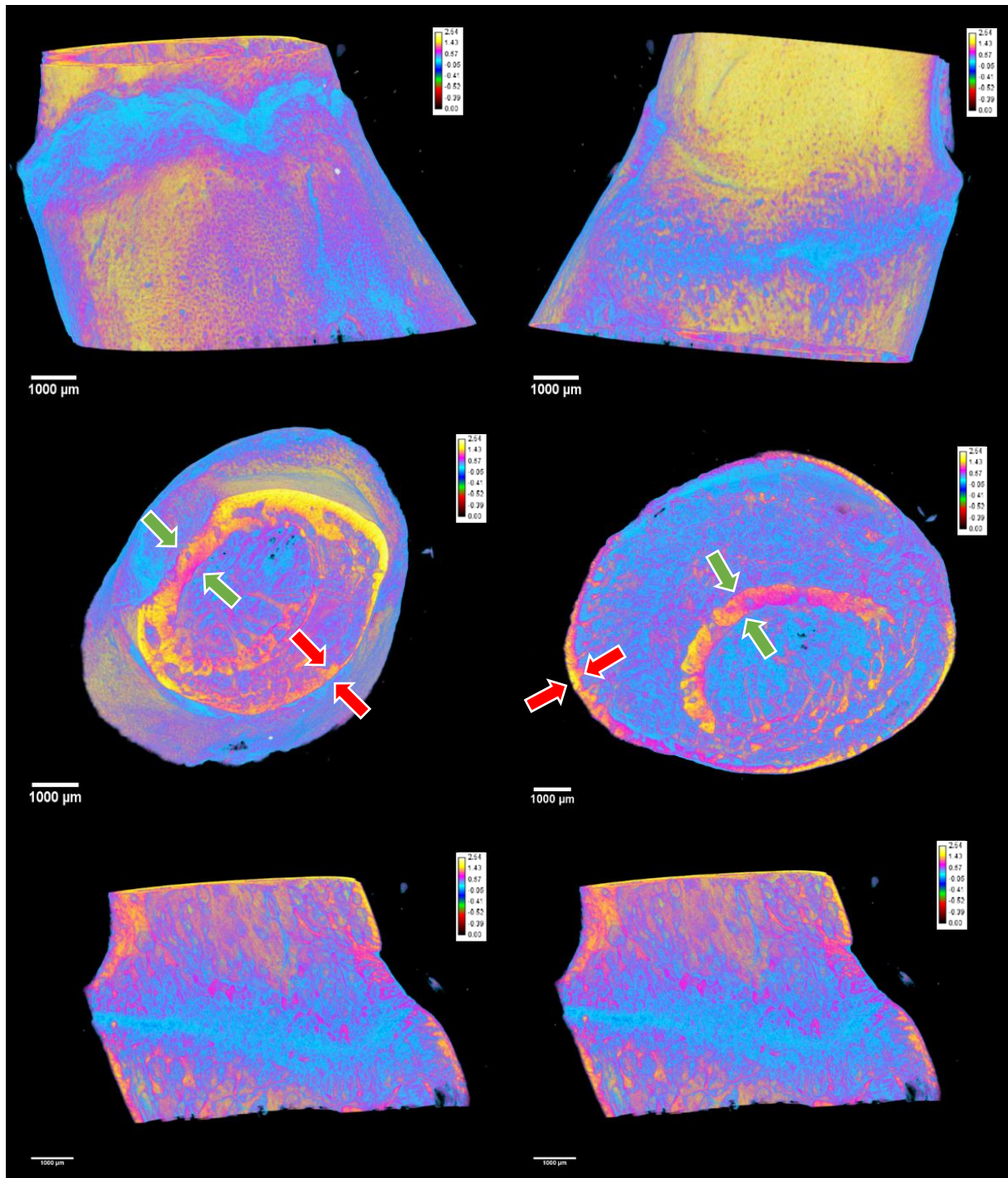


Figure 42 : Représentation d'une reconstruction 3D d'un régénérat osseux de fémur de rat. La minéralisation de l'os est illustrée par des couleurs allant du jaune au bleu et a été calibrée à l'aide de phantoms. **A-B.** Mise en évidence de la corticale nouvellement formée entourant le cal distracté selon l'axe longitudinal. **C-D.** Coupe transverse du côté proximal et distal, montrant la corticale native (flèche verte) et la corticale nouvellement formée pontant le cal distracté (flèche rouge). **E-F.** Représentation d'une coupe longitudinale illustrant une zone profonde du cal. Un réseau trabéculaire remplit ce dernier. Barre d'échelle = 1000 µm. Barre de calibration = 0 à 2540 mg/cm<sup>3</sup> avec en jaune = 1730 mg/cm<sup>3</sup>, en rose = 840 mg/cm<sup>3</sup>, et en bleu = 170 mg/cm<sup>3</sup>.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

### 3. Caractérisation mécanique du régénérat nouvellement formé

Les paramètres mécaniques des fémurs récoltés après 49 jours de consolidation ainsi que ceux des fémurs controlatéraux non distractés ont été analysés. Des essais de F3P ont permis d'analyser la résistance du régénérat distracté puisqu'en effet, les paramètres récoltés sont en lien direct avec la minéralisation de la structure. Pour une meilleure lisibilité, l'ensemble des données a été normalisé par rapport à la patte controlatérale : les résultats obtenus pour les fémurs distractés sont présentés sous forme de pourcentage du résultat correspondant pour les fémurs controlatéraux (conf. Fig. 43). Par exemple, pour la force maximale atteinte, la moyenne obtenue pour les fémurs distractés était  $115.5 \text{ N} \pm 59$  (notée Ffd) et pour les fémurs controlatéraux de  $143.7 \text{ N} \pm 24$  (notée Ffc). On calcule alors la force maximale normalisée des échantillons distractés :  $100 (Ffd/ Ffc)$ , soit 80% des échantillons controlatéraux. Concernant la rigidité, celle-ci ne représentait que 45% des valeurs obtenues sur les fémurs controlatéraux. La contrainte maximale était en moyenne de 12 MPa ( $\pm 6$ ) pour les régénérats distractés alors que les pattes controlatérales ont obtenu une valeur moyenne de 55 MPa ( $\pm 6$ ), ce qui représentait 21% des de valeurs controlatérales. Les valeurs moyennes du module d'Young de la structure nouvellement formée étaient de 138 MPa ( $\pm 109$ ) pour les fémurs distractés comparés à 1415 MPa ( $\pm 21$ ) pour les fémurs controlatéraux, donnant un rapport de 21%. Enfin, l'énergie maximale était plus élevée pour les fémurs distractés que les fémurs controlatéraux 171% des valeurs des fémurs controlatéraux. Cela s'explique du fait que la déformation était plus importante pour les fémurs distractés, et donc le déplacement nécessaire avant d'atteindre la force maximale était plus grand.

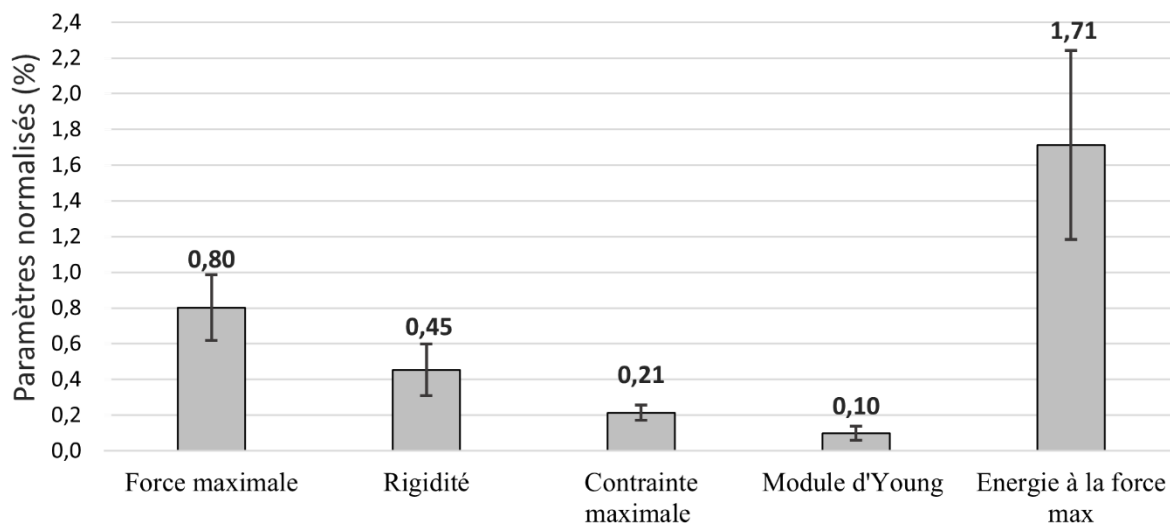


Figure 43 : Propriétés mécaniques : la force maximale, la rigidité, la contrainte maximale, le module de Young et l'énergie absorbée au point de charge maximale, normalisées par rapport aux fémurs controlatéraux chez les animaux distractés.

## IV. Discussion

L'ensemble des données collectées au sein de cette étude nous ont permis de confirmer la faisabilité et la reproductibilité du protocole d'allongement chez le rat. Celui-ci comprend une conception appropriée du fixateur externe et de l'ancillaire ainsi que le développement d'un protocole chirurgical efficient. En effet, ce protocole nous a permis d'appliquer un allongement du fémur entraînant la croissance d'un régénérat osseux et sa maturation. Le nouvel os formé, après 49 jours de consolidation, était suffisamment consolidé et fonctionnel pour permettre la mise en marche physiologique de l'animal pendant deux jours après ablation du fixateur sans survenue de fracture osseuse.

Concernant la chirurgie, l'ensemble des animaux ont bien toléré la procédure chirurgicale de par l'évaluation des signes de bien-être et du fait également qu'aucune infection des broches n'a été perceptible pendant le processus de DO. De plus, la locomotion des animaux n'était pas perturbée par le fixateur externe développé, ni par son positionnement, puisqu'une mise en marche fonctionnelle était possible dès le lendemain de la chirurgie. Les rongeurs ont très rapidement accepté le port du fixateur puisqu'aucun animal n'a essayé de le retirer. Ce point est très important, car chaque effet négatif, tel que du stress ou de la douleur, peut entraîner des variations dans le processus de régénération. Par ailleurs, une attention particulière a été portée au nettoyage de la plaie et du fixateur externe post-chirurgie, afin d'éviter tout blocage de l'axe de manœuvre, ce qui rendrait l'application de la distraction manuelle difficile et pourrait affecter l'alignement des segments osseux ostéotomisés ou l'ancrage des broches.

Le suivi radiologique nous a permis de surveiller tout au long de la procédure l'ancrage des broches au tissu osseux. Les analyses ont mis en évidence qu'aucune rupture et aucun descellement des broches ne sont apparus, ce qui montre que le filetage développé et la technique d'insertion des broches sont efficaces. Un bon ancrage des broches au tissu osseux permet d'obtenir un environnement stable et rigide sans quoi le processus de régénération osseuse ne peut se faire [29]. De même, pour ce qui concerne le fixateur, l'ancrage des tiges aux blocs A et B doit être efficace sinon toute la rigidité du système peut en être impactée. Mark et al [199] ont démontré dans un modèle de fracture chez le rat une corrélation entre le desserrage des vis et la diminution de la rigidité du système : si une ou deux vis de serrage étaient desserrées alors la rigidité axiale (axe de chargement longitudinal) diminuait de 50%. À la fin de la phase de distraction active, les radiographies nous ont permis de constater l'alignement des segments osseux après activation du fixateur externe sur une période de 10

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

jours et jusqu'à la date de fin du protocole. Nous avons validé la fiabilité et l'efficacité du fixateur externe développé et également l'intérêt d'utiliser un guide de forage pour optimiser l'implantation des tiges et une bonne répartition des charges mécaniques. Par ailleurs, le système de distraction manuelle nous a offert la possibilité d'effectuer un allongement sans sédation de l'animal. De plus, le suivi du processus de régénération en cours d'allongement a été établi permettant de constater la formation dans un premier temps du cal périosté puis une minéralisation du régénérat osseux (cal endosté et périosté) de manière centripète. Ce phénomène est bien conforme au processus de régénération constaté au sein de la littérature. En fin de protocole, un pontage apparent a été constaté et une radio du régénérat montre un cal mature et minéralisé.

L'analyse de la qualité osseuse dans des modèles de régénération osseuse est importante puisqu'elle représente une des variables clés dans l'estimation du risque fracturaire [200]. Diverses méthodes peuvent être mises en place pour en permettre sa caractérisation : la micro-CT, qui informe sur l'architecture interne et sur la densité minérale osseuse ; l'établissement d'essais mécaniques de type flexion trois points, permettant d'obtenir des informations sur les propriétés structurales et matérielles du tissu en régénération.

Au sein de la littérature, l'utilisation de la micro-CT dans divers modèles permet de quantifier au cours du temps des variations du tissu osseux sain, pathologique ou en processus de guérison. À titre d'exemple, Zhang et al [200] ont analysé l'évolution des paramètres architecturaux et la densité minérale au cours du vieillissement chez le rat, afin de comprendre la recrudescence de fracture chez les personnes âgées. Leurs résultats montrent une augmentation continue jusqu'à 9 mois de la densité minérale osseuse (vBMD), de la fraction volumique (BV/TV), ainsi que de l'épaisseur des travées osseuses (Tb.th), puis une diminution continue jusqu'à 17 mois. En revanche, on observe de manière intéressante que le nombre de travées osseuses ne fait que diminuer tout au long de ces 17 mois, et inversement, l'espace entre les travées augmente.

De plus, des corrélations entre les propriétés mécaniques et les paramètres architecturaux ont émergé [178,201]. Cependant, des différences en fonction du type de tissu osseux analysé peuvent apparaître. Par exemple, les études menées sur le fémur sain chez les rongeurs ont permis de mettre en corrélation la force maximale (essais de F3P) et la densité minérale osseuse (essais micro-CT) [202,203]. Ce constat est également vrai pour les données de rigidité [202,203]. Mais en revanche, Bissinger et al [180] n'ont trouvé aucune corrélation entre la densité et la force maximale lors de l'analyse d'un cal fracturaire en voie de



## Chapitre 2 : Modèle expérimental

consolidation (21 jours post-fracture) avec les mêmes méthodes d'analyse. Ils ont même obtenu une corrélation négative pour la force maximale et l'épaisseur des travées par rapport à la densité minérale osseuse. Dans notre étude, grâce aux reconstructions 3D des imageries données par la micro-CT, une analyse des propriétés architecturales du cal nouvellement formé a pu être effectuée. Ces dernières ont confirmé la présence d'un pontage complet du régénérat osseux via la formation d'une nouvelle corticale. Nyman et al [179] ont d'ailleurs clairement démontré une corrélation positive entre la présence d'un pontage osseux et la force développée par le cal osseux. Leur étude a également montré une corrélation négative entre la force maximale et la densité minérale osseuse. Ceci suppose que cette stratégie de développer une structure volumineuse permet au système de compenser le manque de rigidité créé par la fracture ou la DO. C'est l'une des raisons qui font que les valeurs de CSA sont plus importantes pour le cal distracté que pour le fémur controlatéral, au fur et à mesure celui-ci tendra vers une géométrie similaire à la corticale native.

Dans notre étude, la densité minérale osseuse (en  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) était de  $775\text{mg}/\text{cm}^3$  en moyenne pour les cals distractés après 7 semaines de consolidation. Si l'on compare cette donnée avec celle de la littérature [202,204], on constate qu'elle représente 65% de la valeur d'un os cortical sain chez le rat mâle. Ceci montre que le processus de distraction mis en place a permis de développer un environnement suffisamment stable pour permettre une formation et une consolidation du régénérat osseux. Cette idée est renforcée si l'on choisit de comparer nos résultats à la densité de l'os trabéculaire présente dans la littérature. Cette valeur orbite autour de  $630 \pm 114 \text{ mg}/\text{cm}^3$ , ce qui est inférieur à notre densité obtenue [202]. L'ensemble des informations citées précédemment et l'analyse de la structure 3D du régénérat, nous confirment que le cal nouvellement formé est un mélange d'os cortical, d'os trabéculaire et d'os immature au centre du gap. En effet, la présence d'une zone moins minéralisée ( $170\text{mg}/\text{cm}^3$ ) est toujours perceptible après 49 jours de consolidation. Ceci confirme que le processus d'ossification est un phénomène long. Néanmoins, la structure nouvellement formée était suffisamment résistante pour ne pas se fracturer après deux jours de marche. Par ailleurs, en clinique, le retrait du fixateur se fait également avant qu'il n'y ait un remodelage complet de la structure, car celui-ci peut prendre jusqu'à 2 années complètes chez l'homme. L'intérêt est donc de retirer le fixateur lorsque la structure est suffisamment consolidée pour une mise en marche physiologique.

Au sein de la littérature, l'analyse des paramètres architecturaux au cours des processus de distraction reste pauvre et ce d'autant plus si l'on impose des critères de comparaison. En effet, lors d'une confrontation de données, il est important d'analyser les paramètres de

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

l'expérimentation mise en place, sinon les variations observées peuvent survenir sans pour autant que cela vienne de l'objet d'étude. C'est pour cette raison qu'après sélection, seulement trois études remplissaient les critères suivants : étude de régénérat distracté, sur un fémur, dans un modèle animal de rat, et montrant des données brutes (souvent, les données sont exprimées en pourcentage du fémur contrôle). Xu et al [57] ont obtenu une densité minérale de  $381.4 \pm 30$  mg/cm<sup>3</sup> pour un cal distracté à 4 semaines avec un protocole de distraction similaire au nôtre. On remarque que nos valeurs obtenues sont supérieures, ce qui est normal puisque dans notre étude, il y a trois semaines de consolidation supplémentaires. Pour l'étude de Xu et al [136], les données pour un fémur distracté après six semaines de consolidation oscillaient aux alentours de 400mg/cm<sup>3</sup> et les valeurs obtenues dans l'étude de Xue et al [205] étaient en moyenne de 600mg/cm<sup>3</sup> pour cinq semaines de consolidation. Cependant, la longueur d'allongement final était de 7mm, expliquant une valeur moyenne de densité minérale osseuse inférieure à la nôtre.

Les essais mécaniques de flexion trois-points nous ont quant à eux permis d'analyser les propriétés mécaniques structurales des fémurs à travers la force maximale, la rigidité et l'énergie développée pour atteindre la force maximale. Les données matériaux (module d'Young, contrainte maximale) du tissu osseux ont pu également être extrapolées via les équations de la théorie des poutres. Dans un premier temps, les valeurs des fémurs controlatéraux ont été confrontées à la littérature. Les forces maximales chez le rat mâle pour des fémurs sains sont comprises entre 124N et 166N et pour la rigidité entre 205 et 261N [124,202,204]. Nos valeurs moyennes obtenues pour les fémurs controlatéraux sont de 144N et de 340N pour la force maximale et la rigidité respectivement. Cette comparaison nous a donc permis de valider le protocole mis en place. Pour analyser les données du cal distracté, la même problématique a émergé que lors de la comparaison des données de micro-CT. Xu et al [57] ont relevé une force maximale de 74.9N, une rigidité de 37.5N/mm, une énergie à la force maximale de 32mJ et un module d'Young de 66.7MPa après quatre semaines de consolidation. Les résultats de l'ensemble de leurs données sont effectivement inférieurs aux nôtres, en raison de la date d'arrêt du protocole, mais restent néanmoins dans des gammes de valeurs similaires. Une seconde étude, proche de notre protocole de distraction et de temps de consolidation, nous a intéressés. En effet, Nomura et al [206] ont rapporté une valeur moyenne de 52N pour la force maximale, de 107 N/mm pour la rigidité, de 15 MPa pour la contrainte maximale et un module d'Young de 421MPa, mais dont l'écart-type était de 308 après six semaines de consolidation. Ces données sont également inférieures aux nôtres ce qui s'explique par un protocole d'allongement légèrement plus long que le nôtre.

## Chapitre 2 : Modèle expérimental

Notre protocole présente cependant certaines limites. Étant donné la lourdeur et les contraintes de cette chirurgie, peu d'animaux ont été analysés, mais les résultats sont néanmoins prometteurs sur l'utilisation de ce protocole dans l'étude la régénération osseuse lors de la DO. Le manque d'information au temps tardif du processus de DO au sein de la littérature rend la comparaison des données difficiles, mais cela montre aussi les difficultés de mettre en place un protocole qui permette d'aller jusqu'à consolidation. L'une des complications les plus récurrentes reste l'apparition de fracture post-ablation du fixateur externe. Sans oublier la problématique portant sur la date de retrait du fixateur, qui aujourd'hui ne semble toujours pas résolue. Une augmentation des données au temps long sur le cal distracté permettrait peut-être d'enrichir les modèles de corrélation ou de modélisation numérique, aidant ainsi à la prise de décision. De plus, il aurait pu être intéressant d'utiliser un système de table de score pour quantifier l'évolution du régénérat osseux au cours de la distraction. Dans la littérature, des systèmes de quantification ont été développés tels que celui établi par Li et al [207], où leur classification est basée sur la forme et l'intensité d'opacité des radiographies.

### V. Conclusion

Nous avons décrit un protocole efficace et reproductible de DO dans un modèle fémoral de rat permettant le développement d'un régénérat osseux fonctionnel. La conception d'un fixateur externe ainsi que d'une ancillaire, basée sur les caractéristiques anatomiques du rat, a permis de générer un environnement stable propice à la maturation du cal distracté. Les paramètres architecturaux et mécaniques étaient suffisamment avancés pour que la mise en marche physiologique sur deux jours n'ait pas entraîné de fracture de ce dernier.

Ce modèle nous autorise à pousser l'analyse des propriétés mécaniques des différents tissus évolutifs au sein du gap distracté. Une meilleure compréhension des propriétés mécaniques des tissus en cours de consolidation semble importante au vu du manque d'information au sein de la littérature. De plus, la possibilité de stimuler la formation osseuse par l'ajout d'un facteur de croissance permettra d'optimiser le processus de régénération, réduisant ainsi le risque potentiel de développer une complication pendant ou après le processus de DO.

## Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

### I. Introduction

La formation du régénérat osseux au cours de la DO est un processus complexe. Ce dernier est une structure évolutive : il est en effet composé de plusieurs tissus dont les propriétés mécaniques vont changer au cours du temps. On pourra voir apparaître dans un premier temps des tissus fibreux et cartilagineux qui sont des tissus mous. S'ensuit l'apposition de tissus de plus en plus minéralisés et donc de plus en plus durs. Effectivement, une structure osseuse de type immature se transforme en un tissu osseux trabéculaire pour enfin tendre vers la structure la plus mature et ayant des propriétés mécaniques plus résistantes : le tissu osseux cortical. La particularité d'un régénérat osseux lors d'un processus d'allongement est que l'on retrouve une organisation spatiale et temporelle des tissus au cours du processus de régénération osseuse.

Cette capacité à pouvoir différencier des tissus à différents stades d'évolution font que le régénérat de la DO est un outil intéressant dans la caractérisation des propriétés mécaniques des tissus en formation. D'ailleurs, cette organisation particulière du régénérat permettrait d'obtenir les variations locales présentes au sein d'un même tissu et entre divers tissus de manière plus directe que dans la formation du cal fracturaire qui lui n'est qu'une mixture de divers tissus [208]. Il est intéressant de noter que dans la littérature, aucune étude ne s'est encore portée sur l'évolution du module d'Young ou de la dureté du régénérat distracté à un niveau microstructural. Pourtant, les informations fournies via cette évolution des propriétés mécaniques au cours des différentes étapes permettraient de clarifier certains points. À titre d'exemple, l'augmentation de la rigidité au sein du cal pourrait venir d'une augmentation du rapport BV/TV ou d'une augmentation de la rigidité du tissu, voire des deux. Il faudrait pouvoir répondre à toutes ces questions. À vrai dire, on retrouve dans la littérature, une seule étude portant sur la caractérisation des propriétés microstructurales du tissu osseux au cours du protocole d'allongement. Mora-Macías et al [64] ont effectivement analysé l'évolution des propriétés de l'os immature dans un modèle d'allongement du métatarse chez le mouton. Cependant, leur étude ne s'est intéressée qu'à un seul type de tissu. Il serait donc intéressant d'aller plus loin et d'analyser les propriétés des différents tissus minéralisés au sein du cal. Tout ceci nous permettrait de mieux comprendre l'évolution de ce tissu régénéré.

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

La structure osseuse a été présentée dans le chapitre 1. Cela a permis de mettre en évidence que l'os est une structure hétérogène dont les constituants internes organiques et non organiques sont variés. En effet, la phase minérale des os va jouer un rôle dans la rigidité de ce dernier tandis que le collagène va contribuer à la solidité et à la ténacité du tissu osseux [209]. Il est donc important de quantifier les propriétés matériaux des tissus constituant le régénérat osseux et les relations entre ses différentes propriétés. Cela permettra de relier les processus de biologie sous-jacents du processus de régénération à la récupération progressive de la fonction mécanique du tissu osseux. Finalement, l'intérêt majeur d'approfondir les connaissances sur la qualité osseuse en cours de régénération pourrait permettre d'un côté de promouvoir l'ingénierie biomédicale, via par exemple la conception de biomatériaux mieux adaptés aux processus physiologiques et d'un autre côté, d'enrichir les modèles numériques de mécanobiologie osseuse.

## 1. Objectif

L'objectif de ce chapitre est donc d'analyser les propriétés mécaniques des tissus minéralisés présents au sein du régénérat via une caractérisation simultanée du cartilage calcifié, de l'os trabéculaire et de l'os cortical. Cette étude permettra de caractériser la qualité osseuse à travers l'évolution du module d'Young et de la dureté du cal de manière générale (comparaison entre les temps) et zones-dépendantes. Pour ce faire, l'utilisation de la micro-indentation nous permettra d'obtenir les variations locales des caractéristiques mécaniques tout en définissant des zones précises d'observation (cal périosté, cal endosté).

## II. Méthodologie

### 1. Préparation des échantillons

Les expériences animales ont toujours été menées en accord avec les directives européennes 2010/63. Toutes les procédures décrites lors de ce projet ont été approuvées par le comité institutionnel de soin et d'utilisation des animaux de l'Université Aix-Marseille et par le Ministère de la Recherche Française. Elles ont assurément été réalisées au sein d'une animalerie conventionnelle de la Faculté de Médecine de Marseille. Le protocole expérimental utilisé était similaire à celui présenté dans le chapitre 2.

Pour cette étude, cinq fémurs distractés ont été récupérés à 2 semaines de consolidation (n=2), 4 semaines de consolidation (n=2) et 6 semaines de consolidation (n=1). Dès la récupération des échantillons, ces derniers ont été conservés dans de l'éthanol à 70% pendant

## Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

une semaine. Par la suite, les fémurs distractés ont été redimensionnés afin d'obtenir notre zone d'intérêt centrée sur le régénérat osseux. En son sein, on y retrouve un peu d'os cortical du segment osseux proximal, le cal distracté et également un peu d'os cortical du segment osseux distal. Pour ce faire, nous avons utilisé une scie DREMEL 4000, montée d'un disque abrasif de diamètre 38mm et d'un système d'hydratation continue. Cette dernière est importante afin de prévenir, le plus possible, des atteintes tissulaires dues aux effets thermiques. Des radiographies effectuées post mise à mort nous ont permis de nous orienter et de nous localiser afin de pouvoir découper notre zone d'intérêt.

Les échantillons ont ensuite été rincés avec de l'eau déminéralisée et ont été déshydratés, puisque la résine utilisée est hydrophobe. La déshydratation des échantillons doit se faire à travers l'utilisation de divers bains d'éthanol dont le degré augmente graduellement : 80%, 95% et 100% d'éthanol. Il est important de préciser d'une part que cette étape est effectuée sous vide afin de minimiser l'apparition de bulles d'oxygène coincées dans l'échantillon, et d'autre part que chaque bain durait 48h pour éviter des déformations du tissu osseux. En effet, si l'on avait directement effectué un bain à 100% d'éthanol des phénomènes d'osmose auraient pu apparaître, entraînant une distorsion du tissu osseux.

À la suite de ces bains, les échantillons ont été nettoyés par un solvant miscible avec la résine, le méthylcyclohexane (VWR international) pour 48h à température ambiante. Puis, l'imprégnation en résine a été réalisée grâce à l'utilisation de résine de méthacrylate de méthyle (MMA) et d'un durcisseur. Cette étape consiste à couler l'échantillon dans ce mélange et induire une polymérisation à l'aide d'un bain-marie dont la température est de 28°C pendant trois jours.

Une fois l'imprégnation effectuée, les coupes pour la microindentation et l'histologie ont pu être réalisées (conf. Fig. 44). Pour cela, l'échantillon est installé dans un microtome Leica RM 2265 (Wetzlar, Allemagne) équipé d'un couteau en carbure de tungstène de profil D. Ce dernier est positionné de sorte que le plan frontal soit apparent. Des sections suivant l'axe antéro-postérieur sont effectuées jusqu'à l'apparition des corticales natives. Une fois distinctes, une première section de 5µm d'épaisseur a été récupérée et déposée sur des lames adhésives (Superfrost Plus) pour les essais histologiques. L'utilisation des coupes histologiques provenant des mêmes échantillons nous permettra d'identifier les tissus présents au sein du régénérat, facilitant ainsi la localisation des divers tissus minéralisés au sein du régénérat distracté. Ensuite, l'échantillon a été transposé dans une machine de tronçonnage de précision Isomet

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

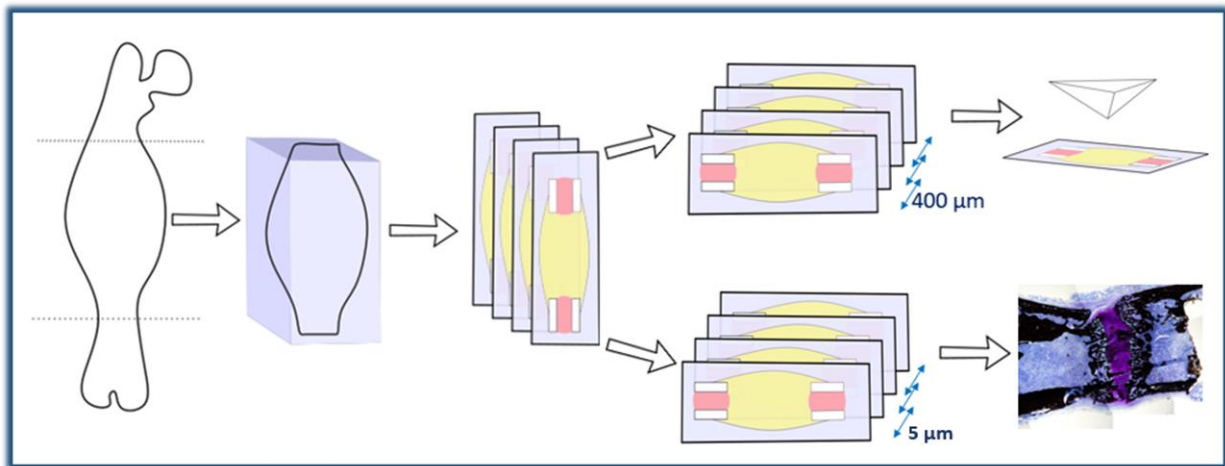


Figure 44 : Représentation schématique du protocole de découpe des échantillons imbibés dans la résine. L'os imbibé est redimensionné puis sectionné formant des coupes de 5µm pour l'histologie et des coupes de 400µm pour l'indentation.

4000® (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) afin de récupérer des sections pour l'indentation. Pour ce faire, l'échantillon a été placé dans un porte-échantillon et un disque de 0.4mm d'épaisseur (Isomet diamond Wafering blade) a été utilisé pour réaliser les coupes. La vitesse de rotation était de 1500rpm et la vitesse d'avancement était de 1.7mm/min. Un système d'irrigation était couplé à la scie pour éviter d'abimer l'échantillon à cause de dégâts thermiques. Une fois la section de 400µm récupérée, l'échantillon a été repositionné dans le microtome afin de récupérer une nouvelle section pour l'histologie. Ces étapes ont ainsi été répétées jusqu'à la fin de l'échantillon. Cette méthode nous a permis d'obtenir de 2 à 4 sections de 400µm par régénérat osseux pour les essais d'indentation.

## 2. Histologie

### 2.1. Principe

Histologie signifie littéralement la science des tissus. Son terme vient des mots grecs « histos » pour tissu et « logos » pour science. Elle se base sur l'observation de la structure anatomique de type tissulaire. Le tissu étant caractérisé par un assemblage de cellules et de substance intercellulaire, elle permet de mettre en lien la composition d'un système biologique et sa fonction physiologique. L'histologie repose sur la coloration ou le marquage d'évènements spécifiques au sein d'un échantillon. Il est possible de diviser les analyses histologiques en cinq sous-catégories dépendantes du marqueur utilisé :

- Les colorations topographiques vont permettre de déterminer la structure, le type cellulaire ainsi que le nombre de cellules ;
- Les colorations histochimiques vont informer l'observateur sur la composition chimique cellulaire ;

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

- L'histoenzymologie, comme son nom l'indique, s'intéresse à l'activité enzymatique (catalyseurs chimiques) présente dans le système analysé afin de comprendre le métabolisme de celui-ci ;
- L'immunohistochimie est quant à elle beaucoup plus spécifique, puisqu'elle dépend de l'interaction anticorps (glycoprotéines) /antigène (protéine membranaire) couplée à un système révélateur.
- L'hybridation in situ qui est un marquage encore plus spécifique venant mettre en évidence des séquences d'acide nucléique de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou de l'acide ribonucléique (ARN).

Dans notre étude expérimentale, nous nous sommes orientés vers des colorations de type topographique.

## 2.2. Coloration topographique

Au sein de la littérature, une multitude de colorations possibles existe lors de l'analyse histologique du tissu osseux. Dans notre étude, nous nous sommes orientés vers une double coloration au Von Kossa et au bleu de toluidine pour analyser la formation osseuse. Ces deux colorations sont particulièrement utilisées dans des modèles de régénération osseuse comprenant des modèles de fracture [210,211], de défaut osseux [212–214] et de distraction ostéogénique [70,215,216].

La première coloration au Von Kossa nous a permis d'identifier et de quantifier les tissus minéralisés présents au sein du cal distracté. Ce marquage est basé sur la substitution du calcium lié aux phosphates par les ions d'argent au niveau des cristaux d'hydroxyapatite et est observé sous forme de dépôt d'argent métallique [217]. Les zones fortement minéralisées auront une couleur noirâtre.

La deuxième coloration que nous avons utilisée, le bleu de toluidine, permet notamment de caractériser le tissu cartilagineux. Son principe est basé sur l'effet métachromatique de ce tissu, c'est-à-dire que le colorant va en modifier la couleur naturelle en le rendant ici violet. Le bleu de toluidine est un colorant basique et peut donc fournir un électron. De son côté, le tissu cartilagineux est composé en partie de glycosaminoglycanes (GAG) qui sont polyanioniques, c'est-à-dire qu'ils sont chargés négativement et sont donc considérés comme un acide. C'est avec ce dernier que l'interaction se fera [135] et c'est par ces échanges d'ions que la coloration apparaîtra.



# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

## 2.3. Protocoles des colorations

Pour permettre la coloration finale (Von Kossa et bleu de toluidine), il est obligatoire de déplastifier les lames, c'est-à-dire de retirer la résine. Pour ce faire, les sections ont été immergées dans trois milieux : le premier incluant du 2-méthoxyéthylacetate pendant vingt minutes, le deuxième contenant de l'éthanol 70% pour cinq minutes et le dernier renfermant de l'éthanol 40% pour cinq minutes encore. Les sections ont finalement été réhydratées une dernière fois dans un bain d'eau déminéralisée. À la suite des colorations, chacune des sections a été de nouveau déshydratée, avant d'être montée dans un milieu de montage (Entellan, Merk Millipore) entre lame et lamelle. L'observation et la photographie des coupes histologiques ont été effectuées à l'aide d'un microscope photonique (lumière blanche) (Olympus BX40) à un grossissement x4.

## 3. La micro-indentation

### 3.1. Principe

La technique d'indentation instrumentée permet de caractériser localement les propriétés mécaniques d'un matériau. Cet outil a été largement utilisé depuis les années 1950 puisqu'il a permis l'exploration des propriétés mécaniques sur de nouvelles échelles [218]. En effet, bien que les caractérisations à l'échelle macroscopique de l'os étaient déjà établies grâce aux essais de flexion trois-points ou de traction, l'utilisation de l'indentation comme outil de recherche a permis d'analyser la microstructure osseuse ainsi que la nanostructure de manière indépendante. Pendant des essais macroscopiques, le tissu osseux est considéré comme un organe : les données des paramètres mécaniques obtenues reflètent donc une action globale des éléments le constituant. Mais avec la microindentation, l'os est considéré comme étant un tissu autorisant ainsi l'observation de l'hétérogénéité du milieu dans des cas pathologiques ou non. De plus, l'avantage d'utiliser cette technique est qu'à cette échelle les propriétés mécaniques ne sont pas affectées par la forme, la taille et la porosité du tissu osseux [219]. L'utilisation de capteurs haute-résolution présents au sein de la machine, que ce soit pour la force ou le déplacement, ont permis de caractériser les propriétés élasto-plastiques du matériel à l'échelle microscopique (tissulaire) voir nanoscopique (composant cellulaire).

Les systèmes d'indentation sont généralement constitués de trois sous-parties : un pénétrateur, un système d'application de force et un capteur mesurant le déplacement (conf. Fig. 45) [220]. Le pénétrateur est couplé à une pointe d'indentation (indent) et est relié à une colonne rigide à travers laquelle la force sera transmise. L'unité de chargement est généralement

## Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

actionnée soit par des bobines magnétiques, soit par des systèmes piézoélectriques ou électrostatiques. On retrouve également des ressorts de rappel et de maintien entourant la colonne qui assurent un déplacement perpendiculaire de cette dernière par rapport à la surface de l'échantillon. Enfin, le capteur de déplacement capacitif de l'indenteur permet d'enregistrer le déplacement de la colonne. L'échantillon, quant à lui, est monté sur un porte-échantillon autorisant des déplacements dans différentes directions. Par ailleurs, un microscope optique est habituellement couplé au système d'indentation pour permettre la localisation des futurs indents.

Le principe de cette méthode consiste en l'approche d'un indenteur, dont la géométrie est connue et supposée indéformable (généralement un diamant), sur la surface d'un matériau. Ensuite, l'indenteur est enfoncé dans le matériau à caractériser puis retiré. L'enregistrement constant et simultané de l'effort subi par la pointe ainsi que de son déplacement permet la sauvegarde du signal force-déplacement. À partir de ces courbes, il est alors possible de déterminer les propriétés matériaux. Il est intéressant de noter que le tissu osseux est considéré comme étant un matériau anisotrope, hétérogène, viscoélastique et poroélastique. C'est pourquoi, différents types de modèles analytiques ou numériques ont été développés et peuvent être utilisés pour caractériser le module d'Young ( $E$ ) et la dureté ( $H$ ) de l'os [219], celle-ci étant la résistance du matériau à la déformation plastique.

De plus, au cours d'un essai, il est possible de piloter l'indentation soit en charge, où l'on définit une charge maximale à atteindre, soit en déplacement, où cette fois on impose un déplacement maximal. Il est généralement établi que le pilotage se programme en charge pour les tissus durs (ex. : os cortical) et en déplacement pour les tissus mous (ex. : cartilage) [221]. Deux autres paramètres à prendre en compte sont le type et la taille de pointe utilisés pendant l'essai. On retrouve des indents de type sphérique, conique, mais le plus souvent utilisé reste

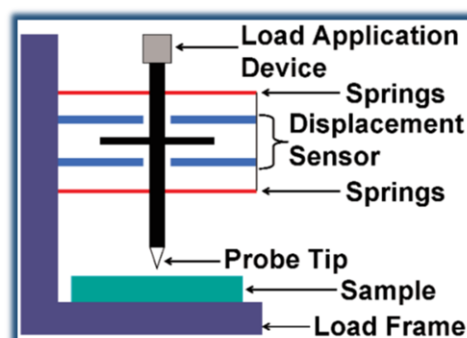


Figure 45 : Représentation schématique d'une machine d'indentation (VanLandingham, 2003). De haut en bas, on retrouve : le système d'application de force, le capteur de déplacement entouré des ressorts de rappels et de maintien de la colonne, la colonne d'indentation avec la pointe dirigée perpendiculairement à l'échantillon.

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

l'indent de forme pyramidale à trois côtés, le Berkovich. Le choix de l'indent est déterminé par l'objet d'étude et le modèle analytique utilisé. Les indentations avec une pointe de type Berkovich sur le tissu osseux entraînent une déformation plastique du matériau, alors l'utilisation du modèle d'Oliver et Pharr [222] ou des modèles viscoélastique-plastique tels que celui développé par Oyen et Cook [223] sont adaptés à ce type d'essais. En revanche, lors de la caractérisation de tissu mou, il est préférable d'utiliser des indenteurs de type sphérique et de grande taille pour éviter une pénétration dans le tissu [219,221].

Pour finir, il est important de contrôler l'environnement ainsi que le type d'échantillon à analyser puisque chacun de ces paramètres peut influencer la caractérisation des propriétés mécaniques (conf. Fig. 46-A). En fonction du type d'indent et de la profondeur d'indentation, les propriétés matériaux obtenues peuvent varier. Étant donné que le volume sollicité est différent [224], la réponse mécanique le sera également (conf. Fig. 46-B).

Zhang et al [225] ont montré expérimentalement et numériquement, que lors de l'application de forte charge (supérieure à 10mN), caractérisant ainsi le tissu à l'échelle microscopique et non nanoscopique, une diminution du module d'élasticité était perceptible. Cette étude a permis de mettre en évidence que la valeur de la charge appliquée, la surface de contact résultant ainsi que la zone de déformation plastique sont des paramètres influençant les valeurs du module d'Young. À l'inverse, pour ce qui est de la dureté, les variations de ces paramètres ne présentent aucune différence significative. Une corrélation négative entre l'aire de contact et le module d'élasticité semble se dessiner.

Le modèle utilisé pour les essais d'indentation est celui développé par Oliver et Pharr en 1992, permettant ainsi d'obtenir les propriétés élasto-plastique du tissu osseux en formation [222]. Leurs hypothèses de départ se basent sur le fait que la partie purement élastique se produit au début de la phase de déchargement et non pendant la phase de chargement. Les travaux

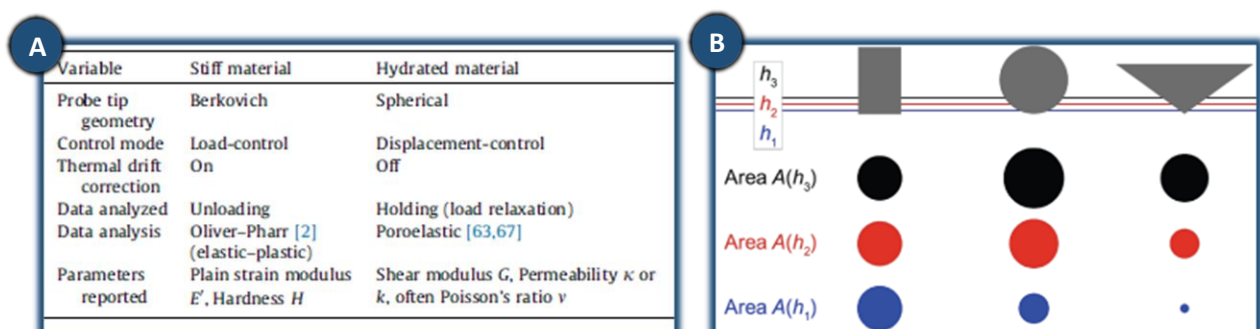


Figure 46 : Représentation des paramètres d'acquisition lors des essais d'indentation (M.L Oyen, 2015 et 2011). **A.** Détails des différents paramétrages et modèles en fonction du type de tissus caractérisés. **B.** Schéma de l'aire de contact de l'indenteur en fonction de la pénétration dans le tissu. À gauche un pénétrateur de type plat, au centre une pointe de type sphérique et à droite un indent de type Berkovich.

## Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

menés par Sneddon ont permis d'établir la relation entre la force, le déplacement et l'aire de contact [222]. Cette relation entre la force-déplacement en fonction de la géométrie de l'indenteur s'écrit de la manière suivante :

$$P = \alpha(h)^m$$

Avec P la force,  $\alpha$  et m des constantes dont m est fonction de la géométrie de l'indenteur et h le déplacement élastique de l'indenteur.

Oliver et Pharr ont constaté que l'empreinte laissée par l'indent avait la même forme que ce dernier et ils ont remarqué lors du déchargement une différence de profondeur entre l'empreinte finale et l'empreinte en cours de chargement (retour élastique). Ils ont pu réécrire l'équation de Sneddon, en choisissant d'approximer la courbe de déchargement via une régression par une courbe de puissance sur toute la courbe (conf. Fig .47-A) [226] :

$$P = \alpha(h - h_f)^m$$

Avec P la force,  $\alpha$  et m des constantes dont m est fonction de la géométrie de l'indenteur, h le déplacement élastique de l'indenteur, et  $h_f$  le déplacement final laissé par l'empreinte résiduelle.

Ensuite, ils se sont intéressés au calcul de la rigidité de contact lors du déchargement noté S. Ce dernier représente la résistance du matériau face à une charge appliquée. La rigidité de contact peut être calculée en traçant la pente de la première portion de la courbe de décharge à la charge maximale (conf. Fig .47-B) [222] :

$$S = m \times P_{max} \times (h_m - h_f)^{-1}$$

Avec S la rigidité de contact,  $P_{max}$  la force maximale,  $\alpha$  et m des constantes dont m est fonction de la géométrie de l'indenteur et  $h_m$  le déplacement maximal,  $h_f$  le déplacement final laissé par l'empreinte résiduelle.

Pour déterminer le module réduit, un dernier paramètre est nécessaire, celui de l'aire projetée de contact,  $A_p$ . Cette donnée est dépendante de la géométrie de l'indenteur et de la profondeur de contact  $h_c$ , qui représente la distance verticale où il y a contact entre le matériau testé et l'indenteur. Son expression est la suivante :

$$h_c = h_m - h_s$$

Où  $h_s$  représente le déplacement de la surface initiale au niveau du périmètre du contact par rapport à la surface initiale et  $h_m$  le déplacement maximal.

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

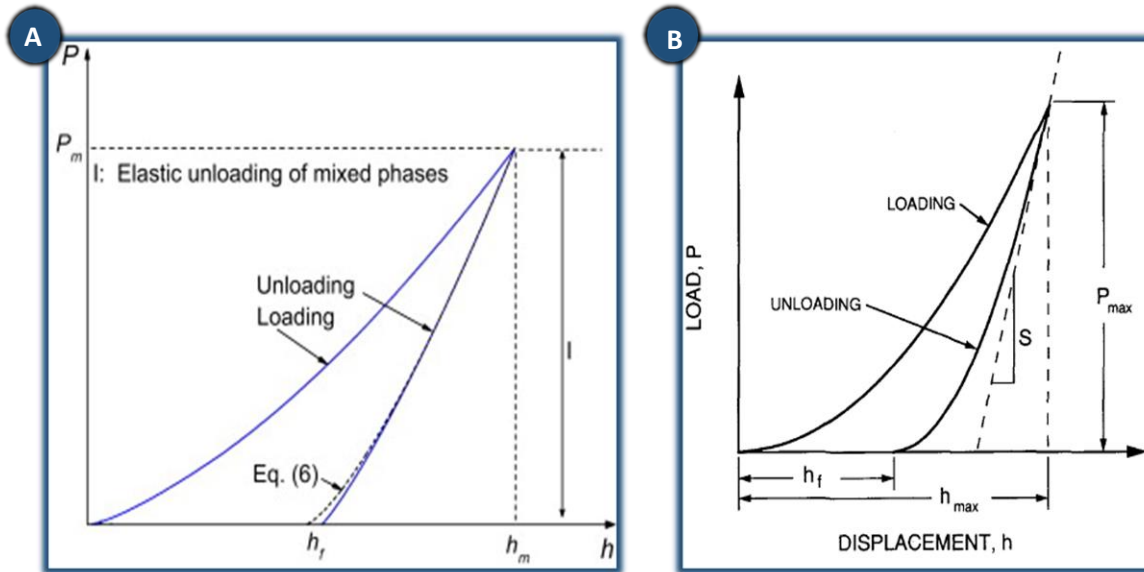


Figure 47 : Représentation des différents paramètres pour le calcul du module d'Young et de la dureté suivant le modèle d'Oliver et Pharr. **A.** Représentation d'une courbe force (P)-déplacement (h) lors d'un essai d'indentation. L'équation (6) du graphique modélise la courbe de régression pour le calcul de la force pendant la phase de décharge (Kan et al, 2013). **B.** Représentation de la tangente à la Force maximale permettant ainsi le calcul de la rigidité (Oliver et Pharr, 1992).

$P_{max}$  = Force maximale, S = rigidité,  $h_f$  = déplacement final,  $h_m$  = déplacement maximal de l'indenteur

Sur le graphique force-déplacement, celui-ci peut être détecté en prolongeant la tangente tracée préalablement pour la rigidité de contact avec l'axe de déplacement. Son expression s'écrit de la manière suivante :

$$h_s = \epsilon \frac{P_{max}}{S}$$

D'où

$$h_c = h_m - \epsilon \frac{P_{max}}{S}$$

Avec  $h_c$  la profondeur de contact,  $h_m$  le déplacement maximal,  $P_{max}$  la force maximale,  $\epsilon$  un paramètre dépendant de la géométrie de l'indenteur et S la rigidité de contact.

En supposant que l'indenteur est indéformable, le calcul de l'aire projetée de contact,  $A_p$ , à la force maximale se fait suivant la relation :

$$A_p = F(h_c)$$

Sachant que cette fonction doit être établie expérimentalement avant une analyse, pour une pointe de type Berkovich dont la géométrie est parfaite cette dernière vaut  $A_p = 24.5h_c^2$

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

Grâce à l'ensemble des équations précédentes, le module réduit  $E_r$  a été déterminé comme étant :

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi} S}{2\beta \sqrt{A_p}}$$

Avec  $S$  la rigidité de contact,  $A_p$  l'aire projetée de contact et  $\beta$  un facteur de correction sans dimension qui prend en compte la non-axisymétrie de l'indenteur. Pour un indent de type Berkovich, il est évalué à 1.034 [226].

Le module d'élasticité de l'échantillon peut être finalement déterminé comme étant égal à :

$$\frac{1}{E_r} = \frac{(1 - \nu_s^2)}{E_s} + \frac{(1 - \nu_i^2)}{E_i}$$

Avec  $E_r$  le module réduit,  $E_i$  le module d'élasticité de l'indenteur et  $\nu_i$  le coefficient de Poisson de l'indenteur. On retrouve  $E_s$  le module d'élasticité de l'échantillon ainsi que  $\nu_s$ , le coefficient de Poisson de l'échantillon.

En plus du calcul du module d'élasticité, il est possible de déterminer la dureté du matériau, notée  $H$ . Cette dernière peut être définie comme étant la pression moyenne que le matériau peut supporter lorsqu'il est chargé. Elle est exprimée selon l'équation suivante :

$$H = \frac{P_{max}}{A_p}$$

Avec  $A_p$  l'aire projetée de contact à la force maximale et  $P_{max}$  la force maximale.

Cette approche développée par Oliver et Pharr est utilisée pour la caractérisation des matériaux de l'ingénierie ainsi que les matériaux biologiques considérés comme étant durs (minéralisés).

## 3.2. Protocole d'acquisition des données

Les sections de 400 $\mu$ m des cals distractés ont été collées sur des lamelles en verre et polis afin d'obtenir une surface plane. Cette étape est importante, car une rugosité trop élevée peut entraîner des biais dans la mesure des paramètres mécaniques. Il est donc habituel d'effectuer un polissage de type miroir afin de pouvoir être garant du parallélisme de la surface lors de l'indentation. C'est pourquoi les coupes ont été polies à l'aide d'une machine de polissage ESC-200-GTL (ESCIL<sup>®</sup>, Chassieu, France) en utilisant différents disques dont la granulométrie était successivement diminuée (600, 1200, 2500 grains /cm<sup>2</sup>). Tout au long du polissage, un système d'irrigation était actionné afin d'évacuer les débris produits et éviter ainsi

## Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

l'endommagement des coupes dû à l'échauffement thermique. Par la suite, un polissage plus fin a été réalisé via l'utilisation de suspensions diamantées. En tout, trois tailles de particules (3, 1 et 0.25 $\mu\text{m}$ ) ont été appliquées de manière successive. Il est important de préciser qu'entre chaque étape de polissage, les échantillons ont été nettoyés à l'aide de bains à ultrasons de cinq minutes. Une fois le polissage effectué, son analyse était faite grâce au microscope optique installé sur la machine d'indentation. Si nécessaire, la dernière étape de polissage utilisant une solution diamantée de 0.25 $\mu\text{m}$  était répétée.

Les essais de micro-indentation ont été réalisés à l'aide d'un indenteur NHT<sup>2</sup> (Anton Paar<sup>®</sup>, Suisse et Autriche) préalablement placé sur une table antivibratoire. Une pointe de type Berkovich en diamant de 120nm de diamètre a été utilisée. Son module d'élasticité est de 1141GPa et le coefficient de Poisson de 0.07. Le système utilisé était monté avec un microscope optique à haute résolution permettant ainsi de positionner la pointe de l'indenteur avec précision sur les tissus d'intérêt tout en évitant la porosité osseuse ou la présence de cellules ostéogéniques. En amont de chaque série de tests, une calibration a été effectuée sur un échantillon de référence en silice fondue. Les valeurs moyennes obtenues étaient de  $71.3 \pm 1.6$  GPa, sachant que les données de référence étaient de 72 GPa. Le profil de chargement appliqué était représenté par une courbe trapézoïdale (conf. Fig. 48-A) [219]. En effet, le cycle d'indentation était composé de trois phases dont une mise en charge de l'échantillon à une vitesse de chargement constant de 50mN/min jusqu'à l'atteinte d'une charge maximale de 25mN. S'ensuit une phase de maintien de 30s dont le but est de minimiser les effets de fluage [227] et une phase de décharge à une vitesse de 50mN/min également. Lors de nos essais, la charge appliquée de 25mN correspondait à un déplacement de 1.5 $\mu\text{m}$  à 3 $\mu\text{m}$  en fonction de la structure caractérisée. Cette valeur de chargement nous permettait de caractériser des surfaces minéralisées peu étendues, tout en limitant les effets de rugosité dus à un probable non-parallélisme de la surface (conf. Fig. 48-D).

De plus, les modules d'élasticité ont été calculés grâce à la méthode développée par Oliver et Pharr. Pour ce faire, nous avons utilisé la portion entre 98% et 40% de la force maximale de la courbe de déchargement pour la régression. Cette portion correspondait aux valeurs fournies par défaut par le constructeur de micro-indenteur (conf. Fig. 48-B).

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

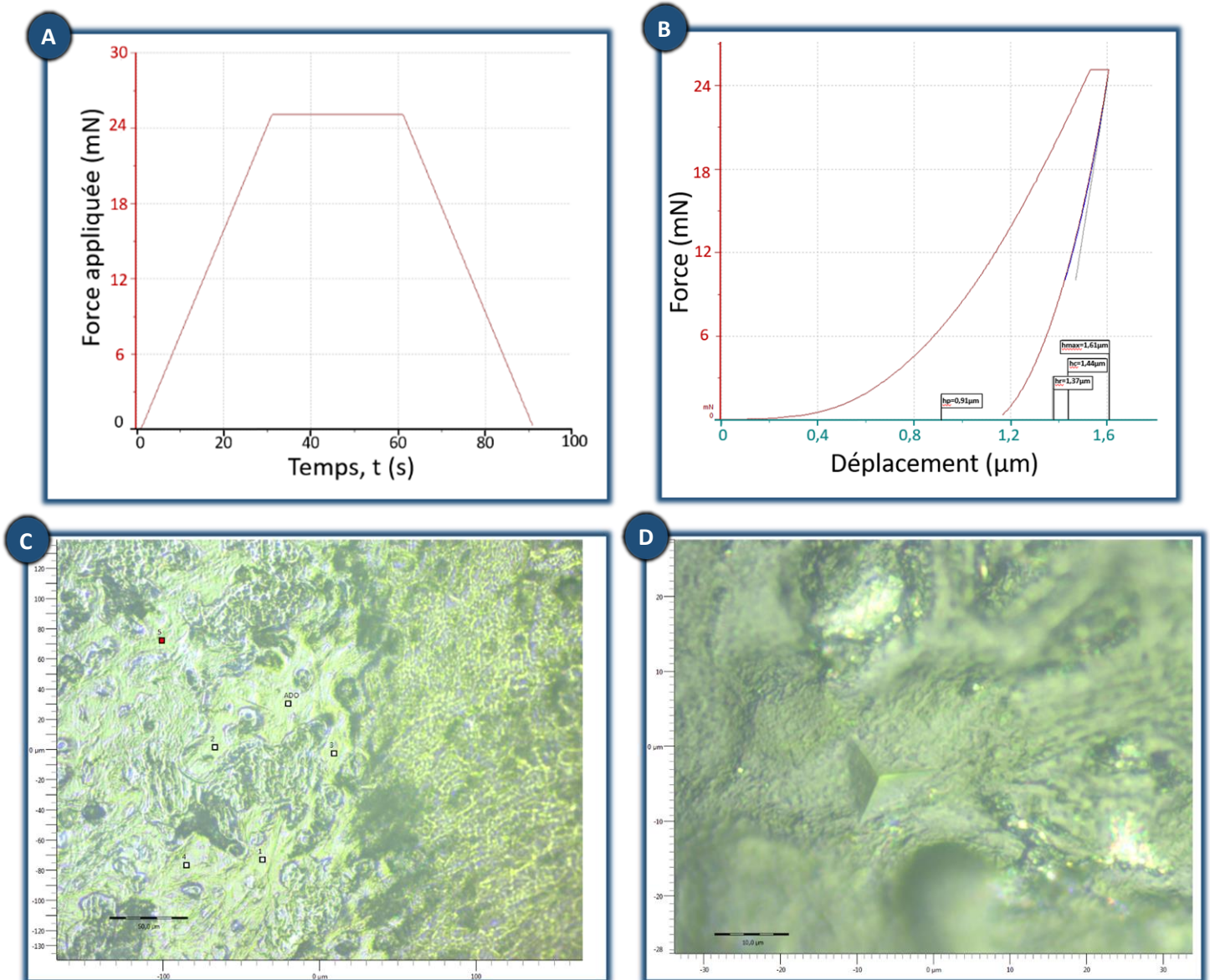


Figure 48 : Illustration du protocole d'acquisition de micro-indentation. **A.** Profil trapézoïdal utilisé lors des essais d'indentation. Avec une phase de chargement jusqu'à la force maximale de 25mN, un temps de pause de 30 secondes et la phase de déchargement. La vitesse de chargement et de déchargement durait 30 secondes. **B.** Graphique force-déplacement obtenu à la suite d'un essai d'indentation. Sur la courbe de déchargement, la plage de données sélectionnées pour les calculs des paramètres mécaniques est représentée en bleu. **C.** Photographie d'une zone d'indentation à un grossissement x4. On observe un profil de minéralisation hétérogène au niveau de l'os trabéculaire en formation. Les points représentent les zones d'indentation futures. **D.** Représentation photographique d'un indenteur après essais, le protocole développé a permis d'indenter dans de petites zones minéralisées sans être perturbée par la présence de cellules ou de porosité.

## 3.3. Région d'intérêt

Plusieurs matrices d'indentation ont été préalablement définies afin de permettre une caractérisation spatiale du régénérat osseux distracté. Cinq régions d'intérêt (ROI) ont été délimitées (conf. Fig. 49 et tableau 3). La première permet de caractériser l'os cortical natif (C) et est composée de deux matrices de 6\*6 indents. Les indentations ont été effectuées de chaque côté du régénérat osseux (proximal et distal). Ensuite, deux régions ont été délimitées permettant ainsi de caractériser la formation du cal périosté dans sa globalité. Ces régions ont



# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

été sous-divisées en quatre zones afin d'obtenir une caractérisation du côté proximal en médial et latéral, ainsi que du côté distal en médial et latéral également. La zone P1, est la proche des corticales natives et est formée d'une matrice de 3\*6\*5, c'est-à-dire qu'une cellule correspond à 5 indents, en tout 3 lignes de 6 cellules ont été effectuées. Pour la zone P2, qui représente une région plus centrale du cal périosté, une matrice de 5\*4\*5 indents a été déterminée. Enfin, deux autres régions, représentant le cal endosté, ont été définies au centre des corticales natives. La première partie correspond à la zone EC1 et représente la zone de formation des microcolonnes au sein du régénérat osseux. Une matrice de 5\*5\*5 indents a permis sa caractérisation. La dernière zone du cal endosté est définie par la zone EC2 et caractérise la zone inter fibreuse (ZIF) du régénérat osseux présenté dans le chapitre 1. Une matrice 3\*6\*5 y a été appliquée.

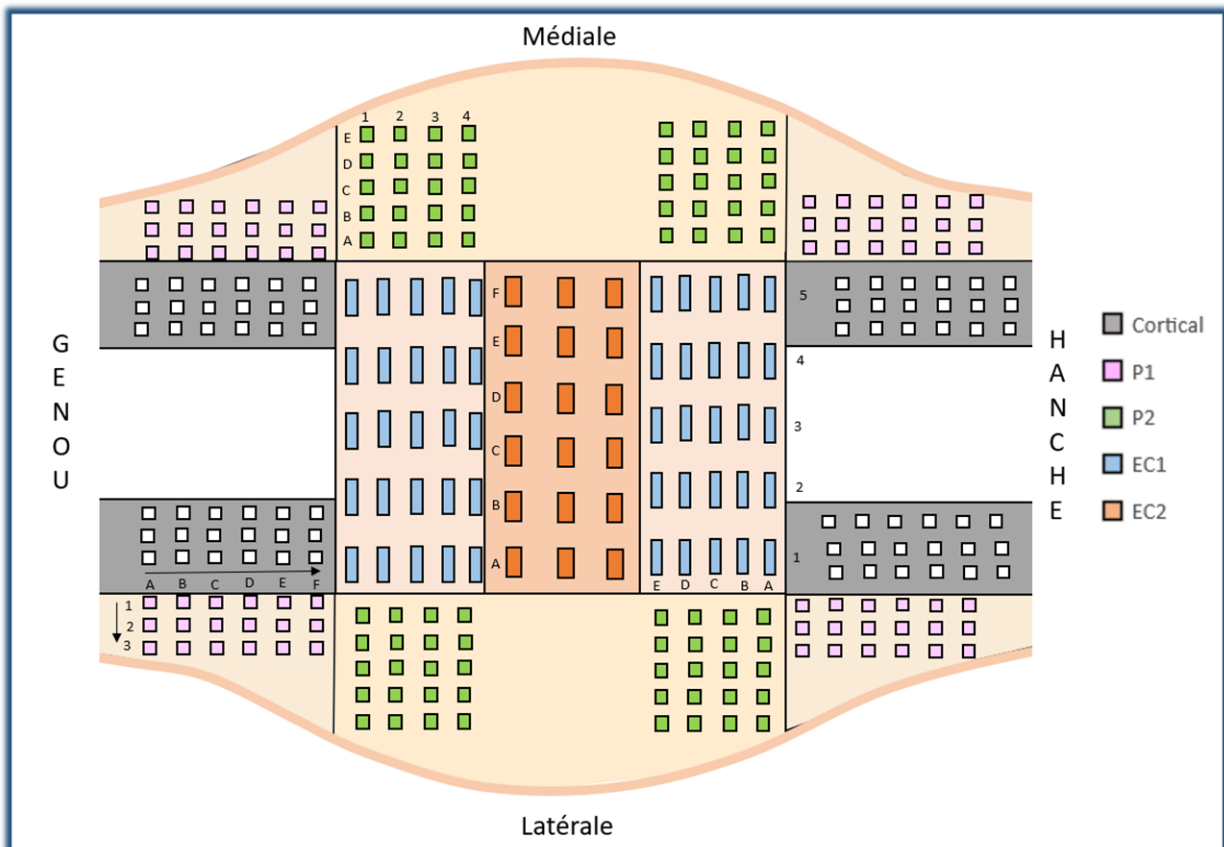


Figure 49 : représentation des différentes zones d'indentation effectuées sur chaque section. Chaque carré correspond à une matrice de 5 indents.

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

Tableau 3 : Matrice d'indentation effectuée sur les coupes des régénérats osseux distractés.

Zones	Dimension ( $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ )	Matrix (L*C*I)	Indentation	Heures
P-GM	300 × 300	3*6*5	90	5
P-GL	300 × 300	3*6*5	90	5
P-HM	300 × 300	3*6*5	90	5
P-HL	300 × 300	3*6*5	90	5
P2-GM	300 × 300	5*4*5	100	5.5
P2-GL	300 × 300	5*4*5	100	5.5
P2-HM	300 × 300	5*4*5	100	5.5
P2-HL	300 × 300	5*4*5	100	5.5
EC1-G	400 × 500	5*5*5	125	7
EC2	500 × 600	3*6*5	90	5
EC1-H	400 × 500	5*5*5	125	7
C1	140 × 65	6*6	36	2
C2	140 × 65	6*6	36	2

L'espace entre les indents était de 30 $\mu\text{m}$  sauf pour la zone corticale C1 et C2 dont l'espace était de 65 $\mu\text{m}$ .

## 3.4. Traitement des données

Les variations du module d'élasticité (E) et de la dureté (H) de l'os trabéculaire en formation, du cartilage calcifié et du tissu cortical natif en fonction des zones d'indentation ont été déterminées pour analyser les variations temporelles au sein du régénérat osseux. Le coefficient de Poisson utilisé était de 0.3 pour le calcul du module d'Young. De plus, l'analyse de l'os trabéculaire en formation au sein des différents ROI a permis d'observer l'hétérogénéité des propriétés mécaniques de la structure permettant ainsi d'établir une caractérisation spatiale des propriétés mécaniques du régénérat osseux.

Le nombre de points par matrice étant dépendant de la structure du cal osseux (conf. Tableau 4) et toutes les matrices d'indentation présentées dans la figure 49 n'ont pu être réalisées. En tout, quatre sections provenant de deux animaux ont été utilisées pour les essais d'indentation à deux semaines. Pour la caractérisation à quatre semaines, cinq lames provenant de deux rats différents ont été indentées. Enfin, deux lames provenant du même animal ont été utilisées pour caractériser la consolidation osseuse à six semaines.

De plus, les indents dont le module d'Young correspondait à 2 GPa ont été considérés comme non valides. En effet, la résine a été caractérisée au long des essais et cette dernière obtenait un module d'Young de 1.8 GPa ( $\pm 0.5$ ).

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

Tableau 4 : Représentation des zones d'indentations au sein de chaque coupe

Zones	2 Semaines		2 Semaines		4 Semaines			4 Semaines		6 Semaines	
	3	4	2	3	1	2	3	3	4	3	4
P1-GM											
P1-GL											
P1-HM											
P1-HL											
P2-GM											
P2-GL											
P2-HM											
P2-HL											
EC1-G											
EC2											
EC1-H											
C1											
C2											
Cartilage											

Zone vérifiée avec histologie : en gris zones présentes sur la coupe histologique, en bleu zone absente et en vert, zone présente en histologie, mais qui n'a pu être caractérisée par l'indentation, car le tissu trabéculaire en formation était trop éloigné du ROI imposé.

Au sein des ROI suivants : P1, P2, EC1 et EC2, les propriétés mécaniques obtenues correspondaient à celle du tissu osseux trabéculaire en formation uniquement. Les zones présentant du cartilage calcifié étaient disposées de manière aléatoire et ne représentaient qu'une faible surface minéralisée. En tout, 40 points ont été enregistrés pour les régénérats à deux semaines et 40 points pour les régénérats récupérés à 4 semaines. Pour le régénérat de 6 semaines la surface du cartilage calcifié était peu présente et, lorsqu'il y en avait, la surface n'était pas suffisamment large pour permettre une indentation. C'est pourquoi les comparaisons temporelles des propriétés mécaniques du tissu cartilagineux calcifié n'ont été établies qu'entre les données obtenues à 2 et à 4 semaines.

## 4. Statistiques

L'ensemble des données obtenues pour la quantification des paramètres mécaniques est exprimé en moyenne avec l'écart-type de ces dernières. Des tests de normalité ont été effectués sur les données. Pour ce faire, un test de Shapiro-Wilk a été appliqué à l'ensemble de nos données. Étant donné le non-respect de la normalité, nous nous sommes orientés vers des tests non paramétriques. Nous avons sélectionné le test de Kruskal-Wallis pour permettre les comparaisons multiples entre plusieurs paramètres indépendants. Si ce dernier obtenait une p-

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

value inférieure à 0.05, alors des comparaisons multiples par paires étaient effectuées à l'aide du test de Dunn. Cependant, pour les données du cartilage calcifié un test de Mann-Whitney a été appliqué. Les différences étaient considérées comme significatives à partir d'une p-value de 0.05 peu importe le test statistique appliqué. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel XLSTAT.

## III. Résultats

### 1. Évolution temporelle des tissus minéralisés du régénérat distracté

Les matrices d'indentation pour caractériser le tissu osseux cortical natif ont présenté des différences significatives en fonction du temps pour le module d'Young (E) et la dureté (H) (conf. Fig. 50). Les valeurs moyennes du module d'élasticité étaient de 15 GPa ( $\pm 3$ ), 16.2 GPa ( $\pm 2$ ) et 14.3 GPa ( $\pm 3$ ) pour les régénérats à 2, 4 et 6 semaines respectivement. L'ensemble des valeurs moyennes obtenues à 4 semaines était significativement différent de celles atteintes aux deux autres temps ( $p < 0.0001$ ). Pour les paramètres de dureté (H), les valeurs moyennes étaient de 0.775 GPa ( $\pm 0.14$ ) à deux semaines de consolidation, de 0.771 GPa ( $\pm 0.27$ ) à quatre semaines et de 0.732 GPa ( $\pm 0.12$ ) à six semaines de consolidation. Les paramètres de dureté ont également montré une différence significative à deux semaines de consolidation comparée aux autres temps ( $p < 0.01$ ). Il est intéressant de constater que les données moyennes obtenues pour la dureté et le module d'élasticité par l'os cortical natif sont significativement différentes des valeurs moyennes analysées dans toutes les zones et ce à tous les temps ( $p < 0.0001$ ).

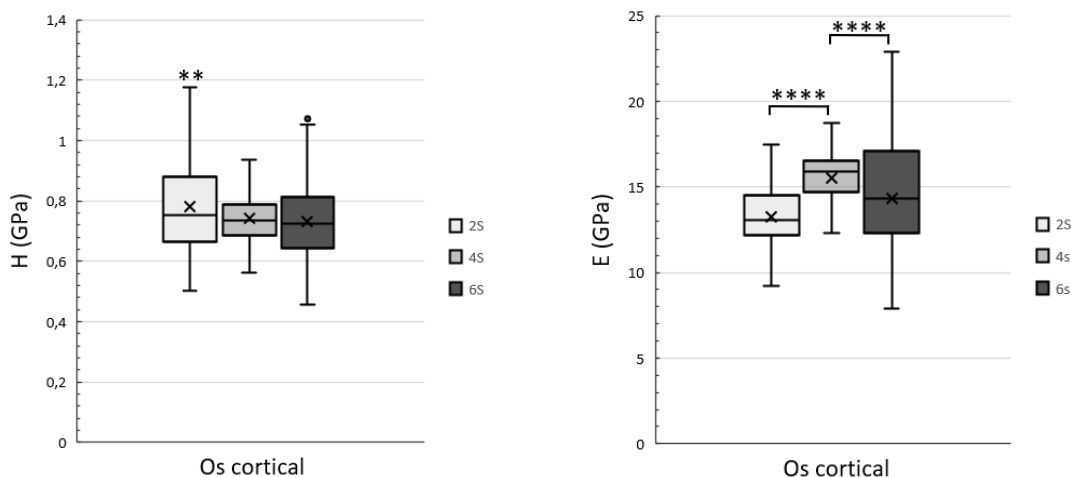


Figure 50 : Graphique représentant les variations temporelles du tissu osseux cortical natif à travers les semaines de consolidation. À gauche H représente la dureté du matériau (GPa) et à droite les données obtenues pour le module d'élasticité (E) en GPa également. S= semaines. \*\* $p < 0.01$  et \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

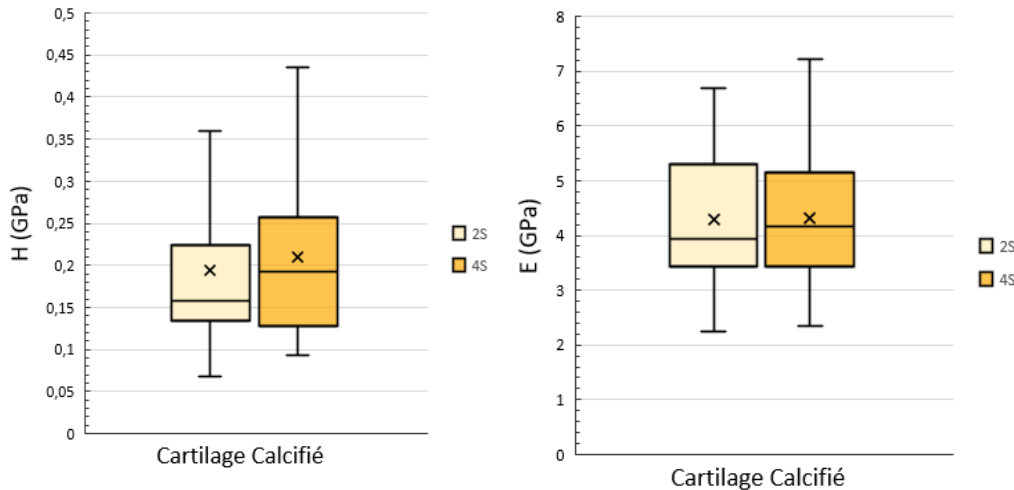


Figure 51 : Graphique représentant la dureté (H) et le module d'élasticité (E) du cartilage calcifié à 2 semaines (2S) et 4 semaines (4S) de consolidation.

Concernant les propriétés mécaniques du cartilage calcifié obtenues à 2 et 4 semaines de consolidation, aucune différence significative n'a été observée au cours du temps, que ce soit pour la dureté ou le module d'élasticité (conf. Fig. 51). Les valeurs moyennes de ce tissu étaient de 4.3 GPa ( $\pm 0.1$ ) et de 4.3 GPa ( $\pm 1$ ) pour le module d'Young et de 0.194 GPa ( $\pm 0.09$ ) et de 0.209 GPa ( $\pm 0.09$ ) pour la dureté à deux et quatre semaines de consolidation.

Les propriétés mécaniques de l'os lamellaire en formation ont été étudiées au sein de différentes régions du régénérat osseux et à différents temps. L'ensemble des régions ont montré des différences significatives au cours du temps. Dans la zone P1 caractérisant le cal périosté, le profil d'évolution des propriétés mécaniques de la dureté et du module d'élasticité sont similaires (conf. Fig. 52). Les valeurs moyennes ont augmenté significativement pendant la période de consolidation passant de 8.2 GPa ( $\pm 3$ ) à 11.5 GPa ( $\pm 4$ ) pour le module d'élasticité entre deux semaines et six semaines de consolidation ( $p < 0.0001$ ). Concernant la dureté, les valeurs moyennes à deux semaines étaient de 0.457 GPa ( $\pm 0.2$ ) alors qu'à six semaines elles correspondaient à 0.526 GPa ( $\pm 0.23$ ) ( $p < 0.0001$ ). Cependant, il est intéressant de noter la présence d'un pic significatif à 4 semaines pour les paramètres de dureté et du module d'élasticité. En effet, les valeurs moyennes atteintes à 4 semaines étaient de 12.7 GPa ( $\pm 4$ ) pour le module d'Young et de 0.585 GPa ( $\pm 0.168$ ) pour la dureté. Ces données étaient statistiquement différentes de celles obtenues à deux semaines et à six semaines ( $p < 0.0001$ ).

La seconde zone, P2, caractérisant la formation du cal périosté, se situe de part et d'autre du cal endosté. Les propriétés mécaniques du tissu osseux lamellaire en formation au sein de cette zone ont évolué positivement avec le temps (conf. Fig. 52). C'est-à-dire que les données obtenues étaient plus élevées à six semaines de consolidation qu'à deux semaines de

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

consolidation. Pour le module d'élasticité, on remarque une différence significative à deux semaines de consolidation par rapport aux autres temps ( $p < 0.0001$ ). Les données moyennes étaient de 7.4 GPa ( $\pm 3$ ) à deux semaines de consolidation et sont passées à 11.9 GPa ( $\pm 3$ ) et 12.3 GPa ( $\pm 3$ ) pour les semaines quatre et six respectivement. Par ailleurs, il est intéressant de stipuler qu'il n'y a pas eu d'évolution des paramètres mécaniques entre 4 et 6 semaines de consolidation. Concernant les valeurs moyennes de dureté, on remarque une augmentation constante de cette dernière jusqu'à 6 semaines de consolidation. En effet, les données obtenues à six semaines de consolidation sont significativement différentes des données obtenues à deux ( $p < 0.0001$ ) et quatre ( $p < 0.01$ ) semaines de consolidation.

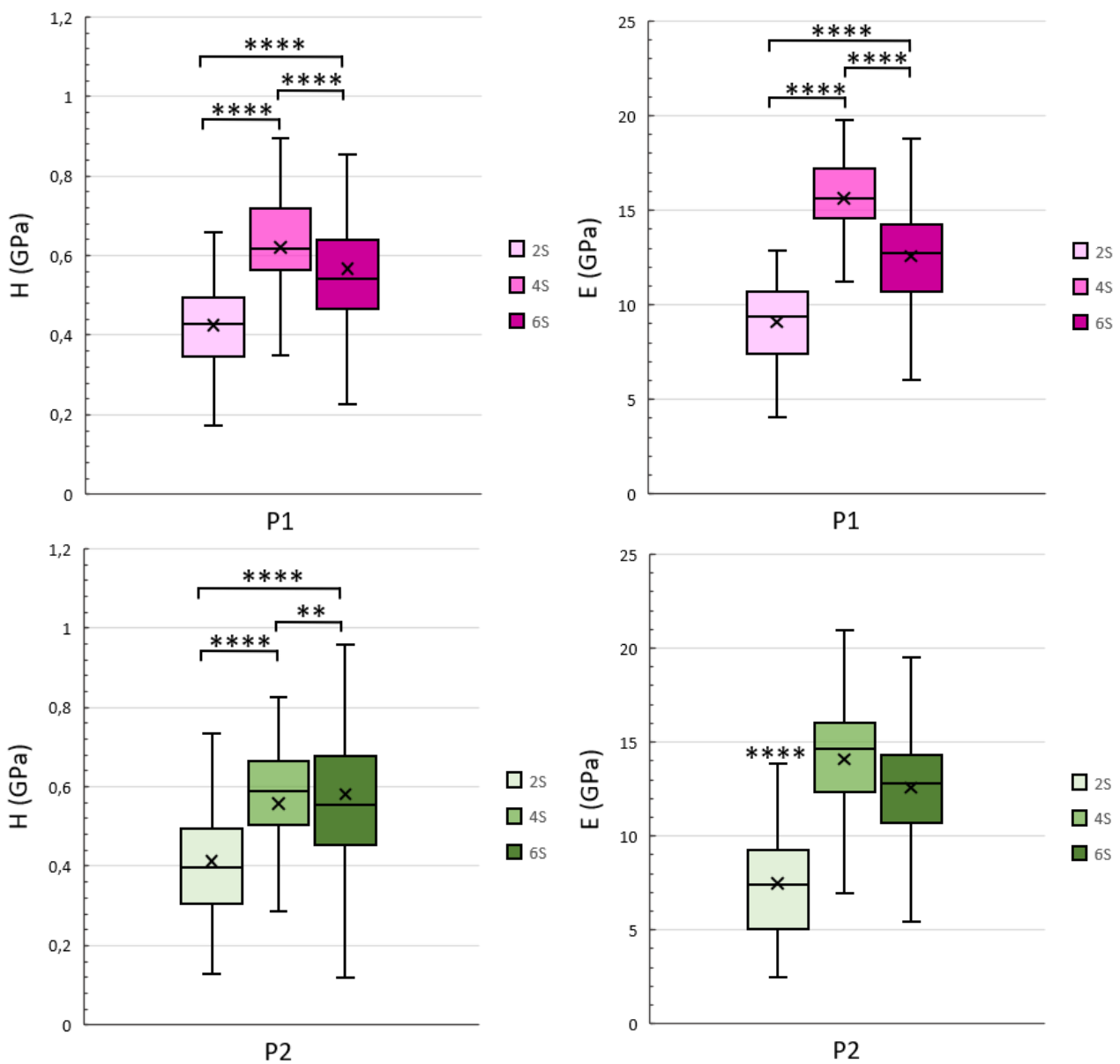


Figure 52 : Evolution des propriétés mécaniques du tissu osseux trabéculaire du cal périosté au cours de la phase de consolidation lors de la DO. A gauche, les données de dureté (H, en GPa) y sont représentées. A droite, on retrouve les valeurs obtenues pour le module d'élasticité (E, en GPa). En haut les informations de la zone P1 et en bas celle de la zone P2. S= semaines. \*\* $p < 0.01$  et \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

Dans les zones EC1 et EC2, qui correspondent au cal endosté du régénérat distracté, on remarque que les propriétés mécaniques du tissu évoluent au cours du temps (conf. Fig. 53). Dans la zone EC1, qui représente la zone de formation des microcolonnes du régénérat, le profil d'évolution des paramètres de dureté et du module d'élasticité sont similaires à ceux observés dans la zone P1. On constate que les valeurs moyennes augmentent avec le temps et la présence d'un pic significatif à quatre semaines de consolidation ( $p < 0.0001$ ). Pour le module d'élasticité, les valeurs moyennes de l'os trabéculaire en formation sont de 7.6 GPa ( $\pm 3$ ), suivies d'une augmentation significative à quatre semaines atteignant ainsi une valeur moyenne de 12.6 GPa

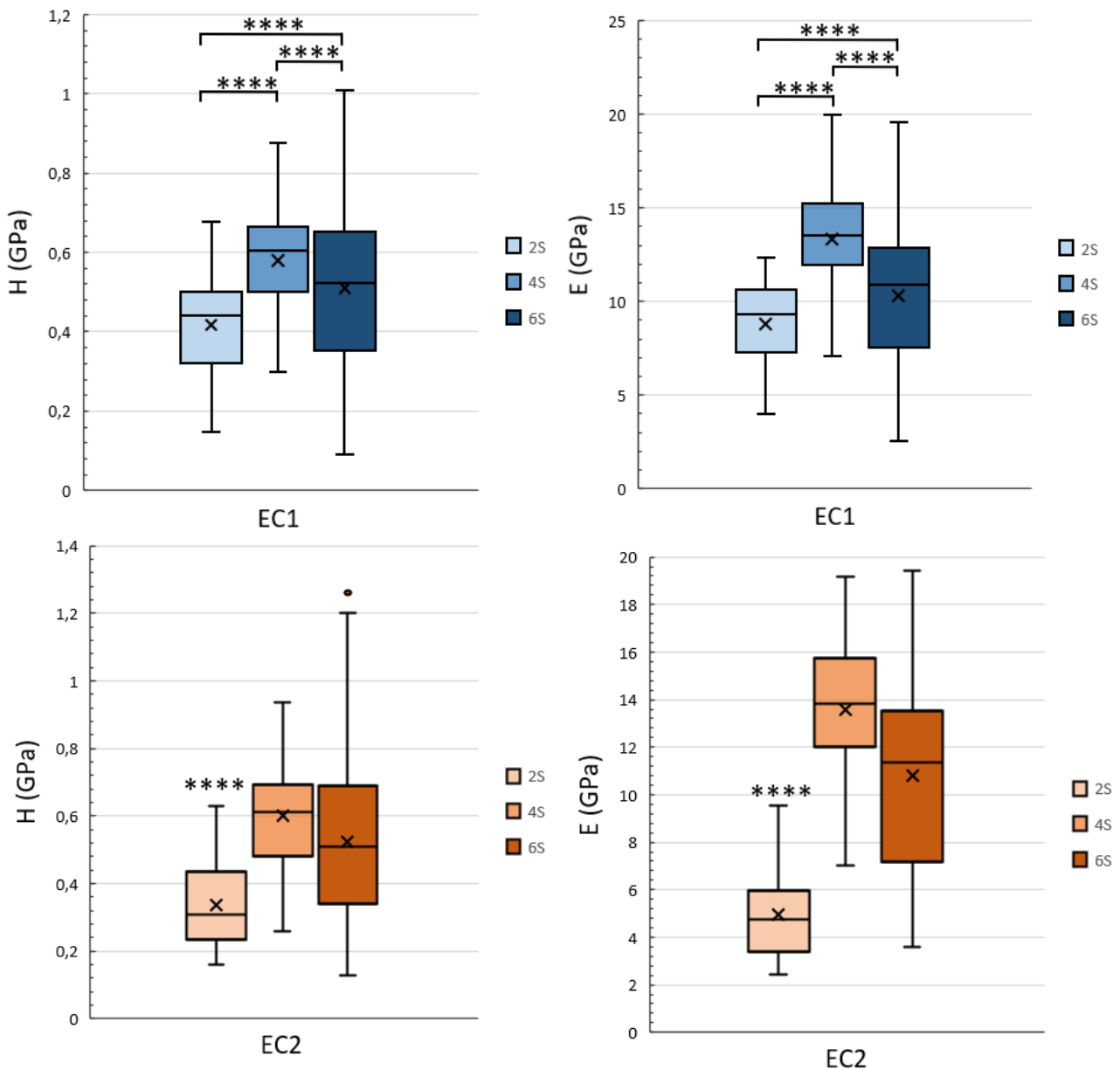


Figure 53 : Graphiques des données de dureté (H) et des modules d'élasticité (E) du tissu trabéculaire en formation du au sein du régénérat distracté. En haut, représentent les valeurs obtenues dans le cal endosté au niveau de la zone de formation des micro-colonne (proche des corticales natives). En bas sont présentées, les données de la zone inter-fibreuse (zone centrale) du cal endosté. S= semaines. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

( $\pm 3$ ) ( $p < 0.0001$ ). Par la suite, la valeur moyenne du module d'Young diminue pour atteindre 10.4 GPa ( $\pm 4$ ), donnée significativement différente par rapport aux données obtenues à deux semaines de consolidation ( $p < 0.001$ ). Pour les données de dureté, on constate une augmentation continue des valeurs moyennes au cours du temps allant de 0.404 GPa ( $\pm 0.13$ ) à 0.511 GPa ( $\pm 0.23$ ) pour deux et six semaines de consolidation respectivement, avec également un pic significatif à quatre semaines de consolidation (0.576 GPa  $\pm 0.3$ ) par rapport aux deux autres temps d'analyse ( $p < 0.0001$ ). Dans la zone EC2, zone la plus centrale, les paramètres mécaniques pour le module d'Young augmentent significativement par rapport à deux semaines de consolidation puis atteignent un plateau entre 4 et 6 semaines de consolidation que ce soit pour la dureté ou le module d'élasticité ( $p < 0.0001$ ). En effet, les données obtenues à deux semaines de consolidation sont de 5.7 GPa ( $\pm 3$ ) et de 0.368 GPa ( $\pm 0.15$ ) pour le module d'élasticité et la dureté respectivement. Tandis que les données obtenues à 4 et 6 semaines pour la dureté sont de 0.528 GPa ( $\pm 0.19$ ) et 0.524 GPa ( $\pm 2.5$ ) et pour le module d'Young, les valeurs moyennes obtenues sont de 11.5 GPa ( $\pm 4$ ) et 10.8 GPa ( $\pm 4$ ).

## 2. Évolution spatiale du tissu lamellaire en formation du cal distracté

Les variations des paramètres mécaniques du tissu osseux lamellaire en formation ont pu être analysées parmi les différentes ROI du cal osseux : P1, P2, EC1 et EC2 (conf. Fig. 54). Concernant l'évolution du module d'élasticité pour les diverses zones à différents temps, on remarque qu'à deux semaines de consolidation, l'ensemble des valeurs moyennes obtenues dans les zones P2, EC1 et EC2 sont homogènes et aucune différence significative n'est perceptible. Les moyennes du module d'élasticité sont de 7.4 GPa ( $\pm 3$ ), 7.7 GPa ( $\pm 3$ ) et 5.7 GPa ( $\pm 3$ ) respectivement. En revanche, on constate qu'au centre du régénérat osseux (EC2), la valeur moyenne obtenue pour le module d'élasticité est significativement différente par rapport à la zone P1 (8.2 GPa  $\pm 3$ ) ( $p < 0.0001$ ). Ensuite, à 4 semaines, les données récupérées ont permis de mettre en lumière des valeurs moyennes significativement différentes des zones P1 et EC1 par rapport aux zones P2 et EC2 ( $p < 0.0001$ ). En effet, l'os trabéculaire formé au sein des zones P1 et EC1 obtient des valeurs moyennes de module d'Young de 12.71 GPa ( $\pm 3.6$ ) et de 12.6 GPa ( $\pm 3$ ) contre 12 GPa ( $\pm 3$ ) et 11.5 GPa ( $\pm 4$ ) pour les zones P2 et EC2 respectivement. Après six semaines de consolidation, les différences significatives concernant l'os lamellaire en formation se situent entre le cal périosté et le cal endosté. Aucune différence significative n'est percevable entre la zone P1 et P2. En revanche, la zone P1 est significativement différente de la zone EC1 ( $p < 0.0001$ ). Pour la zone P2, une valeur moyenne du module d'élasticité (12.3



## Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

GPa  $\pm$  3) était significativement différente comparée aux zones EC1 et EC2 dont les moyennes respectives sont de 10.4 GPa ( $\pm$  4) ( $p < 0.0001$ ) et de 10.8 GPa ( $\pm$  4) ( $p < 0.01$ ).

À propos des paramètres mécaniques de la dureté observés à deux semaines de consolidation, on constate que l'ensemble des régions P1, EC1 et EC2 sont homogènes vis-à-vis de leurs valeurs moyennes obtenues avec 0.456 GPa ( $\pm$  0.19), 0.404 GPa ( $\pm$  0.13), 0.368 GPa ( $\pm$  0.15) respectivement. Cependant, une différence significative entre P1 et P2 est présente au sein du cal périosté ( $p < 0.001$ ). Ensuite, à quatre semaines de consolidation, nous faisons le même constat que pour les données obtenues pour le module d'élasticité au même temps. On remarque, la présence d'une différence significative entre les zones P1 et EC1 comparées aux deux autres zones plus centrales (P2 et EC2). En effet, la valeur moyenne de P1 est statistiquement différente des valeurs moyennes obtenues en P2 ( $0.549 \pm 0.16$ ) ( $p < 0.0001$ ) et dans la zone EC2 ( $0.528 \pm 0.19$ ) ( $p < 0.001$ ).

Pour les données moyennes en dureté obtenues dans la zone EC1, on constate le même profil de différenciation que pour la zone P1 précédemment décrite : une différence significative du paramètre de dureté est présente par rapport à P2 ( $p = 0.001$ ) et EC2 ( $p < 0.001$ ). Enfin, après six semaines de consolidation, les données obtenues pour la dureté sont plus élevées au niveau de la zone P2 avec une différence significative par rapport à la zone P1 ( $p < 0.0001$ ) et à la zone EC1 ( $p < 0.0001$ ). Les moyennes obtenues pour la zone P2 sont de  $0.597 \text{ GPa} \pm 0.22$  alors que pour les zones EC1 et P1 les valeurs moyennes sont de  $0.511 \text{ GPa} \pm 0.24$  et de  $0.525 \text{ GPa} \pm 0.24$ , respectivement.

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

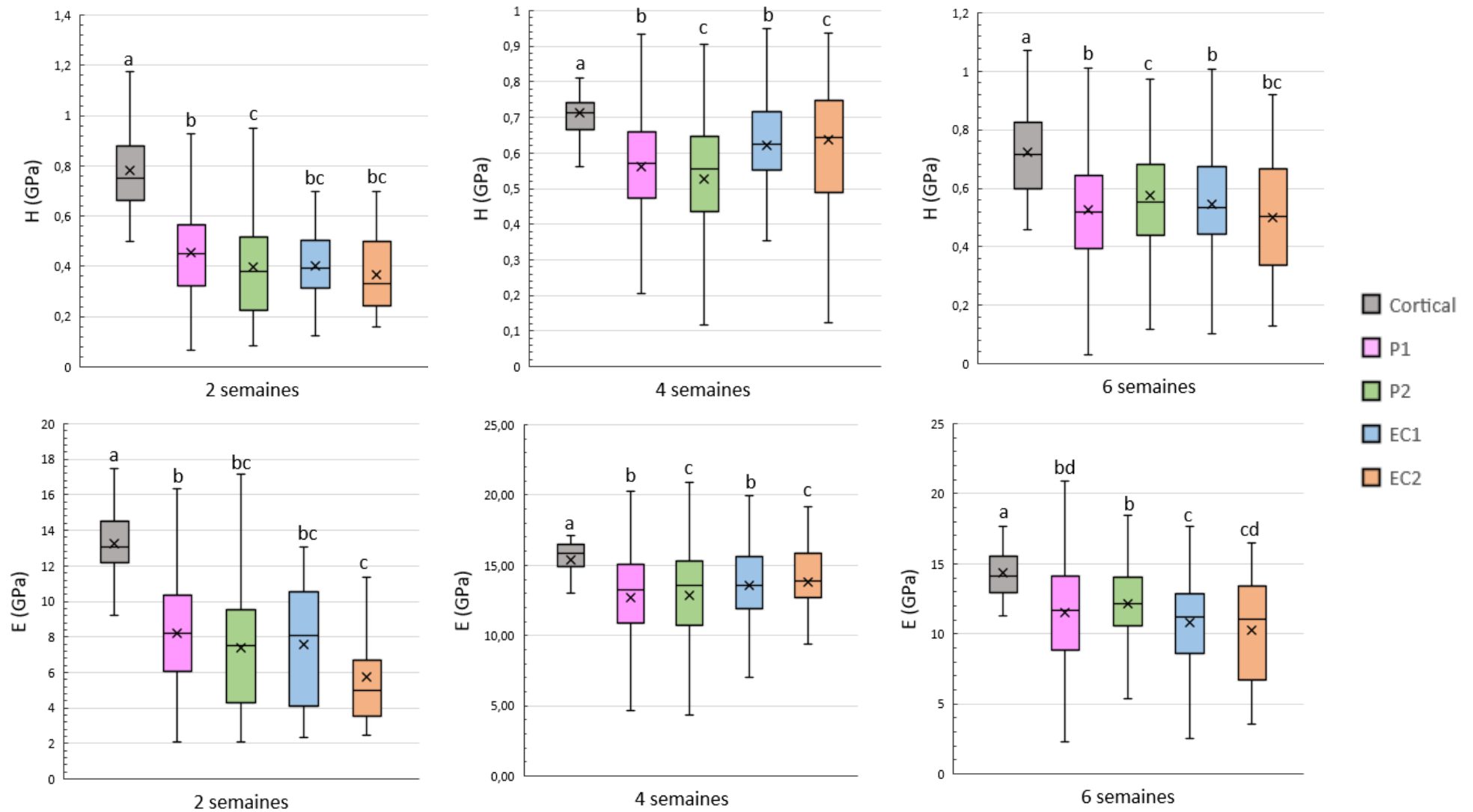


Figure 54 : Graphique illustrant les variations spatiales des propriétés mécaniques au sein du régénérat osseux. En haut sont représentées les données de dureté (H) et en bas les valeurs moyennes du module d'élasticité (E). Concernant, les différences significatives, la convention veut que si deux moyennes partagent une même lettre alors elles ne sont pas significativement différentes l'un de l'autre.

# Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

## IV. Discussion

Les propriétés matériaux à l'échelle microscopique des tissus minéralisés au sein du régénérat osseux sont un facteur primordial dans la réponse mécanique de la structure à l'échelle macroscopique. En effet, l'augmentation des propriétés élastique (module d'élasticité) et plastique (dureté) obtenues localement permet d'expliquer l'augmentation de la rigidité globale de la structure osseuse nouvellement formée au cours de la distraction ostéogénique. C'est pourquoi le but de cette étude était de caractériser localement les propriétés du tissu cartilagineux et du tissu osseux lamellaire en formation du régénérat osseux à la suite d'un allongement osseux. Cette étude a permis plus particulièrement d'observer les variations spatiales et temporelles du tissu osseux lamellaire en formation.

Les valeurs moyennes du module d'élasticité pour le tissu cortical étaient comprises entre 14-16.5 GPa. Ces données sont en accord avec celles trouvées dans la littérature dont les protocoles expérimentaux sont similaires au nôtre comprenant des fémurs de rat imbibés dans de la résine (MMA), des indentations suivant l'axe longitudinal et une caractérisation des propriétés mécaniques via le modèle d'Oliver et Pharr [228]. Il est intéressant de noter que tout au long du protocole les paramètres mécaniques du tissu cortical mesurés en dureté ou en rigidité (par le module d'élasticité) étaient significativement différents des tissus présents au sein du gap, montrant ainsi que le phénomène de régénération au cours de la distraction est un processus long. Mora-Macías et al [64], ont d'ailleurs analysé l'évolution des propriétés mécaniques du tissu osseux lamellaire en formation dans un modèle de transport osseux chez le mouton. Ils ont constaté qu'après 504 jours de consolidation, le module réduit ( $E_r$ ) ne représentait que 75% de la valeur de l'os cortical natif. Il est important de préciser que le module réduit ( $E_r$ ) représente le module d'élasticité obtenu sans inclure les paramètres du coefficient de Poisson ( $\nu$ ) du matériau caractérisé, qui représente le rapport entre le rétrécissement transversal relatif et le rétrécissement longitudinal relatif. Dans la littérature, ce coefficient est compris entre -1 (matériau auxétique) et 0.5 (matériau parfaitement incompressible). Pour le tissu osseux, il est de convention de définir un coefficient de 0.3 [218,229].

Les propriétés mécaniques du tissu trabéculaire en formation, ont été quant à elles analysées dans des modèles de régénération fracturaire au niveau du cal périosté [227] et au sein du régénérat distracté [64]. Ces deux études ont utilisé un modèle de mouton. Manjubala et al [227] ont obtenu des données moyennes de module réduit ( $E_r$ ) d'os en formation qui oscillaient entre 5 et 14 GPa avec un coefficient de variation allant de 30% à 60%. Concernant

## Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

l'étude de Mora-Macia et al [64], les valeurs moyennes des modules d'élasticité caractérisés étaient comprises entre 4-18GPa avec un coefficient de variation de 18% à 60%. Les valeurs moyennes de module d'Young reportées dans cette étude sont similaires à celles observées dans la littérature, avec des valeurs allant de 6 GPa à 13 GPa pour un coefficient de variation compris entre 25 et 46%. Les coefficients de variation permettent de mettre en lumière l'hétérogénéité des propriétés mécaniques que ce soit pour la dureté ou la rigidité et donc indirectement de la minéralisation du tissu en formation. En effet, pour induire la minéralisation du tissu, il faut dans un premier temps l'apposition de la MEC puis la calcification de cette dernière. Le processus par lequel se déroule cette minéralisation est régi par un phénomène de nucléation hétérogène. De premiers dépôts de minéraux vont apparaître grâce à la transformation de solution liquide, ayant une forte concentration en ions calcium et phosphate, en phase solide et formant ainsi des cristaux d'hydroxyapatite. Ensuite, ces premiers dépôts vont servir de site de nucléation pour la formation d'autres cristaux. On parle alors de nucléation secondaire [230]. Les variations présentes reflètent le mode de nucléation hétérogène du tissu osseux en formation.

Le cartilage calcifié à l'inverse de l'os trabéculaire en formation ne présente aucune variation de ses propriétés mécaniques dans le temps. De plus, aucune étude à l'heure actuelle ne s'est intéressée à la caractérisation de ce tissu minéralisé pendant les processus de régénération osseuse. Les comparaisons avec la littérature ont donc été orientées vers des analyses du cartilage calcifié présent au sein du cartilage articulaire chez le rat. Dans notre étude, les données observées du module d'élasticité à l'échelle microscopique sont de 4 GPa en moyenne. Hargrave-Thomas et al [231] ont mesuré des valeurs de module d'Young entre 3 et 6 GPa. Nos valeurs sont donc en lien avec celles observées dans la littérature. Cependant, d'autres études ont observé des ilots de calcifications au sein du tissu cortical chez le rat [232,233]. Shipov et al [232] ont caractérisé mécaniquement ce tissu et les valeurs obtenues étaient en moyenne de 33.4 GPa pour le module d'Young. Il est possible que ces variations obtenues soient dues à la différence des paramètres du protocole d'expérimentation. En effet, la localisation du tissu est distincte, l'un dans du cartilage articulaire et l'autre au sein du tissu osseux et il est donc possible que la formation du cartilage calcifié soit potentiellement différente. La caractérisation pour Hargrave-Thomas et al [231], tout comme dans notre étude, a été réalisée suivant l'axe longitudinal alors que Shipov et al [232] ont caractérisé ce matériau sur des sections transverses. De plus, Zhang et al [225] ont montré que la charge appliquée lors des essais d'indentation permettait de caractériser soit l'échelle nanoscopique soit l'échelle

## Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

microscopique. Étant donné que la charge maximale était de 5mN pour l'étude menée par Shipov et al [232] et que dans notre protocole la charge maximale appliquée était de 25mN. La caractérisation effectuée dans les deux études ne semble pas analyser la même échelle d'observation. Enfin, la présence du cartilage calcifié est transitoire lors de la formation osseuse, ce qui fait que le processus de minéralisation est peut-être différent dans la création de cristaux d'hydroxyapatite. Il serait intéressant d'approfondir ces résultats en caractérisant via le même protocole d'indentation ces trois zones distinctes où le cartilage calcifié semble être présent.

Le tissu osseux lamellaire en formation a été analysé au sein de quatre zones distinctes dont deux caractérisaient la formation du cal périosté et deux permettaient de montrer la formation du cal endosté. Cette étude nous a permis d'analyser les variations spatiales des propriétés mécaniques de ce tissu au cours du temps. Les propriétés mécaniques obtenues à deux semaines montrent une certaine homogénéité des valeurs moyennes des paramètres de dureté et de rigidité au niveau du cal endosté. En revanche, une différence significative présente dans la zone P1 du cal périosté par rapport aux valeurs moyennes de la région centrale fibreuse met en lumière le processus naturel de formation osseuse observé lors de la DO. En effet, au sein de la littérature, il a été décrit que le processus de formation du régénérat débute par une ossification des zones proches des corticales natives pour ensuite minéraliser le centre de celui-ci [91,101,166]. De plus, il est intéressant de noter que le module d'élasticité est dépendant de deux paramètres : la composition organique de la MEC et le contenu minéral présent [227]. Ainsi nos résultats montrent à travers une rigidité plus élevée dans la zone P1 que la formation du cal périosté est à un stade plus avancé que le reste du cal. Par ailleurs, cette même tendance est perçue lors de l'analyse des paramètres de dureté où l'on constate une homogénéité au sein du régénérat osseux sauf entre la zone P1 et P2. Sachant que dans le profil naturel de formation, la zone du cal périosté s'étend de la corticale native vers le côté opposé, la présence de cette différence dans les propriétés mécaniques du tissu analysé semble cohérente avec la littérature [75,101,166]. Après quatre semaines de consolidation, cette idée de formation centripète et donc débutant des corticales natives vers le centre du régénérat osseux, se renforce. On remarque ainsi que les zones P1 et EC1, toutes deux proches des corticales natives, ont des paramètres de dureté et des modules d'élasticité plus importants que le reste des zones. Tout ceci renforce l'idée que la consolidation débute par la minéralisation de la zone appelée « zone de formation des microcolonnes » avant de minéraliser la zone centrale lors de la consolidation pendant la DO. La stratégie mise en place par le système osseux revient à augmenter en priorité

## Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

la rigidité et la résistance mécanique des zones proches des corticales natives pour ensuite graduellement augmenter l'ensemble des propriétés mécaniques des tissus présents dans des zones plus centrales. Enfin, à 6 semaines de consolidation, les propriétés mécaniques obtenues dans le cal périosté sont redevenues supérieures comparées à celles du cal endosté. Ceci est en lien avec le processus de régénération osseuse, qui tend vers la formation d'un os de type cortical en périphérie du régénérat osseux [234]. Le cal périosté au sein de ce modèle de régénération montre une augmentation de la rigidité et de la résistance du tissu au centre du cal périosté (zone P2).

Un second aspect a été analysé dans cette expérimentation : l'évolution du tissu trabéculaire au sein de chaque zone de manière dépendante au facteur temps. Dans chacune des zones, on remarque que les propriétés mécaniques du tissu osseux en formation augmentent avec le temps que ce soit pour la dureté ou le module d'élasticité. Il est intéressant de constater que les profils d'évolution des zones P1 et EC1 sont similaires avec une augmentation atteignant un pic à quatre semaines par rapport à deux semaines puis une diminution de la résistance et de la rigidité du matériau. Néanmoins, ces paramètres restent plus élevés qu'à deux semaines de consolidation. Cette différence significative perçue à 4 semaines de consolidation semble provenir de l'étendue du tissu minéralisé à quatre et à six semaines. En effet, l'apposition du tissu osseux ainsi que la minéralisation de celui-ci a continué pendant cet intervalle, ce qui fait qu'à six semaines, la structure osseuse est composée de tissu plus jeune et donc moins minéralisé qu'à quatre semaines, mais avec une étendue plus importante. Les histogrammes de fréquence (conf. Annexe chap. 3) ont révélé que les distributions de fréquences les plus élevées sont comprises entre 10 et 16 GPa pour les indents effectués à quatre semaines et à six semaines dans la zone P1. Cependant, à six semaines de consolidation, la borne incluant la plus grande fréquence des valeurs de module d'Young est celle de 10 à 12 GPa (23% des données) alors qu'à quatre semaines, c'est la borne incluant les valeurs de 14 à 16 GPa pour le module d'Young qui est la plus élevée (26%). Pour la dureté, le même constat peut être établi. La majorité des données obtenues à quatre et six semaines oscillent entre 0.4 et 0.8 GPa. Néanmoins, 43 % des valeurs obtenues en dureté étaient comprises entre 0.4 et 0.6 GPa alors que pour les données à quatre semaines ces dernières comprenaient des valeurs entre 0.6 et 0.8 GPa. Concernant la zone EC1, la majorité des données pour le module d'Young à quatre et six semaines sont comprises au sein de deux bornes : 12-14 GPa, représentant 26% et 22% des données à 4 et 6 semaines et 10-12 GPa, correspondant à 21% et 22% des données à quatre et six semaines respectivement. Mais la différence observée vient du fait que 17% des données à

## Chapitre 3 : Caractérisation de l'os en formation

six semaines comprennent des valeurs de module d'Young entre 8-10 GPa alors que pour les données obtenues à quatre semaines, 20% des valeurs sont comprises entre 14-16 GPa. Concernant les valeurs moyennes de dureté obtenues, la distribution oscille entre 0.2 et 0.8 GPa, avec des fréquences similaires entre les deux groupes. La différence provient du fait qu'à six semaines, la borne 0-0.2 obtient une fréquence de données plus élevée que celle à quatre semaines. Ici, l'hétérogénéité du tissu osseux lamellaire en formation a pu être mise en évidence.

En parallèle, les profils des propriétés mécaniques des tissus caractérisés dans les zones P2 et EC2 sont également similaires les uns par rapport aux autres, avec une augmentation de la rigidité et de la résistance mécanique du tissu par rapport à deux semaines de consolidation. Nous pouvons supposer que ces deux profils d'évolution reflètent le processus de formation osseuse au cours du protocole d'allongement. En effet, les zones P1 et EC1 sont les zones les plus proches de la corticale native et sont les premières régions à être consolidées. Ce n'est qu'à des temps plus tardifs que les zones centrales du régénérat osseux, désignées par les zones P2 et EC2 dans cette étude, seront consolidées.

L'ensemble des résultats récoltés lors de cette étude enrichit la compréhension du processus de régénération d'un point de vue mécanique. Néanmoins, des limites restent présentes concernant le modèle d'analyse utilisé. En effet, le modèle d'analyse utilisé est celui développé par Oliver et Pharr, ce qui suggère que les tissus présents au sein du régénérat ont un comportement purement élastique. Or, les tissus minéralisés peuvent exprimer des comportements viscoélastiques. Le choix d'utiliser le modèle d'Oliver et Pharr vient du fait qu'il est le plus utilisé dans la littérature, ce qui facilite les comparaisons. De plus, les effets viscoélastiques des tissus minéralisés sont moins importants dans les tissus durs que lors de la caractérisation des tissus mous [64]. Néanmoins, l'application d'une méthode caractérisant les propriétés viscoélastiques permettrait l'estimation de la contribution élastique, plastique et visqueuse du matériel de l'os [219].

Cette étude est une première approche puisque c'est la première fois que les variations temporelles et spatiales des propriétés mécaniques au sein du cal distracté ont été caractérisées. Enfin, le nombre d'animaux pourrait être plus conséquent et une évaluation de périodes plus tardives du processus de consolidation pourrait être intéressante.

## V. Conclusion

En conclusion, cette étude a montré que les propriétés mécaniques de l'os lamellaire en formation au sein du régénérat osseux augmentent avec le temps. Le régénérat osseux comprend des zones dont les propriétés mécaniques sont différentes, mettant ainsi en lumière les variations des paramètres mécaniques d'un point de vue spatial. Les tissus au sein de ses diverses zones évoluent également en fonction du temps. Cette étude a permis de caractériser le processus de consolidation d'un point de vue purement mécanique, pour autant les profils d'évolution observés sont en lien avec les profils biologiques constatés dans la littérature. De plus, l'ensemble de ces données est une source importante d'informations pour les modélisations du processus de régénération. Actuellement, la plupart des modèles considèrent le tissu osseux en formation comme étant homogène. Or, ici, il a été montré qu'il existe une hétérogénéité de ce tissu en tout point, de manière interne, temporelle et spatiale. Il serait donc judicieux d'implémenter ces informations via la création de maillages hétérogènes dans les modèles éléments finis. Une amélioration des modèles permettrait d'optimiser la phase de pré-test animal et ainsi de participer à la diminution du nombre d'animaux utilisés en préclinique. Enfin, ces données sont nécessaires à la compréhension du processus de régénération. En caractérisant de manière précise les matériaux présents, une réflexion plus précise sur l'amélioration du processus de régénération osseuse de manière générale de la DO pourra être menée.



# Chapitre 4 : Amélioration du processus de régénération osseuse au cours de la DO

## I. Introduction

Le processus de distraction ostéogénique peut entraîner diverses complications liées à la longue durée du traitement, à une mauvaise formation du régénérat osseux (pseudarthrose et retard de consolidation) ou à la survenue de fracture lors du retrait du fixateur. Ce sont ces problématiques qui ont poussé les chercheurs et les médecins à promouvoir des stratégies thérapeutiques afin de stimuler les processus de régénération osseuse. Bien que différentes stratégies aient été analysées, il semble qu'à l'heure actuelle aucune ne permette une résolution satisfaisante à cette problématique d'optimisation [132]. Les premiers types de stratégies portent sur la stimulation mécanique, soit acoustique par l'utilisation d'ultrasons [235–237], soit par l'ajout de force de compression au cours du processus de distraction. C'est ce qu'on appelle la technique de l'accordéon [79,100,238]. Lors de la phase de distraction un roulement entre force de traction et force de compression va être appliqué au régénérat osseux pour stimuler mécaniquement la régénération osseuse. Néanmoins, cette technique rallonge la durée du protocole et est peu étudiée.

Un deuxième type de stratégies consiste à appliquer des facteurs de croissance soit pour stimuler la vascularisation via des injections de VEGF [68] par exemple, soit pour stimuler l'ostéogénèse. Le facteur le plus sollicité est celui appartenant à la super famille des TGF- $\beta$ , les BMP et plus particulièrement BMP-2 [128,239–241]. Cependant, son application clinique reste limitée du fait qu'il est rapidement métabolisé par le foie lors de son application systémique. Concernant son application locale, les limites proviennent de sa courte présence au sein des tissus et de la nécessité de la présence d'un certain nombre de cellules répondantes sur le lieu de diffusion [68]. Ceci induit l'application de fortes doses ainsi qu'un coût financier non négligeable. Sans compter les effets secondaires liés à son application.

Une autre stratégie mise en place est l'utilisation de la thérapie cellulaire via l'injection de CSM de manière systémique ou localement et/ou via la diffusion émise d'un biomatériau [36,137,139]. Les études cliniques ont démontré l'absence d'effet toxique notoire chez l'homme lors de l'utilisation de CSM, qui est considéré comme un produit sûr pour la FDA [35]. Malheureusement, la majorité des études précliniques comprennent des études à court terme ce qui rend impossible la caractérisation des effets négatifs à long terme [35]. Ces risques

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

se basent sur leur potentiel de différenciation ainsi que leurs propriétés immunosuppressives. Ces dernières peuvent induire des risques non négligeables *in vivo*. En effet, il est possible à la suite d'une injection de rendre le patient immunodéprimé augmentant ainsi le risque d'infection et/ou l'apparition de tumeur [35,242].

À la suite de cette analyse, notre stratégie mise en place est l'utilisation d'un facteur de croissance dont l'application en Europe est déjà autorisée par une validation de l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché). Cette validation est nécessaire pour les médicaments dits biosimilaires. Parmi les quatre substances actives autorisées en Europe, nous avons choisi le G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor). En effet, ce facteur de croissance est déjà utilisé dans la stimulation de progéniteur hématopoïétique. De ce fait, ses caractéristiques physico-chimiques et son impact sur le système biologique sont suffisamment connus notamment au niveau de sa toxicité et de ses effets secondaires. De plus, les effets bénéfiques sur le processus de régénération ont déjà été étudiés dans des cas de déficit vasculaire ou ostéogénique. Donc, à l'inverse des autres facteurs de croissance, le G-CSF semble avoir un double effet sur la vascularisation et l'ostéogenèse, deux processus qui travaillent en synergie lors de la régénération osseuse. Par ailleurs, comparé à l'utilisation de BMP-2, le G-CSF stimulerait également la production de ce dernier par les CSM au niveau cellulaire par une régulation positive de l'ARNm de BMP-2 [243]. Enfin, si les données sont suffisamment concluantes, son extension d'application au domaine de la chirurgie orthopédique sera plus facilement réalisable et rapide qu'un facteur soluble.

## 1. Le G-CSF

### 1.1. Généralités

Le G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) est une cytokine appartenant à la famille des facteurs de croissance hématopoïétique. Cette glycoprotéine a comme fonction principale de participer à la formation des cellules hématopoïétiques en stimulant de manière générale leur production et plus particulièrement la production de neutrophile mature [244]. Ce facteur de croissance a comme récepteur le G-CSFR. Bien que dans des conditions physiologiques normales, son taux de concentration dans le sang soit faible, cette cytokine joue un rôle primordial dans la défense immunitaire de l'organisme et plus particulièrement dans les processus infectieux, grâce à une augmentation très rapide de son taux de concentration en cas d'infection, pour plus tard revenir à un taux de concentration basale [244]. En outre, Lieschke et al [245] ont montré dans un modèle de souris déficiente en G-CSF (G-CSF<sup>-/-</sup>) le

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

développement d'une neutropénie chronique sévère. Ils ont observé qu'à la suite de quatre jours consécutifs d'injections de G-CSF, le déficit pouvait être inversé. Au sein du corps humain, un ensemble de tissus et plus particulièrement de cellules sont capables de sécréter du G-CSF sous certaines conditions, via par exemple la stimulation par des médiateurs de l'inflammation (VEGF, TNF- $\alpha$ ...). Parmi elles, on retrouve les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales (peau) et les monocytes [244,246]

## 1.2. Application Clinique

L'implication du génie biologique a permis la création d'un recombinant humain du G-CSF. Actuellement, en France, selon l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé), plusieurs formes sont autorisées : le Neupogen<sup>®</sup>, l'Accofil<sup>®</sup>, le Grastofil<sup>®</sup>, le Filgrastin hexal<sup>®</sup>, le Nivestim<sup>®</sup>, le Ratiograstim<sup>®</sup>, le Tevagrastim<sup>®</sup> et le Zarzio<sup>®</sup>. Ces produits ont été utilisés dans un premier temps pour réduire les neutropénies induites lors de traitements par chimiothérapie ou lors d'apparition d'infections chez des patients atteints de cancer. En effet, avant leur utilisation, le personnel médical était obligé de diminuer les doses voire de reporter les séances de chimiothérapie. Aujourd'hui, grâce à une administration quotidienne de cette cytokine pour les patients suivant cette thérapie, on observe une diminution de la durée de la neutropénie, du nombre d'infections, ainsi qu'une meilleure dose-intensité théorique, ce qui entraîne une diminution de la durée des hospitalisations [247]. Dans le monde médical, l'utilisation du G-CSF s'est ensuite étendue aux traitements de neutropénies chroniques graves (idiopathiques, congénitales ou cycliques), de l'anémie aplastique et de la neutropénie néonatale [244,248].

De plus, le G-CSF est utilisé chez des patients sains (non pathologiques) puisqu'il agit comme un agent mobilisant dans un cadre allogénique. En effet, il est également efficace dans la mobilisation en grand nombre de cellules souches/progénitrices autologues pour des transplantations de moelle osseuse chez de patients neutropéniques. Cette technique est devenue une alternative à l'aspiration de moelle osseuse au niveau de la crête pelvienne permettant ainsi d'éviter une chirurgie sous anesthésie générale [244,248,249]. Pour se faire, une administration du G-CSF est effectuée sur une durée de 4 à 5 jours pour induire une mobilisation [249], à partir de cette date les cellules commencent à être récupérées via une technique de prélèvement appelée apherèse. C'est un système qui autorise la séparation des composants sanguins par un système de centrifugation. Une fois les cellules d'intérêt récoltées, le reste est réinjecté au patient ou donneur. Concernant le protocole d'application clinique, grâce à des études et notamment à l'analyse d'effets secondaires possibles, les doses cliniques habituellement

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

administrées oscillent entre 5 et 10 $\mu$ g par kilogramme par jour ( $\mu$ g/kg/j) sur une période généralement comprise entre 5 à 10 jours [55]. De surcroît, le G-CSF est administré sous forme systémique via des injections en sous-cutanée ou en intraveineuse. Enfin, la demi-vie du facteur de croissance est dépendante de plusieurs paramètres notamment de la dose, c'est pourquoi son effet peut varier de 30 minutes à 9h. Crobu et al [250] ont analysé la demi-vie du Neupogen<sup>®</sup> et du BK0023<sup>®</sup>, deux recombinants du G-CSF chez le rat. Ils ont recensé des variations du temps de demi-vie en fonction de l'état pathologique des animaux (sains vs neutropéniques) et de la concentration du G-CSF (10, 30, 100 $\mu$ g/kg). À titre d'exemple, pour des animaux ayant reçu une seule injection de Neupogen<sup>®</sup> à un dosage de 10 $\mu$ g/kg, le temps de demi-vie était de 1.8 heures. En revanche, chez l'homme pour une dose de 10 $\mu$ g/kg le temps de demi-vie est généralement entre 3 à 4 heures, c'est la raison qui explique les injections en sous-cutanée quotidienne sur une certaine période [251].

### 1.3. Effet secondaire

Comme pour tout produit administré, des effets secondaires peuvent être perceptibles. Cependant, le G-CSF ayant été très étudié, l'ensemble des effets négatifs induits par son utilisation sont connus, à l'inverse d'autres facteurs de croissance, dont on ne connaît pas ou mal les risques. D'ailleurs, la grande sollicitation du G-CSF dans le domaine clinique provient d'une part de ces diverses applications possibles, mais d'autre part de son innocuité ce qui fait que son administration peut être faite à des personnes pathologiques, mais également non pathologiques (donneurs sains). Par ailleurs, une méta analyse des effets secondaires chez le donneur sain s'appuyant sur trois bases de données provenant de pays différents (Japon, Espagne et États-Unis) a permis de mieux classer ces derniers. En tout, 737 patients ont été inclus dans cette analyse. Les effets secondaires les plus courants sont des douleurs osseuses, des maux de tête, de la fatigue, de l'insomnie, des nausées et une légère fièvre pour certains. Ils ont majoritairement été classés comme étant modérés, bien qu'une grande partie des donneurs (2/3) aient dû se procurer un traitement analgésiant. Il est important de préciser que les effets négatifs induits par le G-CSF sont dose-dépendants et par conséquent, ils disparaissent en quelques jours après l'arrêt du traitement [251]. D'autres effets indésirables ont également été constatés, tels que les douleurs thoraciques non cardiaques, la paresthésie, des démangeaisons ou réactions mineures au site d'injection, mais l'occurrence est rare. De plus, l'analyse a pu mettre en lumière des facteurs de risque augmentant la survenue d'effets secondaires spécifiques : les dosages élevés de plus de 8.8 $\mu$ g/kg entraînent les douleurs osseuses ; les sujets de moins de 35 ans sont plus migraineux ; les femmes développent plus de nausées [248].

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 1.4. Mobilisation de cellules souches/progénitrices par le G-CSF

Grâce à la recherche, il a été démontré que le G-CSF permet également le recrutement de cellules souches et progénitrices présentes dans les niches de la moelle osseuse (MO) vers le sang périphérique. D'ailleurs, c'est l'une des premières cytokines à être utilisée cliniquement pour la mobilisation de cellules souches/progénitrices (CSPH) dans la circulation sanguine [244].

En amont des explications des mécanismes de mobilisation, une description des niches de la MO semble importante. Cette dernière constitue un micro-environnement 3D complexe qui peut être divisé en deux catégories : les niches ostéoblastiques et les niches périvasculaires. L'ensemble des niches sont composées d'une variété d'éléments jouant un rôle dans le maintien des cellules souches (CS) : on parle alors d'éléments de soutien. On y retrouve diverses cellules stromales dont les cellules endothéliales et des ostéoblastes, de la MEC (riche en collagène, fibronectines et protéoglycanes) ainsi qu'une variété d'autres éléments [44,249]. Les CS quiescentes sont attachées au sein de ces différentes niches via l'action de différentes molécules d'adhésion, qui fonctionnent via l'interaction d'un ligand et d'un récepteur. Parmi ces molécules, on retrouve deux interactions majeures :

- VLA-4 (Vary Late Antigen-4, intégrine présente sur les CS) et son ligand VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecul-1, exprimé sur la MEC et les cellules stromales).
- CXCR4 (CXC motif Chemokine Receptor 4, présent sur les CS) et son ligand CXCL12 plus communément appelé SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor-1, chimiokine exprimé sur la MEC et les cellules stromales et existe sous forme soluble) [44,54,244].

Les mécanismes par lesquels le G-CSF induirait la mobilisation sont mal définis et doivent être approfondis (conf. Fig. 55). L'interaction VLA-4/VCAM-1 ne semble pas être le mécanisme d'action majoritaire du G-CSF. En effet, même si le G-CSF induit une augmentation d'élastase et de cathepsine G qui sont des protéases (enzymes qui brisent des liaisons peptidiques des protéines) capables de cliver VCAM-1, il a été démontré que le G-CSF ne dépend pas de cette voie pour mobiliser les CS. Pour ce faire, des souris n'exprimant aucune de ces deux protéases ont été mobilisées par du G-CSF, et le résultat a été sans appel, la mobilisation des CS s'est effectuée de manière similaire à des souris saines [54].

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

Concernant l'axe SDF-1/CXCR4, plusieurs études ont mis en lumière la capacité du G-CSF à perturber cette interaction, qui intervient dans l'adhésion cellulaire des CSH, des CPE et des CSM. L'ensemble des mécanismes de mobilisation ne sont pas encore complètement élucidés, mais ces derniers se regroupent dans le fait que le G-CSF n'agit pas directement sur les cellules souches, mais par l'implication d'un intermédiaire [252] et que cette mobilisation perturbe dans tous les cas l'interaction entre SDF-1 et CXCR4 [244,249]. Néanmoins, il est intéressant de noter que l'induction de la mobilisation par le G-CSF est comparable au relargage habituel des cellules souches/progénitrices lors d'une réponse à un stress au cours d'un processus de régénération et particulièrement dans le modèle de DO [44,246]. Les différentes voies de mobilisation par le G-CSF induisant la perturbation de SDF-1/CXCR4 sont multiples. On recense à l'heure actuelle une action des enzymes protéolytiques (élastase et cathepsine G), une action de S1P (un chimiottractant lipidique), une action des métalloprotéinases (MMP-9 surtout), une action sur la diminution de l'expression de SDF-1 des cellules bordantes (ostéoblastes) et une perturbation du système nerveux via la production de  $\beta$ 2-agoniste [44,55,244,249,253]. Enfin, une dernière voie établie est la formation d'un gradient de concentration de SDF-1 entre la moelle osseuse et le sang périphérique. Ce fort chimiottractant induirait également une mobilisation des CS [246].

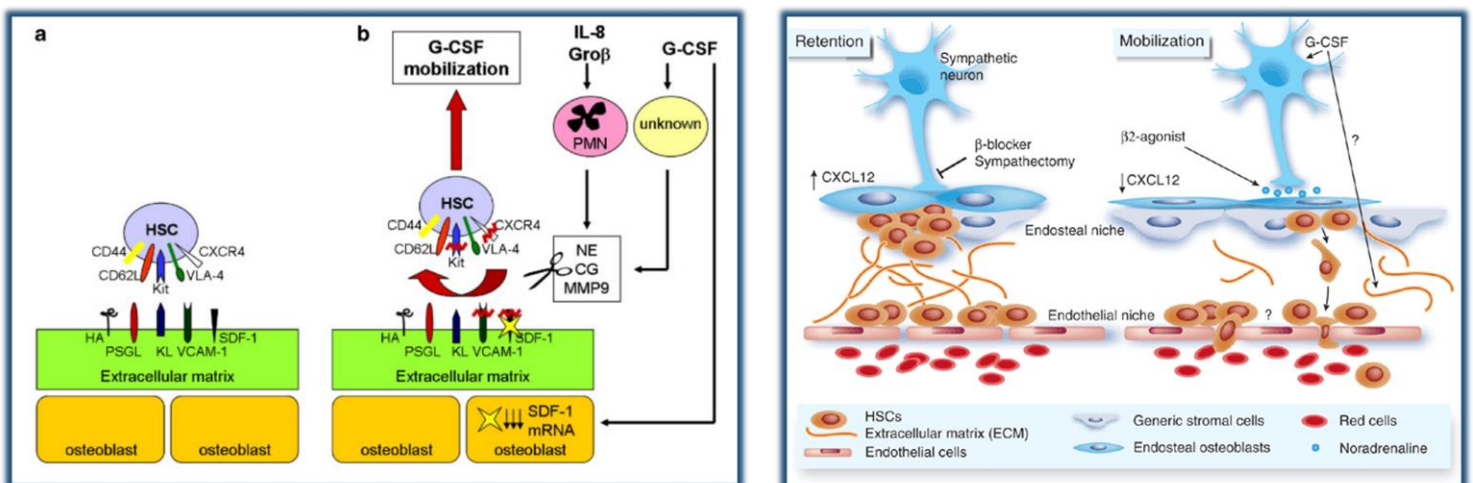


Figure 55 : Représentation schématique des différentes voies de mobilisation des cellules souches par le G-CSF. (Illustration de gauche provenant de l'étude de Nervi et al, 2006 et celle de Cancelas et Williams, 2006).

## 1.5. Mobilisation des CSH par le G-CSF

L'impact du G-CSF sur la mobilisation des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques n'est plus à démontrer et est utilisé cliniquement depuis quelques années. Le G-CSF induit une mobilisation retardée des CSH après 5 jours de traitement. En effet, il est

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

habituel de voir un pic de mobilisation dans la circulation sanguine 5 à 7 jours après la dernière injection [254]. Néanmoins, les mécanismes moléculaires ainsi que les chemins utilisés ne sont encore pas bien établis. Aujourd'hui encore, de nouveaux mécanismes d'action sont mis en évidence. À titre d'exemple, Gębura et al [246] ont mis en évidence l'implication des monocytes sur la mobilisation des CSH à la suite d'un traitement par le G-CSF. Ils ont également constaté une augmentation du niveau de SDF-1 dans le sang périphérique après l'administration de G-CSF, créant un gradient de concentration entre les deux milieux. De plus, une corrélation positive semble se dessiner, c'est-à-dire qu'au plus la concentration de SDF-1 dans le sang périphérique est importante, au plus le nombre de CSH mobilisées est important. Cette analyse confirme les observations décrites par Petit et al, qui ont démontré une corrélation entre la dégradation protéolytique de SDF-1 et le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> immature à être mobilisées.

### 1.6. La mobilisation des CPE par le G-CSF

La mobilisation des cellules progénitrices endothéliales (CPE) à la suite de l'administration de G-CSF a été peu analysée. Cependant, Kawakami et al [60] ont montré que l'axe SDF-1/CXCR4 est un facteur important de mobilisation des CPE, en étudiant des souris dont le gène codant pour le CXCR4 avait été complètement inactivé. Chez les souris CXCR4<sup>-/-</sup>, les CPE ne pouvaient pas s'accumuler correctement au niveau du site de fracture même si une régulation positive de SDF-1 au sein du cal fracturaire était présent. Ce défaut du processus de mobilisation était dû à l'altération du potentiel chimiotactique de SDF-1 par une déplétion sur les CXCR4. Cette étude a donc permis de mettre en évidence la similarité entre le chemin de mobilisation naturelle et celui induit par le G-CSF.

D'ailleurs, Kuroda et al [255], ont analysé l'impact des CPE mobilisés par le G-CSF chez l'homme dans un cas clinique de non-union à la suite d'une fracture. Pour ce faire, ils ont induit une mobilisation des CD34<sup>+</sup> chez le patient grâce aux injections de G-CSF (5µg/kg/j) et ont pu récolter des cellules CD34<sup>+</sup>. Ces dernières ont été séparées afin de ne garder que les CPE, puis induites dans un scaffold bio absorbable afin de maintenir les cellules sur le site lésé. Douze semaines plus tard, la fracture était guérie montrant ainsi l'importance des CPE dans la régénération et la capacité des CPE à être mobilisées par le G-CSF.

### 1.7. La mobilisation des CSM par le G-CSF

L'implication de l'axe SDF-1/CXCR4 dans la mobilisation des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) a également été observée. Cao et al [256] ont utilisé un modèle de

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

rat de DO pour suivre et comprendre la mobilisation systémique de CSM vers le cal distracté à travers l'axe SDF-1/CXCR4. Pour ce faire, ils ont utilisé des CSM marquées par une protéine fluorescente qu'ils ont injectée de manière systémique au niveau de la queue du rat. Lors du prélèvement, des ostéoblastes fluorescents étaient présents au sein du gap proche des nouvelles trabécules formées et participaient à la formation de l'os tissé. Ici, la possibilité de homing des CSM a été démontrée, mais il a été également observé que l'injection de SDF-1 directement dans le cal distracté augmentait la quantité de CSM par deux fois alors qu'en bloquant l'interaction entre SDF-1 et CXCR4, le homing était réduit de 67%. Les CSM mobilisées par le G-CSF ont été caractérisées *in vitro* et leur multipotence a été confirmée puisqu'elles avaient la capacité de se différencier en neurones, cellules endothéliales, ostéoblastes et cardiomyocytes [37,257]. L'intérêt de l'application du G-CSF dans la mobilisation des CSM a suscité un grand intérêt, spécifiquement dans des processus de régénération. En effet, on retrouve son utilisation au sein de modèles de régénération du tissu cardiaque [258,259], du tissu cérébral [260] et du tissu osseux [214,261]. Dans l'ensemble de ces études, on constate une mobilisation des CSM par le G-CSF ainsi que leur habilité à coloniser le site lésé (phénomène appelé homing). De plus, ces cellules sont capables de développer différents phénotypes de la lignée mésodermique.

### 1.8. Le G-CSF dans des modèles de régénération osseuse

Bien que le G-CSF ait la faculté de mobiliser les CSH, les CPE et les CSM, seules quatre études administrant le G-CSF de manière systémique (injection sous-cutanée) ont analysé ses effets lors du processus de régénération osseuse. Parmi ces études, on retrouve trois modèles de fracture [210,261,262] et un modèle de défaut osseux [263]. Aucune étude au sein de la littérature n'a été reportée sur l'impact du G-CSF au cours du processus de régénération lors de la DO.

L'ensemble de ces études ont montré que le G-CSF peut favoriser le processus de régénération osseuse, en augmentant probablement la formation de l'hématome cicatriciel en début de processus et à des temps plus tardifs. Le G-CSF améliorerait la formation osseuse et la vascularisation. On observe de plus que les propriétés mécaniques des os, la rigidité et la force maximale ont été améliorées par rapport au groupe de contrôle dans un modèle d'injection à forte dose [261] et un modèle d'injection à faible dose [210]. Il a également été démontré par l'analyse d'imagerie que l'administration de G-CSF favorisait la formation osseuse. En effet, les scores radiographiques étaient nettement plus élevés pour les groupes traités. Les paramètres architecturaux obtenus par la micro-CT étaient également plus avancés [210,263]. Kaygusuz et



# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

al [262], ont mis en évidence un effet positif sur la sécrétion de TGF- $\beta$ 1, facteur essentiel du processus de régénération via son implication dans la formation osseuse et également dans la minéralisation, après sept jours d'injection de G-CSF à faible dose. Cet effet a été perceptible jusqu'à quatre semaines de consolidation permettant ainsi d'améliorer le processus de régénération fracturaire et montrant l'induction d'effet positif de G-CSF sur les temps tardifs. Concernant l'implication des cellules progénitrices hématopoïétiques, Hermann et al [263], sont les seuls à avoir analysé la fréquence de mobilisation de ces dernières et ont constaté une augmentation significative de cette population cellulaire. Ils ont également montré sur des rats sains que le G-CSF avait un effet dès le lendemain de la dernière injection et cet effet est prolongé jusqu'à 11 jours après 6 jours de traitement. De surcroît, ils ont pu démontrer que le G-CSF ne mobilisait pas directement les cellules endothéliales. Enfin, il est surprenant de constater qu'aucune de ces études ne tient compte de la biodisponibilité induite par le G-CSF sur les cellules progénitrices en circulation.

Il est intéressant de noter que trois autres études portant sur l'ostéogenèse ont également appliqué le G-CSF avec comme intention de stimuler les processus d'ostéogenèse. Ishida et al [214], ont chargé un biomatériau en G-CSF (5 $\mu$ g) et ont constaté des effets positifs sur l'incorporation des ostéoblastes au site lésé (homing). Marmotti et al [264], ont observé l'effet de l'ostéointégration d'un greffon osseux à la suite d'une ostéotomie tibiale et ils ont constaté une meilleure ostéointégration chez les patients mobilisés par le G-CSF. Enfin, Wu et al [265], ont étudié l'effet de l'administration à fort dosage (100 $\mu$ g/kg) du G-CSF. Certes, ce dernier était en combinaison avec un autre facteur de croissance, le SCF (Stem cell factor), qui induit une action sur les CSH. Néanmoins, ils ont constaté des résultats positifs sur la régénération osseuse avec des effets perceptibles aux temps tardifs via la sécrétion d'ostéocalcine (protéine sécrétée par les ostéoblastes matures et jouant un rôle dans la minéralisation de la MEC) à 1, 2 et 3 semaines après l'administration de G-CSF/SCF.

## 2. Objectif de l'étude

Actuellement, il n'existe aucune étude sur l'influence de l'administration de G-CSF sur le processus de régénération pendant la DO. Pour autant, sa production naturelle dans les processus de régénération aux temps précoces (7 premiers jours) [214] ainsi que son implication dans la mobilisation des cellules participant au processus de régénération en fait un bon candidat. C'est pourquoi, au cours de cette étude, une analyse longitudinale des effets consécutifs à une administration à faible dose de G-CSF au cours protocole de DO sera effectuée.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

En outre, la plupart des études sur la régénération des tissus par l'administration de G-CSF n'ont pas analysé les modifications possibles de la cinétique de mobilisation des cellules ostéoprogénitrices et des cellules progénitrices vasculaires. Il convient donc d'étudier les mécanismes responsables de l'effet positif du G-CSF sur la régénération osseuse par ostéogénèse et/ou vascularisation. Par ailleurs, lors du processus de DO, la mobilisation de ces cellules dans des cas naturels n'a été analysée que dans deux études, une portant sur les CPE et une sur les CSM. L'utilisation du G-CSF amène à deux questions : l'analyse du profil de mobilisation de ces cellules au cours du processus de DO et l'impact du G-CSF sur leurs cinétiques.

L'hypothèse émise ici est que le G-CSF améliore la régénération osseuse pendant la DO grâce à une augmentation de la mobilisation des cellules progénitrices. Par conséquent, le but de cette étude est de déterminer les effets de l'administration systémique d'une dose de 5 µg/kg par jour de G-CSF sur les schémas cinétiques de régénération et de mobilisation des CSPH, CPE et CSM dans un modèle de DO chez le rat.

Pour ce faire, les effets de ces injections ont été monitorés au cours du processus via une analyse in vivo par tomographie d'émission de positons (TEP) pour le suivi de métabolisme vasculaire, ainsi qu'une analyse en scintigraphie planaire pour surveiller le dépôt d'hydroxyapatite à l'intérieur du cal distracté. Les cinétiques de mobilisation des cellules progénitrices (CSPH, CSM et CPE) ont été analysées par cytométrie de flux pendant la DO. Enfin, les tests histologiques nous ont permis la discrimination des cellules et des tissus dans le régénérat osseux et les essais de flexion trois-points nous ont apporté des informations sur les propriétés mécaniques de ce cal nouvellement formé.

## II. Caractérisation du processus de régénération

### 1. Modèle animal

Pour cette étude, des variations du protocole établi dans la première étude ont dû être réalisées du fait d'un changement de la structure animalière, entraînant donc une mise à disposition d'outils différents. Néanmoins, les expériences animales ont toujours été menées en accord avec les directives européennes 2010/63. Toutes les procédures décrites lors de cet autre projet ont été approuvées par le comité institutionnel de soin et d'utilisation des animaux de l'Université Aix-Marseille et par le ministère de la Recherche française. Elles ont assurément été réalisées au sein d'une animalerie conventionnelle de la faculté de médecine de Marseille.

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

Les modifications ont concerné le protocole anesthésique, la durée du soin post-opératoire, le protocole de distraction ostéogénique ainsi que la modalité de conservation des échantillons en fin de protocole. Pour le reste, les étapes ont été similaires entre les études expérimentales, incluant le modèle animal choisi, la chirurgie de callotaxis, le fixateur externe et les tiges.

Concernant le protocole de DO, la durée des trois périodes du protocole n'a pas été impactée : 7 jours de latence, 10 jours de distraction active et 49 jours de consolidation (soit 7 semaines). La seule différence correspond à la date où le fixateur externe a été retiré, soit le 66<sup>ème</sup> jour, qui correspond au jour de la mise à mort. L'intérêt était de ne pas induire une modification du processus de régénération osseuse due à la mise en marche de l'animal et donc de pouvoir quantifier de manière isolée l'effet de l'ajout du facteur de croissance.

À propos du protocole anesthésique, une sédation via une anesthésie gazeuse halogénée a été effectuée 20 minutes après l'injection en sous-cutanée de Buprénorphine (Buprécare<sup>®</sup>, 0.3mg/ml) à un dosage de 0.03mg/kg. Cette anesthésie a débuté par une phase d'induction à 5%, suivi d'une phase de maintien pendant l'opération à 1.5%. L'utilisation de l'isoflurane permet de diminuer la sensibilité à la douleur tout en étant myorelaxant, en se fixant sur les récepteurs des neurotransmetteurs GABA<sub>A</sub>, inhibant ainsi la transmission synaptique. De plus, l'utilisation d'atipamézole (Revertor<sup>®</sup>, 5mg/ml) n'a pas été nécessaire puisque le réveil se produit après retrait de la source anesthésiante de manière rapide et calme.

Les soins post-opératoires ont été effectués de la même manière que lors des études précédentes avec les mêmes produits et dosages. Seule la durée du traitement basique, n'incluant pas le G-CSF, a été modifiée passant de 3 jours post-opératoire à 5 jours.

Le dernier point concerne le mode de conservation des échantillons post-mortem. Celui-ci a également varié en fonction du type d'analyse définie. Pour l'analyse mécanique de flexions trois-points, la conservation par congélation a été favorisée puisqu'elle n'induit aucune modification des éléments constituant la structure osseuse cités plus haut. Les échantillons ont été entourés d'une gaze imbibée de sérum physiologique puis conservés au congélateur à -80°C jusqu'au jour dédié aux essais mécaniques. Pour les échantillons dédiés aux essais histologiques, il n'y a pas eu de variation du protocole. La fixation chimique a été préconisée afin de préserver la structure des cellules dans leur environnement spatial. Ceux-ci ont été conservés dans de l'éthanol à 70% pendant une semaine.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 2. Protocole d'injection du facteur de croissance : G-CSF

### 2.1. Préparation des aliquotes de G-CSF

En amont des injections, des aliquotes contenant le facteur de croissance ont été préparées afin de faciliter l'élaboration des seringues le jour de l'administration. La cytokine utilisée lors des expérimentations est le filgrastim (Neupogen<sup>®</sup>) qui est, selon la Haute Autorité de Santé (HAS), une forme recombinante du facteur de croissance hématopoïétique spécifique de la lignée granulocytaire : le G-CSF.

Les aliquotes ont été conditionnées dans un milieu stérile afin d'éviter toute contamination possible. Pour ce faire, une seringue préremplie de 500 $\mu$ L de filgrastim à une concentration de 960 $\mu$ g/ml a été utilisée et divisée dans divers microtubes stérilisés (Eppendorf<sup>™</sup>) de 2ml sous hotte stérile à flux laminaire. Un total de 39 aliquotes de solution pure de filgrastim a été réalisé : 32 aliquotes de 15 $\mu$ l, 6 aliquotes de 3 $\mu$ l et 1 aliquote de 2 $\mu$ l. Lors du fractionnement, la solution de filgrastim ainsi que les aliquotes ont été conservées dans de la glace. Une fois le conditionnement effectué, les microtubes ont été conservés au congélateur à -80°C.

### 2.2. Protocole d'injection

Au lendemain de la chirurgie de callotaxis, les vingt animaux ont reçu une injection sous-cutanée quotidienne pendant cinq jours (conf. Fig. 56). Les dix animaux appartenant au groupe testé ont reçu une injection sous-cutanée de filgrastim (Neupogen<sup>®</sup>) à un dosage de 5 $\mu$ g/kg. Tandis que les dix animaux du groupe contrôle ont reçu une injection sous-cutanée de solution saline de volume correspondant.

Afin de pouvoir conditionner les seringues, chaque animal a été préalablement pesé. Ce paramètre nous a également permis de monitorer l'état de l'animal. Ensuite, une dilution au

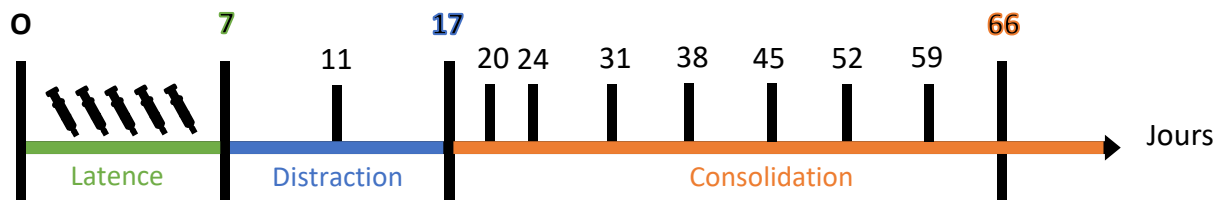


Figure 56 : Schématisation du protocole de distraction ostéogénique. On retrouve en vert la phase de latence de 7 jours. Le symbole  $\sphericalangle$  représente les 5 jours d'injections du facteur de croissance (G-CSF) ou de la solution saline, qui ont débuté au lendemain de la chirurgie. En bleu est représentée la phase de distraction de 10 jours. La phase de consolidation est représentée en orange. Sa durée totale est de 49 jours soit 7 semaines de consolidation.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

centième a été effectuée pour le microtube contenant le G-CSF pur à l'aide d'une solution tampon de phosphate saline, afin de faciliter son administration future. En effet, il est plus simple d'injecter une solution dont le volume est de 200 $\mu$ l que de 2 $\mu$ l, surtout chez un animal vigile.

Une fois la dilution effectuée, le volume pur ( $V_p$ , en  $\mu$ l) d'injection par animal a été calculé selon l'équation suivante :

$$V_p (\mu l) = \frac{C_{ma} \times P}{C_{mgcsf}} \times 1000 \quad (1)$$

Avec  $C_{ma}$  la concentration injectée par animal (5 $\mu$ g/kg),  $C_{mgcsf}$  la concentration de la seringue de g-CSF (960 $\mu$ g/ml) et P le poids de l'animal exprimé en kg. Le tout est multiplié par 1000 afin d'avoir un  $V_p$  en  $\mu$ l et non en ml.

Grâce à l'équation (1), nous avons pu calculer le volume dilué ( $V_d$ ) par injection :

$$V_d = V_p \times 100 \quad (2)$$

À titre d'exemple : pour un animal de 450g, le  $V_d$  était de  $2.3475 \times 100 = 234.75 \mu$ L

Ensuite, le volume dilué, préalablement calculé, a été prélevé du microtube contenant le G-CSF dilué à l'aide d'une pipette à piston (20-200 $\mu$ l, Eppendorf <sup>TM</sup>) et déposé dans un autre microtube stérile numéroté selon l'animal. Pour les animaux appartenant au groupe contrôle, les mêmes équations ont été utilisées pour déterminer le volume de solution tampon de phosphate saline à injecter.

Pour tous les animaux, les injections ont été effectuées au niveau dorsal en sous-cutanée, à l'aide d'une seringue de 1ml et d'une aiguille stérile de 25G (BD Microlance 3 <sup>TM</sup>).

## 3. L'imagerie nucléaire au profit du suivi de la régénération

L'utilisation de radiotraceur doit être effectuée dans un environnement contrôlé et par des personnes qualifiées à la manipulation de tels produits. C'est pourquoi, l'ensemble des imageries médicales obtenues en imagerie TEP et en scintigraphie planaire ont été effectuées au Centre Européen de Recherche en Imagerie Médicale (CERIMED) et par un personnel habilité.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 3.1. La tomographie par Émission de Positons

### a. Principe

La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie clinique basée sur l'utilisation d'isotopes radioactifs émettant des positons, qui sont de charge positive. Ces derniers peuvent être incorporés dans des molécules sans en altérer leurs propriétés biologiques. Les radiotraceurs utilisés sont composés par un isotope radioactif et un vecteur moléculaire, permettant ainsi de localiser la distribution au sein d'un tissu ou organe [266]. C'est grâce à la détection par la caméra-TEP des émissions de photons, générés à la suite de phénomènes d'annihilation, que la localisation du lieu d'émission ainsi que la concentration du traceur en un point peuvent être établies. Ceci permet de créer une imagerie de type fonctionnelle via la visualisation du métabolisme des cellules ciblées. Les imageries obtenues par radiologie ou micro-CT sont considérées comme étant de type structurel.

Les émetteurs de positons sont composés par des noyaux qui ont un excès de charge électrique positive, les protons [267]. Les noyaux vont en effet se désintégrer vers un état stable via la transformation d'un proton en neutron, second élément du noyau atomique et dont la charge électrique est nulle. Cette transformation va générer l'émission d'un neutrino et d'un positon, communément appelé désintégration bêta plus ( $\beta^+$ ). À la suite de cette émission, le positon va parcourir une faible distance dans le tissu, perdant ainsi quasiment toute son énergie cinétique. C'est une fois que le positon est quasiment au repos qu'il va interagir avec un électron environnant, créant ainsi une réaction d'annihilation, et donnant naissance à deux photons gamma de 511keV, émis simultanément dans des directions diamétralement opposées. Et c'est justement par la détection en coïncidence de ces deux photons d'annihilation que repose le principe de la TEP (conf. Fig. 57). Afin de pouvoir enregistrer ce phénomène, le système de

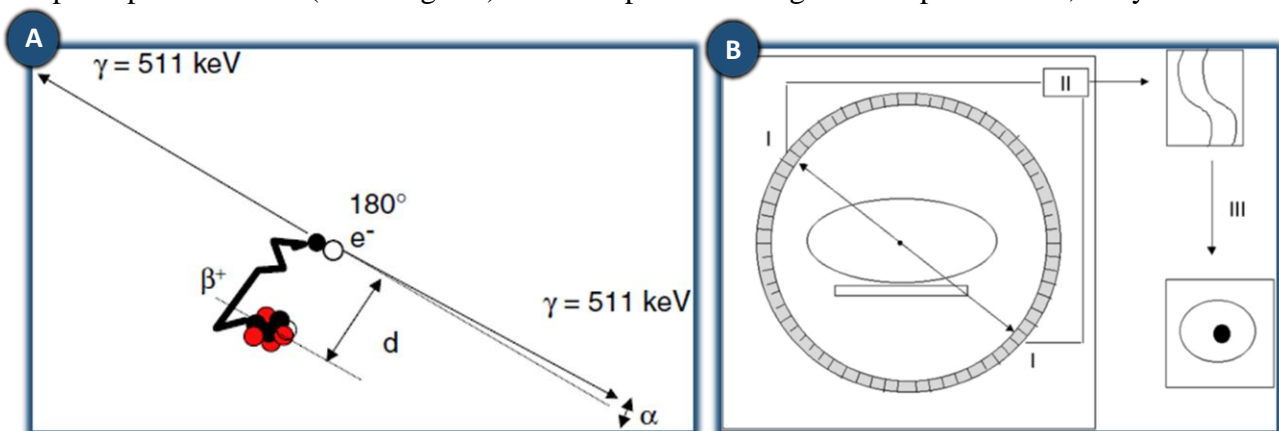


Figure 57 : Schéma explicatif du système de TEP. A. Illustration du phénomène d'annihilation où  $d$  est la distance parcourue du positon avant l'interaction avec l'électron ( $e^-$ ) présent dans l'environnement et ( $\gamma$ ) les deux photons créés. B. Principe de détection de la TEP : I détection, II validation de la coïncidence par le circuit électronique et III reconstitution des données.

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

TEP est constitué de détecteurs élémentaires organisés autour du sujet d'étude en anneaux. Chaque détecteur est composé de cristaux scintillateurs couplés à des tubes photomultiplicateurs. Lorsque le photon entre dans ce système, une énergie électrique est traitée par un système électronique d'acquisition [267].

Néanmoins, un circuit de coïncidence est connecté aux détecteurs, qui n'autorise l'enregistrement des événements que si les deux photons sont détectés dans un intervalle de 10 à 20 ns et par les capteurs diamétralement opposés [266]. Enfin, un algorithme de reconstruction permet de reconstituer une image de répartition des traceurs (conf. Fig. 57).

En amont de nos essais, il nous a fallu choisir le médicament radiopharmaceutique ou radiotracer. Concernant le marqueur (radioisotope), il est intéressant de noter qu'il existe un vaste panel d'émetteurs de positons et qu'ils sont généralement caractérisés en fonction de leurs caractéristiques physiques et de leur période radioactive (demi-vie). L'isotope utilisé au cours de notre étude est le Gallium 68 : ce dernier entre dans la catégorie des isotopes ayant une période radioactive courte de par leurs demi-vies de 68 minutes environ et il est produit par un accélérateur de particules à partir du Germanium 68 [267]. Pour le vecteur, nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'une séquence RGD synthétique. Celle-ci est un tripeptide constitué de trois acides aminés : l'arginine (Arg), la glycine (Gly) et l'acide aspartique (Asp). Cette séquence RGD cible spécifiquement l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  [268], ce qui nous a permis de suivre le processus de vascularisation. En effet, il a été démontré que cette intégrine ( $\alpha_v\beta_3$ ) est exprimée par les cellules endothéliales actives comme lors de processus d'angiogenèse, alors qu'elle ne l'est pas par les cellules endothéliales quiescentes, au sein de vaisseaux sanguins matures. Le rôle de cette intégrine est de participer à l'adhésion cellulaire à la MEC ainsi qu'à la migration cellulaire de ces dernières [268].

### b. Protocole d'acquisition des images

Le métabolisme vasculaire des fémurs distractés a été évalué longitudinalement à l'aide de la tomographie par émission de positons (TEP) au cours du processus de DO (conf. Fig. 58). Sept moments différents ont été analysés : 7 jours, 17 jours, 20 jours, 24 jours, 38 jours, 52 jours et 66 jours après l'opération. L'utilisation du radiopharmaceutique Gallium<sup>68</sup> couplé à une séquence RGD nous a permis de quantifier les cellules endothéliales activées via l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Au total, 4 animaux dans le groupe traité et 6 animaux dans le groupe témoin ont été utilisés pour l'analyse TEP. Les données TEP n'ont pas pu être recueillies pour deux animaux appartenant au groupe G-CSF en raison de problèmes techniques du système d'acquisition.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

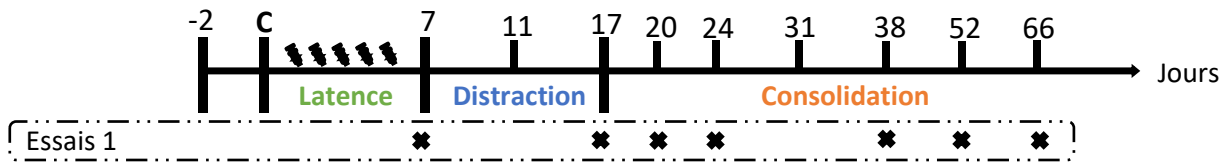



Figure 58 : Représentation du suivi longitudinal du processus de vascularisation et du dépôt d'hydroxyapatite pendant le processus de DO. Les croix marquent les différents temps d'analyse en TEP et en scintigraphie planaire, sachant que les images en scintigraphie ont été effectuées 24h après celles obtenues en TEP. C = chirurgie de callotasis ;  représente les 5 jours d'injection systémique du G-CSF ou de la solution saline.

Pour ce faire, les animaux ont été anesthésiés par une solution halogénée d'isoflurane à 5% pour la phase d'induction, suivie d'une phase de maintien à 1.5%. Cette sédation a permis l'injection en intrapéritonéale de  $10 \pm 0,5$  MBq de  $[^{68}\text{Ga}]\text{-RGD}$ . Une heure après l'administration, les animaux ont été anesthésiés une seconde fois (mêmes doses) pour permettre l'acquisition d'images sur Mediso-NanoPET-CT<sup>®</sup>. Lors de l'imagerie, les animaux ont été positionnés sur le lit du Mediso-NanoPET-CT<sup>®</sup> et le champ de vision a été centré sur fémur distracté. Une attention particulière a été portée sur la position des animaux. Grâce aux prétests, la position optimale vis-à-vis de l'axe de rotation du système et de l'animal a été établie. En effet, la corpulence trop importante des rongeurs par rapport au lit et la présence du fixateur externe, nous a imposé un positionnement sur le côté latéral gauche et c'est l'axe transverse du fémur qui était aligné avec l'axe de rotation de la machine. Les paramètres de la machine comprenaient une tension de 50kV et un courant de  $980\mu\text{A}$ , avec un temps d'exposition 300 ms, soit une durée totale de balayage de 4 minutes.

## c. Traitement de l'imagerie nucléaire de type TEP

L'ensemble des projections d'images 2D obtenues par la TEP ont ensuite été transférées dans le logiciel Vivoquant (Invicro<sup>®</sup>), afin de quantifier la radioactivité présente au sein de la région d'intérêt (ROI). Aucun recalage d'images n'a dû être effectué, car la position de l'animal n'a pas été modifiée entre l'acquisition du micro-CT et la radioactivité. En effet, le processus d'imagerie a été acquis de manière séquentielle. La région ROI choisie était représentée par une forme cubique de  $1000\text{mm}^3$  ( $10 \times 10 \times 10$ ) et son centre coïncidait avec le milieu du régénérat distracté. La sélection du ROI a été faite de manière que le cal distracté soit entièrement inclus. Un second ROI de même dimension a été utilisé au niveau du fémur controlatéral et positionné au centre de la diaphyse. Cette deuxième délimitation nous a permis de normaliser nos valeurs d'activité vasculaire et de surmonter les biais d'inter-manipulation. De plus, les valeurs d'absorption tissulaire données par l'analyse TEP ont été normalisées par rapport au fémur controlatéral et ont été représentées comme le rapport moyen d'absorption de  $[^{68}\text{Ga}]\text{-RGD}$  pour



# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

chaque groupe. Les variations du profil cinétique de la vascularisation induit par l'administration de G-CSF ont pu être obtenues au cours de la DO.

## 3.2. La scintigraphie planaire

### a. Principe

Le principe de la scintigraphie planaire est assez proche de celui de la TEP. En effet, celui-ci est également basé sur l'administration d'un radiopharmaceutique afin de mettre en évidence des processus biologiques. Cependant, l'isotope radioactif utilisé n'est pas basé sur l'émission de positons, mais sur l'émission d'un seul rayon gamma (photon gamma unique) de 140keV. Il n'y a pas de rayonnement bêta associé.

Une fois le radiotracer injecté, ce dernier peut être capté par des détecteurs appelés gamma-caméras, l'absorption du rayon gamma par un cristal permet sa transformation en un photon lumineux [269]. Les gamma-caméras sont constitués de deux sous-parties : un collimateur et un cristal. Le collimateur, placé en amont des cristaux, donne l'information sur le trajet du rayon gamma. En général, dans les systèmes de scintigraphie, les collimateurs sont positionnés parallèlement au cristal et sont composés d'une plaque de plomb percée de trous perpendiculaires au cristal (conf. Fig. 59) [269]. Ceci permet de ne capter que les photons arrivant perpendiculairement, les autres étant bloqués par le collimateur. Une fois que le rayon gamma a atteint le cristal, ce dernier va les convertir en un rayon lumineux, traduit en signal électrique via l'utilisation de photomultiplicateurs. L'image reconstituée sera donc une projection 2D de la zone placée en regard.

Comme pour la TEP, il existe une multitude de marqueurs possibles. Le radiotracer utilisé au cours de cette étude est le technétium 99m [270]. C'est l'un des radiotraceurs les plus utilisés en clinique puisqu'il présente des caractéristiques idéales pour la réalisation d'images diagnostiques. Tout d'abord, sa disponibilité est grande puisqu'il peut être produit sur place via un générateur. Ensuite, sa demi-vie est de 6 h permettant ainsi d'optimiser un temps

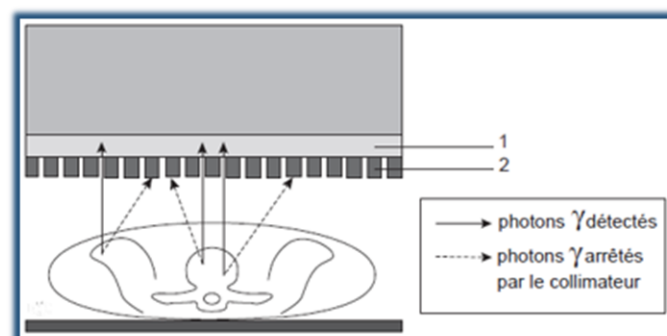


Figure 59 : Illustration du fonctionnement d'une gamma-caméra (Paycha et al. 2001). En 1 le cristal et en 2 le collimateur.

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

d'enregistrement des images assez long tout en restant assez court concernant l'irradiation du patient ou sujet d'étude [271]. Concernant le vecteur, l'utilisation de diphosphonates nous a permis de caractériser l'os en formation. Au sein de la famille de diphosphonates disponibles, nous avons utilisé l'hydroxyméthylène diphosphonate (HMDP). De nombreuses études ont mis en évidence que la fixation des diphosphonates dans le tissu osseux se fait sur sa partie minérale, et plus particulièrement au niveau du front de minéralisation de l'os au cours de processus de formation osseuse [272]. C'est par l'échange de molécules de phosphate entre les cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) en formation et les molécules de phosphate du vecteur que la liaison se fait. Donc ici, le produit se fixe sur des zones d'os en formation qui présente une activité ostéoblastique. De plus, la fixation des diphosphonates est de 40 à 50% pour le HMDP.

Enfin, il est important de stipuler que le rayonnement émis par le radiotracer est adapté à sa détection et que par conséquent la toxicité de ce dernier reste très faible sur le plan biologique. À titre d'exemple, l'irradiation produite est similaire à une radiographie du thorax. De plus, lors de l'utilisation de différents radiopharmaceutiques, il faut tenir compte de deux paramètres d'élimination : celui basé sur les propriétés physiques du radiotracer et celui en lien avec les systèmes biologiques du sujet d'étude. En effet, l'élimination du radiopharmaceutique par le corps peut se faire de différentes manières en incluant l'activité rénale (urine) et l'activité biliaire (foie, bile et les selles) [269].

### b. Protocole d'acquisition

Le processus de minéralisation des fémurs distractés a été évalué longitudinalement à l'aide de la scintigraphie planaire au cours du processus de DO. Pour ce faire, l'utilisation du radiotracer  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-HMDP}$  dans le fémur distracté nous a permis de surveiller le dépôt continu d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) du début du processus de régénération jusqu'à la fin de l'étude. En fait, les images obtenues par le Mediso-NanoSPET-CT<sup>®</sup> nous ont permis d'observer l'accumulation par chimisorption (absorption chimique) du radiotracer sur les cristaux d'hydroxyapatite nouvellement formés et ainsi de surveiller longitudinalement l'activité des ostéoblastes à l'intérieur du fémur distracté (conf. Fig. 60).

Chaque séance d'imagerie en scintigraphie planaire a eu lieu après un délai de 24 heures par rapport à l'imagerie TEP, dans le but d'éviter la création d'un bruit de fond due aux radiotraceurs. De plus, le même panel d'animaux a été utilisé lors des essais en scintigraphie planaire et les essais en imagerie TEP (6 animaux pour le groupe contrôle et 4 animaux pour le groupe traité). À cette fin, les rats ont été anesthésiés par une solution halogénée d'isoflurane à

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

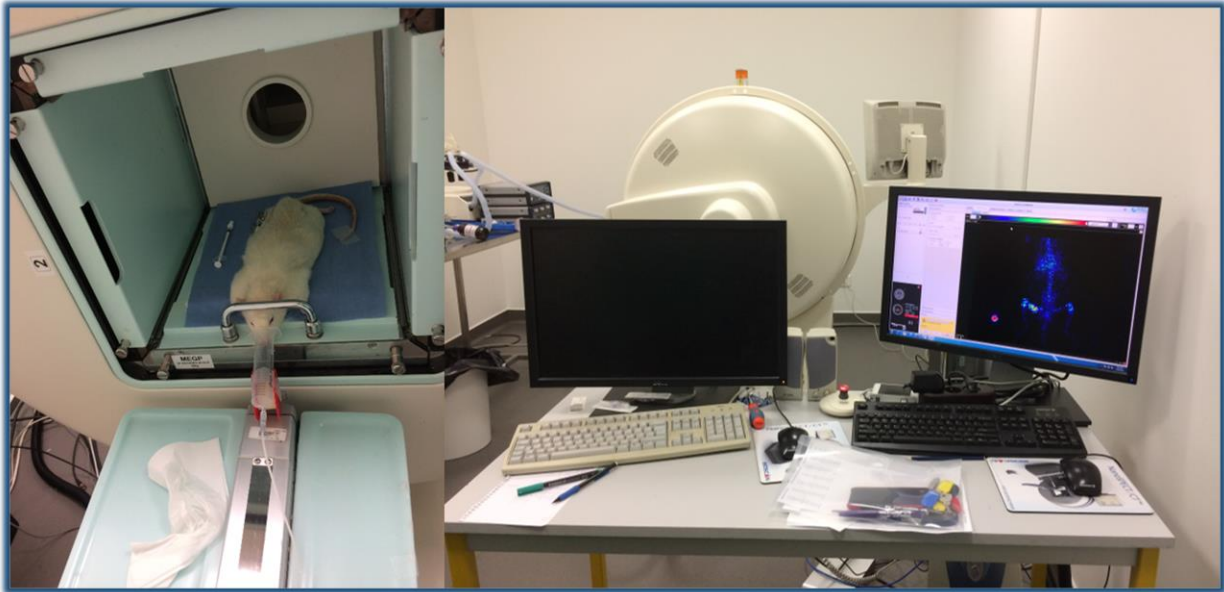


Figure 60: Représentation des essais de scintigraphie planaire. À gauche, l'animal est positionné de sorte que la gamma-caméra puisse imager le fémur droit. Ce dernier est également maintenu sous sédation afin qu'il ne puisse pas bouger. À droite, une représentation de la radioactivité en cours d'acquisition.

5% pour la phase d'induction, suivi d'une phase de maintien à 1.5%. Cette sédation a permis l'administration de  $30 \pm 1,5$  MBq de  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-HMDP}$  dans la veine caudale via l'utilisation d'un cathéter. Quatre heures après l'injection systémique, les rats ont été anesthésiés une seconde fois (même dosage d'induction et de maintien) pour permettre l'acquisition d'images dont le temps moyen par animal était de 10 minutes.

### c. Traitement de l'imagerie nucléaire de type scintigraphie

La délimitation des ROIs pour l'analyse quantitative des images en scintigraphie planaire a également été réalisée avec le logiciel Vivoquant (Invicro®). Le ROI a été choisi de manière à ce que la totalité du fémur soit sélectionnée (de la tête fémorale aux condyles fémoraux). Dans la même idée que pour les images TEP, un ROI a été réalisé sur le fémur controlatéral de façon symétrique à celui appliqué sur le fémur distracté. Ceci nous a permis de calculer le ratio moyen d'absorption du  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-HMDP}$ . Ces valeurs d'absorption tissulaire ont été normalisées par rapport au fémur controlatéral et ont donc été représentées comme le rapport moyen du fémur distracté sur le fémur controlatéral.

## 4. Histologie et immunohistochimie

### 4.1. Coloration topographique

Les analyses histologiques ont été effectuées au niveau du cal distracté sur des échantillons prélevés à 2 semaines de consolidation (31 jours post-opération) et 7 semaines de consolidation (66 jours post-opération). Les échantillons dédiés aux essais histologiques ont été

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

conservés dans de l'éthanol à 70% pendant une semaine. Cette conservation dans l'alcool et non dans du paraformaldéhyde vient du fait que nous avons choisi d'effectuer également des tests immunologiques via le marquage type TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) en plus des colorations pour les tissus minéralisés (Von Kossa) et cartilagineux (bleu de toluidine).

### a. Protocole de colorations topographiques

Le protocole permettant d'obtenir les colorations au Von Kossa et au bleu de toluidine des régénérats distractés est similaire au chapitre 3. En résumé, les échantillons ont été redimensionnés afin d'obtenir notre zone d'intérêt (ROI). Cette dernière comprenait un peu d'os cortical du segment osseux proximal et distal ainsi que l'entièreté du cal distracté. Par la suite, les échantillons ont été déshydratés pour permettre l'imprégnation en résine via l'utilisation de MMA et d'un durcisseur. Puis s'en est suivie une phase de polymérisation des échantillons. Enfin, des sections de 5 $\mu$ m d'épaisseur ont été réalisées de manière longitudinale suivant l'axe antéro-postérieur à l'aide d'un microtome. Ces sections ont été déposées sur des lames adhésives.

Il est important de préciser qu'en amont des marquages, le nombre de sections par échantillon a été divisé en deux : la moitié des sections d'un échantillon a été utilisée pour la coloration topographique (von Kossa et bleu de toluidine) et l'autre moitié du même échantillon pour le marquage histoenzymologique (TRAP). Puis, chaque section a été déplastifiée, colorée et montée dans un milieu de montage entre lamelle et lame. À la suite des colorations, l'observation et la photographie des coupes histologiques ont été effectuées à l'aide d'un microscope photonique (lumière blanche) à un grossissement x4.

### b. Mesure des paramètres histomorphométriques

Les images obtenues des sections marquées par la double coloration ont permis de réaliser une description histologique des tissus/cellules observés au cours du processus de distraction ostéogénique avec ou sans l'impact du facteur de croissance. Une analyse quantitative des tissus minéralisés a également été réalisée englobant le tissu osseux et le cartilage calcifié. Le traitement des images et la mesure des paramètres histomorphométriques ont été réalisés à l'aide du logiciel NIH image software (ImageJ/Fiji) [184] et du plugin BoneJ [186].

Il est important de préciser que les protocoles d'analyse ont été similaires entre tous les échantillons. En effet, huit échantillons ont été analysés dont quatre échantillons prélevés à 2

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

semaines de consolidation (31 jours post-opératoire, noté par la suite temps T1) et quatre autres à 7 semaines de consolidation (66 jours post-opératoire, noté par la suite temps T2). Pour chaque temps, deux échantillons provenaient du groupe contrôle (injection de sérum physiologique) et les deux autres du groupe traité (G-CSF). De plus, les analyses histomorphométriques ont été menées sur les sections où les quatre corticales natives étaient présentes. Par conséquent, pour les sections appartenant à T1, deux sections par échantillon ont été analysées. En revanche pour les sections appartenant à T2, trois sections par échantillon ont été étudiées. De plus, chaque section a été photographiée à un grossissement x4. Il a donc fallu une multitude d'images pour représenter entièrement la section souhaitée. Une fois l'acquisition des images effectuée, nous avons pu les assembler via Photoshop® pour obtenir une vue d'ensemble de la coupe (conf. Fig. 61-A).

Par la suite, les images numériques ont été importées dans le logiciel imageJ sous le format RVB. Ce dernier est basé sur la synthèse additive des couleurs rouge, vert et bleu, elles-mêmes codées en 8 bits. Afin de faciliter la segmentation, une conversion des images au format 8bits a été effectuée (conf. Fig. 61-B). Ensuite, nous avons segmenté nos images pour isoler une partie de l'information, ici le tissu minéralisé (conf. Fig. 61-C-E). La segmentation consiste en la binarisation de l'image en transformant les niveaux de gris en 0 (noir) ou en 255 (blanc). La binarisation des images a été réalisée via la méthode d'Otsu comme lors du traitement des images micro-CT du chapitre 2 [185]. Afin de permettre une comparaison entre les différentes

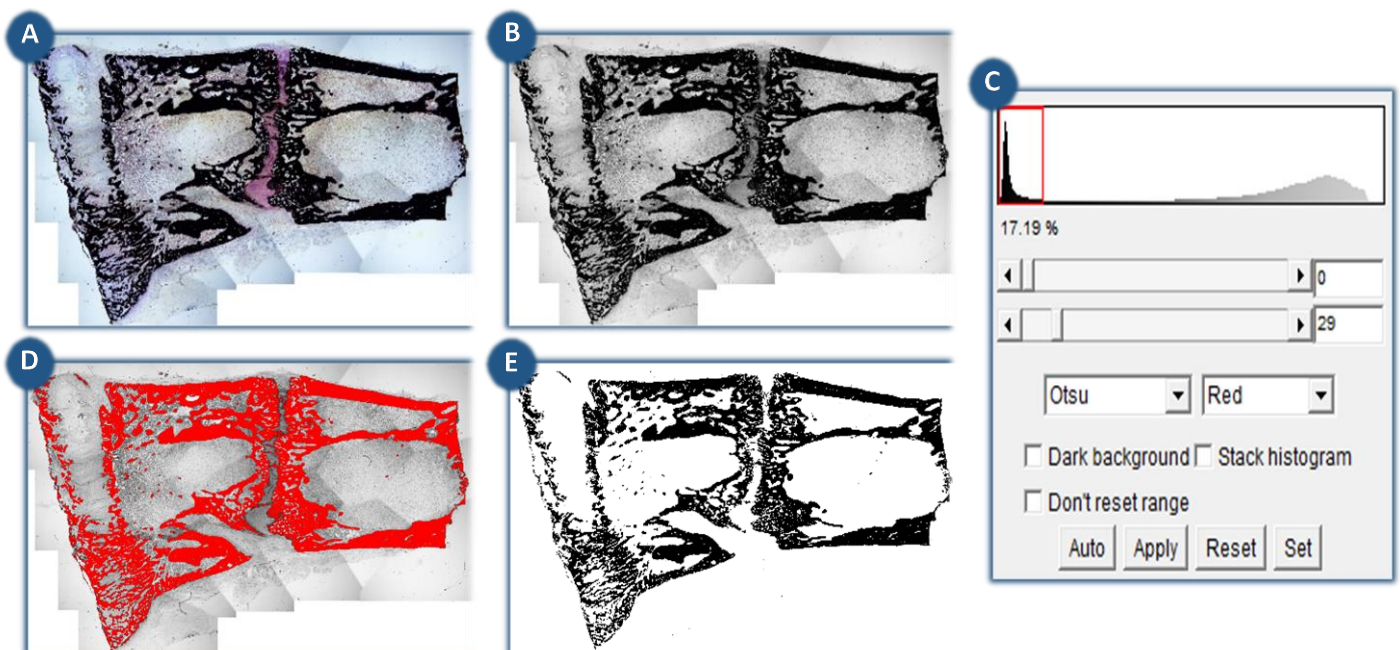


Figure 61 : Illustration des étapes de segmentation pour le calcul des paramètres histomorphométriques. **A.** Image originale au format RVB, grossissement x4. **B.** Conversion en 8bits. **C.** Segmentation de l'image 8bits via la méthode d'Otsu. **D.** Représentation en rouge de la segmentation. **E.** Binarisation de l'image.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

sections, la valeur de seuillage a été fixée entre 0-29 et est restée stable pour tous les échantillons (conf. Fig. 61-C).

Une fois les images binarisées, plusieurs régions d'intérêt (ROI) ont été délimitées dans le but d'analyser séparément la formation du cal endosté (zone intraosseuse) à celui du cal périosté (zone extraosseuse et zone du périoste). En effet, au cours de la régénération osseuse, la participation de ces deux membranes est importante que ce soit pour l'ostéogénèse ou la vascularisation [75,77,273] puisqu'on y retrouve notamment une réserve en cellules ostéoprogénitrices. Le deuxième intérêt des ROIs, est l'exclusion du processus de régénération et de remodelage induit par l'ostéointégration des tiges dans le tissu osseux.

Trois zones ont été discriminées (conf. Fig. 62) :

- La zone intraosseuse (ZI), représentant la zone du cal distracté comprise entre les quatre corticales natives ;
- La zone périosté (ZP), composé de quatre régions de forme rectangulaire et de dimension 1.2\*1.4mm. Lors de la quantification, les quatre sous-régions ont été moyennées, donnant ainsi une valeur unique ;
- La zone extraosseuse (ZE), correspondant à la zone située au-dessus et en dessous de la zone intraosseuse de taille 1.4mm de hauteur et dont la longueur varie en fonction des dimensions de ZI.

Pour finir, les résultats des calculs des paramètres histomorphométriques ont pu être obtenus au sein de ces trois ROIs. Ces derniers comprenaient la fraction surfacique osseuse (BA/TA), représentant la surface d'os par unité de surface de la ROI, exprimée en pourcentage (%) ainsi que l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th) en micromètre (mm) du réseau osseux nouvellement formé.

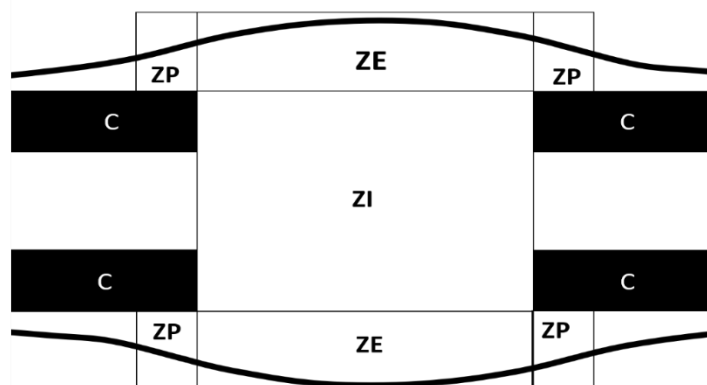


Figure 62 : Illustration des régions d'intérêt (ROI) pour les analyses histomorphométriques.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 4.2. Coloration histo-enzymologique

### a. Principe

La coloration TRAP (Phosphatase acide tartrate-résistance) est utilisée dans des modèles de régénération osseuse afin de marquer l'ostéoclastogénèse [274–277]. La TRAP est une enzyme lytique sécrétée principalement par les ostéoclastes qui a pour rôle de participer à la finalisation de la dégradation des composants osseux, notamment les phosphoprotéines squelettiques telles que l'ostéopontine (protéine d'adhérence) au sein de vésicules transcytotiques. Il a été démontré chez l'homme qu'une déficience de cette enzyme entraîne une ostéopétrose [278], elle-même caractérisée par une augmentation de la formation tissulaire osseuse ainsi que de sa densité minérale. À l'inverse, une sur sécrétion de cette enzyme est présente au cours de l'ostéoporose [279]. La TRAP se base sur une coloration rouge violacé qui est générée dans chaque section en présence de l'enzyme. On qualifiera ce marquage de TRAP-positif (TRAP+). Ce sont les composants de la solution de substrat qui vont médier cette réaction. La solution de révélation quant à elle permettra de pigmenter la section.

### b. Protocole du marquage TRAP

Les sections préalablement réhydratées ont été incubées dans une solution de substrat contenant 1mL de naphthol AS-TR phosphate, à une concentration de 15mg de naphthol AS-TR phosphate (colorant azoïque) dissout dans 1mL de N,N-Diméthylformamide (solvant), le tout dilué dans 100mL de tampon acétate de pH 5 et enrichi en tartrate de sodium. Cette incubation a duré toute la nuit à une température de 37°C. Des sections témoins ont été réalisées via une incubation ne contenant pas le substrat. Par la suite, les lames ont été transférées, sans rinçage, dans une solution de révélation qui était constituée de 1mL de colorant pararosaniline, de 1mL de nitrite de sodium à hauteur de 4% dans de l'eau distillée et de 100mL de tampon d'acétate toujours enrichi au tartrate de sodium. Cette étape a duré 10 minutes à une température de 37°C également. Enfin, après un rinçage à l'eau courante, les lames ont été déshydratées et montées avec un milieu de montage résineux (Entellan, Merk Millipore) entre lame et lamelle. La coloration a été ensuite analysée via la microscopie photonique.

### c. Mesure de l'activité ostéoclastique

Les images marquées par la coloration TRAP-positif ont été analysées via le logiciel NIH image software (ImageJ/Fiji) à l'aide du plugin Trainable Weka Segmentation (TWS) [280]. Pour rappel, les sections consacrées à ce marquage ont été réalisées sur l'autre moitié des blocs utilisés pour la double coloration. L'activité ostéoclastique a été menée sur les

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

sections où les quatre corticales natives étaient présentes. De ce fait, deux sections par échantillon ont été analysées pour T1 et T2. Comme précédemment, les images reconstituées via Photoshop® ont été importées dans ImageJ sous format RVB et une correction de l'arrière-plan a été effectuée, du fait des variations spatiales d'intensité présentes. C'est via le plugin « substrat background » que cette étape a été effectuée, algorithme reposant sur le principe de la boule roulante de Stanley Sternberg.

Les trois ROIs définies auparavant (ZI, ZP et ZE), ont été utilisées et ajustées pour chaque image puis importées dans TWS. Cet outil a été développé pour la classification de pixels en microscopie permettant ainsi d'améliorer la précision des régions désignées [281]. Son principe est basé sur une méthode d'apprentissage automatique via une répartition des pixels d'intérêt dans une classe spécifique. Pour ce faire, nous avons dû définir deux classes distinctes : les ostéoclastes et l'arrière-plan. Pour chaque classe, un ensemble de pixels d'entrée a été étiqueté afin de donner de l'information au système et a été utilisé pour permettre la classification. Une fois le programme terminé, le système affiche une image résultat (conf. Fig. 63-A-B). Si des anomalies de segmentation sont détectées, les étapes précédentes sont répétées afin de venir enrichir les classes et donc ajuster le programme. Après plusieurs essais, le système tend vers une sélection optimale et une image de probabilité peut être établie. Il est intéressant de stipuler que ce même classeur (programme) peut être sauvegardé et utilisé pour l'analyse des autres sections histologiques provenant du même échantillon.

Avant une validation finale, une étape de vérification de l'image de probabilité donnée par l'algorithme est effectuée. Pour ce faire, l'image de probabilité est convertie en 8 bits et est divisée par 255 afin d'avoir des valeurs de pixel comprises entre 0 et 1 uniquement. Puis il suffit de multiplier l'image originale avec l'image de probabilité divisée pour visualiser en noir la segmentation effectuée (conf. Fig. 63-C-F). Si cette segmentation n'est pas optimale, il est nécessaire de continuer à entraîner le programme. À la suite de la vérification, une dernière étape a été réalisée avant l'analyse de l'étendue de l'activité ostéoclastique. En effet, l'image originale a été soustraite à l'image de probabilité convertie en 8 bits afin de ne faire ressortir que l'activité ostéoclastique, donnant une nouvelle image RVB. Une segmentation finale du canal rouge nous a permis d'affiner notre segmentation en ne prenant en compte que les intensités de pixels compris entre 70 et 255. Pour les deux autres canaux (bleu et vert), toutes les gammes d'intensité ont été prises en compte (conf. Fig. 63-G-H). Enfin, la surface occupée par les ostéoclastes, exprimée en mm<sup>2</sup>, a pu être déterminée pour chacune des ROIs.



## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

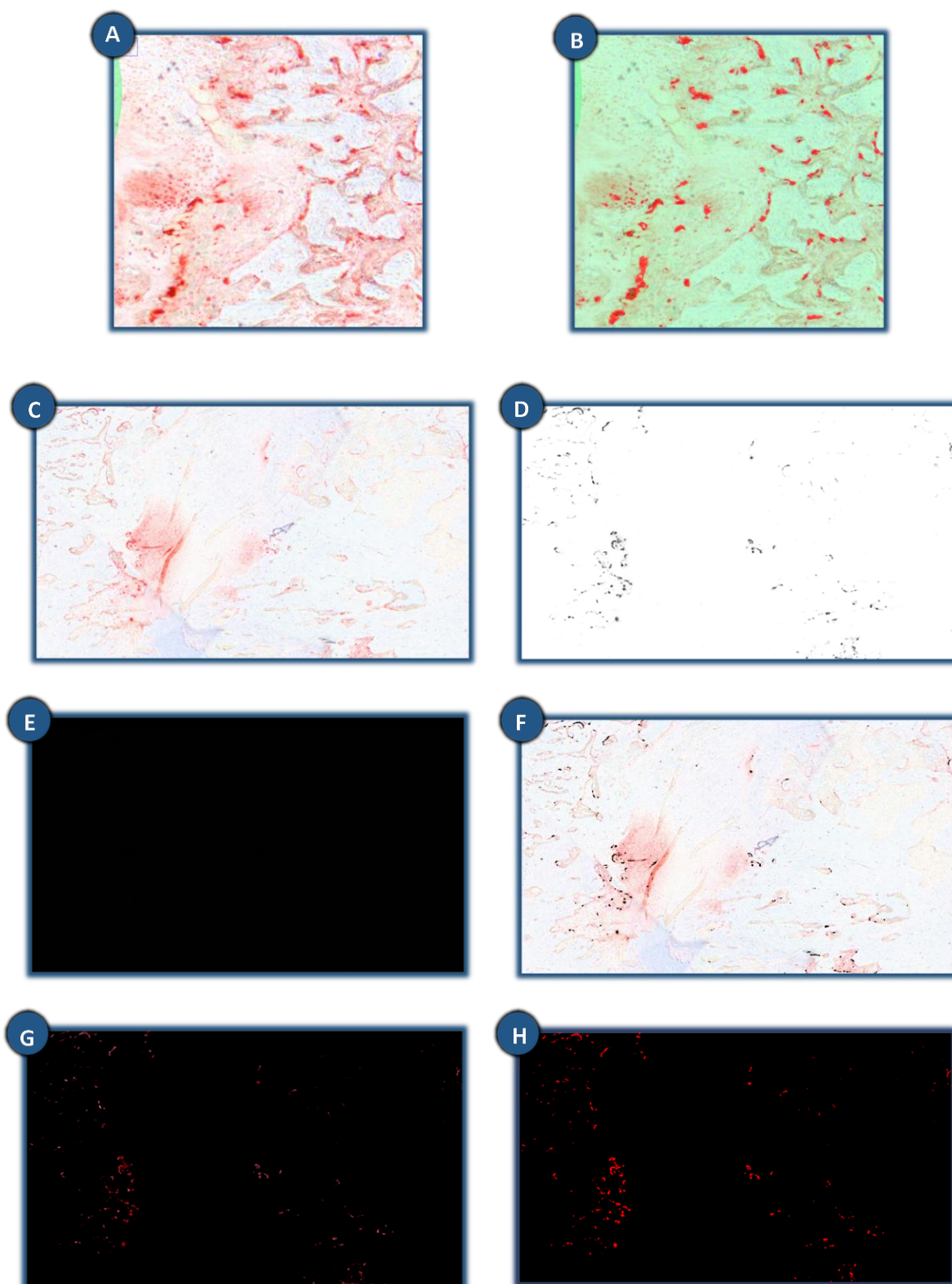


Figure 63 : Représentation des étapes de segmentation effectuée à partir du logiciel TWS.

**A-B.** Résultat de la segmentation du logiciel TWS. **C-F.** Étape de vérification de la segmentation donnée par TWS.

**G-F.** Segmentation finale permettant le calcul de l'activité ostéoclastique.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 5. Mobilisation des cellules ostéo et vasculo-progénitrices par la cytométrie en flux.

### 5.1. Principe

La cytométrie en flux (CMF) est un outil permettant d'effectuer des analyses multiparamétriques, utilisé autant en clinique qu'en recherche. Cette technique est le fruit d'un travail transdisciplinaire entre la physique, la biologie ainsi que l'informatique dans l'optique d'une caractérisation individuelle, qualitative et quantitative de cellules ou particules en suspension dans un liquide. En effet, les cellules ou particules peuvent être distinguées du fait de leurs tailles, leurs structures (granulation) et leurs immunophénotypes.

Un cytomètre est constitué de trois composants principaux : un système fluidique, un système optique et un système informatique (conf. Fig. 64-A) [282]. Le premier composant est le système fluidique qui permet d'étudier des cellules/particules uniques en les séparant et les alignant sans déformation, grâce à la focalisation hydrodynamique exercée par le liquide composé généralement d'une solution saline tamponnée au phosphate. L'intérêt de ce système est de créer un flux laminaire via un différentiel de pression, permettant ainsi aux cellules ou particules en suspension de passer une à une devant la source lumineuse. De plus, en fonction du type d'analyse effectuée, il est possible de modifier la pression exercée sur le système testé et donc de modifier le débit d'injection des cellules ou particules dans la source lumineuse. Par exemple, pour des analyses sur des vésicules extracellulaires [283], il sera préférable d'utiliser un débit dit « lent » ( $10\mu\text{L}/\text{mn}$ ) afin de maximiser la précision des paramètres analysés. L'inconvénient cependant est qu'il en résulte une faible quantité de cellules analysées. À l'inverse, pour des marquages immunophénotypiques classiques de cellules ou pour la détection d'évènements rares, il sera conseillé de paramétrer un débit dit « fort » ( $60\mu\text{L}/\text{mn}$ ). Le deuxième composant correspond au système optique, et est constitué d'une source lumineuse généralement monochromatique de type laser. En fonction du système, il est possible d'avoir de multiples sources lumineuses colinéaires (focalisation centrée) ou décalées (succession de lasers) permettant ainsi une caractérisation simultanée de plusieurs intensités de fluorescence. En effet, la CMF repose sur la présence potentielle d'une sonde fluorescente (anticorps couplé à un fluorochrome, protéine ou molécule fluorescente) à la surface ou dans la cellule. Ce point sera développé plus bas.

Les fluorochromes sont des substances chimiques photoréactives capables d'absorber de l'énergie grâce à l'interaction entre un photon de lumière (laser) et à l'excitation d'électrons

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

de la structure atomique du fluorochrome [284]. On parle alors de transition radiative, résultant sur une émission lumineuse lors du retour à l'état stable (conf. Fig. 64-B).

De plus, chaque fluorochrome est sensible à une certaine longueur d'onde d'excitation déterminée. Par exemple, le laser bleu a une longueur d'onde d'excitation de 488nm, et est capable d'induire une longueur d'onde dite d'émission de la fluorescéine (FITC, fluorochrome) à 535nm [285]. En revanche, pour le fluorochrome allophycocyanine (APC), dont la longueur d'émission est aux alentours de 661nm, il faudra utiliser un laser rouge de longueur d'onde 640nm pour l'exciter [284]. Cependant, plusieurs fluorochromes peuvent être excités par un même laser et donc par une même longueur d'onde. C'est pourquoi les fluorochromes sont généralement rassemblés en famille en fonction de leur seuil d'excitation. De surcroît, il existe un différentiel entre le spectre d'absorption et le spectre d'émission nommé « déplacement de Stokes » (conf. Fig. 64- C). Ce phénomène vient du fait que le système perd de l'énergie sous forme thermique lors de son retour à l'état initial et par conséquent la longueur d'onde d'émission augmente. Ce décalage observé est propre à chacun des fluorochromes puisqu'il dépend de la composition chimique de celui-ci [284].

En résumé, l'utilisation de plusieurs lasers permet de mettre en évidence la présence et l'intensité relative de plusieurs fluorochromes simultanément et donc d'affiner et multiplier les marqueurs contribuant à la caractérisation de plus en plus fine de l'objet analysé.

La deuxième partie du système optique est un banc optique formé de miroirs dichroïques et de filtres. L'intérêt de ce dispositif est d'induire une séparation des longueurs d'ondes émises par les fluorochromes, et une captation de ces photons dans des détecteurs dédiés (photomultiplicateurs ou avalanche photo diode). En effet, un miroir dichroïque est un filtre semi-réfléchissant pouvant dévier une certaine plage de longueurs d'onde déterminée tout en autorisant la transmission des autres. Par conséquent, les miroirs dichroïques autorisent une première étape de séparation des longueurs d'onde vers les détecteurs spécifiques. Les filtres (passe-bandes, passe-bas et passe-haut) jouent quant à eux le même rôle de séparateurs en permettant la transmission de certaines longueurs d'onde en fonction de leurs seuils d'absorption et l'élimination d'autres [282]. Le système informatique est la troisième et dernière partie d'un cytomètre. Une fois les longueurs d'onde déviées et séparées, celles-ci sont détectées par un photomultiplicateur qui garantit la conversion du signal photonique en un signal électrique quantifiable numériquement. Son fonctionnement se base sur l'utilisation d'une photocathode qui émet un faible courant électrique via l'action des photons diffractés. Ce courant est par la suite amplifié et un convertisseur analogique-numérique situé en bout de

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

chaîne traduit le signal électronique en une valeur numérique intelligible par l'ordinateur. Le même principe global (conversion photon-électrons) est appliqué dans le cas des avalanches photodiodes.

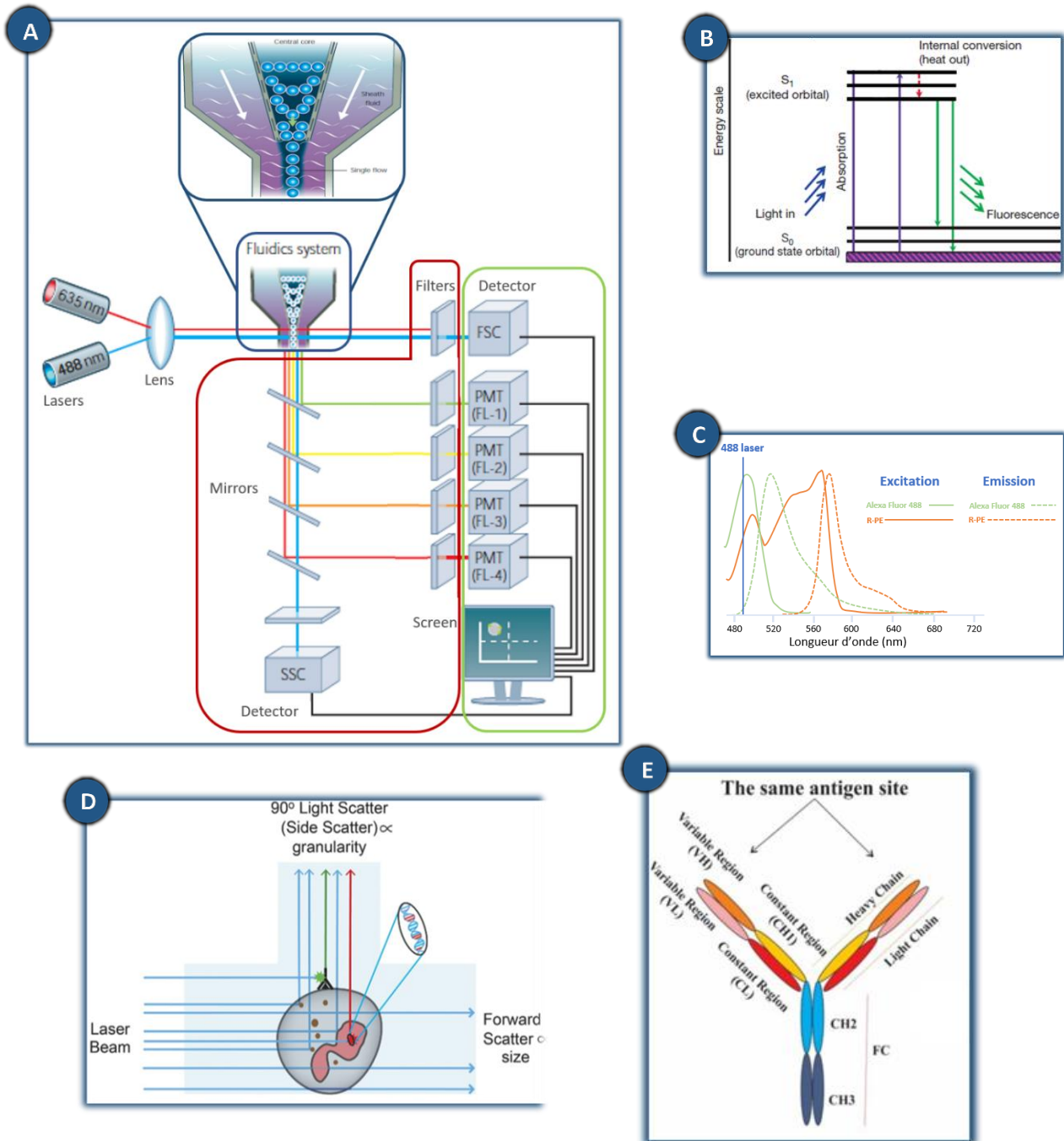


Figure 64 : Schématisation des trois composants formant le cytomètre en flux et les paramètres analysés. **A.** L'illustration est tirée de l'article de Rahman, M, *Introduction to flow cytometry*. En bleu, reproduction du système fluidique. En rouge, zone délimitant le système optique. En vert, représentation du système électronique. **B.** Le principe de transition radiative. **C.** Représentation des spectres d'émission de deux fluorochromes (Alexa Fluor 488 et R-PE) excités par une même longueur d'onde à 488nm. **D.** Paramètres basés sur le principe de diffusion de la lumière : le Forward scatter (FSC) et le Side scatter (SSC). **E.** Représentation de la structure d'un anticorps, provenant de l'étude de Hosseini et al,2020. L'anticorps est constitué de deux chaînes lourdes (bleu, jaune et orange) et de deux chaînes légères (rouge et rose). Les fragments variables sont représentés en rose et orange pour les chaînes légère et lourde respectivement. Le reste des couleurs correspondent aux fragments constants.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 5.2. Les paramètres analysés

La CMF permet de caractériser de nombreux paramètres, autorisant ainsi la discrimination des événements biologiques analysés.

Deux paramètres portent sur le principe de diffusion et de diffraction de la lumière. Une fois que l'objet étudié est passé dans le faisceau du laser, un phénomène de diffraction et de réfraction de cette onde va se produire. L'intensité de la lumière diffractée est captée par le détecteur FSC (Forward-angle Scatter) dans l'axe du laser, et nous donne une information relative de la taille de la cellule. La diffraction est également captée à 90° du laser, sur le paramètre appelé SSC (Side-angle Scatter), nous indiquant la complexité interne via la lobularité ou la granulosité de l'objet étudié (granulosité) (conf. Fig. 64-D).

Les autres paramètres reposent sur captation de fluorescence, potentiellement par l'utilisation d'anticorps, couplé à un fluorochrome (réactif exogène), dirigé contre des glycoprotéines membranaires spécifiques. Les anticorps sont des glycoprotéines complexes en forme de Y, appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig) pouvant se lier à un antigène qui sont des macromolécules. Les anticorps sont constitués de 2 chaînes lourdes polypeptidiques et de deux chaînes légères polypeptidiques qui sont reliées par des ponts disulfures. Une chaîne lourde est communément composée d'un seul fragment variable (unique à l'anticorps) et de plusieurs fragments constants (similaires d'un anticorps à l'autre). Cette partie n'intervient pas dans la reconnaissance de l'antigène et c'est à ce niveau que le fluorochrome sera lié. On parle ainsi du domaine effecteur de la molécule, appelé fragment Fc (Fragment constant).

À l'inverse, on retrouve le fragment « Fab » qui constitue le domaine de reconnaissance de l'antigène (extrémité du Y). Il est composé des fragments variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère, permettant ainsi l'identification de l'antigène spécifique. Ensuite, on retrouve les parties constantes des deux chaînes. La terminologie « ab » signifie « antigen-binding » [284] (conf. Fig.64-E).

Dans le cas de la CMF, les antigènes ciblés sont souvent des glycoprotéines membranaires qui sont communément nommées clusters de différenciation (CD). C'est donc par l'expression ou non de ces molécules de surface (CD) que la caractérisation phénotypique des populations cellulaires pourra se faire.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 5.3. Protocole du marquage pour la CFM

### a. Les prélèvements sanguins

Dans notre étude, trois types cellulaires ont été analysés : les CSPHs, les CPEs et les CSMs. Afin de pouvoir effectuer une quantification absolue de la concentration des cellules mobilisées, nous avons dû récupérer le milieu où baignent ces éléments : le sang périphérique.

Les animaux ont été préalablement répartis aléatoirement en 2 groupes. Le premier constituait le groupe traité avec 6 animaux et le second représentait le groupe témoin avec 4 animaux puisque 2 animaux du groupe contrôle sont décédés pendant les anesthésies. Les prélèvements ont été effectués à 6 temps différents (avant l'opération (-2) et à 7, 11, 17, 24, 31 jours après l'opération) afin de pouvoir déterminer les cinétiques de mobilisation au cours du processus de DO de chaque groupe, et ainsi mieux comprendre l'interaction entre le facteur de croissance et le mécanisme de régénération osseuse.

Pour ce faire, les animaux ont été anesthésiés via une sédation gazeuse halogénée à l'isoflurane (Isoflurin<sup>®</sup>) avec une induction à 3 % et une phase de maintien de 1,5 %. La queue de l'animal a ensuite été désinfectée avec de l'éthanol à 70°. L'ajout d'éthanol est intéressant, car il favorise la vasodilatation des vaisseaux, facilitant ainsi le prélèvement. De plus, pour accentuer cet effet vasodilatateur, des chaufferettes ont été positionnées sous la queue de l'animal. Un cathéter sans ailettes de 24G (0.7\*0.19mm, BD Insite<sup>®</sup>), préalablement rincé à l'EDTA, a été inséré au niveau de la veine caudale du rongeur, à un angle d'environ 30° permettant la collecte d'un volume de 300µl de sang périphérique. Sachant que chez un rat de 500g on retrouve 32ml de volume circulant, le volume sanguin prélevé correspond donc à 1% de ce volume circulant, ce qui n'entraîne aucune conséquence clinique et hémodynamique de l'animal. Les prélèvements sanguins ont été recueillis dans des tubes contenant de l'EDTA agissant comme anticoagulant (10,8µl de 50mg/ml d'EDTA) et ont été conservés dans de la glace le temps de la caractérisation immunophénotypique.

Les prélèvements sanguins, qui ont été effectués les mêmes jours que les analyses TEP, ont été réalisés avant l'injection du radiotracer, évitant ainsi à l'animal une double sédation. De plus, dans l'optique de minimiser les variations des métabolites sanguins, tous les prélèvements ont été accomplis en début de matinée, permettant de débiter l'analyse cytométrique en fin de matinée.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## b. Le marquage immunophénotypique

Pour notre expérimentation, nous avons choisi un marquage d'immunofluorescence de type direct et non indirect. Le marquage par méthode directe correspond à l'utilisation d'anticorps primaires couplés directement au fluorochrome. En revanche, lors d'une caractérisation par méthode indirecte, un anticorps primaire non marqué est reconnu spécifiquement par un anticorps secondaire qui lui est couplé au fluorochrome.

L'utilisation de la méthode directe nous a permis un gain de temps puisqu'il y a une étape d'incubation et de lavage en moins ainsi qu'un gain financier du fait de l'utilisation d'un seul anticorps. Cependant, le point qui a orienté notre stratégie de marquage est que pour réaliser la caractérisation immunophénotypique de nos cellules cibles, un marquage simultané de plusieurs anticorps était nécessaire. Or il est connu,

que lors de marquages indirects, la réactivité interspèces des anticorps secondaires peut poser des problèmes.

Pour réaliser les marquages immunophénotypiques, des tubes de cytométrie de 5ml (Sarstedt®) ont été utilisés afin de permettre l'incubation des anticorps avec le sang préalablement prélevé. Pour ce faire, chaque tube a été identifié en fonction de l'animal et de la population caractérisée. En tout, trois tubes par animal ont été utilisés permettant la caractérisation des trois types cellulaires ciblés. Les anticorps ont été déposés à l'aide d'une pipette à piston (2-20µl, Eppendorf® ou 0.5-10µl, Eppendorf®) dans les tubes de cytométrie placés en amont dans de la glace. Pour chaque type d'immunophénotypage une combinaison d'anticorps spécifiques à une concentration saturante a été mélangée puis incubée 30 minutes avec l'échantillon de sang (100µl) (conf. Tableau 5 et 6), sur glace et à l'obscurité.

Les échantillons ont ensuite été mélangés à une solution tampon de lyse faite maison contenant du chlorure d'ammonium (8.26mg/ml), du bicarbonate de potassium (0.001mg/ml), de l'EDTA (0.037mg/ml) et de l'eau distillée, ceci afin d'éliminer les globules rouges interférant dans l'analyse finale. Le volume d'injection du tampon de lyse dans les échantillons respectait un rapport 1 pour 10, donc 1000µl de solution ont été mélangés pour chaque aliquote. Les tubes ont été passés au vortex avant une deuxième incubation de 15 minutes. La lyse est considérée efficace si la solution n'est absolument plus opaque.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

**Tableau 5 : Marquage des différentes populations cellulaires**

Type cellulaire	Anticorps	Information marquage	Dosage
CSPH	CD34 <sup>+</sup>	Marqueur Hématopoïétique	10µL pas de dilution
	CD45 <sup>dim</sup>	Marqueur Leucocytaire	2µL pas de dilution
	IgG contrôle	Contrôle isotypique du CD309	
CPE	CD34 <sup>+</sup>	Marqueur Hématopoïétique	10µL pas de dilution
	CD45 <sup>dim</sup>	Marqueur Leucocytaire	2µL pas de dilution
	CD309 <sup>+</sup>	Marqueur Endothéliale	2µL pas de dilution
CSM	CD44 <sup>+</sup>	Marqueur exprimer par la plupart des cellules de mammifère	3µL dilué 20 fois
	CD73 <sup>+</sup>	Marqueur Mésoenchymateux	4µL pas de dilution
	CD90 <sup>+</sup>	Marqueur Mésoenchymateux	2µL pas de dilution
	*CD271 <sup>+</sup>	Marqueur d'une <i>sous-population</i> de CSM	4µL pas de dilution
	CD45 <sup>-</sup>	Marqueur Leucocytaire	2µL pas de dilution

\*Deux sous-populations de CSMs ont été analysées. Le premier marquage comprenait le CD44, le CD90, le CD73 et le CD44. Le second marquage correspondait au même cluster de différenciation avec le CD271 en plus.

**Tableau 6 : Fluorochromes utilisés lors de l'expérimentation**

Anticorps	Fluorochrome	Isotype	Référence
CD44	A647		Ozyme - BLE203908
CD34	ECD		Beckman coulter - B49202
CD45	APC/Cy7		Biologende - BLE202216
CD309	A488	IgG isotype contrôle A488	Cliniscience - BS-10412R
CD90	FITC		Biologende - BLE206105
CD73	A594		Cliniscience - BS-4834R
CD271	PE		Thermo Fisher – 12-9400-41



# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 5.4. Acquisition des données cellulaires

L'ensemble des sous-populations présentes dans les échantillons sanguins a pu être mesuré grâce au cytomètre en flux CytoFLEX LX (Beckman Coulter®). À l'aide des prétests, chaque analyse a été effectuée avec des paramètres de fluorescence optimisés via les réglages des gains pour obtenir le rapport Signal/Bruit le plus fort et l'application de corrections de signal (appelées compensations) pour éliminer les potentiels chevauchements spectraux.

De plus, un minimum de 100000 événements par échantillon a été acquis, sachant que lors de nos essais le volume sanguin total au sein des tubes de cytométrie a été aspiré par la machine à une vitesse de 81µl/min. Le temps moyen par échantillon était de 15 minutes.

## 5.5. Traitement des données

### a. L'analyse de données

L'analyse des données a été effectuée via le logiciel Kaluza Analysis (Beckman Coulter®). La première étape de traitement des données a été similaire pour toutes les populations, permettant l'élimination des débris cellulaires ainsi que des doublets de cellules via le cytogramme SSC versus FSC (conf. Fig 65). Étant donné l'utilisation d'anticorps spécifiques à chaque type cellulaire, la stratégie d'analyse (« gating ») a donc été définie de manière individuelle. En amont de la description des stratégies de gating, il est important de stipuler que chaque limite d'expression d'un marqueur (zone positive ou négative) a été définie selon l'animal en début de protocole. Ce dernier a été spécifiquement ajusté, car il existe des variations d'expression entre les animaux. Une fois ajusté, il est resté similaire tout au long de l'étude.

Concernant les CSM, l'identification est basée via un gating sur l'expression à la surface des cellules de CD90 et CD73. L'intérêt ici était de définir la zone où les cellules étaient positives au marquage (CD90<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup>) que l'on appellera population 1 (conf. Fig. 65-C). Ensuite, nous avons pu rechercher sur cette population les cellules négatives au marquage 45 (CD45<sup>-</sup>) et les cellules positives au marquage 44 (CD44<sup>+</sup>). Donc ici, nous avons mis en place une stratégie de gating nous permettant de mettre en évidence une population de CSMs dont la caractérisation immunophénotypique était la suivante : CD90<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>.

La deuxième sous-population de CSM analysée dans cette étude était caractérisée par un marquage positif au CD271 et est intitulée CSM-271. Pour ce faire, il nous a fallu analyser le nombre de cellules positives à ce marquage parmi notre population de CSM précédemment

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

caractérisée. Cette sous-population exprime donc positivement les marqueurs CD90, CD73, CD44, CD271 et négativement le marqueur CD45.

À propos des CSPH, la caractérisation est basée dans un premier temps sur le marquage CD45 au sein de la population cellulaire générale de l'échantillon. Cette stratégie nous a permis de différencier selon l'intensité du signal les cellules CD45<sup>dim</sup> (ayant une expression faible) et les CD45<sup>+</sup> (expression forte de CD45) (conf. Fig. 65-A).

Pour finir, il nous a fallu regarder le signal CD34<sup>+</sup> parmi la population cellulaire dont l'expression de CD45 était faible. Dans cet échantillon, afin de déterminer de façon très fine la présence potentielle de CD309 à la surface des cellules, nous avons utilisé un isotype contrôlé (conf. Fig. 65-B). Il s'agit d'un anticorps, dont la partie constante est similaire à l'anticorps ciblé (ici le CD309), couplé lui aussi au même fluorochrome (ici A488), mais dont la partie variable ne reconnaît aucune séquence protéique de l'animal en question. S'il y a une expression positive dans le canal du fluorochrome marquant le CD309, alors cette réponse est non spécifique. C'est pourquoi, lors du traitement des données, le nombre de cellules marquées par l'isotype dans le canal A488 a été déduit du marquage d'intérêt lors de la caractérisation des CEP.

La dernière population d'intérêt concerne justement les CPE. La première phase concernant la stratégie de gating était similaire à celle des CSPHs. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'expression positive au marquage CD309 au sein de cette population. Les stratégies mises en place pour les diverses caractérisations immunophénotypiques, nous ont permis de quantifier le nombre absolu de ces différentes populations cellulaires dans le sang et d'obtenir ainsi une cinétique de mobilisation de celles-ci au cours du processus de DO.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

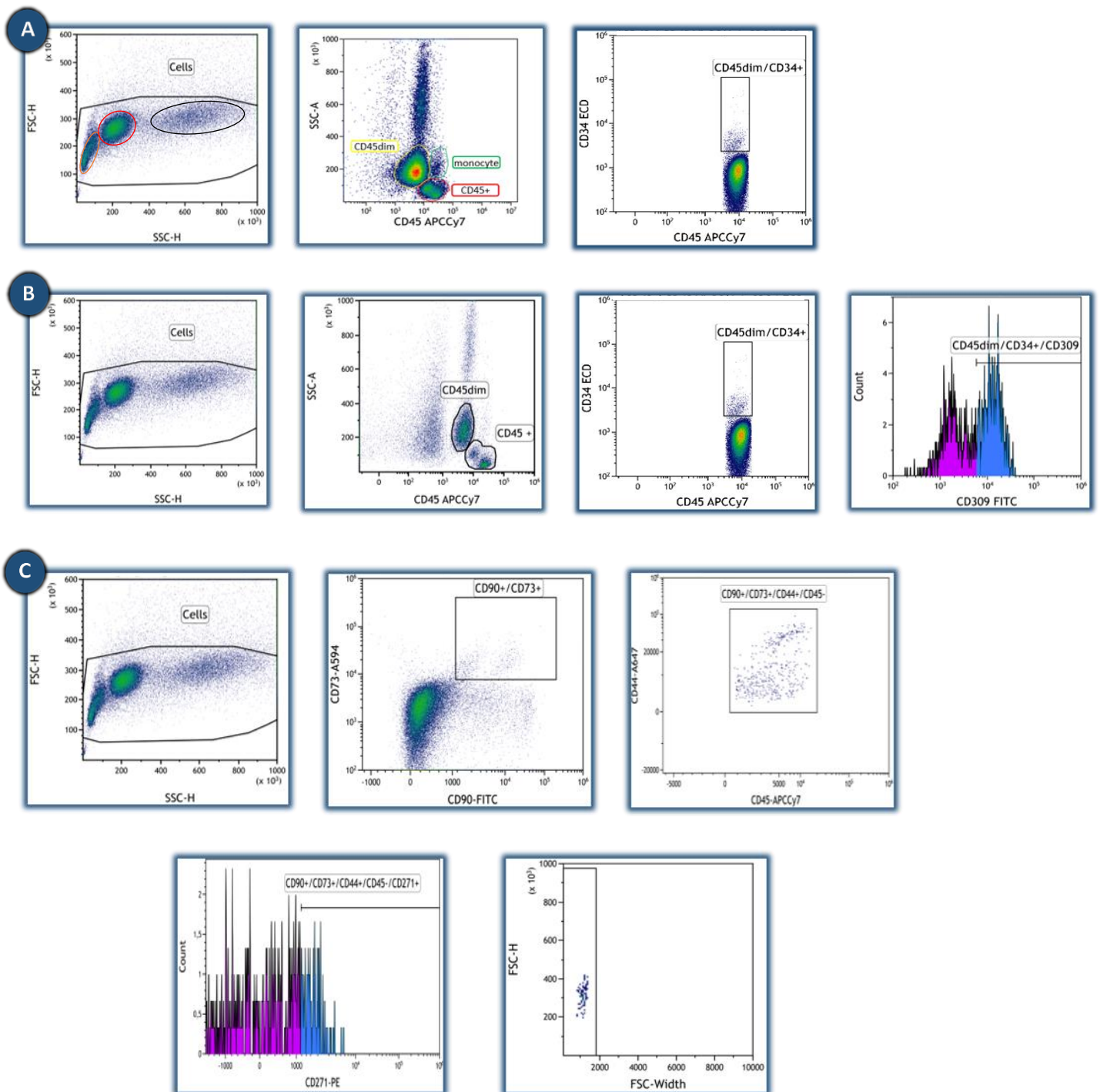


Figure 65 : Stratégie de gating des trois populations analysées au cours de la DO chez le rat. **A.** Caractérisation des CSPH via marquage immunophénotypique suivant :  $CD34^+/CD45^{dim}$ . (1) Nuage de points obtenu par le FSC et le SSC. Le cercle orange représente les lymphocytes, en rouge les monocytes et en noir les granulocytes. (2) Ciblage des  $CD45^{dim}$ . (3) Obtention des cellules  $CD34^+$  parmi les  $CD45^{dim}$ . **B.** Détermination des CPE dont le marquage immunophénotypique est  $CD34^+/CD45^{dim}/CD309^+$ . (1-3) Étapes similaires au marquage des CSPH. (4) Analyse du nombre de cellules qui expriment positivement le CD309. **C.** Ciblage des CSM via les marqueurs  $CD90^+/CD73^+/CD44^+/CD45^-$ . (1) Suppression des débris. (2) Isolation des cellules positives au CD90 et CD73. (3) Détermination des cellules  $CD44^+/CD45^-$  parmi les  $CD90^+/CD73^+$ . (4) Caractérisation d'une sous-population de CSM nommée CSM-271 qui exprime positivement le marqueur CD271. (5) Vérification de l'homogénéité de la population  $CD90^+/CD73^+/CD44^+/CD45^-/CD271^+$ .

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## b. Calcul des concentrations absolues

L'ensemble des informations obtenues via le logiciel Kaluza a été retransmis dans un fichier Excel (Microsoft<sup>®</sup>) et organisé en fonction du type cellulaire, du temps de la cinétique et de l'animal. Les données obtenues se présentaient sous forme d'évènements correspondant au nombre de cellules analysées dans l'échantillon sanguin. Sachant qu'une population est définie par un cluster d'au moins 20 évènements, les évènements en deçà de ce nombre étaient donc comptabilisés comme nuls.

Afin d'obtenir une quantification de la concentration absolue de nos populations, il nous a fallu dans un premier temps calculer le facteur de dilution de nos tubes, suivant l'équation suivante :

$$V_T = V_S + V_A + V_L$$

Avec  $V_T$  ( $\mu\text{l}$ ) le volume total,  $V_S$  ( $\mu\text{l}$ ) le volume sanguin,  $V_A$  ( $\mu\text{l}$ ) le volume d'anticorps utilisé par population et  $V_L$  ( $\mu\text{l}$ ) le volume de lyse

Grâce au calcul du volume total par population, nous avons pu déterminer le facteur de dilution pour chacune de nos populations :

$$F_d = V_T / V_S$$

Avec  $F_d$  pour le facteur de dilution,  $V_T$  le volume total et  $V_S$  le volume sanguin.

À l'aide du facteur de dilution précédemment évalué, nous avons pu calculer le volume réel ( $\mu\text{l}$ ) en divisant le volume total lu par la machine par le facteur de dilution. Pour finir, la concentration absolue de nos trois populations à chaque temps d'observation a pu être obtenue selon l'équation suivante :

$$C_a = \left( N / V_r \right) \times 1000$$

Avec  $C_a$  la concentration absolue en ml,  $N$  le nombre de cellules enregistrées par la machine de cytométrie et  $V_r$  le volume réel en  $\mu\text{l}$ . Le tout a été multiplié par 1000 afin d'obtenir une concentration exprimée en nombre de cellules par millilitre.

## 6. La caractérisation mécanique à l'échelle macroscopique

La mise en place d'essais de flexion 3 points (F3P) nous ont permis de déterminer les propriétés mécaniques des cals distractés après 7 semaines de consolidation. En tout 3 échantillons appartenant au groupe G-CSF et 4 au groupe contrôle ont été analysés. Un des fémurs

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

appartenant au groupe G-CSF a bougé lors de l'essai empêchant l'obtention des propriétés mécaniques de ce dernier. Les fémurs controlatéraux ont également été caractérisés mécaniquement.

## 6.1. Protocole des essais mécaniques de flexion trois-points

Le système utilisé était une machine Instron 5565A (INSTRON®), dont l'erreur relative du capteur de force utilisé 1000N est de 0.1% en traction/compression et la résolution de 0.0025N. En amont de la caractérisation mécanique, les tissus osseux ont été décongelés à température ambiante. De plus, pour éviter une déshydratation des tissus, lors de la décongélation et pendant l'essai de F3P, les échantillons ont été maintenus dans une gaze contenant une solution saline et régulièrement aspergés. La mise en place du dispositif pour la caractérisation mécanique a été similaire pour tous les échantillons. Tout d'abord, les deux appuis fixes de rayon 1mm étaient espacés de 18mm. Concernant l'orientation des échantillons, il a été convenu que la tête fémorale était positionnée à droite vis-à-vis des deux appuis fixes et que les fémurs étaient positionnés horizontalement avec la surface antérieure vers le haut. Ensuite, grâce au logiciel Blue Hill 3, nous avons pu paramétrer la vitesse de déplacement de la cellule de charge. L'appui mobile se déplaçait à 0.5mm/min et venait appliquer une charge dirigée verticalement au milieu de l'échantillon. Cette configuration était critique du fait que la charge était appliquée directement au niveau de la structure osseuse nouvellement formée. Une pré-contrainte de 5N nous a permis de stabiliser l'échantillon avant le début de l'essai. L'ensemble des données force/déplacement a été récupéré et traité sur Matlab. Les données obtenues sont la force maximale en N, la rigidité en N/mm, la contrainte maximale en MPa, le module d'Young en MPa ainsi que l'énergie à la force maximale en mJ. L'ensemble de ces données ont été calculées grâce aux équations utilisées dans le chapitre 2.

## 7. Statistique

Les données recueillies ont été exprimées en valeurs moyennes avec l'erreur type de la moyenne. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel XLSTAT. Avant chaque test statistique, toutes les données mesurées ont été testées pour la distribution normale avec le test de Shapiro ( $P > 0,05$ ). Les comparaisons multiples entre les groupes et le temps ont été testées avec une ANOVA à mesures répétées en utilisant les modèles mixtes. Celles-ci ont été suivies par des tests post hoc avec le test de Fisher dit LSD. Pour les tests histologiques, des tests non paramétriques de Mann-Whitney U ont été utilisés, car les données ne suivaient pas

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

la distribution normale. Une différence était considérée comme significative à partir d'une p-value de 0.05 peu importe le test statistique appliqué.

## III. Résultats

### 1. Le G-CSF a modifié le profil cinétique de mobilisation des CSPH

L'administration de G-CSF a induit une modification significative du profil cinétique de mobilisation des CSPH. Dans le groupe de contrôle, une augmentation progressive du nombre des CSPH a été observée tout au long du protocole de DO (conf. Fig.66-B). À la fin de la période de latence (J7), le niveau de CSPH était de  $1896 \pm 315$  cellules/ml et a continué à augmenter de façon significative ( $p < 0,05$ ) pour atteindre  $4128 \pm 135$  cellules/ml après 2 semaines de consolidation (J31) (conf. Fig. 67-B). En revanche, dans le groupe G-CSF, la concentration de CSPH a atteint un pic significatif pendant la phase de distraction (J11) à  $4908 \pm 458$  cellules/ml comparée au groupe contrôle ( $p < 0,01$ ). (conf. Fig. 66-A). Par la suite, les niveaux de concentration de CSPH ont été similaires entre les deux groupes jusqu'à J31. Lors des comparaisons intragroupes pour le G-CSF, on constate une différence significative entre J11 et J7 ainsi que J17 ( $p < 0,01$ ). Ensuite, de J17 à J31, le nombre de CSPH augmente progressivement pour atteindre des valeurs significatives par rapport à la fin de latence ( $p < 0,05$ ).

### 2. Le G-CSF n'a pas eu d'effet sur le profil de mobilisation des CPE

L'analyse du profil de mobilisation des CPE n'a pas montré de différences manifestes entre le groupe G-CSF et le groupe contrôle. Cependant, un effet significatif du temps a été observé tout au long du processus de distraction ( $p < 0,004$ ) (conf. Fig. 66-C). En effet, à la fin de la période de latence (J7), une légère augmentation pour chaque groupe a été observée par rapport au niveau de base. Pendant la phase précoce de la période de distraction active, la concentration de CPE dans le sang était constante entre les deux groupes. Ensuite, la mobilisation des CPE dans le sang a augmenté et a atteint un pic significatif à la fin de la phase de distraction (J17) pour les deux groupes avec  $537 \pm 225$  cellules/ml pour le groupe témoin et  $896 \pm 222$  cellules/ml pour le groupe G-CSF, par rapport au niveau de base (J-2) ( $p < 0,05$ ). L'augmentation obtenue était donc plus importante pour le groupe G-CSF avec un niveau 1,7 fois supérieur à celui du groupe de contrôle, même si aucune différence statistique n'a été observée entre les deux. Par la suite, la concentration de CPE a diminué au cours de la première période de consolidation et

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

a atteint une différence statistique avec le J17 ( $p < 0,01$ ). La concentration en CPE dans le sang périphérique a fini par atteindre une valeur minimale à deux semaines de consolidation (J31) avec  $124 \pm 43$  cellules/ml pour le groupe de contrôle et  $110 \pm 39$  cellules/ml pour le groupe G-CSF.

### 3. Le G-CSF a modifié le profil cinétique de mobilisation des CSM

Au cours de notre étude, deux sous-populations de CSM ont été analysées. L'ensemble de ces populations exprimaient positivement le CD44, le CD73, le CD90 et négativement le CD45. La seule différence était vis-à-vis de l'expression positive du CD271.

Pour la première population, le profil cinétique des CSM (conf. Fig. 66-D) est différent entre le groupe témoin et le groupe G-CSF ( $p = 0,035$ ). Dans le groupe de contrôle, à la fin de la période de latence (J7), la concentration en CSM a augmenté par rapport au niveau basal (J-2) (conf. Fig. 66-E). Après 4 jours de distraction (J11), le niveau de CSM a diminué de manière significative par rapport à la fin de la période de latence, passant de  $2512 \pm 386$  cellules/ml à  $986 \pm 293$  cellules/ml ( $p < 0,01$ ). Par la suite, la concentration en CSM a augmenté progressivement pour atteindre à J31 (soit à deux semaines de consolidation) une différence significative ( $2703 \pm 962$  cellules/ml) par rapport au niveau obtenu pendant la phase de distraction active ( $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ ) (conf. Fig. 66-E). Pour le groupe G-CSF, le nombre de CSM ( $1093 \pm 247$  cellules/ml) était significativement inférieur à la fin de la période de latence (J7) par rapport au groupe de contrôle ( $2512 \pm 386$  cellules/ml) ( $p = 0,017$ ) (conf. Fig. 66-D). De J11 à 2 semaines de consolidation (J31), le profil cinétique des CSM était similaire à celui du groupe de contrôle (conf. Fig. 66-D). En effet, une augmentation progressive de la concentration de CSM a été perçue pour atteindre une différence significative par rapport au début du protocole de DO ( $p < 0,05$ ) (conf. Fig. 66-E).

La seconde population exprime positivement le marqueur CD271. Ce dernier révèle une population plus primitive que la première population. La cinétique de mobilisation observée dans les groupes de contrôle et G-CSF a été similaire tout au long du protocole de DO (conf. Fig. 66-F). L'anova répétée en utilisant le modèle mixte a montré un effet significatif du temps ( $p = 0,002$ ). Une augmentation progressive a été observée au cours du protocole de DO pour atteindre une valeur maximale à 2 semaines de consolidation (J31) (conf. Fig. 66-F). Le nombre de CSM marqués avec CD271 était significativement différent entre les premiers temps (J2 et J7) et les derniers (J24 et J31) ( $p < 0,05$ ).

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

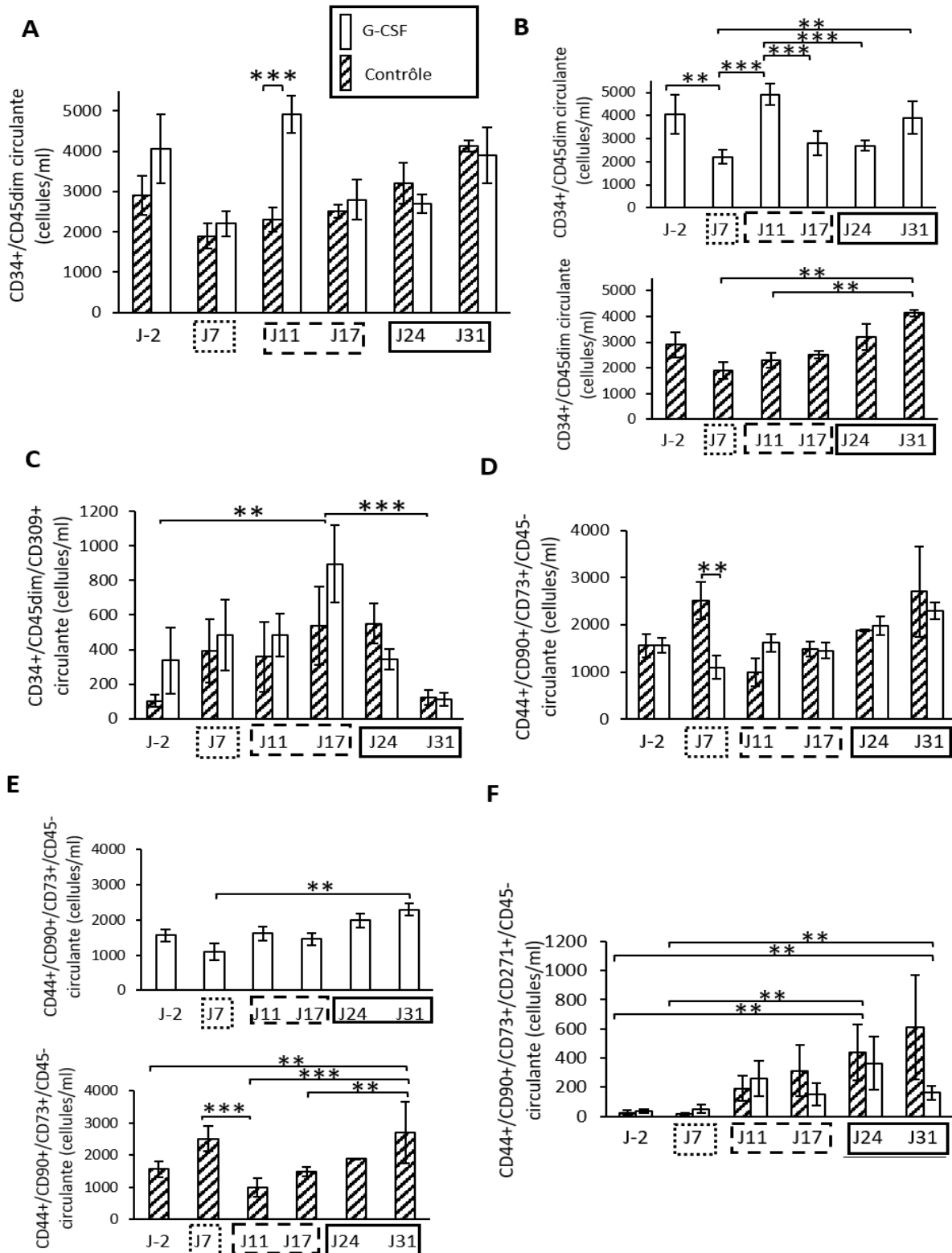


Figure 66 : Mobilisation des CSPH (A et B), des CPE (C) et des CSM (D-F) pendant les trois phases de DO. **A.** Les CSPH montrent un pic significatif de concentration de cellules à J11 pour le groupe G-CSF comparé au groupe contrôle. **B.** Représentation des profils de mobilisation intragroupe des CSPH. **C.** Pour la concentration de CPE, seul un effet du temps a été observé avec un pic significatif sur J17. **D.** Différence statistique dans le profil de mobilisation des CSM à la fin de la latence (J7). **E.** Profil cinétique intragroupe pour la population des CSM. Une augmentation marquée des CSM dans le flux sanguin à J31 (2 semaines de consolidation) est apparente pour les deux groupes. **F.** Pour les cellules CSM-271+, un effet temporel statistiquement significatif a été observé sur les temps précoces de consolidation (J24 et J31) par rapport aux premiers points temporels. ☐ représente la période de latence, ☐ la phase de distraction et ☐ la phase de consolidation. \*\* p < 0,05, \*\*\* p < 0,01, \*\*\*\* p < 0,001, \*\*\*\*\* p < 0,0001.



# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 4. Le G-CSF tend à augmenter le dépôt d'hydroxyapatite à 3 semaines de consolidation

L'anova à mesures répétées en utilisant les modèles mixtes a montré un effet significatif du temps ( $p < 0,0001$ ) (conf. Fig. 67-B). L'absorption moyenne du ratio  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-HDMP}$  a augmenté dès la fin de la période de latence jusqu'à la troisième semaine de la période de consolidation (J38). Au jour 38, l'absorption moyenne normalisée a atteint un maximum, pour diminuer légèrement. À la fin de l'essai, le dépôt de minéraux était toujours effectif avec des rapports moyens de  $2,52 \pm 0,5$  et  $1,94 \pm 0,2$  pour le G-CSF et le groupe témoin respectivement. Lors des essais statistiques, aucune différence n'a été observée dans les profils de dépôt d'hydroxyapatite entre les deux groupes. Cependant, au moment du pic (J38), une différence de 1,5 fois a été observée en faveur du groupe G-CSF avec un ratio moyen de  $3,80 \pm 1,78$  comparé à  $2,47 \pm 0,4$  pour le groupe témoin ( $p = 0,138$ ).

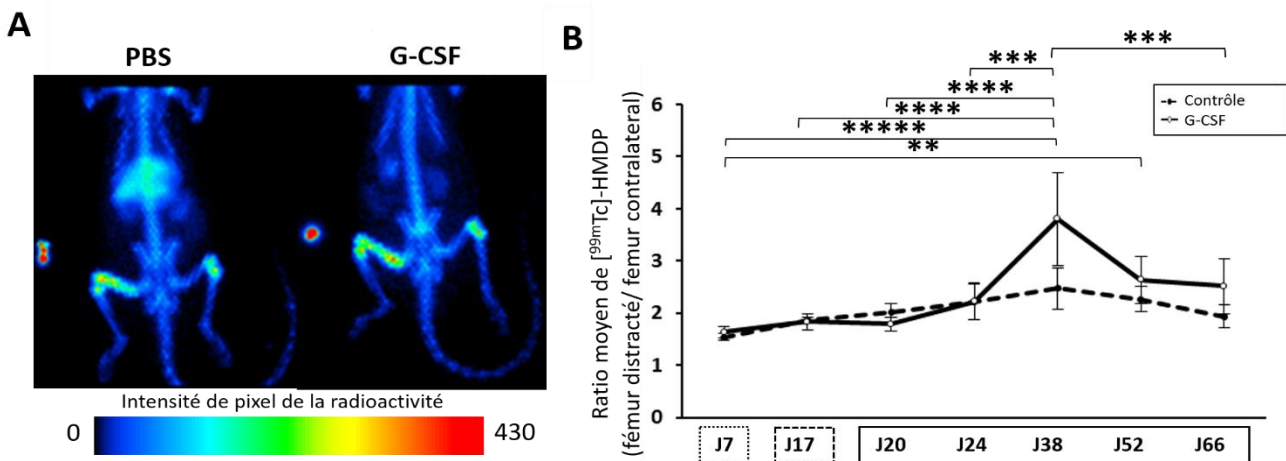


Figure 67 : Évaluation du métabolisme osseux tout au long du protocole de distraction. **A.** Représentation de l'imagerie scintigraphique planaire à 3 semaines de consolidation (J38). Les valeurs maximales de radioactivité sont indiquées en rouge et orange, les valeurs moyennes en jaune et vert, et pour les valeurs les plus faibles de bleu à noir. **B.** La cinétique temporelle du rapport moyen d'absorption est présentée et démontre l'activité des ostéoblastes. La ligne continue correspond au groupe G-CSF tandis que la ligne en pointillé concerne le groupe témoin. À 3 semaines de consolidation (J38), un effet significatif est apparent et diffère de tous les points temporels sauf pour J52 (5 semaines de consolidation). ☐ représente la période de latence, ☐ la phase de distraction, et ☐ la phase de consolidation. \*\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 5. Le G-CSF induit une forte modification temporelle de la vascularisation du régénérat distracté

À la fin de la période de latence (J7), les deux groupes ont montré une forte augmentation du rapport moyen d'absorption avec des valeurs de  $3,38 \pm 0,4$  et de  $3,79 \pm 0,3$  pour le groupe témoin et le groupe GCS-F respectivement. Cela signifie que les processus de vascularisation avaient déjà commencé dans les deux cas. Pendant la phase de distraction, une nette augmentation de l'activité vasculaire a été observée pour les deux groupes. Quatre jours après l'arrêt des forces de traction mécanique (J20), un pic vasculaire statistiquement différent a été atteint pour le groupe témoin avec un ratio moyen d'absorption de  $5,53 \pm 0,6$  ( $p=0.05$ ) et de  $5,57 \pm 0,6$  pour le groupe G-CSF ( $p=0.007$ ) (conf. Fig. 68-C). Pour le groupe témoin, après le pic vasculaire, une baisse significative à  $3,65 \pm 0,6$  a été observée à J24, avec un retour des valeurs d'activité vasculaire comparable à J7. Ce taux s'est maintenu jusqu'à la fin du test (J66) (conf. Fig. 68-C). Par contre, dans le groupe G-CSF, aucune différence statistique n'a été observée dans le ratio moyen d'absorption de [68Ga]-RGD à J24. D'ailleurs, dans ce dernier groupe, un plateau était présent jusqu'à J38 ( $4,71 \pm 0,4$ ). Cependant, une forte baisse significative de l'activité vasculaire a été observée après 5 semaines de consolidation (J52) et maintenue jusqu'à la fin du protocole de DO ( $1,94 \pm 0,3$  et  $1,9 \pm 0,3$  pour J52 et J66 respectivement,  $p < 0,0001$ ) (conf. Fig. 69-C). Cette baisse marquée était statistiquement différente des valeurs obtenues par le groupe de contrôle ( $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  pour D52 et D66 respectivement) (conf. Fig. 68-B).

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

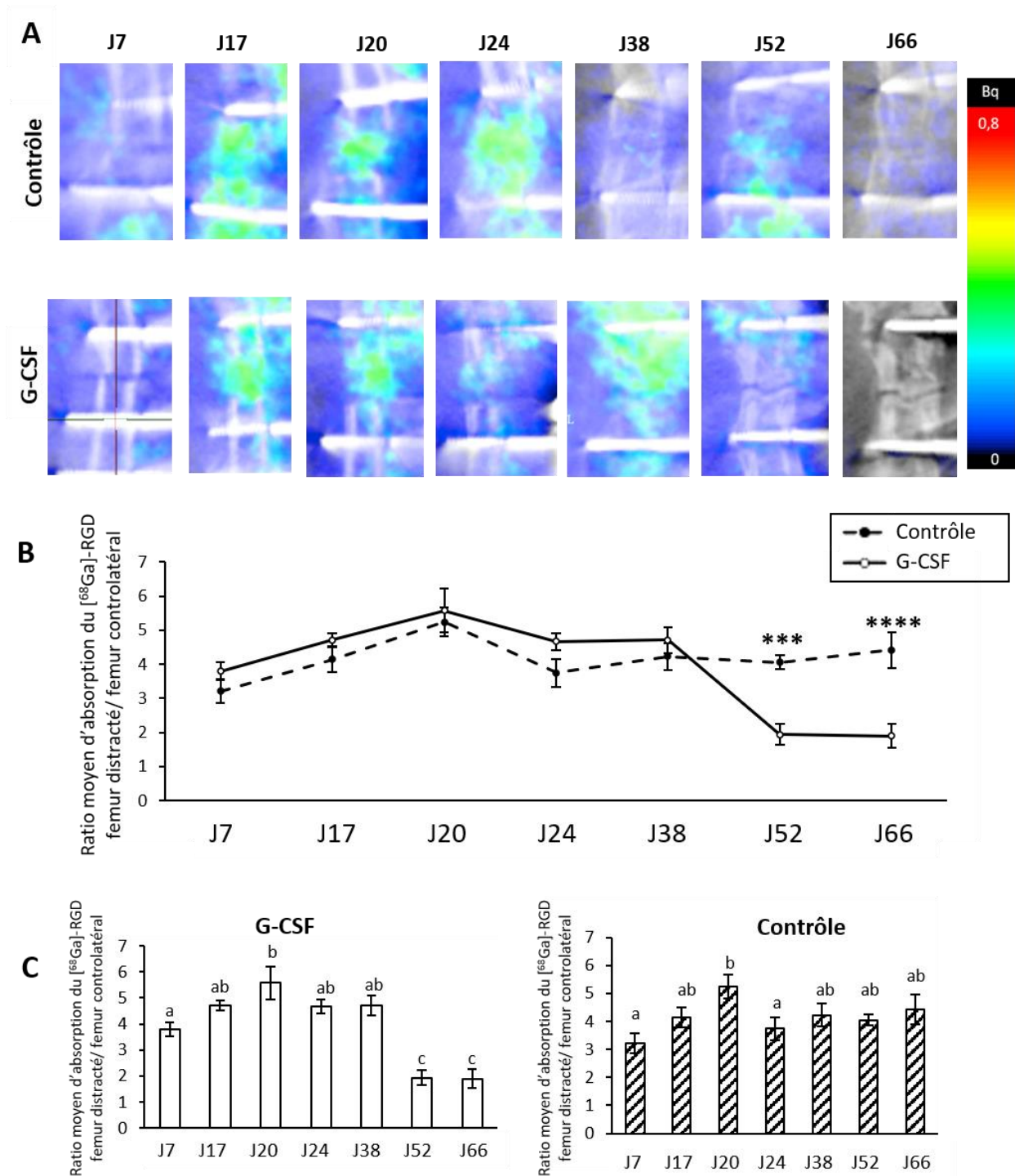


Figure 68 : Évolution du métabolisme de vascularisation pendant la DO. **A.** Imagerie TEP représentative après 7, 17, 20, 24, 38, 52 et 66 jours après l'opération. **B.** Le schéma temporel de l'absorption du rapport moyen de  $[^{68}\text{Ga}]\text{-RGD}$  est présenté. La ligne en pointillé représente le groupe de contrôle et la ligne pleine le groupe GCS-F. **C.** Dans le groupe GCS-F, le rapport moyen a atteint son maximum à J20 par rapport à J7 ( $p = 0,007$ ) et a diminué de manière significative à la fin du protocole ( $p = 0,0001$ ). **D.** Dans le groupe de contrôle, un pic à J20 est également indiqué par rapport à D7 ( $p=0,003$ ) et également par rapport à J24 ( $p=0,05$ ). a, b, c : si deux moyennes partagent la même lettre, aucune différence statistique n'est indiquée. \*\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 6. Le G-CSF induit des modifications dans le profil de régénération osseuse

Dans le groupe de contrôle, deux semaines après que la distraction a été arrêtée, aucun pont osseux n'a été observé dans les ROIs (conf. Fig. 69-B). Le centre de la zone intraosseuse était principalement composé de cartilage calcifié, de tissu cartilagineux et de quelques tissus fibreux. Plus près des corticales natives, un réseau trabéculaire était apparent.

En revanche, pour le groupe G-CSF, un pont osseux était apparent au centre de ZI (conf. Fig. 69-C). Cette zone était principalement composée de tissu cartilagineux, d'os trabéculaire et de cartilage calcifié. À l'approche de la corticale native, le réseau trabéculaire était plus dense et plus connecté et significativement plus épais pour le groupe G-CSF ( $0,081 \pm 0,007$ ) que pour le groupe témoin ( $0,061 \pm 0,007$ ) ( $p=0,029$ ).

En ce qui concerne les régions ZP et ZE, aucune différence entre les groupes n'a été observée que ce soit pour la fraction de surface osseuse ou l'épaisseur du tissu minéralisé. Dans chaque groupe, une deuxième corticale a commencé à se former le long des corticales natives. Cependant, en ce qui concerne la région ZE, même si aucune différence statistique n'a été observée entre les groupes, les valeurs moyennes pour le groupe G-CSF étaient plus élevées, avec une valeur 2 fois plus élevée pour la BA/TA et 1,3 fois plus élevée pour l'épaisseur du tissu minéralisé par rapport au groupe de contrôle.

Après sept semaines de consolidation, dans le groupe contrôle, aucun pontage osseux n'est présent, et ce dans aucun des ROIs. La zone centrale est toujours occupée par du tissu cartilagineux et un réseau trabéculaire en cours de développement.

Concernant le groupe G-CSF, le pontage osseux était présent seulement au niveau de la région ZI. Au sein de cette zone, on retrouve également du cartilage, mais la présence d'un tissu trabéculaire plus dense et plus développé a permis d'obtenir une différence significative des paramètres de BA/TA ( $0,464 \pm 0,077$ ) pour le groupe G-CSF par rapport au groupe contrôle ( $0,366 \pm 0,066$ ) ( $p<0,05$ ). Une différence significative est également observée au niveau de l'épaisseur des nouvelles trabécules formées pour le groupe G-CSF ( $0,148 \pm 0,024$ ) par rapport au groupe contrôle ( $0,119 \pm 0,004$ ) ( $p=0,002$ ). Concernant la zone ZP, une différence significative a également été observée du fait du développement plus important du cal périosté ( $p=0,008$ ). Enfin, la région ZE n'a pas montré de différence significative du fait notamment que le pontage du cal périosté ne s'est pas encore produit.

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

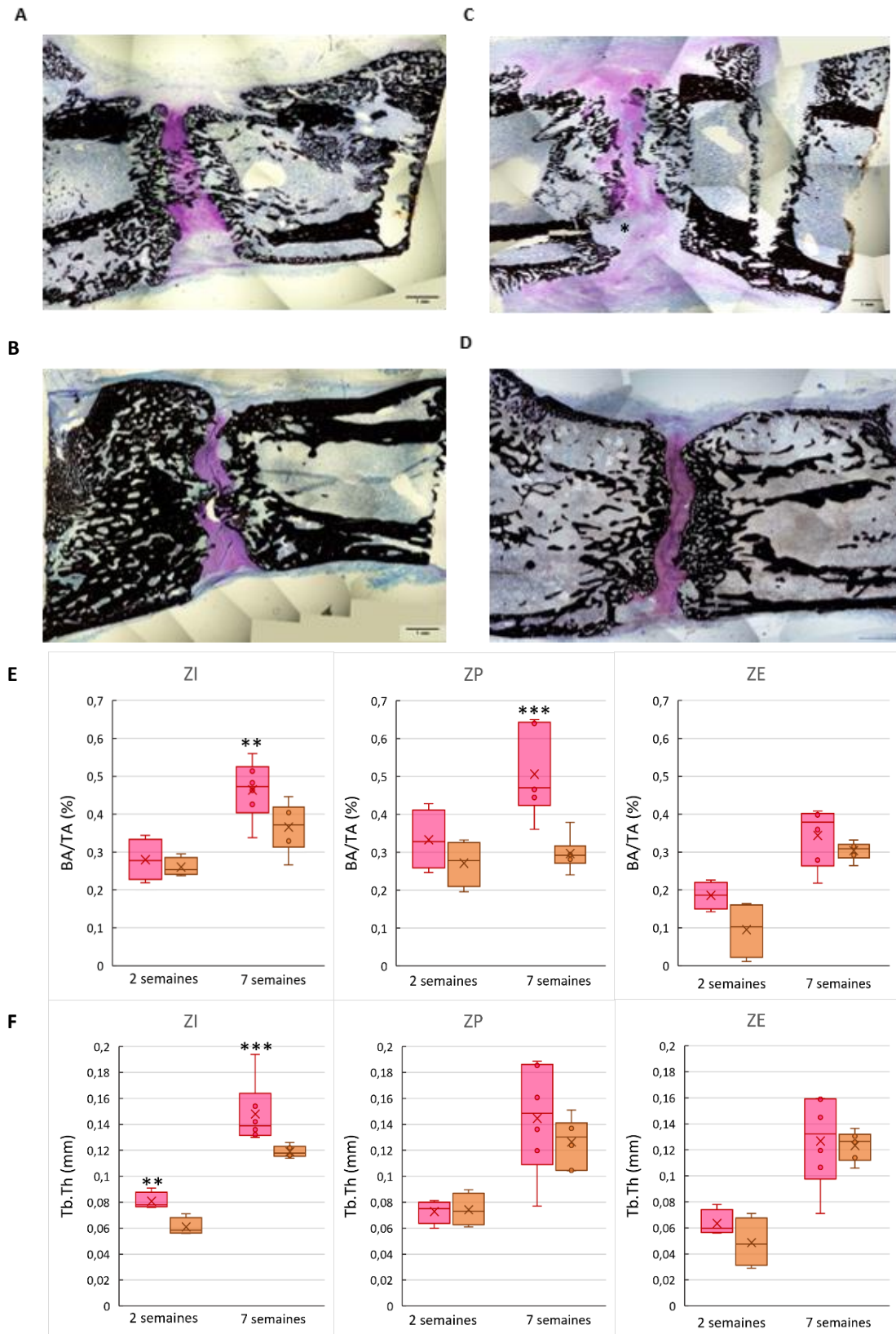


Figure 69 : Ensembles des images et des paramètres histomorphométriques. **A-D.** Images histologiques des cals distractés à faible grossissement (x4) après 2 semaines de consolidation (J31) dans les groupes G-CSF (A) et contrôle (C) ainsi que les images obtenues à 7 semaines de consolidation pour le groupe G-CSF (B) et le groupe contrôle (D). **E-F.** Représentation des données histomorphologiques obtenues dans les différentes zones avec ZI = zone intraosseuse, ZP = zone périosté, ZE = zone extraosseuse. Les valeurs représentent les moyennes obtenues pour la fraction surfacique BA/TA (%) (E) et pour l'épaisseur du réseau trabéculaire Tb.Th (mm) (F). Les données en rose représentent le groupe G-CSF et en orange le groupe contrôle. \* = tissu fibreux

# Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

## 7. Le G-CSF influe sur l'activité ostéoclastique de manière ROI-dépendante

La surface (mm<sup>2</sup>) des ostéoclastes TRAP-positifs, représentant l'activité des ostéoclastes, était différente entre les groupes uniquement pour le ROI ZI, où l'activité des ostéoclastes était significativement plus élevée pour le groupe témoin (0.593 ± 0.206) que pour le groupe G-CSF (p < 0,029) (0.280 ± 0.094) à deux semaines de consolidation. Après sept semaines de consolidation, l'activité ostéoclastique est de manière générale moins importante qu'à deux semaines de consolidation, et ce pour les deux groupes d'étude. En revanche, une différence significative du groupe G-CSF par rapport au groupe contrôle a été observée dans la zone ZE (0.057 ± 0.012 et 0.015 ± 0.006, respectivement) (p=0.029) (conf. Fig. 70).

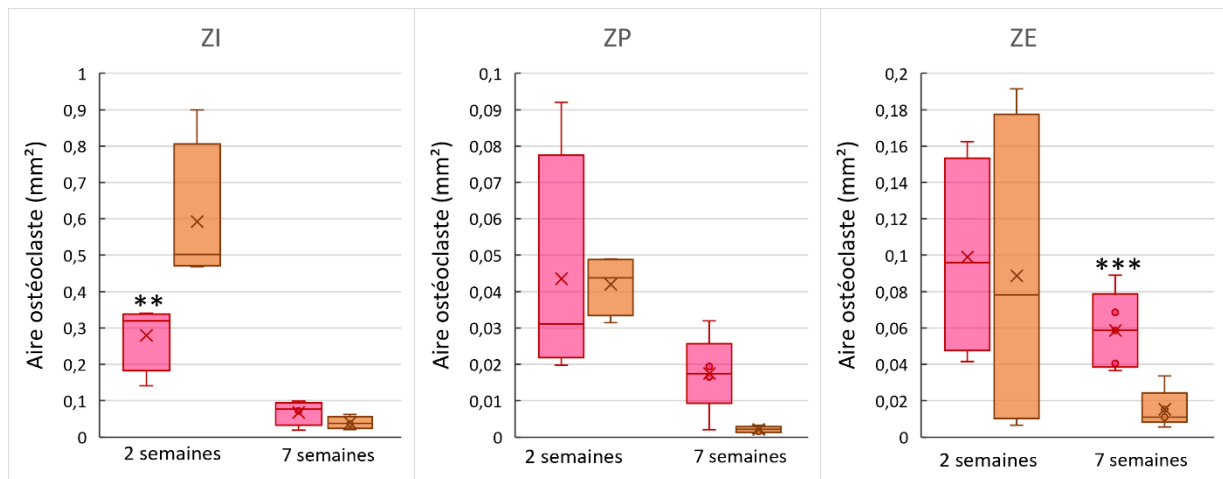


Figure 70 : Représentation des données de l'activité ostéoclastique sous forme de boîte à moustache. En rose les données concernent le groupe G-CSF et en orange le groupe contrôle. Pour rappel ZI = zone intraosseuse, ZE = zone extraosseuse et ZP = zone périoste. \*\*p<0.05 et \*\*\*p<0.01

## 8. Le G-CSF semble impacter les propriétés mécaniques du régénérat

Les paramètres mécaniques des fémurs distractés appartenant aux groupes G-CSF et contrôle ont été récoltés après 49 jours de consolidation (conf. Fig. 72). Les fémurs controlatéraux non distractés ont également été soumis aux essais de F3P. Ces essais ont permis d'analyser la résistance du régénérat distracté. En effet, les paramètres récoltés sont en lien direct avec la minéralisation de la structure. De plus, l'ensemble des données ont été normalisées par rapport à la patte controlatérale. Tout d'abord, une comparaison des paramètres mécaniques des fémurs controlatéraux des deux groupes a été effectuée. Aucune différence significative n'a été perçue, signifiant que la période d'injection de 5 jours ne perturbe pas les propriétés mécaniques du tissu osseux sain. Ensuite, pour l'ensemble des données, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes. Cependant, les valeurs

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

moyennes des paramètres mécaniques pour le groupe G-CSF sont supérieures à celles du groupe contrôle. Pour la force maximale atteinte, la moyenne des fémurs du groupe G-CSF était de  $87.9 \text{ N} \pm 19.3$  et pour les fémurs controlatéraux de  $58.3 \text{ N} \pm 33$ . L'ensemble des données de forces maximales normalisées ont permis de montrer que les échantillons du groupe G-CSF atteignaient 50% des valeurs obtenues par les fémurs controlatéraux et que cette valeur était 1.35 fois supérieure par rapport au groupe contrôle. Concernant la rigidité, celle-ci ne représentait que 21% des valeurs obtenues par les fémurs controlatéraux pour le groupe G-CSF et 17% pour les fémurs du groupe contrôle. La contrainte maximale normalisée était en moyenne 2 fois supérieure à celle obtenue pour les fémurs ayant reçu des injections de PBS. Les contraintes normalisées pour le groupe G-CSF représentaient 21% des valeurs obtenues par les pattes controlatérales, contre 10.2% pour le groupe contrôle. Les valeurs moyennes normalisées du module d'Young de la structure nouvellement formée atteignaient 7.1 % ( $\pm 5$ ) et 2.8 % ( $\pm 2.8$ ) des données acquises par les fémurs controlatéraux pour les fémurs G-CSF et les fémurs du groupe contrôle respectivement. Enfin, l'énergie maximale normalisée par rapport aux valeurs des fémurs controlatéraux était plus élevée pour les fémurs du groupe G-CSF (66.6 %  $\pm 20$ ) que pour les fémurs du groupe contrôle (53.1 %  $\pm 21.5$ ), alors que les données obtenues en déformation étaient similaires.

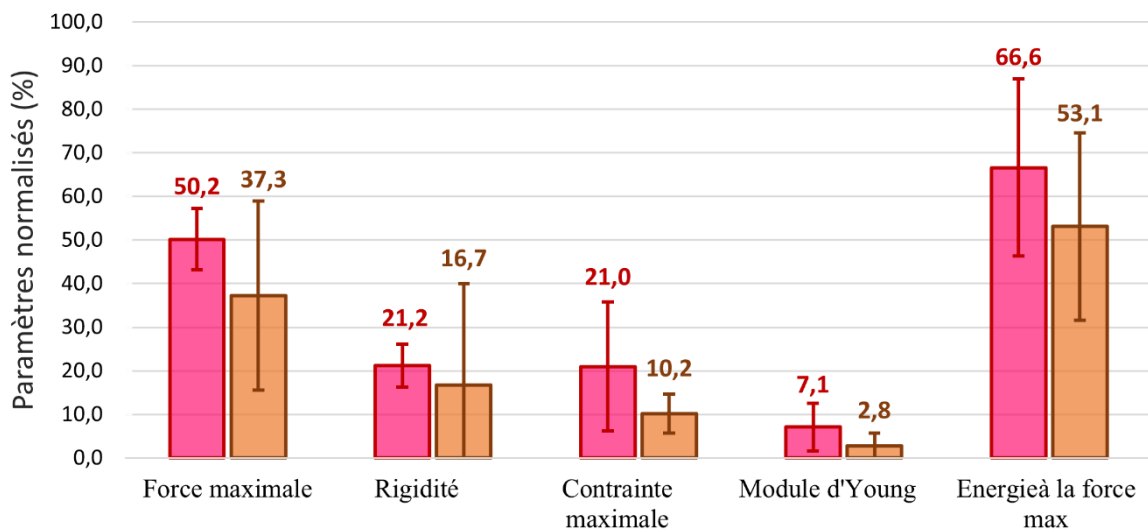


Figure 71 : Propriétés mécaniques des fémurs appartenant au groupe G-CSF (rouge) et du groupe contrôle (orange). L'ensemble des données ont été normalisées par rapport aux fémurs controlatéraux.

## IV. Discussion

L'un des principaux objectifs des chercheurs est d'explorer certaines méthodes permettant d'accélérer les processus de régénération osseuse en raccourcissant le temps nécessaire à la réparation osseuse tout en améliorant la qualité de l'os. La DO est un protocole complexe qui s'appuie sur plusieurs facteurs et signaux permettant d'achever un pontage osseux à la suite d'un allongement des segments osseux. Le but de cette étude était de déterminer les effets de l'administration systémique à faible dose du G-CSF sur la régénération osseuse dans un modèle de rat au cours de la DO. De plus, le second intérêt de cette étude était d'analyser si l'impact du G-CSF était associé à une mobilisation de cellules progénitrices jouant un rôle dans la vascularisation et le processus d'ostéogenèse afin de mettre en évidence un des mécanismes d'action possibles du G-CSF sur le processus de régénération osseuse. À notre connaissance, cette étude est la première à montrer que l'administration systémique de faibles doses de G-CSF stimule la régénération osseuse et la minéralisation du régénérat osseux au cours de la DO.

L'ossification endochondrale est l'un des deux processus de formation des os dans la DO et consiste en la formation d'un cal cartilagineux. En effet, plusieurs études [102,166,286–288] ont signalé la présence de ce type de formation osseuse au cours du processus de DO et particulièrement dans des études utilisant de petits animaux. À l'inverse, dans les modèles utilisant des animaux dits « grands », l'ossification intramembranaire semble être privilégiée. Dans notre travail, des études histologiques ont été menées pour analyser la formation de tissus à l'intérieur du régénérat distracté pendant la phase de consolidation à des temps précoces et tardifs. Une formation osseuse de type endochondrale dans la phase précoce de consolidation chez les animaux du groupe contrôle a été perçue. Effectivement, après 2 semaines de consolidation, la zone intraosseuse était composée de tissu cartilagineux calcifié et non calcifié et on notait la présence de quelques trabécules fines. De plus, ces points d'ossification étaient présents au niveau du front de minéralisation. Ces résultats sont en accord avec les études de Sato et al [70] et Aronson et al [289] dans lesquelles l'ossification endochondrale était décrite après 2 semaines de consolidation. L'administration de G-CSF dans le groupe testé n'a pas modifié le schéma prédominant de formation osseuse au sein du régénérat distracté, puisque le tissu cartilagineux et les points d'ossification endochondrale étaient toujours présents dans la zone intraosseuse du cal. Cependant, chez les animaux traités, le G-CSF a induit la formation d'un réseau trabéculaire plus dense et plus connecté avec des trabécules significativement plus épaisses par rapport au groupe de contrôle. Ce réseau était suffisamment développé pour débiter la formation d'un pontage osseux au centre de cette région, ce qui indique une



## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

accélération de la formation osseuse dans le groupe G-CSF par rapport au groupe contrôle. De plus, bien que non significatif, la surface osseuse occupée dans le régénérat a augmenté dans le groupe G-CSF, en particulier dans la zone extraosseuse, avec une augmentation deux fois plus importante pour les animaux traités que pour le groupe de contrôle. Il est probable que l'absence de différence significative entre les deux groupes provient du fait que le cartilage calcifié était pris en compte dans l'évaluation de ce paramètre histomorphométrique. Ainsi, la majorité du tissu minéralisé pour le groupe contrôle comprenait une surface plus importante de cartilage calcifié alors que pour le groupe G-CSF cette surface était composée majoritairement de trabécules osseuses. À des temps plus tardifs, après 49 jours de consolidation, l'ensemble des différences observées sont conservées et confirmées. En effet, les résultats positifs aux temps courts se sont maintenus au temps tardif, permettant la formation d'un réseau trabéculaire significativement différent du groupe de contrôle au sein du gap osseux. Ce réseau développé était plus dense à la fois de par la taille des nouvelles trabécules formées et de par leur nombre. De manière surprenante, au centre du régénérat osseux, la présence d'une zone centrale non minéralisée restait apparente pour le groupe contrôle et le groupe G-CSF malgré zone était moins importante pour le groupe G-CSF. Cependant, ces résultats sont en accord avec la littérature. Après 8 semaines de consolidation, des études dont le protocole de distraction était similaire au nôtre, ont décrit un cal pas complètement minéralisé [146] ainsi que l'absence de pontage entre les corticales ostéotomisées [131].

L'activité des ostéoclastes a été étudiée et cette dernière est liée au processus de régénération osseuse, du fait que l'ostéogenèse est dirigée par l'apposition et la résorption des tissus nouvellement formés. Lors de l'ossification endochondrale, les ostéoclastes sont nécessaires à la dégradation du cartilage minéralisé sécrété par les chondrocytes hypertrophiques [290]. L'analyse de la réponse ostéoclastique a également été une preuve solide qui soutient le fait que le G-CSF a accéléré la régénération osseuse aux temps précoce et tardif. Dans la littérature [287,291], il a été établi que plus le processus de consolidation est avancé, plus l'ostéoclasie est réduite. C'est pourquoi la faible activité ostéoclastique observée dans le groupe G-CSF suggère que le processus de consolidation était plus avancé par rapport au groupe de contrôle. Par ailleurs, une autre observation histologique a confirmé cette idée. En effet, dans la zone intraosseuse, l'activité ostéoclastique pour les deux groupes était située principalement dans le front de minéralisation. Ceci est lié au fait que lors de l'ossification endochondrale, les ostéoclastes sont nécessaires à la dégradation du cartilage minéralisé comme cité précédemment [290]. Cependant, alors que l'activité ostéoclastique était très élevée dans

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

les travées nouvellement formées dans le groupe témoin, elles étaient largement absentes dans le groupe G-CSF. Comme la résorption du tissu minéralisé précède l'apposition de l'os au cours du processus de régénération [290], nous supposons que le processus de remodelage de ces travées osseuses était plus avancé et que les travées étaient donc plus matures, comme en témoigne leur plus grande épaisseur. Après 49 jours de consolidation, la diminution de l'activité ostéoclastique était marquée au sein des trois zones pour les deux groupes, montrant ainsi un avancement du processus de régénération. En effet, plus le processus de consolidation progresse, plus la formation osseuse augmente et plus l'activation des ostéoclastes diminue [291]. Toutefois, il est intéressant de noter la présence d'une plus forte activité ostéoclastique au niveau du cal périosté pour le groupe G-CSF. Ceci laisse supposer qu'un remodelage des travées osseuses est en cours afin de permettre la formation d'un tissu osseux de type cortical. À l'inverse, pour le groupe contrôle, aucune activité dans cette zone n'est perceptible, laissant concevoir un retard de formation osseuse par rapport au groupe G-CSF. Par ailleurs, cette hypothèse semble être confirmée par une valeur constante de la fraction de surface osseuse (BA/TA) entre les dates analysées. Bien que d'autres études aient déjà démontré que le G-CSF améliorerait la régénération osseuse dans les temps précoces de consolidation après une lésion osseuse [214,263,292,293], notre étude est la première à mettre en évidence l'effet bénéfique du G-CSF sur l'ostéogenèse lors de la DO. Il semblerait que les effets bénéfiques aux temps précoces se répercutent sur les temps tardifs avec un processus plus avancé.

Pour avoir une vision plus globale de la cinétique de la régénération osseuse tout au long du processus DO, nous avons analysé longitudinalement le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite nouvellement formés par scintigraphie planaire reflétant ainsi l'activité de minéralisation des ostéoblastes. Nous avons ainsi constaté que le dépôt d'hydroxyapatite augmentait progressivement et qu'une valeur maximale significative était atteinte 3 semaines après la cessation des forces de distraction, quel que soit le groupe. La minéralisation pendant la DO a déjà été étudiée par d'autres auteurs [67,294–297], qui ont rapporté que la minéralisation du cal se produisait principalement après la cessation des forces de distraction. En particulier, l'étude de Leung [295] suggère que l'activité de minéralisation est maximale dans les premières phases de consolidation, puisque l'activité de la phosphatase alcaline, enzyme impliquée dans la minéralisation de l'os et du cartilage [298], a atteint un pic environ deux semaines après la fin de la phase de distraction. Nos données de scintigraphie sont conformes à cette étude. Bien que le G-CSF n'ait pas eu d'impact sur la temporalité de la minéralisation des tissus, il semblerait avoir un impact sur la quantité de formation de cristaux dans le temps tardif du processus dès

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

la troisième semaine et jusqu'à la fin de la période de l'étude (J66). En effet, à trois semaines de consolidation, bien qu'il n'y ait pas eu de différence significative entre les groupes, le ratio moyen d'absorption du [99mTc]-HDMP était 1,5 fois plus élevé dans le groupe G-CSF que dans le groupe de contrôle. Cette tendance à l'augmentation de l'activité de minéralisation renforcerait l'idée que le G-CSF induirait un effet positif sur l'ostéogenèse et la minéralisation du tissu osseux. Liu et al. [292], Hermann et al. [263] et Moukoko et al. [210] ont déjà montré l'effet positif du G-CSF dans les phases tardives de consolidation dans des modèles de défauts osseux et de fractures osseuses. Ces résultats semblent être confirmés pour la DO grâce aux études histologiques menées après 49 jours de consolidation ainsi que par les données mécaniques obtenues après les essais de flexion trois-points. En effet, les paramètres normalisés ont obtenu des valeurs plus importantes pour le groupe G-CSF notamment pour la force maximale, la contrainte maximale ainsi que l'énergie à la rupture. Cependant, au vu du faible nombre d'animaux caractérisés mécaniquement, ces données ne reflètent qu'une tendance dans l'amélioration des propriétés mécaniques du G-CSF dans les processus de DO.

Pour comprendre l'effet des bienfaits du G-CSF sur la régénération des tissus squelettiques, une seconde hypothèse dans cette étude a été émise. Elle préconisait que la mobilisation des cellules progénitrices ostéogéniques et vasculaires des niches de la moelle osseuse était l'un des mécanismes sous-jacents de l'effet du G-CSF sur la régénération osseuse pendant la DO. Les CSM sont des cellules qui peuvent se différencier en fibroblastes, chondroblastes ou ostéoblastes, chacune participant au processus de régénération dans les différentes étapes de la réparation osseuse [65]. Comme il a été démontré que de faibles doses de G-CSF peuvent mobiliser les CSM [257,299], nous avons étudié la mobilisation de ces cellules. Dans cette étude, nous avons caractérisé les CSM en utilisant des marqueurs classiques tels que CD44<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> conformément à la Société internationale de thérapie cellulaire [43]. Dans le groupe témoin, nous avons constaté une augmentation du nombre de CSM en circulation à la fin de la période de latence, suivie d'une diminution après 4 jours d'allongement, puis d'une augmentation de la mobilisation jusqu'à 2 semaines de consolidation. Ces résultats confirment une mobilisation précoce des CSM pendant le processus de distraction qui a été récemment signalée par Yang et al [137]. Leur profil cinétique semble néanmoins légèrement varié du nôtre. En effet, ils ont constaté comme nous une augmentation des CSM en fin de période de latence, montrant ainsi que la mobilisation des CSM dépend des événements inflammatoires induits par une ostéotomie. Cependant, ils ont constaté un pic de mobilisation après 3 jours de distraction puis une diminution continue jusqu'à un retour à l'état

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

basal, 4 jours après la cessation des forces de traction. À l'inverse, nous avons constaté une mobilisation continue jusqu'à deux semaines de consolidation. Les différences observées pourraient être induites par leur protocole de distraction, qui diffère grandement du nôtre, avec une période de latence et une phase de distraction active plus courte pour un taux d'allongement similaire. De plus, leurs essais se sont portés sur le tibia alors que dans notre étude, c'est le fémur qui a été allongé. Il est intéressant de noter que notre étude et celle de Yang et al [137] sont les seules, au sein de la littérature, à analyser les profils de cinétique liés à la mobilisation des CSM au cours du processus de DO. De manière contradictoire, de multiples études sur l'administration de CSM dans les processus de régénération dont la DO est explorée, mais aucune ne s'oriente vers l'analyse de la mobilisation de ces dernières. Il en reflète donc ici un besoin d'analyser plus en profondeur ces phénomènes de mobilisation pour permettre une meilleure compréhension du système et pour pouvoir établir de meilleures comparaisons.

Concernant l'application du G-CSF, nos travaux ont montré, pour la première fois, que l'administration de G-CSF modifiait la cinétique de mobilisation des CSM pendant la DO. Mais de manière inattendue et contrairement à notre hypothèse, la mobilisation des CSM a été réduite avec le G-CSF, puisque le nombre de CSM était nettement inférieur à la fin de la période de latence par rapport au groupe de contrôle. Ce résultat surprenant n'est pas conforme à la littérature puisque Kassis et al [257] et Ripa et al [299] ont démontré l'effet mobilisateur du G-CSF sur les CSM. Cependant, dans ces dernières études, l'effet mobilisateur a été déterminé respectivement chez des sujets sains et des sujets ayant subi un infarctus aigu du myocarde. Kassis et al [257] ont également mis en lumière des variabilités induites par le traitement de G-CSF sur le nombre de progéniteurs mobilisés chez l'humain ainsi que sur le temps de mobilisation pour l'aphérèse (technique permettant de récupérer les cellules mobilisées). En outre, la contribution des CSM dérivées de la moelle osseuse à la régénération osseuse pendant la DO a été démontrée dans différentes études. En effet, à la suite de la transplantation de ces cellules, Kitoh et al [300], Qi et al [301] et Yang et al [137,139] ont rapporté une amélioration de la régénération du cal probablement liée à l'augmentation du homing des CSM dans le cal [256]. Au vu de ces résultats, nous pensons que la diminution du nombre de CSM dans le groupe G-CSF à la fin de la phase de latence pourrait s'expliquer par un pic de mobilisation qui s'est produit plus précocement. L'étude de Ripa et al [299] soutient notre hypothèse. Cette dernière a décrit une mobilisation très précoce de certains sous-types de CSM dès le 4<sup>ème</sup> jour d'administration avec un effet prolongé encore perceptible au 7<sup>ème</sup> jour, ce qui correspond dans cette étude à 1 jour après la dernière injection. Ce schéma a également été analysé dans l'étude

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

menée par Garcia et al [302], où la mobilisation la plus importante des CSM a eu lieu le cinquième jour d'injection du G-CSF. Si tel est le cas, cela conforterait l'idée que l'accélération de la réparation osseuse que nous avons observée dans la phase de consolidation dans le groupe G-CSF par des études histologiques, histomorphométriques, mécaniques et scintigraphiques pourrait être favorisée par une mobilisation très précoce des CSM à partir de la moelle osseuse induite par le G-CSF. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait mener des études plus approfondies intégrant la détection de ces cellules dans les premiers jours suivant l'administration du G-CSF.

Parmi les CSM, nous avons également caractérisé une population de CSM CD271+. Des chercheurs ont montré que cette sous-population est présente au sein de la moelle osseuse et qu'elle peut proliférer et se différencier en lignées ostéogéniques, chondrogènes et adipogéniques [303–305]. Cependant, il a été démontré que cette population présente un phénotype moins différencié et que ces cellules se différencient préférentiellement en cellules chondrogéniques [42]. Nos résultats ont montré que ces cellules, dont la mobilisation a augmenté, quel que soit le groupe, représentent une petite sous-population de CSM. En effet, si l'on compare la concentration absolue des CSM-CD271+ par rapport à la population de CSM, on remarque qu'elles ne représentent qu'une part très faible de CSM mobilisée. L'administration de G-CSF n'a induit aucune modification dans le profil cinétique de mobilisation de ces CSM-CD271+.

En plus du dépôt de la matrice osseuse et minérale, la maturation du cal pendant la DO nécessite une résorption osseuse par les ostéoclastes. Ces derniers sont essentiels à la conversion du cartilage en os et lors du remodelage du cal [291]. Ainsi, en plus des CSM, nous avons également porté notre attention sur les CSPH, puisque ces cellules fournissent des précurseurs aux ostéoclastes [306]. La mobilisation des CSPH n'a auparavant jamais été étudiée pendant l'ostéogenèse de distraction. Nos résultats ont montré que la DO entraînait une mobilisation croissante des CSPH (CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>dim</sup>) entre les périodes de latence et de consolidation. Leur nombre était significativement plus élevé après 2 semaines de consolidation par rapport à la période de latence et au début de la phase de distraction. Le recrutement de ces cellules est très probablement responsable de l'augmentation du nombre d'ostéoclastes dans le cal. En effet, une forte activité ostéoclastique a été décrite dans l'étude histologique après 14 jours de consolidation. De plus, les injections de G-CSF ont modifié le profil de mobilisation des CSPH pendant la DO. En effet, quatre jours après le début des forces de traction, la mobilisation des CSPH était plus de deux fois plus élevée que dans le groupe témoin. Cet effet mobilisateur du

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

G-CSF sur les CSPH est connu chez les sujets humains en bonne santé. Le G-CSF est utilisé cliniquement pour réduire la neutropénie induite par la chimiothérapie, pour traiter les maladies neutropéniques chroniques graves ainsi que chez les donneurs sains pour induire la mobilisation des cellules progénitrices CD34<sup>+</sup> lors de transplantation [54,244]. Cet impact a également été signalé chez des rats sains à des doses plus élevées (50µg/kg) où la mobilisation des cellules progénitrices hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> était significative au lendemain de la dernière injection de G-CSF avec une mobilisation maximale au jour 11[263]. Dans notre étude, nous avons observé ce pic 5 jours après la dernière injection de G-CSF avec une dose de 5µg/kg. Dans une étude sur les défauts osseux segmentaires chez le lapin, Ishida et ses collaborateurs [214] ont même rapporté un pic de CD34<sup>+</sup> dès le premier jour après l'application locale d'un hydrogel contenant du G-CSF (5 µg). La disponibilité accrue des CSPH, au début de l'élongation dans le groupe G-CSF, est probablement responsable d'une augmentation plus précoce des précurseurs d'ostéoclastes par rapport au groupe contrôle, ce qui plaide en faveur d'une régénération osseuse accélérée par le G-CSF.

Au sein du pool de cellules CSPH, on retrouve également des progéniteurs vasculaires (CPE). Afin de caractériser spécifiquement cette population, nous avons utilisé un marqueur spécifique des CPE (CD309) [43]. Bien que l'injection de G-CSF ait modifié le schéma de mobilisation des CSPH pendant la DO, elle n'a eu aucun effet sur la cinétique de mobilisation des CPE. Néanmoins, une des stratégies pour améliorer la vascularisation d'un site lésé consiste à augmenter le nombre de cellules dans le sang périphérique afin de promouvoir l'incorporation de ces dernières en son sein. Ishida et al [214] ont montré que les CPE mobilisées peuvent s'incorporer dans le défaut osseux et y sont localisées principalement dans la structure capillaire, ce qui conduit à une néovascularisation positive. Dans notre étude, la quantité de cellules mobilisées était plus 1.7 fois plus importante pour le groupe G-CSF que pour le groupe contrôle. De plus, quel que soit le groupe, nous avons constaté une augmentation significative du nombre de CPE pendant la phase de distraction active, comme l'ont déjà signalé Lee et al [86]. Cela met en évidence le rôle des forces de traction dans la mobilisation des CPE ainsi que leur participation dans la vascularisation lors de la DO. En effet, depuis les dernières décennies, les chercheurs ont étudié la formation du réseau néovasculaire [74,75,307] lors de la DO. L'intérêt principal était que la vascularisation et l'ostéogenèse étaient deux systèmes synergiques permettant d'obtenir une régénération osseuse adéquate. Carvalho et al [80] ont montré l'implication de la vascularisation dans le cal distracté en analysant l'expression de multiples gènes codant des facteurs angiogéniques tels que VEGF et Ang au cours de la distraction.

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

Ils en ont conclu que le développement vasculaire lors de la DO permet d'amener les cellules progénitrices participant ainsi à la régénération du site lésé, d'augmenter le degré d'oxygénation et d'apporter les nutriments et minéraux créant un milieu propice à la survie cellulaire. Par ailleurs, il a été démontré que les facteurs angiogéniques tels que VEGF sont sécrétés par les cellules du régénérat dont les ostéoblastes participant ainsi à la formation du réseau vasculaire. Et d'autre part, ce nouveau réseau vasculaire induit des effets paracrines sur la régénération osseuse via la sécrétion de BMP-2 (par les cellules endothéliales), promouvant ainsi la différenciation et la minéralisation des cellules ostéoblastique [95]. La participation des CPE mobilisés par la moelle osseuse dans la néovascularisation des tissus lésés a été clairement démontrée [43], nous avons également étudié la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans le cal distracté pendant la DO. Dans les deux groupes, nous avons observé une absorption de [68Ga]-RGD 3 à 4 fois plus élevée dans le régénérat distracté que dans le membre non opéré et ce dès la fin de la phase de latence, montrant ainsi un processus de vascularisation important lors des premières étapes de la régénération. La néovascularisation du cal a été légèrement augmentée pendant la phase d'allongement et maintenue à ce niveau pendant la première phase de consolidation. Ce schéma temporel de néovascularisation du cal est conforme aux résultats antérieurs de la littérature [86,308]. Il est intéressant de noter que l'augmentation de la concentration de CPE était temporellement liée à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans le cal distracté. En effet, le gain le plus important de l'activité vasculaire est observé au début de la période de consolidation, 4 jours après la forte augmentation des CPE. Ces observations suggèrent une contribution plausible des CPE mobilisés par la moelle osseuse à l'augmentation de la néovascularisation pendant la distraction et les premières phases de consolidation de la DO, ce qui avait également été suggéré dans un travail précédent [86]. De plus, la capacité de mobilisation du G-CSF sur les CPE a été démontrée dans un modèle d'ischémie du membre postérieur [309] et un modèle de grand défaut osseux [214]. Des différences dans les doses de G-CSF et dans la manière de l'administrer pourraient expliquer les différences entre nos résultats et ceux de ces deux études précédentes, puisque ces dernières ont respectivement utilisé une dose cinq fois plus élevée [309] et une administration locale de G-CSF sur les sites lésés [214]. Il serait intéressant d'analyser plus en détail la mobilisation induite par le G-CSF à faible dose.

En ce qui concerne la néovascularisation du cal, il est surprenant de constater qu'au cours de la phase tardive de consolidation, le ratio moyen d'absorption de [68Ga]-RGD était significativement plus élevé dans le groupe témoin par rapport au groupe G-CSF. Cependant,

## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

lors des phases précoces de consolidation analysées, aucune différence dans les ratios moyens d'absorption de [68Ga]-RGD n'a été observée. Il est possible que cette différence significative traduise la mise en place d'un réseau vasculaire plus optimal par le groupe G-CSF, ce qui expliquerait que le marquage soit presque revenu à un niveau basal. En effet, la TEP nous permet d'analyser la présence de cellules endothéliales actives, via la surexpression de l'intégrine  $\alpha\beta3$ . Cependant, une fois mature, les cellules endothéliales n'expriment pas ou très peu cette intégrine et donc leurs expressions ne peuvent être perçues par les essais de type TEP.

Prenant en compte tous nos résultats, il en découle deux choses. Premièrement, dans les phases tardives de consolidation, les processus de vascularisation sont générés par des mécanismes d'angiogenèse, puisqu'à deux semaines de consolidation la concentration en CPE circulante est nulle. Deuxièmement, l'absence de marquage en TEP laisse supposer que le réseau vasculaire mis en place par le groupe G-CSF est suffisamment développé et dense pour que les processus de vascularisation ne soient plus présents. En effet, si le réseau vasculaire est mieux développé par le G-CSF, alors la chute d'activité des cellules endothéliales actives en fin de processus semble cohérente. Il serait donc intéressant d'analyser le flux sanguin présent au sein du cal distracté. Par ailleurs, une étude a examiné la vascularisation dans la phase tardive de consolidation dans un modèle de DO chez le chien [308]. Les auteurs ont constaté que le flux sanguin y était 2 à 3 fois plus élevé que dans le membre non opéré jusqu'à 14 semaines de consolidation et a persisté pendant toute la période de consolidation. Nous émettons l'hypothèse que la diminution de l'activité vasculaire jusqu'à 2 fois moins dans le groupe G-CSF que dans le groupe témoin après 6 et 7 semaines de consolidation pourrait être liée à un pic très précoce de la néovascularisation induite par le G-CSF entre l'ostéotomie et la fin de la phase de latence. Minamino et al. [309] ont montré une augmentation significative du nombre de vaisseaux sanguins dans les membres ischémiques dès 3 jours après la première injection de G-CSF. Le pic de néovascularisation serait précoce. Notre plan d'étude n'a pas réussi à le mettre en évidence. Une hypothèse serait que le processus de consolidation du cal serait plus avancé dans le groupe G-CSF. Cela expliquerait l'obtention de valeurs plus faibles dans la phase tardive de consolidation.

Il est important de noter certaines limites à cette étude. Le nombre insuffisant d'animaux dans certaines expérimentations n'a peut-être pas permis de faire ressortir des différences significatives entre les groupes. C'est pourquoi il serait constructif de continuer l'analyse de l'effet du G-CSF sur le processus de DO. De plus, le mécanisme d'action du G-CSF semble être effectif sur les temps précoces du processus de distraction. C'est pourquoi l'analyse plus



## Chapitre 4 : Amélioration de la régénération

en profondeur de la phase de latence semble être une bonne piste pour mieux comprendre les mécanismes d'action du G-CSF. Une autre limite concerne l'analyse longitudinale des images micro-CT obtenues en parallèle des essais TEP. La résolution trop faible, les mouvements de l'animal ainsi que la présence d'artefacts liés aux tiges et aux fixateurs n'ont pas permis à l'heure actuelle d'obtenir des informations sur la densité minérale osseuse ni sur les paramètres architecturaux, malgré l'utilisation de divers filtres et algorithmes de correction. C'est pourquoi aucune segmentation n'a pu à l'heure actuelle être établie. Ces problèmes expliquent en partie la raison pour laquelle dans la majorité des études les animaux sont sacrifiés à différents intervalles du processus au lieu d'effectuer une étude longitudinale sur un même animal.

### V. Conclusion

En conclusion, malgré les limites, notre étude a montré qu'une faible dose de G-CSF, avec un dosage plus faible que celui déjà utilisé en clinique ( $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ), accélère la régénération osseuse dans les phases précoces de la consolidation pendant la DO. Son utilisation potentielle en thérapeutique pourrait donc réduire les nombreuses complications inhérentes à cette technique chirurgicale. D'autres études doivent maintenant être menées pour déterminer si le G-CSF pourrait permettre un retrait plus précoce du distracteur et donc un raccourcissement du traitement chirurgical. Compte tenu de nos résultats concernant les effets du G-CSF sur la mobilisation des cellules progénitrices, nous pensons que l'amélioration de la régénération du cal avec le G-CSF est le résultat, en partie, à la fois d'une mobilisation accrue très précoce des cellules progénitrices ostéogéniques de la moelle osseuse et à la fois d'un homing favorisé des cellules au sein du cal distracté. Concernant la vascularisation, une tendance positive de ce processus semble se dessiner. Là encore, des travaux supplémentaires seront nécessaires pour mieux connaître les mécanismes par lesquels le G-CSF améliore la vascularisation pendant la distraction ostéogénique. En effet, il serait intéressant de quantifier le réseau vasculaire nouvellement formé lors de la DO grâce à l'imagerie IRM couplée l'application d'agent de contraste. L'analyse du débit sanguin par des techniques utilisant l'effet Doppler permettrait de quantifier la vitesse des particules sanguines. L'ensemble de ces différents paramètres autoriserait d'avoir une représentation plus globale du réseau en formation et ainsi de pouvoir affirmer avec certitude si le G-CSF a un effet ou non sur la néovascularisation.

# Conclusion générale et perspective

Dans ce travail portant sur le processus de régénération osseuse au cours de la distraction ostéogénique, deux grands axes d'études ont été abordés. Le premier s'intéressait à la compréhension des paramètres mécaniques des tissus minéralisés ainsi qu'à l'évolution de ces derniers au sein du régénérat distracté en cours de consolidation. Le second axe était dirigé vers l'amélioration du processus de régénération osseuse, englobant les aspects biologiques, vasculaires et osseux, par l'ajout d'un facteur de croissance.

Le développement d'un fixateur externe, d'une ancillaire ainsi que la mise en place des paramètres du protocole de distraction ont été une première étape pour l'exploration de nos deux axes de recherches. Le protocole développé a permis de maintenir les segments osseux parallèles et alignés tout au long du processus d'observation dans les diverses études menées. Les rigidités induites par le fixateur externe et les broches sont importantes et peuvent influencer le processus de régénération osseuse. Ce constat a pu être établi en cours de thèse. En effet, le fixateur externe et l'ancillaire ont été améliorés afin de maximiser le rendement du nombre d'animaux atteignant la date de mise à mort prévue. Pour ce faire, une augmentation de l'amplitude de l'ancillaire a été effectuée, permettant ainsi une accroche stable malgré des variations de l'anatomie du fémur de rat. L'augmentation du filetage au niveau des broches a permis de faciliter l'insertion en bicorticale côté genou. En effet, l'os fémoral chez le rat est plus évasé côté genou que côté hanche. Enfin, l'augmentation du diamètre des broches a permis d'augmenter la rigidité du système tout en diminuant l'apparition de cassure de ces dernières. Les différences de profils d'évolution de guérison du régénérat osseux entre l'étude du chapitre 2 et celles des chapitres 3 et 4 proviennent des modifications imposées. En effet, étant donné les modifications réalisées pour les broches et le fixateur, l'environnement mécanique généré a été modifié et les processus de mécanotransduction. Ces changements ont été observés dans les profils de pontage en fin de processus. Dans le chapitre 2, l'environnement créé par le fixateur a permis une mise en marche de l'animal après sept semaines de consolidation, mais en contrepartie peu d'animaux ont atteint la fin du protocole du fait de casse des broches ou du blocage du fixateur. Pour les chapitres 3 et 4, un processus de consolidation plus lent a été observé, néanmoins la cinétique de guérison est restée en lien avec les processus de régénération observés dans la littérature.

L'étude menée dans le chapitre 3, portait sur la compréhension de l'évolution des propriétés mécaniques locales du régénérat osseux. Cette analyse semble être importante pour comprendre les processus de régénération dans leur globalité. En effet, si beaucoup d'études s'intéressent aux aspects biologiques voir physiologiques, très peu d'entre elles explorent les paramètres mécaniques des tissus en régénération. Concernant les modèles de régénération osseuse, seulement trois études sont présentes au sein de la littérature : deux études portent sur la régénération du cal fracturaire et la troisième sur un processus de guérison dans un cas de transport osseux. Comprendre les mécanismes par lesquels les propriétés mécaniques des tissus évoluent, ainsi que les réponses induites face aux stimuli mécaniques externes, nous permettrait d'en apprendre un peu plus sur les mécanismes sous-jacents des phénomènes de régénération osseuse, à la fois pour la régénération en cours d'allongement, fracturaire ou autre. Par ailleurs, le protocole de distraction peut être associé à un bioréacteur par la création de tissus où l'environnement mécanique peut être contrôlé. Il semblerait intéressant d'utiliser ce processus dans l'étude des comportements cellulaires et tissulaires face à des environnements mécaniques différents.

Notre étude est la première à s'être intéressée à la caractérisation du tissu osseux en formation lors d'un allongement osseux. Elle a montré que les propriétés mécaniques de rigidité et de résistance des matériaux formés au sein du régénérat évoluent de manière temporelle et spatiale. Il serait intéressant d'induire des modifications contrôlées de l'environnement mécanique et de venir caractériser mécaniquement les variations locales induites. Pour aller plus loin, il serait également judicieux de caractériser le comportement mécanique des divers tissus mous présents dans les sections utilisées de cette étude. La caractérisation par indentation en utilisant des modèles de relaxation sur ces tissus mous, nous permettrait d'obtenir une cartographie générale des propriétés mécaniques de l'ensemble des tissus au sein du régénérat. Une fois établie, on pourrait tendre vers le développement d'une loi comportementale des propriétés mécaniques locales et ainsi perfectionner les modèles numériques existants. Une autre méthodologie qui pourrait être couplée à l'indentation est l'analyse par spectrométrie de fluorescence des rayons X. Cette technique permet la caractérisation de la composition de l'échantillon et est non destructive. L'analyse couplée de ces deux paramètres et la détection de corrélation entre le contenu minéral d'une zone et les valeurs mécaniques obtenues en indentation pourraient être explorées. Cela aiderait à comprendre l'hétérogénéité présente au sein du tissu osseux lamellaire en formation.

Le principe de distraction est un protocole clinique lourd, entraînant de multiples complications dont certaines sont causées par un mauvais processus de régénération osseuse. Ce processus est régi par deux phénomènes distincts, mais travaillant en synergie : la vascularisation et l'ostéogenèse. Il a été démontré dans la littérature que des altérations dans le processus de régénération peuvent être altérées, voire inexistantes, si l'on interrompt ce couplage. L'ensemble de ces processus sont contrôlés par diverses cellules, molécules et facteurs solubles. Néanmoins, la possibilité de formation d'un nouveau tissu provient de la maturation de nouvelles cellules. Ces dernières sont obtenues à partir de cellules non différenciées ou cellules souches qui sont habituellement dans des états quiescents au sein de niches spécifiques. Or, lors du processus d'allongement osseux, l'ensemble des cellules souches sont stimulées et des phénomènes de prolifération, de mobilisation, de différenciation et de migration sont induits. C'est alors que l'utilisation d'un facteur de croissance nommé G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) nous a semblé intéressante. Dans la littérature, il a été admis que ce facteur de croissance a la capacité de mobiliser l'ensemble des trois populations de cellules souches/progénitrices participant à la régénération osseuse. De plus, ces effets bénéfiques ont été observés dans quelques modèles de régénération osseuse. Les résultats obtenus dans notre étude lors de l'utilisation à faible dose semblent montrer un effet bénéfique d'un point de vue vasculaire et de formation osseuse. Cependant, il serait intéressant d'aller plus loin en augmentant le nombre d'animaux par essai que ce soit pour la cytométrie en flux, la TEP, la SPECT et les essais de flexion trois points. Par ailleurs, avec du recul, si le protocole expérimental devait être établi aujourd'hui, quelques modifications seraient apportées. En effet, la stratégie d'optimiser le suivi longitudinal en utilisant les mêmes animaux pour différentes techniques d'analyse a rendu le protocole d'étude lourd pour ces derniers. La fatigue engendrée et le stress des manipulations diverses ont pu engendrer des modifications dans le processus de formation osseuse.

Le G-CSF semble être un bon candidat dans la stimulation du processus de régénération osseuse. Il serait intéressant de voir son application de manière locale. C'est pourquoi la réflexion sur le développement d'un biomatériau adapté au protocole de distraction semble être une voie de recherche intéressante. Les résultats obtenus dans les deux axes d'études apporteraient un soutien dans la conception de ce dernier. D'un point de vue mécanique, les propriétés du biomatériau devraient pouvoir évoluer dans le temps avec une augmentation de la rigidité et ce dernier devrait être capable de se déformer afin de suivre l'allongement des

tissus lors de la phase de distraction active. Enfin, ce dernier pourrait être chargé avec du G-CSF permettant la diffusion continue et locale du facteur de croissance.

Pour finir, il serait judicieux de développer une étude sur la caractérisation des tissus minéralisés dans des régénérats osseux ayant reçu les injections de G-CSF. Cette étude mettrait en lien les deux axes de recherche développés dans cette thèse et permettrait de quantifier l'impact de ce facteur de croissance sur les propriétés mécaniques locales des tissus en formation. Ce nouvel axe d'étude pourrait améliorer la compréhension du système dans sa globalité via le croisement de données biologiques et mécaniques du tissu. Enfin, cette étude pourrait également mettre en lumière un mécanisme sous-jacent du G-CSF.

# Annexe 1 :

Données brutes obtenues à la suite des essais de flexion trois-points (chapitre 2) :

**Table A.1.** Dimensions des échantillons distractés

Numéro	Epaisseur (mm)	Longueur (mm)	$I_x$ (mm <sup>4</sup> )
1	5.56	42.52	46.91
2	7.56	44.86	160.35
3	9.32	42.55	370.37
4	8.68	38.61	278.64

**Table A.2.** Dimensions des échantillons controlatéraux

Numéro	Epaisseur (mm)	Longueur (mm)	$I_x$ (mm <sup>4</sup> )
1	4.88	41.58	27.84
2	5.09	42.75	32.95
3	5.18	42.54	35.34
4	4.52	39.63	20.49

**Tableau A.3.** Résultats des essais de flexion trois-points - *Controlatérales*

Numéro	Force maximale (N)	Rigidité (N/mm)	Contrainte maximale (MPa)	Déformation maximale (%)	Module d'Young (MPa)	Energie pour la rupture (J)
1	161.9	319.7	64	0.10	1395	64.6
2	151.3	385.1	53	0.06	1420	45.8
3	152.6	419.3	50	0.07	1441	48.8
4	108.8	236.5	54	0.08	1402	47
Moyenne	143.7	340.1	55	0.08	1414.7	51.6
Écart-type	23	80	5	0,02	21	9

**Tableau A.4.** Résultats des essais de flexion trois-points - *Distractés*

Numéro	Force maximale (N)	Rigidité (N/mm)	Contrainte maximale (MPa)	Déformation maximale (%)	Module d'Young (MPa)	Energie pour la rupture (J)
1	73.9	109.1	20	0.15	283	31.3
2	109.4	181.8	12	0.36	138	97
3	202	353	11	0.22	116	63.4
4	76.7	37.4	5	0.59	16	138.5
Moyenne	122.6	170.3	10	0,3	138,1	60,8
Écart-type	60.6	135.3	7,5	0,2	109,8	56,3

## Annexe 2 :

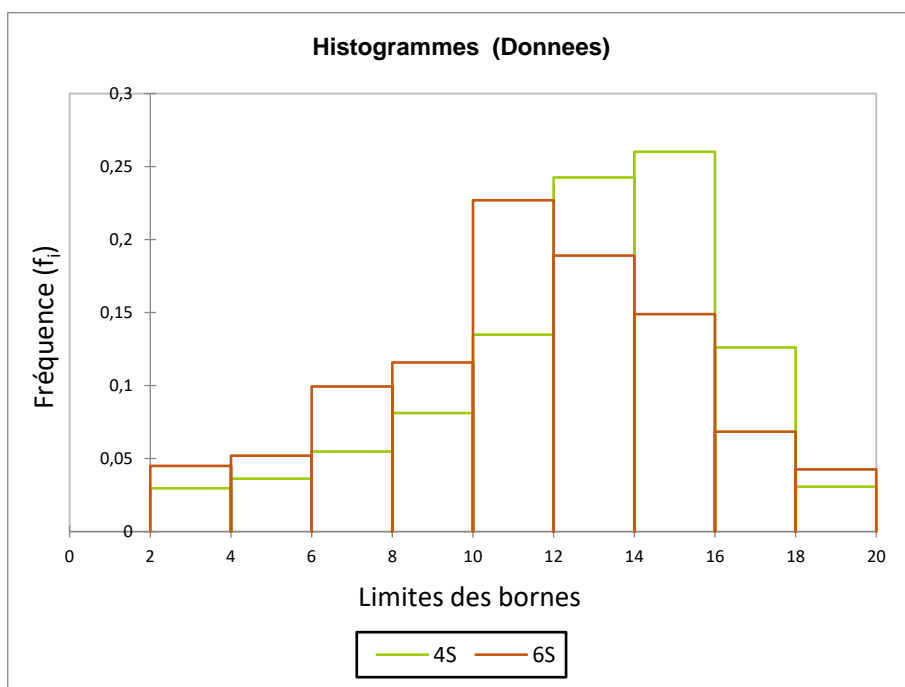
Histogrammes des fréquences obtenues en micro-indentation (chapitre 3) pour *le module d'Young* dans la zone P1 :

Sachant que la fréquence ( $f_i$ ) est exprimée selon l'équation suivante :

$$f_i = e_b / e_T,$$

Avec  $e_b$  l'effectif de la borne et  $e_T$  l'effective total

Les histogrammes de fréquences représentent la distribution des fréquences en fonction des bornes d'intervalles imposées. Et la somme des fréquences relatives est égale à 1 (100%).



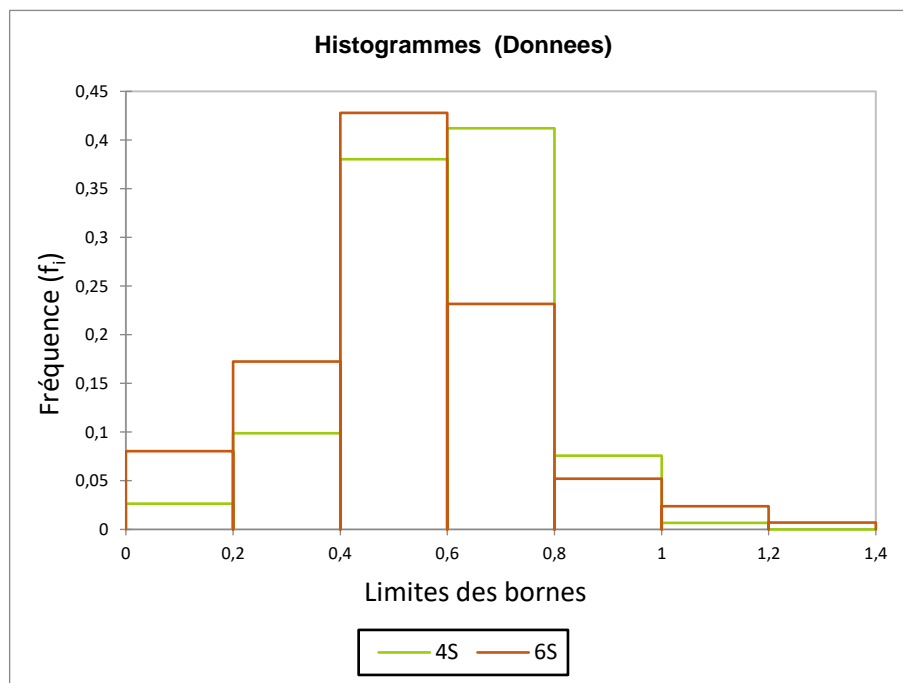
Données à 4 semaines (4S) – zone P1

Borne inférieure	Borne supérieure	Effectif	Fréquence	Densité
2	4	27	0,030	0,015
4	6	33	0,036	0,018
6	8	50	0,055	0,027
8	10	74	0,081	0,041
10	12	123	0,135	0,068
12	14	221	0,243	0,121
14	16	237	0,260	0,130
16	18	115	0,126	0,063
18	20	28	0,031	0,015

Données à 6 semaines (6S) – zone P1

Borne inférieure	Borne supérieure	Effectif	Fréquence	Densité
2	4	19	0,045	0,022
4	6	22	0,052	0,026
6	8	42	0,099	0,050
8	10	49	0,116	0,058
10	12	96	0,227	0,113
12	14	80	0,189	0,095
14	16	63	0,149	0,074
16	18	29	0,069	0,034
18	20	18	0,043	0,021

Histogrammes des fréquences obtenues en micro-indentation (chapitre 3) pour *la dureté* dans la zone P1 :



Données à 4 semaines (4S) – zone P1

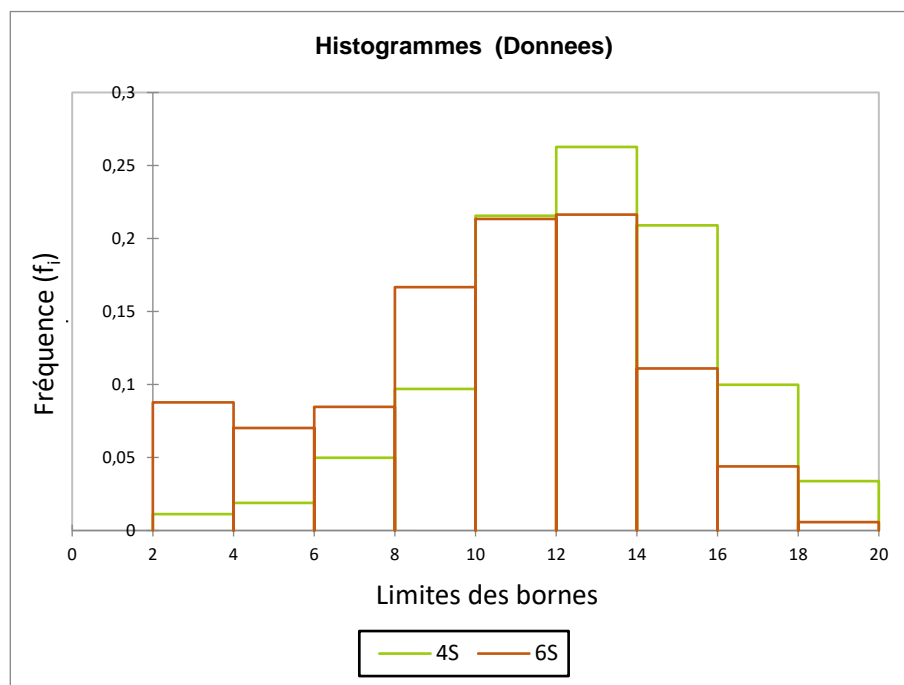
Borne inférieure	Borne supérieure	Effectif	Fréquence	Densité
0	0,2	24	0,026	0,132
0,2	0,4	90	0,099	0,495
0,4	0,6	346	0,380	1,901
0,6	0,8	375	0,412	2,060
0,8	1	69	0,076	0,379
1	1,2	6	0,007	0,033
1,2	1,4	0	0,000	0,000

Données à 6 semaines (S) – zone P1

Borne inférieure	Borne supérieure	Effectif	Fréquence	Densité
0	0,2	34	0,080	0,402
0,2	0,4	73	0,173	0,863
0,4	0,6	181	0,428	2,139
0,6	0,8	98	0,232	1,158
0,8	1	22	0,052	0,260
1	1,2	10	0,024	0,118
1,2	1,4	3	0,007	0,035



Histogrammes des fréquences obtenues en micro-indentation (chapitre 3) pour *le module d'Young* dans la zone EC1 :



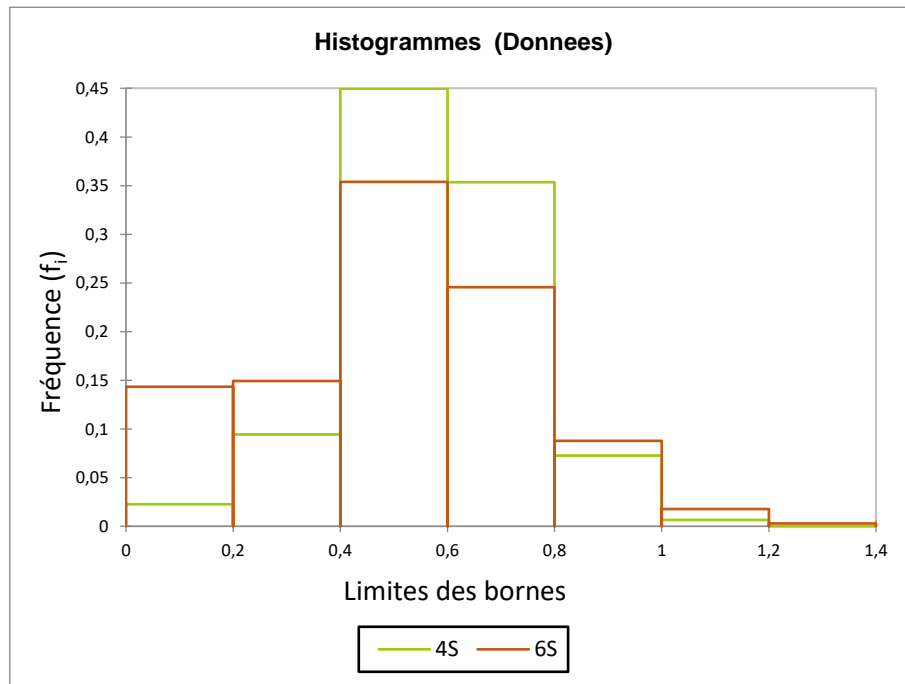
Données à 4 semaines (4S) – zone EC1

Borne inférieure	Borne supérieure	Effectif	Fréquence	Densité
2	4	12	0,011	0,006
4	6	20	0,019	0,009
6	8	53	0,050	0,025
8	10	103	0,097	0,048
10	12	229	0,216	0,108
12	14	279	0,263	0,131
14	16	222	0,209	0,105
16	18	106	0,100	0,050
18	20	36	0,034	0,017

Données à 6 semaines (6S) – zone EC1

Borne inférieure	Borne supérieure	Effectif	Fréquence	Densité
2	4	30	0,088	0,044
4	6	24	0,070	0,035
6	8	29	0,085	0,042
8	10	57	0,167	0,083
10	12	73	0,213	0,107
12	14	74	0,216	0,108
14	16	38	0,111	0,056
16	18	15	0,044	0,022
18	20	2	0,006	0,003

Histogrammes des fréquences obtenues en micro-indentation (chapitre 3) pour *la dureté* dans la zone EC1



Données à 4 semaines (4S) – zone EC1

Borne inférieure	Borne supérieure	Effectif	Fréquence	Densité
0	0,2	24	0,023	0,113
0,2	0,4	100	0,094	0,471
0,4	0,6	477	0,450	2,248
0,6	0,8	375	0,353	1,767
0,8	1	77	0,073	0,363
1	1,2	7	0,007	0,033
1,2	1,4	0	0,000	0,000

Données à 6 semaines (6S) – zone EC1

Borne inférieure	Borne supérieure	Effectif	Fréquence	Densité
0	0,2	49	0,143	0,716
0,2	0,4	51	0,149	0,746
0,4	0,6	121	0,354	1,769
0,6	0,8	84	0,246	1,228
0,8	1	30	0,088	0,439
1	1,2	6	0,018	0,088
1,2	1,4	1	0,003	0,015

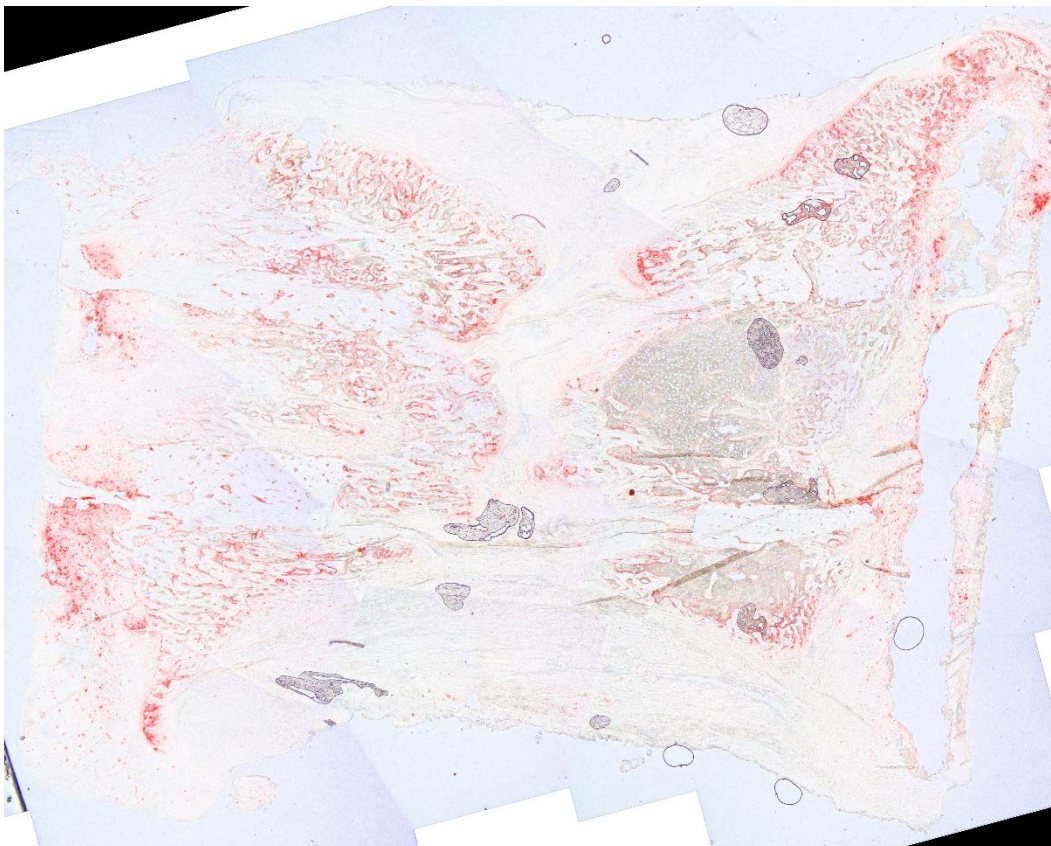
## Annexe 3 :

Représentation de deux lames obtenues à **2 semaines** de consolidation pour les colorations TRAP (chapitre 4) :

Image appartenant au groupe contrôle pour la coloration TRAP :



Image appartenant au groupe G-CSF pour la coloration TRAP



Représentation de deux lames obtenues à **7 semaines** de consolidation pour les colorations TRAP :

Image appartenant au groupe contrôle pour la coloration TRAP :

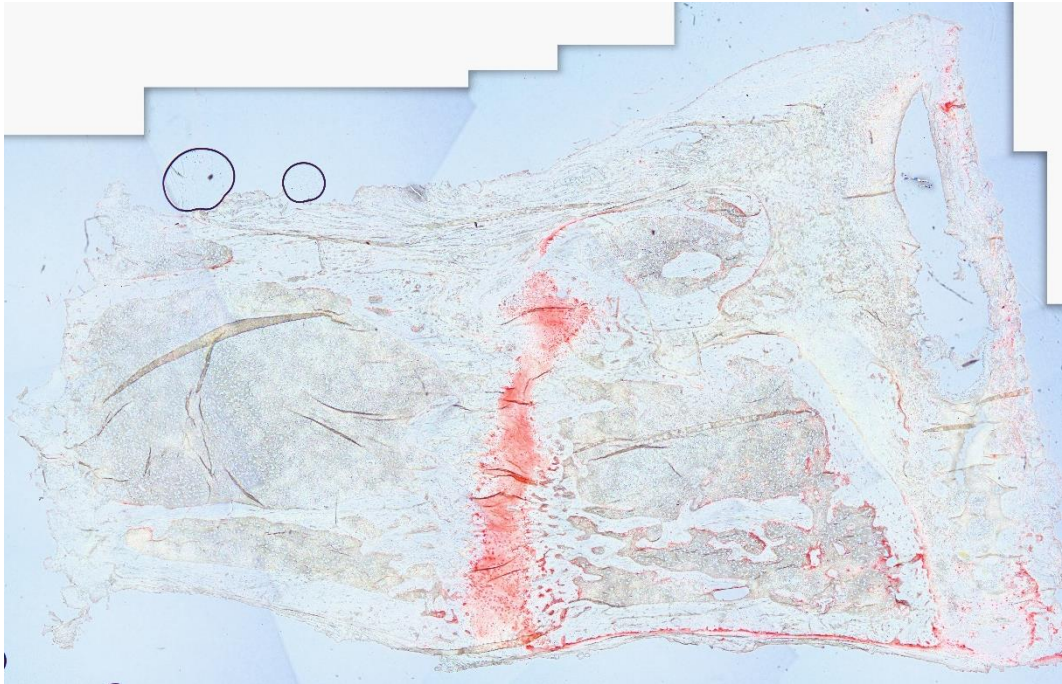
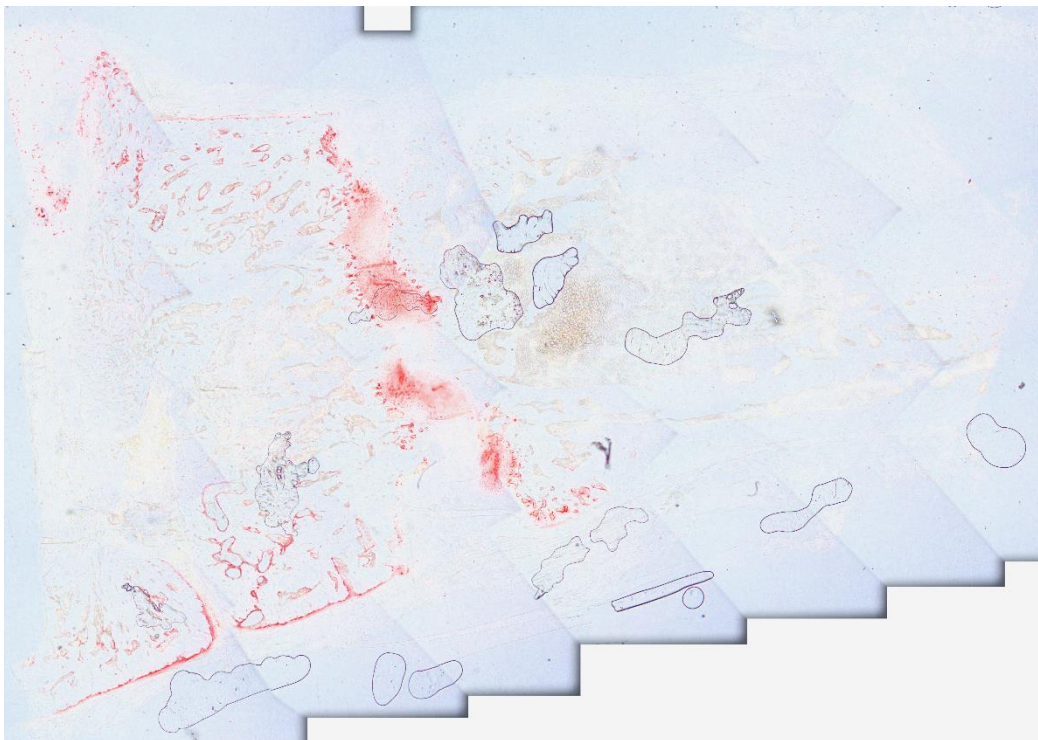


Image appartenant au groupe G-CSF pour la coloration TRAP



## Annexe 4 :

Données brutes obtenues à la suite des essais de flexion trois-points (chapitre 4) :

**Tableau A.5.** Dimensions des échantillons distractés

Numéro	Moyenne Epaisseur (mm)	Longueur (mm)	Allongement (mm)	$I_x$ (mm <sup>4</sup> )
G1	7	47.08	5.1	117.9
G2	5.42	47.69	5.89	42.4
G3	8.67	45.65	4.16	277.4
C1	8.96	44.57	4	316.4
C2	8.39	45.64	4.41	243.2
C3	6.77	44.12	4.25	103.1
C4	4.88	45.47	4.37	27.8

**Tableau A.6.** Dimensions des échantillons controlatéraux

Numéro	Moyenne épaisseur (mm)	Longueur (mm)	$I_x$ (mm <sup>4</sup> )
C1	4.31	40.75	16.9
C2	5.02	41.23	31.2
G1	5.13	42.98	34
G2	4.69	41.80	23.8
G3	4.81	41.49	26.3
C3	4.54	40.87	20.9
C4	4.72	41.10	24.4

**Tableau A.7.** Résultats des essais de flexion trois-points - Distractés

Groupe	Force maximale (N)	Rigidité (N/mm)	Contrainte maximale (MPa)	Déformation maximale (%)	Module d'Young (MPa)	Energie pour la rupture (J)
G-CSF	85.6	123.9	11	0.17	128	36.7
G-CSF	108.2	119.7	31	0.17	343	54.7
G-CSF	69.8	58.2	5	0.59	26	50.6
Contrôle	48	27.9	3	0.56	11	46.2
Contrôle	102.1	167.6	8	0.36	82	44.7
Contrôle	59.9	14.2	9	0.70	17	74.9
Contrôle	23.3	16	9	0.32	70	19.9
Moyenne et écart-type ( $\pm$ )						
G-CSF	87.9 $\pm$ 19.3	100.6 $\pm$ 36.8	15.8 $\pm$ 13.7	0.31 $\pm$ 0.24	165.6 $\pm$ 162.3	47.3 $\pm$ 9.5
Contrôle	58.3 $\pm$ 33	56.4 $\pm$ 74.4	7.3 $\pm$ 2.9	0.49 $\pm$ 0.2	45.2 $\pm$ 36.9	46.4 $\pm$ 22.5
P-value	p = 0.216	p = 0.377	p = 0.377	p = 0.377	p = 0.216	p = 0.860

*\*Test de Mann-Whitney, différence significative à partir de  $p < 0.05$*

**Tableau A.8.** Résultats des essais de flexion trois-points - Controlatérales

Groupe	Force maximale (N)	Rigidité (N/mm)	Contrainte maximale (MPa)	Déformation maximale (%)	Module d'Young (MPa)	Energie pour la rupture (J)
G-CSF	196	486.3	67	0.11	1738	82.9
G-CSF	188	539.4	84	0.10	2760	76.5
G-CSF	141.6	368	58	0.07	1702	60.2
Contrôle	140.3	351.7	80	0.12	2566	72.6
Contrôle	155.1	325.8	56	0.09	1270	75.2
Contrôle	166.7	421.7	82	0.09	2457	109.8
Contrôle	176.9	386.7	77	0.1	1928	93.2
Moyenne $\pm$ écart-type						
G-CSF	179.2 $\pm$ 20	481.8 $\pm$ 62	79.2 $\pm$ 14	0.087 $\pm$ 0.02	2470.6 $\pm$ 610	73.5 $\pm$ 8
Contrôle	159.3 $\pm$ 14	381.3 $\pm$ 42	71 $\pm$ 12	0.099 $\pm$ 0.01	1990.8 $\pm$ 533	86.5 $\pm$ 15
*P-values	p = 0.083	<b>*p = 0.036</b>	p = 0.235	p = 0.315	p = 0.235	p = 0.315

*\*Test de Mann-Whitney, différence significative à partir de  $p < 0.05$*

# Bibliographie

1. Deschaseaux, F.; Sensébé, L.; Heymann, D. Mechanisms of Bone Repair and Regeneration. *Trends Mol. Med.* **2009**, *15*, 417–429, doi:10.1016/j.molmed.2009.07.002.
2. Sikavitsas, V.I.; Temenoff, J.S.; Mikos, A.G. Biomaterials and Bone Mechanotransduction. *Biomaterials* **2001**, *22*, 2581–2593, doi:10.1016/S0142-9612(01)00002-3.
3. Moore, D.C.; Leblanc, C.W.; Müller, R.; Crisco, J.J.; Ehrlich, M.G. Physiologic Weight-Bearing Increases New Vessel Formation during Distraction Osteogenesis: A Micro-Tomographic Imaging Study. *J. Orthop. Res.* **2003**, *21*, 489–496, doi:10.1016/S0736-0266(02)00234-6.
4. Duchamp de Lageneste, O.; Julien, A.; Abou-Khalil, R.; Frangi, G.; Carvalho, C.; Cagnard, N.; Cordier, C.; Conway, S.J.; Colnot, C. Periosteum Contains Skeletal Stem Cells with High Bone Regenerative Potential Controlled by Periostin. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 773, doi:10.1038/s41467-018-03124-z.
5. Simpson, A.H.R.W. The Blood Supply of the Periosteum: *Plast. Reconstr. Surg.* **1986**, *78*, 548, doi:10.1097/00006534-198610000-00053.
6. Nahian, A.; Chauhan, P.R. Histology, Periosteum And Endosteum. 16.
7. Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *3*, S131–S139, doi:10.2215/CJN.04151206.
8. Doblaré, M.; García, J.M.; Gómez, M.J. Modelling Bone Tissue Fracture and Healing: A Review. *Eng. Fract. Mech.* **2004**, *71*, 1809–1840, doi:10.1016/j.engfracmech.2003.08.003.
9. Galante, J.; Rostoker, W.; Ray, R.D. Physical Properties of Trabecular Bone. *Calcif. Tissue Res.* **1970**, *5*, 236–246, doi:10.1007/BF02017552.
10. Su, X.; Sun, K.; Cui, F.Z.; Landis, W.J. Organization of Apatite Crystals in Human Woven Bone. *Bone* **2003**, *32*, 150–162, doi:10.1016/S8756-3282(02)00945-6.
11. Rho, J.-Y.; Kuhn-Spearing, L.; Zioupos, P. Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone. *Med. Eng. Phys.* **1998**, *20*, 92–102, doi:10.1016/S1350-4533(98)00007-1.
12. Kopp, H.-G.; AVECILLA, S.T.; Hooper, A.T.; Rafii, S. The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization. *Physiology* **2005**, *20*, 349–356, doi:10.1152/physiol.00025.2005.
13. Lu, W.; Gao, B.; Fan, J.; Cheng, P.; Hu, Y.; Jie, Q.; Luo, Z.; Yang, L. Mesenchymal Progenitors Derived from Different Locations in Long Bones Display Diverse Characteristics. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 1–11, doi:10.1155/2019/5037578.
14. Philippe Bourin; Luc Sensebé; Pierre Charbord Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) : Données, Controverses, Perspectives. *Hématologie* **2004**, *10*, 434–443.
15. Golub, E.E. Biomineralization and Matrix Vesicles in Biology and Pathology. *Semin. Immunopathol.* **2011**, *33*, 409–417, doi:10.1007/s00281-010-0230-z.
16. Endo-Munoz, L.; EVDOKIOU, A.; SAUNDERS, N.A. The Role of Osteoclasts and Tumour-Associated Macrophages in Osteosarcoma Metastasis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **2012**, *1826*, 434–442, doi:10.1016/j.bbcan.2012.07.003.
17. Baron, R. L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *médecine/sciences* **2001**, *17*, 1260–1269, doi:10.1051/medsci/200117121260.
18. Khosla, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. 6.
19. Pérez-Sayáns, M.; Somoza-Martín, J.M.; Barros-Angueira, F.; Rey, J.M.G.; García-García, A. RANK/RANKL/OPG Role in Distraction Osteogenesis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* **2010**, *109*, 679–686, doi:10.1016/j.tripleo.2009.10.042.
20. Bonewald, L.F.; Johnson, M.L. Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone* **2008**, *42*, 606–615, doi:10.1016/j.bone.2007.12.224.
21. Wittig, N.K.; Bach-Gansmo, F.L.; Birkbak, M.E.; Laugesen, M.; Brüel, A.; Thomsen, J.S.; Birkedal, H. Organ and Tissue Level Properties Are More Sensitive to Age than Osteocyte Lacunar Characteristics in Rat Cortical Bone. *Bone Rep.* **2016**, *4*, 28–34, doi:10.1016/j.bonr.2015.11.003.

22. Dong, P.; Hauptert, S.; Hesse, B.; Langer, M.; Gouttenoire, P.-J.; Bousson, V.; Peyrin, F. 3D Osteocyte Lacunar Morphometric Properties and Distributions in Human Femoral Cortical Bone Using Synchrotron Radiation Micro-CT Images. *Bone* **2014**, *60*, 172–185, doi:10.1016/j.bone.2013.12.008.
23. Collagen Family of Proteins. *FASEB J.* **10**.
24. Bouletreau, P.J.; Warren, S.M.; Longaker, M.T. The Molecular Biology of Distraction Osteogenesis. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2002**, *30*, 1–11, doi:10.1054/jcms.2001.0263.
25. Alford, A.I.; Kozloff, K.M.; Hankenson, K.D. Extracellular Matrix Networks in Bone Remodeling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2015**, *65*, 20–31, doi:10.1016/j.biocel.2015.05.008.
26. Gupta, H.S.; Schratte, S.; Tesch, W.; Roschger, P.; Berzlanovich, A.; Schoeberl, T.; Klaushofer, K.; Fratzl, P. Two Different Correlations between Nanoindentation Modulus and Mineral Content in the Bone–Cartilage Interface. *J. Struct. Biol.* **2005**, *149*, 138–148, doi:10.1016/j.jsb.2004.10.010.
27. Hasler, C.C.; Krieg, A.H. Current Concepts of Leg Lengthening. *J. Child. Orthop.* **2012**, *6*, 89–104, doi:10.1007/s11832-012-0391-5.
28. Spiegl, U.; Pätzold, R.; Friederichs, J.; Hungerer, S.; Militz, M.; Bühren, V. Clinical Course, Complication Rate and Outcome of Segmental Resection and Distraction Osteogenesis after Chronic Tibial Osteitis. *Injury* **2013**, *44*, 1049–1056, doi:10.1016/j.injury.2013.05.003.
29. Solomin, L.N. *The Basic Principles of External Fixation Using the Ilizarov Device*; 1. ed.; Springer: Milan, 2008; ISBN 978-88-470-0512-9.
30. Codivilla, A. The Classic: On the Means of Lengthening, in the Lower Limbs, the Muscles and Tissues Which Are Shortened Through Deformity. *Clin. Orthop.* **2008**, *466*, 2903–2909, doi:10.1007/s11999-008-0518-7.
31. Wiedemann, M. Callus Distraction: A New Method? A Historical Review of Limb Lengthening. *Clin. Orthop.* **1996**, 291–304.
32. Kumar, G.; Narayan, B. The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues Part I. The Influence of Stability of Fixation and Soft-Tissue Preservation. In *Classic Papers in Orthopaedics*; Banaszkiwicz, P.A., Kader, D.F., Eds.; Springer London: London, 2014; pp. 519–522 ISBN 978-1-4471-5450-1.
33. Marsh, D.R.; Shah, S.; Elliott, J.; Kurdy, N. The Ilizarov Method in Nonunion, Malunion and Infection of Fractures. *J Bone Jt. Surg Br* **1997**, *79*, 273–279.
34. Alonso-Goulart, V.; Ferreira, L.B.; Duarte, C.A.; Lima, I.L. de; Ferreira, E.R.; Oliveira, B.C. de; Vargas, L.N.; Moraes, D.D. de; Silva, I.B.B.; Faria, R. de O.; et al. Mesenchymal Stem Cells from Human Adipose Tissue and Bone Repair: A Literature Review. *Biotechnol. Res. Innov.* **2018**, *2*, 74–80, doi:10.1016/j.biori.2017.10.005.
35. Wang, J.; Chen, Z.; Sun, M.; Xu, H.; Gao, Y.; Liu, J.; Li, M. Characterization and Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Tissue Cell* **2020**, *64*, 101330, doi:10.1016/j.tice.2020.101330.
36. Pérez-Silos, V.; Camacho-Morales, A.; Fuentes-Mera, L. Mesenchymal Stem Cells Subpopulations: Application for Orthopedic Regenerative Medicine. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 1–9, doi:10.1155/2016/3187491.
37. Cesselli, D.; Beltrami, A.P.; Rigo, S.; Bergamin, N.; D’Aurizio, F.; Verardo, R.; Piazza, S.; Klaric, E.; Fanin, R.; Toffoletto, B.; et al. Multipotent Progenitor Cells Are Present in Human Peripheral Blood. *Circ. Res.* **2009**, *104*, 1225–1234, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.195859.
38. Hass, R.; Kasper, C.; Böhm, S.; Jacobs, R. Different Populations and Sources of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC): A Comparison of Adult and Neonatal Tissue-Derived MSC. *Cell Commun. Signal.* **2011**, *9*, 12, doi:10.1186/1478-811X-9-12.
39. Yamachika, E.; Iida, S. Bone Regeneration from Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Compact Bone-Derived MSCs as an Animal Model. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **2013**, *49*, 35–44, doi:10.1016/j.jdsr.2012.11.003.
40. Noël, D.; Djouad, F.; Mrugala, D.; Bouffi, C.; Jorgensen, C. Cellules souches mésenchymateuses et immunotolérance : vers quelles applications cliniques ? **2007**, *13*, 8.



41. L. Ramos, T.; Sánchez-Abarca, L.I.; Muntión, S.; Preciado, S.; Puig, N.; López-Ruano, G.; Hernández-Hernández, Á.; Redondo, A.; Ortega, R.; Rodríguez, C.; et al. MSC Surface Markers (CD44, CD73, and CD90) Can Identify Human MSC-Derived Extracellular Vesicles by Conventional Flow Cytometry. *Cell Commun. Signal.* **2016**, *14*, 2, doi:10.1186/s12964-015-0124-8.
42. Hermida-Gómez, T.; Fuentes-Boquete, I.; Gimeno-Longas, M.J.; Muiños-López, E.; Díaz-Prado, S.; de Toro, F.J.; Blanco, F.J. Bone Marrow Cells Immunomagnetically Selected For CD271+ Antigen Promote *In Vitro* the Repair of Articular Cartilage Defects. *Tissue Eng. Part A* **2011**, *17*, 1169–1179, doi:10.1089/ten.tea.2010.0346.
43. Dahl, A.; Almeida-Porada, G.; Porada, C.D.; Soker, S. Peripheral Blood Stem Cells. In *Principles of Regenerative Medicine*; Elsevier, 2019; pp. 307–333 ISBN 978-0-12-809880-6.
44. Nervi, B.; Link, D.C.; DiPersio, J.F. Cytokines and Hematopoietic Stem Cell Mobilization. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *99*, 690–705, doi:10.1002/jcb.21043.
45. Mayani, H.; Alvarado-Moreno, J.A.; Flores-Guzmán, P. Biology of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Present in Circulation. *Arch. Med. Res.* **2003**, *34*, 476–488, doi:10.1016/j.arcmed.2003.08.004.
46. Asahara, T.; Isner, J.M. Endothelial Progenitor Cells for Vascular Regeneration. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **2002**, *11*, 171–178, doi:10.1089/152581602753658385.
47. Wognum, A.W.; Eaves, A.C.; Thomas, T.E. Identification and Isolation of Hematopoietic Stem Cells. *Arch. Med. Res.* **2003**, *15*.
48. Asahara, T.; Murohara, T.; Sullivan, A.; Silver, M.; van der Zee, R.; Li, T.; Witzenbichler, B.; Schatteman, G.; Isner, J.M. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* **1997**, *275*, 964–966, doi:10.1126/science.275.5302.964.
49. Eguchi, M.; Masuda, H.; Asahara, T. Endothelial Progenitor Cells for Postnatal Vasculogenesis. *Clin. Exp. Nephrol.* **2007**, *11*, 18–25, doi:10.1007/s10157-006-0448-1.
50. Urbich, C.; Dimmeler, S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 343–353, doi:10.1161/01.RES.0000137877.89448.78.
51. Rehman, J.; Li, J.; Orschell, C.M.; March, K.L. Peripheral Blood “Endothelial Progenitor Cells” Are Derived From Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors. *Circulation* **2003**, *107*, 1164–1169, doi:10.1161/01.CIR.0000058702.69484.A0.
52. Desjardins, S.F.; Berchiche, Y.A.; Haddad, E.; Heveker, N. CXCR4, un récepteur de chimiokine aux multiples talents. *médecine/sciences* **2007**, *23*, 980–984, doi:10.1051/medsci/20072311980.
53. Aiuti, A.; Webb, I.J.; Bleul, C.; Springer, T.; Gutierrez-Ramos, J.C. The Chemokine SDF-1 Is a Chemoattractant for Human CD34<sup>+</sup> Hematopoietic Progenitor Cells and Provides a New Mechanism to Explain the Mobilization of CD34<sup>+</sup> Progenitors to Peripheral Blood. *10*.
54. Lévesque, J.-P.; Hendy, J.; Takamatsu, Y.; Simmons, P.J.; Bendall, L.J. Disruption of the CXCR4/CXCL12 Chemotactic Interaction during Hematopoietic Stem Cell Mobilization Induced by G-CSF or Cyclophosphamide. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 187–196, doi:10.1172/JCI15994.
55. Lapidot, T.; Petit, I.; Kollet, O. I. CURRENT UNDERSTANDING OF FACTORS INFLUENCING STEM CELL MOBILIZATION. **2003**, *19*.
56. Askari, A.T.; Unzek, S.; Popovic, Z.B.; Goldman, C.K.; Forudi, F.; Kiedrowski, M.; Rovner, A.; Ellis, S.G.; Thomas, J.D.; DiCorleto, P.E.; et al. Effect of Stromal-Cell-Derived Factor 1 on Stem-Cell Homing and Tissue Regeneration in Ischaemic Cardiomyopathy. *The Lancet* **2003**, *362*, 697–703, doi:10.1016/S0140-6736(03)14232-8.
57. Xu, J.; Chen, Y.; Liu, Y.; Zhang, J.; Kang, Q.; Ho, K.; Chai, Y.; Li, G. Effect of SDF-1/Cxcr4 Signaling Antagonist AMD3100 on Bone Mineralization in Distraction Osteogenesis. *Calcif. Tissue Int.* **2017**, *100*, 641–652, doi:10.1007/s00223-017-0249-4.
58. Zhao, F.; Cheng, T.; Yang, L.; Huang, Y.; Li, C.; Han, J.; Li, X.; Fang, L.; Feng, D.; Tang, Y.; et al. G-CSF Inhibits Pulmonary Fibrosis by Promoting BMSC Homing to the Lungs via SDF-1/CXCR4 Chemotaxis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 10515, doi:10.1038/s41598-020-65580-2.
59. Kitaori, T.; Ito, H.; Schwarz, E.M.; Tsutsumi, R.; Yoshitomi, H.; Oishi, S.; Nakano, M.; Fujii, N.; Nagasawa, T.; Nakamura, T. Stromal Cell-Derived Factor 1/CXCR4 Signaling Is Critical for the

- Recruitment of Mesenchymal Stem Cells to the Fracture Site during Skeletal Repair in a Mouse Model. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 813–823, doi:10.1002/art.24330.
60. Kawakami, Y.; Ii, M.; Matsumoto, T.; Kuroda, R.; Kuroda, T.; Kwon, S.-M.; Kawamoto, A.; Akimaru, H.; Mifune, Y.; Shoji, T.; et al. SDF-1/CXCR4 Axis in Tie2-Lineage Cells Including Endothelial Progenitor Cells Contributes to Bone Fracture Healing: SDF-1/CXCR4 AXIS AND BONE FRACTURE HEALING. *J. Bone Miner. Res.* **2015**, *30*, 95–105, doi:10.1002/jbmr.2318.
  61. Li, D.-W.; Liu, Z.-Q.; Wei, J.; Liu, Y.; Hu, L.-S. Contribution of Endothelial Progenitor Cells to Neovascularization. *Int. J. Mol. Med.* **2012**, *30*, 1000–1006, doi:10.3892/ijmm.2012.1108.
  62. Heissig, B.; Hattori, K.; Dias, S.; Friedrich, M.; Ferris, B.; Hackett, N.R.; Crystal, R.G.; Besmer, P.; Lyden, D.; Moore, M.A.S.; et al. Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell* **2002**, *109*, 625–637, doi:10.1016/S0092-8674(02)00754-7.
  63. Dimitriou, R.; Tsiridis, E.; Giannoudis, P.V. Current Concepts of Molecular Aspects of Bone Healing. *Injury* **2005**, *36*, 1392–1404, doi:10.1016/j.injury.2005.07.019.
  64. Mora-Macías, J.; Pajares, A.; Miranda, P.; Domínguez, J.; Reina-Romo, E. Mechanical Characterization via Nanoindentation of the Woven Bone Developed during Bone Transport. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *74*, 236–244, doi:10.1016/j.jmbbm.2017.05.031.
  65. Al-Aql, Z.S.; Alagl, A.S.; Graves, D.T.; Gerstenfeld, L.C.; Einhorn, T.A. Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. *J. Dent. Res.* **2008**, *87*, 107–118, doi:10.1177/154405910808700215.
  66. Dhaliwal, K.; Kunchur, R.; Farhadieh, R. Review of the Cellular and Biological Principles of Distraction Osteogenesis: An in Vivo Bioreactor Tissue Engineering Model. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **2016**, *69*, e19–e26, doi:10.1016/j.bjps.2015.11.003.
  67. Lammens, J.; Liu, Z.; Aerssens, J.; Dequeker, J.; Fabry, G. Distraction Bone Healing versus Osteotomy Healing: A Comparative Biochemical Analysis. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 279–286.
  68. Makhdoum, A.M.; Hamdy, R.C. The Role of Growth Factors on Acceleration of Bone Regeneration During Distraction Osteogenesis. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2013**, *19*, 442–453, doi:10.1089/ten.teb.2012.0717.
  69. Alam, N.; St-Arnaud, R.; As, D.L.; Rosen, V.; Hamdy, R.C. Are Endogenous BMPs Necessary for Bone Healing during Distraction Osteogenesis? *Clin. Orthop.* **2009**, *467*, 9.
  70. Sato, M.; Yasui, N.; Nakase, T.; Kawahata, H.; Sugimoto, M.; Hirota, S.; Kitamura, Y.; Nomura, S.; Ochi, T. Expression of Bone Matrix Proteins mRNA during Distraction Osteogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 1221–1231.
  71. Eingartner, C.; Coerper, S.; Fritz, J.; Gaissmaier, C.; Koveker, G.; Weise, K. Growth Factors in Distraction Osteogenesis. *Int. Orthop.* **1999**, *23*, 253–259, doi:10.1007/s002640050365.
  72. Hu, J.; Zou, S.; Li, J.; Chen, Y.; Wang, D.; Gao, Z. Temporospatial Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor during Mandibular Distraction Osteogenesis. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2003**, *31*, 238–243, doi:10.1016/S1010-5182(03)00034-9.
  73. Chim, S.M.; Tickner, J.; Chow, S.T.; Kuek, V.; Guo, B.; Zhang, G.; Rosen, V.; Erber, W.; Xu, J. Angiogenic Factors in Bone Local Environment. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2013**, *24*, 297–310, doi:10.1016/j.cytogfr.2013.03.008.
  74. Pacicca, D. Expression of Angiogenic Factors during Distraction Osteogenesis. *Bone* **2003**, *33*, 889–898, doi:10.1016/j.bone.2003.06.002.
  75. Choi, I.H.; Chung, C.Y.; Cho, T.J.; Yoo, W.J. Angiogenesis and Mineralization During Distraction Osteogenesis. *J. Korean Med. Sci.* **2002**, *17*, 435, doi:10.3346/jkms.2002.17.4.435.
  76. Yang, Y.-Q.; Tan, Y.-Y.; Wong, R.; Wenden, A.; Zhang, L.-K.; Rabie, A.B.M. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Ossification. *Int. J. Oral Sci.* **5**.
  77. Runyan, C.M.; Gabrick, K.S. Biology of Bone Formation, Fracture Healing, and Distraction Osteogenesis. *J. Craniofac. Surg.* **2017**, *28*, 1380–1389, doi:10.1097/SCS.00000000000003625.
  78. Buschmann, I.; Schaper, W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *Physiology* **1999**, *14*, 121–125, doi:10.1152/physiologyonline.1999.14.3.121.

79. Xu, J.; Sun, Y.; Wu, T.; Liu, Y.; Shi, L.; Zhang, J.; Kang, Q.; Chai, Y.; Li, G. Enhancement of Bone Regeneration with the Accordion Technique via HIF-1 $\alpha$ /VEGF Activation in a Rat Distraction Osteogenesis Model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *12*, e1268–e1276, doi:10.1002/term.2534.
80. Carvalho, R.S.; Einhorn, T.A.; Lehmann, W.; Edgar, C.; Al-Yamani, A.; Apazidis, A.; Pacicca, D.; Clemens, T.L.; Gerstenfeld, L.C. The Role of Angiogenesis in a Murine Tibial Model of Distraction Osteogenesis. *Bone* **2004**, *34*, 849–861, doi:10.1016/j.bone.2003.12.027.
81. Fang, T.D.; Salim, A.; Xia, W.; Nacamuli, R.P.; Guccione, S.; Song, H.M.; Carano, R.A.; Filvaroff, E.H.; Bednarski, M.D.; Giaccia, A.J.; et al. Angiogenesis Is Required for Successful Bone Induction During Distraction Osteogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **2005**, *20*, 1114–1124, doi:10.1359/JBMR.050301.
82. Zheng, L.W.; Ma, L.; Cheung, L.K. Angiogenesis Is Enhanced by Continuous Traction in Rabbit Mandibular Distraction Osteogenesis. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2009**, *37*, 405–411, doi:10.1016/j.jcms.2009.03.007.
83. Matsubara, H.; Hogan, D.E.; Morgan, E.F.; Mortlock, D.P.; Einhorn, T.A.; Gerstenfeld, L.C. Vascular Tissues Are a Primary Source of BMP2 Expression during Bone Formation Induced by Distraction Osteogenesis. *Bone* **2012**, *51*, 168–180, doi:10.1016/j.bone.2012.02.017.
84. Kähler, C.M.; Wechselberger, J.; Hilbe, W.; Gschwendtner, A.; Colleselli, D.; Niederegger, H.; Boneberg, E.-M.; Spizzo, G.; Wendel, A.; Gunsilius, E.; et al. Peripheral Infusion of Rat Bone Marrow Derived Endothelial Progenitor Cells Leads to Homing in Acute Lung Injury. *Respir. Res.* **2007**, *8*, 50, doi:10.1186/1465-9921-8-50.
85. Cetrulo, C.L.; Knox, K.R.; Brown, D.J.; Ashinoff, R.L.; Dobryansky, M.; Ceradini, D.J.; Capla, J.M.; Chang, E.I.; Bhatt, K.A.; McCarthy, J.G.; et al. Stem Cells and Distraction Osteogenesis: Endothelial Progenitor Cells Home to the Ischemic Generate in Activation and Consolidation: *Plast. Reconstr. Surg.* **2005**, *116*, 1053–1064, doi:10.1097/01.prs.0000178403.79051.70.
86. Lee, D.Y.; Cho, T.-J.; Kim, J.A.; Lee, H.R.; Yoo, W.J.; Chung, C.Y.; Choi, I.H. Mobilization of Endothelial Progenitor Cells in Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. *Bone* **2008**, *42*, 932–941, doi:10.1016/j.bone.2008.01.007.
87. Cai, W.; Schaper, W. Mechanisms of Arteriogenesis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2008**, *40*, 681–692, doi:10.1093/abbs/40.8.681.
88. Morgan, E.F.; Hussein, A.I.; Al-Awadhi, B.A.; Hogan, D.E.; Matsubara, H.; Al-Alq, Z.; Fitch, J.; Andre, B.; Hosur, K.; Gerstenfeld, L.C. Vascular Development during Distraction Osteogenesis Proceeds by Sequential Intramuscular Arteriogenesis Followed by Intraosteal Angiogenesis. *Bone* **2012**, *51*, 535–545, doi:10.1016/j.bone.2012.05.008.
89. Caton, J.H.; Dalery, J.; Chatelain, P. Lengthening of the lower limbs of short stature people ethnic and psychologic aspects. **2016**, *16*.
90. Pickering, V.; Jordan, R.C.; Schmidt, B.L.; Looser, K.G.; Shah, J.P.; Strong, E.W.; Chen, T.Y.; Emrich, L.J.; Driscoll, D.L.; Sloopweg, P.J.; et al. Principles of Distraction Osteogenesis. *Curr. Ther. Oral Maxillofac. Surg.* **2011**, *38*, 101.
91. Kojimoto, H.; Yasui, N.; Goto, T.; Matsuda, S.; Shimomura, Y. Bone Lengthening in Rabbits by Callus Distraction. The Role of Periosteum and Endosteum. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1988**, *70-B*, 543–549, doi:10.1302/0301-620X.70B4.3403595.
92. Moukoko, D. Le périoste vascularisé et la reconstruction osseuse. *Chir. Main* **2010**, *29*, S214–S220, doi:10.1016/j.main.2010.09.008.
93. Singh, M.; Vashistha, A.; Chaudhary, M.; Kaur, G. Biological Basis of Distraction Osteogenesis – A Review. *J. Oral Maxillofac. Surg. Med. Pathol.* **2016**, *28*, 1–7, doi:10.1016/j.ajoms.2015.05.006.
94. Loi, F.; Córdova, L.A.; Pajarinen, J.; Lin, T.; Yao, Z.; Goodman, S.B. Inflammation, Fracture and Bone Repair. *Bone* **2016**, *86*, 119–130, doi:10.1016/j.bone.2016.02.020.
95. Hu, K.; Olsen, B.R. The Roles of Vascular Endothelial Growth Factor in Bone Repair and Regeneration. *Bone* **2016**, *91*, 30–38, doi:10.1016/j.bone.2016.06.013.
96. Amir, L.R.; Everts, V.; Bronckers, A.L.J.J. Bone Regeneration during Distraction Osteogenesis. *Odontology* **2009**, *97*, 63–75, doi:10.1007/s10266-009-0101-z.

97. Compton, J.; Fragomen, A.; Rozbruch, S.R. Skeletal Repair in Distraction Osteogenesis: Mechanisms and Enhancements. *JBJS Rev.* **2015**, *3*, 1, doi:10.2106/JBJS.RVW.N.00107.
98. Percival, C.J.; Richtsmeier, J.T. Angiogenesis and Intramembranous Osteogenesis: Angiogenesis and Intramembranous Osteogenesis. *Dev. Dyn.* **2013**, *242*, 909–922, doi:10.1002/dvdy.23992.
99. Hvid, I.; Horn, J.; Huhnstock, S.; Steen, H. The Biology of Bone Lengthening. *J. Child. Orthop.* **2016**, *10*, 487–492, doi:10.1007/s11832-016-0780-2.
100. Hamdy, R.C. The Effect of Altering the Mechanical Loading Environment on the Expression of Bone Regenerating Molecules in Cases of Distraction Osteogenesis. *Front. Endocrinol.* **11**.
101. Nowazesh Ali, M.; Ejiri, S.; Kobayashi, T.; Anwar, R.B.; Oda, K.; Ohshima, H.; Saito, C. Histologic Study of the Cellular Events during Rat Mandibular Distraction Osteogenesis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* **2009**, *107*, 325–335, doi:10.1016/j.tripleo.2008.06.030.
102. Yasui, N.; Sato, M.; Ochi, T.; Kimura, T.; Kawahata, H.; Kitamura, Y.; Nomura, S. Three Modes of Ossification during Distraction Osteogenesis in the Rat. *Bone Jt. J.* **1997**, *79*, 824–830.
103. Forriol, F.; Denaro, L.; Longo, U.G.; Taira, H.; Maffulli, N.; Denaro, V. Bone Lengthening Osteogenesis, a Combination of Intramembranous and Endochondral Ossification: An Experimental Study in Sheep. **2010**, *8*.
104. Kanczler, J.M.; Oreffo, R.O.C. OSTEOGENESIS AND ANGIOGENESIS: THE POTENTIAL FOR ENGINEERING. **15**.
105. Launay, F.; Younsi, R.; Pithioux, M.; Chabrand, P.; Bollini, G.; Jouve, J.-L. Fracture Following Lower Limb Lengthening in Children: A Series of 58 Patients. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* **2013**, *99*, 72–79, doi:10.1016/j.otsr.2012.08.005.
106. Sangkaew, C. Distraction Osteogenesis of the Femur Using Conventional Monolateral External Fixator. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **2008**, *128*, 889–899, doi:10.1007/s00402-007-0437-1.
107. Krieg, A.H.; Lenze, U.; Speth, B.M.; Hasler, C.C. Intramedullary Leg Lengthening with a Motorized Nail: Indications, Challenges, and Outcome in 32 Patients. *Acta Orthop.* **2011**, *82*, 344–350, doi:10.3109/17453674.2011.584209.
108. Lascombes, P.; Popkov, D.; Huber, H.; Haumont, T.; Journeau, P. Classification of Complications after Progressive Long Bone Lengthening: Proposal for a New Classification. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* **2012**, *98*, 629–637, doi:10.1016/j.otsr.2012.05.010.
109. Prendergast, P.J.; Huiskes, R.; Søballe, K. Biophysical Stimuli on Cells during Tissue Differentiation at Implant Interfaces. *J. Biomech.* **1997**, *30*, 539–548, doi:10.1016/S0021-9290(96)00140-6.
110. Lacroix, D.; Prendergast, P.J. A Mechano-Regulation Model for Tissue Differentiation during Fracture Healing: Analysis of Gap Size and Loading. *J. Biomech.* **2002**, *35*, 1163–1171.
111. Isaksson, H.; Comas, O.; van Donkelaar, C.C.; Mediavilla, J.; Wilson, W.; Huiskes, R.; Ito, K. Bone Regeneration during Distraction Osteogenesis: Mechano-Regulation by Shear Strain and Fluid Velocity. *J. Biomech.* **2007**, *40*, 2002–2011, doi:10.1016/j.jbiomech.2006.09.028.
112. Ge, C.; Xiao, G.; Jiang, D.; Franceschi, R.T. Critical Role of the Extracellular Signal-Regulated Kinase-MAPK Pathway in Osteoblast Differentiation and Skeletal Development. *J. Cell Biol.* **2007**, *176*, 709–718, doi:10.1083/jcb.200610046.
113. Tong, L.; Buchman, S.R.; Ignelzi, M.A.; Rhee, S.; Goldstein, S.A. Focal Adhesion Kinase Expression during Mandibular Distraction Osteogenesis: Evidence for Mechanotransduction. *Plast. Reconstr. Surg.* **2003**, *111*, 211–222; discussion 223–224, doi:10.1097/01.PRS.0000033180.01581.9A.
114. Park, J.S.; Chu, J.S.; Tsou, A.D.; Diop, R.; Tang, Z.; Wang, A.; Li, S. The Effect of Matrix Stiffness on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Response to TGF- $\beta$ . *Biomaterials* **2011**, *32*, 3921–3930, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.019.
115. Mehrara, B.J.; Rowe, N.M.; Steinbrech, D.S.; Dudziak, M.E.; Saadeh, P.B.; McCarthy, J.G.; Gittes, G.K.; Longaker, M.T. Rat Mandibular Distraction Osteogenesis: II. Molecular Analysis of

- Transforming Growth Factor Beta-1 and Osteocalcin Gene Expression. *Plast. Reconstr. Surg.* **1999**, *103*, 536–547, doi:10.1097/00006534-199902000-00026.
116. Tsuchiya, H.; Tomita, K.; Minematsu, K.; Mori, Y.; Asada, N.; Kitano, S.; Tsuchiya, H.; Tomita, K.; Minematsu, K.; Mori, Y.; et al. LIMB SALVAGE USING DISTRACTION OSTEOGENESIS. *J. BONE Jt. Surg.* **1997**, *79*, 9.
  117. Wen, G.; Zhou, R.; Wang, Y.; Lu, S.; Chai, Y.; Yang, H. Management of Post-Traumatic Long Bone Defects: A Comparative Study Based on Long-Term Results. *Injury* **2019**, *50*, 2070–2074, doi:10.1016/j.injury.2019.07.029.
  118. Antoci, V.; Ono, C.M.; Jr, V.A.; Raney, E.M. Bone Lengthening in Children: How to Predict the Complications Rate and Complexity? *J Pediatr Orthop* **2006**, *26*, 7.
  119. Paley, D. Problems, Obstacles, and Complications of Limb Lengthening by the Ilizarov Technique: *Clin. Orthop.* **1990**, *NA*, 81–104, doi:10.1097/00003086-199001000-00011.
  120. Simpson, A.; Kenwright, J. Fracture after Distraction Osteogenesis. *Bone Jt. J.* **2000**, *82*, 659–665.
  121. Skoulis, T.; Vekris, M.; Terzis, J. Effect of Distraction Osteogenesis on the Peripheral Nerve: Experimental Study in the Rat. *J. Reconstr. Microsurg.* **1998**, *14*, 565–574, doi:10.1055/s-2008-1040777.
  122. Cho, T.-J.; Kim, J.A.; Chung, C.Y.; Yoo, W.J.; Gerstenfeld, L.C.; Einhorn, T.A.; Choi, I.H. Expression and Role of Interleukin-6 in Distraction Osteogenesis. *Calcif. Tissue Int.* **2007**, *80*, 192–200, doi:10.1007/s00223-006-0240-y.
  123. Schiller, J.R.; Moore, D.C.; Ehrlich, M.G. Increased Lengthening Rate Decreases Expression of Fibroblast Growth Factor 2, Platelet-Derived Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor, and CD31 in a Rat Model of Distraction Osteogenesis. *J. Pediatr. Orthop.* **2007**, *27*, 961–968.
  124. Seebach, C.; Skripitz, R.; Andreassen, T.T.; Aspenberg, P. Intermittent Parathyroid Hormone (1–34) Enhances Mechanical Strength and Density of New Bone after Distraction Osteogenesis in Rats. *J. Orthop. Res.* **2004**, *22*, 472–478, doi:10.1016/j.orthres.2003.08.018.
  125. Waanders, N.A.; Richards, M.; Steen, H.; Kuhn, J.L.; Goldstein, S.A.; Goulet, J.A. Evaluation of the Mechanical Environment during Distraction Osteogenesis. *Clin. Orthop.* **1998**, *349*, 225–234.
  126. Younger, A.S.E.; Morrison, J.; MacKenzie, W.G. Biomechanics of External Fixation and Limb Lengthening. *Foot Ankle Clin.* **2004**, *9*, 433–448, doi:10.1016/j.fcl.2004.05.015.
  127. Wang, Y.; Ni, M.; Tang, P.-F.; Li, G. Novel Application of HA-TCP Biomaterials in Distraction Osteogenesis Shortened the Lengthening Time and Promoted Bone Consolidation. *J. Orthop. Res.* **2009**, *27*, 477–482, doi:10.1002/jor.20782.
  128. Ni, M.; Li, G.; Tang, P.-F.; Chan, K.-M.; Wang, Y. RhBMP-2 Not Alendronate Combined with HA-TCP Biomaterial and Distraction Osteogenesis Enhance Bone Formation. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **2011**, *131*, 1469–1476, doi:10.1007/s00402-011-1357-7.
  129. Montes-Medina, L.; Hernández-Fernández, A.; Gutiérrez-Rivera, A.; Ripalda-Cemboráin, P.; Bitarte, N.; Pérez-López, V.; Granero-Moltó, F.; Prosper, F.; Izeta, A. Effect of Bone Marrow Stromal Cells in Combination with Biomaterials in Early Phases of Distraction Osteogenesis: An Experimental Study in a Rabbit Femur Model. *Injury* **2018**, *49*, 1979–1986, doi:10.1016/j.injury.2018.09.007.
  130. Pan, Q.; Li, Y.; Xu, J.; Kang, Y.; Li, Y.; Wang, B.; Yang, Y.P.; Lin, S.; Li, G. The Effects of Tubular Structure on Biomaterial Aided Bone Regeneration in Distraction Osteogenesis. *J. Orthop. Transl.* **2020**, *25*, 80–86, doi:10.1016/j.jot.2020.09.009.
  131. Wang, X.; Zhu, S.; Jiang, X.; Li, Y.; Song, D.; Hu, J. Systemic Administration of Lithium Improves Distracted Bone Regeneration in Rats. *Calcif. Tissue Int.* **2015**, *96*, 534–540, doi:10.1007/s00223-015-0004-7.
  132. Hong, P.; Boyd, D.; Beyea, S.D.; Bezuhyly, M. Enhancement of Bone Consolidation in Mandibular Distraction Osteogenesis: A Contemporary Review of Experimental Studies Involving Adjuvant Therapies. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **2013**, *66*, 883–895, doi:10.1016/j.bjps.2013.03.030.

133. Sailhan, F.; Gleyzolle, B.; Parot, R.; Guerini, H.; Viguier, E. Rh-BMP-2 in Distraction Osteogenesis: Dose Effect and Premature Consolidation. *Injury* **2010**, *41*, 680–686, doi:10.1016/j.injury.2009.10.010.
134. Simpson, A.; Keenan, G.; Nayagam, S.; Atkins, R.M.; Marsh, D.; Clement, N.D. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Does Not Influence Bone Healing by Distraction Osteogenesis. *Bone Jt. J* **2017**, *99*, 494–502.
135. Radomisli, T.E.; Moore, D.C.; Barrach, H.J.; Keeping, H.S.; Ehrlich, M.G. Weight-Bearing Alters the Expression of Collagen Types I and II, BMP 2/4 and Osteocalcin in the Early Stages of Distraction Osteogenesis. *J. Orthop. Res.* **2001**, *19*, 1049–1056.
136. Xu, J.; Sun, Y.; Wu, T.; Liu, Y.; Shi, L.; Zhang, J.; Kang, Q.; Chai, Y.; Li, G. Enhancement of Bone Regeneration with the Accordion Technique via HIF-1 $\alpha$ /VEGF Activation in a Rat Distraction Osteogenesis Model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *12*, doi:10.1002/term.2534.
137. Yang, Y.; Pan, Q.; Zou, K.; Wang, H.; Zhang, X.; Yang, Z.; Lee, W.Y.W.; Wei, B.; Gu, W.; Yang, Y.P.; et al. Administration of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells in Lengthening Phase Accelerates Early Bone Consolidation in Rat Distraction Osteogenesis Model. *Stem Cell Res. Ther.* **2020**, *11*, 129, doi:10.1186/s13287-020-01635-5.
138. Sunay, O.; Can, G.; Cakir, Z.; Denek, Z.; Kozanoglu, I.; Erbil, G.; Yilmaz, M.; Baran, Y. Autologous Rabbit Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Bone Injuries with Distraction Osteogenesis. *Cytotherapy* **2013**, *15*, 690–702, doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.004.
139. Yang, Y.; Lin, S.; Wang, B.; Gu, W.; Li, G. Stem Cell Therapy for Enhancement of Bone Consolidation in Distraction Osteogenesis: A Contemporary Review of Experimental Studies. *Bone Jt. Res.* **2017**, *6*, 385–390, doi:10.1302/2046-3758.66.BJR-2017-0023.
140. Lumpkin, C.K.; Aronson, J.; Shen, X.C.; Gao, G.G.; Skinner, R.A.; Badger, T.M. The Impact of Total Enteral Nutrition on Distraction Osteogenesis in a Rat Model. *J. Bone Miner. Res.* **1996**, *11*, 962–969.
141. Aronson, J.; Shen, X.C.; Skinner, R.A.; Hogue, W.R.; Badger, T.M.; Lumpkin, C.K. Rat Model of Distraction Osteogenesis. *J. Orthop. Res.* **1997**, *15*, 221–226.
142. Aronson, J.; Hogue, W.R.; Flahiff, C.M.; Gao, G.G.; Shen, X.C.; Skinner, R.A.; Badger, T.M.; Lumpkin, C.K. Development of Tensile Strength during Distraction Osteogenesis in a Rat Model. *J. Orthop. Res.* **2001**, *19*, 64–69.
143. Takamine, Y.; Tsuchiya, H.; Kitakoji, T.; Kurita, K.; Ono, Y.; Ohshima, Y.; Kitoh, H.; Ishiguro, N.; Iwata, H. Distraction Osteogenesis Enhanced by Osteoblastlike Cells and Collagen Gel. *Clin. Orthop.* **2002**, *399*, 240–246.
144. Sigurdson, U.; Reikeras, O.; Utvag, S.E. The Influence of Compression on the Healing of Experimental Tibial Fractures. *Injury* **2011**, *42*, 1152–1156, doi:10.1016/j.injury.2010.08.018.
145. Yang, J.-H.; Kim, H.-J.; Kim, S.-E.; Yun, Y.-P.; Bae, J.-H.; Kim, S.-J.; Choi, K.-H.; Song, H.-R. The Effect of Bone Morphogenic Protein-2-Coated Tri-Calcium Phosphate/Hydroxyapatite on New Bone Formation in a Rat Model of Femoral Distraction Osteogenesis. *Cytotherapy* **2012**, *14*, 315–326, doi:10.3109/14653249.2011.630728.
146. Erdem, M.; Gulabi, D.; Sen, C.; Sahin, S.A.; Bozdag, E. Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Melatonin on Distraction Osteogenesis: An Experimental Study. *SpringerPlus* **2014**, *3*, 1.
147. Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. 47.
148. Aronson, J.; Gao, G.G.; Shen, X.C.; McLaren, S.G.; Skinner, R.A.; Badger, T.M.; Lumpkin, C.K. The Effect of Aging on Distraction Osteogenesis in the Rat. *J. Orthop. Res.* **2001**, *19*, 421–427.
149. Zhao, Z.; Yang, D.; Ma, X.; Zhao, H.; Nie, C.; Si, Z. Successful Repair of a Critical-Sized Bone Defect in the Rat Femur with a Newly Developed External Fixator. *Tohoku J. Exp. Med.* **2009**, *219*, 115–120, doi:10.1620/tjem.219.115.
150. Histing, T.; Garcia, P.; Holstein, J.H.; Klein, M.; Matthys, R.; Nuetzi, R.; Steck, R.; Laschke, M.W.; Wehner, T.; Bindl, R.; et al. Small Animal Bone Healing Models: Standards, Tips, and

- Pitfalls Results of a Consensus Meeting. *Bone* **2011**, *49*, 591–599, doi:10.1016/j.bone.2011.07.007.
151. Bak, B.; Andreassen, T.T. The Effect of Aging on Fracture Healing in the Rat. *Calcif. Tissue Int.* **1989**, *45*, 292–297, doi:10.1007/BF02556022.
  152. Aronson, J.; Liu, L.; Liu, Z.; Gao, G.G.; Perrien, D.S.; Brown, E.C.; Skinner, R.A.; Thomas, J.R.; Morris, K.D.; Suva, L.J.; et al. Decreased Endosteal Intramembranous Bone Formation Accompanies Aging in a Mouse Model of Distraction Osteogenesis. *E-Biomed J. Regen. Med.* **2002**, *3*, 7–16, doi:10.1089/152489002760269667.
  153. Oda, T.; Wada, T.; Kuwabara, H.; Sawada, N.; Yamashita, T.; Kokai, Y. Ovariectomy Fails to Augment Bone Resorption and Marrow B Lymphopoiesis in Granulocyte Colony-Stimulating Factor Transgenic Mice. *J. Orthop. Sci.* **2005**, *10*, 70–76, doi:10.1007/s00776-004-0851-y.
  154. El Khassawna, T.; Böcker, W.; Govindarajan, P.; Schliefer, N.; Hürter, B.; Kampschulte, M.; Schlewitz, G.; Alt, V.; Lips, K.S.; Faulenbach, M.; et al. Effects of Multi-Deficiencies-Diet on Bone Parameters of Peripheral Bone in Ovariectomized Mature Rat. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71665, doi:10.1371/journal.pone.0071665.
  155. Estai, M.A.; Nirwana, I.; Shuid, A.N.; Das, S.; Ali, A.M.; Suhaimi, F.H. Histological Changes in the Fracture Callus Following the Administration of Water Extract of Piper Sarmentosum (Daun Kadok) in Estrogen-Deficient Rats. *9*.
  156. Vanacker, J.-M.; Bonnelye, E.; Fournier, B.; Laudet, V. L'effet des œstrogènes sur l'os : une histoire de famille. *15*, *7*.
  157. Pottratz, S.T.; Bellido, T.; Mocharla, H.; Crabb, D.; Manolagas, S.C. 17 Beta-Estradiol Inhibits Expression of Human Interleukin-6 Promoter-Reporter Constructs by a Receptor-Dependent Mechanism. *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 944–950, doi:10.1172/JCI117100.
  158. Yang, N.N.; Bryant, U.; Galvin, J.S.; Glasebrook, L.; Termine, D. Estrogen and Raloxifene Stimulate Transforming Growth Factor- $\beta$ 3 Gene Expression in Rat Bone: A Potential Mechanism for Estrogen- or Raloxifene- Mediated Bone Maintenance. *10*.
  159. Behrens, F. General Theory and Principles of External Fixation: *Clin. Orthop.* **1989**, *NA*, 15??23, doi:10.1097/00003086-198904000-00004.
  160. Chao, E.Y.; Aro, H.T.; Lewallen, D.G.; Kelly, P.J. The Effect of Rigidity on Fracture Healing in External Fixation. *Clin. Orthop.* **1989**, 24–35.
  161. Ilizarov, G.A. *Transosseous Osteosynthesis*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1992; ISBN 978-3-642-84390-7.
  162. García-Esponda, C.M.; Candela, A.M. Hindlimb Musculature of the Largest Living Rodent *Hydrochoerus Hydrochaeris* (Caviomorpha): Adaptations to Semiaquatic and Terrestrial Styles of Life: HINDLIMB MUSCULATURE OF HYDROCHOERUS. *J. Morphol.* **2016**, *277*, 286–305, doi:10.1002/jmor.20495.
  163. Fragomen, A.T.; Rozbruch, S.R. The Mechanics of External Fixation. *HSS J.* **2007**, *3*, 13–29, doi:10.1007/s11420-006-9025-0.
  164. Klein, P.; Schell, H.; Streitparth, F.; Heller, M.; Kassi, J.-P.; Kandziora, F.; Bragulla, H.; Haas, N.P.; Duda, G.N. The Initial Phase of Fracture Healing Is Specifically Sensitive to Mechanical Conditions. *J. Orthop. Res.* **2003**, *21*, 662–669, doi:10.1016/S0736-0266(02)00259-0.
  165. Pacicca, D.M.; Moore, D.C.; Ehrlich, M.G. Physiologic Weight-Bearing and Consolidation of New Bone in a Rat Model of Distraction Osteogenesis. *J. Pediatr. Orthop.* **2002**, *22*, 652–659.
  166. Richards, M.; Kozloff, K.M.; Goulet, J.A.; Goldstein, S.A. Increased Distraction Rates Influence Precursor Tissue Composition without Affecting Bone Regeneration. *J. Bone Miner. Res.* **2000**, *15*, 982–989.
  167. Welch, R.D.; Lewis, D.D. Distraction Osteogenesis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **1999**, *29*, 1187–1205, doi:10.1016/S0195-5616(99)50109-5.
  168. White, S.; Kenwright, J. The Timing of Distraction of an Osteotomy. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1990**, *72-B*, 356–361, doi:10.1302/0301-620X.72B3.2341426.
  169. Ilizarov, G.A. The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues: Part II. The Influence of the Rate and Frequency of Distraction. *Clin. Orthop.* **1989**, 263–285.

170. Li, G.; Simpson, A.H.R.W.; Kenwright, J.; Triffitt, J.T. Effect of Lengthening Rate on Angiogenesis during Distraction Osteogenesis: ANGIOGENESIS DURING DISTRACTION OSTEOGENESIS. *J. Orthop. Res.* **1999**, *17*, 362–367, doi:10.1002/jor.1100170310.
171. Hayatsu, K.; De Deyne, P.G. Muscle Adaptation during Distraction Osteogenesis in Skeletally Immature and Mature Rabbits. *J. Orthop. Res.* **2001**, *19*, 897–905.
172. Jauregui, J.J.; Ventimiglia, A.V.; Grieco, P.W.; Frumberg, D.B.; Herzenberg, J.E. Regenerate Bone Stimulation Following Limb Lengthening: A Meta-Analysis. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2016**, *17*, doi:10.1186/s12891-016-1259-5.
173. Ji, B.; Jiang, G.; Fu, J.; Long, J.; Wang, H. Why High Frequency of Distraction Improved the Bone Formation in Distraction Osteogenesis? *Med. Hypotheses* **2010**, *74*, 871–873, doi:10.1016/j.mehy.2009.11.026.
174. Prince, D.E.; Herzenberg, J.E.; Standard, S.C.; Paley, D. Lengthening With External Fixation Is Effective in Congenital Femoral Deficiency. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2015**, *473*, 3261–3271, doi:10.1007/s11999-015-4461-0.
175. Imagerie Médicale : Radiologie et Médecine Nucléaire. 628.
176. Régent, D.; Mandry, D.; Croise-Laurent, V.; Oliver, A.; Jausset, F.; Lombard, V. Production des rayons X en imagerie par projection et en scanographie. In *Scanner et Rayons X*; Elsevier, 2013; pp. 1–59 ISBN 978-2-294-73417-5.
177. Bouxsein, M.L.; Boyd, S.K.; Christiansen, B.A.; Guldberg, R.E.; Jepsen, K.J.; Müller, R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *J. Bone Miner. Res.* **2010**, *25*, 1468–1486, doi:10.1002/jbmr.141.
178. Morgan, E.F.; Mason, Z.D.; Chien, K.B.; Pfeiffer, A.J.; Barnes, G.L.; Einhorn, T.A.; Gerstenfeld, L.C. Micro-Computed Tomography Assessment of Fracture Healing: Relationships among Callus Structure, Composition, and Mechanical Function. *Bone* **2009**, *44*, 335–344, doi:10.1016/j.bone.2008.10.039.
179. Nyman, J.S.; Munoz, S.; Jadhav, S.; Mansour, A.; Yoshii, T.; Mundy, G.R.; Gutierrez, G.E. Quantitative Measures of Femoral Fracture Repair in Rats Derived by Micro-Computed Tomography. *J. Biomech.* **2009**, *42*, 891–897, doi:10.1016/j.jbiomech.2009.01.016.
180. Bissinger, O.; Götz, C.; Wolff, K.-D.; Hapfelmeier, A.; Prodinger, P.M.; Tischer, T. Fully Automated Segmentation of Callus by Micro-CT Compared to Biomechanics. *J. Orthop. Surg.* **2017**, *12*, doi:10.1186/s13018-017-0609-9.
181. Li, G.; Lopez, O.; Rubash, H. Variability of a Three-Dimensional Finite Element Model Constructed Using Magnetic Resonance Images of a Knee for Joint Contact Stress Analysis. *J. Biomech. Eng.* **2001**, *123*, 341–346, doi:10.1115/1.1385841.
182. Boas, F.E.; Fleischmann, D. CT Artifacts: Causes and Reduction Techniques. *Imaging Med.* **2012**, *4*, 229–240, doi:10.2217/iim.12.13.
183. Barrett, J.F.; Keat, N. Artifacts in CT: Recognition and Avoidance. *RadioGraphics* **2004**, *24*, 1679–1691, doi:10.1148/rg.246045065.
184. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W.; others NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat Methods* **2012**, *9*, 671–675.
185. Otsu, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* **1979**, *9*, 62–66, doi:10.1109/TSMC.1979.4310076.
186. Doube, M.; Klosowski, M.M.; Arganda-Carreras, I.; Cordelières, F.P.; Dougherty, R.P.; Jackson, J.S.; Schmid, B.; Hutchinson, J.R.; Shefelbine, S.J. BoneJ: Free and Extensible Bone Image Analysis in ImageJ. *Bone* **2010**, *47*, 1076–1079, doi:10.1016/j.bone.2010.08.023.
187. Barengolts, E.I.; Curry, D.J.; Bapna, M.S.; Kukreja, S.C. Effects of Endurance Exercise on Bone Mass and Mechanical Properties in Intact and Ovariectomized Rats. *J. Bone Miner. Res.* **2009**, *8*, 937–942, doi:10.1002/jbmr.5650080806.
188. Belill, K.A.; Settle, T.L.; Angel, C.R.; Kim, S.-W.; Rothwell, S.W. Femoral Strength after Induced Lesions in Rats. *Comp. Med.* **2014**, *64*, 7.



189. Bembey, A.K.; Bushby, A.J.; Boyde, A.; Ferguson, V.L.; Oyen, M.L. Hydration Effects on the Micro-Mechanical Properties of Bone. *J. Mater. Res.* **2006**, *21*, 1962–1968, doi:10.1557/jmr.2006.0237.
190. Ejersted, C.; Andreassen, T.T.; Oxlund, H.; Jørgensen, P.H.; Bak, B.; Häggblad, J.; Tørring, O.; Nilsson, M.H.L. Human Parathyroid Hormone (1-34) and (1-84) Increase the Mechanical Strength and Thickness of Cortical Bone in Rats. *J. Bone Miner. Res.* **2009**, *8*, 1097–1101, doi:10.1002/jbmr.5650080910.
191. Ekeland, A.; Engesæter, L.B.; Langeland, N. Mechanical Properties of Fractured and Intact Rat Femora Evaluated by Bending, Torsional and Tensile Tests. *Acta Orthop. Scand.* **1981**, *52*, 605–613, doi:10.3109/17453678108992155.
192. Steiner, M.; Volkheimer, D.; Meyers, N.; Wehner, T.; Wilke, H.-J.; Claes, L.; Ignatius, A. Comparison between Different Methods for Biomechanical Assessment of Ex Vivo Fracture Callus Stiffness in Small Animal Bone Healing Studies. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0119603, doi:10.1371/journal.pone.0119603.
193. Turner, C.H.; Burr, D.B. Experimental Techniques for Bone Mechanics. 35.
194. Turner, A.S. Research in Orthopedic Surgery. In *Surgical Research*; Elsevier, 2001; pp. 1137–1200 ISBN 978-0-12-655330-7.
195. Turner, C.H.; Burr, D.B. Basic Biomechanical Measurements of Bone: A Tutorial. *Bone* **1993**, *14*, 595–608, doi:10.1016/8756-3282(93)90081-K.
196. Jepsen, K.J.; Silva, M.J.; Vashishth, D.; Guo, X.E.; van der Meulen, M.C. Establishing Biomechanical Mechanisms in Mouse Models: Practical Guidelines for Systematically Evaluating Phenotypic Changes in the Diaphyses of Long Bones: ASSESSING BIOMECHANICAL MECHANISMS IN MOUSE LONG BONES. *J. Bone Miner. Res.* **2015**, *30*, 951–966, doi:10.1002/jbmr.2539.
197. Beaupied, H.; Lespessailles, E.; Benhamou, C.-L. Evaluation of macrostructural bone biomechanics. *Joint Bone Spine* **2007**, *74*, 233–239, doi:10.1016/j.jbspin.2007.01.019.
198. Wang, X.; Nyman, J.S.; Dong, X.; Leng, H.; Reyes, M. Fundamental Biomechanics in Bone Tissue Engineering. *Synth. Lect. Tissue Eng.* **2010**, *2*, 1–225, doi:10.2200/S00246ED1V01Y200912TIS004.
199. Mark, H.; Bergholm, J.; Nilsson, A.; Rydevik, B.; Strömberg, L. An External Fixation Method and Device to Study Fracture Healing in Rats. *Acta Orthop. Scand.* **2003**, *74*, 476–482.
200. Zhang, R.; Gong, H.; Zhu, D.; Ma, R.; Fang, J.; Fan, Y. Multi-Level Femoral Morphology and Mechanical Properties of Rats of Different Ages. *Bone* **2015**, *76*, 76–87, doi:10.1016/j.bone.2015.03.022.
201. Shefelbine, S.J.; Simon, U.; Claes, L.; Gold, A.; Gabet, Y.; Bab, I.; Müller, R.; Augat, P. Prediction of Fracture Callus Mechanical Properties Using Micro-CT Images and Voxel-Based Finite Element Analysis. *Bone* **2005**, *36*, 480–488, doi:10.1016/j.bone.2004.11.007.
202. Hsu, J.-T.; Wang, S.-P.; Huang, H.-L.; Chen, Y.-J.; Wu, J.; Tsai, M.-T. The Assessment of Trabecular Bone Parameters and Cortical Bone Strength: A Comparison of Micro-CT and Dental Cone-Beam CT. *J. Biomech.* **2013**, *46*, 2611–2618, doi:10.1016/j.jbiomech.2013.08.004.
203. Jämsä, T.; Jalovaara, P.; Peng, Z.; Väänänen, H.K.; Tuukkanen, J. Comparison of Three-Point Bending Test and Peripheral Quantitative Computed Tomography Analysis in the Evaluation of the Strength of Mouse Femur and Tibia. *Bone* **1998**, *23*, 155–161.
204. Leppänen, O.; Sievänen, H.; Jokihaara, J.; Pajamäki, I.; Järvinen, T.L. Three-Point Bending of Rat Femur in the Mediolateral Direction: Introduction and Validation of a Novel Biomechanical Testing Protocol. *J. Bone Miner. Res.* **2006**, *21*, 1231–1237, doi:10.1359/jbmr.060511.
205. Xue, J.; Peng, J.; Yuan, M.; Wang, A.; Zhang, L.; Liu, S.; Fan, M.; Wang, Y.; Xu, W.; Ting, K.; et al. NELL1 Promotes High-Quality Bone Regeneration in Rat Femoral Distraction Osteogenesis Model. *Bone* **2011**, *48*, 485–495, doi:10.1016/j.bone.2010.10.166.
206. Nomura, I.; Watanabe, K.; Matsubara, H.; Hayashi, K.; Sugimoto, N.; Tsuchiya, H. Uncultured Autogenous Adipose-Derived Regenerative Cells Promote Bone Formation During Distraction Osteogenesis in Rats. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2014**, *472*, 3798–3806, doi:10.1007/s11999-014-3608-8.

207. Li, R.; Saleh, M.; Yang, L.; Coulton, L. Radiographic Classification of Osteogenesis during Bone Distraction. *J. Orthop. Res.* **2006**, *24*, 339–347, doi:10.1002/jor.20026.
208. Leong, P.L.; Morgan, E.F. Measurement of Fracture Callus Material Properties via Nanoindentation. *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 1569–1575, doi:10.1016/j.actbio.2008.02.030.
209. Isaksson, H.; Nagao, S.; Małkiewicz, M.; Julkunen, P.; Nowak, R.; Jurvelin, J.S. Precision of Nanoindentation Protocols for Measurement of Viscoelasticity in Cortical and Trabecular Bone. *J. Biomech.* **2010**, *43*, 2410–2417, doi:10.1016/j.jbiomech.2010.04.017.
210. Moukoko, D.; Pourquier, D.; Genovesio, C.; Thezenas, S.; Chabrand, P.; Roffino, S.; Pithioux, M. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Enhances Bone Fracture Healing. *Clin. Biomech.* **2018**, *58*, 62–68, doi:10.1016/j.clinbiomech.2018.07.010.
211. Kolbeck, S.; Bail, H.; Schmidmaier, G.; Alquiza, M.; Raun, K.; Kappelgard, A.; Flyvbjerg, A.; Haas, N.; Raschke, M. Homologous Growth Hormone Accelerates Bone Healing—a Biomechanical and Histological Study. *Bone* **2003**, *33*, 628–637, doi:10.1016/S8756-3282(03)00232-1.
212. Lisignoli, G.; Fini, M.; Giavaresi, G.; Nicoli Aldini, N.; Toneguzzi, S.; Facchini, A. Osteogenesis of Large Segmental Radius Defects Enhanced by Basic Fibroblast Growth Factor Activated Bone Marrow Stromal Cells Grown on Non-Woven Hyaluronic Acid-Based Polymer Scaffold. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1043–1051, doi:10.1016/S0142-9612(01)00216-2.
213. Bi, L.; Jung, S.; Day, D.; Neidig, K.; Dusevich, V.; Eick, D.; Bonewald, L. Evaluation of Bone Regeneration, Angiogenesis, and Hydroxyapatite Conversion in Critical-sized Rat Calvarial Defects Implanted with Bioactive Glass Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100A*, 3267–3275, doi:10.1002/jbm.a.34272.
214. Ishida, K.; Matsumoto, T.; Sasaki, K.; Mifune, Y.; Tei, K.; Kubo, S.; Matsushita, T.; Takayama, K.; Akisue, T.; Tabata, Y.; et al. Bone Regeneration Properties of Granulocyte Colony-Stimulating Factor via Neovascularization and Osteogenesis. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 3271–3284, doi:10.1089/ten.tea.2009.0268.
215. Xu, J.; Wang, B.; Sun, Y.; Wu, T.; Liu, Y.; Zhang, J.; Lee, W.Y.; Pan, X.; Chai, Y.; Li, G. Human Fetal Mesenchymal Stem Cell Secretome Enhances Bone Consolidation in Distraction Osteogenesis. *Stem Cell Res. Ther.* **2016**, *7*, doi:10.1186/s13287-016-0392-2.
216. Weng, D.; Hürzeler, M.B.; Quiñones, C.R.; Ohlms, A.; Caffesse, R.G. Contribution of the Periosteum to Bone Formation in Guided Bone Regeneration: A Study in Monkeys. *Clin. Oral Implants Res.* **2000**, *11*, 546–554, doi:10.1034/j.1600-0501.2000.011006546.x.
217. Rungby, J.; Kassem, M.; Eriksen, E.F.; Danscher, G. The von Kossa Reaction for Calcium Deposits: Silver Lactate Staining Increases Sensitivity and Reduces Background. *Histochem. J.* **1993**, *25*, 446–451, doi:10.1007/BF00157809.
218. Bala, Y.; Lefèvre, E.; Roux, J.-P.; Baron, C.; Lasaygues, P.; Pithioux, M.; Kaftandjian, V.; Follet, H. Pore Network Microarchitecture Influences Human Cortical Bone Elasticity during Growth and Aging. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2016**, *63*, 164–173, doi:10.1016/j.jmbbm.2016.05.018.
219. Rodriguez-Florez, N.; Oyen, M.L.; Shefelbine, S.J. Insight into Differences in Nanoindentation Properties of Bone. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2013**, *18*, 90–99, doi:10.1016/j.jmbbm.2012.11.005.
220. VanLandingham, M.R. Review of Instrumented Indentation. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **2003**, *108*, 249, doi:10.6028/jres.108.024.
221. Qian, L.; Zhao, H. Nanoindentation of Soft Biological Materials. *Micromachines* **2018**, *9*, 654, doi:10.3390/mi9120654.
222. Oliver, W.C.; Pharr, G.M. An Improved Technique for Determining Hardness and Elastic Modulus Using Load and Displacement Sensing Indentation Experiments. *J. Mater. Res.* **1992**, *7*, 1564–1583, doi:10.1557/JMR.1992.1564.
223. Oyen, M.L.; Cook, R.F. Load–Displacement Behavior during Sharp Indentation of Viscous–Elastic–Plastic Materials. *J. Mater. Res.* **2003**, *18*, 139–150, doi:10.1557/JMR.2003.0020.
224. Oyen, M.L. Nanoindentation of Biological and Biomimetic Materials. *Exp. Tech.* **2013**, *37*, 73–87, doi:10.1111/j.1747-1567.2011.00716.x.

225. Zhang, J.; Niebur, G.L.; Ovaert, T.C. Mechanical Property Determination of Bone through Nano- and Micro-Indentation Testing and Finite Element Simulation. *J. Biomech.* **2008**, *41*, 267–275, doi:10.1016/j.jbiomech.2007.09.019.
226. Kan, Q.; Yan, W.; Kang, G.; Sun, Q. Oliver–Pharr Indentation Method in Determining Elastic Moduli of Shape Memory Alloys—A Phase Transformable Material. *J. Mech. Phys. Solids* **2013**, *61*, 2015–2033, doi:10.1016/j.jmps.2013.05.007.
227. Manjubala, I.; Liu, Y.; Epari, D.R.; Roschger, P.; Schell, H.; Fratzl, P.; Duda, G.N. Spatial and Temporal Variations of Mechanical Properties and Mineral Content of the External Callus during Bone Healing. *Bone* **2009**, *45*, 185–192, doi:10.1016/j.bone.2009.04.249.
228. Amanat, N.; He, L.H.; Swain, M.V.; Little, D.G. The Effect of Zoledronic Acid on the Intrinsic Material Properties of Healing Bone: An Indentation Study. *Med. Eng. Phys.* **2008**, *30*, 843–847, doi:10.1016/j.medengphy.2007.09.008.
229. Feng, L.; Chittenden, M.; Schirer, J.; Dickinson, M.; Jasiuk, I. Mechanical Properties of Porcine Femoral Cortical Bone Measured by Nanoindentation. *J. Biomech.* **2012**, *45*, 1775–1782, doi:10.1016/j.jbiomech.2012.05.001.
230. Boivin, G. Minéralisation et minéralité osseuses. *Therapies* **2003**, *58*, 409–413, doi:10.2515/therapie:2003066.
231. Hargrave-Thomas, E.; van Sloun, F.; Dickinson, M.; Broom, N.; Thambyah, A. Multi-Scalar Mechanical Testing of the Calcified Cartilage and Subchondral Bone Comparing Healthy vs Early Degenerative States. *Osteoarthritis Cartilage* **2015**, *23*, 1755–1762, doi:10.1016/j.joca.2015.05.012.
232. Shipov, A.; Zaslansky, P.; Riesemeier, H.; Segev, G.; Atkins, A.; Shahar, R. Unremodeled Endochondral Bone Is a Major Architectural Component of the Cortical Bone of the Rat (*Rattus Norvegicus*). *J. Struct. Biol.* **2013**, *183*, 132–140, doi:10.1016/j.jsb.2013.04.010.
233. Carmeli-Ligati, S.; Shipov, A.; Dumont, M.; Holtze, S.; Hildebrandt, T.; Shahar, R. The Structure, Composition and Mechanical Properties of the Skeleton of the Naked Mole-Rat (*Heterocephalus Glaber*). *Bone* **2019**, *128*, 115035, doi:10.1016/j.bone.2019.115035.
234. Chang, F.; Mishima, H.; Ishii, T.; Yanai, T.; Akaogi, H.; Sakai, S.; Yoshioka, T.; Ochiai, N. Stimulation of EP4 Receptor Enhanced Bone Consolidation during Distraction Osteogenesis. *J. Orthop. Res.* **2007**, *25*, 221–229, doi:10.1002/jor.20327.
235. Salem, K.H.; Schmelz, A. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Shortens the Treatment Time in Tibial Distraction Osteogenesis. *Int. Orthop.* **2014**, *38*, 1477–1482, doi:10.1007/s00264-013-2254-1.
236. Dudda, M.; Hauser, J.; Muhr, G.; Esenwein, S.A. Low-Intensity Pulsed Ultrasound as a Useful Adjuvant During Distraction Osteogenesis: A Prospective, Randomized Controlled Trial: *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care* **2011**, *71*, 1376–1380, doi:10.1097/TA.0b013e31821912b2.
237. Simpson, A.H.R.W.; Keenan, G.; Nayagam, S.; Atkins, R.M.; Marsh, D.; Clement, N.D. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Does Not Influence Bone Healing by Distraction Osteogenesis: A Multicentre Double-Blind Randomised Control Trial. *Bone Jt. J.* **2017**, *99-B*, 494–502, doi:10.1302/0301-620X.99B4.BJJ-2016-0559.R1.
238. Özgül, S.; Akdeniz, Z.D.; Çelebiler, Ö.; Alcan, T.; Sav, A. The Effect of 2 Different Distraction-Compression Models on New Bone Generation. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2012**, *70*, e490–e499, doi:10.1016/j.joms.2012.05.022.
239. Zhu, S.; Song, D.; Jiang, X.; Zhou, H.; Hu, J. Combined Effects of Recombinant Human BMP-2 and Nell-1 on Bone Regeneration in Rapid Distraction Osteogenesis of Rabbit Tibia. *Injury* **2011**, *42*, 1467–1473, doi:10.1016/j.injury.2011.05.040.
240. Sailhan, F.; Gleyzolle, B.; Parot, R.; Guerini, H.; Viguiet, E. Rh-BMP-2 in Distraction Osteogenesis: Dose Effect and Premature Consolidation. *Injury* **2010**, *41*, 680–686, doi:10.1016/j.injury.2009.10.010.
241. Lesaichot, V.; Leperlier, D.; Viateau, V.; Richarme, D.; Petite, H.; Sailhan, F. The Influence of Bone Morphogenetic Protein-2 on the Consolidation Phase in a Distraction Osteogenesis Model. *Injury* **2011**, *42*, 1460–1466, doi:10.1016/j.injury.2011.05.039.

242. Roux, S.; Leotot, J.; Chevallier, N.; Bierling, P.; Rouard, H. Cellules stromales mésenchymateuses : propriétés biologiques et perspectives thérapeutiques. *Transfus. Clin. Biol.* **2011**, *18*, 1–12, doi:10.1016/j.tracli.2011.01.001.
243. AO Research Institute, Clavadelerstrasse 8, CH 7270-Davos Platz, Switzerland; Ralphs, J.; Alini, M.; Stoddart, M. Enhancing Inflammatory and Chemotactic Signals to Regulate Bone Regeneration. *Eur. Cell. Mater.* **2014**, *28*, 320–334, doi:10.22203/eCM.v028a22.
244. Bendall, L.J.; Bradstock, K.F. G-CSF: From Granulopoietic Stimulant to Bone Marrow Stem Cell Mobilizing Agent. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25*, 355–367, doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.011.
245. Lieschke, G.J.; Grail, D.; Hodgson, G.; Metcalf, D.; Stanley, E.; Cheers, C.; Fowler, K.J.; Basu, S.; Zhan, Y.F.; Dunn, A.R. Mice Lacking Granulocyte Colony-Stimulating Factor Have Chronic Neutropenia, Granulocyte and Macrophage Progenitor Cell Deficiency, and Impaired Neutrophil Mobilization. *Blood* **1994**, *84*, 1737–1746.
246. Gębura, K.; Butrym, A.; Chaszczewska-Markowska, M.; Wróbel, T.; Kuliczkowski, K.; Bogunia-Kubik, K. G-CSF Administration Favours SDF-1 Release and Activation of Neutrophils and Monocytes in Recipients of Autologous Peripheral Blood Progenitor Cells. *Cytokine* **2019**, *116*, 38–47, doi:10.1016/j.cyto.2018.12.011.
247. Viret, F.; Gonçalves, A.; Tarpin, C.; Chabannon, C.; Viens, P. [G-CSF in oncology]. *Bull. Cancer (Paris)* **2006**, *93*, 463–471.
248. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). In *Meyler's Side Effects of Drugs*; Elsevier, 2016; pp. 605–619 ISBN 978-0-444-53716-4.
249. Cashen, A.F.; Lazarus, H.M.; Devine, S.M. Mobilizing Stem Cells from Normal Donors: Is It Possible to Improve upon G-CSF? *Bone Marrow Transplant.* **2007**, *39*, 577–588, doi:10.1038/sj.bmt.1705616.
250. Crobu, D.; Spinetti, G.; Schrepfer, R.; Tonon, G.; Jotti, G.S.; Onali, P.; Dedoni, S.; Orsini, G.; Stefano, A.D. Preclinical and Clinical Phase I Studies of a New Recombinant Filgrastim (BK0023) in Comparison with Neupogen®. **2014**, *14*.
251. Hosing, C. Hematopoietic Stem Cell Mobilization with G-CSF. In *Stem Cell Mobilization*; Kolonin, M.G., Simmons, P.J., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; pp. 37–47 ISBN 978-1-61779-942-6.
252. Liu, F.; Poursine-Laurent, J.; Link, D.C. Expression of the G-CSF Receptor on Hematopoietic Progenitor Cells Is Not Required for Their Mobilization by G-CSF. *Blood* **2000**, *95*, 3025–3031.
253. Cancelas, J.A.; Williams, D.A. Stem Cell Mobilization by B2-Agonists. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 278–279, doi:10.1038/nm0306-278.
254. Sudo, Y.; Shimazaki, C.; Ashihara, E.; Kikuta, T.; Hirai, H.; Sumikuma, T.; Yamagata, N.; Goto, H.; Inaba, T.; Fujita, N.; et al. Synergistic Effect of FLT-3 Ligand on the Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Induced Mobilization of Hematopoietic Stem Cells and Progenitor Cells Into Blood in Mice. *Blood* **1997**, *89*, 3186–3191, doi:10.1182/blood.V89.9.3186.
255. Kuroda, R.; Matsumoto, T.; Miwa, M.; Kawamoto, A.; Mifune, Y.; Fukui, T.; Kawakami, Y.; Niihara, T.; Lee, S.Y.; Oe, K.; et al. Local Transplantation of G-CSF-Mobilized CD34<sup>+</sup> Cells in a Patient with Tibial Nonunion: A Case Report. *Cell Transplant.* **2011**, *20*, 1491–1496, doi:10.3727/096368910X550189.
256. Cao, J.; Wang, L.; Du, Z.; Liu, P.; Zhang, Y.; Sui, J.; Liu, Y.; Lei, D. Recruitment of Exogenous Mesenchymal Stem Cells in Mandibular Distraction Osteogenesis by the Stromal Cell-Derived Factor-1/Chemokine Receptor-4 Pathway in Rats. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2013**, *51*, 937–941, doi:10.1016/j.bjoms.2013.05.003.
257. Kassis, I.; Zangi, L.; Rivkin, R.; Levdansky, L.; Samuel, S.; Marx, G.; Gorodetsky, R. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from G-CSF-Mobilized Human Peripheral Blood Using Fibrin Microbeads. *Bone Marrow Transplant.* **2006**, *37*, 967–976, doi:10.1038/sj.bmt.1705358.
258. Tatsumi, K.; Otani, H.; Sato, D.; Enoki, C.; Iwasaka, T.; Imamura, H.; Taniuchi, S.; Kaneko, K.; Adachi, Y.; Ikehara, S. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Increases Donor Mesenchymal Stem Cells in Bone Marrow and Their Mobilization Into Peripheral Circulation but Does Not

- Repair Dystrophic Heart After Bone Marrow Transplantation. *Circ. J.* **2008**, *72*, 1351–1358, doi:10.1253/circj.72.1351.
259. Cheng, Z.; Liu, X.; Ou, L.; Zhou, X.; Liu, Y.; Jia, X.; Zhang, J.; Li, Y.; Kong, D. Mobilization of Mesenchymal Stem Cells by Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2008**, *22*, 363–371, doi:10.1007/s10557-008-6110-2.
260. Deng, J.; Zou, Z.; Zhou, T.; Su, Y.; Ai, G.; Wang, J.; Xu, H.; Dong, S. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Can Be Mobilized into Peripheral Blood by G-CSF in Vivo and Integrate into Traumatically Injured Cerebral Tissue. *Neurol. Sci.* **2011**, *32*, 641–651, doi:10.1007/s10072-011-0608-2.
261. Bozlar, M.; Aslan, B.; Kalaci, A.; Baktiroglu, L.; Yanat, A.N.; Tasci, A. Effects of Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor on Fracture Healing in Rats. *Saudi Med. J.* **2005**, *26*, 1250–1254.
262. Kaygusuz, M.A.; Turan, C.C.; Aydın, N.E.; Temel, İ.; Firat, S.; Bulut, T.; Kuku, İ. The Effects of G-CSF and Naproxen Sodium on the Serum TGF- $\beta$ 1 Level and Fracture Healing in Rat Tibias. *Life Sci.* **2006**, *80*, 67–73, doi:10.1016/j.lfs.2006.08.023.
263. Herrmann, M.; Zeiter, S.; Eberli, U.; Hildebrand, M.; Camenisch, K.; Menzel, U.; Alini, M.; Verrier, S.; Stadelmann, V.A. Five Days Granulocyte Colony-Stimulating Factor Treatment Increases Bone Formation and Reduces Gap Size of a Rat Segmental Bone Defect: A Pilot Study. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2018**, *6*, 5, doi:10.3389/fbioe.2018.00005.
264. Marmotti, A.; Castoldi, F.; Rossi, R.; Marengo, S.; Risso, A.; Ruella, M.; Tron, A.; Borrè, A.; Blonna, D.; Tarella, C. Bone Marrow-Derived Cell Mobilization by G-CSF to Enhance Osseointegration of Bone Substitute in High Tibial Osteotomy. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **2013**, *21*, 237–248, doi:10.1007/s00167-012-2150-z.
265. Wu, X.; Yang, S.; Duan, D.; Liu, X.; Zhang, Y.; Wang, J.; Yang, C.; Jiang, S. A Combination of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Stem Cell Factor Ameliorates Steroid-Associated Osteonecrosis in Rabbits. *J. Rheumatol.* **2008**, *35*, 2241–2248, doi:10.3899/jrheum.071209.
266. Bendriem, B. LES DETECTEURS DE POSITONS : Caméra PET - Caméra PET-SPECT. **1998**, *7*.
267. de Dreuille, O.; Maszelin, P.; Foehrenbach, H.; Bonardel, G.; Gaillard, J.-F. Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *EMC - Radiol.* **2004**, *1*, 2–35, doi:10.1016/j.emcrad.2003.12.001.
268. Withofs, N.; Hustinx, R. Integrin Av $\beta$ 3 and RGD-Based Radiopharmaceuticals. *Médecine Nucl.* **2016**, *40*, 41–54, doi:10.1016/j.mednuc.2015.12.002.
269. Paycha, F. Exploration scintigraphique du squelette. 37.
270. Bevan, J.A.; Tote, A.J.; Benedict, J.J.; Barnett, B.L. Tc-99m HMDP(HydroxymethyleneDiphosphonate):A Radiopharmaceuticalfor Skeletal and Acute Myocardial Infarct Imaging. I. Synthesis and Distribution in Animals. *21*, 7.
271. Fragogeorgi, E.A.; Rouchota, M.; Georgiou, M.; Velez, M.; Bouziotis, P.; Loudos, G. In Vivo Imaging Techniques for Bone Tissue Engineering. *J. Tissue Eng.* 13.
272. Paycha, F.; Maia, S.; Ayachi, N.; Grossin, M.; de Vernejoul, M.-C. Quelle est la signification des anomalies observées en scintigraphie osseuse ? Retour sur les mécanismes de fixation des bisphosphonates-(99mTc). **2007**, 10.
273. Yamane, K.; Okano, T.; Kishimoto, H.; Hagino, H. Effect of ED-71 on Modeling of Bone in Distraction Osteogenesis. *Bone* **1999**, *24*, 187–193.
274. Li, G.; Dickson, G.R.; Marsh, D.R.; Simpson, H. Rapid New Bone Tissue Remodeling during Distraction Osteogenesis Is Associated with Apoptosis. *J. Orthop. Res.* **2003**, *21*, 28–35.
275. Sousa, C.; Abreu, H.; Viegas, C.; Azevedo, J.; Reis, R.; Gomes, M.; Dias, I. Serum Total and Bone Alkaline Phosphatase and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Activities for the Assessment of Bone Fracture Healing in Dogs. *Arq. Bras. Med. Veterinária E Zootec.* **2011**, *63*, 1007–1011, doi:10.1590/S0102-09352011000400029.

276. Rachmiel, A.; Laufer, D.; Jackson, I.T.; Lewinson, D. Midface Membranous Bone Lengthening: A One-Year Histological and Morphological Follow-Up of Distraction Osteogenesis. *Calcif. Tissue Int.* **1998**, *62*, 370–376, doi:10.1007/s002239900447.
277. Li, G.; Simpson, A.H.R.W.; Triffitt, J.T. The Role of Chondrocytes in Intramembranous and Endochondral Ossification During Distraction Osteogenesis in the Rabbit. *Calcif. Tissue Int.* **1999**, *64*, 310–317, doi:10.1007/s002239900625.
278. Alatalo, S.L.; Ivaska, K.K.; Waguespack, S.G.; Econs, M.J.; Väänänen, H.K.; Halleen, J.M. Osteoclast-Derived Serum Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b in Albers-Schönberg Disease (Type II Autosomal Dominant Osteopetrosis). *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 883–890, doi:10.1373/clinchem.2003.029355.
279. Halleen, J. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b (TRACP 5b) as a Marker of Bone Resorption. *3*, 11.
280. Arganda-Carreras, I.; Khassawna, T.E. An Optimized Approach to Perform Bone Histomorphometry. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 11.
281. Arganda-Carreras, I.; Kaynig, V.; Rueden, C.; Eliceiri, K.W.; Schindelin, J.; Cardona, A.; Sebastian Seung, H. Trainable Weka Segmentation: A Machine Learning Tool for Microscopy Pixel Classification. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 2424–2426, doi:10.1093/bioinformatics/btx180.
282. Rahman, M. Introduction to Flow Cytometry. 36.
283. Welsh, J.A.; Van Der Pol, E.; Arkesteijn, G.J.A.; Bremer, M.; Brisson, A.; Coumans, F.; Dignat-George, F.; Duggan, E.; Ghiran, I.; Giebel, B.; et al. MIFlowCyt-EV: A Framework for Standardized Reporting of Extracellular Vesicle Flow Cytometry Experiments. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1713526, doi:10.1080/20013078.2020.1713526.
284. Tario, J.D.; Wallace, P.K. Reagents and Cell Staining for Immunophenotyping by Flow Cytometry. In *Pathobiology of Human Disease*; Elsevier, 2014; pp. 3678–3701 ISBN 978-0-12-386457-4.
285. Wilkerson, M.J. Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **2012**, *42*, 53–71, doi:10.1016/j.cvsm.2011.09.012.
286. Kossmann, T.; Giebel, G.; Glombitza, A. Rat Model for Limb Lengthening by Callus Distraction. *Res. Exp. Med. (Berl.)* **1993**, *193*, 13–20.
287. López-Pliego, E.M.; Giráldez-Sánchez, M.Á.; Mora-Macías, J.; Reina-Romo, E.; Domínguez, J. Histological Evolution of the Regenerate during Bone Transport: An Experimental Study in Sheep. *Injury* **2016**, *47*, S7–S14, doi:10.1016/S0020-1383(16)30600-3.
288. Sojo, K.; Sawaki, Y.; Hattori, H.; Mizutani, H.; Ueda, M. Immunohistochemical Study of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Bone Morphogenetic Protein-2, -4 (BMP-2, -4) on Lengthened Rat Femurs. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2005**, *33*, 238–245, doi:10.1016/j.jcms.2005.02.004.
289. Aronson, J.; Shen, X.C.; Skinner, R.A.; Hogue, W.R.; Badger, T.M.; Lumpkin, C.K. Rat Model of Distraction Osteogenesis. *J. Orthop. Res.* **1997**, *15*, 221–226.
290. Touaitahuata, H.; Cres, G.; de Rossi, S.; Vives, V.; Blangy, A. The Mineral Dissolution Function of Osteoclasts Is Dispensable for Hypertrophic Cartilage Degradation during Long Bone Development and Growth. *Dev. Biol.* **2014**, *393*, 57–70, doi:10.1016/j.ydbio.2014.06.020.
291. Wang, L.C.; Takahashi, I.; Sasano, Y.; Sugawara, J.; Mitani, H. Osteoclastogenic Activity during Mandibular Distraction Osteogenesis. *J. Dent. Res.* **2005**, *84*, 1010–1015, doi:10.1177/154405910508401108.
292. Liu, X.L.; Hu, X.; Cai, W.X.; Lu, W.W.; Zheng, L.W. Effect of Granulocyte-Colony Stimulating Factor on Endothelial Cells and Osteoblasts. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 1–8, doi:10.1155/2016/8485721.
293. Isaksson, H.; Wilson, W.; van Donkelaar, C.C.; Huiskes, R.; Ito, K. Comparison of Biophysical Stimuli for Mechano-Regulation of Tissue Differentiation during Fracture Healing. *J. Biomech.* **2006**, *39*, 1507–1516, doi:10.1016/j.jbiomech.2005.01.037.

294. Meyer, U.; Meyer, T.; Vosshans, J.; Joos, U. Decreased Expression of Osteocalcin and Osteonectin in Relation to High Strains and Decreased Mineralization in Mandibular Distraction Osteogenesis. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **1999**, *27*, 222–227, doi:10.1016/S1010-5182(99)80033-X.
295. Leung, K.S.; Fung, K.P.; Liu, P.P.L.; Lee, K.M. Bone-Specific Alkaline Phosphatase Activities in Plasma and Callus during Callotaxis in Rabbits. *Life Sci.* **1995**, *57*, 637–643, doi:10.1016/0024-3205(95)00315-W.
296. Fink, B.; Feldkamp, J.; Fox, F.; Hofmann, B.; Singer, J.; Krieger, M. Time Course of Osteocalcin, Bone-Specific Alkaline Phosphatase, and C-Terminal Procollagen Peptide During Callus Distraction: *J. Pediatr. Orthop.* **2001**, *21*, 246–251, doi:10.1097/01241398-200103000-00024.
297. Fink, B.; Fox, F.; Singer, J.; Skripitz, R.; Feldkamp, J. Monitoring of Bone Formation during Distraction Osteogenesis via Osteocalcin: A Time Sequence Study in Dogs. *J. Orthop. Sci.* **2002**, *7*, 557–561, doi:10.1007/s007760200099.
298. Capoccia, B.J.; Shepherd, R.M.; Link, D.C. G-CSF and AMD3100 Mobilize Monocytes into the Blood That Stimulate Angiogenesis in Vivo through a Paracrine Mechanism. *Blood* **2006**, *108*, 2438–2445, doi:10.1182/blood-2006-04-013755.
299. Ripa, R.S.; Haack-Sorensen, M.; Wang, Y.; Jorgensen, E.; Mortensen, S.; Bindslev, L.; Friis, T.; Kastrup, J. Bone Marrow Derived Mesenchymal Cell Mobilization by Granulocyte-Colony Stimulating Factor After Acute Myocardial Infarction: Results From the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) Trial. *Circulation* **2007**, *116*, I-24–I-30, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678649.
300. Kitoh, H.; Kitakoji, T.; Tsuchiya, H.; Mitsuyama, H.; Nakamura, H.; Katoh, M.; Ishiguro, N. Transplantation of Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma during Distraction Osteogenesis—a Preliminary Result of Three Cases. **2004**, *7*.
301. Qi, M.; Hu, J.; Zou, S.; Zhou, H.; Han, L. Mandibular Distraction Osteogenesis Enhanced by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Rats. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2006**, *34*, 283–289, doi:10.1016/j.jcms.2006.02.002.
302. Garcia, N.P.; de Leon, E.B.; da Costa, A.G.; Tarragô, A.M.; Pimentel, J.P.; Fraporti, L.; de Araujo, F.F.; Campos, F.M.F.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, O.A.; et al. Kinetics of Mesenchymal and Hematopoietic Stem Cells Mobilization by G-CSF and Its Impact on the Cytokine Microenvironment in Primary Cultures. *Cell. Immunol.* **2015**, *293*, 1–9, doi:10.1016/j.cellimm.2014.09.006.
303. Calabrese, G.; Giuffrida, R.; Lo Furno, D.; Parrinello, N.; Forte, S.; Gulino, R.; Colarossi, C.; Schinocca, L.; Giuffrida, R.; Cardile, V.; et al. Potential Effect of CD271 on Human Mesenchymal Stromal Cell Proliferation and Differentiation. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 15609–15624, doi:10.3390/ijms160715609.
304. Álvarez-Viejo, M. CD271 as a Marker to Identify Mesenchymal Stem Cells from Diverse Sources before Culture. *World J. Stem Cells* **2015**, *7*, 470, doi:10.4252/wjsc.v7.i2.470.
305. Müller, S.; Nicholson, L.; Al Harbi, N.; Mancuso, E.; Jones, E.; Dickinson, A.; Wang, X.N.; Dalgarno, K. Osteogenic Potential of Heterogeneous and CD271-Enriched Mesenchymal Stromal Cells Cultured on Apatite-Wollastonite 3D Scaffolds. *BMC Biomed. Eng.* **2019**, *1*, 16, doi:10.1186/s42490-019-0015-y.
306. Bar-Shavit, Z. The Osteoclast: A Multinucleated, Hematopoietic-Origin, Bone-Resorbing Osteoimmune Cell. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *102*, 1130–1139, doi:10.1002/jcb.21553.
307. Morgan, E.F.; Hussein, A.I.; Al-Awadhi, B.A.; Hogan, D.E.; Matsubara, H.; Al-Alq, Z.; Fitch, J.; Andre, B.; Hosur, K.; Gerstenfeld, L.C. Vascular Development during Distraction Osteogenesis Proceeds by Sequential Intramuscular Arteriogenesis Followed by Intraosteal Angiogenesis. *Bone* **2012**, *51*, 535–545, doi:10.1016/j.bone.2012.05.008.
308. Aronson, J. Temporal and Spatial Increases in Blood Flow During Distraction Osteogenesis: *Clin. Orthop.* **1994**, *NA*, 124–131, doi:10.1097/00003086-199404000-00020.

309. Minamino, K.; Adachi, Y.; Okigaki, M.; Ito, H.; Togawa, Y.; Fujita, K.; Tomita, M.; Suzuki, Y.; Zhang, Y.; Iwasaki, M.; et al. Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), As Well As Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF), Accelerates Neovascularization. 9.



# Résumé

La distraction ostéogénique (DO) est une technique chirurgicale utilisée dans divers cas cliniques, permettant la correction de discordance de membres d'origine pathologique ou non, autorisant un gain de taille chez des patients atteints d'achondroplasie ainsi que la correction de défauts osseux importants à la suite de traumatismes ou d'excision de tumeur osseuse. Ce protocole est organisé en trois phases distinctes. La première phase dite de latence débute après la chirurgie d'ostéotomie, avec la mise en place du fixateur externe et l'induction de fracture. S'ensuit une phase de distraction active où le fixateur externe est actionné éloignant ainsi les segments osseux l'un par rapport à l'autre. Une fois l'allongement désiré atteint, la phase de consolidation débute permettant au régénérat osseux de se développer et se minéraliser. À l'heure actuelle, le processus de DO est un protocole complexe, long et qui entraîne de multiples complications telles que des infections, des pseudarthroses, des luxations, des contractures, des non-unions osseuses et des fractures itératives ou des déformations osseuses après ablation du fixateur externe. Autour de la DO gravite un grand nombre d'interrogations que ce soit sur les principes sous-jacents liés à l'ostéogénèse via l'interaction de phénomènes de vascularisation et de formation osseuse, ou sur la caractérisation des propriétés mécaniques des divers tissus présents au sein du cal osseux.

Pour cette thèse, deux aspects de recherche ont été définis : la caractérisation des propriétés mécaniques des tissus minéralisés au cours de la DO et l'amélioration du processus de régénération. Nous avons établi un modèle expérimental de distraction du fémur chez le rat en développant un fixateur externe ainsi qu'une ancillaire. Ce protocole nous a permis d'obtenir un régénérat osseux fonctionnel validé par l'analyse des propriétés architecturales et mécaniques de ce dernier.

L'analyse des propriétés mécaniques à l'échelle microscopique via des essais d'indentation, nous a permis d'observer une augmentation des paramètres mécaniques dans la phase de consolidation traduisant une évolution temporelle. De plus, les paramètres étudiés étaient également dépendants des zones observées (cal périosté ou endosté), montrant aussi des variations d'un point de vue spatial du cal osseux.

Le second aspect s'est porté sur l'analyse des effets d'une faible dose systémique de facteur de croissance G-CSF sur la consolidation osseuse. Celui-ci a un rôle sur la mobilisation des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques (CSPH), des cellules progénitrices endothéliales (CPE) et des cellules stromales mésenchymateuses (CSM). La néovascularisation et la minéralisation ont été surveillées longitudinalement à l'aide de la tomographie par émission de positons et de la scintigraphie. Une analyse histologique a été effectuée et le nombre de CSPH, CPE et CSM circulantes a été étudié par cytométrie de flux. Les données obtenues nous indiquent que le G-CSF accélère la régénération osseuse et module la mobilisation des cellules souches/progénitrices pendant la DO.

**Mots-clés :** Ingénierie tissulaire, Micro-indentation, Cellules souches/progénitrices, G-CSF, Distraction ostéogénique

# Abstract

Distraction osteogenesis (DO) is a surgical technique used in various clinical cases, to correct discrepancies of limb (pathological or non-pathological origin), allowing a gain in size in patients with achondroplasia as well as the correction of important bone defects following trauma or bone tumor excision. This protocol is organized in three distinct phases. The first so-called latency phase starts after osteotomy surgery, with the placement of the external fixator and the induction of fracture. Then, an active distraction phase in which the external fixator is activated, moving the bone segments away from each other. Once the desired elongation is reached, the consolidation phase begins, allowing the bone regeneration to develop and mineralize. At present, the DO process is a complex, lengthy protocol that involves multiple complications such as infections, pseudarthrosis, dislocations, contractures, bone non-union and iterative fractures, or bone deformations after removal of the external fixator. Many questions still revolve around the DO, whether on the underlying principles related to osteogenesis via the interaction of vascularization and bone formation phenomena or on the characterization of the mechanical properties of the various tissues present within the callus.

Thus, during this thesis two aspects of research were defined: the characterization of the mechanical properties of mineralized tissues during DO and the improvement of the regeneration process. We have established an experimental model of femur distraction in the rat by developing an external fixator and an ancillary device. This protocol allowed us to obtain a functional bone regeneration validated by the analysis of its architectural and mechanical properties.

The analysis of the mechanical properties at the microscopic scale via indentation tests, allowed us to observe an increase in the mechanical parameters in the consolidation phase, reflecting a temporal evolution. Moreover, the observed parameters were also dependent on the areas examined (periosteal or endosteal callus), also showing variations from a spatial point of view of the bone callus.

The second aspect concerned the analysis of the effects of a low systemic dose of G-CSF growth factor on bone consolidation. This affects the mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC), endothelial progenitor cells (EPC) and mesenchymal stromal cells (MSC). Neovascularization and mineralization were monitored longitudinally using positron emission tomography and scintigraphy. Histological analysis was performed and the number of circulating HSPC, EPC and MSC was studied by flow cytometry. The data obtained indicate that G-CSF accelerates bone regeneration and modulates stem/progenitor cells mobilization during DO.

**Key words:** Tissue engineering, Micro-indentation, Stem/progenitor cells, G-CSF, Distraction osteogenesis