

Culture cellulaire d'ostéoblastes et de fibroblastes sur substituts osseux poreux en phosphate de calcium

Cellular culture of osteoblasts and fibroblasts on macroporous calcium-phosphate bone substitutes

J. Chouteau *, **, A. Bignon ***, P. Chavassieux ****, J. Chevalier ***, M. Melin *****, G. Fantozzi ***, G. Boivin ****, D. Hartmann *****, J.-P. Carret *, **

* Laboratoire Mecal, Faculté de Médecine Lyon Sud, 69600 Oullins.

** Service de Chirurgie Orthopédique, Pavillon T, Hôpital Edouard-Herriot, 5, place d'Arsonval, 69437 Lyon.

*** INSA, Laboratoire GEMPPM, Unité CNRS 5510, 69621 Villeurbanne.

**** INSERM, Unité 403, Faculté de Médecine R. Laennec, 69372 Lyon.

***** Equipe Biomatériaux et Remodelage Matriciel, EA 3090, Faculté de Pharmacie, Lyon.

ABSTRACT

Purpose of the study

Calcium phosphate ceramics are synthetic bone substitutes able to fill in bone destruction as a support of the bone growth. This work consisted in an *in vitro* assessment of osteoblasts and fibroblasts cultures on macroporous calcium-phosphate bone substitutes to analyze the interaction between cells and bone substitute.

Materials and methods

The macroporous ceramic was composed of 70% hydroxyapatite and 30% tri-calcium phosphate with known mechanical and physico-chemical properties. Three compounds were processed with different size of macropore and with or without microporosity on their surface. Cells were seeded on discs measuring 10 mm in diameter and 2 mm in thickness. Cellular viability was evaluated by the MTT test for every stage of observation. An histological study to observe the invasion in the depth of discs was performed. Scanning electron microscopy was used to analyze the cellular compartment in contact with the surface of substitutes.

Results

An exponential cellular growth was effective on each substitute with the two cellular types. Cells spread on the surface of the compounds covering macropores and colonized the depth of the discs. A size of macropore of 300 μm or more seemed to support this invasion. 15 μm sized interconnections appeared to be effective to allow cell migration between macropores. The cell proliferation was similar on substitutes with or without microporosity.

Conclusion

Biomaterials currently used as bone substitute are more or less osteoconductive but they have no osteoinductive property. A hybrid association of calcium-phosphate ceramic with osteogenic cells should promote the development of a calcium phosphate compound with osteoinductive capacity.

Key words: Bone substitute, calcium-phosphate, hydroxyapatite, porosity, cell culture.

RÉSUMÉ

Les céramiques en phosphate de calcium sont des substituts osseux synthétiques capables de combler des pertes de substance osseuse en servant de support à la repousse osseuse. Ce travail a consisté à étudier *in vitro* la culture d'ostéoblastes et de fibroblastes sur trois matériaux synthétiques de phosphate de calcium composés de 70 % d'hydroxyapatite et de 30 % de phosphate tricalcique-bêta. Ils se différenciaient par la taille de leurs macropores et par la présence ou non de microporosités sur leurs parois. Les caractéristiques mécaniques et physico-chimiques de chaque composé ont été analysées. Les cultures cellulaires ont été réalisées sur des disques de 10 mm de diamètre et 2 mm

Tirés à part : J. CHOUTEAU, à l'adresse ci-dessus.

E-mail : juchout@club-internet.fr

Acceptation définitive le : 8 octobre 2002

d'épaisseur. La viabilité cellulaire a été évaluée par test MTT à chaque temps d'observation. Une étude histologique appréciant l'invasion en profondeur des disques a été menée et la microscopie électronique à balayage a permis d'apprécier le comportement cellulaire au contact et à la surface du substitut. Il n'a pas été observé de cytotoxicité des trois composés. La croissance cellulaire s'est déroulée sur chaque substitut et pour chaque type cellulaire de manière exponentielle. Les cellules se sont développées en surface des composés en pontant les macropores et ont colonisé la profondeur des disques. Les macropores de plus de 300 μm ont semblé favoriser cette invasion. Une taille d'interconnexion de 15 μm est apparue suffisante pour permettre le passage cellulaire entre les macropores. La présence ou non de microporosités sur les parois n'a pas engendré de différence significative sur la prolifération cellulaire. Actuellement, les substituts osseux sont ostéoconducteurs mais non ostéo-inducteurs. L'association d'une culture de cellules ostéoblastiques sur un composé macroporeux de phosphate de calcium synthétique pourrait permettre la réalisation d'un substitut osseux ayant des propriétés ostéoinductrices.

Mots clés : Substitut osseux, phosphate de calcium, hydroxyapatite, porosité, culture cellulaire.

INTRODUCTION

La recherche de produits de substitution à l'os humain offrant une alternative à la greffe osseuse a été instaurée dès 1827 par Ollier qui avait utilisé des xéno greffes. L'ampleur des réactions inflammatoires d'origine immunologique, compréhensible grâce au savoir actuel, n'avait pas fait poursuivre cette voie.

Grâce à leurs propriétés [Le Huec *et al.* (1), Passuti *et al.* (2)], les céramiques bio-actives telles que l'hydroxyapatite ont servi de base au développement de substituts osseux synthétiques [Bruder et Fox (3)]. Lors d'interventions chirurgicales, les quantités d'os autologue disponibles étant souvent limitées et la prise de greffe présentant une morbidité propre (durée d'intervention augmentée, douleurs au site de prélèvement...), les substituts osseux ont été proposés en complément d'autogreffes.

Les substituts osseux utilisés actuellement en orthopédie sont généralement des céramiques poreuses composées de phosphate de calcium tels que l'hydroxyapatite [Oonishi (4)]. N'étant pas ostéo-inducteurs mais ostéoconducteurs, ils servent essentiellement de tuteurs à la formation osseuse et ont une résorption variable selon leur composition. Ils sont actuellement utilisés non pour la résection des tumeurs [Uchida *et al.* (5), Inoue *et al.* (6)] mais pour le comblement de cavités osseuses [Gouin *et al.* (7)], les pertes de substance post-traumatiques [Bucholz *et al.* (8)] et les reprises prothétiques [Oonishi *et al.* (9), Levai et Boisgard (10)]. Ils ont l'avantage de ne pas exposer au risque de transmission d'agents pathogènes.

Néanmoins, ces substituts sont insuffisants pour le comblement de perte de substance de grand volume car la repousse osseuse y est souvent longue et incomplète [Daculsi et Passuti (11)]. Leurs caractéristiques sont très variables en terme de porosité, de surface spécifique et de propriétés mécaniques. L'interconnexion de leurs porosités n'est souvent pas contrôlée. On considère généralement que la taille des pores et le taux de porosité favorisent la repousse osseuse mais au détriment des propriétés mécaniques [Daculsi et Passuti (11), Gauthier *et al.* (12), Le Huec *et al.* (13), Delagoutte (14)]. La surface spécifique de l'implant est aussi probablement primordiale puisqu'il

est souvent dit que la repousse osseuse se déroule par épitaxie.

Afin de palier au manque d'ostéo-induction des substituts osseux synthétiques, plusieurs techniques ont été développées. Des protéines de la matrice extracellulaire ou des facteurs de croissance à potentiel ostéogénique ont été incorporés au sein des substituts [Urist *et al.* (15)]. Ces facteurs, suivant une cinétique variable, sont relargués *in vivo* potentialisant l'ostéogenèse au sein des biomatériaux. L'association de cellules ostéoblastiques aux substituts osseux a été l'autre principale voie de recherche. Cette association « hybride » nécessite un substitut de comblement et une source autologue de cellules ostéoblastiques. Ces cellules peuvent provenir des précurseurs médullaires capables de se différencier *in vitro* et *in vivo*. Le comportement des cellules de moelle osseuse au contact de la céramique de phosphate de calcium a été étudié par Heymann *et al.* (16). Les cellules peuvent aussi provenir d'explants osseux à partir desquels les cellules ostéoblastiques sont isolées puis cultivées.

Cette voie de recherche a guidé notre étude qui a eu pour but de mettre en évidence les interactions cellules/substituts osseux synthétiques afin d'évaluer leur potentiel dans les processus de réparation osseuse. Trois composés biphasés aux caractéristiques propres (taille et interconnexion des macro porosités, présence ou non de microporosités) ont été synthétisés. L'influence des caractéristiques des substituts osseux a été étudiée sur deux types de cultures cellulaires : les fibroblastes de peau humaine et les ostéoblastes provenant d'explants osseux humains. La prolifération et la migration cellulaire au contact des trois substituts ont été étudiées.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

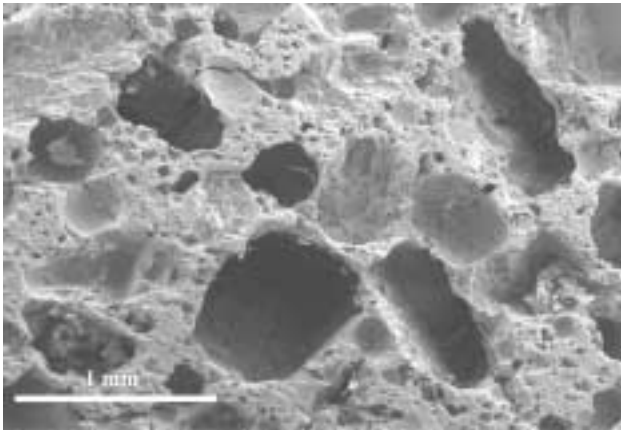
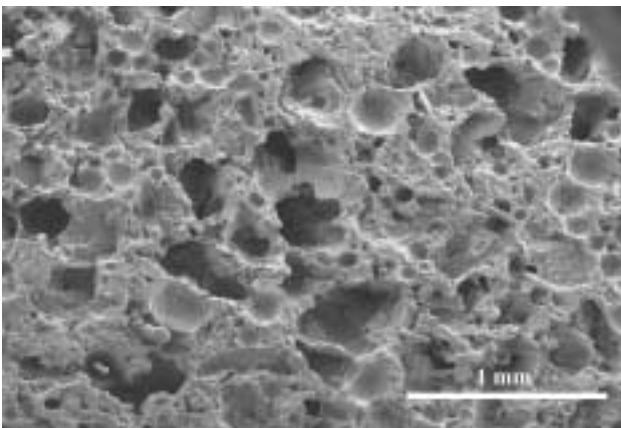
Composés céramiques

Trois types de substituts osseux de porosité variable ont été fabriqués. Les poudres initiales utilisées ont été de l'hydroxyapatite (HAP) de qualité médicale fournie par Coating Industries (France) et du phosphate tricalcique β (TCP) fourni par Merck (Allemagne). Les trois types de substituts ont été élaborés avec la même composition

TABLEAU I. – Propriétés physiques des substituts A, B et C.

Type de substitut osseux	A	B	C
Macroporosités	600-1250 μm	300-600 μm	300-600 μm
Taille d'interconnexion (porosimétrie mercure)	30 μm	15 μm	15 μm
Frittage	1 125°C, 15 h	1 125°C, 15 h	1 250°C, 6 h
Microporosités	Quantité importante	Quantité importante	Quantité faible
Surface spécifique	1,01 m^2/g	0,87 m^2/g	0,17 m^2/g
Porosité totale	74 \pm 2 %	72 \pm 2 %	60 \pm 2 %
Résistance en compression	1,5 \pm 0,2 MPa	11 \pm 2 MPa	22 \pm 7 MPa

biphasée HAP/TCP 70/30 afin de les rendre partiellement résorbables *in vivo*. Les matériaux ont été fabriqués par une voie classique de coulage en barbotine : les poudres ont été mélangées à de l'eau distillée et à un agent disper-

FIG. 1. – Macroporosité du substitut osseux de type A : 600-1250 μm (MEB $\times 40$).FIG. 2. – Macroporosité des substituts osseux de type B et C : 300-600 μm (MEB $\times 40$).

sant polymère de type électro-stérique puis ont été ajoutés avant le coulage un polymère de renfort et un agent porogène. Les crus ont ensuite été déliantés à 600 °C ce qui, par la dégradation du porogène, a donné naissance aux macroporosités. La céramique a été frittée au-dessus de 1 100°C, afin de lui conférer, selon le degré de frittage, ses propriétés mécaniques qui sont améliorées au fur et à mesure que les microporosités disparaissent.

Les deux premiers substituts osseux A et B ont été différenciés par la taille de leur macroporosité ainsi que par la taille de leurs interconnexions tandis que les substituts osseux B et C ont été différenciés par la quantité de leurs microporosités. Les trois substituts ont été élaborés avec le même taux volumique d'agent porogène (tableau I).

La morphologie de la porosité a été étudiée par microscopie électronique à balayage (MEB). Les substituts A, contrairement aux B et aux C présentaient de grosses macroporosités séparées par des parois très fines par endroits, ce qui avait tendance à les fragiliser (fig. 1 et 2). Les substituts A et B présentaient de nombreuses microporosités visibles en coupe à l'intérieur des parois mais aussi à la surface des macropores, offrant une surface poreuse et rugueuse au contact des cellules (fig. 3). Inversement, les substituts C ne présentaient pas de microporosités visibles et offraient une surface parfaitement lisse et étanche au contact des cellules (fig. 4).

Culture cellulaire

Cultures primaires d'ostéoblastes humains [Chavassieux et al. (17), Gundle et Beresford (18), Robey (19), Robey et Termine (20)]

Des explants d'os spongieux, prélevés au cours d'interventions chirurgicales orthopédiques pratiquées le jour même (conservation dans du sérum physiologique à 4 °C) ont été fragmentés. Ces fragments ont été lavés trois fois avec du tampon phosphate salin (PBS, Gibco BRL) contenant un mélange pénicilline-streptomycine, fungizone, gentamicine et agent anti-PPLO (Gibco BRL). Ces fragments osseux ont ensuite subi un traitement par la collagénase de type IV (1 mg/ml) (*Clostridium histolyticum*,

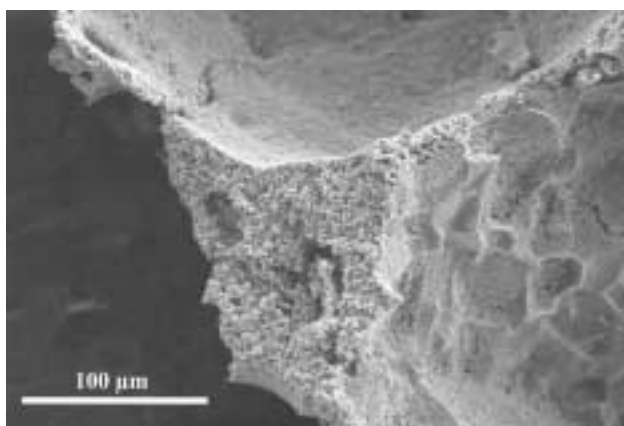


FIG. 3. – Microporosité des substituts osseux de type A et B frittés à 1125°C pendant 15 h (MEB x300).

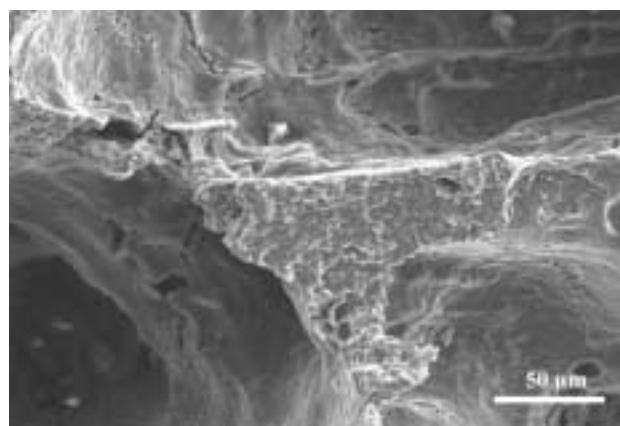


FIG. 4. – Absence de microporosité du substitut osseux de type C frittés à 1250°C pendant 6 h (MEB x400).

Sigma) par deux bains successifs, le premier ayant pour but de séparer les cellules contaminantes de type fibroblastique. Après la digestion, le surnageant qui contient les cellules ostéoblastiques a été prélevé et tamisé. Le culot a été repris dans un mélange milieu de Eagle modifié par Dulbecco/HAM F12 (DMEM-F12) contenant 20 % de sérum de veau fœtal (SVF), 2 nM de glutamine, 1 % v/v d'acides aminés non essentiels, 10 U/ml de pénicilline et streptomycine et 0,25 µg/ml de fungizone (Gibco, BRL). Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri et maintenues dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et à 37 °C. Le lendemain, la culture a été rincée avec du PBS puis le milieu a été changé tous les trois jours. La confluence a été atteinte en moyenne au bout de trois semaines de culture.

Culture de fibroblastes

Les fibroblastes ont été obtenus à partir de peau adulte humaine par la technique d'explant. Le prélèvement a été rincé plusieurs fois en milieu sans sérum mais avec des antibiotiques. Le tissu a ensuite été déposé à la surface d'une boîte de culture en présence de quelques gouttes de milieu avec 10 % de sérum.

Protocole de culture

Les boîtes ont été placées dans une étuve à 37°C avec 5 % de CO₂ sous atmosphère humide pendant 2 heures pour permettre l'adhérence des fragments, puis quelques ml de milieu ont été rajoutés. Après plusieurs jours, les fibroblastes ont migré hors de l'explant et lorsque la couche cellulaire a été maximum, les cellules ont été récupérées après trypsination (Trypsine-EDTA 1X, 5 mn), remises en suspension dans du milieu avec sérum et réparties dans plusieurs boîtes de cultures. Les cellules ont été utilisées jusqu'au 8^e passage.

Culture cellulaire sur les substituts

Ostéoblastes : A confluence, les cellules ostéoblastiques ont été récoltées à l'aide de trypsine-EDTA puisensemencées sur les substituts à la densité de 10⁵ cellules, dans un milieu minimum essentiel (MEM) contenant 10 % de SVF. A chaque temps d'observation correspondait une plaque quarante-huit puits fond plat. Dans chaque plaque, nous avons deux puits pour chaque type de substitut et un puit contrôle témoin sans substitut mais avec le même nombre de cellules. Pour chaque composé, le premier puit a été utilisé pour le test MTT, le second a permis l'étude histologique. Après 4, 8, 15, 21 et 28 jours, la viabilité cellulaire a été évaluée et des échantillons des substituts ont été fixés pour une étude histomorphométrique et par microscopie électronique à balayage.

Fibroblastes : La méthode d'obtention des cellules a fait appel à un rinçage PBS, puis à l'ajout de trypsine EDTA dans chaque boîte. Un mélange de MEM SVF 10 % et de ciprofloxacine a été rajouté pour arrêter l'action de la trypsine. Après transfert et centrifugation, le surnageant a été retiré puis le culot repris dans du milieu. Les fibroblastes ayant un pouvoir de prolifération supérieur aux ostéoblastes, moitié moins de cellules ont été utilisées (à savoir 5.10⁴ cellules par puit), afin d'éviter une trop rapide inhibition de contact.

Auparavant les trois substituts ont été incubés sans cellule dans le milieu de culture. Il n'a pas été retrouvé de modification structurale macroscopique après trois semaines d'observation ni de modification du pH du milieu.

Etude de la viabilité cellulaire

Elle a été évaluée par le test MTT (Sigma) basé sur la réduction du MTT, sel jaune de tétrazolium, par les réductases NADPH mitochondriales des cellules vivantes en un produit formazan bleu-violet.

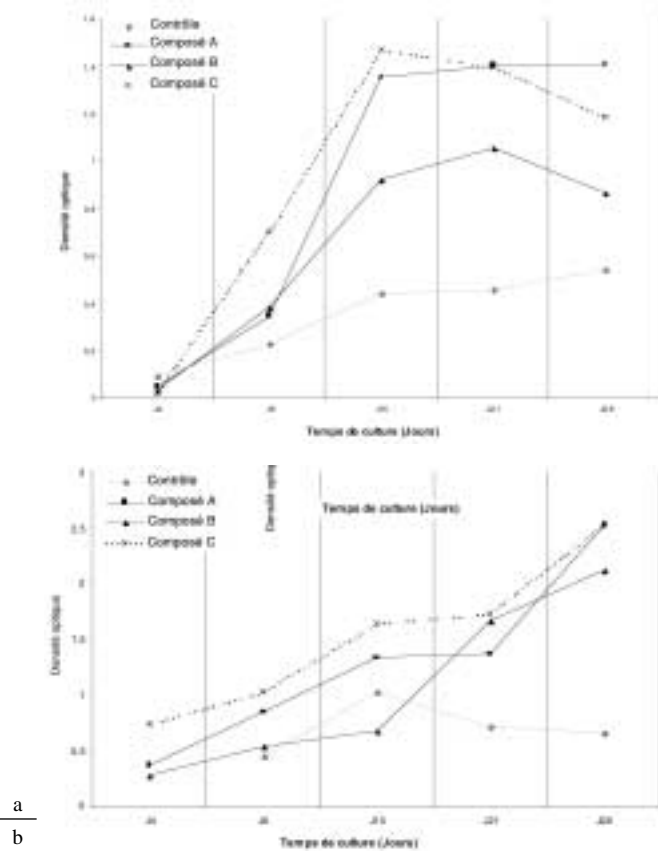


FIG. 5. — a) Évolution de la viabilité des ostéoblastes par le test MTT. b) Evolution de la viabilité des fibroblastes par le test MTT.

La poudre de MTT (Sigma) a été diluée dans du PBS puis filtrée. La solution de MTT a été ajoutée de manière à recouvrir le substitut. Après 4 h d'incubation à 37 °C, le MTT a été retiré et un mélange éthanol-DMSO (vol-vol) a été ajouté. Après homogénéisation, le surnageant a été analysé au spectrophotomètre à 570 nm de longueur d'onde. Les résultats ont été exprimés en densité optique. Il a été réalisé deux mesures successives par puit. La moyenne des deux mesures a été retenue.

Etude histologique

Après culture cellulaire, les biomatériaux ont été fixés dans du paraformaldéhyde 4 % à 4 °C pendant au moins une semaine. Les échantillons ont été ensuite déshydratés dans de l'éthanol, dégraissés avec de l'oxyde de propylène et finalement inclus dans de l'Epon B.

Dans un premier temps, des coupes de 1 µm d'épaisseur ont été réalisées et colorées avec du bleu de méthylène afin d'étudier les interactions entre les biomatériaux et les cellules. Des coupes ultra fines ont ensuite été réalisées à l'aide d'un Ultracut E (Leica) équipé d'un couteau dia-

mant. Ces coupes ont été contrastées avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb.

Imagerie par microscopie électronique à balayage

Après une déshydratation progressive en éthanol, les échantillons ont été revêtus d'une couche d'or par pulvérisation plasma (avec un appareil Balzers SCD 040) afin d'éviter les phénomènes de charge électrique lors de l'observation. Les images MEB ont été réalisées en électrons secondaires (contraste topographique) sur des microscopes Philips XL20 et JEOL M JSM 840A.

RÉSULTATS

Viabilité cellulaire

Les figures 5a et 5b montrent l'absence de cytotoxicité des substituts A, B et C et reflètent une croissance cellulaire exponentielle pour les ostéoblastes et les fibroblastes, supérieure à celle des cellules contrôles cultivées sans substitut sur plastique.

La croissance des ostéoblastes s'est poursuivie jusqu'à J 15 sur les trois substituts. Entre J 15 et J 28, l'inflexion des courbes traduisait probablement l'arrêt de la croissance cellulaire par inhibition de contact et un début de mort cellulaire avec les substituts B et C.

Les fibroblastes avaient une croissance supérieure à celle des ostéoblastes. Cela nous était confirmé sur la figure 5b car, malgré un ensemencement de moitié moins de cellules ($0,5 \cdot 10^5$ contre 10^5), les valeurs de densités optiques mesurées étaient nettement supérieures à chaque temps d'observation. Il ne semblait pas exister d'inhibition de contact à 28 jours car les fibroblastes, étant de taille inférieure aux ostéoblastes, pouvaient tapisser complètement les macropores augmentant ainsi la surface disponible pour leur croissance. Aucune différence de cinétique de croissance n'était observable entre les trois substituts.

Histologie

L'étude histologique a permis d'étudier la colonisation cellulaire de la profondeur du substitut. La figure 6a représente la coupe du substitut B après culture de fibroblastes pendant huit jours. Elle met en évidence une colonisation par les cellules de la moitié de l'épaisseur du substitut B. Sur les substituts A et C, la pénétration a été respectivement des deux tiers et de la moitié de l'épaisseur de l'échantillon.

La figure 6b montre la colonisation des macropores du substitut A par des fibroblastes à J 8. Le maillage cellulaire, très dense en surface du substitut, est visible aussi dans le volume des premiers macropores. La surface des macropores était tapissée par de nombreuses cellules.

Les figures 6c et 6d montrent la pénétration d'un fibroblaste et d'un ostéoblaste dans une interconnexion d'environ 5 µm. Bien que cette taille fut inférieure à la taille

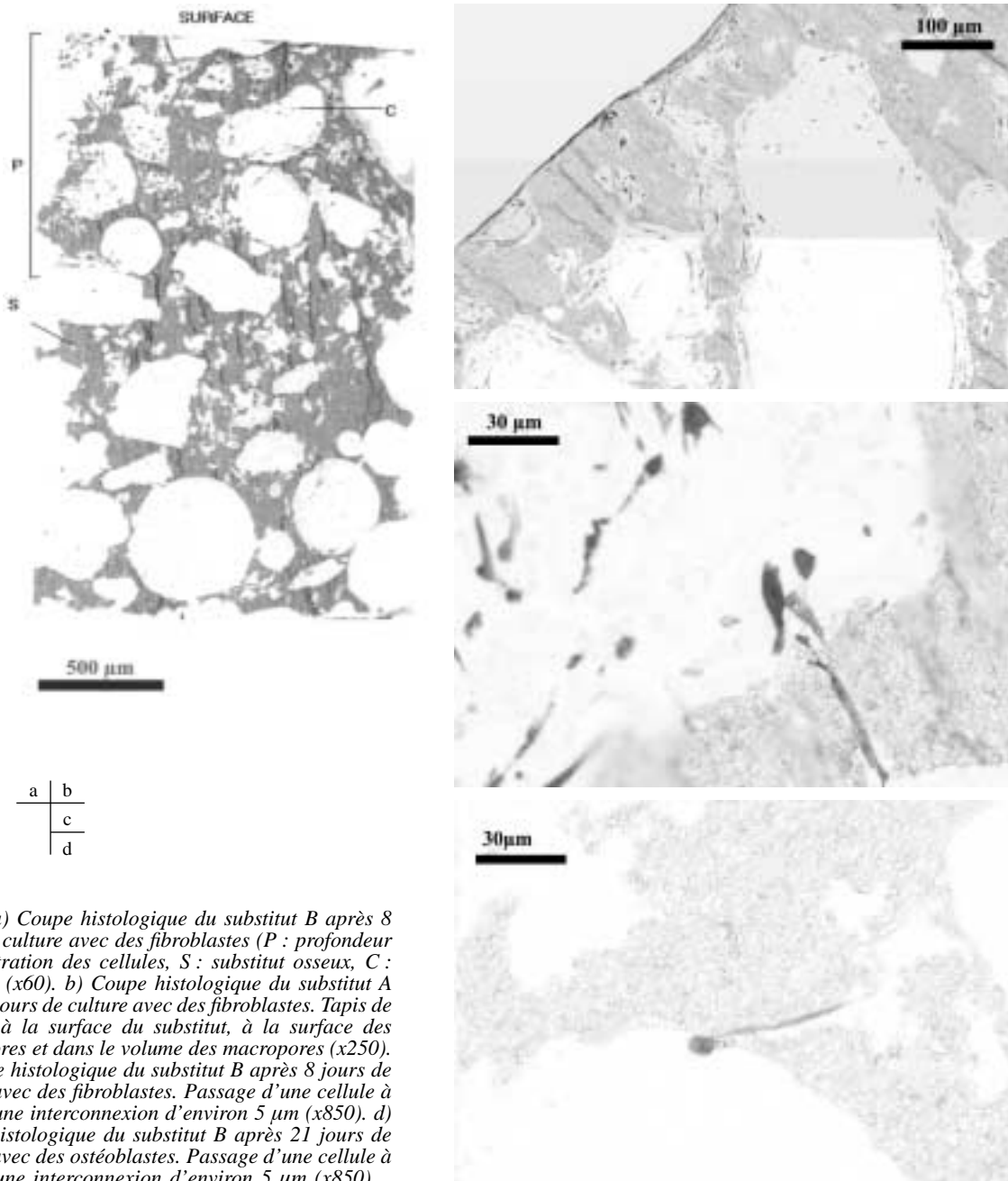


FIG. 6. – a) Coupe histologique du substitut B après 8 jours de culture avec des fibroblastes (P : profondeur de pénétration des cellules, S : substitut osseux, C : cellules) (x60). b) Coupe histologique du substitut A après 8 jours de culture avec des fibroblastes. Tapis de cellules à la surface du substitut, à la surface des macropores et dans le volume des macropores (x250). c) Coupe histologique du substitut B après 8 jours de culture avec des fibroblastes. Passage d'une cellule à travers une interconnexion d'environ 5 µm (x850). d) Coupe histologique du substitut B après 21 jours de culture avec des ostéoblastes. Passage d'une cellule à travers une interconnexion d'environ 5 µm (x850).

moyenne des interconnexions des matériaux, ces images montrent que les cellules étaient capables de pénétrer dans des interconnexions de faible diamètre.

Microscopie électronique à balayage

Les observations par microscopie électronique à balayage ont permis de mieux comprendre le mode de développement cellulaire au contact des substituts. Quel que soit le type cellulaire, ce développement semblait

identique sur les trois substituts étudiés. Dès les premiers jours, la cellule émettait des prolongements cytoplasmiques pour ponter les macropores (fig. 7a). Ainsi, de proche en proche et de division en division, la couverture de la surface était effective (fig. 7b). Parallèlement, on observait l'invasion proprement dite des macropores vers la profondeur du substitut. Les cellules colonisaient à la fois la surface et le volume des macropores (fig. 7c). Il ne semblait pas exister de différence quant à la couverture de

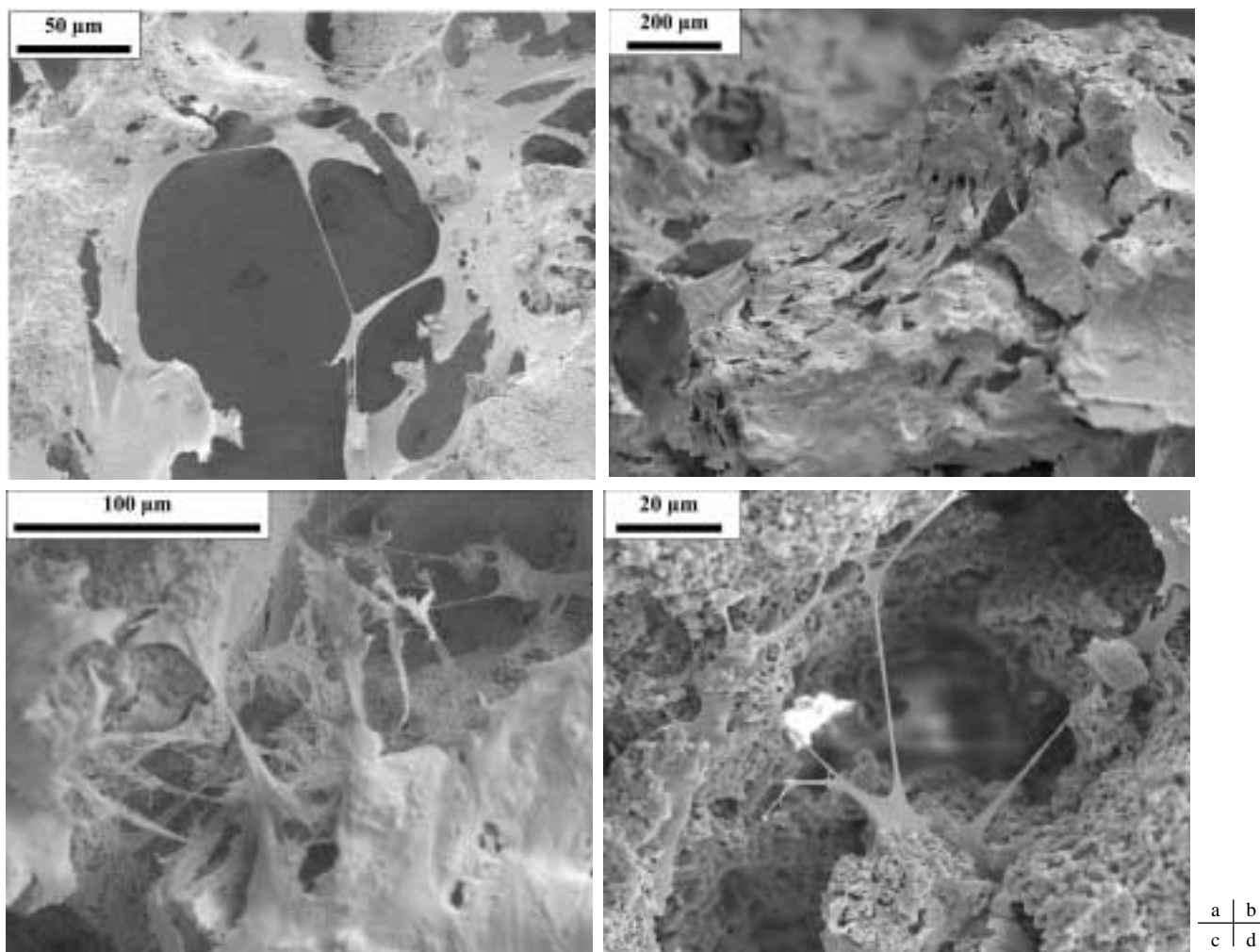


FIG. 7. – a) Pontage des macropores du substitut B par des ostéoblastes après 8 jours de culture (MEB x240). b) Tapis d'ostéoblastes pontant les macropores à la surface du substitut A après 21 jours de culture (MEB x100). c) Premier plan : tapis d'ostéoblastes à la surface du substitut B après 21 jours de culture. Arrière plan : pénétration des cellules à l'intérieur des macropores et colonisation du volume poreux (MEB x500). d) Accrochage des ostéoblastes sur les microporosités du substitut B après 8 jours de culture (MEB x1100).

surface des trois substituts. De nombreuses attaches cellulaires ont pu être observées sur les microporosités des substituts A et B par microscopie électronique à balayage (fig. 7d). Le nombre de ces attaches semblait moins important sur le substitut C que sur les autres.

DISCUSSION

Cette étude a permis la compréhension du développement cellulaire au contact des substituts grâce aux différentes techniques d'imagerie et aux tests réalisés.

Tout d'abord, il y a croissance cellulaire au contact des substituts aussi bien pour les fibroblastes que pour les ostéoblastes. Cette donnée était connue mais les substituts

A, B et C étant expérimentaux, il convenait de les valider en terme de cytotoxicité et d'ostéoconduction. Certains ont montré l'influence de la surface spécifique sur la cytotoxicité *in vitro* [Frayssinet *et al.* (21)]. Dans notre étude, il n'a pas été relevé de différence de croissance cellulaire entre les composés B ($0,87 \text{ m}^2/\text{g}$) et C ($0,17 \text{ m}^2/\text{g}$). La surface spécifique est généralement liée à la morphologie (forme anguleuse ou ronde) des grains de céramique et il est possible que ce deuxième facteur puisse participer à la cytotoxicité des composés.

La croissance cellulaire sur nos disques s'établit en surface et en profondeur. Pour coloniser la surface, les cellules pontent les macropores grâce à de longs prolongements cytoplasmiques qui s'amarrent aux parois et sur

les microporosités, lorsqu'elles sont présentes [Ohgushi *et al.* (22), Oonishi *et al.* (23)]. Après anastomose entre elles, un véritable tapis cellulaire est réalisé à la surface des disques de céramique. La phase de pontage est initialement plus longue sur le substitut A car ses macropores sont les plus volumineux. Dans le même temps, la progression en profondeur est réalisée. Il convient de remarquer que les cellules se développent en profondeur pour assurer leur survie et échapper à l'inhibition de contact superficielle. Toutes les illustrations de microscopie électronique montrent bien ce foisonnement cellulaire au sein des macropores et ce maillage très dense des prolongements cytoplasmiques.

La taille des macropores semble influencer la pénétration des cellules [Daculsi et Passuti (11)]. Dans notre étude, deux substituts (A et B), ne variant que par la taille de leurs macropores, ont été comparés. Les coupes histologiques ont bien montré qu'à J 21, le substitut A est colonisé à plus des 2/3 de son épaisseur contre seulement 1/2 pour le substitut B. Ces résultats peuvent être expliqués si l'on admet que la difficulté pour les cellules n'est pas de coloniser le macropore mais de passer d'un pore à l'autre. Ainsi, plus les macropores sont volumineux, plus le nombre d'interconnexions à traverser est faible et plus la vitesse de colonisation est élevée. L'accroissement de la taille de la microporosité affaiblit énormément la résistance mécanique du matériau [Delagoutte *et al.* (14)]. La résistance des céramiques est étroitement liée à la taille du « défaut critique », ici représenté par le plus gros macropore.

La taille des interconnexions est sans doute un paramètre encore plus crucial pour la colonisation du substitut osseux. Certains auteurs ont étudié ce paramètre, en particulier Lu *et al.* (24) pour qui les interconnexions doivent mesurer plus de 40 µm pour permettre une colonisation osseuse optimale. Pour notre part, les trois substituts utilisés dans l'étude avaient des tailles moyennes d'interconnexion allant de 15 à 30 µm. Cette taille est apparue suffisante pour permettre la pénétration des cellules. Les coupes histologiques ont montré un passage d'ostéoblastes à travers des interconnexions inférieures à 5 µm. Il est logique de penser que plus les interconnexions sont larges meilleure sera la pénétration des cellules. Néanmoins, il est techniquement difficile de réaliser ce type de matériau sans affaiblir leurs propriétés mécaniques car il est en général nécessaire d'augmenter le nombre des microporosités afin d'augmenter la probabilité de contact entre elles.

Malgré l'observation d'attaches cytoplasmiques sur les microporosités, il n'est pas possible de conclure sur leur intérêt suite à cette étude. Les pores du substitut C dépourvus de microporosité ont été envahis. Il est probable que la microporosité joue sur l'adhésion cellulaire mais nous n'avons pas quantifié ce facteur dans cette étude. Il est important de rappeler que la présence de microporosités influence la résorption *in vivo* des substituts [Passuti *et al.*

(2)]. Plus la microporosité est élevée, plus la cohésion entre les grains de céramique est faible. La porosité évolutive du substitut B (porosité engendrée par la résorption du matériau) devrait donc être supérieure à celle du C.

Pour améliorer la colonisation des substituts, il aurait été souhaitable de les imprégner au préalable avec du milieu de culture afin d'avoir dès l'ensemencement les protéines nécessaires à l'adhésion cellulaire. Il faudrait aussi envisager la culture de cellules ostéoblastiques directement au cœur du substitut. Ce procédé devrait permettre d'éviter l'inhibition de contact en surface et de favoriser une croissance plus homogène à l'intérieur du substitut. L'adaptation de ces techniques *in vivo* pour réaliser de « l'os hybride » devra de plus se passer de sérum bovin (utilisation de milieux synthétiques) afin d'éviter l'éventuelle transmission d'agents pathogènes.

CONCLUSION

La viabilité cellulaire a été effective sur les trois substituts étudiés. Il n'a pas été retrouvé de cytotoxicité après culture *in vitro*. La croissance cellulaire a été exponentielle sur les trois composés et pour les deux types cellulaires en surface et en profondeur. La taille des macropores a semblé influencer la colonisation des substituts. Une taille d'interconnexion de 15 µm est apparue suffisante pour permettre le passage cellulaire entre les macropores. Une microporosité de paroi n'a pas été nécessaire pour permettre l'invasion des substituts.

Remerciements

Nous remercions la société Coating Industries (Vaulx-en-Velin) pour sa participation à l'élaboration des substituts osseux ainsi que la société NOVOTEC (Lyon). Les auteurs expriment leur gratitude à Anne-Catherine Maurin et Delphine Farlay (INSERM, Unité 403) pour leur précieuse aide technique.

Références

1. LE HUEC JC, CLEMENT D, LESPRIT E, FABER J : The use of calcium phosphates, their biological properties. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2000, 10, 223-229.
2. PASSUTI N, DELECRIN J, GOUIN F, HEYMANN D : Substituts osseux. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Appareil locomoteur*, 199914-015-B-10, 1-6.
3. BRUDER S, FOX B : Tissu engineering of bone. *Clin Orthop*, 1999, 367S, 68-83.
4. OONISHI H : Orthopaedic applications of hydroxyapatite. *Biomaterials*, 1991, 12, 171-178.
5. UCHIDA A, ARAKI N, SHINTO Y, YOSHIKAWA H, KURISAKI E, ONO K : The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1990, 72, 298-302.
6. INOUE O, IBARAKI K, SHIMABUKURO H, SHINGAKI Y : Packing with high-porosity hydroxyapatite cubes alone for the treatment of simple bone cyst. *Clin Orthop*, 1993, 293, 287-292.

7. GOUIN F, DELECRIN J, PASSUTI N, TOUCHAIS S, POIRIER P, BAINVEL JV : Comblement osseux par céramique phosphocalcique biphasée macroporeuse. A propos de 23 cas. *Rev Chir Orthop*, 1995, 81, 59-65.
8. BUCHOLZ RW, CARLTON A, HOLMES R : Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin Orthop*, 1989, 240, 53-62.
9. OONISHI H, WAKITANI S, MURATA N, SAITO M, IMOTO K, KIM S *et al.* : Clinical experience with ceramics in total hip replacement. *Clin Orthop*, 2000, 379, 77-84.
10. LEVAI JP, BOISGARD S : Acetabular reconstruction in total hip revision using a bone graft substitute. Early clinical and radiographic results. *Clin Orthop*, 1996, 330, 108-114.
11. DACULSI G, PASSUTI N : Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Bio-materials*, 1990, 11, 86-87.
12. GAUTHIER O, BOULER JM, AGUADO E, PILET P, DACULSI G : Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics : influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials*, 1998, 19, 133-139.
13. LE HUEC JC, SCHAEVERBEKE T, CLEMENT D, FABER J, LE REBELLER A : The influence of porosity on mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress. *Biomaterials*, 1995, 16, 113-118.
14. DELAGOUTTE JP : Les substituts osseux. *Conférences d'Enseignement de la SOFCOT*, 1992, 42, 239-252.
15. URIST MR, LIETZE A, DAWSON E : Beta tri-calcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*, 1984, 187, 277-280.
16. HEYMANN D, DELECRIN J, DESCHAMPS C, GOUIN F, PADRINES M, PASSUTI N : Etude in vitro de l'association de cellules ostéogènes avec une céramique en phosphate de calcium macroporeux. *Rev Chir Orthop*, 2001, 87, 8-17.
17. CHAVASSIEUX PM, CHENU C, VALENTIN-OPRAN A, MERLE B, DELMAS PD, HARTMANN DJ *et al.* : Influence of experimental conditions on osteoblast activity in human primary bone cell cultures. *J Bone Miner Res*, 1990, 5, 337-343.
18. GUNDLE R, BERESFORD JN : The isolation and culture of cells from explants of human trabecular bone. *Calcif Tissue Int*, 1995, 56 (suppl 1), S8-10.
19. ROBEY PG : Collagenase-treated trabecular bone fragments : a reproducible source of cells in the osteoblastic lineage. *Calcif Tissue Int*, 1995, 56 (suppl 1), S11-12.
20. ROBEY PG, TERMINE JD : Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int*, 1985, 37, 453-460.
21. FRAYSSINET P, MATHON D, AZIMUS E, AUTEFAVE A : Céramiques phosphocalciques : influence de leurs caractéristiques sur leur ostéoconductivité. In : Actualités en biomatériaux. Paris, Edition Romillat, 1998, 4, 121-125.
22. OHGUSHI H, OKUMURA M, TAMAI S, SHORS E, CAPLAN A : Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate : a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res*, 1990, 24, 1563-1570.
23. OONISHI H, HENCH LL, WILSON J, SUGIHARA F, TSUJI E, KUSHITANI S *et al.* : Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44, 31-43.
24. LU JX, FLAUTRE B, ANSELME K, HARDOUIN P, GALLUR A, DESCAMPS M *et al.* : Role of interconnection in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J Mater Sci*, 1999, 10, 111-120.