UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE SUR LES PARTICULES DE CORAIL COMME SYSTÈME DE LIBÉRATION DU TGF-ß1 POUR LA RÉGÉNÉRATION OSSEUSE

Caroline DEMERS
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES (M.Sc.A.)
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
AVRIL 2001

© Caroline Demers, 2001.

National Library of Canada
Bibliothèque nationale du Canada

Acquisitions and Bibliographic Services
Acquisitions et services bibliographiques

385 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-65570-9

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

ÉTUDE SUR LES PARTICULES DE CORAIL
COMME SYSTÈME DE LIBÉRATION DU TGF-ß1
POUR LA RÉGÉNÉRATION OSSEUSE

présenté par: DEMERS Caroline
en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

M. CARTILIER Louis, Ph.D., président
M. YAHIA L'Hocine, Ph.D., membre et directeur de recherche
Mme TABRIZIAN Maryam, Ph.D., membre et codirectrice de recherche
M. HAMDY Reggie, MD, membre et codirecteur de recherche
M. FERNANDEZ Julio, MD, membre

À mon fiancé,

À mes parents,

À la mémoire de ma grand-mère,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, docteur L'Hocine Yahia, pour l'opportunité d'avoir fait ma maîtrise au sein du Groupe de recherche en biomécanique et biomatériaux dans le domaine du génie biomédical à l'École Polytechnique. Je le remercie également pour sa vision et son encouragement tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais également étendre un très grand merci à ma codirectrice, docteure Maryam Tabrizian, pour sa disponibilité, son dévouement, son encouragement, son sourire et son amitié. Son support quotidien fut grandement apprécié.

Je tiens à remercier mon codirecteur, docteur Reggie Hamdy, pour sa contribution indispensable à ce projet, son encouragement et sa disponibilité. Son sujet de recherche qui est au coeur de ce projet, m'a donné l'opportunité de travailler avec des animaux et de développer une appréciation de la complexité inhérente à la recherche *in vivo*.

Je tiens à les remercier pour m'avoir permis de participer à de nombreux congrès scientifiques qui ont servi à enrichir mon expérience de maîtrise et à mettre en perspective mes travaux de recherche. Je vous remercie également de m'avoir donné une grande liberté dans la direction et la planification de mon projet, ce qui par la même occasion m'a permis d'apprendre autant de mes erreurs que de mes réussites.

Je désire exprimer ma reconnaissance au docteur Alain Petit pour m'avoir accueillie dans le laboratoire des docteurs Olga Huk et David Zukor à l'Institut Lady Davis de l'hôpital Général Juif. Je tiens particulièrement à le remercier pour sa disponibilité, ses opinions, son aide fort appréciée ainsi que sa philosophie si rafraîchissante.

Je tiens à remercier le docteur Jacques Dupuis pour m'avoir permis d'effectuer mes études *in vivo* à la Clinique des petits animaux de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Je le remercie particulièrement pour son temps, son enseignement et son implication dans le projet. Je tiens également à remercier le personnel et les étudiants de cet établissement qui se sont si bien occupés des lapins et qui ont fourni une aide fort appréciée lors des interventions auprès des lapins. Votre dévouement, votre passion et vos interventions auprès des animaux sont une inspiration.

Je voudrais exprimer ma gratitude aux docteurs Louis Cartilier et Julio Fernandez qui ont accepté d'évaluer mon travail en faisant partie de mon jury.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui m'ont apporté une aide scientifique ou technique pendant ma maîtrise:

- Sylvie Charette pour son introduction à la manipulation et aux interventions médicales avec les lapins à l'hôpital des enfants. Son approche m'a permis une initiation tellement plus plaisante au travail avec les animaux. Merci pour sa joie de vivre et les bons moments;
- Francis Boudrault pour son enseignement des procédures pour les tests mécaniques à l'École Polytechnique et pour son encouragement;
- Docteur Thomas Steffen et Lorne Beckman pour la réalisation de tous les tests mécaniques à l'hôpital Royal Victoria et pour leur disponibilité;
- Dominique Lauzier pour son initiation à l'histologie et ses analyses histomorphométriques des coupes histologiques des tibias de lapins. Un grand merci pour son dévouement incroyable et son aide très appréciée;
- Stéfania Polizu pour son aide avec les analyses par microscopie électronique à balayage des particules de corail, et pour son amitié et son encouragement;
- Serge Dallaire pour les analyses de calcium dans les milieux *in vitro*, par la spectroscopie par absorption atomique;

- la compagnie Inoteb, une filiale de Biocorail®, pour son don des particules de corail, ainsi que le Docteur Jean-Louis Patat, le directeur scientifique et médical d'Inoteb, pour son support technique.

Je tiens à remercier le CRSNG pour ma bourse. Je remercie également les organismes qui ont contribué financièrement à la recherche au GRBB et donc de mon projet, ainsi que les fonds CRM et de l'hôpital Shriners du docteur Reggie Hamdy.

Je voudrais souligner le dévouement et l'aide indispensable de Louise Clément, secrétaire du GRBB. Je la remercie pour les mille et une tâches administratives qu'elle a accomplies pendant ma maîtrise et pour son sourire qui pouvait toujours rendre une journée plus agréable. Je voudrais aussi remercier Diane Giroux pour ses instructions, son aide et son support dans les derniers moments critiques et stressants de rédaction de mon mémoire et de préparation à la soutenance de ma maîtrise.

Je tiens à remercier aussi tous les étudiants que j'ai côtoyés pour les heures passées ensemble et tous les petits coups de main. Je tiens à remercier en particulier Yan Chevalier pour son amitié, ses conversations et son support.

Enfin je tiens à remercier mes parents pour leur support indispensable et leur amour inconditionnel. Je voudrais également remercier mon fiancé pour son support journalier, sa confiance en mes habiletés, son oreille attentive et ses conseils. Sans lui, je n'aurais su trouver le courage, la persévérance et l'énergie pour mener à bout ma maîtrise.

Résumé

L'allongement des os par distraction permet de corriger des inégalités de membres et de combler des pertes osseuses importantes. Cette longue procédure médicale est caractérisée par un taux élevé de complications qui surviennent principalement de la nécessité de porter un fixateur pendant tout le traitement. Par contre, le succès de cette technique semble résider dans la surexpression de facteurs de croissance en réponse aux contraintes mécaniques appliquées lors de la distraction, qui à leur tour permettent d'accélérer la régénération osseuse. Ainsi, l'introduction de facteurs de croissance exogènes après la fin de l'allongement pourrait potentiellement recréer les conditions biochimiques obtenues lors de la distraction afin d'accélérer le processus de consolidation osseuse, et par ce fait, réduire le temps de port du fixateur. Les facteurs de croissance injectés seuls sont cependant rapidement éliminés du site d'implantation. Ce projet avait donc pour but de développer et de tester un système de libération pour ces facteurs de croissance qui pouvait être introduit de façon minimalement invasive dans le site allongé des tibias de lapins.

Nous avons choisi le corail comme matériau, pour ses propriétés intrinsèques de biocompatibilité, de biorésorption et d'ostéoconduction. Pour sa part, le *transforming growth factor ßl* (TGF-ß1) a été sélectionné comme facteur de croissance en raison de son rôle – certes, encore mal défini – dans le développement, la guérison et le remodelage osseux. Des études précédentes ont également démontré que la combinaison du corail avec le TGF-ß1 pouvait améliorer le processus de régénération osseuse dans des défauts craniaux de lapins. Le manque d'information cependant sur les propriétés du corail comme système de libération, nous a conduit à étudier dans un premier temps, le comportement d'adsorption et de libération du TGF-ß1 par des particules de corail *in vitro*. Plus particulièrement, nous avons étudié l'effet de co-adsorbants - l'albumine et la gélatine -, du pH d'adsorption – pH 3, 7.4 et 11 -, de la taille des particules de corail -

<80 µm et 300-450 µm – ainsi que du pH de relargage – pH 4.0 et 7.4 – sur la cinétique de relargage du TGF-ß1 des particules de corail dans un fluide osseux artificiel.

Par la suite, nous avons évalué *in vivo* la faisabilité d'injecter des particules de corail de taille <80 µm, de même que l'effet de notre système d'injection corail-gélatine sur la consolidation osseuse de tibias de lapins trois semaines après la fin de leur allongement de 2.1 cm. Notre évaluation des tibias a été basée sur une mesure de la densité minérale osseuse par DEXA, une analyse histomorphométrique de coupes histologiques, ainsi qu'un test biomécanique de traction.

Notre deuxième étude *in vivo* s'est portée sur l'identification d'une dose de TGF-ß1, capable d'améliorer significativement la consolidation osseuse des tibias allongés de lapins. Les résultats de cette étude devaient servir ensuite de références pour évaluer l'efficacité de notre système de libération du TGF-ß1 dans le modèle animal. Les mêmes techniques que celles de la première étude *in vivo* ont été employées pour évaluer la qualité de la consolidation osseuse trois semaines après la fin de l'allongement.

L'étude *in vitro* a permis de conclure que le corail peut lier le TGF-ß1 principalement par l'entremise d'interactions électrostatiques. Ces résultats suggèrent que le corail se comporte comme d'autres matériaux à base de calcium, tels l'hydroxyapatite et le sulphate de calcium, lors de l'adsorption de protéines. De plus, les particules de corail ont été capables de libérer le TGF-ß1 sur une période de plus de deux semaines dans le fluide osseux artificiel. La cinétique de relargage est en fait caractérisée par une phase de libération qui est principalement régie par la vitesse de dissolution du TGF-ß1, après les premières 24 heures. Cette dépendance permet ainsi d'expliquer la modulation de la cinétique de libération que nous avons obtenue, selon le type de protéines co-adsorbées avec le TGF-ß1, le pH d'adsorption de même que la taille des particules de corail.

La première étude *in vivo* a démontré que les particules de corail injectées, avaient un effet bénéfique mais modéré sur la consolidation osseuse. La présence des particules de corail semble améliorer la stabilité et la rigidité des tibias. Cependant, des problèmes sont survenus pour la manipulation du système d'injection, à cause du comportement de la gélatine. Il devient donc essentiel d'optimiser la méthode minimalement invasive d'introduction des particules de corail dans les tibias allongés, avant de poursuivre d'autres études.

Les résultats de la deuxième étude *in vivo* ont démontré qu'aucune des trois doses de TGF-ß1 testées ne permet d'améliorer significativement le processus de consolidation osseuse des tibias allongés. La stabilité ainsi que les propriétés mécaniques de traction semblent légèrement améliorées par l'ajout de TGF-ß1, mais l'effet est trop faible pour être considéré significatif d'un point de vue clinique. Un autre facteur de croissance, comme par exemple le BMP-7, devra être utilisé pour évaluer adéquatement l'efficacité *in vivo* du système de libération.

En conclusion, les résultats de ce projet suggèrent que les particules de corail ont le potentiel d'être un bon système de libération de facteurs de croissance injectable, moyennant l'optimisation de la méthode d'introduction des particules de corail. Un choix judicieux du facteur de croissance sera nécessaire afin d'accélérer le processus de régénération osseuse selon les besoins du processus.

Abstract

Limb lengthening by distraction osteogenesis allows correction of limb length discrepancies and replacement of significant bone loss. Distraction osteogenesis is a lengthy medical procedure characterized by a high level of complications resulting mainly from the need of a fixation device during the treatment. The success of this technique appears to depend primarily on the mechanical stimulation of high levels of growth factors during distraction, which in turn help accelerate the bone regeneration process. We therefore hypothesized that recreating the biochemical conditions of the distraction, by introducing growth factors during the consolidation phase, could accelerate the process sufficiently to reduce the length of the treatment. However, growth factors injected alone are rapidly eliminated from the implantation site. Therefore, the aim of this project was to develop and evaluate an injectable growth factor delivery system in the lengthened tibia of rabbits.

Coral was our material of choice due to its properties of biocompatibility, bioresorption and osteoconduction, while transforming growth factor-ß1 (TGF-ß1) was selected as the growth factor due to its role – though still ill defined – in the development, repair and remodeling of bone. Furthermore, the combination of coral and TGF-ß1 has been shown in previous studies to repair critical-sized calvarial bone defects in rabbits. Little information is known however concerning the properties of coral as a drug delivery system. Our first study was to determine the adsorption and release behavior of TGF-ß1 by coral particles *in vitro*. More specifically, we studied the effects of the type of co-adsorbant – albumin and gelatin -, of the pH of adsorption – pH 3, 7.4 and 11 -, of the coral particle size - <80 µm and 300-450 µm -, and the pH of release – pH 4.0 and 7.4 – on the TGF-ß1 release kinetics from coral particles in an artificial bone fluid.

Our first *in vivo* study was designed to evaluate the feasability of injecting <80 µm coral particles, while at the same time testing the effect of this coral-gelatin based injection

system on the bone consolidation of rabbit tibiae three weeks after a 2.1 cm-lengthening. Our second *in vivo* study was performed to identify a TGF-ß1 dose capable of accelerating the bone consolidation process in lengthened rabbit tibiae. In turn, this study would have then served as a reference basis to evaluate the effectiveness of our TGF-ß1 delivery system in the rabbit limb lengthening model. Our evaluation of the consolidating tibiae for both *in vivo* studies was based upon bone mineral density measurements by DEXA, histomorphometry of histological sections and biomechanical testing of the tensile properties.

The results from our *in vitro* study led us to conclude that coral binds TGF-ß1, mainly through electrostatic interactions. Coral thus appears to behave as other calcium-containing biomaterials (hydroxyapapatite, calcium sulphate, etc.) for protein adsorption. We also observed with our release experiment that coral particles could release TGF-ß1 in the artificial bone fluid for more than two weeks. In fact, the TGF-ß1 kinetics of release were characterized by a TGF-ß1 diffusion-dependent release rate, after the first 24 hours of the study. This behavior explains the observed modulation of the TGF-ß1 kinetics of release by the type of co-adsorbant present, the pH at adsorption, and the size of the coral particles.

Our first *in vivo* study showed that coral particles, when injected at the end of lengthening, enhance consolidation, if somewhat moderately, by confering upon the tibiae better bone stability and rigidity. We however found handling of our gelatin-based injection system for the coral particles to be difficult. Optimization of the injection system is therefore required before further *in vivo* experiments with coral particules are performed.

Results from our second *in vivo* study indicate that none of the doses of TGF-ß1 tested, sufficiently helped bone consolidation of the elongated tibiae, eventhough the stability and tensile properties of tibiae with the lower dose of TGF-ß1 were slightly higher than

those of the noninjected tibiae. Furthermore, these results suggest that even at higher dosage, TGF-ß1 may not be an adequate growth factor, unlike BMP-7, to accelerate the limb lengthening process at the time of its introduction.

In conclusion, coral particles have the potential to be a good injectable growth factor delivery system, as long as the method used for particle injection is optimized for easy handling. A judicious choice for the growth factor will also be required in order to obtain a strong and benefic effect on the bone regeneration process during consolidation of the lengthened limb.

Table des matières

Dédicace iv
Remerciements v
Résumé viii
Abstract xi
Table des matières xiv
Liste des tableaux xviii
Liste des figures xix
Liste des annexes xxii
Liste des sigles et abréviations xxiii
État de la situation et objectifs 1
CHAPITRE 1. État de l'art sur l'allongement des os et le rôle des facteurs de croissance 6
1.1 Allongement des os par la méthode d'ostéogenèse par distraction 6
1.1.1 Étiologie 7
1.1.2 Principe de l'allongement par distraction des os 8
1.1.3 Rôle des fixateurs dans l'allongement des os 10
1.1.4 Processus biologiques de régénération osseuse lors de l'ostéogenèse par distraction 11
1.1.5 Complications 14
1.1.6 Effet de suppléments sur la consolidation du site allongé 16
1.2 *Transforming Growth Factor-β1* 17
1.2.1 Biologie du TGF-ß1 17
1.2.2 Fonctions du TGF-ß1 18
1.2.2.1 Effets sur les fonctions cellulaires 19
1.2.2.1.1 Migration cellulaire 19
1.2.2.1.2 Prolifération et différenciation cellulaire 19
1.2.2.1.3 Matrice extracellulaire 20

1.2.2.2 Effets sur le système osseux 21
1.2.2.3 Effets sur le système immunitaire 22
1.2.3 Expression du TGF-ß1 lors de la guérison et du remodelage osseux.. 22
1.2.4 Effets du TGF-ß1 exogène dans le processus de régénération osseuse 24
CHAPITRE 2. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review 26
2.1 Abstract 29
2.2 Introduction 29
2.3 Background 30
2.4 Coral properties 31
2.4.1 Composition 31
2.4.2 Architecture and porosity 32
2.4.3 Mechanical properties 35
2.4.4 Osteoconduction 36
2.4.5 Osteoinduction 42
2.4.6 Osteogenesis 42
2.4.7 Coral resorption 43
2.4.7.1 Physical process 43
2.4.7.2 Cellular process 44
2.4.8 Coral as a drug delivery system 49
2.5 Biocompatibility 54
2.6 Quality Control 54
2.7 Clinical applications 56
2.8 Discussion 64
2.9 References 66
CHAPITRE 3. Méthodologies utilisées pour les expériences *in vitro* et *in vivo* avec le corail et le TGF-ß1 82
3.1 Étude *in vitro* 82
3.1.1 Matériel 82
3.1.1.1 Caractéristiques des particules de corail 82

3.1.1.2 *Transforming growth factor beta 1* 83
3.1.1.3 Solutions pour l'adsorption du TGF-ß1 84
3.1.1.4 Solution pour le relargage du TGF-ß1 84
3.1.1.5 Dosage du TGF-ß1 85
3.1.1.6 Dosage de l'albumine bovine 86
3.1.1.7 Dosage de la gélatine 86
3.1.2 Expériences 87
3.1.2.1 L'adsorption du TGF-ß1 sur les particules de corail 87
3.1.2.2 La cinétique de relargage du TGF-ß1 des particules de corail 88
3.1.2.3 La dégradation des particules de corail dans le milieu de relargage 89
3.1.2.4 L'adsorption des co-absorbants sur les particules de corail 89
3.2 Étude *in vivo* 90
3.2.1 Modèle animal 90
3.2.1.1 Fixateur externe 90
3.2.1.2 Protocole opératoire 91
3.2.1.3 Protocole Expérimental 93
3.2.1.4 Préparation des seringues 95
3.2.2 Techniques d'évaluation de la consolidation du tibia allongé 96
3.2.2.1 Densité minérale osseuse 96
3.2.2.2 Histologie 100
3.2.2.3 Histomorphométrie 101
3.2.2.4 Tests mécaniques 102
3.3 Analyses statistiques 103
CHAPITRE 4. Effect of experimental parameters on the *in vitro* release kinetics of transforming growth factor ß1 from coral particles 105
4.1 Abstract 108
4.2 Introduction 109
4.3 Materials and Methods 110
4.3.1 Materials 110

4.3.2 Adsorption 111
4.3.3 Release kinetics 112
4.3.4 Coral particle degradation 114
4.3.5 Statistical analysis 114
4.4 Results 114
4.4.1 Adsorption 114
4.4.2 TGF-ß1 release kinetics 115
4.4.3 Particle degradation 119
4.5 Discussion 122
4.6 Conclusion 125
4.7 Acknowledgements 125
4.8 References 126
CHAPITRE 5. Évaluation *in vivo* du système d'injection corail – gélatine 130
5.1 Comportement du système d'injection corail-gélatine 130
5.2 Évaluation radiologique, histologique, histomorphométrique et biomécanique du système d'injection corail-gélatine sur la consolidation osseuse 132
5.3 Discussion 138
CHAPITRE 6. Étude *in vivo* avec le TGF-ß1 140
6.1 Observations lors de la procédure 140
6.2 Évaluation densitométrique, histomorphométrique et biomécanique 141
6.3 Discussion 146
CHAPITRE 7. Discussion générale 148
CHAPITRE 8. Conclusion et perspectives 157
Références 158
Annexes 199

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Résumé des complications survenants pendant ou après l'allongement des os 15
Tableau 2.1. Physical and mechanical properties of three coral species compared to trabecular and cortical bone [20,30-33] 34
Tableau 2.2. Experimental studies on animals demonstrating the biocompatibility and osteoconductivity of coral. 37
Tableau 2.3. Resorption rates of various corals depending on the site of implantation and the species. 46
Tableau 2.4. Summary of the osteoinductive properties of coral when combined to growth factors. 51
Tableau 2.5. Applications of coral grafts in humans. 59
Tableau 3.1. Conditions expérimentales pour l'adsorption et le relargage du TGF-ß1 des particules de corail. 88
Tableau 3.2. Nombre de lapins dans les groupes expérimentaux et répartis selon les analyses à la fin du protocole. 94
Tableau 5.1. Observations des tibias allongés de lapins après 3 semaines de consolidation 133
Tableau 5.2. Analyse histomorphométrique des coupes histologiques de tibias allongés de lapins après 3 semaines de consolidation. 136
Tableau 5.3. Sites de fracture des tibias de lapins lors des tests mécaniques. 138
Tableau 6.1. Analyse histomorphométrique des coupes histologiques de tibias allongés de lapins 3 semaines après l'injection de différentes doses de TGF-ß1 143
Tableau 6.2. Observations des tibias allongés de lapins après 3 semaines de consolidation 144
Tableau 6.3. Sites de fracture des tibias de lapins lors des tests mécaniques. 146

Liste des figures

Figure 1.1. Allongement par la méthode d'ostéogenèse par distraction. Radiographies du tibia d'un lapin une semaine après la chirurgie jusqu'à 7 semaines post-opératoires. 7

Figure 1.2. Fixateurs employés lors de l'allongement des os par distraction. Le fixateur d'Ilizarov (A) est composé de multiples anneaux et tiges minces (Younger *et al.*, 1994), tandis que l'Orthofix (B) est un fixateur unilatéral avec de moins de tiges (Marsh *et al.*, 1994). 11

Figure 2.1. Histologic sections of a lengthened rabbit tibia 1 week after the injection of coral particles. (Coral was injected at the end of distraction.) The arrows in Figure 1A show the coral particles. Figure 1B is a magnification of coral particles. (Stain, hematoxylin and eosin; magnifications, (A) 4x and (B) 20x) 53

Figure 3.1. Fixateur externe avec les tiges mi-filetées employé pour l'allongement des tibias de lapins. 91

Figure 3.2. Photos de la chirurgie. (A) Le lapin est sous anesthésie générale durant la procédure, et la patte droite est rasée et stérilisée. (B) La première tige mi-filetée du fixateur est posée dans le tibia en position distale. (C) Le fixateur sert de guide pour la pose des trois autres tiges dans le tibia. (D) L'ostéotomie est faite, les segments osseux réalignés et le fixateur reposé avant de fermer le site. 93

Figure 3.3. Image du système d'injection à base de particules de corail et de gélatine... 96

Figure 3.4. Exemple d'image obtenue par le système DEXA. Le site allongé (R3) et les régions proximales (R1) et distales (R2) sont analysés pour le BMC et la BMD. 99

Figure 3.5. Image d'une section histologique d'un tibia allongé de lapins analysée par histomorphométrie. Le tissu osseux est coloré en bleu, le tissu fibreux en marron pointillé, le tissu cartilagineux (cartilage et fibrocartilage) en rose, et la moëlle osseuse par une coloration grise. 101

Figure 3.6. Exemple de courbe force-déplacement obtenue pour un test de traction sur un tibia de lapins. 104

Figure 4.1. Scanning electron micrographs of coral particles. (A) The small particles (<80 μm) have a rough and uneven surface, lack apparent porosity and tend to be spherical compared to the more elongated large particles (300-450 μm) with a smoother surface (B). 113

Figure 4.2. Protein adsorption on coral particles. TGF-ß1 was incubated for 24h with <80 μm coral particles in the presence of the co-absorbants, BSA and gelatin, at pH 3, 7.4 and 11 (a). The co-absorbants were also incubated alone with the coral particles for 24h at pH 3, 7.4 and 11 (b). The results are the mean ± standard deviation of 3 experiments..... 116

Figure 4.3. Release kinetics of TGF-ß1 from coral particles. Adsorption of TGF-ß1 on <80 μm coral particles was done in the presence of BSA (a) and gelatin (b) at pH 3, 7.4 and 11. The release was realized in an artificial bone fluid at 37°C, pH 7.4. The results are the mean ± standard deviation of 3 experiments..... 118

Figure 4.4. Effect of particle size on the TGF-ß1 release from coral particles. Adsorption of TGF-ß1 on <80 μm and 300-450 μm coral particles was done in the presence of gelatin at pH 3. The release was realized in an artificial bone fluid at 37°C, pH 7.4. The results are the mean ± standard deviation of 3 experiments... 119

Figure 4.5. Effect of pH on the rate of TGF-ß1 release from coral particles. Adsorption of TGF-ß1 on <80 μm coral particles was done in the presence of gelatin at pH 3. The release was done in an artificial bone fluid at 37°C, pH 4.0 and 7.4. The results are the mean ± standard deviation of 3 experiments..... 120

Figure 4.6. Degradation of coral particles. Coral particles of size <80 μm and 300-450μm were incubated in an artificial bone fluid at 37°C, and at pH 4.0 or pH 7.4. The variation of pH of the artificial bone fluid (a) and the calcium ion release from coral particles (b) were measured during the degradation. The results are the mean ± standard deviation of 3 experiments. 121

Figure 5.1. Coupe histologique du site allongé d'un tibia de lapin trois semaines après l'injection des particules de corail. Coloration au Trichrome de Goldner et

grossissement de 20x. Les flèches pointent vers des formes qui pourraient être des particules de corail. 133

Figure 5.2. Densité minérale osseuse des tibias allongés de lapins après 3 semaines de consolidation. Les valeurs sont rapportées selon le pourcentage de la densité minérale osseuse des tibias opposés pour le groupe contrôle et le groupe corail [avec (n=9) et sans (n=7) les 2 non-unions]. * p=0.009 et # p=0.068 lorsque comparés au groupe contrôle. 135

Figure 5.3. Propriétés biomécaniques de traction des tibias allongés de lapins après 3 semaines de consolidation. Les valeurs de la force ultime (A) et de la rigidité (B) sont présentées selon le pourcentage des valeurs des tibias opposés. Chaque cercle représente la mesure pour un tibia et la barre noire représente la moyenne de chaque groupe. * p=0.097. 137

Figure 6.1. Densité minérale osseuse des tibias allongés de lapins 3 semaines après l'injection de différentes doses de TGF-ß1. Les valeurs sont présentées selon le pourcentage de la densité minérale osseuse des tibias opposés. Les différences significatives avec le groupe contrôle sont indiquées par un astérisque (* p=0.009 et # p=0.068). # indique une différence significative entre les groupes de TGF-ß1 combinés et le groupe contrôle (p=0.003). 142

Figure 6.2. Propriétés biomécaniques de traction des tibias allongés de lapins 3 semaines après l'injection de différentes doses de TGF-ß1. Les valeurs de la force ultime (A) et de la rigidité (B) sont présentées selon le pourcentage des valeurs pour les tibias opposés. Chaque cercle représente la mesure pour un tibia et la barre noire représente la moyenne de chaque groupe. 145

Liste des annexes

Annexe 1. Études sur l'effet de cellules osseuses, de facteurs de croissance ou d'autres protéines sur la consolidation osseuse de membres allongés. 200

Annexe 2. Études sur les effets du TGF-ß1 exogène introduit dans différents modèles animaux. 203

Annexe 3. Comparaison de la composition et des concentrations du fluide osseux artificiel à ceux du milieu de relargage employé pour l'étude *in vitro*. 210

Liste des sigles et abréviations

a.a.	acides aminés
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ANOVA	*Analysis of Variance* (Analyse de variance)
ARN	Acide RiboNucléique
bFGF	*basic Fibroblast Growth Factor* (Facteur de croissance basique des fibroblastes)
BMC	*Bone Mineral Content* (Contenu minéral osseux)
BMD	*Bone Mineral Density* (Densité minérale osseuse)
BMP	*Bone Morphogenetic Protein* (Protéine morphogénétique osseuse)
BSA	*Bovine Serum Albumin* (Albumine de sérum bovin)
CTScan	*Computed Tomography Scan*
DEXA	*Dual Energy X-ray Absorptiometry* (Absorptiométrie à double énergie)
DPA	*Dual Photon Absorptiometry* (Absorptiométrie à photon double)
ELISA	*Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay* (Essai avec enzymes par immunosorption)
FTIR/ATR	*Fourier Transform Infra-Red/Attenuated Total Reflectance*
GDF	*Growth and Differenciation Factor* (Facteur de croissance et de différentiation)
GDNF	*Glial-Derived Neurotrophic Factor*
IGF 1	*Insulin-like Growth Factor-1*
IL-1ß	Interleukine-1beta
kDa	kiloDalton
LAP	*Latency Associated Peptide* (Peptide associé à la latence)
LTBP	*Latent TGFß Binding Protein* (Protéine latente liant le TGFß)
Mrad	Mégaradiation
OPG	Ostéoprotégérine
PDGF-A, B	*Platelet-Derived Growth Factor-A, B* (Facteur de croissance dérivé

	des plaquettes)
PMMA	Polyméthylméthacrylate
post-op	Post-opératoire
QCT	*Quantitative Computed Tomography* (Tomographie quantitative)
QUS	*Quantitative UltraSonography* (Ultrasonographie quantitative)
RANKL	*Receptor Activator of TNF-κ B Ligand* (Récepteur d'activation du ligand TNF-κ)
SA/V	Surface apparente par volume
SPA	*Simple Photon Absorptiometry* (Absorptiométrie à photon simple)
SXA	*Simple X-ray Absorptiometry* (Absorptiométrie à rayons X simple)
TGFß	*Transforming Growth Factor Beta* (Facteur de transformation de croissance)
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor alpha* (Facteur de nécrose tumorale)
TRANCE	*TNF-Related Activation-induced Cytokine* (Cytokine activée indirectement par le TNF)
UTHSCSA	University of Texas Heath Science Center in San Antoniou

État de la situation et objectifs

L'allongement de membres peut parfois offrir une alternative à une condition de vie limitée par une malformation osseuse ou une perte osseuse. Le succès de cette technique repose sur le principe biologique selon lequel les tissus osseux et mous peuvent se régénérer lorsqu'ils sont soumis à une traction mécanique. Cette technique nécessite cependant l'utilisation d'un fixateur porté tout au long du traitement. Il s'agit d'un traitement long, complexe, inconfortable et non sans complications. Pour contrer ces désavantages, il importe de réduire la durée d'utilisation du fixateur. A cette fin, les chercheurs étudient depuis plus de 50 ans les mécanismes biologiques derrière cette technique. Leurs résultats suggèrent qu'une accélération du processus de consolidation soit possiblement le seul moyen de parvenir à une réduction importante du temps du traitement.

Par ailleurs, l'implication des facteurs de croissance dans le développement de l'os et la guérison osseuse, de même que la découverte du pouvoir ostéoprogéniteur des cellules de la moëlle osseuse, fournissent une solution tangible à explorer. Notre hypothèse de travail repose donc sur l'utilisation de facteurs de croissance pour améliorer la consolidation osseuse de membres allongés, le tout visant à réduire la période d'utilisation du fixateur, voire même éliminer un grand nombre de complications inhérentes au processus d'allongement. Cette hypothèse soulève plusieurs questions. Tout d'abord, il faut identifier le type de facteur(s) ostéoinducteur(s) à introduire, de même que la dose et la fréquence à laquelle ces facteurs seront introduits. Il est également important de déterminer à quel moment du traitement ces protéines devront être introduites, et d'identifier la méthode d'introduction dans le site ciblé.

Certaines réponses ont été trouvées à partir des études biochimiques et histologiques du processus d'allongement. En fait, il semblerait que le processus d'allongement est similaire à la guérison osseuse d'une fracture jusqu'au moment de la séparation des

fragments osseux (Ilizarov, 1989). Les contraintes mécaniques ensuite imposées semblent induire l'expression de plusieurs facteurs de croissance, ce qui accélère la régénération osseuse. L'expression de ces facteurs diminue cependant par la suite lorsque les contraintes imposées disparaissent, une fois l'allongement terminé (Mehrara *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 1999; Rauch *et al.*, 2000a,b). Ainsi, l'introduction de facteurs de croissance pourrait être bénéfique lors de la consolidation (Tay *et al.*, 1998).

Le *transforming growth factor beta 1* (TGF-ß1) est un des facteurs de croissance qui jouent un rôle important lors de l'embryogénèse et de la guérison osseuse. Ses effets sont multiples, parfois même contradictoires, et ne sont pas restreints au système osseux. Vu son rôle encore mal défini dans le système osseux, ses effets chémotactiques et parfois prolifératifs envers les cellules, sa stimulation de la synthèse de la matrice extracellulaire, ainsi que son induction lors de stimulation mécanique, le TGF-ß1 pourrait possiblement être un grand coordonnateur du processus de formation et résorption osseuse. Il pourrait également être un des liens entre la stimulation mécanique et les effets biologiques qui en découlent.

Admettant l'utilisation potentielle du TGF-ß1 pour l'accélération de la consolidation osseuse d'un membre, deux questions demeurent: comment l'introduire et en quelle quantité? En réponse à la première question, la demi-vie du TGF-ß1 est très courte (~2.2 min) (Bonewald *et al.*, 1999). Le TGF-ß1 doit donc être introduit soit par une seule dose élevée–une alternative coûteuse vu le coût des facteurs de croissance-, soit par multiples injections de faibles doses–une alternative moins favorable d'un point de vue clinique-, ou soit par une libération soutenue à partir d'un biomatériau. Pour être pratique, la dernière alternative devrait être la moins invasive possible afin d'éliminer le besoin d'une seconde chirurgie, mais plus particulièrement afin d'affecter au minimum le processus de régénération enclenché dès le début du traitement.

Sous ces conditions, la seule option connue et accessible au début de ce projet était d'injecter le système de libération. Plusieurs biomatériaux, tels les hydrogels, certaines céramiques et le corail, rencontraient nos critères pour un système de libération. Le corail est étudié depuis près de 30 ans et les résultats des recherches ont démontré son potentiel comme substitut osseux dans plusieurs domaines d'application. Au moment d'entreprendre ce projet, les connaissances concernant l'application du corail comme système de libération se limitaient à la capacité du biomatériau à améliorer le processus de régénération osseuse, lorsque celui-ci est introduit en combinaison avec des facteurs de croissance et/ou des cellules ostéoprogénitrices (Boden *et al.*, 1995 & 1997; Gao *et al.*, 1997a; Arnaud *et al.*, 1994 & 1998). Nous avons résumé les connaissances sur le corail sous un premier article intitulé "Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review".

Notre **premier objectif** a donc été de définir les caractéristiques des particules de corail comme système de libération en employant le TGF-ß1. Avec la publication de plusieurs études dans les deux dernières années concernant les propriétés de divers systèmes de libération et le comportement d'adsorption des glycosaminoglycanes par le corail, nous avons été en mesure de mettre en perspective les résultats de nos expériences dans un second article intitulé "Effect of experimental parameters on the *in vitro* release kinetics of transforming growth factor ß1 from coral particles".

Aucune étude n'a été faite dans le passé pour évaluer la faisabilité d'injecter des particules de corail dans un défaut osseux. Pourtant, des particules de corail de taille variant de 300 à 1000 µm avec une substance de cohésion, tels le collagène de type I (Damien *et al.*, 1998; Sciadini *et al.*, 1997; Boden *et al.*, 1997) ou de type IV (Gao *et al.*, 1996), la fibrine (Kania *et al.*, 1998; Arnaud *et al.*, 1994 & 1998), et l'hydroxyéthyl d'amidon (Wikesjö *et al.*, 1998) sont couramment employées pour le comblement de défauts osseux. Sur cette prémisse, notre **second objectif** a été d'évaluer l'efficacité ainsi

que la faisabilité d'injecter une solution de particules de corail dans notre modèle animal d'un tibia allongé de lapins.

Une étude précédente par le groupe du Dr Hamdy avait démontré que l'introduction quotidienne de TGF-ß1 tout au long de l'allongement et de la consolidation osseuse n'accélérait pas la formation osseuse mais semblait plutôt enfreindre le processus en affectant les propriétés mécaniques du tibia allongé de lapins après trois semaines de consolidation (Rauch *et al.*, 2000b). Sachant également que le facteur de croissance est exprimé au-dessus de son niveau basal lors de l'allongement (Rauch *et al.*, 2000b), notre **troisième objectif** était de vérifier l'effet du TGF-ß1 exogène sur la consolidation osseuse lorsqu'il est introduit à la fin de l'allongement. A cette fin, trois doses de TGF-ß1 furent employées afin de cibler une quantité capable d'accélérer le processus de consolidation de tibias allongés de lapins. Cette étude avait pour but de servir de référence pour comparer l'efficacité du système de libération corail-TGFß1. Nos résultats nous amènent à un questionnement sur la validité d'entreprendre ce dernier volet du projet.

Ce mémoire est organisé sous forme d'articles. Une revue des connaissances et des particularités de la technique d'allongement des os est présentée au chapitre 1. De plus, l'implication des facteurs de croissance dans ce processus, dont en particulier le TGF-ß1, est discuté dans ce chapitre. Le chapitre 2 présente les propriétés du corail et ses applications dans un article de revue intitulé "Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review". La méthodologie de toutes les expériences est condensée dans le chapitre 3. L'article intitulé "Effect of experimental parameters on the *in vitro* release kinetics of transforming growth factor ß1 from coral particles" fait le sujet du chapitre 4. Les résultats des expériences *in vivo* sur l'effet du système d'injection à base de particules de corail sur la consolidation des tibias allongés de lapins, de même que l'identification d'une dose de TGF-ß1 capable d'accélérer le processus de consolidation osseuse sont présentés aux chapitres 5 et 6, respectivement. La rétrospective de

l'ensemble de nos résultats est présentée dans la discussion (chapitre 7), où leur pertinence y est analysée. A la lumière de ce survol, nous présentons au chapitre 8 des recommandations pour la direction future du projet ainsi que nos conclusions sur l'applicabilité du corail comme système de libération de facteurs de croissance pour accélérer la régénération osseuse.

CHAPITRE 1. État de l'art sur l'allongement des os et le rôle des facteurs de croissance

Ce chapitre concerne la problématique clinique derrière la technique de l'allongement des os, de même que le rôle qui a été dernièrement associé aux facteurs de croissance, dont le *transforming growth factor ß1* (TGF-ß1), dans ce processus. Le chapitre est structuré de façon à présenter dans une première section le principe derrière cette technique médicale, les facteurs qui l'influencent ainsi que le rôle que les facteurs de croissance exercent. Sous une deuxième section, nous avons élaboré sur les fonctions connues du TGF-ß1 dans le système osseux.

1.1 Allongement des os par la méthode d'ostéogenèse par distraction

Cette section vise à dresser un bilan des connaissances sur le processus d'allongement des os, en mettant une emphase sur le mécanisme de formation osseuse par la technique de distraction des membres. Nous présenterons les limites de cette technique telle qu'appliquée aujourd'hui afin de bien justifier et situer notre projet.

La première correction d'une inégalité osseuse par allongement fut reportée en 1905 par un italien du nom de Codivilla. La technique reposait sur l'allongement d'un membre par une séparation aiguë des segments osseux coupés (Aronson, 1997). Plus de 35 ans s'écoulèrent avant qu'Ilizarov introduise le concept d'ostéogenèse par distraction. La technique était similaire à celle de Codivilla à l'exception que la formation d'os entre les deux surfaces osseuses était réalisée par une séparation graduelle. Aujourd'hui, les fixateurs Ilizarov sont employés non seulement pour l'allongement simple ou simultané à plusieurs sites osseux d'un membre, mais aussi pour la correction de malformations osseuses, telles l'angulation et la rotation.

De nos jours, il existe deux approches pour l'allongement des os: la méthode de Wagner et la méthode la plus courante, la méthode Ilizarov d'ostéogenèse par distraction (Coleman et Scott, 1991). Cette dernière méthode, employée dans notre projet, repose sur l'utilisation d'un taux de distraction lent (~ 1 mm/jour) ainsi que d'une approche peu invasive, en employant un fixateur externe (Figure 1.1).

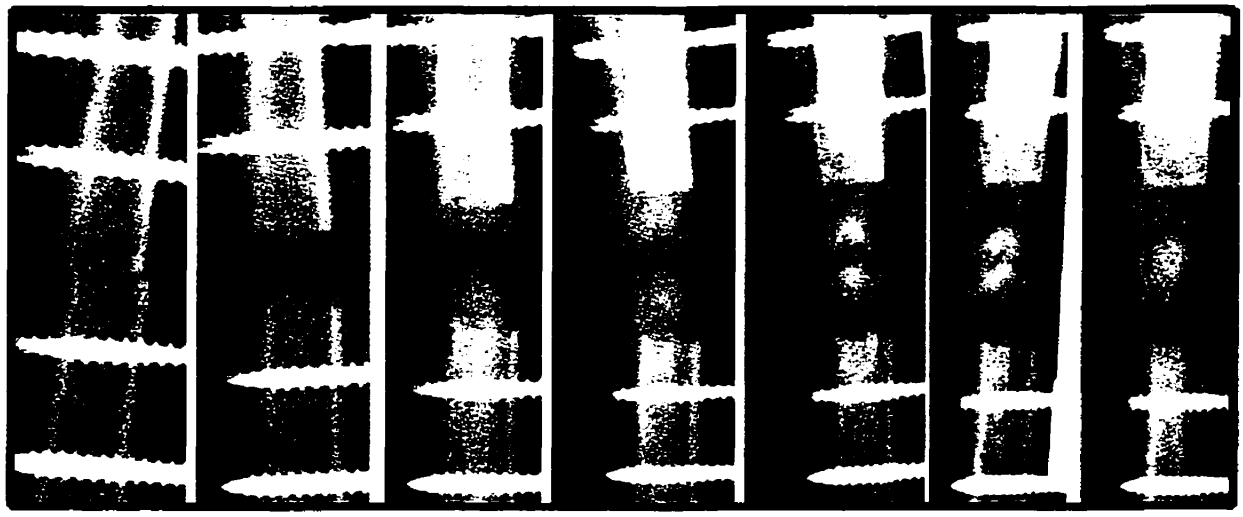

Figure 1.1. Allongement par la méthode d'ostéogenèse par distraction. Radiographies du tibia d'un lapin une semaine après la chirurgie jusqu'à 7 semaines post-opératoires.

1.1.1 Étiologie

Les inégalités des membres de plus de 3 à 5 cm sont généralement corrigées par un allongement osseux (Hill et Tucker, 1997; Simpson *et al.*, 1996; Aronson, 1997). Ces inégalités peuvent être causées par différents problèmes médicaux, tels des problèmes de sources congénitale, vasculaire, et neurologique, des infections, des traumatismes et des tumeurs ou dysplasies osseuses. Chez les enfants, il s'ensuit très souvent un endommagement de la plaque de croissance qui produit un arrêt temporaire ou permanent de la croissance du membre affecté (Hill et Tucker, 1997).

1.1.2 Principe de l'allongement par distraction des os

La méthode d'allongement par distraction est généralement divisée en trois phases: la phase de latence, la phase de distraction et la phase de consolidation.

Phase de latence

La phase de latence est simplement une période d'attente de 3 à 10 jours suivant la segmentation de l'os (ostéotomie). Un temps de plus de 10 jours peut parfois résulter en une consolidation de l'os avant le début de la distraction. La présence de cette phase, introduite par Abbott en 1927, semble améliorer la formation osseuse en permettant au mécanisme de guérison osseuse de débuter, dont en particulier le rétablissement de la circulation sanguine entre les segments osseux (White et Kenwright, 1991). La période de temps attribuée à cette phase varie selon le site de l'ostéotomie et la vitesse de régénération osseuse qui est variable selon l'âge, l'espèce et le type d'os (Aronson, 1997).

Phase de distraction

La durée de la phase de distraction varie selon le taux et la fréquence de distraction. Un taux de distraction trop lent (généralement 0.5 mm/jour ou moins) résulte en une consolidation prématurée. Un taux de distraction trop rapide (généralement supérieur à 1 mm/jour) cause la rupture des vaisseaux sanguins établis entre les segments osseux et compromet une formation osseuse adéquate pour la consolidation du membre allongé (Yasui *et al.*, 1993; Ilizarov, 1989). Selon Ilizarov (1989), l'emploi d'une fréquence de distraction élevée (60 fois/jour) est préférable car elle semble reproduire les contraintes ressenties lors du processus naturel de la croissance osseuse. En pratique, l'allongement est effectué à un taux de 1 mm/jour et ce, réparti en quatre fois (Hill et Tucker, 1997). Afin de réduire le traumatisme aux tissus mous environnants, plus particulièrement les

nerfs et les muscles, l'allongement total lors d'un traitement est généralement limité à 10-15% de la longueur initiale du membre (Aaron et Eilert, 1996; Simpson *et al.*, 1996; Aronson, 1997). Même si des allongements de 20% à même 48% de la longueur initiale ont été accomplis avec succès (Aaron et Eilert, 1996), des études ont démontré que ces taux causent des dommages au niveau du cartilage, des nerfs et des veines chez les animaux. Ces dommages se traduiraient souvent chez les humains en des réductions dans la liberté des mouvements (Stanitski, 1994; Ippolito *et al.*, 1994).

Phase de consolidation

La durée de la période de consolidation suivant la distraction est très variable. Le fixateur est généralement conservé en place jusqu'à ce qu'il y ait fusion des segments osseux et que le membre soit en mesure de subir les contraintes physiologiques. L'évaluation clinique de la consolidation osseuse repose sur l'expérience du médecin, l'observation des radiographies et la mesure de la densité minérale osseuse par des techniques non-invasives, tels le DEXA et la QCT (Derbyshire et Simpson, 1992; Markel *et al.*, 1990; Hamdy *et al.*, 1995). L'enlèvement trop rapide du système de fixation peut résulter en une fracture ou une déformation du membre. D'un autre côté, la conservation du fixateur pour une période de temps trop longue peut résulter en un remodelage osseux inadéquat. Le membre allongé est donc incapable de supporter les charges physiologiques lorsque le fixateur est enfin enlevé (Chao *et al.*, 1989).

L'index de guérison est un outil employé pour indiquer la durée totale du traitement et donc de l'utilisation du fixateur par centimètre allongé. Il sert de référence pour le temps où le fixateur est en général enlevé. Les enfants ont un index de guérison d'environ un mois par centimètre allongé tandis que les adultes, ayant un processus de régénération osseux plus lent, prennent plutôt 2 à 3 mois par centimètre allongé (Aronson, 1997). La période de consolidation peut donc s'étendre sur plusieurs mois à même plus d'un an. Le système de fixation joue donc un rôle primordial dans le processus d'allongement des os.

1.1.3 Rôle des fixateurs dans l'allongement des os

Le type de fixateur externe utilisé pour la méthode d'ostéogenèse par distraction semble plutôt dépendre de la correction à effectuer et de la préférence du chirurgien, selon son expertise. Le système de fixation est critique dans la technique de l'allongement des os non seulement par sa fonction principale de permettre la distraction des segments osseux, mais aussi pour son rôle dans la stabilité du membre et la répartition des charges mécaniques avec l'os (Behrens, 1989; Ilizarov, 1989). Ainsi, il existe le fixateur Ilizarov qui implique l'introduction de plusieurs petites tiges dans l'os et l'utilisation d'anneaux circulaires autour de l'os auxquelles les tiges sont fixées, permettant l'ajustement de la tension dans les tiges [Figure 1.2 (a)]. Similaire à celui d'Ilizarov, le fixateur de Monticelli-Spinelli est considéré plus rigide et plus facile à employer que le fixateur d'Ilizarov (Coleman et Scott, 1991). Ces fixateurs circulaires sont en mesure de répartir les contraintes mécaniques de façon concentrique autour du site d'ostéogenèse, permettant ainsi une formation osseuse symétrique avec les colonnes d'os se prolongeant de façon verticale et parallèle une à l'autre, entre les deux segments osseux (Ilizarov, 1989; Chao *et al.*, 1989). Un troisième système d'allongement est le système de fixation DeBastiani commercialement connu sous le nom d'Orthofix [Figure 1.2 (b)]. Ce fixateur est unilatéral et nécessite l'insertion de plus grosses tiges dans l'os, mais seulement une par site (Coleman et Scott, 1991). Les fixateurs unilatéraux sont capables d'induire un volume de nouvel os comparable aux fixateurs circulaires, mais répartissent les contraintes de façon excentrique, résultant ainsi en la formation de colonnes osseuses sous un angle (Aronson *et al.*, 1989).

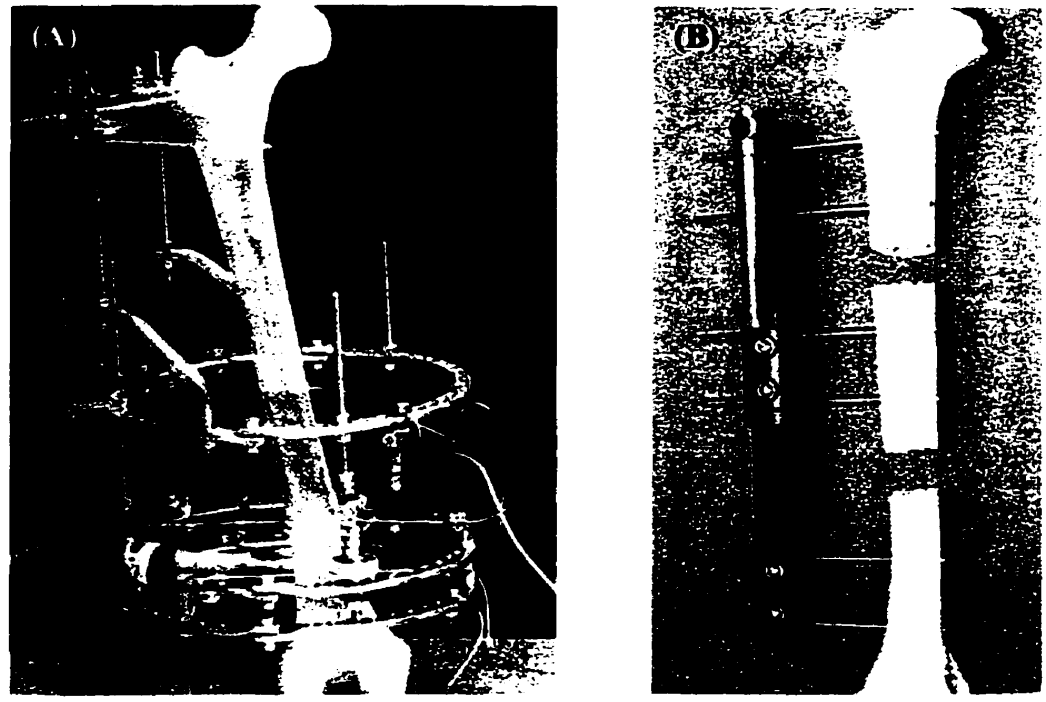

Figure 1.2. Fixateurs employés lors de l'allongement des os par distraction. Le fixateur d'Ilizarov (A) est composé de multiples anneaux et tiges minces (Younger *et al.*, 1994), tandis que l'Orthofix (B) est un fixateur unilatéral avec moins de tiges étant d'un diamètre plus large (Marsh *et al.*, 1994).

1.1.4 Processus biologiques de régénération osseuse lors de l'ostéogenèse par distraction

Les études biochimiques, histologiques et immunohistochimiques faites chez les animaux ont permis de dresser un schéma assez détaillé du processus biologique lors de l'ostéogenèse par distraction. Le type d'ossification est souvent un mélange d'ossification de type endochondriale, retrouvée lors de la guérison de fracture, et de type membranaire, c'est-à-dire la formation d'os directe à partir des tissus fibreux sans passage intermédiaire par la formation de cartilage. Il semblerait que le type d'ossification dépende non

seulement de la rigidité du fixateur mais aussi de l'espèce animale. Les études démontrent que le processus a tendance à être principalement de type membranaire chez la brebis et l'humain. Par contre, une ossification de type endochondriale et membranaire semble être plus fréquemment observée chez le lapin, le rat, et de façon moindre chez la souris et le chien (Li *et al.*, 1999; Kojimoto *et al.*, 1988; Hamdy *et al.*, 1997; Lascombes *et al.*, 1991).

Phase de latence

Durant la phase de latence, le processus biologique est typique d'une réaction à un traumatisme comme lors d'une fracture. Ainsi, un hématome composé surtout de globules rouges, de fibrines et de plaquettes, se forme entre les fragments osseux. Les plaquettes sont particulièrement importantes car elles produisent des facteurs de croissance, comme le TGF-ß1, essentiels pour leur action régulatrice de l'activité cellulaire et leur capacité d'attirer d'autres types de cellules au site du traumatisme. Les ARN messagers de d'autres facteurs de croissance, tels ceux des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) 2, 4 et 6, et du *growth and differentiation factor* (GDF) 5, ont été détectés 4 jours suivant l'ostéotomie dans le cal osseux de fémur de rats (Sato *et al.*, 1999). L'expression des BMPs 2, 4 et 7 a aussi été détectée dans le cal osseux avant la distraction du tibia de lapins (Rauch *et al.*, 2000a).

Quelques jours (3-5) après une fracture, on observe en général la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans l'hématome ainsi que la formation d'un tissu conjonctif formé de fibroblastes. Le cal sert de protection aux vaisseaux sanguins et aide à stabiliser les deux fragments osseux (Hollinger et Wong, 1996). C'est durant la formation du cal qu'il est préférable de débuter la distraction, avant qu'il y ait consolidation des segments osseux par le cal.

Phase de distraction

Lors de la distraction, on observe en général trois zones distinctes dans le site sous allongement. Au centre du site, il existe une zone de tissu fibreux qui augmente en longueur lorsque la vitesse de distraction est augmentée (Li *et al.*, 1997; Tay *et al.*, 1998). Tay *et al.* (1998) ont démontré que les cellules de cette zone ne sont pas encore différenciées en ostéoblastes.

Les zones étroites sous-jacentes de part et d'autre de la zone fibreuse, constituent les sites de minéralisation. Ces zones sont caractérisées par un réseau de fibres de collagène, principalement de type I, déposées sur la matrice de fibronectine et orientées longitudinalement dans l'axe de distraction (Kallio *et al.*, 1995; Tay *et al.*, 1998). Les fibres de collagène servent de tuteurs pour la minéralisation de la matrice extracellulaire des cellules par les ostéoblastes (Li *et al.*, 1997; Aronson *et al.*, 1989; Lascombes *et al.*, 1991). Ce sont dans ces zones qu'on retrouve le plus haut taux de prolifération cellulaire (Welch *et al.*, 1998). Plusieurs observations suggèrent que les contraintes mécaniques exercées par la distraction stimulent les ostéoblastes à produire des facteurs mitogènes, comme le TGF-ß1, qui à leur tour induiraient dans un cycle perpétuel la prolifération des cellules et la synthèse de la matrice extracellulaire (Waanders *et al.*, 1998; Holbein *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997; Lammens *et al.*, 1998). En général, l'expression des BMPs, de l'*insulin-like growth factor* (IGF) 1 et du TGF-ß1 augmente pendant la distraction et diminue à leur taux basal peu de temps après la fin de l'allongement (Rauch *et al.*, 2000a,b; Sato *et al.*, 1999). Ces facteurs sont observés principalement dans la zone fibreuse et dans le cal osseux.

La dernière zone relie la zone de minéralisation et la surface de chaque segment osseux. Elle est constituée d'os nouveau minéralisé et d'os lamellaire, deux types d'os dont la minéralisation se produit différemment (Hollinger et Wong, 1996; Li *et al.*, 1997). Cette zone semble raccourcir lorsque la vitesse de distraction est augmentée (Li *et al.*, 1997).

Ainsi, puisque le taux de minéralisation est indépendant du taux de distraction, une distraction trop rapide peut causer une non-union.

Phase de consolidation

Lors de la phase de consolidation, le tissu osseux devient mature, la zone centrale de tissu fibreux commence à s'ossifier et le remodelage osseux se poursuit dans la région centrale de l'os trabéculaire afin d'établir la cavité médullaire et de redéfinir le cortex (Li *et al.*, 1997; Tay *et al.*, 1998; Ilizarov 1989; Lascombes *et al.*, 1991). Le remodelage osseux peut s'étendre sur plusieurs mois et même plus d'un an selon l'espèce (Moro Robledo *et al.*, 1998; Lascombes *et al.*, 1991; Tajana *et al.*, 1989).

1.1.5 Complications

Le processus d'allongement des os est une technique longue, complexe et coûteuse, qui requiert la coopération non seulement du patient mais aussi de sa famille, et ce en particulier pour le traitement des enfants. Il n'est donc pas surprenant que cette technique soit sujet à plusieurs complications. Leurs sources sont variables et dépendent de l'expérience du chirurgien, du type de fixateur et du patient lui-même. Les complications les plus courantes surviennent suite à l'ostéotomie et au positionnement des tiges du fixateur dans les tissus (blessures aux tissus), à l'échec mécanique ou matériel du fixateur ainsi qu'à la friction générée entre la tige et les tissus environnants. La tableau 1.1 résume les principales complications rencontrées lors de l'allongement d'un os et de sa consolidation.

Une étude par Dahl *et al.* (1994) a démontré que leur taux moyen de complications majeures – complications dont les séquelles persistent et nécessitent une autre chirurgie ou un traitement prolongé - a diminué de plus de 40% après avoir effectué trente allongements, et donc après avoir acquis suffisamment d'expérience. Les complications

temporaires les plus courantes semblent être principalement des oedèmes, des infections au site où les tiges du fixateur pénètrent les tissus, et la réduction du mouvement de l'articulation (Velazquez *et al.*, 1993). Les difficultés à évaluer la consolidation osseuse pour enlever le fixateur augmentent les chances de fracture ou de déformation osseuse suite à un enlèvement précoce du fixateur (Walsh *et al.*, 1994; Aronson, 1997). Enfin, une préparation inadéquate du patient, le manque de support émotif lors du traitement ainsi que la douleur au site des tiges de fixation peuvent causer des difficultés de comportement et même des problèmes psychologiques (anxiété et dépression) (Ghoneem *et al.*, 1996; Ramaker *et al.*, 2000; Naudie *et al.*, 1998).

Tableau 1.1. Résumé des complications survenant pendant ou après l'allongement des os

Complications pendant l'allongement
Contraction des muscles
Subluxation ou dislocation de l'articulation
Fibrose de l'articulation ou dommage au cartilage
Déviation axiale de l'os
Blessures neurologiques
Blessures vasculaires (dommage directe à la veine, thrombose, hypertension, oedème, embolie pulmonaire)
Consolidation prématurée, retardée, ou incomplète
Inflammation ou infection
Douleur et difficulté à dormir
Problèmes psychologiques
Complications après l'allongement
Fracture
Rigidité de l'articulation
Perte de la longueur allongé ou allongement inadéquat

1.1.6 Effet de suppléments sur la consolidation du site allongé

Connaissant l'effet bénéfique de certains facteurs de croissance et des cellules dérivées de la moëlle osseuse sur le processus de guérison osseuse, certains chercheurs ont étudié dernièrement l'effet de ces suppléments sur la formation osseuse, suivant leur introduction pendant et/ou après la distraction. Les études et leurs résultats sont résumés sous forme d'un tableau dans l'annexe 1 afin d'alléger le texte.

En résumé, la plupart des études ont démontré une accélération de la formation osseuse et/ou du remodelage osseux, voire même une amélioration des propriétés mécaniques, permettant ainsi de réduire la période d'utilisation du fixateur (Yamane *et al.*, 1999; Raschke *et al.*, 1999). Les expériences sont cependant limitées à des modèles animaux de petite taille (rat, lapin, mini-porc).

L'étude du groupe du Dr Hamdy n'a pas démontré l'effet bénéfique du TGF-ß1 sur la consolidation d'un tibia allongé de lapins suite à l'introduction de TGF-ß1 par une mini-pompe osmotique pendant l'allongement et la consolidation (Rauch *et al.*, 2000b). L'observation des cals osseux et la tendance des résultats chez le groupe avec la pompe libérant une solution sans TGF-ß1 suggèrent que la présence de la pompe aurait pu être néfaste. De plus, la position du tube au niveau du cal osseux aurait pu réduire la quantité de TGF-ß1 introduite dans le site de l'allongement.

Enfin une étude récente avec le TGF-ß2, injecté lors d'un transport osseux du radius de chiens pour combler un défaut osseux, a démontré que le TGF-ß2 retardait la formation d'un régénérat stable et uni (Sciadini *et al.*, 2000). Ces résultats sont difficiles à extrapoler à notre étude puisque le TGF-ß2 exerce certaines fonctions différentes de celles du TGF-ß1 et n'est pas régulé de façon similaire (Sandberg *et al.*, 1993; Centrella *et al.*, 1995). De plus, la technique d'allongement par transport osseux est différente de celle par distraction.

1.2 *Transforming Growth Factor-ß1*

Cette section présente un résumé des connaissances sur le facteur de croissance TGF-ß1. Tout en ayant une approche générale, nous avons tenté de mettre en relief ses fonctions connues ainsi que son importance potentielle lors des processus de guérison osseuse comme lors de l'allongement des os.

Le TGF-ß1 fait partie de la superfamille des *transforming growth factor beta* avec les isoformes TGF-ß2 à TGF-ß5, les *bone morphogenetic proteins* (BMPs), les activines, les inhibines, le *Mullerian duct inhibitory substance*, le *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) et les *growth and differentiation factors* (GDFs) (Bostrom et Asnis, 1998; Demers et Hamdy, 1999). Plusieurs des membres de cette famille, dont le TGF-ß1 et certaines BMPs, sont reconnus pour le rôle important qu'ils exercent au niveau du développement, de la réparation et du remodelage osseux.

1.2.1 Biologie du TGF-ß1

Le gène codant pour le TGF-ß1 a été localisé sur le chromosome humain 19 en position q13 (Roberts, 1998). Le TGF-ß1 est synthétisé sous forme de précurseur de 390 acides aminés (a.a.) (Miyazono *et al.*, 1993) dont la région C-terminale (112 a.a.) renferme la partie biologiquement active de la molécule. La région N-terminale du précurseur contient le *latency associated peptide* (LAP). Ce peptide joue un rôle dans la dimérisation et le repliement du monomère TGF-ß1 mature ainsi que pour sa sécrétion (Wrana, 1998; Miyazono *et al.*, 1993).

Le TGF-ß1 actif est constitué de deux homodimères peptidiques de 12.5 kDa liés par un lien disulphure. Sa structure tridimensionelle rappelle deux mains orientées de façon opposée, dont chacune serait allongée avec le bout des doigts légèrement pliés pour créer une région hydrophobe (Griffith *et al.*, 1996; Bonewald, 1999; Demers et Hamdy, 1999).

De plus, on retrouve une région "convexe" et une région "concave" qui sont critiques à l'activité biologique du TGF-ß1 (Scheufler *et al.*, 1999).

Plusieurs cellules sécrètent le TGF-ß1, non seulement sous forme inactive mais également avec un autre complexe peptidique nommé *latent TGF-ß binding protein* (LTBP). Tout comme le LAF, le LTBP joue un rôle dans la distribution, la disponibilité et l'activité du TGF-ß1 (Roberts, 1998; Miyazono *et al.*, 1993, Bonewald, 1999). L'activation du TGF-ß1 est possible par l'entremise de plusieurs molécules *in vivo* comme l'intégrine $\alpha v \beta 6$, certaines enzymes protéolytiques, la thrombospondine, les protéines sérines de cellules tumorales et des espèces d'oxygène réactif (de Visser et Kast, 1999; Miyazono *et al.*, 1993; Bonewald, 1999; Haüfel *et al.*, 1999). Le TGF-ß1 peut également être activé par un micro environnement acide créé par les ostéoclastes résorbant l'os.

Le TGF-ß1 exerce ses actions en se liant à des récepteurs membranaires de la famille des récepteurs kinases sérine/thréonine, communément appelés les récepteurs TGFß de type I et II (Demers et Hamdy, 1999). Une fois activé, le récepteur de type I peut activer à son tour plusieurs cascades biologiques qui affectent ultimement les mécanismes nucléaires des cellules (Visser et Themmen, 1998).

1.2.2 Fonctions du TGF-ß1

Le TGF-ß1 joue principalement deux rôles. Il joue un rôle important dans la régulation de plusieurs fonctions de diverses cellules tel que leur migration, leur prolifération, leur différenciation et leur synthèse de la matrice extracellulaire environnante. Il est également impliqué au niveau du système immunitaire d'un organisme.

1.2.2.1 Effets sur les fonctions cellulaires

1.2.2.1.1 Migration cellulaire

Considéré un facteur chémotactique pour plusieurs cellules, le TGF-ß1 stimule la migration des cellules vers un endroit spécifique, contrairement au mouvement aléatoire habituel de cellules. Les fibroblastes, les cellules du système immunitaire (monocytes et macrophages), les cellules mésenchymateuses isolées d'embryon de poussin (stage 24), et les cellules exprimant les caractéristiques d'ostéoblastes, sont toutes affectées par le TGF-ß1 (Lucas, 1989; Roberts et Sporn, 1993; Centrella *et al.*, 1991; Zhuang *et al.*, 1997). Son effet serait possiblement indirect (Hanazawa *et al.*, 1991).

1.2.2.1.2 Prolifération et différenciation cellulaire

Le TGF-ß1 est généralement considéré comme un inhibiteur de la croissance cellulaire. Cependant une compilation non-exhaustive de plusieurs études démontre que l'effet du TGF-ß1 est très variable et semble dépendre de l'espèce et du type de cellule, de la densité cellulaire, du stage de différenciation cellulaire, de la concentration de TGF-ß1 présent, et *in vitro* de la présence d'autres facteurs de croissance (Bostrom et Asnis, 1998; Shibanuma *et al.*, 1991). Ainsi de façon générale, le TGF-ß1 semble inhiber la croissance de la plupart des cellules épithéliales, lymphoïdes (cellules B et T du système immunitaire) et hématopoïétiques (Vodovotz et Bogdan, 1994; Roberts et Sporn, 1993; Sporn *et al.*, 1987; Shibanuma *et al.*, 1991; Keller *et al.*, 1992). Par contre, on y retrouve un effet biphasique du TGF-ß1 sur les cellules à caractère ostéoblastique ou ostéoclastique; il cause une augmentation de la synthèse d'ADN à faibles concentrations tandis que des concentrations plus élevées bloquent l'activité mitogénique de ces cellules (Centrella *et al.*, 1991 & 1995).

Les cellules se différencient afin d'accomplir des fonctions particulières. Le TGF-ß1 induit la différenciation de certaines cellules. Par exemple, les cellules souches se différencient en cellules du cartilage en présence de TGF-ß1 (Miura *et al.*, 1994). Par contre, le processus de différenciation et de maturation de cellules comme les cellules cytotoxiques T, les lymphocytes B, les chondrocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes, est ralenti ou bloqué en présence de TGF-ß1 (Suzuki, 1992; Laitinen *et al.*, 1999; Kimoto *et al.*, 1999; Gazit *et al.*, 1999; Roberts et Sporn, 1993). Plus particulièrement, les études *in vitro* démontrent que les marqueurs de différenciation des ostéoblastes (phosphatase alcaline, collagène de type I et ostéonectine) sont généralement exprimés davantage en présence de TGF-ß1, mais la différenciation des ostéoblastes, une étape indispensable pour la minéralisation de la matrice de collagène, est retardée en présence du TGF-ß1 (Bostrom et Asnis, 1998; Centrella *et al.*, 1991).

1.2.2.1.3 Matrice extracellulaire

Le TGF-ß1 est un facteur de croissance à effet pléiotropique qui exerce son influence sur l'expression d'ARN messagers et sur la synthèse de plusieurs cytokines et facteurs de croissance, de certaines enzymes, ainsi que sur d'autres facteurs de la matrice extracellulaire. Son influence sur ces médiateurs lui permet de jouer un rôle souvent indirect dans plusieurs fonctions, telle la régénération osseuse. Les gènes du *tumor necrosis factor*-α (TNF-α), de l'*interleukine 1ß* (IL-1ß), du *platelet derived growth factor* (PDGF-A et B) ainsi que du *basic fibroblast growth factor* (bFGF), qui jouent un rôle central au niveau de l'inflammation, l'angiogenèse et la fibrogenèse, sont transcrits davantage en présence de TGF-ß1 dans plusieurs types de cellules (Zhuang *et al.*, 1997; McCartney-Francis *et al.*, 1990).

L'ostéoprotégérine (OPG), une cytokine de la superfamille des récepteurs de TNF qui inhibe l'activité de résorption des ostéoclastes, est induite par le TGF-ß1 tandis que le TRANCE/RANKL (*TNF-related activation-induced cytokine /receptor activator of TNF-κ B ligand*), qui stimule l'ostéoclastogenèse et inactive l'OPG, est inhibé par le TGF-ß1 (Takai *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 1998).

Le TGF-ß1 stimule également la production de la fibronectine et de l'ostéopontine, des protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire, du collagène de type I, de l'ostéonectine, une protéine impliquée dans la déposition du collagène de type I et dans la transition du cartilage à l'os, ainsi que la sialoprotéine osseuse (BSP), une protéine impliquée dans la minéralisation initiale de l'os (Rodeblo *et al.*, 1998; Zhuang *et al.*, 1997; Centrella *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1993; Ballock *et al.*, 1997; Ogata *et al.*, 1997; Galéra *et al.*, 1992; Bonewald, 1999; Bostrom et Asnis, 1998). Par contre, la production d'ostéocalcine, une protéine impliquée dans la régulation de la calcification de la matrice extracellulaire, est inhibée par le TGF-ß1 (Staal *et al.*, 1998; Ogata *et al.*, 1997; Centrella *et al.*, 1991).

Les enzymes sous le contrôle partiel du TGF-ß1 sont des enzymes impliquées dans la synthèse ou la dégradation de la matrice extracellulaire. L'ecto-nucléotide-triphosphate pyrophosphatase, une enzyme nécessaire à la minéralisation, est activée en présence de TGF-ß1 tandis que l'expression de l'alkaline phosphatase, impliquée dans le remodelage osseux, est inhibée (Zhuang *et al.*, 1997; Centrella *et al.*, 1995;Zhou *et al.*, 1993; Suzuki, 1992).

1.2.2.2 Effets sur le système osseux

Un survol des effets du TGF-ß1 dans le système osseux démontre que le TGF-ß1 sécrété par les plaquettes sanguines lors d'une fracture stimule la formation d'os par son action chémotactique envers plusieurs cellules impliquées dans la guérison osseuse ainsi que par

sa stimulation de la synthèse de plusieurs protéines impliquées dans la formation de la matrice extracellulaire (Ogata *et al.*, 1997; Centrella *et al.*, 1991; Bostrom et Asnis, 1998; Galéra et al., 1992). Le TGF-ß1 permet aussi l'initiation de la calcification dans les tissus en réparation mais inhibe les processus comme tel de minéralisation et de remodelage (Ogata *et al.*, 1997; Centrella *et al.*, 1991; Bostrom et Asnis, 1998). Il semble inhiber les transitions de développement des cellules impliquées dans la régénération osseuse à des étapes particulières de leur différenciation (Centrella *et al.*, 1991). De plus, le TGF-ß1 relâché lors de la résorption de la matrice par les ostéoclastes, peut inhiber les ostéoclastes, et par ce fait, semble permettre une autorégulation indirecte de sa propre expression. Certains pensent donc que le TGF-ß1 sert de facteur de couplage du processus de résorption osseuse avec le processus de formation osseuse (Sporn *et al.*, 1987).

1.2.2.3 Effets sur le système immunitaire

Le TGF-ß1 est un immunosuppresseur très puissant. Des études ont démontré que des souris génétiquement modifiées pour éliminer le gène codant pour le TGF-ß1 (*TGF-ß1 gene knockout mice*) meurent deux à trois semaines après leur naissance, en raison d'une inflammation globale. Le TGF-ß1 semble donc jouer un rôle anti-inflammatoire essentiel au maintien du fonctionnement normal du système immunitaire (de Visser et Kast, 1999; Vodovotz et Bogdan, 1994).

1.2.3 Expression du TGF-ß1 lors de la guérison et du remodelage osseux

Plusieurs cellules et organes entreposent et/ou produisent le TGF-ß1. Les plaquettes contiennent la plus haute concentration de TGF-ß1 tandis que les os retiennent la plus grande quantité de TGF-ß1 (450 ng/g d'os) (Roberts et Sporn, 1993; Ogata *et al.*, 1997; Bonewald et Dallas, 1994; Bonewald, 1999). Plus particulièrement, les cellules osseuses (ostéocytes, ostéoblastes et ostéoclastes), les chondrocytes, les lymphocytes,

macrophages et neutrophiles activés, les cellules épithéliales, les cémentoblastes, les cellules mésenchymateuses, et les tumeurs et lignées cellulaires tumorales produisent du TGF-ß1 (de Visser et Kast, 1999; Zhou *et al.*, 1993; Miura *et al.*, 1994; Bostrom et Asnis, 1998; Staal *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1998).

En plus d'être exprimé par plusieurs cellules, le TGF-ß1 est retrouvé dans des régions spécifiques au cours du développement de l'os et du cartilage, ainsi que lors de la guérison osseuse suivant une fracture ou une distraction osseuse. De façon générale, l'ARN messager TGF-ß1 semble principalement exprimé dans les ostéoblastes actifs et les chondrocytes non différenciés, ainsi que dans les régions d'ossification plutôt endochondriale que membranaire (Horner *et al.*, 1998; Dodds *et al.*, 1994; Andrew *et al.*, 1993; Si *et al.*, 1997; Bostrom et Asnis, 1998).

Chez un humain, le TGF-ß1 est localisé très tôt après une fracture dans l'hématome près du périoste et des tissus fibreux en périphérie du site fracturé (Bostrom et Asnis, 1998; Steinbrech *et al.*, 2000). Ceci correspond aux régions de prolifération périostéale et plus tard, de formation osseuse membranaire (Bostrom et Asnis, 1998; Farhadieh *et al.*, 1999). Plus tard lors de la guérison osseuse, le TGF-ß1 est localisé dans les ostéoblastes près de cristaux osseux, dans les cellules mésenchymateuses et les chondrocytes matures dans les régions d'ossification endochondriale (Bostrom et Asnis, 1998). Au niveau extracellulaire, le TGF-ß1 est localisé près des chondrocytes matures dans les régions d'ossification endochondriale. Vers la fin de la guérison osseuse, seuls les ostéoblastes actifs le long de la matrice osseuse et environ la moitié des ostéoclastes expriment le TGF-ß1 (Bostrom et Asnis, 1998).

Les études sur la distraction par ostéogenèse ont démontré que l'expression du TGF-ß1 est similaire à celle observée lors de la guérison osseuse d'une fracture. Il subsiste deux différences. Une surexpression (*upregulation*) de TGF-ß1, comparé au niveau basal, est maintenue tout au long de la distraction et ne diminue que lentement lors de la

consolidation osseuse. L'apogée semble avoir lieu dans les jours ou au plus la semaine suivant la fin de la distraction (Mehrara *et al.*, 1999; Rauch *et al.*, 2000b). Les patterns spatio-temporels d'expression et de production du TGF-ß1 semblent coïncider avec la migration, la différenciation et la synthèse de la matrice extracellulaire des ostéoblastes. De plus, les zones de prolifération exprimant le TGF-ß1 ont également été associées à la présence d'ostéoblastes et de fibroblastes dans le cal osseux sous distraction (Eingartner *et al.*, 1999; Gosain *et al.*, 2000).

Enfin contrairement à un os fracturé, le TGF-ß1 a aussi été observé dans les vaisseaux sanguins de la zone allongée d'une mandibule de rat (Mehrara *et al.*, 1999). Le TGF-ß1 est connu pour sa stimulation de nouveaux vaisseaux sanguins *in vivo* et *in vitro* et pour son rôle dans le maintien de l'intégrité vasculaire en stabilisant les membranes des nouveaux vaisseaux sanguins (Mehrara *et al.*, 1999; Steinbrech *et al.*, 2000).

1.2.4 Effets du TGF-ß1 exogène dans le processus de régénération osseuse

Vu le potentiel du TGF-ß1 à améliorer la guérison osseuse, plusieurs études ont été entreprises sur divers modèles animaux afin de déterminer l'effet du TGF-ß1 exogène. La dose et le moment de son introduction dans l'os sont critiques pour améliorer le processus de régénération osseuse propre à chaque modèle animal (annexe 2).

Le TGF-ß1 ne semble être ostéoinducteur que dans les sites extrasquelettiques des babouins (Ripamonti *et al.*, 1997). La plupart des résultats des autres études ont démontré une accélération de la formation osseuse en présence de TGF-ß1. L'introduction de TGF-ß1 dans un modèle de fracture osseuse, contrairement à un modèle de défaut osseux, ne semble pas être bénéfique. Certaines études rapportent une augmentation des dimensions du cal osseux, suggérant que le TGF-ß1 affecte en partie la prolifération cellulaire. Enfin, la variabilité dans les résultats pourrait simplement dépendre d'où le facteur de croissance

est introduit pendant la régénération osseuse, de la méthode d'injection (injection seule versus une libération contrôlée par une mini-pompe osmotique ou une matrice biodégradable), ou encore du moment où l'effet du TGF-ß1 a été évalué.

CHAPITRE 2. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review

Tel que nous l'avons mentionné dans l'introduction, nous avons choisi le corail, un dérivé de l'exosquelette de certains coraux madréporaires, comme matériau de libération du TGF-ß1. Bien que son utilisation depuis les années 1970s ait généré beaucoup d'information sur plusieurs de ses propriétés, son comportement comme système de libération de facteurs de croissance n'a jamais été rapporté. Une étude récente démontre cependant que le corail peut adsorber les glycosaminoglycanes par des interactions électrostatiques entre les sites de calcium du corail et les polyanions des protéoglycanes. La somme des connaissances sur le corail est présentée dans ce chapitre sous forme d'un article intitulé "Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review" qui a été soumis au journal *Bio-medical Materials and Engineering*.

L'exosquelette du corail est en fait un matériau composé de 97-99% de carbonate de calcium. Le type le plus couramment employé est le *Porites*, dont la structure est similaire à l'os trabéculaire. Ces coraux ont été démontrés comme d'excellents substituts osseux. Ils sont biocompatibles, ostéoconducteurs, et biorésorbables, mais non ostéoinducteurs. Leur propriétés mécaniques initiales sont aussi comparables à celles de l'os, mais diminuent en fonction de leur taux de dégradation.

Faciles à façonner dans la forme du défaut à combler, ils sont aussi disponibles sous formes de particules. Les greffons de corail sont stérilisés par rayons gamma ou à la vapeur moyennant des températures en-dessous de 200°C à pression atmosphérique (Irigaray *et al.*, 1993c), sans modification de leur propriétés physicochimiques. La croissance des taux de mortalité et d'infections des coraux marins dans les dernières décennies, suite aux problèmes environnementaux de décoloration (*bleaching*) des coraux, soulève la nécessité d'effectuer un contrôle rigoureux de la stérilité des greffons de corail. La culture du corail en laboratoire pourrait devenir une alternative attrayante.

L'utilisation du corail dans des sites déjà infectés, sans contact avec du tissu osseux ou encore dans des régions à contraintes mécaniques trop élevées par rapport à la porosité du corail, peut générer une réaction inflammatoire. En autres temps, le greffon de corail permet l'attachement, la croissance, la migration et la différenciation des cellules afin d'accélérer ou d'améliorer le processus de formation osseuse dans des applications aussi diverses que les comblements périodontaux et d'os longs, les corrections cranio-maxillo-faciales et les fusions de vertèbres.

NATURAL CORAL EXOSKELETON AS A BONE GRAFT SUBSTITUTE: A REVIEW

Caroline Demers[1], Reggie C. Hamdy[2], Karin Corsi[1], Fatiha Chellat[3], Maryam Tabrizian[4] and L'Hocine Yahia[1]

[1] École Polytechnique, Montréal, Québec, Canada

[2] Shriners Hospital for Children, Montreal Children Hospital Research Institute and Department of Orthopaedics, McGill University, Montréal, Québec, Canada

[3] Notre-Dame Hospital (CHUM) / École Polytechnique, Montréal, Québec, Canada

[4] Department of Biomedical Engineering, McGill University, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author and address for reprint requests:
L'Hocine Yahia
Professor and Director of Biomechanics and Biomaterials Research Group
Department of Mechanical Engineering - École Polytechnique - P.O. Box 6079, Station Centre-ville - Montréal (Québec) Canada, H3C 3A7 - Telephone: (514) 340-4711 ext. 4378 - Fax: (514) 340-4611, (514) 340-5230 - E-mail: yahia@grbb.polymtl.ca

2.1 Abstract

Natural coral graft substitutes are derived from the exoskeleton of marine madreporic corals. Researchers first started evaluating corals as potential bone graft substitutes in the early 1970s in animals and in 1979 in humans. The structure of the commonly used coral, *Porites*, is similar to that of cancellous bone and its initial mechanical properties resemble those of bone. The exoskeleton of these high content calcium carbonate scaffolds has since been shown to be biocompatible, osteoconductive, and biodegradable at variable rates depending on the exoskeleton porosity, the implantation site and the species. Although not osteoinductive or osteogenic, coral grafts act as an adequate carrier for growth factors and allow cell attachment, growth, spreading and differentiation. When applied appropriately and when selected to match the resorption rate with the bone formation rate of the implantation site, natural coral exoskeletons have been found to be impressive bone graft substitutes. The purpose of this article is to review and summarize all the pertinent work that has been published on natural coral as a bone graft including *in vitro*, animal and clinical human studies. Preliminary report of our own experiments as well as our recommendations on the use of coral are also included.

Keywords: coral, biomaterial, bone graft substitute, bioresorbable, and osteoconductive

2.2 Introduction

Material research in the biomedical field has expanded tremendously in the last quarter of the twentieth century, to meet the increasing demands for a satisfactory alternative to autografts. Researchers agree that a number of criteria are required to consider a material as an ideal bone graft substitute. In a practical manner, an adequate bone implant necessitates a porous, osteoconductive structure with a resorption rate that is concomitant with the bone formation process of the implanted site and a mechanical strength that will maintain bone functionality.

A wide range of materials has been extensively studied for their bone applications. Most candidate materials have been synthetically modified to meet the essential requirements of an adequate bone substitute. This is not the case for natural coral. The exoskeleton of some madreporic corals has remarkable similarities to bone. Coral is one of the few materials that has been extensively studied as a bone graft substitute - with close to 30 years of *in vitro*, animal and human research, this material has stood the test of time. Consequently, the aim of this review is to highlight the defining aspects of coral as a bone graft substitute, through an extensive review of the literature.

2.3 Background

Corals are marine invertebrates from the anthozoa class that regroup over 7000 species [1-2], of which more than a third belong to the genus *Madrepora* [3]. Madreporic corals live in colonies of microscopic animals known as polyps. During the day, the polyps edify a centripetal exoskeleton upon which they reside [4]. The edification process is reminiscent of bone formation. In bone, osteoblasts secrete collagen, which forms the framework of bone. The outer layer of coral consists of cells called calicoblasts that secrete aragonite which will calcify and form the coral scaffold with an architecture characteristic to each species [5].

The use of coral as a bone graft substitute dates back to the early 1970s when researchers at the "Institut de Recherches Orthopédiques de Garches" began work on porous biomaterials for the stabilization of non-cemented prosthesis [5-6]. In the United States, researchers were also testing coral as a possible bone graft substitute [7-8]. Because of what they felt were unsatisfactory results of coral instability once exposed to physiological fluids, they developed a hydrothermal exchange process. Simply, this process exchanges the carbonate of coral for phosphate to produce coralline hydroxyapatite, using high temperatures of 250-260°C and pressures of 15 000 psi for 24

to 48 hours [9-10]. Further studies however concluded that although biocompatible and bioactive, this calcium phosphate material becomes brittle when in contact with physiological fluids, therefore lacking the necessary mechanical properties for adequate biofunctionality [6,11]. More importantly, it does not demonstrate a capacity for resorption, which is essential to allow replacement by newly formed bone. American researchers have since adapted the process to achieve partial conversions of *Porites* and *Goniopora* species to produce resorbable coralline hydroxyapatites.

The initial drawbacks with coralline hydroxyapatite led French researchers to adopt natural coral as a bone graft substitute [11-12]. The exoskeleton of the species *Porites*, *Acropora* and *Lobophyllia* were first marketed by INOTEB (Saint-Gonnery, France), as Biocoral® products. Commercialization began in 1987 [13]. In 1979, the first clinical applications of natural coral occurred at the hospital 'R. Poincaré' in Garches (France) in orthopaedic and maxillo-facial trauma surgeries [14]. Nowadays, it is applied as a bone graft substitute in orthopaedic surgery, cranial and maxillo-facial surgery, periodontal and plastic surgery [12,15-19].

2.4 Coral properties

The madreporic corals used for medical applications are limited to a select number of species: *Porites*, *Acropora*, *Lobophyllia*, *Goniopora*, *Polyphyllia* and *Pocillopora*. Areas of harvest include the Caribbean Sea [20], New Caledonia [19], the Red Sea [21], the East Coast of Africa [21-22], the Thailand Sea [23], the coast of Hainan island [24] and the coastline of Australia [21].

2.4.1 Composition

Polyps absorb the calcium ions and carbonic acid present in the seawater to produce aragonite crystals of calcium carbonate, representing 97-99% of the coral exoskeleton.

The remaining balance is made up from various elements, such as oligoelements comprising 0.5 to 1%, magnesium varying from 0.05 to 0.2%, sodium in quantities of 0.4-0.5%, amino acids representing 0.07% and the remainder consisting of traces of potassium (0.02-0.03%), strontium, fluorine and phosphorous in the phosphate form [3,5,13]. The oligoelements found in coral are known to play a critical role in the bone mineralization process and in the activation of enzymatic reactions with osteoid cells. Strontium contributes to the mineralization process and protects calcification [5,13]. Fluorine, present 1.25 to 2.5 times more in coral than in bone, helps bone formation through its effects on osteoblast proliferation [13].

The main differences between natural coral and bone include the organic content and the mineral composition. One third of the total weight in bone is composed of organic components while the coral organic content is limited to 1-1.5%. The mineral composition of bone is mainly hydroxyapatite and amorphous calcium phosphate associated with calcium carbonate while coral is essentially calcium carbonate [11].

Evidently, most of the elements in bone can be found in coral but in a different distribution [12].

2.4.2 Architecture and porosity

Natural coral has a porous structure that offers a substantial surface exchange area. The size and interconnectivity of the coral pores have been shown to be critical factors in the rate of coral resorption and in the role of coral in bone regeneration [3,4,11]. As reported by Chen *et al.* for other biomaterials [25], interconnected porous coral exoskeletons allow bone infiltration to the centrum of the implant while others lacking adequate pore interconnections limit bone formation to the periphery [21,26].

The minimal pore diameter for adequate colonization by connective and osteoid tissue has been determined to be 100 μm, with the ideal diameter between 300 and 400 μm [6,27-28]. However, osteoid cells can colonize pores of 40 μm to 100 μm and fibrous tissue can grow in pores of 5 μm to 15 μm [29]. Pore connections of 100 μm to 200 μm are necessary for the development of Haversian systems and the anastomosis of blood vessels, which are essential for bone nourishment.

Goniopora and *Porites* have an open porosity of 80% and 50% (volumetric) respectively, resembling that of spongy bone where the pores are interconnected longitudinally and transversally (see Table 2.1). This allows for a rapid vascularization as well as the invasion and apposition of newly formed bone. *Acropora* is also characterized by an open, interconnected porous system, but with a lower volumetric porosity (20-30%).

Unlike *Porites, Goniopora* and *Acropora*, the *Polyphyllia* exoskeleton (60% porosity) is not completely interconnected. This closed porosity structure does not allow easy access to cells in the surrounding environment, resulting in longer bone formation and coral resorption. However, such porosity can allow greater volumetric stability as well as a solid anchorage to the adjacent bone [26]. The species *Pocillopora, Favites* and *Lobophyllia* have a compact exterior wall surrounding an area of greater closed porosity that is more closely related to cortical bone [11,19,23].

Tableau 2.1. Physical and mechanical properties of three coral species compared to trabecular and cortical bone [20,30-33]

Mechanical Properties	*Porites*	*Acropora*	*Lobophyllia*		Trabecular bone	Cortical bone
			interior	exterior		
Macroporosity	150 μm	200 μm	500-1000 μm (center)		n.a.	n.a.
Microporosity	5-15 μm	5-20 μm	On the exterior		n.a.	n.a.
Porosity (% volume)	Regular, interconnected open porosity (47-51 %)	Regular, interconnected open porosity (20-30 %)	Irregular porosity with a dense exterior and porous interior (45-60 %)		50-90 %	5-30 %
Constraint to rupture (MPa)	20-31	78-142	6-10	315-365	1-12	150-200
Deformation at rupture (%)	0.22-0.30	0.41-0.65	0.22-0.28	0.45-0.51	*	*
Young's modulus (MPa)	7620-8360	21300-27900	n.a.	n.a.	50-400	17000
Direction of growth	vertical	horizontal (center) to vertical (ends)	horizontal		horizontal	horizontal

* Bone is viscoelastic. n.a. – not available

2.4.3 Mechanical properties

The mechanical properties of any biomaterial before implantation are a function of its material properties (composition, crystallinity, and porosity) and its geometry (size and shape) [34]. In the case of corals, their mechanical properties are mainly influenced by the direction of growth of the polyps and the porosity of their skeleton [20]. Chamberlain has shown that corals have better mechanical properties in the direction of their growth, but that overall, corals growing vertically as opposed to horizontally have better resistance to mechanical strains (see Table 2.1) [20].

Although the more commonly used coral implants in the biomedical field (mainly *Porites* and *Acropora*) have initial mechanical properties similar or superior to cancellous bone, their behaviour under compression differs as it is a linearly elastic material [20].

Once a biomaterial is implanted *in vivo*, it must fulfill the functional loading requirements. Many biomaterials have been found to be deficient in this aspect, thus explaining the use of fixation devices until union of the graft-host bone interface occurs. Since commonly used *Porites* are porous and biodegradable and are mainly used as particles, evaluation of the mechanical properties after implantation is very difficult. Most studies report significant improvement of the mechanical properties of the limbs after implantation of coral [35-36].

Vuola *et al.* were able to show that rectangular specimens of *Porites* implanted subcutaneously in rats with bone marrow maintained a compressive strength comparable to cancellous bone for up to 6 weeks after implantation, before attaining too high a degradation level for mechanical testing [32]. Good bone ingrowth and newly formed bone porosity were also observed with these coral implants.

Mechanical integrity can be maintained if an appropriate rate of coral resorption is matched to the bone formation rate of each implant site. In fact, coral degrades at different rates depending on the animal species, the site of implantation and the tissues present. Implantation of a coral graft without prior knowledge of its resorption behaviour can result in particularly disappointing results, especially for implantation sites where mechanical loads are present.

2.4.4 Osteoconduction

The 3-D structure, as well as the porosity, the pore interconnections and the composition of commonly used natural coral confer its osteoconductive capacity and make it suitable for hard tissue regeneration.

The osteoconductive capacity of porous coral allows cell attachment and growth through the scaffold of the material, characteristic of a good support for cells [37-40]. The initial invasion of coral by blood and bone marrow cells with subsequent vascularization is a determinant factor for bone regeneration and represents a primordial step during this complex process [19].

Not only osseous cells but cells from other tissues have been observed to colonize coral grafts (Table 2.2). It is still questionable however if bone forms in direct contact with the coral exoskeleton which then resorbs, or if coral resorption is followed by bone deposition. Some researchers tend towards the latter [58] but further studies should be performed to answer this issue.

Tableau 2.2. Experimental studies on animals demonstrating the biocompatibility and osteoconductivity of coral.

Experimental model	Coral Implant	Results	References
Cranial-Maxillo-Facial Studies			
Ovine alveolar defects	*Porites* fragments	Colonization; resorption and new bone by 6 months	[3]
Sealing of root canals in cats	Powder and propyrene-glycol	Bone formation	[41]
Rabbit mandibular defects	*Porites* implants	Successful coral implantation and bone repair	[24]
Sheep nasal and mandibular defects	*Polyphyllia* implants (2x1x0.5 cm)	5% fibrous colonization but no bone; no infection	[21,42]
Cranial defects in guinea pigs	*Porites* blocs	Bone maturation and remodelling at 60 and 90 days	[43]
Palatal connective tissue of miniature pigs	*Porites* particles (300-450 μm and 630-1000 μm)	No coral replacement with bone after 6 months	[44]

Table 2.2. Experimental studies on animals demonstrating the biocompatibility and osteoconductivity of coral (continuation).

Experimental model	Coral Implant	Results	References
Rabbit cortical calvarial defects	Blocs (2 mm thick)	Bone ingrowth (2 weeks) and remodelling (12 weeks)	[45]
Rabbit circular cranial defects	Particles	Bone present only in center of defect (37%) after 12 weeks although complete coral resorption	[46]
Dog cortical mandibular defects	*Favites* fragments	Replacement of coral by new bone after 6-8 months	[47]
Critical-sized rat calvarial defects	*Porites* discs (8x0.5 mm) or particles (300-450 μm)	More bone formation with coral than empty controls	[48]
Sinus augmentations in goats	*Porites* particles (630-1000 μm)	No bone formation; no inflammatory reaction	[49]

Table 2.2. Experimental studies on animals demonstrating the biocompatibility and osteoconductivity of coral (continuation).

Experimental model	Coral Implant	Results	References
Orthopaedic Studies			
Cortical and transcortical bone defects in dog femurs and cubitus	*Porites* and *Favites* fragments	Coral replaced by centripetal bone formation	[11,15]
Cortical bone defect in dog femur and ulna	*Goniopora* (femur) and *Porites* (ulna) fragments	Replacement of coral with woven bone in ulna defects at 8 weeks and in femoral defects at 6 weeks	[19]
Critical-sized transcortical bone defects in dog femur	*Favites* and *Lobophyllia* blocs	Union by 12 months	[19]
Femoral and tibial circular defects in pigs and sheeps	*Acropora* and *Porites* cylinders (8x10 mm)	Similar bone formation with or without *Porites*; less bone formation with *Acropora*	[22]

Table 2.2. Experimental studies on animals demonstrating the biocompatibility and osteoconductivity of coral (continuation).

Experimental model	Coral Implant	Results	References
Bone marrow of rat femoral bone	*Porites* cylinders (2x4 mm)	Coral fragments left in newly formed lamellar bone matrix while controls almost consolidated	[50]
Sheep femur and posterior iliac crest	*Goniopora* cylinders (5x 18 mm)	Bone ingrowth and coral resorption after 3 months; complete bone regeneration at 12 months	[21,42]
Posterolateral sheep spinal fusion	*Porites* blocs (15x5x4 mm)	Replacement of coral with bone by 3 months	[36]
Rabbit femoral condyle defects	*Porites*, *Montastrea* and *Dichocoenia* blocs (2x1x1 cm)	Bone formation at 8 weeks in presence of *Porites*; only adipose and hematopoietic tissues with *Dichocoenia*	[51]
Spinal fusion in dogs	*Acropora* cubes (6x6x6 mm)	Biomechanical properties lower than with autogenous bone grafts and fixation	[52]
Rat femoral defects	*Porites* cylinders (1.5x6 mm)	Significant bone apposition and growth in implants from 7-28 days; high osteoblastic collagen synthesis	[53]

Table 2.2. Experimental studies on animals demonstrating the biocompatibility and osteoconductivity of coral (continuation).

Experimental model	Coral Implant	Results	References
Rabbit anterior interbody fusion	Blocs	No adverse reaction; new bone close to interface but no osteointegration, unlike autografts at 2 months	[54]
Sheep tibial defect	*Porites* hollow cylinders (15x16 mm)	Bone bridging at 6 weeks; good osteointegration after 12 weeks	[35]
Medullar cavities of rabbit tibia with titanium or bioglass implants	*Porites* particles (630-1000 μm)	Bone formation on surface of granules with bridging in-between at 3 weeks; mild inflammatory reaction	[55]
Rabbit osteochondral knee defect	*Porites* plugs	Replacement of coral by bone after 6 months; subchondral bone plate continuous with tidemark	[56]
Sheep vertebral resections (5x15 mm)	*Porites* particles (1.6-1.8 mm)	More bone mineralization and bone surface area with coral after 2-4 months; coral still present	[57]

2.4.5 Osteoinduction

Research has clearly demonstrated coral to be only an osteoconductive and not an osteoinductive material [56,59-60]. Coral particles with collagen lyophilized into discs implanted in a rat subcutaneous model were partially resorbed after 4 weeks, but without any bone or cartilage formation [61]. Similarly, coral implanted in rat muscle tissue [60] and coral particles implanted in the palatal connective tissue of miniature pigs [44] were found to lack bone inducing capacity.

2.4.6 Osteogenesis

The osteogenic capacity of bone marrow cells has been reported by many authors with several materials used as scaffolds [62]. Fricain *et al.* found *Porites* blocks to act *in vitro* as a scaffold for the attachment, growth, spreading and differentiation of human bone marrow cells [37]. Similarly, osteogenesis was induced by bone marrow in *Porites* grafts implanted in rat muscle [59]. The addition of bone marrow cells (10^8) on *Porites* cylinders improved the biointegration and progressive substitution of the material by bone, in the treatment of induced large ulna defects in rabbits [63]. Surprisingly, *Porites* particles (630-1000 μm) implanted with bone marrow cells ($2x10^7$) in rat critical-sized calvarial defects did not increase significantly bone formation compared to coral alone after 2 months [64]. This observation may be explained by the fact that bone remodelling may have occurred in both cases after this length of time, masking the possible effect of the addition of bone marrow cells to coral. Coral resorption was found in general to increase significantly in the presence of bone marrow cells.

2.4.7 Coral resorption

Better understanding of the coral resorption process *in vivo* has been achieved through numerous studies. Both physical and cellular mechanisms are involved in the degradation of the coral scaffold.

The rate of coral resorption varies significantly depending on the porosity [21], the chemical composition, the crystallinity [65] and the size of the coral graft, as well as the site of implantation and the animal species. Table 2.3 presents a summary of the coral resorption rate per species, implantation site and coral implant type. Clearly, the animal models employed so far are not representative of the slower coral resorption observed in humans.

2.4.7.1 Physical process

The current accepted mechanism for coral resorption begins by an initial dissolution of the coral elements in the surrounding fluid. This phenomenon was confirmed by Irigaray *et al.* and Braye *et al.* using neutron activation and radioactive studies on implanted corals in various animal models [74-76]. They found strontium, an element essential in stabilizing the aragonite structure of coral, to decrease in the implant over time. This was accompanied by a similar decrease of calcium in the implants.

Following the initial dissolution phase, the appearance of a calcium phosphate layer occurs on coral [58,65,77]. Damien *et al.* found the calcium phosphate to be composed of three layers: a dense inner coral layer changing to a lower coral density area and finally to a crystal-like structure region of calcium phosphate [65].

Contrary to the belief of many, Irigaray *et al.* have shown that only 5% of calcium 45 released by the dissolution of the radioactively labelled coral is found 5 months after

implantation in the newly formed bone replacing the coral in ovine femurs [75]. Most of the calcium 45 was found to integrate the blood stream and follow normal calcium metabolism. The calcium phosphate of new bone does not appear to be predominantly formed from the dissolved calcium of coral grafts.

The crystallinity and mineral composition of coral during the resorption and concomitant bone regeneration processes have been reported to change from an orthorhombic aragonite structure to gradual increases of apatite over a five-month period in sheep mandibles [75,78]. The initial high levels of calcium carbonate creates poorly crystallized apatite and in some cases, nonapatitic phases such as brushite [58,74,78]. The process eventually ends with the appearance of only apatite crystallized in the hexagonal system characteristic of bone [78].

2.4.7.2 Cellular process

The presence of the calcium phosphate layer at the surface of coral appears to attract multinucleated giant cells such as osteoclast-like cells. Cellular resorption of coral is believed to be initially driven by these cells.

The exact role of osteoclasts in coral resorption is still under debate. Fricain *et al.* concluded from cell morphology observations of TEM micrographs and cell tartrate-resistant acid phosphatase activity, that osteoclasts were not the main cells involved in the cellular process [79]. However, other studies contradict this conclusion. Osteoclasts resorb a matrix partly through the action of their carbonic anhydrase enzyme, which converts carbonate to carbon dioxide and hydrogen ions. Animals implanted with coral and tested with acetazolamide, a carbonic anhydrase inhibitor, had almost all femoral non-unions (9/10) after 18 months compared to complete unions with coral alone [19]. Coral resorption was also reduced in the presence of acetazolamide. In addition, increased coral resorption rates have been observed when coral and certain bone proteins

such as BMP-2 are present together [80-84]. (BMP-2 is a growth factor recently shown to play a role in osteoclast formation and activity [85-87].) These observations appear to substantiate the role of osteoclasts in coral resorption. Finally, the acid environment created by osteoclasts is suggested to further induce dissolution of coral [15].

Macrophages have also been observed at the surface of coral [80,88]. These cells have been shown *in vitro* to contribute to coral dissolution [89]. In general, the size, concentration and composition of particles have been shown to play a role in macrophage stimulation [90-91]. Some researchers have also suggested that internalization of particles is not required and that cell membrane-particle interactions are capable of inducing macrophage response [92].

Ohgushi *et al.* suggest that the physical transformation of the coral surface is also necessary for the apposition of osteoblasts and/or the differentiation of osteoprogenitor cells into osteogenic cells [93]. Many histology studies have reported on the presence of active osteoblasts in direct contact with coral [50,53,59,93].

Tableau 2.3. Resorption rates of various corals depending on the site of implantation and the species.

Species	Implantation site	Coral Implant	Coral resorption rate
Rats	Cranium	*Porites* particles and discs (8 mm) [48]	Partial resorption; at periphery only for discs (28 days)
	Femur	*Porites* cylinder (2x4 mm) [50]	Almost complete after 2 months
Guinea pigs	Cranium	*Porites* blocs [43]	Complete by 30 days
Rabbits	Knee	*Porites* plugs [56]	Complete by 6 months
	Femoral condyle	*Porites*, *Montastrea* and *Dichocoenia* blocs (2x1x1 cm) [51]	After 20 weeks, complete resorption for *Porites*, partial for *Montastrea* and none for *Dichocoenia*
	Tibial medullar cavity	*Porites* particles [54]	Complete by 12 weeks
Dogs	Mandible and femur	*Favites* fragments [47]	Complete by 6-8 months
	Spine	*Acropora* blocs (6x6x6 mm) [52]	Almost complete resorption (fixation) and little (no fixation) after 8 weeks
Pigs	Femur and tibia	*Acropora* cylinders (8x10 mm) [22]	Partial (64%) after 2 months
		Porites cylinders [22]	Almost complete (99%) after 2 months
Lambs	Tooth socket	*Porites* fragments [3]	Complete by 6 months

Table 2.3. Resorption rates of various corals depending on the site of implantation and the species (continuation).

Species	Implantation site	Coral Implant	Coral resorption rate
Sheeps	Nose and mandible	*Polyphyllia* blocs (2x1x0.5 cm) [21,42]	None after 12 months
	Vertebra	*Porites* particles [57]	Almost complete by 4 months
	Spine	*Porites* blocs (15x5x4 mm) [36]	Complete by 3 months
	Femur and tibia	*Acropora* cylinders (8x10 mm) [22]	Partial (56%) after 2 months
		Porites cylinders [22]	Almost complete (90%) after 2 months
	Tibia	*Porites* hollow cylinders (15x16 mm) [35]	Partial after 16 weeks
Humans	Tooth socket	*Porites* particles (500-1000 μm) [66]	Almost complete after 8 to 10 months
		Porites particles (300-450 μm) [67]	Partial after 18 months
	Cranium	*Porites* corks (9-11 mm) [68]	Complete after 1 year
		Porites blocs (10x20x50/60 mm) [17,68]	Partial (40-50%) after ≥1 year
	Face	*Acropora* particles [69]	5/54 implants with resorption after 1 to 3 years

Table 2.3. Resorption rates of various corals depending on the site of implantation and the species (continuation).

Species	Implantation site	Coral Implant	Coral resorption rate
Humans	Spinal fusion	*Lobophyllia* implants [16]	Almost complete after 1 year (children)
		Blocs [14]	Partial after 18-24 months (adults)
		Blocs [70]	Little resorption in 80% of implants (>2 years, adults)
		Acropora (97%) and *Porites* (3%) blocs [33]	Partial after 6 years; slower with *Acropora*
	Iliac bone	*Porites* wedge-shaped blocs (30x30x12 to 4 mm) [71]	Partial after 1.6 to 2.3 years
	Tibial fractures	*Porites* blocs (20x10x10 or 15x5x5 mm) [72]	Mostly peripheral resorption after 28 months
		Porites blocs (20x10x10 mm) [73]	3/5 with ≥ 50% resorption and 2/5 with 30-50% resorption after more than 2 years (children)
	Tibial osteotomies	*Lobophyllia* corners (3-12 mm high) [2]	None after 32 months on average
		Porites corners [2]	Lysis of coral and some resorption (1 to 6 years)
	Calcaneus fractures	*Porites* blocs (20x10x10 or 15x5x5 mm) [72]	Mostly little resorption after 12 to 28 months

2.4.8 Coral as a drug delivery system

Many studies have shown coral to act as an appropriate carrier for osteoinductive proteins. In fact, experiments on animal models have shown increased osteogenesis when using appropriate osteoinductive proteins, such as bone morphogenetic proteins (Table 2.4). In cases where results were compared to coral alone [61,80, 82-84,94,96,98-99] or even to the gold standard (i.e. autograft) [82-83], more newly formed bone and/or better mechanical properties were reported.

Delivery of coral and of the osteoinductive proteins have been accomplished most often with the use of either fibrin-based [57,66,94,97,100], type I collagen [61,81-84,96] or type IV collagen [80,94] solutions. When collagen is used, the coral-osteoinductive protein-collagen mixture is lyophilized to form specific implant shapes. The fibrin sealants (i.e. pooled plasma, generally human) are used for their biological properties of adhesiveness and solidify as polymerization occurs between fibrin and thrombin [100].

Two studies have also employed mixtures of hydroxyethyl starch with [98] or without gelatin [99]. The product allows formation of a paste to easily fill defects with coral particles.

Preliminary data from our laboratory using minimally invasive techniques showed that small coral particles in a gelatin solution can be injected in the lengthened tibia of a rabbit, provided a sufficiently large syringe diameter is used to prevent pressure build-up. Furthermore, we found that injected coral particles were well retained at the site of injection in the lengthened zone one week after the injection (as shown in Figure 2.1).

Although some authors have previously combined osteoinductive proteins to coral to evaluate the effects on various animal models, we were unable to find any detailed studies on the use of coral as an interactive matrix for the adsorption and release of drugs

in vitro and *in vivo*. Only one author has recently studied the adsorption behaviour of glycosaminoglycans upon coral. Volpi found that the adsorption of glycosaminoglycans on coral was mainly dependent upon their charge density, with the content of sulphate groups more important for adsorption than the carboxyl groups. The adsorption also increased with decreasing pH and was blocked in the presence of high amounts of sodium chloride salts [101]. As was shown previously with tricalcium phosphate and TGF-$ß_1$ [102], mainly electrostatic interactions appear to be involved in the adsorption of the glycosaminoglycans on coral, by way of the calcium ions.

Our preliminary *in vitro* studies have shown that TGF-$ß_1$ can be adsorbed on coral particles. Our results also indicate that TGF-$ß_1$ can subsequently be released from coral particles over a period of two weeks or more, depending on different conditions [103-104]. These findings further attest to the potential usefulness of coral as a delivery system.

Tableau 2.4. Summary of the osteoinductive properties of coral when combined to growth factors.

Animal model and Coral implant	Growth factor	Observations compared to coral alone	References
Subcutaneous rat model; *Porites* particles (630-710 μm) & 1% collagen lyophilized into discs	Bovine BP	Mineralization after 4 weeks	[61]
Rabbit calvarial defects; particles (500 μm) & fibrin glue	rhTGF-$ß_1$	More bone area and bone growth between particles	[94]
Rabbit spinal fusion; *Porites* particles (630-1000 μm) & 3% collagen lyophilized into blocs (12x30x2.5 mm)	Bovine BP	Fusion with coral and 300, 1000 μg BP (5 weeks)	[82-83]
Mouse muscle model; *Porites* discs (4x2 mm) & type IV collagen	rhTGF-$ß_1$	Ca^{45} uptake in tissues around muscle (10-20 days)	[95]
Sheep tibial defects; hollow cylinders (15x16 mm) & type IV collagen	Moose BP	Increased callus size but lower torsion properties after 3 and 6 weeks	[80]
Dog radial defects; *Porites* particles (630-1000 μm) & type I collagen lyophilized into cylinders (2.5x 1.5 cm)	Bovine BP	Improvement of mechanical properties and radiographic union after 12 and 24 weeks	[96]

Table 2.4. Summary of the osteoinductive properties of coral when combined to growth factors (continuation).

Animal model and Coral implant	Growth factor	Observations compared to coral alone	References
Human cranial-maxillo-facial defects; particles (500 μm) or blocs with fibrin glue	rhTGF-$ß_1$	Bone formation after 6 months [case study of one patient]	[97]
Dog critical-sized periodontal defects; *Porites* particles (630-1000 μm) & hydroxyethyl starch & gelatin	rhTGF-$ß_1$	Small significant differences in defect height decrease, area and density of regenerated bone	[98]
Rat critical-sized mandibular defects; *Porites* particles (630-1000 μm) & hydroxyethyl starch	rhTGF-$ß_1$	Increased bone bridging with 0.4 μg rhTGF-$ß_1$ after 24 days; increase of bone formation with increasing rhTGF-$ß_1$ at 12 weeks	[99]
Rabbit calvarial defects (12 mm); *Porites* particles (630-1000 μm) with/without hydroxyethyl starch	rhTGF-$ß_1$	Complete bone bridging (28 days) but 53.5% with coral and 43.9% with coral & hydroxyethyl starch	[99]

BP – Bone Protein; rhTGF-$ß_1$ – recombinant human Transforming Growth Factor-beta 1

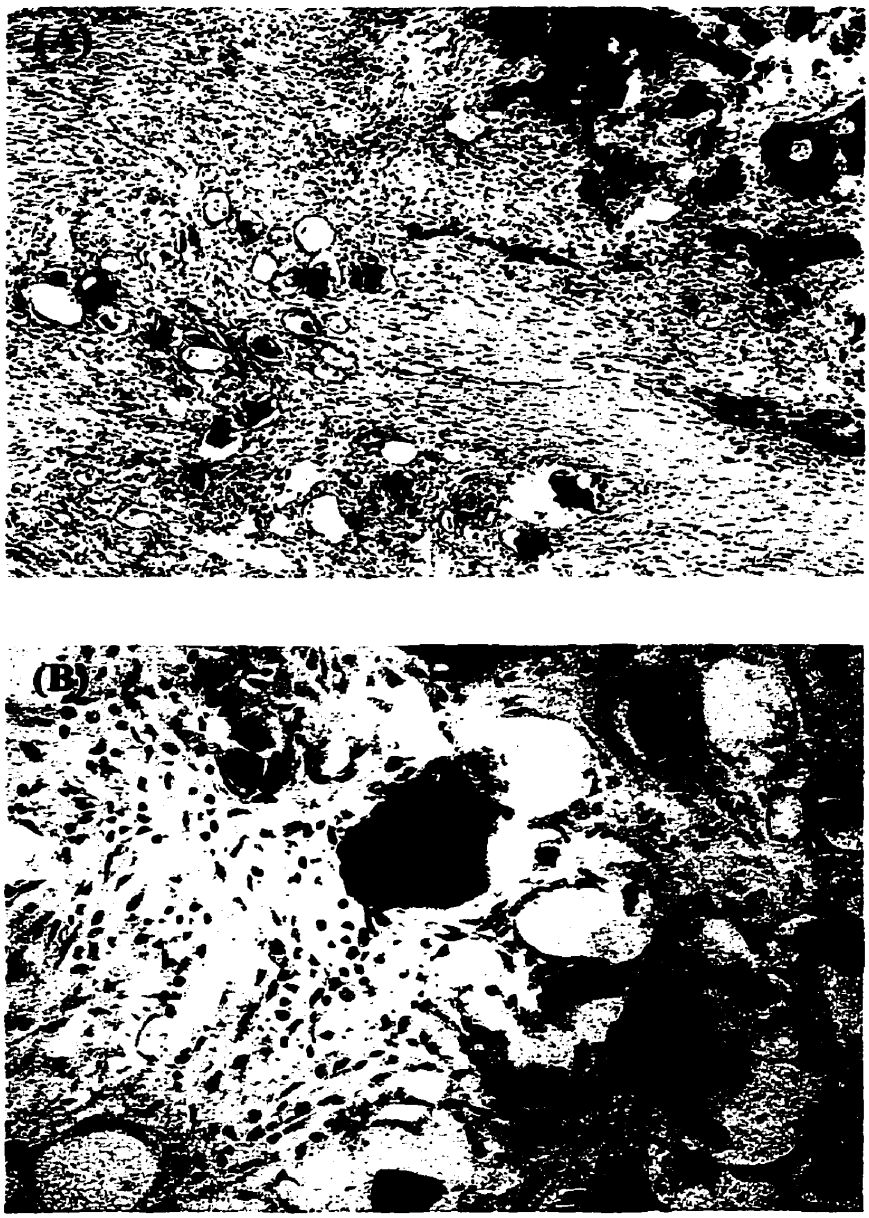

Figure 2.1. Histologic sections of a lengthened rabbit tibia 1 week after the injection of coral particles. (Coral was injected at the end of distraction.) The arrows in Figure 1A show the coral particles. Figure 1B is a magnification of coral particles. (Stain, hematoxylin and eosin; magnifications, (A) 4x and (B) 20x).

2.5 Biocompatibility

Many studies have been reported on coral biocompatibility *in vitro* and *in vivo*. Rat calvarial bone cells [105] and human bone marrow cells [37] cultured in the presence of coral from various sources have been shown to attach, spread, proliferate and differentiate on the coral surface. Studies in the group of D.J. Wilson [106-107] with human osteoblasts on coral attest of a similar degree of coral cytocompatibility and biocompatibility, eventhough cell proliferation is slower at lower initial cell seeding densities (1.25×10^4 vs. 2.5×10^4 cells/cm^2) than with demineralized bone scaffolds. Other studies have shown *in vitro* that coral also supports the growth of fibroblasts, macrophages and chondrocytes [38-39,89].

In vivo studies of coral implanted in rat subcutaneous tissue [60,74,93], pig palatal connective tissue [44], alveolar defects and a variety of bony applications in a number of animal species have shown cell colonization without immunologic or important inflammatory reactions (see Table 2.2). The results also reported on human clinical studies, in some cases after more than 5 years also confirm the biocompatibility of coral when adequately applied.

2.6 Quality Control

Before coral can be used as a bone graft substitute, it must undergo a rigorous process to control its quality from the harvest, to the manufacturing and then to its final applications. Various studies can be performed to ensure that, within the limits of detection, no foreign entities are incorporated and that the biomaterial is of the highest quality. These studies include optical, radiographic, chromatographic, spectrophotometric and biocompatibility analyses [22].

Coral exoskeletons have been sterilized in the past mainly by steam or gamma rays and in certain cases by ethylene oxide gas. Prior to sterilization, specimens are often cleaned of their organic constituents by immersing them in a 5% solution of sodium hypochlorite for 30 minutes then drying at about 90°C and/or using ultrasound treatment [23,108].

Sterilization by steam is accomplished by treating the specimens for 20 minutes at 121°C [22,66] or 60 minutes at 131°C [17,19]. X-ray diffraction analyses performed by Irigaray *et al.*, to test the effects of sterilization by steam on coral exoskeleton, have shown that heating *Acropora* species up to 200°C at atmospheric pressure does not cause any detectable transformation of the coral crystal structure [109]. The transformation of aragonite to calcite begins at 271-293°C, while the aragonite-calcite transition phase occurs around 300°C and complete conversion of aragonite to calcite can take place after 30 minutes at 400°C and atmospheric pressure. Calcite has been tested *in vitro* by Fricain *et al.* [37]. They found coral-derived calcite to be cytocompatible but showed less [^{3}H]-thymidine incorporation than natural coral, possibly due to lower cell attachment to the calcite substrate.

A 2.5 Mrad dose is normally used for sterilization by gamma radiation [6,65,68].

Some researchers [21,80,95] have reported sterilization of coral by ethylene oxide, in one case specifying a 4-hour process with an 8-hour evaporation period [80,95]. No studies have however been found by the authors on the possible effects of ethylene oxide gas on the coral structure and crystallinity.

J.-L. Patat *et al.* also recommend soaking coral grafts for 30 minutes in an antibiotic solution prior to implantation to prevent contamination during surgery [14].

The need for appropriate quality control in coral is gaining much more importance with the recent emergence of diseases affecting marine animals [110]. In fact, coral bleaching

has been reported more frequently in the past few decades, leading to its mortality and increasing its susceptibility to opportunistic infections [111]. Further studies are essential to determine the exact relation between the bleaching and the occurrence of disease, as well as the role that the pollution from human activities has to play. Nonetheless, the increase in diseases affecting corals reinforces the need for stringent quality control.

2.7 Clinical applications

Over the past 10 years, coral has been used as a bone graft substitute to treat a wide range of bone-related problems in humans. The applications tested include spinal fusion, fracture repair due to trauma, replacement of harvested iliac bone and treated bone tumors, and filling of bone defects mainly in periodontal and cranial-maxillo-facial areas. All these applications have been extensively tested in various animal models. A non-exhaustive list of the applications of coral in humans with results from follow-ups after a few months to in some cases up to 6-8 years is compiled in Table 2.5.

Overall, reported results appear satisfactory with infection rates ranging from 0 to 11%, which is comparable to the levels obtained when autologous bone is employed for treatment. As for any bone graft substitute, some specific rules have to be followed when using coral implants. These rules include (1) the protection of the coral architecture during handling and shaping; (2) the need for the coral graft to be in intimate contact on all sides with bone tissue or at least have a high surface area in contact with bone tissue; (3) the stability of the graft in the implant site; (4) the positioning of the coral in a viable and aseptic area: away from sites of infections treated with solutions destroying the coral architecture or preventing cell invasion, away from synovial liquid in cases of dura-mater breach, away from zones other than extra-articular, and away from devascularized sites where osseous necrosis can occur [13,33,121]. It is evident from the results reported in the literature that deviation from these rules causes complications and results in higher infection rates.

A number of recommendations have been reported as knowledge of coral handling and applications have grown over the years. From clinical studies by De Peretti *et al.* and De La Caffinière *et al.*, the use of coral to treat fractures of the calcaneus requires great expertise in the handling of coral as infection rates between 38% and 75%, respectively, were reported [72-73]. The calcaneus sustains high levels of mechanical load and this appears to cause faster resorption of the coral implant and/or its loosening with subsequent appearance of higher incidences of aseptic serous fluid. Unless another type of coral exoskeleton than *Porites* is used, coral application in the calcaneus site is not recommended.

A recent study by Vuola *et al.* tested the use of coral blocks as graft replacements for harvested iliac bone [71]. Although some bone formation was formed as opposed to none in the empty control group, the amounts observed after a mean follow-up time of 2.2 years were considered insufficient for this application. In this situation, osteoinductive proteins are also required for acceleration of the bone regeneration process.

Studies of cervical interbody fusion in humans have retrospectively shown that use of coral grafts with lower porosity such as *Acropora* is preferable, since compression of the graft can result after some time in a decrease in the corrected height [33,70]. The use of a fixation device also helps reduce the constraints exerted on coral grafts implanted in this area [33,70].

Since Issahakian *et al.*, all researchers have successfully used *Porites* particles of mainly 300 to 450 microns instead of blocs to treat alveolar bone defects in the maxilla and mandible area [6,67,114,119,122-123]. They often use a membrane to retain the particles at the site of implantation. One group also successfully used the highly porous species *Goniopora* to fill mandibular defects [26].

Coral has been applied to treat cranial-maxillo-facial defects. Most studies report the use of blocs of coral to treat these defects, except for some facial reconstruction where the high facial contours makes shaping of coral blocs difficult. The studies by Papacharalambous and Anastasoff, and Santache underline the importance of maintaining the coral particles tightly in the implant site, to prevent migration of the particles into other tissues and thus result in infection or loss of the initial corrections applied [23,124]. In the case of cranial applications, especially in the area of the cranial base bone, the importance of finding a coral implant with a lower resorption rate (i.e. lower porosity) is necessary since high-porosity *Porites* resorbs faster than the very slow rate of bone formation in that region. This results in migration and splitting of the *Porites* blocs, and loss of the cranial floor integrity [68].

Two other possible applications of coral have been tested experimentally. The first one consists of filling the medullar space of long bones with coral particles around prosthetic implants to allow better bone ingrowth. Turunen *et al.* found that bony ingrowth around titanium implants in rabbit tibiae decreased once coral resorption began, while an implant made of a more osteoconductive material like bioactive glass was able to continue guiding bony ingrowth in the medullar space around the implant [55].

In another experimental model, coral was used to repair cartilage. Loss or damage of cartilage in humans is generally due to osteoarthritis, osteochondritis dissecans and trauma. Shahgaldi performed implantations of *Porites* coral plugs into the subchondral bone of rabbits [56]. He observed after 6 months complete replacement of coral with new bone as well as the presence of a well-defined subchondral plate and a tidemark continuous with the adjacent osteochondral tissue. Successful repair was achieved when the coral graft was positioned below the calcified cartilage level to prevent bone differentiation from progressing to the surface. Although surface repair of the cartilage was better than when defects were left ungrafted, the quality of the surface was found to be lower than that of normal rabbit cartilage.

Tableau 2.5. Applications of coral grafts in humans.

Coral	Protocol	Results	References
Alveolar Defects			
Porous fragments	Treatment of alveolar lesions	Bone replacement of coral by 8 months; complications include 2 inflammatory reactions and 1 insufficient bone filling	[4]
Porites particles (300-450 μm)	Treatment of infrabony defects	Complete bone contact with coral, better attachment and decreased bony defect height by 18 months	[67]
Porites particles (500-1000 μm)	Treatment of alveolar bone defects	At 3 months coral contact with tissues: 1/3 bony, 2/3 fibrous; no bone replacement of coral after 8-10 months; no complications	[66]
Porites particles (300-450 μm)	Treatment of infrabony defects	Improvement in mean vertical probing attachment level, pocket depth and gingival recession after 6-12 months; results maintained after 5 years	[112]
Cranial-Maxillo-Facial Defects			
Fungia blocs and *Porites* grafts (2 cases)	Inner ear and maxillo-facial defects	Mostly good results after up to 10 months; 2 reported complications attributed to improper covering of coral graft	[113]

Table 2.5. Applications of coral grafts in humans (continuation).

Coral	Protocol	Results	References
Porites corks (9-11 mm) or blocs (10x20x50 or 60 mm)	Repair of cranial base bone defects	20% of coral blocs moved, or partly resorbed and split after 7 to 36 months; complications include 4% local infections (blocs) and 1% subcutaneous suppuration (corks)	[17,68,115]
Small *Porites* blocs (trephine holes) and 3-6 cm long *Porites* fragments (iliac bone)	Filling of cranial trephine holes and iliac bone harvest sites	No complications or inflammatory reactions due to coral; 48% of trephans with 30-50% bone remodelling and the rest with >50% remodelling; only partial union in cases of iliac bone fillings (85% with 30-50% remodelling) after 0.5 to 3.5 years	[116]
Polyphyllia and *Goniopora* grafts	Filling of bone defects and bone apposition	*Polyphyllia* offers great volumetric stability while *Goniopora* allows 50-60% reossification after 10 years	[26]
Acropora particles and blocs, and *Pocillopora* blocs	Facial augmentations (children and adults)	No reported complications except in one case where rupture of the periosteum occurred and failed to maintain coral graft in place	[23]

Table 2.5. Applications of coral grafts in humans (continuation).

Coral	Protocol	Results	References
Acropora particles	Correction of facial contour defects	Complications (6%) include 2 infections (coral left in superficial wound) and 1 case of suppuration (perforation of sinus wall); coral resorption in 9% of sites after 1-3 years	[69]
Fragments	Orbital floor reconstruction (children and adults)	Bone replacement of partially resorbed coral after 2 years; 89% with good corrections; complications include 1 infection and 3 implant related problems	[117]
Blocs	Correction of zygomatic hypoplasia	Tolerance was perfect in 89% of cases after 1.5-2 years; complications include 2 fractures of graft and 3 septic apparitions in first year when without coral fixation	[118]
Porites particles (300-450 μm) with collagen	Treatment of bone defects in adult maxilla and mandible	Mature bone surrounding coral particles after 6 months; no inflammatory reactions	[119]

Table 2.5. Applications of coral grafts in humans (continuation).

Coral	Protocol	Results	References
Orthopaedic Defects			
Lobophyllia blocs	Correction of scoliosis with coral grafts and instrumentation (children)	No non-unions; stability of corrections (60%) after 3 years; only coral in contact with bone replaced by new bone; complications include infections of surgical (2.2%) and mechanical origins (4.4%) where 3.3% with corrections (stacked blocs) had local reactions with/without aseptic liquid	[16,120]
Porites blocs (20x10x10, 15x5x5 mm)	Tibial and calcaneus fracture repair	Consolidation after 55 days on average except for 1 implant removed; complications include serous aseptic flows (21.7%)	[72]
Lobophyllia and *Porites* corners (3-12 mm high)	Treatment of tibial osteotomies	Good results (53%), slight pain (32%), persistent pain (12%) and failure (3%) after 1-4 years; 5 complications with 3 inflammations (*Porites*)	[2]
Porites blocs (20x10x10 mm)	Repair of calcaneus fractures	Osteointegration with incomplete coral resorption after 3-7 years, except in 4 cases (1 tibia and 3 calcaneus) with aseptic sequestration of implant	[73]

Table 2.5. Applications of coral grafts in humans (continuation).

Coral	Protocol	Results	References
Acropora (97%) and *Porites* (3%) blocs	Treatment of lower cervical discopathies	97% with height stability except for 2 cases of graft compression causing diminished height (*Porites*); consolidation after 3-4 months except for cases of 1 late sepsis and 1 non-union; overall 7.5% severe complications	[33]
Porites wedge-shaped blocs (30x30x12 to 4 mm)	Replacement of harvested iliac bone	No complete restoration of iliac shape and coral only partly resorbed after 2.1 years (average)	[71]
Acropora blocs (various sizes)	Treatment of cervical transdiscal osteophytectomies and corporectomies	94% success rate reported after follow-up of 3 years or more; complications include dura-matter breach (4%) and infection (1%)	[121]

2.8 Discussion

Coral has been shown to possess all the principal properties of an adequate bone graft substitute, with the exception of its lack of osteoinductivity and osteogenesis, which can be provided by adding growth factors such as bone morphogenetic proteins and bone marrow cells. The addition of growth factors or bone marrow cells to coral grafts were found in general to improve bone formation when compared to implantation of coral alone. Coral scaffolds thus act as good carriers of growth factors and good supports for cell transplantation into a bony site.

Numerous animal and human studies in many implantation sites demonstrated that natural coral exoskeleton is effective when adequately applied. Our review of the literature (Tables 2.2 to 2.5) revealed that a number of considerations should be taken into account prior to coral implantation. Most studies indicated that coral should preferably not be in contact with fibrous tissue as it seems to slow or prevent bone formation, such as in the cases of repair of nasal defects. Grafting of porous corals (i.e. *Porites* and *Goniopora*) in regions of high mechanical loads, such as the calcaneus, without sufficient load transfer to fixator devices, is not recommended by the authors. Even in regions of little or no mechanical loading, coral especially in particle shape should be well stabilized and maintained at the implant site. Many authors have indicated the use of membranes in a number of alveolar and maxillo-facial applications. Finally, the stacking of coral implants to fill a defect is not recommended since all surfaces have to be in contact with bone to be colonized.

Overall, complications attributable to coral were generally low, and little or no inflammatory reactions were found in animals and humans. However, whenever the specific rules elaborated in section VI, on the use of coral grafts were not respected, complications such as coral mobility or splitting and aseptic serous fluids occurred.

Since the coral resorption rate should match the bone formation rate, an adequate selection of the coral implant is critical. This is evidently difficult as the reviewed studies have shown that coral resorption rate depends on the coral species and its properties (especially porosity), the graft size and shape, the implantation site and species, and the use of additional factors such as bone marrow cells or growth factors. In general, resorption of *Porites* and *Goniopora* scaffolds was faster than the lower porosity corals like *Acropora* and closed porosity corals like *Favites*, *Lobophyllia* and *Polyphyllia*. In the case of the most commonly used *Porites*, resorption was often too fast for the new bone to completely fill the defect site. Ultimately, the most adequate type of coral scaffold to use for most applications can only be derived from experience. Actual coral resorption rates and hence the evolving coral-bone mechanical properties are therefore dependant upon the implant environment, which is itself unique to each patient.

With the increasing awareness of the threat of powerful and devastating infectious agents, the need for stringent quality control of all bioimplants is necessary. The culture of coral in controlled laboratory environments may soon be necessary to satisfactorily modify their properties, better control the purity of their growth environment, and furthermore eliminate harvesting of the oceans.

At the dawn of the new millennium, this material could definitely play an important role as a bone graft substitute in the management of numerous bone-related conditions.

2.9 References

[1] P. Furla and D. Allemand, Nos ancêtres les coraux..., *Médecine Sciences* **16** (2000), 1139-1140.

[2] C. Kenesi, M.C. Voisin and A. Dhem, Ostéotomie tibiale d'addition interne calée par un coin corail. Premiers résultats à propos de 38 interventions, *Chirurgie* **122** (1997), 379-382.

[3] D. Collangettes-Peyrat, Y. Fonck, J.C. Capelani, J.L. Irigaray, H. Ouadesse and G. Blondiaux, Ossification de corail implanté dans une machoire d'ovin: détermination quantitative par des méthodes physiques et étude anatomo-pathologique, *Innov. Tech. Biol. Med.* **10** (1989), 679-693.

[4] J.-P. Boiteux, G. Paré and J.-P. Robin, Comblement madréporaire périapical. Bilan clinique de l'utilisation d'un matériau de comblement madréporaire dans les pertes de substances osseuses périapicales, *Rev. Odontostomatol (Paris)* **17** (1988), 291-298.

[5] J.-L. Patat and G. Guillemin, Le corail naturel utilisé comme biomatériau de substitution à la greffe osseuse, *Ann. Chir. Plast. Esthet.* **34** (1989), 221-225.

[6] S. Issahakian, J.P. Ouhayoun, G. Guillemin and J.-L. Patat, Le corail madréporaire, *Info. Dent.* **24** (1987), 2123-2132.

[7] R.A. White, J.N. Weber and E.W. White, Replamineform: a new process for preparing porous ceramic metal and polymer prosthetic materials, *Science* **176** (1972), 922-924.

[8] J.N. Weber and E.W. White, Carbonate minerals as precursors of new ceramic, metal and polymer materials for biomedical applications, *Mineral Science Engineering* **5** (1973), 151-165.

[9] D.M. Roy and S.K. Linnehan, Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange, *Nature* **247** (1974), 220-222.

[10] R.T. Chiroff, E.W. White, J.N. Weber and D.M. Roy, Tissue ingrowth of replamineform implants, *J. Biomed. Mater. Res.* **6** (1975), 29-45.

[11] G. Guillemin, J. Fournié, J.-L. Patat and M. Chétail, Contribution à l'étude du devenir d'un fragment de squelette de corail madréporaire implanté dans la diaphyse des os longs chez le chien, *C.R. Seances Acad. Sci. III* **293** (1981), 371-376.

[12] Y. Levet and G. Jost, Utilisation de squelettes de coraux madréporaires en chirurgie réparatrice, *Ann. Chir. Plast. Esthet.* **28** (1983), 180-181.

[13] Du corail à biocorail (documentation from Biocoral®), Société Industrielle INOTEB, 38 rue Anatole France, 92594 Levallois-Perret, Cedex France.

[14] J.-L. Patat, J.C. Pouliquen and G. Guillemin, Le corail naturel utilisé comme substitut de greffon osseux. Son rôle dans les économies de sang dans la chirurgie du rachis, *Acta Orthop. Belg.* **58** (1992), 115-121.

[15] A. Patel, F. Honnart, G. Guillemin, and J.-L. Patat, Utilisation de fragments de squelette de coraux madréporaires en chirurgie orthopédique et réparatrice. Expérimentation animale, applications cliniques humaines, *Chirurgie* **106** (1980), 199-205.

[16] J.C. Pouliquen, M. Noat, C. Verneret, G. Guillemin and J.-L. Patat, Le corail substitué à l'apport osseux dans l'arthrodèse vertébrale postérieure chez l'enfant. Premiers Résultats, *Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot.* **75** (1989), 360-369.

[17] F.X. Roux, D. Brasnu, B. Loty, B. George and G. Guillemin, Madreporic coral: a new bone graft substitute for cranial surgery, *J. Neurosurg.* **69** (1988), 510-513.

[18] F. Souyris, C. Pellequer, C. Payrot, and C. Servera, Coral, a new biomedical material. Experimental and first clinical investigations on madreporia, *J. Maxillofac. Surg.* **13** (1985), 64-69.

[19] G. Guillemin, J.-L. Patat, J. Fournie and M. Chétail, The use of coral as a bone graft substitute, *J. Biomed. Mater. Res.* **21** (1987), 557-567.

[20] J.A. Chamberlain, Mechanical properties of coral skeleton: compressive strength and its adaptive significance, *Paleobiology* **4** (1978), 419-435.

[21] P. Jammet, F. Souyris, P. Baldet, F. Bonnel and M. Huguet, The effect of different porosities in coral implants: an experimental study, *J. Cranio-Maxillo-Facial. Surg.* **22** (1994), 103-108.

[22] G. Guillemin, A. Meunier, P. Dallant, P. Christel, J.C. Pouliquen and L. Sedel, Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities, *J. Biomed. Mater. Res.* **23** (1989), 765-779.

[23] S.K. Papacharalambous and K.I. Anastasoff, Natural coral skeleton used as onlay graft for contour augmentation of the face, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **22** (1993), 260-264.

[24] R.S. Zeng, The use of coral as a substitute for maxillofacial bone reconstruction, *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih* **26** (1991), 389-390.

[25] L. Chen, W. Klaes and S. Assenmacher, A comparative morphometric and histologic study of five bone substitute materials, *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih* **76** (1996), 527-30.

[26] G. Atlan, P. Jammet, L. Montes de Oca and F. Souyris, Indications actuelles du corail en chirurgie cranio-faciale. Dix ans d'expérience, *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* **92** (1991), 199-203.

[27] D.J. Zaner and R.A. Yukna, Particle size of periodontal bone grafting materials, *J. Periodontol.* **55** (1984), 406-409.

[28] E.C. Shors, Coralline bone graft substitutes, *Orthop. Clin. North Am.* **30** (1999), 599-613

[29] S.F. Hulbert, F.A. Young, R.S. Mathews, J.J. Klawitter, C.D. Talbert and F.H. Stelling, Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses, *J. Biomed. Mater. Res.* **4** (1970), 433-456.

[30] Biocoral, *GESTO*, www.maitrise-orthop.com/gesto/biocoral.shtml, 1-8.

[31] J.A. Buckwalter, M.J. Glimcher, R.R. Cooper and R. Recker, Bone biology. Part I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization, *J. Bone Joint Surg. Am.* **77** (1995), 1256-1275.

[32] J. Vuola, R. Taurio, H. Göransson and S. Asko-Seljavaara, Compressive strength of calcium carbonate and hydroxyapatite implants after bone-marrow-induced osteogenesis, *Biomaterials* **19** (1998), 223-227.

[33] K. Ghiamphy, F. Gosset and P. Kehr, Coral grafts used in cervical interbody fusion, *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* **9** (1999), 209-222.

[34] D.T. Davy, Biomechanical issues in bone transplantation, *Orthop. Clin. North Am.* **30** (1999), 553-563.

[35] T.-J. Gao, T.K. Tuominen, T.S. Lindholm and *et al.*, Morphological and biomechanical difference in healing in segmental tibial defects implanted with Biocoral® or tricalcium phosphate cylinders, *Biomaterials* **18** (1997), 219-223.

[36] P. Guigui, P.Y. Plais, B. Flautre and *et al.*, Experimental model of posterolateral spinal arthrodesis in sheep. Part 2. Application of the model: Evaluation of vertebral fusion obtained with coral (Porites) or with a biphasic ceramic (Triosite), *Spine* **19** (1994), 2798-2803.

[37] J.C. Fricain, R. Bareille, F. Ulysse, B. Dupuy and J. Amedee, Evaluation of proliferation and protein expression of human bone marrow cells cultured on coral crystallized in the aragonite or calcite form, *J. Biomed. Mater. Res.* **42** (1998a), 96-102.

[38] B. Kreklau, M. Sittinger, M.B. Mensing and *et al.*, Tissue engineering of biphasic joint cartilage transplants, *Biomaterials* **20** (1999), 1743-1749.

[39] Guillemin G., Lauray M., Meunier A., Natural coral as a substrate for fibroblastic growth *in vitro*, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **4** (1993), 575-581.

[40] H. Petite, K. Kacem and J.T. Triffitt, Adhesion, growth and differentiation of human bone marrow stromal cells on non-porous calcium carbonate and plastic substrata: effects

of dexamethasone and 1,25 dihydroxy-vitamin D3, *J. Mater. Sci. Mater. In Med.* **7** (1996), 665-671.

[41] S. Kajiwara, Histopathological studies on tissue reactions to experimental root canal sealer in cats, *Fukuoka Shika Daigaku Gakkai Zasshi* **17** (1990), 358-382.

[42] P. Jammet, Corail et chirurgie crânio-maxillo-faciale. Résultats d'une étude expérimentale chez le mouton, *Chirurgie* **119** (1993-1994), 273-277.

[43] C. Alpaslan, G. Alpaslan and T. Oygur, Bone reaction to subperiosteally implanted hydroxyapatite/collagen/glycosaminoglycans and coral in the guinea pig, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **77** (1994), 335-340.

[44] N.N. Bou-Abboud, J.-L. Patat, G. Guillemin, S. Issahakian, N. Forest and J.-P. Ouhayoun, Evaluation of the osteogenic potential of biomaterials implanted in the palatal connective tissue of miniature pigs using undecalcified sections, *Biomaterials* **15** (1994), 201-207.

[45] L. Miao and B. Liu, Subperiosteal implantation of block coral on the rabbit cavarial bone, *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih* **32** (1997), 221-223.

[46] L. Miao and B. Liu, Experimental study of coral implantation in repair of skull bone defect in rabbit: histomorphometry of bone, *Chung Kuo Hsiu Fu Chung Chien Wai Ko Tsa Chih* **11** (1997), 132-135.

[47] R. Zeng, C. Ren and C. Li, Experimental study on bone formation in a denser coral used for repairing cortical defects in dogs, *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih* **32** (1997), 16-18.

[48] N.N. Bou-Abboud and J.-P. Ouhayoun, Bone formation with discs or particles of natural coral skeleton plus polyglactin 910 mesh: Histologic evaluation in rat calvaria, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **13** (1998), 115-120.

[49] P. Bravetti, H. Membre, L. Marchal and R. Jankowski, Histologic changes in the sinus membrane after maxillary sinus augmentation in goats, *J. Oral Maxillofac. Surg.* **56** (1998), 1170-1177.

[50] M. Hott, P.J. Marie, G. Guillemin and J.-L. Patat, Ostéoformation induite par l'implantation de corail dans l'os cortical de rat, in: *Organes artificiels hybrides/Hybrid artificial organs (Colloque INSERM)*, vol. 177, C. Baquey and B. Dupuy, eds, BIOMAT BORDEAUX, France, 1989, p. 311-318.

[51] M. Roudier, C. Bouchon, J.L. Rouvillain and *et al.*, The resorption of bone-implanted corals varies with porosity but also with the host reaction, *J. Biomed. Mater. Res.* **29** (1995), 909-15.

[52] D.A. Fuller, S. Stevenson and S.E. Emery, The effects of internal fixation on calcium carbonate. Ceramic anterior spinal fusion in dogs, *Spine* **21** (1996), 2131-2136.

[53] S.A. Reis, C. Voigt, C. Müller-Mai, H. Herbst, S. Bisson and U. Gross, Procollagen α1(I) transcripts in cells near the interface of coralline implants in rats, detected by in situ hybridization, *Clin. Oral Implants Res.* **7** (1996), 253-260.

[54] K.S. Tho and S. Krishnamoorthy, Use of coral grafts in anterior interbody fusion of the rabbit spine, *Ann. Acad. Med. Singapore* **25** (1996), 824-827.

[55] T. Turunen, J. Peltola, H. Helenius and *et al.*, Bioactive glass and calcium carbonate granules as filler material around titanium and bioactive glass implants in the medullar space of the rabbit tibia, *Clin. Oral Implants Res.* **8** (1997), 96-102.

[56] B.F. Shahgaldi, Coral graft restoration of osteochondral defects, *Biomaterials* **19** (1998), 205-213.

[57] G. Cunin, H. Boissonnet, H. Petite, C. Blanchat and G. Guillemin, Experimental vertebroplasty using osteoconductive granular material, *Spine* **25** (2000), 1070-1076.

[58] M. Richard, E. Aguado, M. Cottrel and G. Daculsi, Ultrastructural and electron diffraction of the bone-ceramic interfacial zone in coral and biophasic CaP implants, *Calc. Tissue Int.* **62** (1998), 437-442.

[59] J. Vuola, H. Göransson, T. Böhling and S. Asko-Seljavaara, Bone marrow induced osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants, *Biomaterials* **17** (1996), 1761-1766.

[60] C.T. Begley, M.J. Doherty, R.A.B. Mollan and D.J. Wilson, Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes, *Biomaterials* **16** (1995), 1181-1185.

[61] C.J. Damien, P.S. Christel, J.J. Benedict, J.-L. Patat and G. Guillemin, A composite of natural coral, collagen, bone protein and basic fibroblast growth factor tested in a rat subcutaneous model, *Ann. Chir. Gynaecol. Suppl.* **82** (1993), 117-128.

[62] H. Ohgushi, V.M. Goldberg and A.I. Caplan, Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells, *J. Orthop. Res.* **7** (1989), 568-578.

[63] S. Louisia, M. Stromboni, A. Meunier, L. Sedel and H. Petite, Coral grafting supplemented with bone marrow, *J. Bone Joint Surg. Br.* **81** (1999), 719-724.

[64] E. Arnaud, C. De Pollak, A. Meunier, L. Sedel, C. Damien and H. Petite, Osteogenesis with coral is increased by BMP and BMC in a rat cranioplasty, *Biomaterials* **20** (1999), 1909-1918.

[65] C.J. Damien, J.L. Ricci, P. Christel, H. Alexander and J.-L. Patat, Formation of a Calcium Phosphate-Rich Layer on Absorbable Calcium Carbonate Bone Graft Substitutes, *Calcif. Tissue Int.* **55** (1994), 151-158.

[66] D. Zaffe, C. Palumbo and E. Cantoni, Coral granules in the repair of human mandibular defects, in: *Materials in Clinical Applications*, P. Vincenzini, ed, Techna Srl, 1995, p. 431-438.

[67] S. Issahakian and J.-P. Ouhayoun, Evaluation clinique et histologique d'un nouveau matériau de comblement: le corail naturel, *J. Parodontol.* **8** (1989), 251-259.

[68] F.X. Roux, D. Brasnu, M. Menard and *et al.*, Madreporic coral for cranial base reconstruction: 8 years experience, *Acta Neurochir. (Wien)* **133** (1995), 201-205.

[69] D. Marchac and G. Sandor, Use of coral granules in the craniofacial skeleton, *Journal of Craniofacial Surgery* **5** (1994), 213-217.

[70] C. Bizette, J.-S. Raul, B. Orhan, G. Jacquet and A. Czorny, Résultats d'arthrodèses intersomatiques cervicales par greffons coralliens, *Neurochirurgie* **45** (1999), 4-14.

[71] J. Vuola, T. Böhling, J. Kinnunen, E. Hirvensalo and S. Asko-Seljavaara, Natural coral as bone-defect-filling material, *J. Biomed. Mater. Res.* **51** (2000), 117-122.

[72] F. De Peretti, C. Trojani, P.M. Cambas and *et al.*, Le corail comme soutien d'un enfoncement articulaire traumatique: Étude prospective au membre inférieur de 23 cas, *Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot.* **82** (1996), 234-240.

[73] J.-Y. De la Caffinière, E. Viehweger and A. Worcel, Évolution radiologique à long terme du corail implanté en os spongieux au membre inférieur: Corail madréporique versus hydroxyapatite du corail, *Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot.* **84** (1998), 501-507.

[74] J.L. Irigaray, H. Oudadesse, G. Blondiaux and D. Collangettes, Kinetics of the diffusion of some elements evaluated by neutron activation in a coral implanted in vivo. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **169** (1993a), 339-346.

[75] J.L. Irigaray, T. Sauvage, H. Oudadesse and *et al.*, Study of the mineralization of coral implanted *in vivo* by radioactive tracers, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **174** (1993b), 93-102.

[76] F. Braye, J.L. Irigaray, E. Jallot and *et al.*, Resorption kinetics of osseous substitute: natural coral and synthetic hydroxyapatite, *Biomaterials* **17** (1996), 1345-1350.

[77] J.M. Sautier, J.R. Nefussi and N. Forest, Surface-reactive biomaterials in osteoblast cultures: an ultrastructural study, *Biomaterials* **13** (1992), 400-402.

[78] J.L. Irigaray, H. Oudadesse and G. Blondiaux, Quantitative study of the coral transformations 'in vivo' by several physical analytical methods, *Biomaterials* **11** (1990), 73-74.

[79] J.Ch. Fricain, Ch. Baquey and B. Dupuy, Resorption of corals implanted in diffusion chambers, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **6** (1995), 680-684.

[80] T.-J. Gao, T.S. Lindholm, B. Kommonen and *et al.*, The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep, *Int. Orthop. (SICOT)* **21** (1997), 194-200.

[81] Q. Ma, T. Mao, B. Liu and *et al.*, Vascular osteomuscular autograft prefabrication using coral, type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **38** (2000), 561-564.

[82] S.D. Boden, J.H. Schimandle and W.C. Hutton, The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part II: Study of dose, carrier, and species, *Spine* **20** (1995), 2633-2644.

[83] S.D. Boden, J.H. Schimandle, W.C. Hutton and *et al.*, *In vivo* evaluation of resorbable osteoinductive composite as a graft substitute for lumbar spinal fusion, *J. Spinal Disord.* **10** (1997), 1-11.

[84] C.J. Damien, J.L. Patat and J.J. Benedict, Natural coral as a carrier for BMPs, in: *Actualités en Biomatériaux*, Chapter 2 (Les substituts osseux), vol. IV, D. Mainard, M. Merle, J.P. Delagoutte and J.P. Louis, eds, Editions Romillat, Paris, 1998, pp. 181-188.

[85] H. Kaneko, T. Arakawa, H. Mano and *et al.*, Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts, *Bone* **27** (2000), 479-486.

[86] M. Koide, Y. Murase, K. Yamato, T. Noguchi, N. Okahashi and T. Nishihara, Bone morphogenetic protein-2 enhances osteoclast formation mediated by interleukin-1 alpha

through upregulation of osteoclast differentiation factor and cyclooxygenase 2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259** (1999), 97-102.

[87] M. Kanatani, T. Sugimoto, H. Kaji and *et al.*, Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity, *J. Bone Miner. Res.* **10** (1995), 1681-1690.

[88] J.P. Ouhayoun, A.H.M. Shabana, S. Issahakian and *et al.*, Histological evaluation of natural coral skeleton as a grafting material in miniature swine mandible, *J. Mater. Sci.* **3** (1992), 222-228.

[89] J.Ch. Fricain, R. Bareille, F. Rouais, B. Basse-Cathalinat and B. Dupuy, "In vitro" dissolution of coral in peritoneal or fibroblast cell cultures, *J. Dent. Res.* **77** (1998b), 406-411.

[90] A.S. Shanbhag, J.J. Jacobs and T.T. Glant, Human monocyte response to particulate biomaterials generated *in vivo* and *in vitro*, *J. Orthop. Res.* **13** (1995), 792-801.

[91] T. Rae, The macrophage response to implant materials-with special reference to those used in orthopaedics, *Crit. Rev. Biocompat.* **2** (1986), 97-126.

[92] A.S. Shanbhag, J. Yang, J. Lilien and J. Black, Deacreased neutrophil respiratory burst on exposure to cobalt-chrome alloy and polystyrene *in vitro*, *J. Biomed. Mater Res.* **26** (1992.), 185-195.

[93] H. Ohgushi, M. Okumura, T. Yoshikawa and *et al.*, Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res.* **26** (1992), 885-895.

[94] E. Arnaud, C. Morieux, M. Wybier and M.C. de Vernejoul, Potentiation of transforming growth factor (TGF-ß1) by natural coral and fibrin in a rabbit cranioplasty model, *Calcif. Tissue Int.* **54** (1994), 493-498.

[95] T.J. Gao, T.S. Lindholm, A. Marttinen and M.R. Urist, Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics, *Int. Orthop. (SICOT)* **20** (1996), 321-325.

[96] M.F. Sciadini, J.M. Dawson and K. Johnson, Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model, *J. Orthop. Res.* **15** (1997), 844-857.

[97] E. Arnaud, F. Molina, M. Mendoza, A. Fuente Del Campo and F. Ortiz-Monasterio, Substitut osseux avec facteur de croissance. Cas cliniques préliminaires pour des indications cranio- et maxillo-faciales, *Ann. Chir. Plast. Esthet.* **43** (1998), 40-50.

[98] U.M.E. Wikesjö, S.S. Razi, T.J. Sigurdsson and *et al.*, Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human transforming growth factor-ß1 on guided tissue regeneration, *J. Clin. Periodontol.* **25** (1998), 475-481.

[99] G. Zellin, S. Beck, R. Hardwick and A. Linde, Opposite effects of recombinant human transforming growth factor-ß1 on bone regeneration in vivo: Effect of exclusion of periosteal cells by microporous membrane, *Bone* **22** (1998), 613-620.

[100] R. E. Kania, A. Meunier, M. Hamadouche and *et al.*, Addition of fibrin sealant to ceramic promotes bone repair: long-term study in rabbit femoral defect model, *J. Biomed. Mater. Res.* **43** (1998), 38-45.

[101] N. Volpi, Adsorption of glycosaminoglycans onto coral – a new possible implant biomaterials for regeneration therapy, *Biomaterials* **20** (1999), 1359-1363.

[102] B. Ongpipattanakul, M. Cromwell, R. Wong and T. Nguyen, The adsorption of rhTGF-ß1 and its release from tricalcium phosphate, *Pharm. Res.* (1994 AAPS Annual Meeting) **11** (1994), S-82.

[103] C. Demers, M. Tabrizian, R.C. Hamdy and L'H. Yahia, Coral particles and transforming growth factor beta 1: *In vitro* kinetics of release and preliminary *in vivo* study, Second International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB), June 28-July 1, 2000, Montréal, Canada, paper #104.

[104] C. Demers, M. Tabrizian, R. Hamdy, A. Petit and L'H. Yahia, Release of transforming growth factor-ß1 from coral particles: Effect of adsorption conditions, SIROT/CSOS 2000, May 5-10, 2000, Shanghai-Beijing, China.

[105] J.M. Sautier, J.R. Nefussi, H. Boulekbache and N. Forest, *In vitro* bone formation on coral granules, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **26** (1990), 1079-1085.

[106] C.T. Begley, M.J. Doherty, D.P. Hankey and D.J. Wilson, The Culture of Human Osteoblasts upon Bone Graft Substitutes, *Bone* **14** (1993), 661-666.

[107] M.J. Doherty, G. Schlag, N. Schwarz, R.A.B. Mollan, P.C. Nolan and D.J. Wilson, Biocompatibility of xenogeneic bone, commercially available coral, a bioceramic and tissue sealant for human osteoblasts, *Biomaterials* **15** (1994), 601-608.

[108] J.Ch. Fricain, M. Roudier, F. Rouais, B. Basse-Cathalinat and B. Dupuy, Influence of the structure of three corals on their resorption kinetics, *J. Periodontal. Res.* **31** (1996), 463-469.

[109] J.L. Irigaray, H. Oudadesse, H. El Fadl, T. Sauvage, G. Thomas and A.M. Vernay, Effet de la température sur la structure cristalline d'un biocorail, *Journal of Thermal Analysis* **39** (1993c), 3-14.

[110] H. Yamashiro, M. Yamamoto and R. van Woesik, Tumor formation on the coral Montipora informis, *Dis. Aquat. Organ* **41** (2000), 211-217.

[111] C.D. Harvell, K. Kim, J.M. Burkholder and *et al.*, Emerging marine diseases-Climate links and anthropogenic factors, *Science* **285** (1999), 1505-1510.

[112] R.A. Yukna and C.N. Yukna, A 5-year follow-up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (Biocoral™) bone replacement grafts in infrabony defects, *J. Clin. Periodontol.* **25** (1998), 1036-1040.

[113] A. Robier, Ph. de Geofroy, L. Pandraud, D. Goga and P. Beutter, Utilisation des implants coralliens en chirurgie oto-rhino-laryngologique et maxillo-faciale, *Ann. Otolaryngol. Chir. Cervicofac.* **104** (1987), 303-306.

[114] Cl. Servera, F. Souyris, C. Payrot and P. Jammet, Le corail dans les lésions infra-osseuses. Bilan après 7 ans d'utilisation, *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* **88** (1987), 326-333.

[115] F.X. Roux, O. Laccourreye, B. Devaux, C. Cioloca and D. Brasnu, Évolution des techniques de reconstruction de la base antérieure du crâne après exérèse tumorale, *Ann. Otolaryngol. Chir. Cervicofac.* **113** (1996), 29-33.

[116] B. Loty, F.X. Roux, B. George, J.P. Courpied and M. Postel, Utilisation du corail en chirurgie osseuse, *Int. Orthop. (SICOT)* **14** (1990), 255-259.

[117] J. Mercier, B. Piot, P. Gueguen and *et al.*, Le plancher orbitaire en corail. Son intérêt en traumatologie, *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* **97** (1996), 324-331.

[118] F. Boutault, D. Cantaloube, S. Testelin, J.-M. Gueroult and P. Huet, Intérêt des blocs de corail dans les plasties d'augmentation des pommettes: Étude prospective portant sur 23 patients, *Ann.Chir. Plast. Esthet.* **42** (1997), 216-222.

[119] A. Piattelli, G. Podda and A. Scarano, Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate, *Biomaterials* **18** (1997), 623-627.

[120] J.C. Pouliquen, M. Noat, G. Guillemin and J.-L. Patat, Le corail substitué à l'apport osseux en orthopédie pédiatrique, *Annales de Pédiatrie* **37** (1990), 59-61.

[121] P. Kehr, F. Gosset, A.G. Graftiaux and K. Ghiamphy, Utilisation du corail dans les arthrodèses intersomatiques cervicales (expérience de 6 ans), in: *Actualités en Biomatériaux*, Chapter 2 (Les substituts osseux), vol. IV, D. Mainard, M. Merle, J.P. Delagoutte and J.P. Louis, eds, Editions Romillat, Paris, 1998, pp. 147-156.

[122] J.-P. Ouhayoun, P. Pokoik, D. Etienne, F. Alcouffe and G. Guillemin, Prévention d'une perte de substance sur un site édenté: Rapport sur un cas combinant greffe gingivale et particules de corail, *J. Parodontol.* **10** (1991), 61-67.

[123] M.P. Hippolyte, D. Fabre and S. Peyrol, Corail et régénération tissulaire guidée. Aspects histologiques. *Journal de Parodontologie* **10** (1991), 279-286.

[124] P. Santanche and C. Bonarrigo, Coral in malar augmentation: Complications in our experience (Correspondence), *Plast. Reconstr. Surg.* **99** (1997), 266-268.

CHAPITRE 3. Méthodologies utilisées pour les expériences *in vitro* et *in vivo* avec le corail et le TGF-ß1

Ce chapitre présente le matériel et les expériences *in vitro* conçues pour définir les propriétés du corail comme système de libération. Le modèle animal de l'allongement d'un membre est décrit en détail, ainsi que les systèmes d'injection du TGF-ß1 et des particules de corail. Les techniques d'évaluation de la qualité de la consolidation osseuse du membre allongé sont présentées avec une courte justification pour chaque technique choisie.

3.1 Étude *in vitro*

3.1.1 Matériel

3.1.1.1 Caractéristiques des particules de corail

Nous avons choisi d'effectuer les études de ce projet avec une taille spécifique de particules de corail car:

- de petites particules étaient nécessaires pour développer un système d'injection minimalement invasif, et
- des plages précises de diamètres de particules de corail ont été mises à notre disposition.

Nous avons également testé des particules de plus grosse taille, souvent employées pour des applications dentaires, pour fin de comparaison. Nous avons donc utilisé des particules de corail de type *Porites* de tailles <80 µm et 300-450 µm de diamètres, fournies par la filiale INOTEB de la compagnie Biocoral® (Saint-Gonnery, France). La distribution de la taille exacte de ces particules a été déterminée par une analyse d'images obtenues par microscopie électronique à balayage (JEOL JSM 840, Jeol USA Inc.,

Peabody, MA, États-Unis). Les images des particules prises par microscopie électronique à balayage se retrouvent dans la figure 4.1 de l'article "Effect of experimental parameters on the *in vitro* release kinetics of transforming growth factor ß1 from coral particles". Le logiciel *Image Tool* (version 2.00, UTHSCSA, San Antonio, Texas) a permis de mesurer le diamètre des particules ainsi que leur sphéricité, exprimée sur une échelle de 0 à 1 avec 1 indiquant une particule circulaire. L'analyse a démontré que les particules <80 µm ont un diamètre de 3 à 100 µm dont 88% réside dans la fraction inférieure à 30 µm, et que 87% ont un indice de sphéricité élevé (0.5-1.0). Les particules de taille 300-450 µm ont un diamètre variant entre 290 et 560 µm dont 81% se retrouve dans la plage de 300 à 500 µm. Leur sphéricité indique que les particules sont de forme plus allongées (95% avec sphéricité entre 0.4 et 0.8) que les particules de plus petite taille.

Toutes les quantités de particules de corail employées au cours de l'étude *in vitro* ont été sélectionnées pour obtenir un rapport surface apparente moyenne des particules: volume de milieu de 6 cm^2/mL dans les expériences de cinétique de relargage. Cette valeur a été choisie selon les recommandations proposées dans la norme française NF S 90-701 (Masson, 1988) pour l'extraction d'implants chirurgicaux. Les calculs se résument à l'équation suivante:

*Quantité de particules = densité (aragonite) * rayon moyen (plage de particules) * volume (milieu) * rapport surface apparente:volume du milieu*

*Quantité de particules (g) = 2.95 g/cm^3 * rayon (cm) * volume (mL) * 6 cm^2/mL*

3.1.1.2 ***Transforming growth factor beta 1***

Le TGF-ß1 purifié de plaquettes humaines a été acheté de la compagnie VWR Canlab (Mississauga, ON, Canada), en solution très concentrée (50-110 µg/mL) dans 36% acétonitrile/0.1% acide trifluoroacétique. Les solutions d'entreposage (5 µg/mL) et de travail (334 ng/mL) ont été obtenues en diluant les solutions dans le même solvant.

3.1.1.3 Solutions pour l'adsorption du TGF-ß1

Notre motivation initiale pour l'ajout d'albumine et de gélatine dans le milieu employé pour l'adsorption du TGF-ß1 sur les particules de corail a été fondée sur la nécessité de réduire les pertes de TGF-ß1 sur les parois des outils de travail (Paralkar *et al.*, 1991;Gombotz *et al.*, 1994). Ainsi, les solutions pour l'adsorption du TGF-ß1 sont composées de 0.1% d'albumine de sérum bovin (fraction V, Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) à un pH de 3, 7.4 et 11, ou de 0.1% de gélatine isolée de peau de porc (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) aux mêmes pHs.

3.1.1.4 Solution pour le relargage du TGF-ß1

La solution pour le relargage a été choisie dans le but de simuler le fluide osseux. Nous avons donc basé notre solution sur le fluide osseux artificiel décrit dans la norme française NF S 90-701: 1988 (Masson, 1988). Nous avons effectué certaines modifications afin de réduire les coûts:

(1) le milieu nutritif pour culture cellulaire HAM-F10 (Biomedia, Montréal, QC, Canada) a fourni les sels minéraux à des concentrations ioniques suffisamment similaires au fluide osseux artificiel,

(2) la glycine (BDH, Toronto, ON, Canada) a été sélectionnée pour refléter le groupe d'acides aminés ayant une chaîne résiduelle (R) aliphatique non polaire,

(3) la sérine (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) a été employée pour le groupe d'acides aminés avec chaîne R polaire,

(4) la lysine (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) a été utilisée pour représenter le groupe d'acides aminés avec chaîne R chargée positivement,

(5) le groupe d'acides aminés avec chaîne R aromatique n'a pas été suppléé en raison des coûts pour ces composés,

(6) l'acide ascorbique (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) a servi de substitut pour le groupe d'acides aminés avec chaîne R chargée négativement, et

(7) l'azide de sodium (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA, USA) a été ajouté pour servir d'agent de conservation.

Les deux vitamines retrouvées en quantité abondante dans le milieu artificiel, le chlorure de choline (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) et l'acide ascorbique (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada), ont été suppléées. Les autres ajouts effectués incluent le HEPES (Biomedia, Montréal, QC, Canada), l'albumine bovine (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada), le glucose (BDH, Toronto, ON, Canada), l'acide α-cétoglutarique (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada). Le tableau en annexe 3 compare la composition de la solution de relargage employée dans l'étude *in vitro* à la solution décrite dans la norme française.

Le pH de la solution de relargage finale a été ajusté soit à un pH de 7.4, soit à un pH de 4.

3.1.1.5 Dosage du TGF-ß1

Le dosage du TGF-ß1 est effectué par la méthode ELISA, *Enzyme-linked immunosorbent assay*. La sensibilité du kit ELISA pour le TGF-ß1 (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) est de l'ordre de 4 pg/mL avec une précision dans un même essai de 3.3-3.9% et entre essais de 7.7-13.4%. Le standard fourni, un recombinant de TGF-ß1 humain, permet un dosage sur une échelle de 15.6 à 1000 pg/mL de TGF-ß1. Afin de quantifier adéquatement le TGF-ß1, il a été dosé en duplicata, et parfois même en triplicata.

3.1.1.6 Dosage de l'albumine bovine

Plusieurs essais colorimétriques existent pour mesurer la concentration totale de protéines dans une solution. L'albumine étant souvent le standard de choix pour ces essais, les méthodes les plus courantes de Lowry et de Bradford sont donc recommandées.

L'essai protéique de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Ltd, Mississauga, Ontario, Canada) utilisé dans l'étude *in vitro* est basé sur la procédure de Bradford. L'intensité du produit coloré (*Coomassie Brilliant Blue G250* - acides aminés basiques ou aromatiques) résultant a été mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. Le dosage de concentrations connues de BSA a permis d'établir une courbe standard linéaire pour déterminer la quantité de BSA dans les échantillons. Le dosage a été accompli en duplicata.

3.1.1.7 Dosage de la gélatine

L'essai employé pour doser la gélatine dans les échantillons est une modification de la procédure de Lowry. Elle a été développée par Komsa-Penkova *et al.* (1996) pour le dosage du collagène et de la gélatine. Leurs modifications permettent la lecture d'une intensité plus élevée du composé bleu à 650 nm (au lieu de 600 nm), et éliminent la dépendance de la méthode de Lowry sur le pH des échantillons. Le dosage de concentrations connues de gélatine a permis de créer une courbe standard linéaire pour déterminer la quantité de gélatine dans les échantillons.

La méthode de Komsa-Penkova *et al.* (1996) permet la mesure de concentration de gélatine dans l'ordre de 20 à 500 µg/mL et offre une sensibilité d'environ 2 unités d'absorbance/mg/mL gélatine. L'essai a généralement été accompli en duplicata.

3.1.2 Expériences

3.1.2.1 L'adsorption du TGF-ß1 sur les particules de corail

Une étude factorielle préliminaire (4 facteurs, 2 niveaux, résolution IV) a permis de cibler les paramètres importants pour notre étude. Les facteurs qui ont été étudiés lors de cette étude incluent: (1) la taille des particules de corail (<80 µm et 300-450 µm), (2) le volume d'incubation (0.2 mL et 1mL), (3) le temps d'incubation (4 h et 24 h), et (4) le temps de relargage du TGF-ß1 (2 h et 24 h). Les résultats de cette série d'expériences (sans réplicata) ont démontré qu'après 4 et 24 h d'incubation, des quantités similaires de TGF-ß1 ont été adsorbées sur les particules de corail, à l'exception d'une plus faible adsorption sur les particules de 300-450 µm après 4 h comparé à 24 h. De plus après avoir testé l'effet de la concentration (10 ng/0.2 mL et 200 ng/0.2 mL) lors d'une expérience subséquente, nous avons découvert que le volume d'incubation et non la concentration de TGF-ß1 dans le milieu semblait réduire la quantité de TGF-ß1 adsorbée.

L'adsorption du TGF-ß1 sur les particules de corail a donc été accomplie sous un volume fixe de 0.2 mL et une incubation de 24 h à la température de la pièce avec une agitation de 30 rpm. En raison du coût, la concentration du TGF-ß1 a été fixée à 0.05 µg/mL. Les paramètres qui ont été variés sont résumés ci-dessous:

- Co-adsorbant: albumine bovine et gélatine
- pH du milieu: 3, 7.4 et 11
- Taille des particules: <80 µm (quantité: 0.0178 g)
  et 300-450 µm (quantité: 0.1661 g)

A la fin de l'incubation, le milieu a été centrifugé à 10000 x *g* pendant 10 minutes, et le surnageant a été conservé à –80°C pour le dosage du TGF-ß1. Les particules de corail ont été lavées avec 0.5 mL du même milieu d'incubation, puis recentrifugées pour conserver le deuxième surnageant. Les particules de corail ont été séchées partiellement avant de les

entreposer à 4°C jusqu'à l'étude de relargage. La quantité de TGF-ß1 adsorbée a été dosée par ELISA, en quantifiant le TGF-ß1 dans la solution initiale et dans les deux surnageants après 24 h d'incubation avec les particules.

3.1.2.2 La cinétique de relargage du TGF-ß1 des particules de corail

Les paramètres sélectionnées pour l'expérience d'adsorption du TGF-ß1 sur les particules de corail ont également été étudiés pour déterminer si leur effet pouvait influencer la cinétique de libération du TGF-ß1 (tableau 3.1). De plus, nous avons évalué l'effet du pH de relargage sur la cinétique de relargage, en choisissant le pH physiologique (7.4) et un pH de 4.0. Le milieu acide a été sélectionné pour simuler le pH acide dans les zones de résorption de l'os par les ostéoclastes (Oreffo *et al.*, 1989).

Tableau 3.1. Conditions expérimentales pour l'adsorption et le relargage du TGF-ß1 des particules de corail.

Tailles des particules (μm)	Co-adsorbant	pH d'adsorption	pH de relargage
<80	BSA	3	7.4
<80	BSA	7.4	7.4
<80	BSA	11	7.4
<80	gélatine	3	7.4
<80	gélatine	7.4	7.4
<80	gélatine	11	7.4
<80	gélatine	3	4.0
300-450	gélatine	3	7.4

Le jour suivant l'adsorption du TGF-ß1, les particules de corail ont été incubées dans le milieu de relargage (décrit à la section 4.1.1.4) à 37°C avec une agitation de 15 rpm. Le milieu de relargage a été changé à des intervalles de temps précis (1, 2, 4, 8 et 24 h, et 2, 4, 7, 10 et 14 jours) afin d'empêcher la saturation du TGF-ß1 dans le milieu. Le surnageant a été recueilli, après centrifugation à 10000 x *g* pendant 5 minutes, pour chaque temps de relargage puis conservé à –80°C jusqu'au dosage du TGF-ß1 par ELISA.

3.1.2.3 La dégradation des particules de corail dans le milieu de relargage

L'effet de la dégradation des particules de corail sur la cinétique de libération a été étudié en incubant les particules de corail à un rapport surface apparente:volume de solution fixe à 6 cm^2/mL (<80 µm: 0.0943g; 300-450 µm: 0.8850g) dans le milieu de relargage (8 mL), sous les mêmes conditions que l'étude de relargage. Les particules de taille <80 µm ont été dégradées à pH 4.0 et 7.4, tandis que les particules 300-450 µm ont été testées à pH 7.4 seulement. Les milieux ont été centrifugés 5 minutes à 3000 x *g* et les surnageants de chaque temps de dégradation ont été dosés pour la quantité de Ca^{2+} par spectroscopie par absorption atomique (Perkin Elmer, modèle 5000, États-Unis). Le corail étant composé d'environ 98% de carbonate de calcium, la quantité de calcium dans les milieux de relargage a donc servi d'indicateur du taux de dégradation du corail, après correction pour la quantité de calcium dans le milieu de relargage initial. La dégradation du corail a également été suivie par la mesure du pH de chaque surnageant.

3.1.2.4 L'adsorption des co-absorbants sur les particules de corail

Dans le but de mieux comprendre les phénomènes impliqués lors de l'adsorption du TGF-ß1 sur les particules de corail (<80 µm), une étude d'adsorption similaire à celle décrite à la section 4.1.2.1 pour le TGF-ß1 a été entreprise en n'incubant que les solutions d'albumine bovine et de gélatine à différents pHs avec les particules de corail, sous les

mêmes conditions. De plus, des solutions contenant les co-absorbants ont été incubées sans particules de corail, afin de corriger pour les pertes de protéines au cours de l'étude. La solution initiale ainsi que les deux surnageants avec l'albumine ont été dosés par l'essai protéique de Bio-Rad (section 4.1.1.6). De même, les solutions de gélatine ont été quantifiées par la méthode de Komsa-Penkova *et al.* (1996) (section 4.1.1.7). Les triplicatas de chaque expérience ont été dosés la journée même de la fin de l'incubation.

3.2 Étude *in vivo*

3.2.1 Modèle animal

Nous avons choisi comme modèle animal, pour les deux études *in vivo*, le tibia allongé de lapins. Ce modèle a été développé et utilisé par le Dr Hamdy lors d'expériences antérieures (Amako *et al.*, 2001). La comparaison des résultats a été faite avec un groupe d'animaux contrôles (sans traitement) qui ont été faits lors d'une autre étude par le Dr Hamdy à l'hôpital des enfants de Montréal (Amako *et al.*, 2001). Les animaux sont tous des lapins blancs de la Nouvelle Zélande pesant initialement entre 2 à 3.5 kg.

3.2.1.1 Fixateur externe

Le design du fixateur a été basé sur le modèle du fixateur uniplanaire M-100 de Orthofix Inc. (Verona, Italie). Le matériel principal employé pour le système de fixation est du titane de grade 7. Il est composé de deux tiges guides sur lesquelles deux boîtiers permettent de fixer le fixateur aux tiges, et peuvent être déplacées par un mécanisme de vis. Quatre tiges (deux par boîtiers) filetées jusqu'à mi-hauteur approximativement sont employées, tel qu'illustré à la figure 3.1.

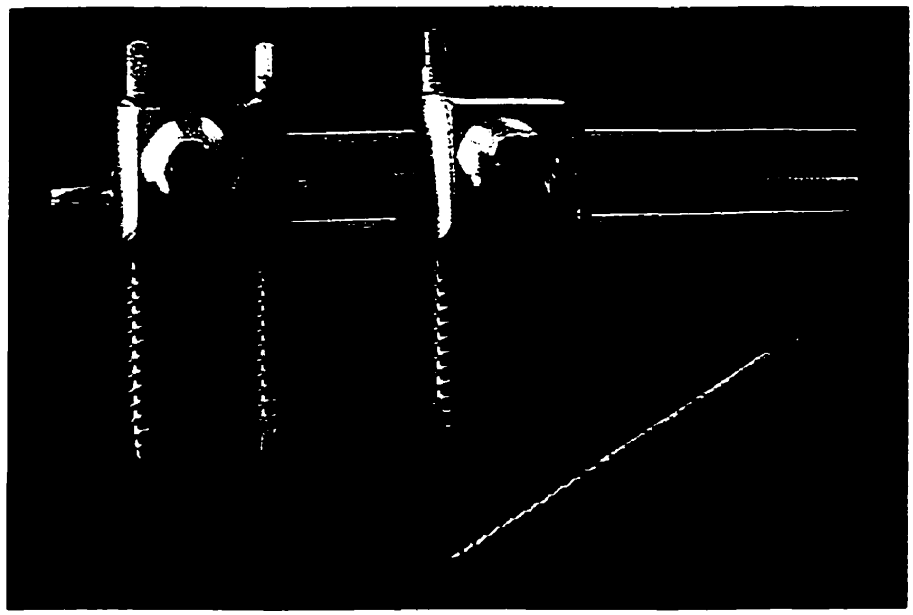

Figure 3.1. Fixateur externe avec les tiges mi-filetées employé pour l'allongement des tibias de lapins.

3.2.1.2 Protocole opératoire

Les lapins ont été achetés de Charles Rivers (Québec, Canada) de quelques jours jusqu'à plus d'une semaine avant la chirurgie afin de permettre une adaptation au nouvel environnement. Les lapins ont été mis à jeun pour une période de 12 à 24 h précédent la chirurgie.

Préparation: Les lapins ont reçu une anesthésie générale, administrée par une injection intramusculaire de 30 mg/kg de kétamine, 0.05 mg/kg d'acépromazine et 0.4 mg/kg de butorphanol. Après environ 15 minutes, la xylocaine, un relaxant musculaire, a été atomisée dans la trachée du lapin afin d'insérer un tube endotrachéal (2.5-3.0 cm diamètre interne). L'anesthésie a été maintenu pendant la chirurgie par l'administration d'un mélange gazeux d'isoflurane (2 à 3.5%) et d'oxygène (1 à 1.5 mL). Le lapin a

également reçu un antibiotique par voie intramusculaire (20 mg/kg enrofluoxacin). Un lubrifiant (LacriLube) a été appliqué sur les yeux des lapins pour les conserver humides pendant la procédure chirurgicale. Le membre inférieur droit des lapins a été rasé au niveau du tibia et du fémur, puis désinfecté [figure 3.2 (A)].

Chirurgie: La chirurgie a toujours été faite sous conditions stériles (jaquette, casque et masque). La première étape consiste en la pose des quatre vis du fixateur, en débutant par la position la plus distale sur le tibia [figure 3.2 (B)]. Une légère incision a été effectuée dans les tissus mous puis le premier trou a été percé (perceuse chirurgicale avec une mèche de 0.49-0.51 pouce de diamètre). La tige mi-filetée a ensuite été vissée dans le tibia, en prenant garde de ne pas induire de fissures dans l'os lors de l'entrée et de la sortie de chaque cortex. Les autres tiges ont été insérées de la même façon en se servant du fixateur comme guide [figure 3.2 (C)]. Les tiges ont été insérées de la position la plus distale à la plus proximale puis vers l'intérieur de proximal à distal.

Suivant la pose des tiges mi-filetées, le fixateur a été enlevé pour couper l'os. Le tibia a premièrement été exposé et sous préservation du périoste et irrigation de l'os, une ostéotomie entre les tiges du centre a été faite à l'aide d'une scie oscillatoire [Figure 3.2 (D)]. Dans les cas où une fissure de l'os s'était produite, un cerclage avec un fil métallique mince était posé autour de la région affaiblie. Les deux extrémités osseuses ont été ensuite alignées de façon à remettre l'os dans sa géométrie initiale, et en même temps, le fixateur a été fixé aux vis. Le site a enfin été irrigué avec une solution saline et refermé avec du fil de suture dégradable. Les lapins ont reçu une dose intramusculaire de 0.3 mL de buprénorphine après la chirurgie et le matin suivant, pour la douleur.

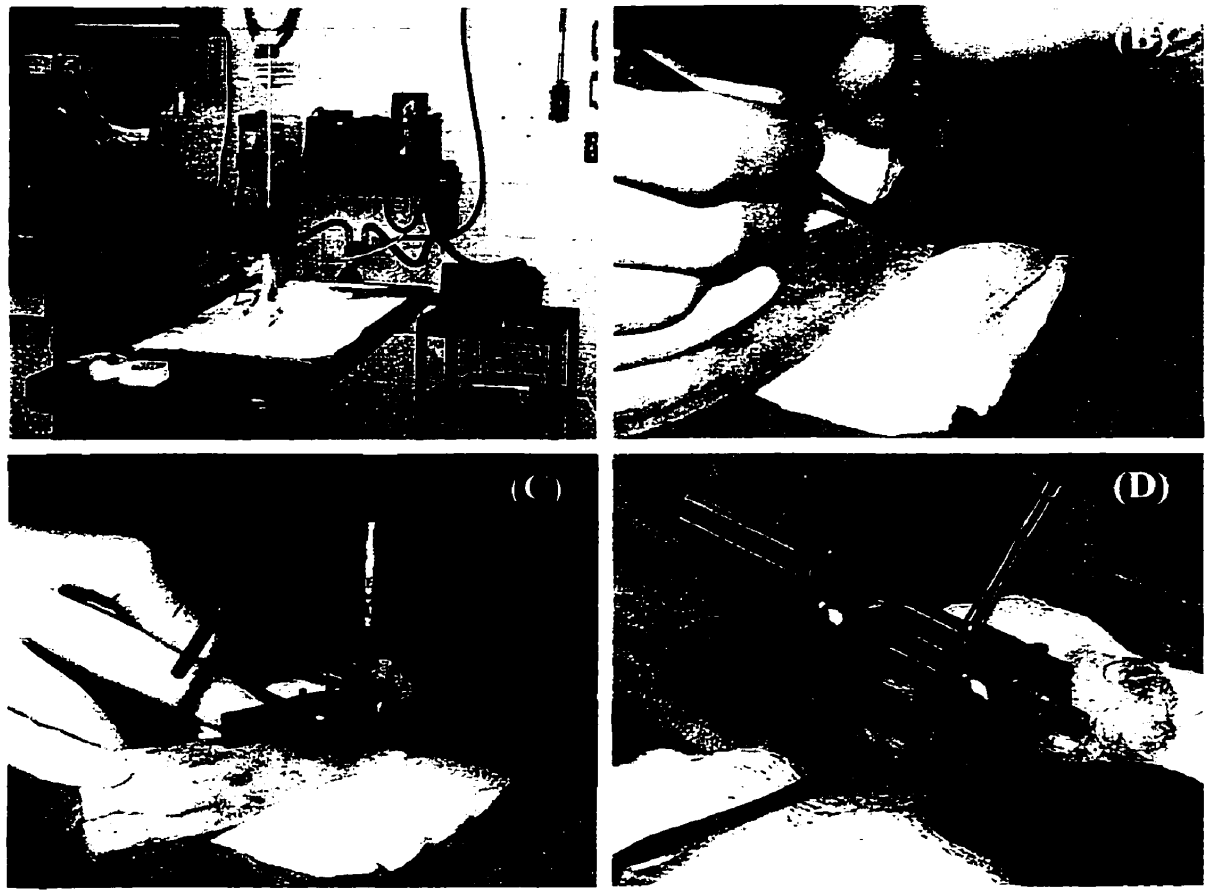

Figure 3.2. Photos de la chirurgie. (A) Le lapin est sous anesthésie générale durant la procédure, et la patte droite est rasée et stérilisée. (B) La première tige mi-filetée du fixateur est posée dans le tibia en position distale. (C) Le fixateur sert de guide pour la pose des trois autres tiges dans le tibia. (D) L'ostéotomie est faite, les segments osseux réalignés et le fixateur reposé avant de fermer le site.

3.2.1.3 Protocole Expérimental

Un total de 47 lapins ont fait partie de cette étude. Les lapins ont été répartis dans le tableau 3.2 selon les groupes et les tests effectués pour évaluer la consolidation des tibias.

Tableau 3.2. Nombre de lapins dans les groupes expérimentaux et répartis selon les analyses à la fin du protocole.

Tests	Groupe Contrôle	Groupe TGF-ß1			Groupe Corail
		0.3 μg	0.6 μg	1.2 μg	
Analyses histologiques	1	2	2	2	2
Analyses mécaniques	10	7	7	6	8

Les expériences avec les lapins dans le groupe contrôle ont été faites au cours d'une étude antérieure du Dr Hamdy à l'hôpital des enfants de Montréal (Amako *et al.*, 2001).

Suivant la chirurgie, il y a eu une période de latence de 7 jours, durant laquelle les lapins pouvaient boire, manger et se déplacer librement dans leur cage. L'allongement du tibia a débuté le huitième jour après la chirurgie pour une période de 21 jours à un taux de distraction de 1 mm/jour, réparti sur deux fois (8-9h et 16-17h). La journée suivant la fin de la distraction, les lapins dans les groupes appropriés ont reçu une injection de TGF-ß1 ou de particules de corail au centre du site allongé dans la partie translucide sur les radiographies. Afin de s'assurer de la bonne position de la seringue, l'insertion de l'aiguille a été faite sous fluoroscopie et une radiographie a été prise du site. La même personne a fait toutes les injections, en essayant d'injecter les solutions dans tous les coins du site allongé. Les lapins du groupe contrôle n'ont pas reçu d'injection.

Après l'injection, les lapins ont été conservés 21 jours pour permettre une consolidation de leur tibia allongé, avant de les euthanasier par une injection intraveineuse d'Euthanyl. Le joint des genoux droit et gauche des lapins a ensuite été désarticulé pour effectuer les analyses sur les tibias.

Les lapins ont été examinés régulièrement, au cours des 7 semaines des études, pour des signes d'infection, de douleur ou de perte de poids. Lorsque les lapins montraient des signes de se lécher le dessus d'une patte, celle-ci était nettoyée et un bandage épais était appliqué pour prévenir la mutilation du membre. Dans un cas extrême, un collet Élizabethéen a dû être utilisé.

3.2.1.4 Préparation des seringues

Seringues de TGF-ß1

Le TGF-ß1 de plaquettes humaines (VWR Canlab, Mississauga, ON, Canada) a été premièrement dilué dans une solution de 4 mM HCl avec 0.5% de gélatine. Cette solution de travail a ensuite été diluée dans du tampon Ringer avec dextrose (BDH, Toronto, ON, Canada) et gélatine de peau de porc (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) pour fabriquer des seringues de 0.3, 0.6 et 1.2 µg de TGF-ß1 dans 1 mL de Ringer au lactate avec 5% de dextrose et 0.25% de gélatine. Les seringues ont toujours été préparées sous conditions stériles et conservées à –20°C. Elles ont généralement été préparées dans la semaine précédent l'injection dans les tibias.

Seringues de particules de corail

Les particules de corail <80 µm ont été reçues stériles de la compagnie Inoteb. Ils effectuent leur stérilisation par radiation gamma (2.5 Mrad).

Les particules ont été pesées (0.1365g) sous conditions stériles et mélangées à une solution de 0.6 mL 20 mM d'acétate de sodium avec 1% de gélatine à pH 7.4. La formation d'un gel a ensuite été réussi en mettant les seringues à 4°C jusqu'à ce que la gélatine fige. Afin de garder les particules en suspension et bien les distribuer dans le gel, les seringues ont été mises en rotation lors de la formation du gel. La quantité de corail

employée a été déterminée par essais et erreurs jusqu'à l'obtention d'une bonne suspension de particules dans le milieu de gélatine, capable d'être en plus injectée. Le produit final est montré à la figure 3.3. Les seringues ont en général été préparées 3 à 4 jours au plus avant l'injection et conservées entre temps à 4°C.

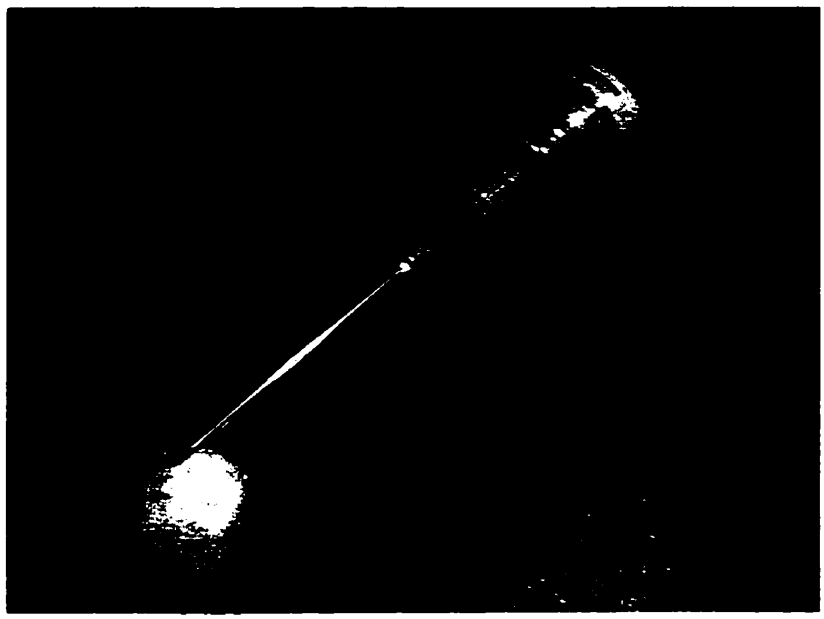

Figure 3.3. Image du système d'injection à base de particules de corail et de gélatine.

3.2.2 Techniques d'évaluation de la consolidation du tibia allongé

3.2.2.1 Densité minérale osseuse

Il existe plusieurs techniques qui mesurent la densité minérale osseuse: les techniques à base de radiation non-ionisante [ultrasonographie quantitative (QUS)], et les techniques à base de radiation ionisante, tels la radiation gamma [absorptiométrie à photon simple ou double énergie (SPA ou DPA)] et les rayons X [absorptiométrie radiographique, absorptiométrie à rayons X simple ou double énergie (SXA ou DEXA), et tomographie quantitative (QCT)]. A l'exception de la tomographie et l'ultrasonographie, toutes les

techniques ont recours à une mesure de la projection bi-dimensionnelle du membre et nécessitent donc souvent la prise de plus d'une vue pour bien analyser les défauts osseux. Les techniques couramment employées incluent l'absorptiométrie radiographique, le DEXA, le QCT et le QUS (Mirsky et Einhorn, 1998).

L'absorptiométrie radiographique est souvent employée car aucun équipement spécialisé n'est nécessaire et les coûts d'opération sont relativement bas (Mirsky et Einhorn, 1998). La technique est cependant limitée par la résolution des films radiographiques et la diffusion de l'image. De plus, la mesure correspond plus au contenu minéral osseux qu'à la densité minérale osseuse (Mirsky et Einhorn, 1998; Markel et Chao, 1993).

La technique du DEXA est en fait dérivée des techniques à radiation gamma, la SPA et la DPA. L'utilisation d'une source rayons X a permis d'améliorer la résolution spatiale, d'augmenter la vitesse des scans et de réduire la radiation émise (Peterson, 2000). Les mesures prises par DEXA ont cependant le gros désavantage d'être moins représentatives des propriétés mécaniques de l'os, comparé au QCT, et de ne pas permettre la différenciation entre l'os trabéculaire et l'os cortical (Jarvinen *et al.*, 1998;Wood *et al.*, 1998; Markel *et al.*, 1990; Mirsky et Einhorn, 1998). La technique tridimensionnelle QCT demeure la méthode la plus précise et fiable qui donne une représentation valide de la densité minérale osseuse. La méthode est cependant moins exacte lors de la mesure de l'os trabéculaire comparé au DEXA, est dispendieuse, émet une dose de radiation plus élevée et est affectée par la présence d'appareils métalliques (Peterson, 2000; Hughes *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999; Mirsky et Einhorn, 1998).

Enfin l'ultrasonographie quantitative mesure la vitesse du son ainsi que l'atténuation des ultrasons dans l'os afin de déterminer la densité et l'élasticité osseuses (Peterson, 2000). La technique est relativement simple, peu coûteuse, facile à implanter et n'émet pas de radiation comparé aux autres techniques (Mirsky et Einhorn, 1998). Des études ont cependant démontré que les mesures ultrasonographiques correspondent aux propriétés

mécaniques d'un os allongé seulement au début de l'allongement (Hughes *et al.*, 1994; Hamdy *et al.*, 1995.

En raison de l'inaccessibilité de la plupart de ces techniques d'évaluation de la densité minérale osseuse à la faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe, le suivi a été fait quotidiennement par radiographie, et une fois euthanasiés, les membres droits et gauches des lapins ont pu être transportés à l'hôpital Shriners pour effectuer une analyse par DEXA.

Radiographies

Des vues cranio-caudales et obliques du tibia droit ont été prises avant et après la chirurgie ainsi qu'à toutes les semaines suivant la chirurgie jusqu'au jour du sacrifice. La journée de l'euthanasie du lapin, les deux vues ont aussi été prises sur le tibia gauche pour fin de comparaison.

Toutes les radiographies ont été enregistrées sur du film à mammographie (Fuji HR Mammo Fine 314247). Le système radiographique a été positionné avec les paramètres 46 kvp (vue oblique) et 48 kvp (vue cranio-caudale), 9.0 MAS et 40" hauteur pour les prises de vues du tibia droit avant la chirurgie. En tout autre temps, les paramètres ont été fixés à 49 kvp (vue oblique) et 51 kvp (vue cranio-caudale), 9.0 MAS et une hauteur de 40".

DEXA

Les mesures par DEXA ont été effectuées sur le tibia allongé droit et le tibia contrôle gauche de tous les lapins après euthanasie. Les analyses ont été faites avec les tissus mous intacts, en employant le système QDR 2000 (Hologic Inc., Waltham, MA, États-Unis). Les mesures du contenu minéral osseux (BMC) et de la densité minérale osseuse

(BMD) ont été prises pour la région allongée du tibia droit et la région correspondante sur le tibia gauche, ainsi que des régions proximales et distales de ce site (figure 3.4). Le système a été programmé pour mesurer sur une longueur de 18.87 cm (la longueur maximale) en mode résolution régionale haute du menu pour les petite animaux.

Les mesures ont été faites en positionnant le tibia du lapin au centre de la table dans le sens de la longueur parallèle à celle de la table de mesure et avec le pied du lapin vers la tête de la table. Le tibia a aussi été placé de façon à ce que la référence laser tombe au centre du long axe du tibia. L'analyse a été débutée de la partie proximale du tibia. Le BMC est rapporté en grammes et le BMD en grammes par centimètre carré.

Après l'analyse par DEXA, les spécimens ont été soit congelés à –20°C pour les tests mécaniques ou soit traités immédiatement pour l'histologie et l'histomorphométrie.

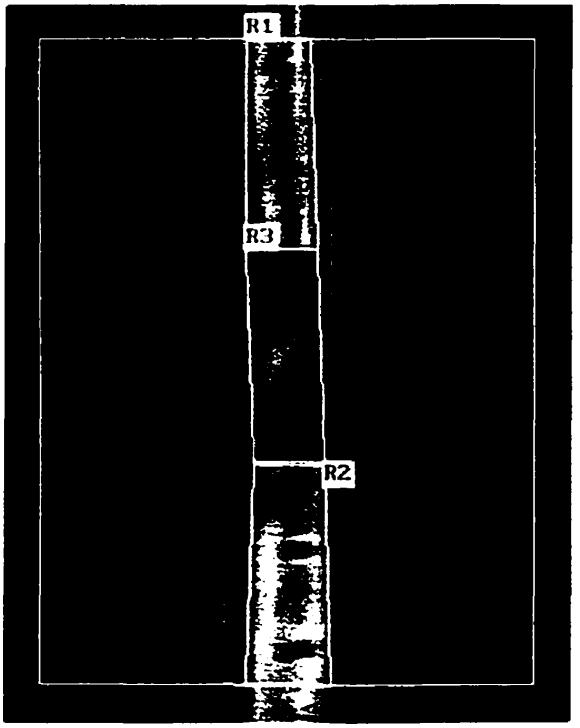

Figure 3.4. Exemple d'image obtenue par le système DEXA. Le site allongé (R3) et les régions proximales (R1) et distales (R2) sont analysés pour le BMC et la BMD.

3.2.2.2 Histologie

Dans la même journée suivant l'euthanasie des lapins et la mesure de la BMD, les tissus mous du tibia allongé ont été disséqués puis le tibia a été coupé à l'aide d'une scie entre les deux vis proximales et entre les deux vis distales. Les spécimens ont été par la suite mis dans la formaline 10% tamponnée pour la fixation à 4°C.

Après une semaine, les spécimens ont été lavés durant la nuit dans une solution 10% de sucrose dans 0.01M de tampon phosphate à pH 7.4. La journée suivante, les spécimens ont été déshydratés pendant 1 h à 4°C dans chaque solution suivante: (1) 70% d'acétone, (2) 90% d'acétone, (3) 100% d'acétone, répété trois fois. Les spécimens ont ensuite été imprégnés de xylène pendant 1h à 4°C puis laissés environ 12 h à 4°C dans une solution de xylène:méthyl méthacrylate (1:1). Les spécimens ont été transférés dans une solution de méthyl méthacrylate:*n*-butyl méthacrylate:peroxyde de benzoyle asséché (40:60:2) et laissé durant la nuit à 4°C.

La polymérisation des spécimens a été réalisée dans une solution de (méthyl méthacrylate avec 2% en masse de peroxyde de benzoyle):(*n*-butyl méthacrylate avec 2% en volume de polyéthylène glycol et 1% en volume de *N,N*-diméthyl-p-toluidine) (2:3) pendant environ 2 jours à –20°C. Le peroxyde sert de catalyseur pour la polymérisation du spécimen dans le méthacrylate. Une fois la polymérisation réalisée, les spécimens ont été coupés grossièrement avant de faire des sections de 6 µm d'épaisseur des spécimens polymérisés, à l'aide d'un microtome Polycut E (Reichert-Jung, Heidelberg, Allemagne). Les sections ont été posées sur des lames et séchées durant la nuit à 60°C. Enfin les sections ont été mises 24 h dans le toluène puis colorées au Trichrome de Goldner avec une contre-coloration au bleu de toluidine.

3.2.2.3 Histomorphométrie

Les sections histologiques ont été analysées avec un microscope Polyvar (Reichert-Jung, Heidelberg, Allemagne) à un grossissement de 80x, et relié à une table de numérisation. Le logiciel Osteomeasure (Osteometrics, Atlanta, GA) a permis la quantification des volumes de tissu fibreux, de fibrocartilage, de cartilage et d'os dans le site allongé. La figure 3.5 donne un exemple d'une analyse histomorphométrique.

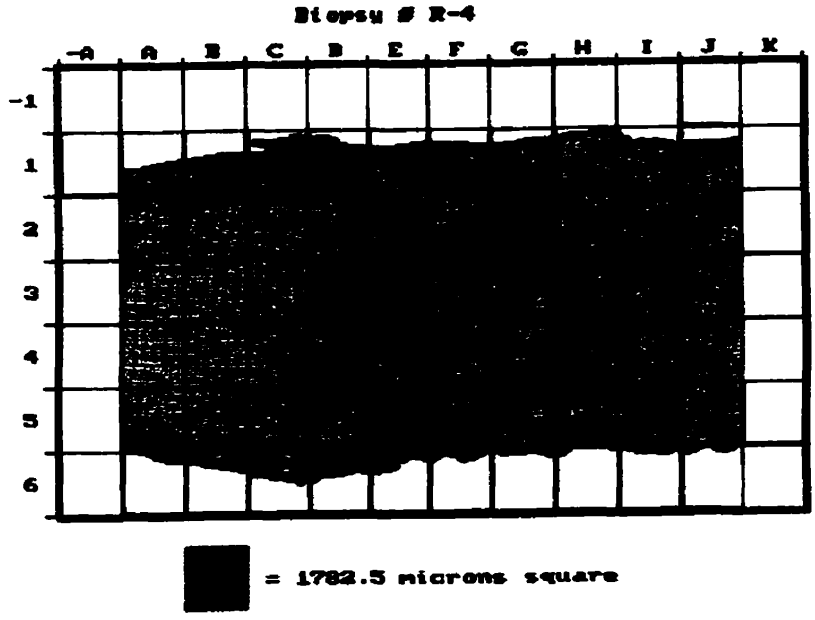

Figure 3.5. Image d'une section histologique d'un tibia allongé de lapins analysée par histomorphométrie. Le tissu osseux est coloré en bleu, le tissu fibreux en pointillés marrons, le tissu cartilagineux (cartilage et fibrocartilage) en rose, et la moëlle osseuse par une coloration grise.

3.2.2.4 Tests mécaniques

En général, un os long ressent des contraintes plus fréquemment en flexion qu'en torsion, en tension ou en compression (Black *et al.*, 1984). Plusieurs chercheurs testent donc les propriétés mécaniques d'os fracturés ou allongés par des tests de flexion 3 points et 4 points. Ce type de test dépend fortement de la géométrie originale de l'os, un paramètre très variable selon l'espèce et l'âge des spécimens. Le test de flexion devient donc largement dépendant de l'expertise et de l'orientation des spécimens à tester (Black *et al.*, 1984). Tout comme le test de flexion, le test de torsion dépend de l'orientation du spécimen et de son moment d'inertie. De plus, un test de torsion transmet de l'information sur les propriétés de cisaillement du spécimen et non d'élasticité comme les tests de flexion, traction ou compression (Walsh *et al.*, 1984). Un test de traction uniaxial devrait en principe donner des résultats plus reproductibles et devrait être plus représentatif des propriétés mécaniques du cal osseux et de la qualité des tissus (Black *et al.*, 1984). De façon pratique cependant la variabilité intrinsèque des spécimens cause souvent une grande variabilité dans les résultats obtenus. Les fissures induites lors de la chirurgie, les variations mécaniques entre fixateurs, et les différences ambulatoires et de charges appliquées sont toutes des sources de variation (Walsh, *et al.*, 1984).

Le test de traction fut néanmoins choisi pour évaluer les propriétés mécaniques des os allongés après trois semaines de consolidation. La mesure de rigidité permet de déterminer si la consolidation osseuse est suffisante pour enlever le fixateur, tandis que la force ultime semblerait servir plutôt d'indicateur des niveaux auxquels les processus de régénération et de remodelage osseux sont rendus (Black *et al.*, 1984).

Protocole

Les tibias droit et gauche ont généralement été dégelés à 4°C durant la nuit précédant la journée des tests mécaniques. Après la dissection des tissus mous, les bouts proximal et

distal des tibias ont été empotés dans du polyméthylmétacrylate (PMMA) (Fluide pour base dentaire, DenPlus Inc., Montréal, Québec, Canada), à l'aide de moules cylindriques (6.2 cm diamètre externe, 5.3 cm diamètre interne, 5.3 cm longueur) en plexiglass. Pour augmenter la prise du PMMA, un petit fil Kirchner (1.6 mm) a été inséré dans les deux bouts du tibia pour la série de lapins dans le groupe contrôle. La technique a ensuite été améliorée en enroulant un fil de cuivre (1.77 mm) sur la partie distale seulement des tibias des lapins dans les groupes ayant reçu une injection de corail ou de TGF-ß1. En général, seulement le trou de vis le plus distal du tibia était empoté dans le PMMA, laissant ainsi 6 à 8 cm de la partie os-cal-os du tibia libre entre les sections empotées. Une radiographie en vue latérale a été prise avant chaque test afin de s'assurer que l'os était bien empoté.

Les parties empotées du tibia ont ensuite été fixées dans des supports permettant un mouvement xyz libre de l'os lors du test de traction avec le système MTS-858 Mini Bionix (MTS Systems Corporation, Eden Prairie, MN, É-U). Les tibias ont reçu une tension uniaxiale avec un déplacement contrôlé de 0.1 mm/sec jusqu'à la fracture de l'os. Le logiciel Teststar-SX a été employé pour la configuration du système MTS et le logiciel Testware pour le protocole. La force ultime (charge exercée à la brisure de l'os), et la rigidité (tangente de la section linéaire de la courbe charge-déplacement) ont été déterminées à partir des données du test de traction, tel qu'indiqué à la figure 3.6.

3.3 Analyses statistiques

La détermination des effets des paramètres sur les cinétiques de relargage *in vitro* a été faite par des tests d'analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées. Toutes les autres analyses *in vitro* ont été accomplies par ANOVA simple. Un test student pairé ou nonpairé selon le cas a été employé pour comparer les groupes lorsqu'il y avait un effet.

Pour les études *in vivo*, les différences entre les groupes ont été évaluées par un ANOVA simple et les différences entre groupes ont été par la suite comparées par un test de student pairé ou nonpairé selon le cas. Les résultats pour l'histomorphométrie n'ont pas pu être comparés statistiquement en raison du petit nombre de spécimens. Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel Statview ou par Excell. Les résultats ont été considérés significativement différents pour un $p<0.05$.

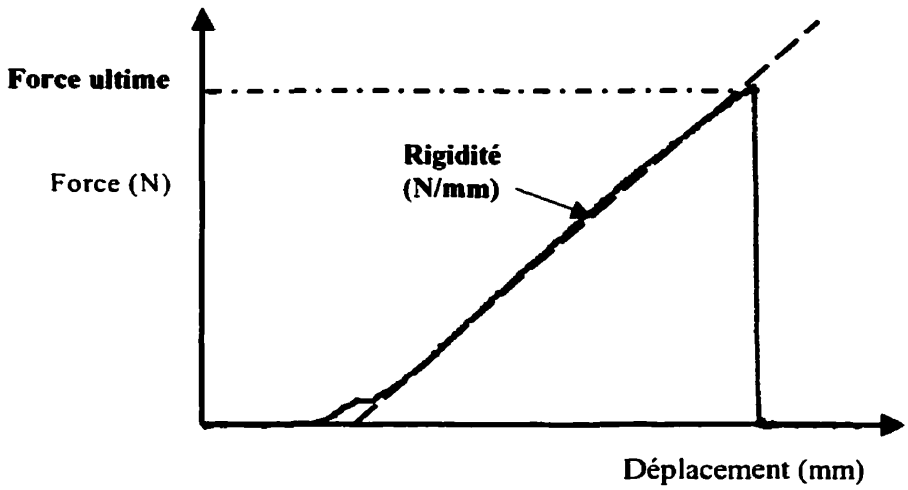

Figure 3.6. Exemple de courbe force-déplacement obtenue pour un test de traction sur un tibia de lapins.

CHAPITRE 4. Effect of experimental parameters on the *in vitro* release kinetics of transforming growth factor ß1 from coral particles

Notre première étude a permis de mieux définir le comportement *in vitro* des particules de corail comme système de libération du TGF-ß1 dans un fluide osseux artificiel. Nous avons étudié l'effet de différentes conditions d'adsorption (co-adsorbant et pH) du TGF-ß1 sur les particules de corail, de la taille des particules et du pH de relargage sur la libération du TGF-ß1 pendant 2 semaines. Nos résultats sont présentés dans ce chapitre sous forme d'un article intitulé "Effect of experimental parameters on the *in vitro* release kinetics of transforming growth factor ß1 from coral particles", qui a été soumis au *Journal of Biomedical Materials Research.*

Nous avons observé que des quantités semblables de TGF-ß1 étaient adsorbées sur les particules de corail, indépendamment des conditions expérimentales. Cependant, l'albumine seule, un co-adsorbant présent lors de l'adsorption du TGF-ß1, étaient adsorbée 2 à 4 fois plus que la gélatine sous les mêmes conditions (selon le pH du milieu). Ces résultats qui confirment ceux obtenus par Volpi (1999) sur l'adsorption des glycosaminoglycanes, indiquent que le corail établit principalement des interactions électrostatiques avec les molécules environnantes. Nos résultats ont également démontré que la cinétique de libération du TGF-ß1 des particules de corail consistait en trois phases distinctes: (1) une libération rapide dans la première heure de relargage, associée au TGF-ß1 en surface et interagissant peu avec le corail, (2) une diminution de la vitesse de libération pendant les 24 h suivantes, puis (3) une libération à un taux constant jusqu'à la fin des deux semaines étudiées. Pendant la dernière phase, la libération du TGF-ß1 semble dépendre principalement de la vitesse de diffusion du TGF-ß1, puisque le corail se dégrade peu sous ces conditions. La quantité de TGF-ß1 libérée augmente en présence d'albumine, comparé à la libération de TGF-ß1 en présence de gélatine. La libération du

TGF-ß1 est également plus lente avec les particules de grande taille. Ces résultats permettent de conclure que les particules de corail adsorbent et libèrent *in vitro* le TGF-ß1 sur une période de plus de deux semaines. De plus, la cinétique peut être modifiée selon les conditions d'adsorption et la taille des particules. Le corail a donc le potentiel d'être un puissant système de relargage *in vivo*.

Effect of experimental parameters on the *in vitro* release kinetics of transforming growth factor ß1 from coral particles

Caroline Demers[1], Maryam Tabrizian[2], Alain Petit[3], Reggie C. Hamdy[4] and L'Hocine Yahia[1]

[1] BBRG, Department of Mechanical Engineering, Ecole Polytechnique, Montréal, QC H3C 3A7, Canada

[2] Department of Biomedical Engineering, McGill University, Montréal, QC H3A 2B4, Canada

[3] Division of Orthopaedic Surgery, McGill University, Lady Davis Institute for Medical Research, Montréal, QC H3T 1E2, Canada

[4] Shriners Hospital for Children, Montreal Children Hospital Research Institute and Department of Orthopaedics, McGill University, Montréal, QC H3G 1A6, Canada

Corresponding author:
Caroline Demers
Biomechanics and Biomaterials Research Group - Biomedical Engineering Institute - École Polytechnique - P.O. Box 6079, Station Centre-ville – Montréal, QC H3C 3A7, Canada - Telephone: (514) 340-8222 ext. 5287 - Fax: (514) 340-4611, - E-mail: cndemers@hotmail.com

4.1 Abstract

Coral bone graft substitutes have been supplemented in the past with growth factors to further enhance bone regeneration in defects. Little is known however on the dynamics of protein release from coral. Coral particles were studied for their ability to release transforming growth factor beta 1 (TGF-ß1) *in vitro*, under different adsorption conditions. Adsorption of TGF-ß1 (0.05 µg/mL) on coral particles (<80 µm or 300-450 µm) after 24 h of incubation was high, regardless of conditions. TGF-ß1 release kinetics in an artifical bone fluid followed a specific profile: an initial 1 h protein burst, followed by a decreasing release during the next 24 h at which time the release increased again to reach a constant rate until the end of the 2-week study. The protein release rate appeared mainly depend upon the diffusion of TGF-ß1. TGF-ß1 release from coral particles was enhanced in the presence of bovine serum albumin (BSA) compared to the release in the presence of gelatin, and was dependent on the pH of adsorption. The highest total TGF-ß1 release was obtained when adsorption occurred with BSA at pH 7.4 (82±3%), while the lowest release was observed when adsorption was done in the presence of gelatin at pH 11 (38±1%). TGF-ß1 release was also found to vary with particle size, higher release being obtained with the smaller particles. These results suggest that coral particles could be used as a delivery system for growth factors and that the release rate may be modulated through modification of the adsorption conditions and coral particle size.

Key words: coral particles; transforming growth factor beta 1; protein adsorption; growth factor delivery system; coral degradation

4.2 Introduction

A number of materials, including polymers, ceramics, metals and naturally-derived materials, have been developed and tested to serve as an alternative to autogenous bone grafts[1]. Many have been shown to possess the required properties of osteoconductivity, biodegradability and biocompatibility, but fail to be osteoinductive like autogenous bone grafts which are known to contain growth factors and to some extent, stem cells[2]. To counter the intrinsic limitations of these materials, researchers have been combining biomaterials with growth factors and/or bone marrow cells.

Coral is an interesting biomaterial since it is derived from the exoskeleton of natural madreporic corals. The exoskeleton of some of these marine species also has a porosity similar to either cancellous or cortical bone, and is edified by cells reminiscent of those in bone[3]. Coral exoskeletons are structural matrices with adequate initial mechanical properties, and inherent properties of osteoconduction, bioresorption and biocompatibility but not osteoinduction[4-7]. An extensive amount of information has been acquired on the properties of coral as a bone graft substitute from the experimental investigations started since the early 1970s and from its application in clinical setting since 1979[8,9]. Except for contraindications in certain bone regions where high mechanical loads occur, coral grafts have been successfully used when adequately applied as per the manufacturer's instructions (for review see 10). Like most biomaterials, the coral graft should be chosen with a porosity that ideally allows the coral degradation rate to match the bone formation rate. Lately, researchers have combined coral grafts with growth factors[11-13] and/or with bone marrow cells[13] to accelerate the bone repair process. Although coral appears to allow growth factors to enhance bone formation, none of the published papers have reported on the properties of coral as a delivery system for growth factors. Only Volpi has recently demonstrated that glycosaminoglycans are adsorbed on coral granules mainly by electrostatic interactions between the coral calcium sites and the glycosaminoglycan polyanion sites, in a charge density- and pH-dependent manner[14].

The purpose of the present study was to establish *in vitro* the ability of coral to time-dependently release growth factors such as transforming growth factor beta 1 (TGF-ß1), and to identify factors capable of modulating the release profiles. TGF-ß1 is a 25 kDa, disulfide-linked homodimer of the TGF-ß superfamily expressed by many different cells. In bone, high levels of mRNA TGF-ß1 are predominantly expressed by active osteoblasts and nondifferentiated chondrocytes[15]. This multifunctional growth factor plays an important role in the immune system, as well as in the regulation of cell activity, i.e. migration, proliferation, differentiation and extracellular matrix synthesis[15-17]. Overall, TGF-ß1 is believed to play a role in the development, the regeneration and the remodeling of bone[15-16].

In the present study, we measured the effect of coral particle size, co-adsorbant, pH of adsorption and pH of release on the TGF-ß1 release kinetics from coral. The *in vitro* release profiles of TGF-ß1 were also compared to the rate of coral degradation in order to better understand the mechanism of release.

4.3 Materials and Methods

4.3.1 Materials

Coral particles (*Porites*, Inoteb, Saint-Gonnery, France) of <80 µm and 300-450 µm sieve size were chosen for this study. Image analysis (ImageTool 2.00, UTHSCSA, San Antonio, Texas, USA) of scanning electron micrographs show that more than 75% of the smaller-sized particles are in the 0-30 µm range while larger-sized particles are in the 300-500 µm range [Fig. 4.1]. These larger particles are more elongated (roundness: 0.4-0.8) and some have retained their porosity unlike the <80 µm particles which are more spherical (roundness: 0.5-1.0) and appear to have a higher surface roughness.

TGF-ß1 isolated from human platelets (VWR Canlab, Ville Mont-Royal, Québec, Canada) was reconstituted with 36% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid to a concentration of 5 µg/mL and kept at –80 °C. Bovine serum albumin (BSA), gelatin from pork skin, choline chloride, ascorbic acid, α-ketoglutaric acid, glycine, lysine and serine were all purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). The HAM-F10 media and HEPES buffer were obtained from Biomedia (Drummondville, Québec, Canada). All tubes (Fisher Scientific Canada Ltd, Nepean, Ontario, Canada) and pipette tips (VWR Canlab) used for experiments with TGF-ß1 were made of siliconized polypropylene to reduce TGF-ß1 losses. The TGF-ß1 ELISA kits were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, Québec, Canada).

4.3.2 Adsorption

Stock TGF-ß1 solutions (5 µg/mL) were first diluted with 36% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid to a concentration of 334 ng/mL, then further diluted with the co-adsorbant (0.1% BSA or 0.1% gelatin) in distilled deionized water (ddH_2O) at pH 3, pH 7.4 and pH 11 to a concentration of 50 ng/mL. Coral particles were incubated with 200 µL of TGF-ß1 solutions for 24 h at room temperature (R.T.) under agitation (30 rpm). The quantities of coral particles used were based on the amount required to have a constant surface area to volume (SA/V) ratio of 6 cm^2/mL for the release study (based on the average diameter of each particle group and on the assumption that particles were spherical). At the end of the 24 h incubation, coral particles were centrifuged at 10000x*g* for 10 min at R.T. and washed with the appropriate adsorption solutions, before partial drying by air and storage at 4°C overnight. The amount of TGF-ß1 in the initial TGF-ß1 solutions, and in the supernatants after incubation and washing was quantified by ELISA.

The co-adsorbants in 200 µL ddH_2O at different pHs with <80 µm coral particles were also prepared as for the TGF-ß1 adsorption experiment in order to discern the proteins implicated in the adsorption and release of TGF-1 from coral particles. The supernatants

of the BSA samples were assayed for the quantity of protein using the Bio-Rad protein assay protocol (Bio-Rad Laboratories Ltd, Mississauga, Ontario, Canada). The supernatants of the gelatin samples were assayed using a modified Lowry method[18]. For each experiment, controls were set up with 0.1% BSA or 0.1% gelatin solutions to allow for corrections of protein losses in the system.

4.3.3 Release kinetics

The day following TGF-ß1 adsorption, coral particles were incubated in 1.5 mL of release media at 37°C under agitation (15 rpm). The release media consisted of an artificial bone fluid based on the French norm NF S 90-701: 1988[19]. This media was composed of a HAM-F10 culture media supplemented with 20 mM HEPES, 0.35 mM choline chloride, 5 mM glucose, 2.1 mM lysine, 17.65 mM glycine, 2.97 mM serine, 1 mM vitamin C, 0.2 mM α-ketoglutaric acid, 0.1% BSA, and 0.03% sodium azide. The pH was adjusted to 4.0 or 7.4. At specific times, particle suspensions were centrifuged at 10000x*g* for 5 min at R.T., and the supernatants were collected and kept at –80°C until quantification by ELISA. Fresh media was added each time to the particles to continue the release study.

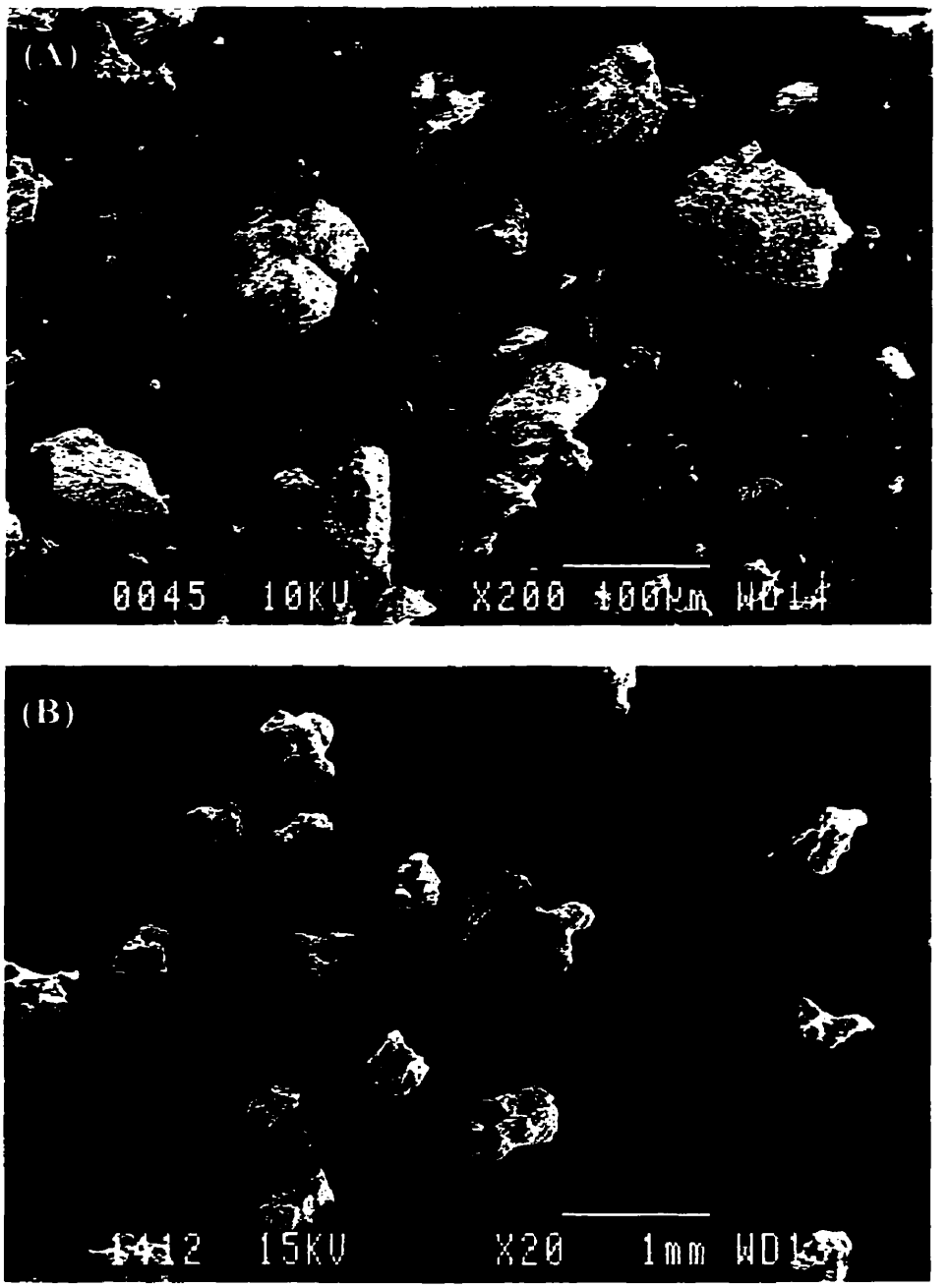

Figure 4.1. Scanning electron micrographs of coral particles. (A) The small particles (<80 µm) have a rough and uneven surface, lack apparent porosity and tend to be spherical compared to the more elongated large particles (300-450 µm) with a smoother surface (B).

4.3.4 Coral particle degradation

Coral particles (SA/V ratio of 6 cm^2/mL) were incubated in 8 mL of release media at pH 4.0 or pH 7.4. The media was changed at the same time points as in the TGF-ß1 release study, collected, and kept at –20°C until analysis. Degradation of the particles was followed by the change in pH and was measured by the amount of calcium ions released in the media, using atomic absorption spectroscopy (Perkin Elmer, Model 5000, PerkinElmer Instruments, Markham, Ontario, Canada). The amount of calcium ions initially present in the artificial bone fluid was also measured.

4.3.5 Statistical analysis

All experiments were done in triplicate. The results are reported as means ± standard deviations. Repeated measures analysis of variance (ANOVA) and single factor ANOVA were used to assess for statistically significant effects at the 95% level. Unpaired or paired t-tests were performed for all other comparisons ($p<0.05$).

4.4 Results

4.4.1 Adsorption

More than 90% of TGF-ß1 in the incubation media was adsorbed on coral particles, regardless of the incubation conditions [Fig. 4.2(A)] and particle size, except for the lower retention of TGF-ß1 on small coral particles in the presence of BSA at pH 11 (76%). This was due to a lower adsorption with one sample. The experiments were conducted below the saturation level of coral particles with TGF-ß1, since adsorption with 1.0 µg/mL TGF-ß1 in the presence of BSA at pH 3 (data not shown) was similar to the results in this study using 0.05 µg/mL TGF-ß1.

The adsorption of the co-adsorbants on coral particles was determined to better understand the adsorption process of TGF-ß1 on coral. The adsorption on the small particles was significantly higher for BSA than for gelatin, at all pHs tested [Fig. 4.2(B)]. The adsorption of BSA was also found to depend on the pH of the solution. It decreased from a mean of 38% at pH 3 to a mean of 24% and 22% at pH 7.4 and pH 11, respectively. In the case of gelatin, adsorptions below 10% were observed at all pHs.

4.4.2 TGF-ß1 release kinetics

The results for the TGF-ß1 release study are presented as a cumulative percentage of TGF-ß1 released from coral particles per initial TGF-ß1 adsorbed on the particles. The type of co-adsorbant was found overall to significantly affect the release profile of TGF-ß1 from small coral particles [Fig. 4.3]. Indeed, TGF-ß1 was released faster from coral particles in the presence of BSA than in the presence of gelatin. Although significant, no trends of the effect of adsorption pH on the kinetics of release are evident, except for the cumulative percentage of TGF-ß1 released at the end of the 2-week study. More TGF-ß1 appeared to be released from <80 µm coral particles when TGF-ß1 adsorption was performed at pH 7.4, while less TGF-ß1 was released for a pH 11-adsorbed TGF-ß1. The overall release rate of TGF-ß1 appeared slower from the larger particles than from the smaller-sized particles, but the difference was not significant [Fig. 4.4]. The TGF-ß1 release profile from <80 µm coral particles was also determined in the release media at pH 4.0 to simulate the localized acid microenvironment produced by osteoclasts during bone resorption[20]. The release was found to stop after the first 24 h, unlike the continuous release observed at pH 7.4 [Fig. 4.5]. Coral particles appeared to agglomerate over time at pH 4.0.

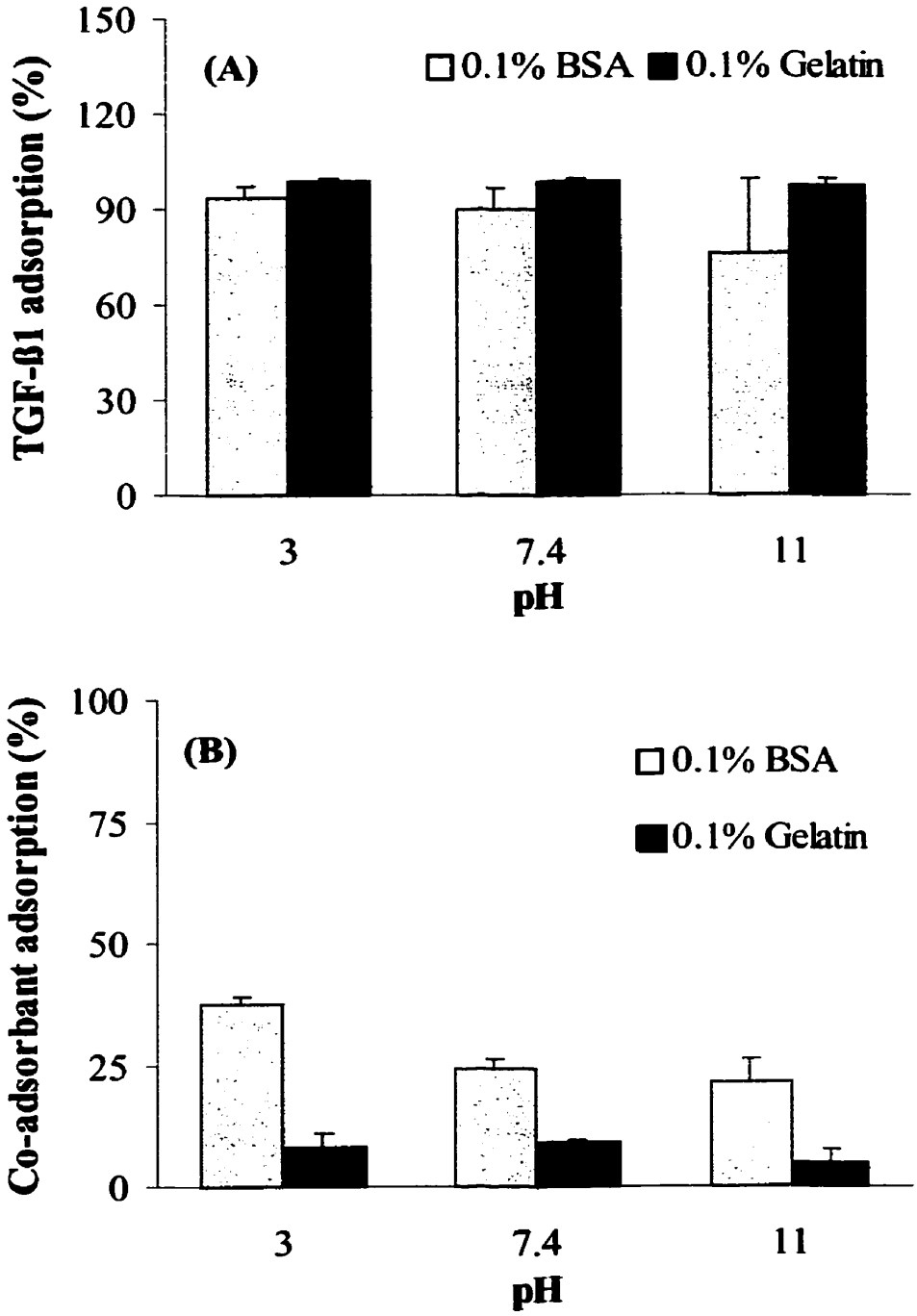

Figure 4.2. Protein adsorption on coral particles. TGF-ß1 was incubated for 24h with <80 μm coral particles in the presence of the co-absorbants, BSA and gelatin, at pH 3, 7.4 and 11 (a). The co-absorbants were also incubated alone with the coral particles for 24h at pH 3, 7.4 and 11 (b). The results are the mean ± standard deviation of 3 experiments.

The release profiles showed that for all conditions tested, there were three common phases, which are particularly evident when results are plotted by the square root of time: (1) an initial high release occurred in the first hour, (2) followed by a decrease in the rate of release until a plateau was almost reached after 24 h, and (3) a higher linear release rate then took place over the 1 to 14 day-period [Fig. 4.3]. The burst during the first hour of release was significantly lower in the presence of the co-adsorbant gelatin than with BSA. The TGF-ß1 rapid release was also found to vary with the adsorption pH when BSA was present. It was highest at pH 7.4 and lowest at pH 11. Comparisons of slopes for the third phase show that the release rates varied significantly with the co-adsorbant, with the size of the coral particles, and with the pH of release. Slower TGF-ß1 release rates were observed in the presence of gelatin (5.1±1.9 %/day$^{1/2}$ vs. 14.5±3.8 %/day$^{1/2}$ for BSA), of the 300-450 µm coral particles (2.0±0.6 %/day$^{1/2}$ vs. 6.6±1.7 %/day$^{1/2}$ for smaller particles) and in the release media at pH 4.0 (0.2±0.1 %/day$^{1/2}$ vs. 6.6±1.7 %/day$^{1/2}$ for the release media at pH 7.4).

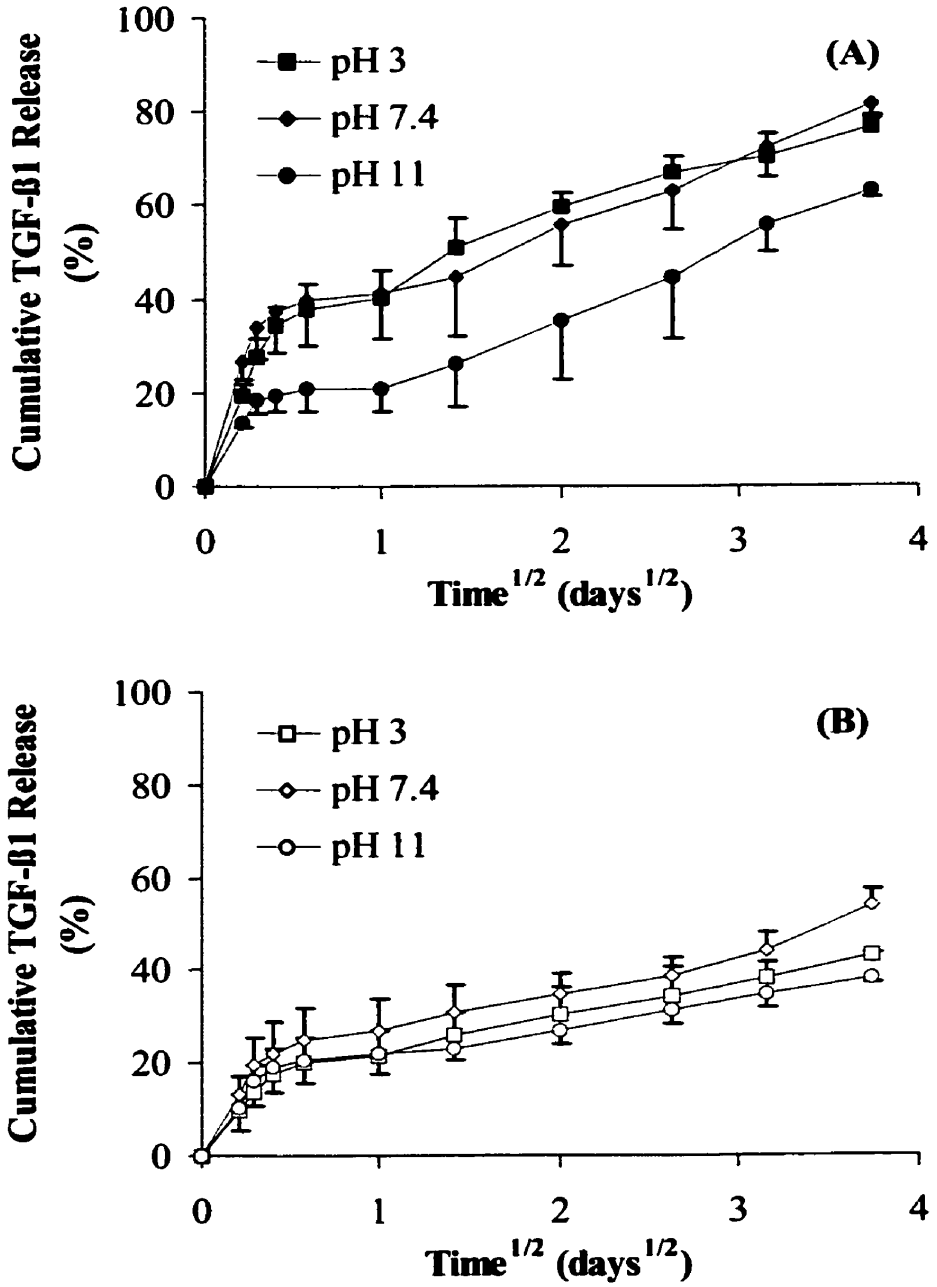

Figure 4.3. Release kinetics of TGF-ß1 from coral particles. Adsorption of TGF-ß1 on <80 μm coral particles was done in the presence of BSA (a) and gelatin (b) at pH 3, 7.4 and 11. The release was realized in an artificial bone fluid at 37°C, pH 7.4. The results are the mean ± standard deviation of 3 experiments.

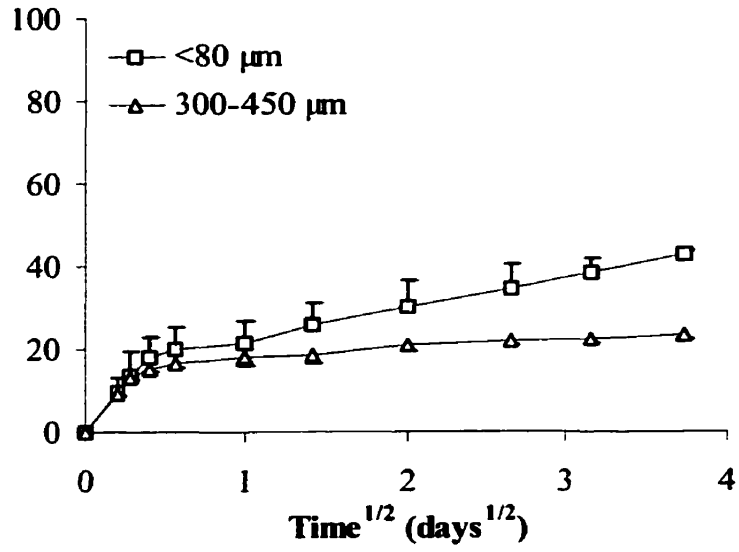

Figure 4.4. Effect of particle size on the TGF-ß1 release from coral particles. Adsorption of TGF-ß1 on <80 µm and 300-450 µm coral particles was done in the presence of gelatin at pH 3. The release was realized in an artificial bone fluid at 37°C, pH 7.4. The results are the mean ± standard deviation of 3 experiments.

4.4.3 Particle degradation

Degradation profiles of <80 µm coral particles at pH 4.0 and pH 7.4 and 300-450 µm particles at pH 7.4 are shown in Figure 4.6. At pH 7.4, coral particles degraded slowly at a linear rate, with smaller particles degrading slightly faster than the larger particles. When the small coral particles were placed in the release media at pH 4.0, there was a high rate of degradation in the first 24 to 48 h followed by a slower and more linear degradation rate. Variations in the pH reflected the trends observed for calcium release from coral particles. A small decrease in pH occurred for particles in the release media at pH 7.4, while a significant initial increase of pH, followed by little variation, was observed with the small particles in the release media at pH 4.0. Cumulative percentages of calcium release at the end of the 14-day study, reported in terms of the total percent of calcium in coral, show however that the values correspond to very little coral actually

degraded (only 0.2% and 0.4% for < 80 μm particles at pH 7.4 and 4.0 respectively, and 0.07% for 300-450 μm particles at pH 7.4).

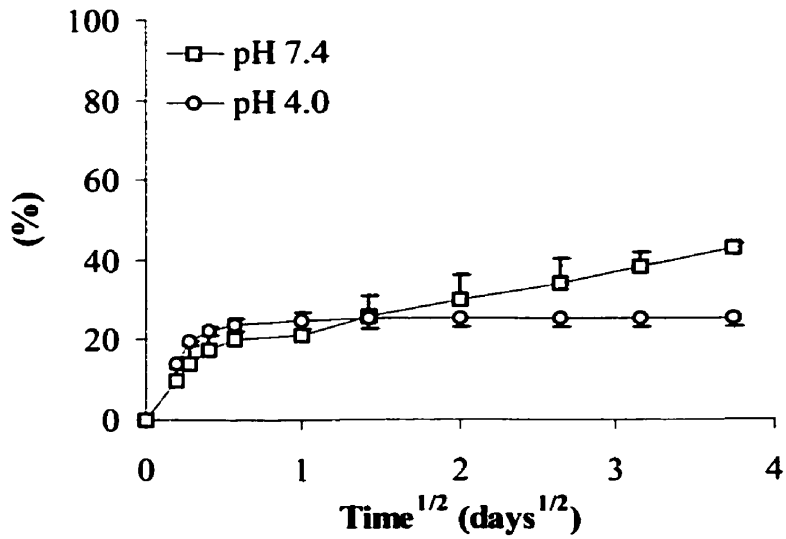

Figure 4.5. Effect of pH on the rate of TGF-ß1 release from coral particles. Adsorption of TGF-ß1 on <80 μm coral particles was done in the presence of gelatin at pH 3. The release was done in an artificial bone fluid at 37°C, pH 4.0 and 7.4. The results are the mean ± standard deviation of 3 experiments.

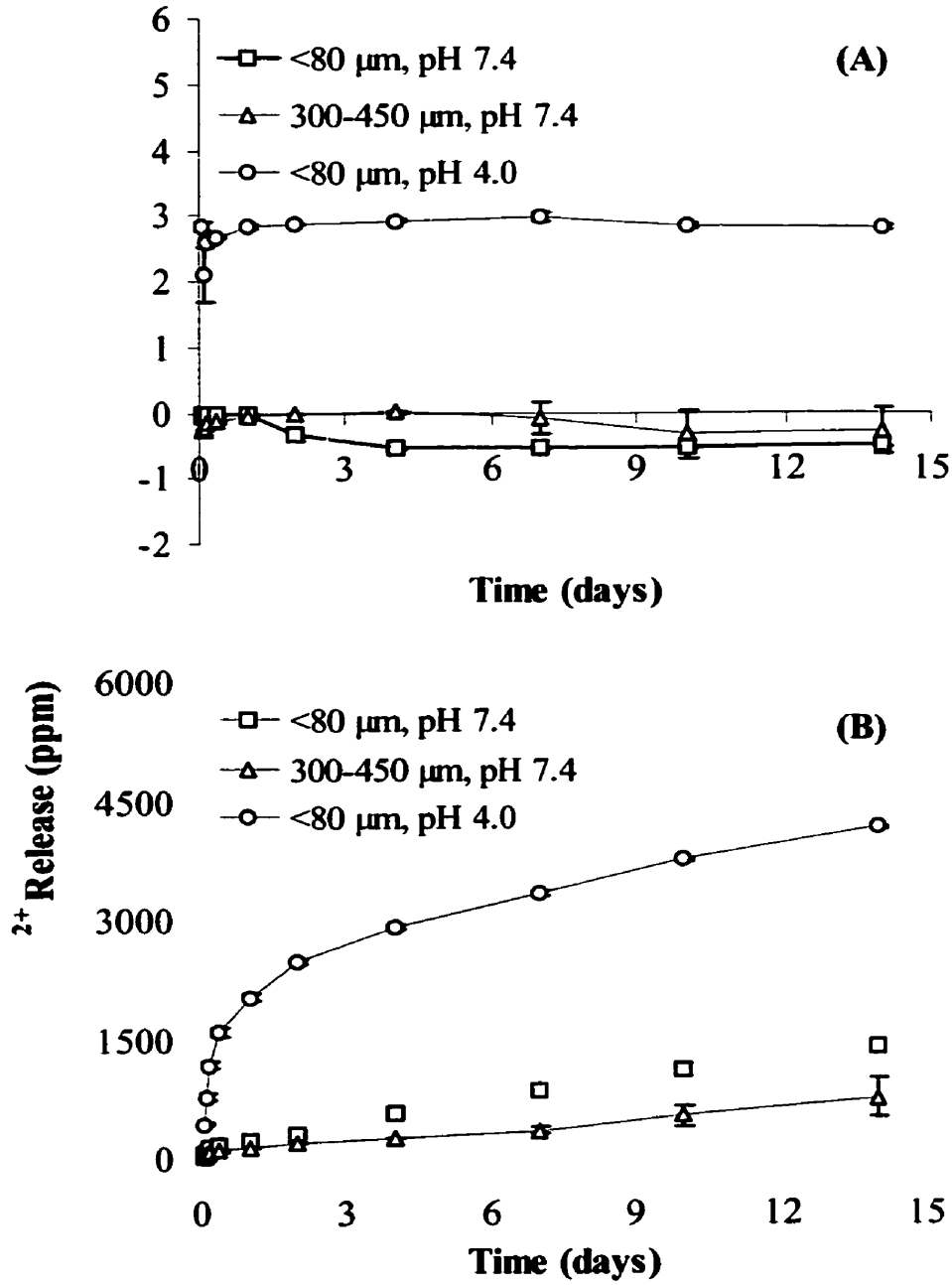

Figure 4.6. Degradation of coral particles. Coral particles of size <80 μm and 300-450μm were incubated in an artificial bone fluid at 37°C, and at pH 4.0 or pH 7.4. The variation of pH of the artificial bone fluid (a) and the calcium ion release from coral particles (b) were measured during the degradation. The results are the mean ± standard deviation of 3 experiments.

4.5 Discussion

This study was undertaken to investigate the potential use of coral as a delivery system for growth factors. Coral grafts are naturally-derived materials composed of 97-99% calcium carbonate. Previous studies with hydroxyapatite[21,22], tricalcium phosphate[23] and calcium sulphate[24] have shown that these calcium-containing biomaterials can adsorb proteins, such as albumin and TGF-ß1, through electrostatic interactions. This also appears to be the case for coral[14]. A recent *in vivo* study by Uludag *et al.* with polymers and bone-derived ceramics has further underlined the importance of the protein isoelectric point (pI) on the initial protein release rate[25]. The present study extends this knowledge to coral particles to determine the mechanism of TGF-ß1 release and to identify factors capable of modulating these release profiles.

Adsorption of proteins on biomaterials is dependent upon a number of factors, including the charge density and sign of the protein (pI) and material, as well as the degree of protein hydration[21]. In our study, more BSA (pI ~4.8) was adsorbed on coral particles than gelatin (pI ~10), most likely due to the lower potential of gelatin for electrostatic interactions [Fig. 4.2(B)][26]. The amino groups of basic proteins, like gelatin, are believed to be crucial for their binding to hydroxyapatite, but that overall they bind less strongly than acidic proteins like BSA[21]. Extrapolation of this behavior to coral may explain the lower adsorption of gelatin. Interaction of gelatin with coral through the coral carbonate groups may also have occurred but to a lesser extend possibly due to the more thermodynamically favorable hydrated state of gelatin in solution[26].

A higher percentage of BSA was also adsorbed on coral particles at pH 3 than at pH 7.4 and pH 11 [Fig. 4.2(A)]. Similar results have been obtained for the adsorption of BSA and other molecules onto hydroxyapatite[21,22] or coral[14]. At pH 3, BSA has a net positive charge and a lower degree of hydration, which cause a more compact conformation from

the interacting BSA molecules. This pH-induced conformation change of BSA has been proposed in part as the driving force for the increased adsorption at low pH[21].

TGF-ß1 kinetics of release were derived using an artificial bone fluid composed of various minerals and biological molecules. Most *in vitro* release studies are performed in phosphate buffered solution. Some have shown however that in serum, protein release rates are faster due to competitive binding of serum proteins with materials[23,27]. The use of an artificial bone fluid also eliminates the problem of variations in protein concentrations between samples of serum. TGF-ß1 release kinetics were significantly affected by the co-adsorbant [Fig. 4.3]. A previous study on the release profiles of nerve growth factors (NGF) (pI ~10) from polymer particles found that co-encapsulated molecules with an overall charge opposite to the charge of NGF, increased its release at physiologic pH. This effect was attributed to the increased stability of NGF[28]. A similar increase in TGF-ß1 release was observed in the presence of BSA, when compared to gelatin, which has a global charge similar to TGF-ß1 (pI ~9.5) at all pHs[29]. With gelatin, the release profile may have been further influenced by the fact that little gelatin was found to interact with coral particles. One study also showed that only 5% of TGF-ß1 can be adsorbed by gelatin derived from pork skin[29]. Our results also show that during the initial burst, more TGF-ß1 was released when adsorption was done at pH 7.4 (27±4%) than pH 3 (20±2%) or pH 11 (14±1%) in BSA. When adsorption is done at pH 7.4, BSA and TGF-ß1 are of opposite sign, while at pH 3 they would both be positively charged and at pH 11 both negatively charged. If BSA and TGF-ß1 initially retain their charge at adsorption before sufficient hydration by the release media occurs, then the initial release would be faster when adsorption was done at pH 7.4.

Protein release from most polymers and ceramics is controlled by protein diffusion or material degradation, or by a combination of both[28,30,31,32]. In our study, the TGF-ß1 release kinetics were characterized by a distinct profile: an initial high release, followed by a non-linear decreasing phase with a plateau-like effect, and finally a square root of

time kinetic release [Fig. 4.3]. The burst effect has been observed previously with many delivery systems both *in vitro*[24,29,33,34] and *in vivo*[25,34]. The rapid release always occurs within the first 24 h. Most attribute this effect to the desorption of proteins near or on the surface of the carrier, either insufficiently interacting with the carrier or in contact with a hydrated surface[31,35]. The process that takes place during the second phase may simply correspond to the transition between the decreasing desorption of loosely- or surface-bound TGF-ß1 and the start of the desorption of more tightly bound or bulk-bound TGF-ß1. The last phase of release appears to correspond to Higuchi's model for the release mechanism of a protein from a planar system with a homogeneous matrix[30,31]. In such case, the release is proportional to the square root of time. To determine if the protein release mechanism during this phase was only a function of protein diffusion, we quantified the degradation of the coral particles in the release media [Fig. 4.6]. The increase in calcium release in the media was considered insignificant when compared to the total calcium content of coral particles. Therefore, the TGF-ß1 release profile during the last phase appears predominantly dependent on diffusion of the protein through the coral particles.

The use of particles over blocs was motivated by the increasing interest in orthopaedics for the application of minimally invasive procedures[36]. The release profiles for both particle sizes were studied using a similar SA/V ratio. Results still show that the larger-sized particles released less TGF-ß1 over time and this trend was significant in the linear release phase [Fig. 4.4]. Although coral degradation was found negligible during this 2-week period at pH 7.4, the 300-450 μm particles degraded at a slower rate than the <80 μm particles. This could explain in part the observed effect of particle size on TGF-ß1 release. Lack of consideration for the true particle geometry, surface roughness and porosity could also have been a factor. All surface and bulk physicochemical properties of a carrier are important factors to consider when selecting a delivery system[32].

Correlation of our *in vitro* release kinetics to actual *in vivo* behavior has not been done. Previous studies have shown that *in vitro* and *in vivo* release profiles do not often correspond[23,27]. Also, we did not show the effect of our manipulations on the bioactivity of TGF-ß1. This is an important property to evaluate since the conformation that a protein takes after adsorption on materials or interactions with other molecules is believed to affect the biocompatibility of the material[37]. We attempted to test for bioactivity of TGF-ß1 in our release media using the mink lung epithelial cell proliferation inhibition assay[38]. However, our release media appeared to increase the proliferation of the cells, which may have affected the assay. We were unable to observe reproducible inhibition.

4.6 Conclusion

Past investigations have shown that coral grafts may be combined with growth factors to accelerate the bone repair process[11-13]. The current study has shown that coral can be used as a delivery system for the sustained release of TGF-ß1. It has also identified factors important for the modulation of TGF-ß1 release profiles and serves as a preliminary study to orient future *in vivo* studies with this delivery system. Release characteristics of proteins from coral grafts *in vivo* may potentially be designed per requirements in the future, through the choice of the coral graft properties (geometry, roughness, degradation, etc.) and through modulation of protein dissolution mainly by the adsorption conditions.

4.7 Acknowledgements

This research was supported by funds from NSERC and MRC. Coral particles were generously supplied by INOTEB (Biocoral®, France). The assistance of S. Polizu for the scanning electron micrographs is gratefully acknowledged.

4.8 References

1. Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. Adv Drug Deliv Rev 2000;43:65-92.
2. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. Clin Orthop 1999;360:71-86.
3. Patat J-L, Guillemin G. Le corail naturel utilisé comme biomatériau de substitution à la greffe osseuse. Ann Chir Plast Esthet 1989;34:221-225.
4. Guillemin G, Patat J-L, Fournie J, Chetail M. The use of coral as a bone graft substitute. J Biomed Mater Res 1987;21:557-567.
5. Chamberlain JA. Mechanical properties of coral skeleton: Compressive strength and its adaptive significance. Paleobiology 1978;4:419-435.
6. Fricain JC, Bareille R, Ulysse F, Dupuy B, Amedee J. Evaluation of proliferation and protein expression of human bone marrow cells cultured on coral crystallized in the aragonite or calcite form. J Biomed Mater Res 1998;42:96-102.
7. Begley CT, Doherty MJ, Mollan RAB, Wilson DJ. Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. Biomaterials 1995;16:1181-1185.
8. Patat J-L, Pouliquen JC, Guillemin G. Le corail naturel utilisé comme substitut de greffon osseux: Son rôle dans les économies de sang dans la chirurgie du rachis. Acta Orthop Belg 1992;58 Suppl 1:115-121.
9. Souyris F, Pellequer C, Payrot C, Servera C. Coral, a new biomedical material. Experimental and first clinical investigations on Madreporia. J Maxillofac Surg 1985;13:64-69.
10. Demers C, Hamdy RC, Corsi K, Chellat F, Tabrizian M, Yahia L'H. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review. Biomed Mater Eng (submitted).
11. Arnaud E, Molina F, Mendoza M, Fuente Del Campo A, Ortiz-Monasterio F. Substitut osseux avec facteur de croissance: Cas cliniques préliminaires pour des indications cranio- et maxillo-faciales. Ann Chir Plast Esthet 1998;43:40-50.

12. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part II: Study of dose, carrier, and species. Spine 1995;20:2633-2644.
13. Arnaud E, De Pollak C, Meunier A, Sedel L, Damien C, Petite H. Osteogenesis with coral is increased by BMP and BMC in a rat cranioplasty. Biomaterials 1999;20:1909-1918.
14. Volpi N. Adsorption of glycosaminoglycans onto coral – a new possible implant biomaterials for regeneration therapy. Biomaterials 1999;20:1359-1363.
15. Bostrom MPG, Asnis P. Transforming growth factor beta in fracture repair. Clin Orthop 1998;355S:S124-S131.
16. Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor ß in bone formation. J Cell Biochem 1994;55:350-357.
17. De Visser KE, Kast WM. Effects of TGF-ß on the immune system: implications for cancer immunotherapy. Leukemia 1999;13:1188-1199.
18. Komsa-Penkova R, Spirova R, Bechev B. Modification of Lowry's method for collagen concentration measurement. J Biochem Biophys Methods 1996;32:33-43.
19. Matériel médico-chirurgical. Biocompatibilité des matériaux et dispositifs médicaux. Méthodes d'extraction. In: Masson M (president). Norme française NF S 90-701. Paris: Afnor; December 1988. p 9-10 (annexe A).
20. Oreffo ROC, Mundy GR, Seyedin SM, Bonewald LF. Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. Biochem Biophys Res Commun 1989;158:817-823.
21. Hughes Wassell DT, Hall RC, Embery G. Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite. Biomaterials 1995;15:697-702.
22. Hughes Wassell DT, Embery G. Adsorption of chondroitin-4-sulphate and heparin onto hydroxyapatite – effect of bovine serum albumine. Biomaterials 1997;18:1001-1007.
23. Ongpipattanakul B, Nguyen T, Zioncheck TF, Wong R, Osaka G, DeGuzman L, Lee WP, Beck LS. Development of tricalcium phosphate/amylopectin paste combined

with recombinant human transforming growth factor beta 1 as a bone defect filler. J Biomed Mater Res 1997;36:295-305.

24. Gombotz WR, Pankey SC, Bouchard LS, Phan DH, Puolakkainen PA. Stimulation of bone healing by transforming growth factor-beta1 released from polymeric or ceramic implants. J Appl Biomater 1994 summer;5:141-150.
25. Uludag H, D'Augusta D, Golden J, Li J, Timony G, Riedel R, Wozney JM. Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: A correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. J Biomed Mater Res 2000;50:227-238.
26. Gautam J, Schott H. Interaction of anionic compounds with gelatin. II: Effect on some physicochemical properties of gelatin. J Pharm Sci 1994;83:316-321.
27. Laffargue P, Fialdes P, Frayssinet P, Rtaimate M, Hildebrand HF, Marchandise X. Adsorption and release of insulin-like growth factor-I on porous tricalcium phosphate implant. J Biomed Mater Res 2000;49:415-421.
28. Krewson CE, Dause R, Mak M, Saltzman WM. Stabilization of nerve growth factor in controlled release polymers and in tissue. J Biomater Sci Polymer Edn 1996;8:103-117.
29. Yamamoto M, Tabata Y, Hong L, Miyamoto S, Hashimoto N, Ikada Y. Bone regeneration by transforming growth factor ß1 released from a biodegradable hydrogel. J Control Release 2000;64:133-142.
30. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication: Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. J Pharm Sci 1963;52:1145-1148.
31. Jameela SR, Kumary TV, Lal AV, Jayakrishnan A. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. J Control Release 1998;52:17-24.
32. Uludag H, D'Augusta D, Palmer R, Timony G, Wozney J. Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. J Biomed Mater Res 1999;46:193-202.

33. Lu L, Stamatas GN, Mikos AG. Controlled release of transforming growth factor ß1 from biodegradable polymer microparticles. J Biomed Mater Res 2000;50:440-451.
34. Yaylaoğlu MB, Korkusuz P, Örs Ü, Korkusuz F, Hasirci V. Development of a calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release. Biomaterials 1999;220:711-719.
35. Eliaz RE, Kost J. Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins. J Biomed Mater Res 2000;50:388-396.
36. Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. Biomaterials 2000;21:2405-2412.
37. Chinn JA. Biomaterials: Protein-surface interactions. In: Bronzino JD, editor. The Biomedical Engineering Handbook. USA: CRC PRess; 1995. p.1597-1608.
38. Danielpour D, Dart LL, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB. Immunodetection and quantification of the two forms of transforming growth factor-beta (TGF-ß1 and TGF-ß2) secreted by cells in culture. J Cell Physiol 1989;138:79-86.

CHAPITRE 5. Évaluation *in vivo* du système d'injection corail – gélatine

Notre deuxième étude a été entreprise pour évaluer l'effet des particules de corail dans un milieu de gélatine, sur la consolidation osseuse de tibias allongés de lapins. Tel que d'écrit au chapitre 4, nous avons allongé les tibias de lapins une semaine suivant la chirurgie à une vitesse de 0.5 mm deux fois par jour pendant 3 semaines, pour un allongement total de 2.1 cm. Suivant l'allongement, les particules de corail dans un milieu de gélatine ont été injectées sous fluoroscopie dans la région centrale radiotranslucide du site allongé des tibias. Ceux-ci ont été testés pour la qualité de leur consolidation osseuse trois semaines après l'injection.

5.1 Comportement du système d'injection corail-gélatine

Nous avons choisi des particules de corail de petites tailles dans le but de les injecter à l'aide d'une seringue de petit diamètre (21G), ainsi que d'obtenir une dégradation suffisamment rapide des particules pour ne pas ralentir le processus de consolidation des tibias allongés de lapins. Nous avons sélectionné une solution de gélatine à 1% pour suspendre nos particules car c'est un milieu peu coûteux qui possède une densité suffisante pour maintenir les particules de corail en suspension. Les études antérieures démontrent aussi que la gélatine a été employée sans effet néfaste dans divers modèles de lapins (Yamamoto *et al.*, 2000; Yaylaoğlu *et al.*, 1999). De plus, une compagnie travaille actuellement sur le développement de collagène et de gélatine humains recombinants pour appaiser les inquiétudes sur la possibilité de contamination ou de réactions immunologiques en présence de substances dérivées de sources animales (Polarek, 2000).

Notre étude a permis d'observer que le système d'injection corail-gélatine n'était pas facile à manipuler. En fait, lorsque la solution de gélatine était transférée de 4°C à la température de la pièce, elle commençait à se liquéfier après environ 30 minutes, empêchant ainsi l'injection complète des particules de corail dans le site allongé. Nous avons essayé d'utiliser un gel de plus de 1% de gélatine, mais en vain car la viscosité obtenue réduit son injectabilité. Un autre problème associé avec notre système est le développement d'une pression négative lors de l'injection dans quatre des neuf tibias testés, empêchant ainsi l'injection de tout le milieu dans le site allongé. Dans plusieurs cas, il était possible par la suite d'injecter le reste du milieu en réaspirant un peu d'air dans la seringue avant de réinjecter. Dans les cas où ce n'était pas possible, une seconde seringue a été employée pour injecter le volume total voulu (0.6 mL).

En rétrospective, les problèmes d'injection ne semblent pas reliés au volume à combler dans le site allongé. Bien qu'il soit possible que l'ouverture de l'aiguille ait été bloquée par un caillot de sang ou un tissu, la source du problème n'a pas été identifiée encore. L'emploi d'aiguilles à diamètre plus grand pourrait possiblement résoudre ce problème. Quant au milieu de gélatine, il devra être modifié dans le futur afin de permettre une meilleure manipulation. Une solution serait d'employer par exemple un polymère à base de cellulose qui selon des études antérieures, semble fournir une densité suffisante pour la suspension de particules et une viscosité adéquate pour l'injection (Dupraz *et al.*, 1999; Gauthier *et al.*, 1999; Temenoff et Mikos, 2000). L'introduction de ce polymère pourrait cependant modifier significativement le comportement de libération du TGF-ß1 des particules de corail observé lors de notre étude *in vitro* (chapitre 4). En effet, une étude a démontré que la matrice polymérique attirait le calcium de particules de phosphate de calcium biphasique (Dupraz *et al.*, 1999).

5.2 Évaluation radiologique, histologique, histomorphométrique et biomécanique du système d'injection corail-gélatine sur la consolidation osseuse

Un lapin appartenant au groupe recevant des particules de corail a dû être euthanasié avant la fin de l'étude à cause d'une fracture longitudinale apparue peu de temps après le début de la distraction. Sur les 9 tibias de lapins injectés avec du corail, deux non-unions ont été observées 3 semaines après l'injection (tableau 5.1). Selon les radiographies, les non-unions semblent plutôt résultés de l'instabilité du système de fixation et/ou de la faible vitesse d'ostéogenèse observée avant l'injection du corail. Une randomisation des lapins dans chaque groupe n'était pas possible puisque le groupe contrôle avait déjà été obtenu lors d'une autre étude. Ainsi, il serait probablement préférable de tester le corail dans quelques autres lapins afin d'éliminer tout doute que les non-unions ne sont pas causées par l'introduction des particules de corail. Enfin, les tibias droit et gauche d'un lapin du groupe contrôle ainsi que le tibia gauche d'un autre lapin du même groupe ont été perdu dans le transport après l'analyse par DEXA mais avant les tests biomécaniques.

L'observation histologique d'une section longitudinale du cal osseux d'un tibia une semaine après l'injection du corail montre clairement la distribution des particules de corail le long de la zone centrale du site allongé (Figure 2.1). Aucune particule ne semble avoir migré hors du site d'injection, suggérant que les tissus environnants permettent de maintenir les particules en place. Les sections histologiques des tibias allongés trois semaines après l'injection ne semblent plus contenir de particules, à l'exception de quelques régions isolées dans la moëlle osseuse de la zone centrale du site allongé qui sembleraient avoir quelques petites particules (Figure 5.1).

Tableau 5.1. Observations des tibias allongés de lapins après 3 semaines de consolidation.

Groupes	Union osseuse	Dimensions du cal osseux (mm)	
		Plan cranio-caudal	Plan médio-latéral
Contrôle	12/12	10.4±1.6	14.2±1.7
Corail	7/9	10.8±0.6	12.7±2.1

Figure 5.1. Coupe histologique du site allongé d'un tibia de lapin trois semaines après l'injection des particules de corail. Coloration au Trichrome de Goldner avec contre-coloration au bleu de toluidine. Grossissement de 20x. Les flèches pointent vers des formes qui pourraient être des particules de corail.

Les résultats des analyses de densitométrie, d'histomorphométrie et de biomécanique suggèrent que les particules de corail ont un effet bénéfique modéré sur la consolidation osseuse des tibias allongés. Les mesures densitométriques indiquent que les tibias injectés de corail ont une densité minérale osseuse significativement inférieure à celle des tibias non injectés des contrôles, si les deux non-unions sont considérées (Figure 5.2). Cette différence diminue significativement cependant lorsque les deux non-unions sont exclues des analyses statistiques (90.7±10.6%, p=0.068 versus 82.8±18.2%, p=0.009 avec les deux non-unions). Malgré le petit nombre de spécimens, les résultats des analyses histomorphométriques indiquent aussi que le volume osseux des cals est similaire dans les deux groupes (tableau 5.2). Par contre, l'épaisseur du cal osseux dans le plan médio-latéral du tibia (plan parallèle au fixateur) est plus petite pour le groupe corail que pour le groupe contrôle (tableau 5.1), de même que moins de tissus fibreux et cartilagineux (fibrocartilage et cartilage) ont été retrouvés dans le groupe corail. L'ensemble de ces résultats suggère donc que le site allongé des tibias du groupe corail après trois semaines de consolidation est plus stable et a possiblement subi un remodelage plus rapide, que les tibias du groupe contrôle. Afin de s'assurer de ces résultats et de la cause des non-unions, d'autres spécimens devraient être testés avant de conclure avec certitude de l'applicabilité des particules de corail dans le site allongé de tibias de lapins.

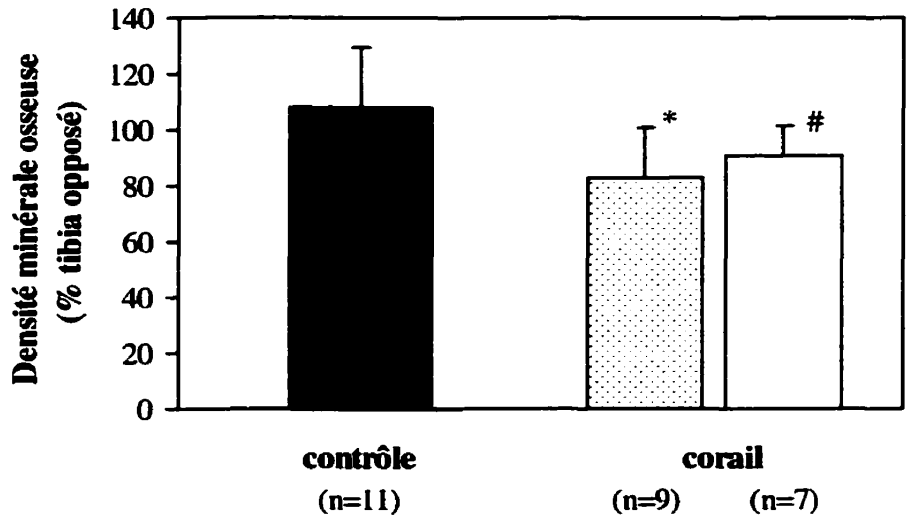

Figure 5.2. Densité minérale osseuse des tibias allongés de lapins après 3 semaines de consolidation. Les valeurs sont rapportées selon le pourcentage de la densité minérale osseuse des tibias opposés pour le groupe contrôle et le groupe corail [avec (n=9) et sans (n=7) les 2 non-unions]. * p=0.009 et # p=0.068 lorsque comparés au groupe contrôle.

Les résultats des test biomécaniques ont été rapportés à la figure 5.3, en fonction des tibias opposés car une différence significative existait entre la rigidité des tibias opposés (non-allongés) du groupe corail et ceux du groupe contrôle. Ceci pourrait être dû au fait que les expériences pour les deux groupes ont été faites à des temps et des endroits différents, et ce, malgré l'utilisation du même fournisseur de lapins, du même protocole et des mêmes fixateurs. Les analyses biomécaniques des propriétés de traction des tibias démontrent qu'il semble y avoir une tendance vers une force ultime et une rigidité (p=0.097) plus élevées chez les tibias du groupe corail que ceux du groupe contrôle. De plus, plus de fractures des tibias lors des tests mécaniques ont eu lieu ailleurs que dans le cal osseux pour le groupe corail (60%) que pour le groupe contrôle (25%) (tableau 5.3).

Ceci suggère que les valeurs de force ultime et de rigidité pourraient être légèrement supérieures à celles présentées, particulièrement dans le cas du groupe corail.

Tableau 5.2. Analyse histomorphométrique des coupes histologiques de tibias allongés de lapins après 3 semaines de consolidation.

% Volume de tissu par volume de tissu total	Groupes*	
	Contrôle	Corail
Tissu osseux	36.8	44.8
		40.2
Tissu fibreux	19.4	9.60
		1.50
Tissu cartilagineux	5.8	1.43
		0.20
Cartilage	5.42	1.38
		0.24
Fibrocartilage	0.38	0.06
		0.00
Moëlle osseuse	38.4	44.2
		58.0

* Les valeurs pour chaque spécimen testé (1 pour le groupe contrôle et 2 pour le groupe corail) sont indiquées dans le tableau.

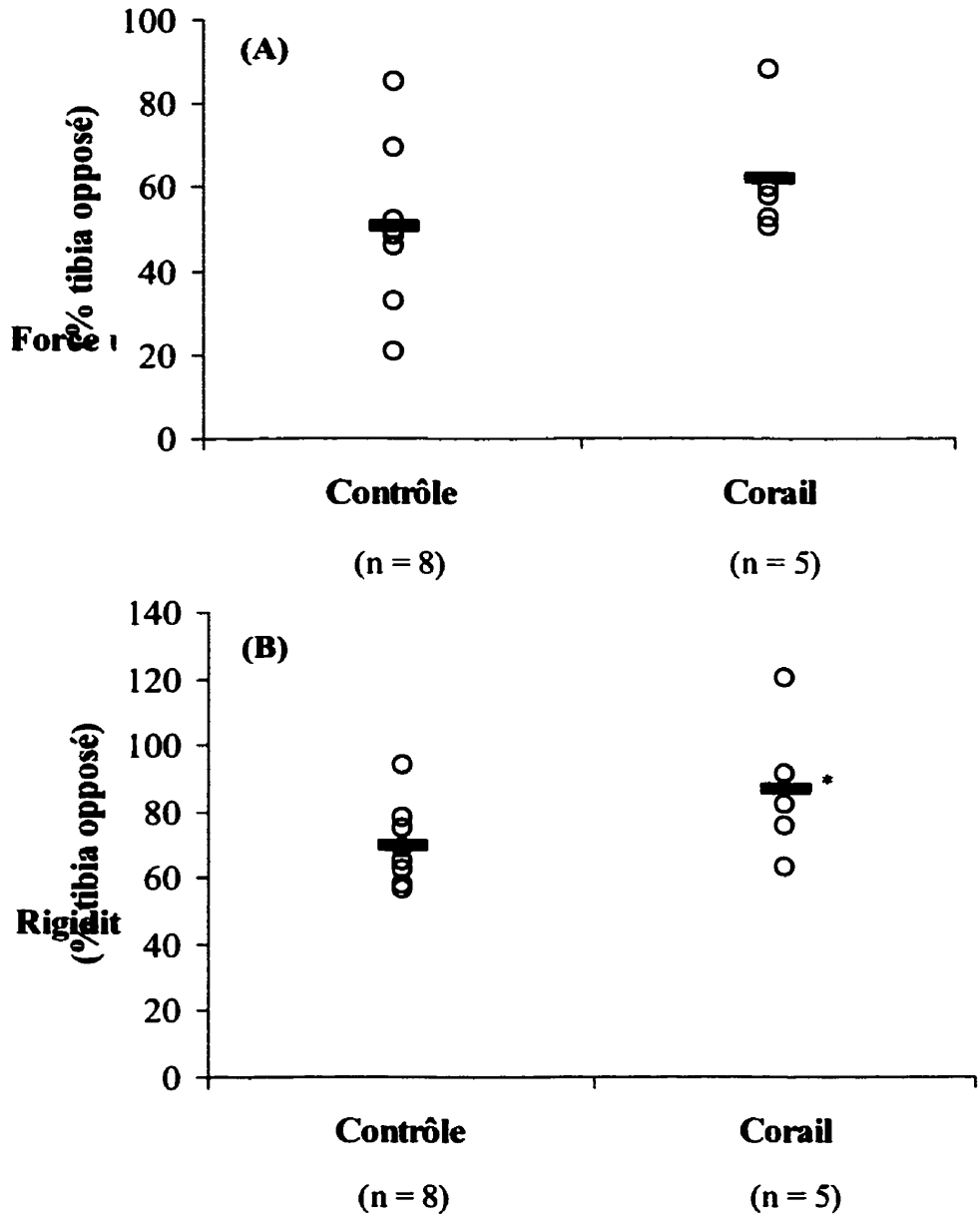

Figure 5.3. Propriétés biomécaniques de traction des tibias allongés de lapins après 3 semaines de consolidation. Les valeurs de la force ultime (A) et de la rigidité (B) sont présentées selon le pourcentage des valeurs des tibias opposés. Chaque cercle représente la mesure pour un tibia et la barre noire représente la moyenne de chaque groupe. * p=0.097.

Tableau 5.3. Sites de fracture des tibias de lapins lors des tests mécaniques.

Fractures	Groupes	
	Contrôle	Corail
Cal osseux	6	2
Trou de tige du système de fixation	0	1
Ailleurs au niveau de l'os	2	2

5.3 Discussion

Les résultats démontrent que les propriétés mécaniques des tibias sont meilleures dans le groupe corail que le groupe contrôle, particulièrement au niveau de la rigidité des tibias. La rigidité d'un os est généralement un indicateur du niveau de consolidation osseuse (Black *et al.*, 1984). Une rigidité plus élevée indique donc que le fixateur pourra être enlevé plus rapidement. Les résultats de l'analyse histomorphométrique suggèrent aussi que les tibias du groupe corail sont plus stables après trois semaines de consolidation que ceux du groupe contrôle. Cette meilleure stabilité pourrait être le résultat d'une bonne ostéoconduction par le corail qui aurait ainsi permis une ossification de type membranaire plutôt qu'endochondriale. La force ultime qui indique le niveau auquel les processus de régénération et de remodelage osseux sont rendus, semble également être meilleure pour les tibias ayant reçu une injection de particules de corail. Il est cependant difficile de déterminer si le remodelage osseux est plus rapide en présence de corail, car la densité minérale osseuse et le volume osseux sont similaires pour les deux groupes.

Ongpipattanakul *et al.* (1997) ont démontré que leur granules de phosphate tricalcique (125-250 µm) utilisées pour combler un défaut osseux dans le radius de lapins avaient diminué les propriétés mécaniques en torsion des membres, à cause de leur dégradation trop lente comparé à la vitesse de régénération osseuse. Ceci ne semble pas être un problème dans cette étude, car selon les coupes histologiques, les particules de corail de plus petite taille ont été complètement ou presque complètement dégradées.

Ainsi, les particules de corail semblent avoir un effet global bénéfique sur la consolidation osseuse des tibias allongés. La taille des particules ainsi que le temps d'introduction des particules semblent également appropriés. Afin d'éliminer tout doute envers la cause des deux non-unions obtenues, quelque autres lapins devraient être testés avec des particules de corail, ce qui permettrait également de confirmer les tendances générales observées. La méthode employée pour introduire les particules n'est cependant pas optimale. Les études futures devraient donc être concentrées sur l'amélioration de la méthode d'introduction des particules, soit en employant un autre milieu de suspension des particules que la gélatine ou soit en utilisant de nouvelles procédures minimalement invasives qui sont offertes sur le marché.

CHAPITRE 6. Étude *in vivo* avec le TGF-ß1

Nous avons entrepris cette étude dans le but d'identifier une dose de TGF-ß1 capable d'accélérer significativement le processus de consolidation osseuse des tibias allongés de lapins, afin de servir de référence pour l'évaluation de l'efficacité *in vivo* de notre système de libération. Les lapins ont subi une semaine après l'ostéotomie, un allongement du tibia droit à une vitesse de 0.5 mm deux fois par jour pendant 21 jours. A la fin de l'allongement, les tibias ont reçu une injection de 0.3 µg, 0.6 µg ou 1.2 µg de TGF-ß1. Après 3 semaines, la qualité de la consolidation osseuse des tibias a été évaluée par un test mécanique, par le DEXA et par l'histomorphométrie.

6.1 Observations lors de la procédure

Un lapin appartenant au groupe recevant 0.6 µg de TGF-ß1 a été euthanasié tôt durant le traitement à cause d'une fracture longitudinale de l'ostéotomie vers les tiges qui continuait à progresser pendant l'allongement. Un autre lapin du groupe de 0.3 µg de TGF-ß1 a été sacrifié durant la phase de distraction suite à un problème avec le mécanisme d'allongement du fixateur qui a causé une consolidation prématurée du tibia. Le même problème est survenu avec le fixateur d'un lapin du groupe de 0.6 µg de TGF-ß1 mais ce fixateur a été changé assez vite pour prévenir une consolidation prématurée du tibia. La tige d'un fixateur sur un lapin du groupe de 0.6 µg de TGF-ß1 a du être remplacée après deux semaines d'allongement car elle a cassé sous la charge des contraintes mécaniques appliquées par le lapin. Les deux derniers lapins n'ont cependant pas été exclus de l'étude. Tel que mentionné au chapitre 5, les tibias droit et gauche d'un lapin du groupe contrôle ainsi que le tibia gauche d'un autre lapin du même groupe ont été perdu après l'analyse par DEXA. Ces tibias n'ont donc pas été testés mécaniquement.

Les lapins ont tous perdu environ 5% de leur poids initial pendant l'allongement, mais ils ont par la suite repris du poids pendant la phase de consolidation. Nous avons également

observé une enflure au site d'injection du TGF-ß1, la journée suivant l'injection. L'enflure a disparu après moins d'une semaine. Critchlow *et al.* (1995) qui a aussi observé cette réaction après l'injection de TGF-ß2 dans des fractures de lapins, a associé l'enflure à la présence d'un oedème.

De façon générale, les radiographies ont révélé que tous les tibias étaient consolidés, mais que ce degré de consolidation semblait varier non pas selon la dose de TGF-ß1 administrée mais plutôt selon la stabilité et la rigidité du système de fixation.

6.2 Évaluation densitométrique, histomorphométrique et biomécanique

Au lieu de comparer nos résultats des lapins ayant reçu différentes doses de TGF-ß1 avec ceux pour des lapins ayant reçu la solution d'injection sans TGF-ß1, nous avons choisi de les comparer à ceux obtenus pour des lapins contrôles n'ayant reçu aucune injection. Ceci a permis de minimiser le nombre de lapins pour l'étude, en utilisant les résultats du groupe contrôle d'une autre étude effectuée par le Dr Hamdy. De plus, une étude antérieure avec le même modèle animal mais avec une vitesse de distraction plus lente (0.5 mm/jour) et une mini-pompe osmotique pour introduire le TGF-ß1, avait permis de conclure que la même solution que nous avons employé, n'avait aucun effet néfaste sur la densité minérale osseuse et les propriétés mécaniques des tibias (Rauch *et al.*, 2000b). Certes, sans ce groupe, il existe toujours un doute que nos résultats ont pu être affectés par le volume de tampon Ringer employé pour injecter le TGF-ß1.

Nos résultats ont démontré que la densité minérale osseuse des tibias allongés était significativement inférieure pour les lapins ayant reçu une injection de TGF-ß1, comparé à ceux dans le groupe contrôle (figure 6.1). Une analyse de l'effet des doses de TGF-ß1 injectées indique qu'en fait ce sont les lapins des groupes de 0.3 µg et de 1.2 µg de TGF-ß1 qui semblent avoir une densité minérale osseuse plus faible (86±13% et 87±15% pour

les groupes de 0.3 μg et 1.2 μg de TGF-ß1 versus 108±21% pour le groupe contrôle et 92±18% pour le groupe de 0.6 μg de TGF-ß1). Malgré le petit nombre de spécimens, l'analyse histomorphométrique suggère par contre que le volume osseux est similaire entre tous les groupes (tableau 6.1). Il semble également y avoir moins de cartilage et de tissus fibreux dans les tibias des groupes ayant reçu du TGF-ß1 que ceux du groupe contrôle. De plus, nous avons également observé que les dimensions des cals osseux variaient selon le groupe (tableau 6.2). Ainsi comme le BMD, la largeur du cal dans le plan médio-latéral des tibias appartenant aux groupes 0.3 μg et 1.2 μg de TGF-ß1 est inférieure à celle des cals du groupe contrôle, tandis que la largeur des cals osseux dans le plan cranio-caudal du groupe de 0.6 μg de TGF-ß1 est supérieure à celle du groupe contrôle.

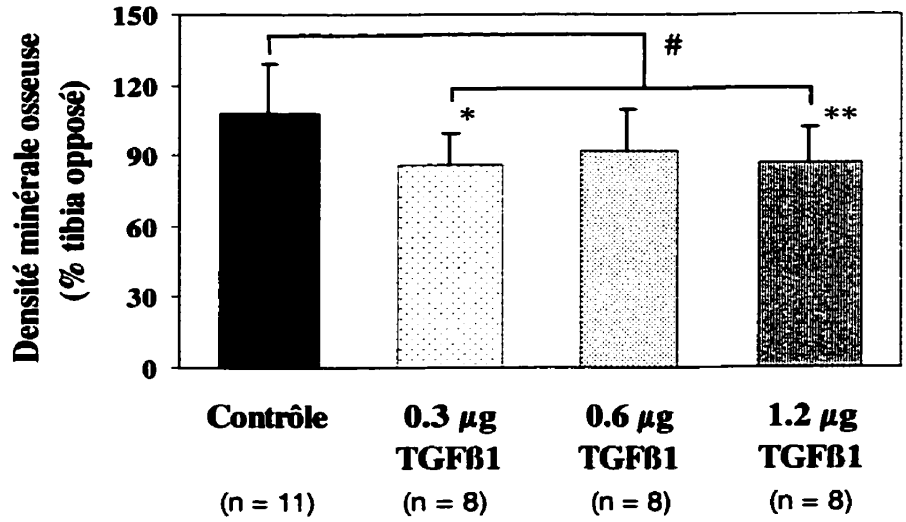

Figure 6.1. Densité minérale osseuse des tibias allongés de lapins 3 semaines après l'injection de différentes doses de TGF-ß1. Les valeurs sont présentées selon le pourcentage de la densité minérale osseuse des tibias opposés. Les différences significatives avec le groupe contrôle sont indiquées par un astérisque (* p=0.02 et ** p=0.03). # indique une différence significative entre les groupes de TGF-ß1 combinés et le groupe contrôle (p=0.003).

Tableau 6.1. Analyse histomorphométrique des coupes histologiques de tibias allongés de lapins 3 semaines après l'injection de différentes doses de TGF-ß1.

Groupes	Tissus (% volume de tissu par volume de tissu total)				
	Os	Cartilage	Fibrocartilage	Tissu fibreux	Moëlle osseuse
Contrôle	36.8	5.42	0.38	19.4	38.4
0.3 µg TGF-ß1					
spécimen 1	32.4	0.16	0	11.9	55.6
spécimen 2	38.9	0	0	1.7	59.4
0.6 µg TGF-ß1					
spécimen 1	29.8	0.1	0.03	9.2	60.9
spécimen 2	38.6	0.39	0.01	2.4	58.6
1.2 µg TGF-ß1					
spécimen 1	33.2	0	0	2.8	64
spécimen 2	33.7	0	0	6.5	59.7

Tableau 6.2. Observations des tibias allongés de lapins après 3 semaines de consolidation.

Groupes	Union osseuse	Dimensions du cal osseux (mm)	
		Plan cranio-caudal	Plan médio-latéral
Contrôle	11/11	10.4±1.6	14.2±1.7
TGF-ß1			
0.3 µg	8/8	10.5±1.8	11.3±1.4*
0.6 µg	8/8	12.2±0.6*	13.6±1.3
1.2 µg	8/8	9.7±0.9	11.6±1.3*

* $p<0.05$ lorsque comparé au groupe contrôle

Les tests mécaniques ont démontré qu'aucune différence statistiquement significative n'existait entre le groupe contrôle et les groupes de TGF-ß1 (figure 6.2). Cependant, il semble y avoir une tendance – plus évidente au niveau de la rigidité – qui suggère qu'une augmentation de la dose de TGF-ß1 administrée diminue les propriétés mécaniques des tibias allongés. Les valeurs de force ultime et de rigidité des tibias testés sont en fait possiblement plus élevées que celles mesurées car un sixième et un tiers seulement des fractures, induites sous traction, ont eu lieu dans le cal osseux pour les tibias du groupe de 0.6 µg de TGF-ß1, et des groupes de 0.3 µg et 1.2 µg de TGF-ß1, respectivement (tableau 6.3). Par contre, deux tiers des tibias du groupe contrôle qui ont été testés ont fracturé dans le cal osseux. Ainsi, plus de 65% des tibias testés qui ont reçu du TGF-ß1 étaient mécaniquement plus forts sous traction que le reste du tibia, comparé à moins de 35% pour le groupe contrôle.

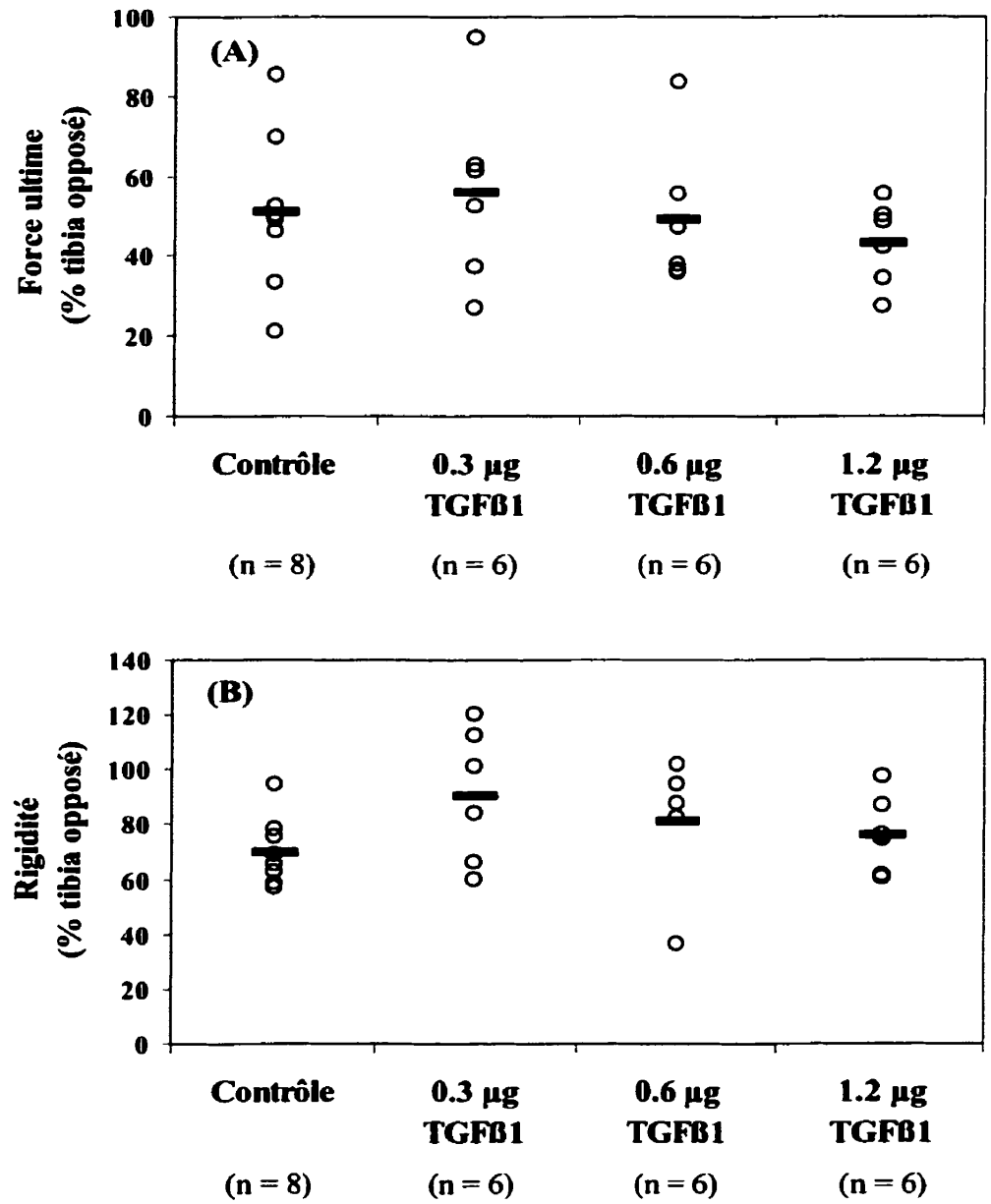

Figure 6.2. Propriétés biomécaniques de traction des tibias allongés de lapins 3 semaines après l'injection de différentes doses de TGF-ß1. Les valeurs de la force ultime (A) et de la rigidité (B) sont présentées selon le pourcentage des valeurs pour les tibias opposés. Chaque cercle représente la mesure pour un tibia et la barre noire représente la moyenne de chaque groupe.

Tableau 6.3. Sites de fracture des tibias de lapins lors des tests mécaniques.

Fractures	Groupes			
	Contrôle	0.3 μg TGF-ß1	0.6 μg TGF-ß1	1.2 μg TGF-ß1
Cal osseux	6	4	1	4
Trou de tige du système de fixation	1	1	4	2
Ailleurs au niveau de l'os	2	1	1	0

6.3 Discussion

Les mesures densitométriques par DEXA sont des projections en deux dimensions dans le plan cranio-caudal de la densité minérale osseuse des tibias, tandis que les sections histologiques utilisées pour l'analyse histomorphométrique ont été prises dans le plan médio-latéral. Les mesures par DEXA sont donc sensibles aux variations dans le plan médio-latéral et nos résultats en fait démontrent une corrélation entre les valeurs plus faibles de BMD et la largeur moins grande des tibias des groupes de 0.3 μg et 1.2 μg de TGF-ß1 ($r=0.69$, $p<0.01$) dans le plan médio-latéral. Les analyses histomorphométriques sont par contre indépendante des dimensions des cal osseux car l'utilisation de couches minces élimine essentiellement les variations dans le plan cranio-caudal et les valeurs sont présentées par rapport au volume total de tissus pour éliminer les variations dans le plan médio-latéral. Ainsi, tous les groupes ont probablement une densité minérale osseuse tridimensionnelle semblable. Pour corroborer cette hypothèse, les mesures de BMD devraient être faites par tomographie quantitative (QCT).

Nous ne sommes pas en mesure cependant d'expliquer l'effet de la dose de TGF-ß1 que nous avons observé sur la dimension des cal osseux. Puisque la composition du milieu de dissolution du TGF-ß1, le volume d'injection ainsi que la procédure pour l'injection du TGF-ß1 étaient les mêmes pour tous les groupes, les résultats semblent suggérer que le TGF-ß1 a un effet quadratique sur les dimensions des cals osseux, avec une réduction de la grosseur du cal en présence d'une dose de 0.3 µg et 1.2 µg de TGF-ß1 mais une augmentation de la taille des cals osseux lorsqu'une dose de 0.6 µg de TGF-ß1 est administrée. Plusieurs effets du TGF-ß1 dépendent de la dose, mais le comportement en général est biphasique (Joyce *et al.*, 1990; Zellin *et al.*, 1998), ce qui met en doute l'importance de nos observations sur la variation de la taille des cals osseux avec la dose de TGF-ß1.

Les résultats des tests mécaniques, en considérant également les analyses histomorphométriques, suggèrent que le TGF-ß1 – indépendamment de la dose testée – augmente légèrement la stabilité mécanique des tibias allongés. Il serait donc intéressant de déterminer si cette meilleure stabilité induit une ossification de type membranaire dans la zone fibreuse au centre des tibias allongés, ce qui permettrait d'expliquer la plus faible quantité de tissu cartilagineux observée dans les tibias injectées de TGF-ß1. Malgré les résultats intéressants qui pointent vers une réduction du temps de port du fixateur, l'amélioration ne semble pas suffisante, ce qui remet en question la validité de poursuivre cette étude avec le TGF-ß1, surtout lorsque des résultats plus encourageants ont été dernièrement obtenus avec des injections de BMP-7 (Amako *et al.*, 2001).

CHAPITRE 7. Discussion générale

Les connaissances sur le processus biochimique derrière la technique d'allongement des os par distraction commencent à s'accumuler depuis le développement de nouvelles techniques d'analyse. Les facteurs de croissance présents lors du processus sont en grande majorité identifiés mais leurs rôles individuels exacts ainsi que leurs actions synergiques restent encore à être mieux définis. Ainsi, la combinaison de facteurs de croissance nécessaires pour améliorer le processus de consolidation osseuse de même que la dose de chacun, le moment critique de leur introduction et leur durée d'action au niveau du processus ne peuvent être déterminés à l'heure actuelle que par essais et erreurs.

Ce projet a donc été initié dans le but de développer un système minimalement invasif qui permettrait une libération contrôlée de facteurs de croissance dans le site allongé de tibias de lapins. Il fait partie intégrante d'un projet mère dont l'objectif principal est de trouver un ou une combinaison de facteurs de croissance permettant d'accélérer le processus de consolidation osseuse d'un site allongé et donc de réduire le temps de port du fixateur. Le système de libération pour sa part permettrait de prolonger la présence des facteurs de croissance dans le site, qui sont autrement rapidement éliminés. Le potentiel de cette approche a été mis en évidence par Ongpipattanakul *et al.* (1997). A l'aide de techniques radioactives, il a démontré qu'en utilisant des particules de phosphate tricalcique (TCP) dans un défaut osseux de radius de lapins, la demi-vie du TGF-ß1 pouvait être dramatiquement augmentée de 2.2 minutes à 4-6 jours. Avec leur particules TCP, ils ont obtenu une libération de TGF-ß1 sur une période d'un peu plus de 21 jours. L'utilisation d'un système de libération représente donc une alternative attrayante comparée à l'emploi d'une dose très élevée de facteurs de croissance ou à l'injection de multiples doses plus faibles. Les coûts pourraient en être ainsi visiblement réduits. De plus, l'association de l'expression de BMPs et du TGF-ß1 à des cellules de sarcomes humains a soulevé des inquiétudes sur la sécurité des facteurs de croissance et, par ce fait,

a souligné la nécessité d'introduire une dose minimale de facteurs de croissance dans un site osseux afin de prévenir la possibilité que surviennent des effets secondaires néfastes (Winn *et al.*, 1998; Yoshikawa *et al.*, 1994; Raval *et al.*, 1996).

Néanmoins, le développement d'un système de libération n'est pas une alternative simple. Le système en soi doit être biocompatible, de même que biodégradable et ce, préférablement à un taux compatible à la vitesse de la formation osseuse. Ces critères éliminent donc l'utilisation d'une mini-pompe osmotique qui, malgré son avantage au niveau du contrôle de la libération, est une technique invasive. Les travaux de Rauch *et al.* (2000b) suggèrent également que l'emploi d'un tel système dans un site sous contraintes mécaniques importantes – particulièrement lors de la distraction – pourrait ralentir plutôt qu'améliorer le processus de régénération osseuse.

En plus d'être biocompatible et biodégradable, le système de libération doit être adaptable au problème clinique et capable de fournir le traitement désiré, c'est-à-dire d'être en mesure de modifier le taux de libération afin d'obtenir une libération programmée selon les caractéristiques voulues (vitesse de libération – uniforme ou variable, temps de libération, etc.) pour un ou même plusieurs facteurs de croissance (Winn *et al.*, 1998).

Certes, les matériaux synthétisés en laboratoire, dont en particulier les polymères, présentent un avantage évident comme système de libération car il est beaucoup plus facile de modifier leurs propriétés physicochimiques (géométrie, porosité, chimie et texture de surface, etc.) (Temenoff et Mikos, 2000). Cependant, le développement de systèmes synthétiques peut causer des problèmes subséquents relatifs à la biocompatibilité des produits de dégradation et/ou des produits résiduels employés lors de la fabrication du système. Ceci a par exemple été observé avec les polymères à base d'acide polylactique (Lam *et al.*, 1993; Suganuma et Alexander, 1993; Böstman, 1991). Les polymères sont aussi sensibles aux traitements thermiques et aux rayons gamma, ce

qui rend leur stérilisation adéquate plus difficile (Athanasiou *et al.*, 1996). Une autre méthode pour libérer les facteurs de croissance est l'emploi de la thérapie génique. Cette technique est certainement un outil attrayant pour transférer à des cellules d'un défaut osseux l'habileté de contrôler leur production de certains facteurs de croissance spécifiques, en plus de servir de système facilement injectable. Des résultats préliminaires semblent démontrer le potentiel de cette technique (Baltzer *et al.*, 1999). Elle est cependant trop récente pour démontrer si les vecteurs viraux sont sécuritaires et si le traitement permettra un contrôle du temps et de la quantité de facteurs de croissance nécessaire pour accélérer la régénération osseuse (Kirker-Head, 2000). Par contre, les céramiques, en plus d'être plus facilement stérilisables, ont l'avantage d'offrir un support minéral aux cellules. Selon une étude, ce support pourrait agir en synergie avec les facteurs ostéoinducteurs pour obtenir une union supérieure du défaut osseux (Winn *et al.*, 1998).

De toute évidence, d'autres matériaux en plus du corail remplissaient nos critères de biocompatibilité, biodégradation, stérilisation facile, ainsi que d'accessibilité sous forme de particules. Cependant, le corail possède l'avantage d'avoir été le sujet d'un grand nombre d'études durant les trente dernières années, autant du côté expérimental que clinique. Ces études ont permis de démontrer ses applications et sa biocompatibilité à long terme, en plus d'avoir permis d'optimiser les façons les plus appropriées de l'employer (Jammet, 1993-1994; Roux *et al.*, 1995; Yukna et Yukna, 1998; Pouliquen *et al.*, 1989; de la Caffinière *et al.*, 1998). Le fait que le corail soit un matériau naturel et que l'exosquelette de certaines espèces de coraux marins soit construit selon une architecture curieusement semblable à l'os trabéculaire, ne fait que le rendre plus intéressant. Après tout, quel meilleur substitut osseux qu'un matériau exerçant une des fonctions similaires à l'os, celle du support pour la survie des cellules (Fricain *et al.*, 1998a)?

Certes, le corail ne peut pas être qualifié de substitut osseux idéal car tout comme plusieurs matériaux biodégradables, il maintient moins facilement une intégrité mécanique généralement suffisamment longue du membre traité pour ne pas nécessiter le support d'un système de fixation (Gao *et al.*, 1997b). Pour un système de libération injectable, ce n'est guère un souci. Un deuxième désavantage du corail est son inhabileté d'induire une formation osseuse dans un site extrasquelettique, comme l'hydroxyapatite semblerait pouvoir le faire dans les babouins (Ripamonti, 1999). Cependant, le corail peut être combiné à des facteurs ostéoinducteurs et ne semble pas empêcher ces facteurs d'exercer leur effet *in vivo*. Plusieurs études ont démontré cet aspect et certaines ont même démontré que la combinaison de corail avec un facteur de croissance induit une plus grande formation d'os que l'utilisation du facteur de croissance seul (Gao *et al.*, 1996 & 1997a; Arnaud *et al.*, 1994; Boden *et al.*, 1997). Le comportement du corail comme système de libération n'avait jamais été examiné. Il nous a donc semblé préférable d'étudier cet aspect avant de débuter les études *in vivo*. Nous cherchions à nous assurer que le corail pouvait libérer de façon soutenue un facteur de croissance et que le potentiel existait pour moduler sa cinétique de libération afin de pouvoir ultimement obtenir une libération répondant au besoin de régénération osseuse d'un modèle animal.

Notre étude *in vitro* démontre que le corail peut adsorber l'albumine et le TGF-ß1, mais très peu la gélatine. Malgré le but principal de cette étude de déterminer la cinétique de libération du TGF-ß1 de particules de corail, nos résultats sur l'adsorption supportent les travaux de Volpi (1999) qui a démontré que le corail interagit électrostatiquement avec les glycosaminoglycanes, et ce principalement par ses sites de calcium. En effet, l'albumine, une protéine acide avec une charge nette négative (à un pH > 5) a été adsorbée selon le pH, de 2 à 4 fois plus que la gélatine, une protéine avec un plus grand nombre de résidus non polaires et une charge nette positive (à un pH < ~10). De plus, les quantités similaires de TGF-ß1 adsorbées en présence d'albumine et de gélatine suggèrent que le TGF-ß1 peut être directement adsorbé par le corail. Puisque le TGF-ß1

est aussi une protéine à charge nette positive (à un pH < 9.5), il serait intéressant de vérifier dans une étude future les types d'interactions entre les protéines et le corail, les sites où ces interactions ont lieu, de même que le changement de conformation des protéines lors de l'adsorption, en employant des techniques spécialisées, telles la spectroscopie infrarouge FTIR/ATR, la microscopie à force atomique et l'ellipsométrie (Chittur, 1998a,b; Elwing, 1998, Siedlecki et Marchant, 1998) Uludag *et al.* (1999) ont récemment suggéré que certains matériaux piégeraient les facteurs de croissance, comme le BMP-2, dans leur espace tridimensionnel, plutôt que de former des interactions en surface. Enfin, l'utilisation de techniques comme la spectroscopie infrarouge est particulièrement intéressante car elle peut démontrer des changements de conformation de protéines après leur adsorption et déterminer si les changements sont réversibles une fois les protéines libérées. La conformation d'une protéine reflète directement son activité biologique (Chinn, 1995). Lors de notre étude *in vitro*, nous avons essayé d'employer le test d'inhibition de la prolifération des cellules épithéliales de poumons de visons (*CCl64 mink lung epithelial growth inhibition assay*) pour évaluer indirectement si nos manipulations, telles les conditions d'adsorption sur le corail, avaient affecté l'activité du TGF-ß1 (Danielpour *et al.*, 1989). Les milieux d'adsorption et de relargage sans TGF-ß1 semblaient cependant induire la prolifération des cellules, masquant ainsi l'inhibition par le TGF-ß1 et rendant les résultats non reproductibles.

Les expériences des cinétiques de relargage du TGF-ß1 ont pour leur part démontré clairement que les conditions d'adsorption du TGF-ß1 (type de co-adsorbant et pH), ainsi que la taille des particules de corail pouvaient influencer la quantité de TGF-ß1 relarguée à travers le temps (figures 4.3 et 4.4). Nous avons également démontré que pour une même taille de particules de corail, le relargage après 24 h dépend principalement de la vitesse de diffusion du TGF-ß1. La dégradation du corail ne semble pas être un facteur (figure 4.6). Cette dernière observation indique que les cinétiques de libération obtenues des études *in vitro* ne reflètent probablement pas les cinétiques de libération qui seraient obtenues dans des conditions *in vivo*, car aucune particule n'a été identifiée sur les coupes

histologiques des tibias de lapins trois semaines après l'injection des particules de corail, à l'exception possible de quelques cavités de moëlle osseuse au centre du site allongé pouvant contenir ce qui semblerait être de petites particules de corail avec un contour plus arrondi (figure 5.1). En fait, si nous comparons nos résultats des demi-vies du TGF-ß1, c'est-à-dire du temps requis pour la libération de 50% de TGF-ß1, à celles obtenues pour des études *in vivo*, il est clair que les valeurs que nous avons obtenues ne sont pas en général représentatives du comportement général des matériaux de libération testés *in vivo*. Nous avons obtenu des demi-vies pour le TGF-ß1 variant de 2-3 jours, lorsqu'en présence du BSA à pH 3 et 7.4, jusqu'à des demi-vies de 12 à 18 jours, lorsque le TGF-ß1 fut mis en présence de gélatine à pH 7.4 et à pH 3 et pH 11, respectivement. Par contre, le temps nécessaire pour libérer 67% des BMPs 2, 4 et 6 semble varié entre 3 et 6 jours selon l'utilisation d'éponges de collagènes, de matrices d'un copolymère, ou de particules d'os bovin ou humain déminéralisé (Uludag *et al.*, 2000).

La modulation de la cinétique de libération par les conditions d'adsorption du TGF-ß1 et de la taille des particules de corail semblerait cependant toujours possible *in vivo*. Krewson *et al.* (1996) ont démontré que leur copolymère chargé de *nerve growth factor* (NGF) et implanté dans le cerveau de rats a libéré des quantités variables de NGF sur une période d'une semaine, selon le type de co-dispersant présent. Afin de mieux caractériser le comportement des particules de corail comme système de libération, il serait néanmoins essentiel d'entreprendre une étude sur la cinétique de libération du corail *in vivo* en employant un modèle ectopique de rats (Uludag *et al.*, 1999).

Nos résultats *in vitro* nous ont encouragés à entreprendre le second volet de ce projet. L'évaluation du système d'injection avec les particules de corail dans un milieu de gélatine indique que le système semblerait améliorer les propriétés mécaniques des tibias, en particulier la rigidité sous traction, ainsi que la stabilité du site allongé des tibias (figure 5.3, tableau 5.3). L'analyse densitométrique démontre qu'il y a peu de différence de densité minérale osseuse entre les tibias ayant reçu du corail et ceux n'ayant reçu

aucune injection. En tenant compte des résultats des tests mécaniques et de l'histomorphométrie, les résultats suggèrent qu'un remodelage osseux plus rapide a lieu en présence de particules de corail. D'autres lapins doivent cependant être testés afin de démontrer de façon définitive que les particules de corail n'ont pas causé les deux non-unions.

La problématique principale réside cependant dans le comportement du système d'injection lors de son application dans les sites allongés. Le milieu de suspension des particules de corail sélectionné, une solution de 1% de gélatine, n'est pas adéquat. Selon les observations lors de l'injection, nous sommes en mesure de conclure que le milieu optimal doit maintenir une consistance de gel autant à 4°C (entreposage) qu'à la température de la pièce, en plus d'être biocompatible et suffisamment dense pour maintenir les particules de corail en suspension. Selon une étude précédente, un polymère à base de cellulose semblerait être un bon candidat (Dupraz *et al.*, 1999; Gauthier *et al.*, 1999; Temenoff et Mikos, 2000). Cependant, une alternative intéressante qui pourrait éliminer le besoin d'un milieu intermédiaire pour l'introduction des particules de corail serait d'essayer les nouvelles techniques minimalement invasives. Celle en question consiste à employer un cylindre dont le diamètre peut permettre des particules jusqu'à 2-3 mm de diamètre de passer dans la cavité cylindrique pour rejoindre le site osseux, et ce en y accédant par une incision. Moyennant l'optimisation de la méthode d'introduction des particules de corail dans le tibia allongé, nos résultats préliminaires suggèrent néanmoins que le corail ne ralentit pas le processus de consolidation osseuse mais en fait pourrait être bénéfique.

Pendant les tests *in vivo* sur notre système de particules de corail injectable, nous avons également procédé au troisième volet de ce projet, soit à l'identification d'une dose de TGF-ß1 permettant l'amélioration de la consolidation osseuse des tibias allongés. Les résultats de cette étude nous ont amenés à une remise en question de la validité de notre choix de facteur de croissance pour le projet. Ainsi, nous avons observé une variation de

la distribution de la densité osseuse selon la dose de TGF-ß1 injectée, mais l'analyse histomorphométrique n'indique pas de différence de volume osseux entre les tibias des différents groupes, incluant ceux du groupe contrôle (figure 6.1, tableau 6.1). Par contre, les propriétés mécaniques en traction, la force ultime et la rigidité, sont légèrement supérieures à celles des tibias allongés mais non traités (figure 6.2). De plus, les valeurs semblent augmentées avec la diminution de la dose de TGF-ß1. Nous n'avons pas observé cependant une différence suffisante pour être en mesure d'employer cette étude comme référence pour évaluer l'efficacité du système de libération du TGF-ß1 par les particules de corail sur la consolidation osseuse des tibias allongés.

Ces résultats sont surprenants car le TGF-ß1 est considéré comme un des facteurs de croissance qui jouent un rôle important dans le processus de formation osseuse (Bonewald et Dallas, 1994; Bostrom et Asnis, 1998). Plusieurs études ont démontré que le TGF-ß1 augmentait la formation d'os, et ce même à de faibles doses chez le lapin (annexe 2). Le moment approprié pour introduire le TGF-ß1 ainsi que la dose à employer sont encore sous débat. Dans notre étude, ces deux facteurs auraient pu influencer les résultats obtenus. Le retour au niveau basal de l'expression du TGF-ß1 suivant la fin de l'allongement suggère que l'introduction de TGF-ß1 exogène à la fin de l'allongement pourrait être bénéfique. Ceci ne semble pas avoir été le cas à moins que la dose de TGF-ß1 n'était pas adéquate. Des études antérieures ont démontré que 0.2 μg et 1.0 μg de TGF-ß1 de recombinant human injecté dans un défaut du radius de lapins permettaient d'améliorer les propriétés mécaniques de torsion des radius lorsque comparées à celles de radius de lapins n'ayant reçu aucune injection ou une dose plus élevée de TGF-ß1 de 10 μg (Ongpipattanakul *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 1998). Le modèle animal choisi pour évaluer le système de libération est également très spécifique. Contrairement aux modèles typiques de défauts osseux simples, la régénération osseuse dans notre modèle animal était en fait déjà initiée lors de l'introduction du TGF-ß1, ce qui complique le type d'intervention possible. L'applicabilité du lapin dans des études sur le système osseux est également questionnée par certains chercheurs, puisque le lapin a un métabolisme plus

un métabolisme plus rapide et donc un pouvoir de guérison osseuse plus rapide. D'un autre côté ceci est considéré un avantage car l'utilisation de lapins dans une étude permet de réduire la durée du protocole expérimental, en plus d'être moins coûteux et de permettre une évaluation mécanique du membre traité (Kirker-Head, 2000).

Enfin, nous avons observé des complications avec le système de fixation (4.2% avec le mécanisme d'allongement et plus de 10% avec des vis qui crochissaient). Selon Behrens (1989), les problèmes de fixateurs ne sont plus aussi courants chez les humains car les fabricants ont réussi à améliorer leurs systèmes de fixation pour subvenir aux besoins cliniques. De plus, les lapins ont tendance à appliquer des contraintes élevées sur leurs pattes arrières, contrairement aux humains qui sont généralement plus sédentaires lors du traitement. Pour résoudre le problème, la rigidité du fixateur pourrait être augmentée en utilisant six tiges au lieu de quatre, ce qui permettrait possiblement de réduire le stress sur les tiges (Chao *et al.*, 1989). Nous avons également observé des comportements inquiétants chez les lapins, tels qu'une faible perte de poids (environ 5%) lors de l'allongement de même qu'un comportement nerveux et un rythme cardiaque élevé lorsqu'ils étaient manipulés. Ces comportements sont généralement considérés comme étant des indicateurs de douleur, de détresse ou d'inconfort (Morton et Griffith, 1985). Les lapins sont cependant des animaux plus nerveux. Certains lapins avaient tendance à favoriser leur patte non traitée et à même garder la patte allongée fléchie. D'autres encore léchaient excessivement le dessus de leur patte lors de l'allongement, et dans un cas il fut impossible d'empêcher le lapin de s'automutiler de façon grave. Ainsi, malgré le besoin de ne pas influencer les résultats, ces observations suggèrent que l'utilisation de médicament contre la douleur, tel le Fentanil, lors de l'allongement devrait être considérée.

CHAPITRE 8. Conclusion et perspectives

Ce projet a permis de démontrer clairement que le corail peut servir de système de libération pour les facteurs de croissance comme le TGF-ß1. Nous avons également démontré qu'en dépit des difficultés avec la méthode d'injection, les particules de corail semblent améliorer la qualité de consolidation des tibias allongés de lapins, un modèle considéré assez complexe en soit. En combinaison avec des facteurs de croissance, les particules de corail ont donc le potentiel d'être un puissant substitut osseux. L'étude portant sur le TGF-ß1, lorsqu'elle est mise en perspective avec l'étude antérieure du Dr Hamdy, suggère que le TGF-ß1 ne conduit pas à une accélération suffisante de la consolidation osseuse des tibias allongés, ou encore que la dose de TGF-ß1 requise pour avoir un effet bénéfique doit être largement supérieure à celles employées.

Les études futures devraient donc se concentrer sur une évaluation plus approfondie des caractéristiques du corail comme système de libération *in vivo*, en employant un facteur de croissance tels que les BMPs 2 et 7. La cinétique de libération pourrait être suivie en fonction de la distribution du facteur de croissance lors de la libération dans le tibia allongé, par des techniques non invasives comme l'emploi d'une caméra gamma pour détecter la protéine marquée à la radioactivé. Enfin, l'optimisation de la méthode minimalement invasive d'introduction des particules de corail pourrait nettement augmenter l'applicabilité du corail dans le domaine orthopédique. A un niveau plus fondamental, l'ensemble des travaux publiés révèlent qu'il existe un besoin pressant pour l'élucidation du rôle exact des facteurs de croissance impliqués dans le processus d'ostéogenèse par distraction. La production d'une synthèse affinée de ce processus permettrait de cibler adéquatement le traitement requis pour réduire le temps de consolidation des os allongés.

Références

AARON, A.D. et EILERT, R.E. (1996). Results of the Wagner and Ilizarov methods of limb-lengthening. *J. Bone Joint Surg [Am.]*, 78, 20-29.

ALPASLAN, C., ALPASLAN, G., et OYGUR, T. (1994). Bone reaction to subperiosteally implanted hydroxyapatite/collagen/glycosaminoglycans and coral in the guinea pig. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 77, 335-340.

AMAKO, M., HAMDY, R., et STEFFEN, T. (2001). The effects of a single injection of OP-1 on stimulating of new bone formation in distraction osteogenesis in the rabbit. *ORS*, 582.

ANDREW, J.G., HOYLAND, J., ANDREW, S.M., FREEMONT, A.J., et MARSH, D. (1993). Demonstration of TGF-ß1 mRNA by *in situ* hybridization in normal human fracture healing. *Calcif. Tissue Int.*, 52, 74-78.

ARNAUD, E., DE POLLAK, C., MEUNIER, A., SEDEL, L., DAMIEN, C., et PETITE, H. (1999). Osteogenesis with coral is increased by BMP and BMC in a rat cranioplasty. *Biomaterials*, 20, 1909-1918.

ARNAUD, E., MOLINA, F., MENDOZA, M., FUENTE DEL CAMPO, A., et ORTIZ-MONASTERIO, F. (1998). Substitut osseux avec facteur de croissance. Cas cliniques préliminaires pour des indications cranio- et maxillo-faciales. *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, 43, 40-50.

ARNAUD, E., MORIEUX, C., WYBIER, M., et DE VERNEJOUL, M.C. (1994). Potentiation of transforming growth factor (TGF-ß1) by natural coral and fibrin in a rabbit cranioplasty model. *Calcif. Tissue Int.*, 54, 493-498.

ARONSON, J. (1997). Limb-lengthening, skeletal reconstruction, and bone transport with the Ilizarov method. *J. Bone Joint Surg. [Am.]*, 79, 1243-1258.

ARONSON, J., HARRISON, B.H., STEWART, C.L., et HARP, J.H. (1989). The histology of distraction osteogenesis using different external fixators. *Clin. Orthop.*, 241, 106-116.

ASPENBERG, P., JEPPSSON, C., WANG, J.-S., et BOSTROM, M. (1996). Transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein 2 for bone ingrowth: A comparison using bone chambers in rats. *Bone*, 19, 499-503.

ATHANASIOU, K.A., NIEDERAUER, G.G., et AGRAWAL, C.M. (1996). Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 17, 93-102.

ATLAN, G., JAMMET, P., MONTES DE OCA, L., et SOUYRIS, F. (1991). Indications actuelles du corail en chirurgie cranio-faciale. Dix ans d'expérience. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*, 92, 199-203.

BALLOCK, R.T., HEYDEMANN, A., IZUMI, T., et REDDI, A.H. (1997). Regulation of the expression of the type-II collagen gene in periosteum-derived cells by three members of the transforming growth factor-β superfamily. *J. Orthop. Res.*, 15, 463-467.

BALTZER, A.W.A., LATTERMANN, C., WHALEN, J.D., WOOLEY, P.D., WEISS, K., NASSER, S., ROBBINS, P.D., EVANS, C.H. (1999). Bone healing induced by adenoviral based gene therapy with BMP-2 and TGF BETA. *ORS*, 308.

BECK, L.S., WONG, R.L., DeGUZMAN, L., LEE, W.P., ONGPIPATTANAKUL, B., et NGUYEN, T.H. (1998). Combination of bone marrow and TGF-β1 augment the healing of critical-sized bone defects. *J. Pharm. Sci.*, 87, 1379-1386.

BEGLEY, C.T., DOHERTY, M.J., HANKEY, D.P., et WILSON, D.J. (1993). The Culture of Human Osteoblasts upon Bone Graft Substitutes. *Bone*, 14, 661-666.

BEGLEY, C.T., DOHERTY, M.J., MOLLAN, R.A.B., et WILSON, D.J. (1995). Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. *Biomaterials*, 16, 1181-1185.

BEHRENS, F. (1989). General theory and principles of external fixation. *Clin. Orthop.*, 241, 15-23.

Biocoral, *GESTO*, www.maitrise-orthop.com/gesto/biocoral.shtml, 1-8.

BIZETTE, C., RAUL, J.-S., ORHAN, B., JACQUET, G., et CZORNY, A. (1999). Résultats d'arthrodèses intersomatiques cervicales par greffons coralliens. *Neurochirurgie*, 45, 4-14.

BLACK, J., PERDIGON, P., BROWN, N., et POLLACK, S.R. (1984). Stiffness and strength of fracture callus. *Clin. Orthop.*, 182, 278-288.

BODEN, S.D., SCHIMANDLE, J.H., et HUTTON, W.C. (1995). The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part II: Study of dose, carrier, and species. *Spine*, 20, 2633-2644.

BODEN, S.D., SCHIMANDLE, J.H., HUTTON, W.C., DAMIEN, C.J., BENEDICT, J.J., BARANOWSKI, C., et COLLIER, S. (1997). *In vivo* evaluation of resorbable

osteoinductive composite as a graft substitute for lumbar spinal fusion. *J. Spinal Disord.*, 10, 1-11.

BOITEUX, J.-P., PARÉ, G., et ROBIN, J.-P. (1988). Comblement madréporaire périapical. Bilan clinique de l'utilisation d'un matériau de comblement madréporaire dans les pertes de substances osseuses périapicales. *Rev. Odontostomatol. (Paris)*, 17, 291-298.

BONEWALD, L.F. (1999). Regulation and regulatory activities of transforming growth factor ß. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 9, 33-44.

BONEWALD, L.F. et DALLAS, S.L. (1994). Role of active and latent transforming growth factor β in bone formation. *J. Cell Biochem.*, 55, 350-357.

BOSTMAN, O.M. (1991). Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants. *J. Bone Joint Surg. [Br.]*, 73, 679-682.

BOSTROM, M.P.G. et ASNIS, P. (1998). Transforming growth factor beta in fracture repair, *Clin. Orthop.*, 355S, S124-S131.

BOU-ABBOUD, N.N. et OUHAYOUN, J.-P. (1998). Bone formation with discs or particles of natural coral skeleton plus polyglactin 910 mesh: Histologic evaluation in rat calvaria. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 13, 115-120.

BOU-ABBOUD, N.N., PATAT, J.-L., GUILLEMIN, G., ISSAHAKIAN, S., FOREST, N., et OUHAYOUN, J.-P. (1994). Evaluation of the osteogenic potential of biomaterials implanted in the palatal connective tissue of miniature pigs using undecalcified sections. *Biomaterials*, 15, 201-207.

BOUTAULT, F., CANTALOUBE, D., TESTELIN, S., GUEROULT, J.-M., et HUET, P. (1997). Intérêt des blocs de corail dans les plasties d'augmentation des pommettes: Étude prospective portant sur 23 patients. *Ann.Chir. Plast. Esthet.*, 42, 216-222.

BRAVETTI, P., MEMBRE, H., MARCHAL, L., et JANKOWSKI, R. (1998). Histologic changes in the sinus membrane after maxillary sinus augmentation in goats. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 56, 1170-1177.

BRAYE, F., IRIGARAY, J.L., JALLOT, E., OUDADESSE, H., WEBER, G., DESCHAMPS, N., DESCHAMPS, C., FRAYSSINET, P., TOURENNE, P., TIXIER, H., TERVER, S., LEFAIVRE, J., et AMIRABADI, A. (1996). Resorption kinetics of osseous substitute: natural coral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials*, 17, 1345-1350.

BUCKWALTER, J.A., GLIMCHER, M.J., COOPER, R.R., et RECKER, R. (1995). Bone biology. Part I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 77, 1256-1275.

CENTRELLA, M., McCARTHY, T.L., et CANALIS, E. (1991). Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J. Bone Joint Surg.*, 73, 1418-1428.

CENTRELLA, M., ROSEN, V., HOROWITZ, M.C., WOZNEY, J.M., et McCARTHY, T.L. (1995). Transforming growth factor-ß gene family members, their receptors, and bone cell function. *Endocr. Rev.*, 4, 211-226.

CHAMBERLAIN, J.A. (1978). Mechanical properties of coral skeleton: compressive strength and its adaptive significance. *Paleobiology*, 4, 419-435.

CHAO, E.Y.S., ARO, H.T., LEWALLEN, D.G., et KELLY, P.J. (1989). The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. *Clin. Orthop.*, 241, 24-33.

CHEN, L., KLAES, W., et ASSENMACHER, S. (1996). A comparative morphometric and histologic study of five bone substitute materials. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih*, 76, 527-30.

CHINN, J.A. (1995). Biomaterials: Protein-surface interactions. *The Biomedical Engineering Handbook.* J.D. Bronzino (ed.), CRC PRess, USA, 1597-1608.

CHIROFF, R.T., WHITE, E.W., WEBER, J.N., et ROY, D.M. (1975). Tissue ingrowth of replamineform implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, 6, 29-45.

CHITTUR, K.K. (1998a). FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 19, 357-369.

CHITTUR, K.K. (1998b). Surface techniques to examine the biomaterial-host interface: an introduction to the papers. *Biomaterials*, 19, 301-305.

COLEMAN, S.S. et SCOTT, S.M. (1991). The present attitude toward the biology and technology of limb lengthening. *Clin. Orthop.*, 264, 76-83.

COLLANGETTES-PEYRAT, D., FONCK, Y., CAPELANI, J.C., IRIGARAY, J.L., OUADESSE, H., et BLONDIAUX, G. (1989). Ossification de corail implanté dans une machoire d'ovin: détermination quantitative par des méthodes physiques et étude anatomo-pathologique. *Innov. Tech. Biol. Med.*, 10, 679-693.

CRITCHLOW, M.A., BLAND, Y.S., et ASHHURST, D.E. (1995). The effect of exogenous transforming growth factor-ß2 on healing fractures in the rabbit. *Bone*, 16, 521-527.

CUNIN, G., BOISSONNET, H., PETITE, H., BLANCHAT, C., et GUILLEMIN, G. (2000). Experimental vertebroplasty using osteoconductive granular material. *Spine*, 25, 1070-1076.

DAHL, M.T., GULLI, B., et BERG, T. (1994) Complications of limb lengthening: A learning curve, *Clin. Orthop.*, 301, 10-18.

DAMIEN, C.J., CHRISTEL, P.S., BENEDICT, J.J., PATAT, J.-L., et GUILLEMIN, G. (1993). A composite of natural coral, collagen, bone protein and basic fibroblast growth factor tested in a rat subcutaneous model. *Ann. Chir. Gynaecol. Suppl.*, 82, 117-128.

DAMIEN, C.J., PATAT, J.L., et BENEDICT, J.J. (1998). Natural coral as a carrier for BMPs. *Actualités en Biomatériaux*, D. Mainard, M. Merle, J.P. Delagoutte and J.P. Louis, eds, Editions Romillat, Paris, 4, chapitre 2 (Les substituts osseux), 181-188.

DAMIEN, C.J., RICCI, J.L., CHRISTEL, P., ALEXANDER, H., et PATAT, J.-L. (1994). Formation of a Calcium Phosphate-Rich Layer on Absorbable Calcium Carbonate Bone Graft Substitutes, *Calcif. Tissue Int.*, 55, 151-158.

DANIELPOUR, D., DART, L.L., FLANDERS, K.C., ROBERTS, A.B., SPORN, M.B. (1989). Immunodetection and quantification of the two forms of transforming growth factor-beta (TGF-ß1 and TGF-ß2) secreted by cells in culture. *J. Cell Physiol.*, 138, 79-86.

DAVY, D.T. (1999). Biomechanical issues in bone transplantation. *Orthop. Clin. North Am.*, 30, 553-563.

DE LA CAFFINIERE, J.-Y., VIEHWEGER, E., et WORCEL, A. (1998). Évolution radiologique à long terme du corail implanté en os spongieux au membre inférieur: Corail

madréporique versus hydroxyapatite du corail. *Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot.*, 84, 501-507.

DE PERETTI, F., TROJANI, C., CAMBAS, P.M., LOUBIERE, R., et ARGENSON, C. (1996). Le corail comme soutien d'un enfoncement articulaire traumatique: Étude prospective au membre inférieur de 23 cas. *Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot.*, 82, 234-240.

DE VISSER, K.E. et KAST, W.M. (1999). Effects of TGF-ß on the immune system: implications for cancer immunotherapy. *Leukemia*, 13, 1188-1199.

DEMERS, C. et HAMDY, R.C. (1999). Bone morphogenetic proteins. *Science & Medicine*, Nov./Dec., 8-17.

DEMERS, C., HAMDY, R.C., CORSI, K., CHELLAT, F., TABRIZIAN, M., et YAHIA, L'H. (2001-2). Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review. *Biomed. Mater. Eng.* (submitted).

DEMERS, C., TABRIZIAN, M., HAMDY, R., PETIT, A., et YAHIA, L'H. (2000). Release of transforming growth factor-ß1 from coral particles: Effect of adsorption conditions. *SIROT/CSOS 2000*, Shanghai-Beijing, China.

DEMERS, C., TABRIZIAN, M., HAMDY, R.C., et YAHIA, L'H. (2000). Coral particles and transforming growth factor beta 1: *In vitro* kinetics of release and preliminary *in vivo* study. *Second International Symposium on Advanced Biomaterials (ISAB)*, Montréal, Canada, 104.

DERBYSHIRE, N.D.J. et SIMPSON, A.H.R.W. (1992). A role for ultrasound in limb lengthening. *Br. J.Radiol.*, 65, 576-580.

DODDS, R.A., MERRY, K., LITTLEWOOD, A., et GOWEN, M. (1994). Expression of mRNA for IL1β, IL6 and TGFβ1 in developing human bone and cartilage. *J. Histochem. & Cytochem.*, 42, 733-744.

DOHERTY, M.J., SCHLAG, G., SCHWARZ, N., MOLLAN, R.A.B., NOLAN, P.C., et WILSON, D.J. (1994). Biocompatibility of xenogeneic bone, commercially available coral, a bioceramic and tissue sealant for human osteoblasts. *Biomaterials*, 15, 601-608.

Du corail à biocorail (documentation de Biocoral®), *Société Industrielle INOTEB*, 38 rue Anatole France, 92594 Levallois-Perret, Cedex France.

DUPRAZ, A., NGUYEN, T.P., RICHARD, M., DACULSI, G., et PASSUTI, N. (1999). Influence of a cellulosic ether carrier on the structure of biphasic calcium phosphate ceramic particles in an injectable composite material. *Biomaterials*, 20, 663-673.

EINGARTNER, C., COERPER, S., FRITZ, J., GAISSMAIER, C., KOVEKER, G., et WEISE, K. (1999). Growth factors in distraction osteogenesis. Immuno-histological pattern of TGF-beta1 and IGF-I in human callus induced by distraction osteogenesis. *Int. Orthop.*, 23, 253-9.

ELIAZ, R.E. et KOST, J. (2000). Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins. *J. Biomed. Mater. Res.*, 50, 388-396.

ELWING, H. (1998). Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research. *Biomaterials*, 19, 397-406.

FARHADIEH, R.D., DICKINSON, R., YU, Y., GIANOUTSOS, M.P., et WALSH, W.R. (1999). The role of transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and

basic fibroblast growth factor in distraction osteogenesis of the mandible. *J. Craniofac. Surg.*, 10, 80-6.

FRICAIN, J.C., BAREILLE, R., ULYSSE, F., DUPUY, B., et AMEDEE, J. (1998a). Evaluation of proliferation and protein expression of human bone marrow cells cultured on coral crystallized in the aragonite or calcite form. *J. Biomed. Mater. Res.*, 42, 96-102.

FRICAIN, J.Ch., BAQUEY, Ch., et DUPUY, B. (1995). Resorption of corals implanted in diffusion chambers. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 6, 680-684.

FRICAIN, J.Ch., BAREILLE, R., ROUAIS, F., BASSE-CATHALINAT, B., et DUPUY, B. (1998b). "In vitro" dissolution of coral in peritoneal or fibroblast cell cultures. *J. Dent. Res.*, 77, 406-411.

FRICAIN, J.Ch., ROUDIER, M., ROUAIS, F., BASSE-CATHALINAT, B., et DUPUY, B. (1996). Influence of the structure of three corals on their resorption kinetics. *J. Periodontal. Res.*, 31, 463-469.

FULLER, D.A., STEVENSON, S., et EMERY, S.E. (1996). The effects of internal fixation on calcium carbonate. Ceramic anterior spinal fusion in dogs. *Spine*, 21, 2131-2136.

FURLA, P. et ALLEMAND, D. (2000). Nos ancêtres les coraux. *Médecine Sciences*, 16, 1139-1140.

GALERA, P., VIVIEN, D., PRONOST, S., BONAVENTURE, J., REDINI, F., LOYAU, G., et PUJOL, J.-P. (1992). Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) up-regulation of collagen type II in primary cultures of rabbit articular chondrocytes (RAC) involves

increased mRNA levels without affecting mRNA stability and procollagen processing. *J. Cell. Physiol.*, 153, 596-606.

GAO, J., SYMONS, A.L., et BARTOLD, P.M. (1998). Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-β 1) in the developing periodontium of rats. *J. Dent. Res.*, 77, 1708-1716.

GAO, T.-J., LINDHOLM, T.S., KOMMONEN, B., RAGNI, P., PARONZINI, A., LINDHOLM, T.C., JALOVAARA, P., et URIST, M.R. (1997a). The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep. *Int. Orthop. (SICOT)*, 21, 194-200.

GAO, T.J., LINDHOLM, T.S., MARTTINEN, A., et URIST, M.R. (1996). Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. *Int. Orthop. (SICOT)*, 20, 321-325.

GAO, T.-J., TUOMINEN, T.K., LINDHOLM, T.S., KOMMONEN, B., et LINDHOLM, T.C. (1997b). Morphological and biomechanical difference in healing in segmental tibial defects implanted with Biocoral® or tricalcium phosphate cylinders. *Biomaterials*, 18, 219-223.

GAUTAM, J. et SCHOTT, H. (1994). Interaction of anionic compounds with gelatin. II: Effect on some physicochemical properties of gelatin. *J. Pharm. Sci.*, 83, 316-321.

GAUTHIER, O., BOULER, J.-M., WEISS, P., BOSCO, J., DACULSI, G., et AGUADO, E. (1999). Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.*, 47, 28-35.

GAZIT, D., ZILBERMAN, Y., TURGEMAN, G., ZHOU, S., et KAHN, A. (1999). Recombinant TGF-β1 stimulates bone marrow osteoprogenitor cell activity and bone matrix synthesis in osteopenic, old male mice. *J. Cell. Biochem.*, 73, 379-389.

GHIAMPHY, K., GOSSET, F., et KEHR, P. (1999). Coral grafts used in cervical interbody fusion. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, 9, 209-222.

GHONEEM, H.F., WRIGHT, J.G., COLE, W.G., et RANG, M. (1996). The Ilizarov method for correction of complex deformities: Psychological and functional outcomes. *J. Bone Joint Surg. [Am.]*, 78, 1480-1485.

GOMBOTZ, W.R., PANKEY, S.C., BOUCHARD, L.S., PHAN, D.H., PUOLAKKAINEN, P.A. (1994). Stimulation of bone healing by transforming growth factor-beta1 released from polymeric or ceramic implants. *J. Appl. Biomater.*, 5, 141-150.

GOODMAN, S.B., SONG, Y., CHUN, L., REGULA, D., et ASPENBERG, P. (1999). Effects of TGFß on bone ingrowth in the presence of polyethylene particles. *J. Bone Joint Surg. [Br.]*, 81, 1069-1075.

GOSAIN, A.K., SONG, L.-S., SANTORO, T., WEIHRAUCH, D., BOSI, B.O., CORRAO, M.A., et CHILIAN, W.M. (2000). Effects of transforming growth factor-ß and mechanical strain on osteoblast cell counts: An in vitro model for distraction osteogenesis. *Plast. Reconstr. Surg.*, 105, 130-139.

GRIFFITH, D.L., KECK, P.C., SAMPATH, T.K., RUEGER, D.C., et CARLSON, W.D. (1996). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc., Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 878-883.

GUIGUI, P., PLAIS, P.Y., FLAUTRE, B., VIGUIER, E., BLARY, M.C., CHOPIN, D., LAVASTE, F., et HARDOUIN, P. (1994). Experimental model of posterolateral spinal arthrodesis in sheep. Part 2. Application of the model: Evaluation of vertebral fusion obtained with coral (Porites) or with a biphasic ceramic (Triosite). *Spine*, 19, 2798-2803.

GUILLEMIN, G., FOURNIÉ, J., PATAT, J.-L., et CHÉTAIL, M. (1981). Contribution à l'étude du devenir d'un fragment de squelette de corail madréporaire implanté dans la diaphyse des os longs chez le chien. *C.R. Seances Acad. Sci. III*, 293, 371-376.

GUILLEMIN, G., LAURAY, M., et MEUNIER A. (1993). Natural coral as a substrate for fibroblastic growth *in vitro*. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 4, 575-581.

GUILLEMIN, G., MEUNIER, A., DALLANT, P., CHRISTEL, P., POULIQUEN, J.C., et SEDEL, L. Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities. *J. Biomed. Mater. Res.*, 23, 765-779.

GUILLEMIN, G., PATAT, J.-L., FOURNIE, J., et CHÉTAIL, M. (1987). The use of coral as a bone graft substitute. *J. Biomed. Mater. Res.*, 21, 557-567.

HAGINO, T. et HAMADA, Y. (1999). Accelerating bone formation and earlier healing after using demineralized bone matrix for limb lengthening in rabbits. *J. Orthop. Res.*, 17, 232-237.

HAMANISHI, C., YOSHII, T., TOTANI, Y., et TANAKA, S. (1994). Bone mineral density of lengthened rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cells: An experimental study using dual X-ray absorptiometry. *Clin. Orthop.*, 303, 250-255.

HAMDY, R.C., SILVESTRI, A., RIVARD, C.H., et EHRLICH, M. (1997). Évaluation histologique de la régénération osseuse dans les cas d'allongement des membres suivant la technique d'Ilizarov: Une étude expérimentale chez le chien. *Ann. Chir.*, 51, 875-883.

HAMDY, R.C., WALSH, W., OLMEDO, M., WALLACH, M., et EHRLICH, M.G. (1995). Correlation between ultrasound imaging and mechanical and physical properties of lengthened bone: An experimental study in a canine study. *J. Pediatr. Orthop.*, 15, 206-211.

HANAZAWA, S., TAKESHITA, A., TSUKAMOTO, Y., KAWATA, Y., TAKARA, K.O., et KINATO, S. (1991). Transforming growth factor-beta-induced gene expression of monocyte chemoattractant JE in mouse osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180, 1130-1136.

HARVELL, C.D., KIM, K., BURKHOLDER, J.M., COLWELL, R.R., EPSTEIN, P.R., GRIMES, D.J., HOFMANN, E.E., LIPP, E.K., OSTERHAUS, A.D.M.E., OVERSTREET, R.M., PORTER, J.W., SMITH, G.W., et VASTA, G.R. (1999). Emerging marine diseases-Climate links and anthropogenic factors. *Science*, 285, 1505-1510.

HAUFEL, T., DORMANN, S., HANUSCH, J., SCHWIEGER, A. et BAUER, G. (1999). Three distinct roles for TGF-beta during intercellular induction of apoptosis: A review. *Anticancer Res.*, 19, 105-112.

HECKMAN, J.D., AUFDEMORTE, T.B., ATHANASIOU, K.A., SCHWARTZ, Z., KORVICK, D.L., BROOKS, B.P., NGUYEN, T., WONG, R., ONGPIPATTANAKUL, B., et BOYAN, B.D. (1995). Treatment of acute ostectomy defects in the dog radius with rhTGF-ß1. *ORS*, 590.

HECKMAN, J.D., EHLER, W., BROOKS, B.P., AUFDEMORTE, T.B., LOHMANN, C.H., MORGAN, T., et BOYAN, B.D. (1999). Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor-ß enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J. Bone Joint Surg. [Am.]*, 81, 1717-1729.

HIGUCHI, T. (1963). Mechanism of sustained-action medication: Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.*, 52, 1145-1148.

HILL, R.A. et TUCKER, S.K. (1997). Leg lengthening and bone transport in children. *Br. J.Hosp. Med.*, 57, 399-404.

HIPPOLYTE, M.P., FABRE, D., et PEYROL, S. (1991). Corail et régénération tissulaire guidée. Aspects histologiques. *Journal de Parodontologie*, 10, 279-286.

HOLBEIN, O., NEIDLINGER-WILKE, C., SUGER, G., KINZL, L., et CLAES, L. (1995). Ilizarov callus distraction produces systemic bone cell mitogens. *J. Orthop. Res.*, 13, 629-638.

HOLLINGER, J. et WONG, M.E.K. (1996). The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 82, 594-606.

HONG, L., TABATA, Y., MIYAMOTO, S., YAMADA, K., AOYAMA, I., TAMURA, M., HASHIMOTO, N., et IKADA, Y. (2000a). Promoted bone healing at a rabbit skull gap between autologous bone fragment and the surrounding intact bone with biodegradable microspheres containing transforming growth factor-beta1. *Tissue Eng.*, 6, 331-40.

HONG, L., TABATA, Y., MIYAMOTO, S., YAMAMOTO, M., YAMADA, K., HASHIMOTO, N., et IKADA, Y. (2000b). Bone regeneration at rabbit skull defects treated with transforming growth factor-beta1 incorporated into hydrogels with different levels of biodegradability. *J. Neurosurg.*, 92, 315-25.

HORNER, A., KEMP, P., SUMMERS, C., BORD, S., BISHOP, N.J., KELSALL, A.W., COLEMAN, N., et COMPSTRON, J.E. (1998). Expression and distribution of transforming growth factor-β isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone*, 23, 95-102.

HOTT, M., MARIE, P.J., GUILLEMIN, G., et PATAT, J.-L. (1989). Ostéoformation induite par l'implantation de corail dans l'os cortical de rat. *Organes artificiels hybrides/Hybrid artificial organs (Colloque INSERM)*, C. Baquey and B. Dupuy, eds, BIOMAT BORDEAUX, France, 177, 311-318.

HUGHES WASSELL, D.T., et EMBERY, G. (1997). Adsorption of chondroitin-4-sulphate and heparin onto hydroxyapatite – effect of bovine serum albumine. *Biomaterials*, 18, 1001-1007.

HUGHES WASSELL, D.T., HALL, R.C., EMBERY, G. (1995). Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite. *Biomaterials*, 15, 697-702.

HUGHES, T.H., MAFFULLI, N., GREEN, V., et FIXSEN, J.A. (1994). Imaging in bone lengthening: A review. *Clin. Orthop.*, 308, 50-53.

HULBERT, S.F., YOUNG, F.A., MATHEWS, R.S., KLAWITTER, J.J., TALBERT, C.D., et STELLING, F.H. (1970). Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.*, 4, 433-456.

ILIZAROV, G.A. (1989). The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin. Orthop.*, 238, 249-281.

IPPOLITO, E., PERETTI, G., BELLOCCI, M., FARSETTI, P., TUDISCO, C., CATERINI, R., et DE MARTINO, C. (1994) Histology and ultrastructure of arteries, veins, and peripheral nerves during limb lengthening, *Clin. Orthop.*, 308, 54-62.

IRIGARAY, J.L., OUDADESSE, H., BLONDIAUX, G., et COLLANGETTES, D. (1993a). Kinetics of the diffusion of some elements evaluated by neutron activation in a coral implanted *in vivo*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 169, 339-346.

IRIGARAY, J.L., OUDADESSE, H., EL FADL, H., SAUVAGE, T., THOMAS, G., et VERNAY, A.M. (1993c). Effet de la température sur la structure cristalline d'un biocorail. *Journal of Thermal Analysis*, 39, 3-14.

IRIGARAY, J.L., OUDADESSE, H., et BLONDIAUX, G. (1990). Quantitative study of the coral transformations 'in vivo' by several physical analytical methods. *Biomaterials*, 11, 73-74.

IRIGARAY, J.L., SAUVAGE, T., OUDADESSE, H., EL FADL, H., DESCHAMPS, N., LEFAIVRE, J., BARLET, J.P., TERVERS, S., et TIXER, H. (1993b). Study of the mineralization of coral implanted *in vivo* by radioactive tracers. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 174, 93-102.

ISSAHAKIAN, S. et OUHAYOUN, J.-P. (1989). Evaluation clinique et histologique d'un nouveau matériau de comblement: le corail naturel. *J. Parodontol.*, 8, 251-259.

ISSAHAKIAN, S., OUHAYOUN, J.P., GUILLEMIN, G., et PATAT, J.-L. (1987). Le corail madréporaire. *Info. Dent.*, 24, 2123-2132.

JAMEELA, S.R., KUMARY, T.V., LAL, A.V., JAYAKRISHNAN, A. (1998). Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. *J. Control. Release*, 52, 17-24.

JAMMET, P. (1993-1994). Corail et chirurgie crânio-maxillo-faciale. Résultats d'une étude expérimentale chez le mouton. *Chirurgie*, 119, 273-277.

JAMMET, P., SOUYRIS, F., BALDET, P., BONNEL, F., et HUGUET, M. (1994). The effect of different porosities in coral implants: an experimental study. *J. Cranio-Maxillo-Facial. Surg.*, 22, 103-108.

JARVINEN, T.L.N., SIEVANEN, H., KANNUS, P., et JARVINEN, M. (1998). Dual-energy X-ray absorptiometry in predicting mechanical characteristics of rat femur. *Bone*, 22, 551-558.

JOYCE, M.E., ROBERTS, A.B., SPORN, M.B., et BOLANDER, M.E. (1990). Transforming growth factor-ß and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J. Cell Biol.*, 110, 2195-2207.

KAJIWARA, S. (1990). Histopathological studies on tissue reactions to experimental root canal sealer in cats. *Fukuoka Shika Daigaku Gakkai Zasshi*, 17, 358-382.

KALLIO, T., LEHTO, M., PELTONEN, J., et KARAHARJU, E.O. (1995). Fibronectin and laminin during the initital phase of distraction bone healing in sheep radius. *Eur. J. Exp. Musculoskel. Res.*, 4, 160-163.

KANATANI, M., SUGIMOTO, T., KAJI, H., KOBAYASHI, T., NISHIYAMA, K., FUKASE, M., KUMEGAWA, M., et CHIHARA, K. (1995). Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity. *J. Bone Miner. Res.*, 10, 1681-1690.

KANEKO, H., ARAKAWA, T., MANO, H., KANEDA, T., OGASAWARA, A., NAKAGAWA, M., TOYAMA, Y., YABE, Y., et KUMEGAWA, M. (2000). Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone*, 27, 479-486.

KANIA, R. E., MEUNIER, A., HAMADOUCHE, M., SEDEL, L., et PETITE, H. (1998). Addition of fibrin sealant to ceramic promotes bone repair: long-term study in rabbit femoral defect model. *J. Biomed. Mater. Res.*, 43, 38-45.

KEHR, P., GOSSET, F., GRAFTIAUX, A.G., et GHIAMPHY, K. (1998). Utilisation du corail dans les arthrodèses intersomatiques cervicales (expérience de 6 ans). *Actualités en Biomatériaux*, D. Mainard, M. Merle, J.P. Delagoutte and J.P. Louis, eds, Editions Romillat, Paris, 4, chapitre 2 (Les substituts osseux), 147-156.

KELLER, J.R., JACOBSEN, S.E.W., DUBOIS, C.M., HESTDAL, K., et RUSCETTI, F.W. (1992). Transforming growth factor-β: A bidirectional regulator of hematopoietic cell growth. *Int. J. Cell Cloning*, 10, 2-11.

KENESI, C., VOISIN, M.C., et DHEM, A. (1997). Ostéotomie tibiale d'addition interne calée par un coin corail. Premiers résultats à propos de 38 interventions. *Chirurgie*, 122, 379-382.

KIBBLEWHITE, D.J., BRUCE, A.G., STRONG, D.M., OTT, S.M., PURCHIO, A.F., et LARRABEE, W.F. (1993). Transforming growth factor-β accelerates osteoinduction in a craniofacial onlay model. *Growth Factors*, 9, 185-193.

KIMOTO, S., MATSUZAWA, M., MATSUBARA, S., KOMATSU, T., UCHIMURA, N., KAWASE, T., et SAITO, S. (1999). Cytokine secretion of periodontal ligament fibroblasts derived from human deciduous teeth: Effect of mechanical stress on the secretion of transforming growth factor-ß1 and macrophage colony stimulating factor. *J. Periodont. Res.*, 34, 235-243.

KIRKER-HEAD, C.A. (2000). Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 43, 65-92.

KOIDE, M., MURASE, Y., YAMATO, K., NOGUCHI, T., OKAHASHI, N., et NISHIHARA, T. (1999). Bone morphogenetic protein-2 enhances osteoclast formation mediated by interleukin-1 alpha through upregulation of osteoclast differentiation factor and cyclooxygenase 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 259, 97-102.

KOJIMOTO, H., YASUI, N., GOTO, T., MATSUDA, S., et SHIMONURA, Y. (1988). Bone lengthening in rabbits by callus distraction: The role of periosteum and endosteum. *J. Bone Joint Surg. [Br.]*, 70, 543-549.

KOMSA-PENKOVA, R., SPIROVA, R., et BECHEV, B. (1996). Modification of Lowry's method for collagen concentration measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 32, 33-43.

KREKLAU, B., SITTINGER, M., MENSING, M.B., VOIGT, C., BERGER, G., BURMESTER, G.R., RAHMANZADEH, R., et GROSS, U. (1999). Tissue engineering of biphasic joint cartilage transplants. *Biomaterials*, 20, 1743-1749.

KREWSON, C.E., DAUSE, R., MAK, M., SALTZMAN, W.M. (1996). Stabilization of nerve growth factor in controlled release polymers and in tissue. *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.*, 8, 103-117.

LAFFARGUE, P., FIALDES, P., FRAYSSINET, P., RTAIMATE, M., HILDEBRAND, H.F., et MARCHANDISE, X. (2000). Adsorption and release of insulin-like growth factor-I on porous tricalcium phosphate implant. *J. Biomed. Mater. Res.*, 49, 415-421.

LAITINEN, M., HALTTUNEN, T., JORTIKKA, L., TERONEN, O., SORSA, T., et LINDHOLM, T.S. (1999). The role of transforming growth factor-β on retarded osteoblastic differentiation *in vitro*. *Life Sciences*, 64, 847-858.

LAM, K.H., SCHAKENRAAD, J.M., ESSELBRUGGE, H., FEIJEN, J., et NIEUWENHUIS, P. (1993). The effect of phagocytosis of poly(L-lactic acid) fragments on cellular morphology and viability. *J. Biomed. Mater. Res.*, 27, 1569-1577.

LAMMENS, J., LIU, Z., AERSSENS, J., DEQUEKER, J., et FABRY, G. (1998). Distraction bone healing versus osteotomy healing: A comparative biochemical analysis. *J. Bone Miner. Res.*, 13, 279-286.

LASCOMBES, P., MEMBRE, H., PRÉVOT, J., et BARRAT, E. (1991). Histomorphométrie du régénérat osseux dans les allongements des membres selon la technique d'Ilizarov, *Rev. Chir. Orthop.*, 77, 141-150.

LEVET, Y. et JOST, G. (1983). Utilisation de squelettes de coraux madréporaires en chirurgie réparatrice. *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, 28, 180-181.

LI, G., SIMPSON, H.R.W., KENWRIGHT, J., et TRIFFITT, J.T. (1997). Assessment of cell proliferation in regenerating bone during distraction osteogenesis at different distraction rates. *J. Orthop. Res.*, 15, 765-772.

LI, G., SIMPSON, H.R.W., KENWRIGHT, J., et TRIFFITT, J.T. (1999). Effect of lengthening rate on angiogenesis during distraction osteogenesis. *J. Orthop. Res.*, 17, 362-367.

LIND, M. (1998). Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteotomies, and implants fixation. *Acta Orthop. Scand.*, 69 (Suppl.283), 1-37.

LIND, M., OVERGAARD, S., ONGPIPATTANAKUL, B., NGUYEN, T., BUNGER, C., et SOBALLE, K. (1996). Transforming growth factor-β1 stimulates bone ongrowth to weight-loaded tricalcium phosphate coated implants. *J. Bone Joint Surg. [Br.]*, 78, 377-382.

LOTY, B., ROUX, F.X., GEORGE, B., COURPIED, J.P., et POSTEL, M. (1990). Utilisation du corail en chirurgie osseuse. *Int. Orthop. (SICOT)*, 14, 255-259.

LOUISIA, S., STROMBONI, M., MEUNIER, A., SEDEL, L., et PETITE, H. (1999). Coral grafting supplemented with bone marrow. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 81, 719-724.

LU, L., STAMATAS, G.N., et MIKOS, A.G. (2000). Controlled release of transforming growth factor ß1 from biodegradable polymer microparticles. *J. Biomed. Mater. Res.*, 50, 440-451.

LUCAS, P.A. (1989). Chemotactic response of osteoblast-like cells to transforming growth factor beta. *Bone*, 10, 459-463.

MA, Q., MAO, T., LIU, B., ZHAO, J., CHEN, F., WANG, H., et ZHAO, M. (2000). Vascular osteomuscular autograft prefabrication using coral, type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 38, 561-564.

MARCHAC, D. et SANDOR, G. (1994). Use of coral granules in the craniofacial skeleton. *Journal of Craniofacial Surgery*, 5, 213-217.

MARKEL, M.D., WIKENHEISER, M.A., MORIN, R.L., LEWALLEN, D.G., et CHAO, E.Y.S. (1990). Quantification of bone healing. Comparison of QCT, SPA, MRI, and DEXA in dog osteotomies. *Acta Orthop. Scand.*, 61, 487-498.

MARSH, J.L., PROKUSKI, L., et BIERMANN, J.S. (1994). Chronic infected tibia nonunions with bone loss. Conventional techniques versus bone transport. *Clin. Orthop.*, 301, 139-146.

MASSON, M. (president). (1988). Matériel médico-chirurgical. Biocompatibilité des matériaux et dispositifs médicaux. Méthodes d'extraction. *Norme française NF S 90-701*. Afnor, Paris, 9-10 (annexe A).

McCARTNEY-FRANCIS, N., MIZEL, D., WONG, H., WAHL, L., et WAHL, S. (1990). TGF-ß regulates production of growth factors and TGF-ß by human peripheral blood monocytes. *Growth Factors*, 4, 27-35.

MEHRARA, B.J., ROWE, N.M., STEINBRECH, D.S., DUDZIAK, M.E., SAADEH, P.B., McCARTHY, J.G., GITTES, G.K., et LONGAKER, M.T. (1999). Rat mandibular distraction osteogenesis: II. Molecular analysis of transforming growth factor beta-1 and osteocalcin gene expression. *Plast. Reconstr. Surg.*, 103, 536-547.

MERCIER, J., PIOT, B., GUEGUEN, P., CANTALOUBE, D., BLANC, J.L., BOUTAULT, F., CARIOU, J.L., DEVAUCHELLE, B., PELLERIN, Ph., PERI, G., RICBOURG, B., STRICKER, M., et WILK, A. (1996). Le plancher orbitaire en corail. Son intérêt en traumatologie. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*, 97, 324-331.

MIAO, L. et LIU, B. (1997a). Experimental study of coral implantation in repair of skull bone defect in rabbit: histomorphometry of bone. *Chung Kuo Hsiu Fu Chung Chien Wai Ko Tsa Chih*, 11, 132-135.

MIAO, L. et LIU, B. (1997b). Subperiosteal implantation of block coral on the rabbit cavarial bone. *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih*, 32, 221-223.

MIRSKY, E.C., et EINHORN, T.A. (1998). Current concepts review: Bone densitometry in orthopaedic practice. *J. Bone Joint Surg. [Am.]*, 80, 1687-1698.

MIURA, Y., FITZSIMMONS, J.S., COMMISSO, C.N., GALLAY, S.H., et O-DRISCOLL, S.W. (1994). Enhancement of periosteal chondrogenesis *in vitro*. Dose-response for transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1). *Clin. Orthop.*, 301, 271-280.

MIYAZONO, K., ICHIJO, H., et HELDIN, C.-H. (1993). Transforming growth factor-β: Latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors*, 8, 11-22.

MOORADIAN, D.L., LUCAS, R.C., WEATHERBEE, J.A., et FURSCHT, L.T. (1989). Transforming growth factor-beta 1 binds to immobilized fibronectin. *J. Cell. Biochem.*, 41, 189-200.

MORO ROBLEDO, J., DE LA VARGA SALTO, V., GUERADO PARRA, E., DE SANTOS DE LA FUENTE, J., LOPEZ AREVALO, R., ET ESPEJO BAENA, A.

(1998). Histologic analysis of distraction osteogenesis in the femoral shaft of the immature rabbit, *Acta Orthop. Belg.*, 64, 125-130.

MORTON, D.B. et GRIFFITHS, P.H.M. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.*, 116, 431-436.

MOXHAM, J.P., KIBBLEWHITE, D.J., BRUCE, A.G., RIGLEY, T., GILLESPY III, T., et LANE, J. (1996b). Transforming growth factor-ß1 in a guanidine-extracted demineralized bone matrix carrier rapidly closes a rabbit critical calvalrial defect. *J. Otolaryngol.*, 25, 82-87.

MOXHAM, J.P., KIBBLEWHITE, D.J., DVORAK, M., PEREY, B., TENCER, A.F., BRUCE, A.G., et STRONG, M. (1996a). TGF-ß1 forms functionally normal bone in a segmental sheep tibial diaphyseal defect. *J. Otolaryngol.*, 25, 388-392.

MURAKAMI, T., YAMAMOTO, M., YAMAMOTO, M., ONO, K., NISHIKAWA, M., NAGATA, N., MOTOYOSHI, K., et AKATSU, T. (1998). Transforming growth factor-ß1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252, 747-752.

NAUDIE, D., HAMDY, R.C., FASSIER, F., et DUHAIME, M. (1998). Complications of limb-lengthening in children who have an underlying bone disorder. *J. Bone Joint Surg. [Am.]*, 80, 18-24.

NODA, M., et CAMILLIERE, J.J. (1989). In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-ß. *Endocrinology*, 124, 2991-2994.

OGATA, Y., NIISATO, N., FURUYAMA, S., CHEIFETZ, S., KIM, R.H., SUGIYA, H., et SODEK, J. (1997). Transforming growth factor-β1 regulation of bone sialoprotein gene transcription: Identification of a TGF-β activation element in the rat BSP gene promoter. *J. Cell. Biochem.*, 65, 501-512.

OHGUSHI, H., GOLDBERG, V.M., et CAPLAN, A.I. (1989). Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J. Orthop. Res.*, 7, 568-578.

OHGUSHI, H., OKUMURA, M., YOSHIKAWA, T., INOUE, K., SENPUKU, N., et TAMAI, S. (1992). Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.*, 26, 885-895.

OKAZAKI, H., KUROKAWA, T., NAKAMURA, K., MATSUSHITA, T., MAMADA, K., et KAWAGUCHI, H. (1999). Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotasis bone lengthening of rabbits. *Calcif. Tissue Int.*, 64, 542-546.

OKUDA, K., NAKAJIMA, Y., IRIE, K., SUGIMITO, M., KABASAWA, Y., YOSHIE, H., HARA, K., et OZAWA, H. (1995). Tranforming growth factor-β1 coated β-tricalcium phosphate pellets stimulate healing of experimental bone defects of rat calvariae. *Oral Dis.*, 1, 92-97.

ONGPIPATTANAKUL, B., CROMWELL, M., WONG, R., et NGUYEN, T. (1994). The adsorption of rhTGF-ß1 and its release from tricalcium phosphate. *Pharm. Res. (1994 AAPS Annual Meeting)*, 11, S-82.

ONGPIPATTANAKUL, B., NGUYEN, T., ZIONCHECK, T.F., WONG, R., OSAKA, G., DeGUZMAN, L., LEE, W.P., et BECK, L.S. (1997). Development of tricalcium

phosphate/amylopectin paste combined with recombinant human transforming growth factor beta 1 as a bone defect filler. *J. Biomed. Mater. Res.*, 36, 295-305.

OREFFO, R.O.C., MUNDY, G.R., SEYEDIN, S.M., et BONEWALD L.F. (1989). Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res.Comm.*, 158, 817-823.

OUHAYOUN, J.-P., POKOIK, P., ETIENNE, D., ALCOUFFE, F., et GUILLEMIN, G. (1991). Prévention d'une perte de substance sur un site édenté: Rapport sur un cas combinant greffe gingivale et particules de corail. *J. Parodontol.*, 10, 61-67.

OUHAYOUN, J.P., SHABANA, A.H.M., ISSAHAKIAN, S., PATAT, J.-L., GUILLEMIN, G., SAWAF, M.H., et FOREST, N. (1992). Histological evaluation of natural coral skeleton as a grafting material in miniature swine mandible. *J. Mater. Sci.*, 3, 222-228.

PAPACHARALAMBOUS, S.K. et ANASTASOFF, K.I. (1993). Natural coral skeleton used as onlay graft for contour augmentation of the face. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 22, 260-264.

PARALKAR, W.M., VUKICEVIC, S., et REDDI, A.H. (1991). Transforming growth factor ß type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: Implications for development. *Developmental Biology*, 143, 303-308.

PATAT, J.-L. et GUILLEMIN, G. (1989). Le corail naturel utilisé comme biomatériau de substitution à la greffe osseuse. *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, 34, 221-225.

PATAT, J.-L., POULIQUEN, J.C., et GUILLEMIN, G. (1992). Le corail naturel utilisé comme substitut de greffon osseux. Son rôle dans les économies de sang dans la chirurgie du rachis. *Acta Orthop. Belg.*, 58, 115-121.

PATEL, A., HONNART, F., GUILLEMIN, G., et PATAT, J.-L. (1980). Utilisation de fragments de squelette de coraux madréporaires en chirurgie orthopédique et réparatrice. Expérimentation animale, applications cliniques humaines. *Chirurgie*, 106, 199-205.

PERRY, C.R. (1999). Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin. Orthop.*, 360, 71-86.

PETERSEN, M.M. (2000). Bone mineral measurements at the knee using dual photon and dual energy X-ray absorptiometry. Methodological evaluation and clinical studies focusing on adaptive bone remodeling following lower extremity fracture, total knee arthroplasty, and partial versus total meniscectomy. *Acta Orthop. Scand.*, 271 (suppl. 293), 3-37.

PETITE, H., KACEM, K., et TRIFFITT, J.T. (1996). Adhesion, growth and differentiation of human bone marrow stromal cells on non-porous calcium carbonate and plastic substrata: effects of dexamethasone and 1,25 dihydroxy-vitamin D3. *J. Mater. Sci. Mater. In Med.*, 7, 665-671.

PIATELLI, A., PODDA, G., et SCARANO, A. (1997). Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate. *Biomaterials*, 18, 623-627.

POLAREK, J.W. (2000). Use of recombinant human collagen as a biomaterial. *Sixth World Biomaterials Congress Transactions*, Hawaii, 129.

POULIQUEN, J.C., NOAT, M., GUILLEMIN, G., et PATAT, J.-L. (1990). Le corail substitué à l'apport osseux en orthopédie pédiatrique. *Annales de Pédiatrie*, 37, 59-61.

POULIQUEN, J.C., NOAT, M., VERNERET, C., GUILLEMIN, G., et PATAT, J.-L. (1989). Le corail substitué à l'apport osseux dans l'arthrodèse vertébrale postérieure chez l'enfant. Premiers Résultats. *Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot.*, 75, 360-369.

RAE, T. (1986). The macrophage response to implant materials-with special reference to those used in orthopaedics. *Crit. Rev. Biocompat.*, 2, 97-126.

RAMAKER, R.R., LAGRO, S.W.J., VAN ROERMUND, P., et SINNEMA, G. (2000). The psychological and social functioning of 14 children and 12 adolescents after Ilizarov leg lengthening. *Acta Orthop. Scand.*, 71, 55-59.

RASCHKE, M.J., BAIL, H., WINDHAGEN, H.J., KOLBECK, S.F., WEILER, A., RAUN, K., KAPPELGARD, A., SKIAERBAEK, C., et HAAS, N.P. (1999). Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone*, 24, 81-88.

RAUCH F., LAUZIER D., TRAVERS R., GLORIEUX F., et HAMDY R. (2000b). Effects of locally applied transforming growth factor-ß1 on distraction osteogenesis in a rabbit limb-lengthening model. *Bone*, 26, 619-624.

RAUCH, F., LAUZIER, D., CROTEAU, S., TRAVERS, R., GLORIEUX, F., et HAMDY, R. (2000a). Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, -4, and –7 during distraction osteogenesis. *Bone*, 26, 611-617.

RAVAL, P., HSU, H.H., SCHNEIDER, D.J., SARRAS, M.P. Jr., MASUHARA, K., BONEWALD, L.F., et ANDERSON, H.C. (1996). Expression of bone morphogenetic

proteins by osteoinductive and non-osteoinductive human osteosarcoma cells. *J. Dent. Res.*, 75, 1518-1523.

REIS, S.A., VOIGT, C., MULLER-MAI, C., HERBST, H., BISSON, S., et GROSS, U. (1996). Procollagen α1(I) transcripts in cells near the interface of coralline implants in rats, detected by in situ hybridization. *Clin. Oral Implants Res.*, 7, 253-260.

RICHARD, M., AGUADO, E., COTTREL, M., et DACULSI, G. (1998). Ultrastructural and electron diffraction of the bone-ceramic interfacial zone in coral and biophasic CaP implants. *Calc. Tissue Int.*, 62, 437-442.

RICHARDS, M., HUIBREGTSE, B.A., CAPLAN, A.I., GOULET, J.A., et GOLDSTEIN, S.A. (1999). Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J. Orthop. Res.*, 17, 900-908.

RIPAMONTI, U., CROOKS, J., et KIRKBRIDE, A.N. (1999). Sintered porous hydroxyapatites with intrinsic osteoinductive activity: geometric induction of bone formation. *South African Journal of Science*, 95, 335-343.

RIPAMONTI, U., DUNEAS, N., VAN DEN HEEVER, B., BOSCH, C., et CROOKS, J. (1997). Recombinant transforming growth factor-ß1 induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) to initiate rapid bone formation. *J. Bone Miner. Res.*, 12, 1584-1595.

ROBERTS, A.B. (1998). Molecular and cell biology of TGF-β. *Miner. Electrolyte Metab.*, 24, 111-119.

ROBERTS, A.B. et SPORN, M.B. (1993). Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-ß (TGF-ß). *Growth factors*, 8, 1-9.

ROBIER, A., DE GEOFROY, Ph., PANDRAUD, L., GOGA, D., et BEUTTER, P. (1987). Utilisation des implants coralliens en chirurgie oto-rhino-laryngologique et maxillo-faciale. *Ann. Otolaryngol. Chir. Cervicofac.*, 104, 303-306.

ROBLEDO, M.M., SANZ-RODRIGUEZ, F., HIDALGO, A., et TEIXIDO, J. (1998). Differential use of very late antigen-4 and –5 integrins by hematopoietic precursors and myeloma cells to adhere to transforming growth factor-β1 -treated bone marrow stroma. *J. Biol. Chem.*, 273, 12056-12060.

ROUDIER, M., BOUCHON, C., ROUVILLAIN, J.L., AMÉDÉE, J., BAREILLE, R., ROUAIS, F., FRICAIN, J.Ch., DUPUY, B., KIEN, P., JEANDOT, R., et BASSE-CATHALINAT, B. (1995). The resorption of bone-implanted corals varies with porosity but also with the host reaction. *J. Biomed. Mater. Res.*, 29, 909-15.

ROUX, F.X., BRASNU, D., LOTY, B., GEORGE, B., et GUILLEMIN, G. (1988). Madreporic coral: a new bone graft substitute for cranial surgery. *J. Neurosurg.*, 69, 510-513.

ROUX, F.X., BRASNU, D., MENARD, M., DEVAUX, B., NOHRA, G., et LOTY, B. (1995). Madreporic coral for cranial base reconstruction: 8 years experience. *Acta Neurochir. (Wien)*, 133, 201-205.

ROUX, F.X., LACCOURREYE, O., DEVAUX, B., CIOLOCA, C., et BRASNU, D. (1996). Évolution des techniques de reconstruction de la base antérieure du crâne après exérèse tumorale. *Ann. Otolaryngol. Chir. Cervicofac.*, 113, 29-33.

ROY, D.M. et LINNEHAN, S.K. (1974). Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature*, 247, 220-222.

SANDBERG, M.M., ARO, H.T., et VUORIO, E.I. (1993). Gene expression during bone repair. *Clin. Orthop.*, 289, 292-312.

SANTACHE, P. et BONARRIGO, C. (1997). Coral in malar augmentation: Complications in our experience (Correspondence). *Plast. Reconstr. Surg.*, 99, 266-268.

SATO, M., OCHI, T., NAKASE, T., HIROTA, S., KITAMURA, Y., NOMURA, S., et YASUI, N. (1999). Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J. Bone Miner. Res.*, 14, 1084-1095.

SAUTIER, J.M., NEFUSSI, J.R., BOULEKBACHE, H., et FOREST, N. (1990). *In vitro* bone formation on coral granules. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 26, 1079-1085.

SAUTIER, J.M., NEFUSSI, J.R., et FOREST, N. (1992). Surface-reactive biomaterials in osteoblast cultures: an ultrastructural study. *Biomaterials*, 13, 400-402.

SCHEUFLER, C., SEBALD, W., et HULSMEYER, M. (1999). Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 A resolution. *J. Mol. Biol.*, 287, 103-115.

SCIADINI, M.F., DAWSON, J.M., BANIT, D., JULIAO, S.F., JOHNSON, K.D., LENNINGTON, W.J., et SCHWARTZ, H.S. (2000). Growth factor modulation of distraction osteogenesis in a segmental defect model. *Clin. Orthop.*, 381, 266-277.

SCIADINI, M.F., DAWSON, J.M., et JOHNSON, K. (1997). Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J. Orthop. Res.*, 15, 844-857.

SERVERA, Cl., SOUYRIS, F., PAYROT, C., et JAMMET, P. (1987). Le corail dans les lésions infra-osseuses. Bilan après 7 ans d'utilisation, *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*, 88, 326-333.

SHAHGALDI, B.F. (1998). Coral graft restoration of osteochondral defects. *Biomaterials*, 19, 205-213.

SHANBHAG, A.S., JACOBS, J.J., et GLANT, T.T. (1995). Human monocyte response to particulate biomaterials generated *in vivo* and *in vitro*. *J. Orthop. Res.*, 13, 792-801.

SHANBHAG, A.S., YANG, J., LILIEN, J., et BLACK, J. (1992). Deacreased neutrophil respiratory burst on exposure to cobalt-chrome alloy and polystyrene *in vitro*. *J. Biomed. Mater Res.*, 26, 185-195.

SHERRIS, D.A., MURAKAMI, C.S., LARRABEE, W.F., et BRUCE, A.G. (1998). Mandibular reconstruction with transforming growth factor-β1. *Laryngoscope*, 108, 368-372.

SHIBANUMA, M., KUROKI, T., et NOSE, K. (1991). Release of H_2O_2 and phosphorylation of 30 kilodalton proteins as early responses of cell cycle-dependent inhibition of DNA synthesis by transforming growth factor β1. *Cell Growth Differ.*, 2, 583-591.

SHORS, E.C. (1999). Coralline bone graft substitutes. *Orthop. Clin. North Am.*, 30, 599-613.

SI, X., JIN, Y., et YANG, L. (1998). Induction of new bone by ceramic bovine bone with recombinant human bone morphogenetic orotein 2 and transforming growth factor β. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 27, 310-314.

SI, X.H., JIN, Y., YANG, L.J., TIPOE, G.L., et WHITE, F.H. (1997). Expression of BMP-2 and TGF-β1 mRNA during healing of the rabbit mandible. *Eur. J. Oral Sciences*, 105, 325-330.

SIEDLECKI, C.A. et MARCHANT, R.E. (1998). Atomic force microscopy for characterization of the biomaterial interface. *Biomaterials*, 19, 441-454.

SIMPSON, A.H.R.W., CUNNINGHAM, J.L., et KENWRIGHT, J. (1996). The forces which develop in the tissues during leg lengthening. *J. Bone Joint Surg [Br.]*, 78, 979-983.

SMITH, S.W., SACHDEVA, R.C.L., et COPE, J.B. (1999). Evaluation of the consolidation period during osteodistraction using computed tomography. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, 116, 254-263.

SOUYRIS, F., PELLEQUER, C., PAYROT, C., et SERVERA, C. (1985). Coral, a new biomedical material. Experimental and first clinical investigations on madreporia. *J. Maxillofac. Surg.*, 13, 64-69.

SPORN, M.B., ROBERTS, A.B., WAKEFIELD, L.M., et DE CROMBRUGGHE, B. (1987). Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J. Cell. Biol.*, 105,1039-45.

STAAL, A., GEERTSMA-KLEINEKOORT, W.M.C., VAN DEN BEMD, G.J.C.M., BUURMAN, C.J., BIRKENHAGER, J.C., POLS, H.A.P., et VAN LEEWNEN, J.P.T.M. (1998). Regulation of osteocalcin production and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in mouse long bones: Interaction with the bone-derived growth factors TGF-β and IGF-1. *J. Bone Miner. Res.*, 13, 36-43.

STANITSKI, D.F. (1994). The effect of limb lengthening on articular cartilage: An experimental study. *Clin. Orthop.*, 301, 68-72.

STEINBRECH, D.S., MEHRARA, B.J., ROWE, N.M., DUDZIAK, M.E., LUCHS, J.S., SAADEH, P.B., GITTES, G.K., et LONGAKER, M.T. (2000). Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast. Reconstr. Surg.*, 105, 2028-38

SUGANUMA, J. et ALEXANDER, H. (1993). Biological response of intramedullary bone to poly-L-lactic acid. *J Applied Biomater.*, 4, 13-27.

SUMNER, D.R., TURNER, T.M., PURCHIO, A.F., GOMBOTZ, W.R., URBAN, R.M., et GALANTE, J.O. (1995). Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor-β. *J. Bone Joint Surg. [Am.]*, 77, 1135-1147.

SUZUKI, F. (1992). Effects of various growth factors on a chondrocyte differentiation model. *Prostate Cancer and Bone Metastasis*, Plenum Press, New York, 101-106.

TAJANA, G.F., MORANDI, M., et ZEMBO, M.M. (1989). The structure and development of osteogenetic repair tissue according to Ilizarov technique in man: Charaterization of extracellular matrix. *Orthopedics*, 12, 515-523.

TAKAI, H., KANEMATSU, M., YANO, K., TSUDA, E., HIGASHIO, K., IKEDA, K., WATANEBE, K., et YAMADA, Y. (1998). Transforming growth factor-β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.*, 273, 27091-27096.

TAKUSHIMA, A., KITANO, Y., et HARII, K. (1998). Osteogenic potential of cultured periosteal cells in a distracted bone gap in rabbits. *J. Surg. Res.*, 78, 68-77.

TANAKA, T., YANIGUCHI, Y., GOTOH, K., SATOH, R., INAZU, M., et OZAWA, H. (1993). Morphological study of recombinant human transforming growth factor β_1-induced intramembranous ossification in neonatal rat parietal bone. *Bone*, 14, 117-123.

TAY, B.K.-B., LE, A.X., GOULD, S.E., et HELMS, J.A. (1998). Histochemical and molecular analyses of distraction osteogenesis in a mouse model. *J. Orthop. Res.*, 16, 636-642.

TEMENOFF, J.S. et MIKOS, A.G. (2000). Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials*, 21, 2405-2412.

THO, K.S. et KRISHNAMOORTHY, S. (1996). Use of coral grafts in anterior interbody fusion of the rabbit spine. *Ann. Acad. Med. Singapore*, 25, 824-827.

TIELINEN, L., MANNINEN, M., PUOLAKKAINEN, P., PIHLAJAMAKI, H., POHJONEN, T., RAUTAVUORI, J., et TORMALA, P. (1998). Polylactide pin with transforming growth factor β1 in delayed osteotomy fixation. *Clin. Orthop.*, 355, 312-322.

TSUBOTA, S., TSUCHIYA, H., SHINOKAWA, Y., TOMITA, K., et MINATO, H. (1999). Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits. *J. Bone Joint Surg. [Br.]*, 81, 125-129.

TURUNEN, T., PELTOLA, J., HELENIUS, H., YLI-URPO, A., et HAPPONEN, R.-P. (1997). Bioactive glass and calcium carbonate granules as filler material around titanium and bioactive glass implants in the medullar space of the rabbit tibia. *Clin. Oral Implants Res.*, 8, 96-102.

ULUDAG, H., D'AUGUSTA, D., GOLDEN, J., Li, J., TIMONY, G., RIEDEL, R., et WOZNEY, J.M. (2000). Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: A correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J. Biomed. Mater. Res.*, 50, 227-238.

ULUDAG, H., D'AUGUSTA, D., PALMER, R., TIMONY, G., et WOZNEY, J. (1999). Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *J. Biomed. Mater. Res.*, 46, 193-202.

VAN BEUNINGEN, H.M., GLANSBEEK, H.L., VAN DER KRAAN, P.M., et VAN DEN BERG, W.B. (1998). Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-ß1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage*, 6, 306-317.

VELAZQUEZ, R.J., BELL, D.F., ARMSTRONG, P.F., BABYN, P., et TIBSHIRANI, R. (1993). Complications of use of the Ilizarov technique in the correction of limb deformities in children. *J. Bone Joint Surg. [Am.]*, 75, 1148-1156.

VISSER, J.A. et THEMMEN, A.P.N. (1998). Downstream factors in transforming growth factor-ß family signaling. *Mol. Cell. Endocrino.*, 146, 7-17.

VODOVOTZ, Y. et BOGDAN, C. (1994). Control of nitric oxide synthase expression by transforming growth factor-β: Implications for homeostasis. *Progress in Growth Factor Research*, 5, 341-351.

VOLPI, N. (1999). Adsorption of glycosaminoglycans onto coral – a new possible implant biomaterials for regeneration therapy. *Biomaterials*, 20, 1359-1363.

VUOLA, J., BOHLING, T., KINNUNEN, J., HIRVENSALO, E., et ASKO-SELJAVAARA, S. (2000). Natural coral as bone-defect-filling material, *J. Biomed. Mater. Res.*, 51, 117-122.

VUOLA, J., GORANSSON, H., BOHLING, T., et ASKO-SELJAVAARA, S. (1996). Bone marrow induced osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants. *Biomaterials*, 17, 1761-1766.

VUOLA, J., TAURIO, R., GORANSSON, H., et ASKO-SELJAVAARA, S. (1998). Compressive strength of calcium carbonate and hydroxyapatite implants after bone-marrow-induced osteogenesis. *Biomaterials*, 19, 223-227.

WAANDERS, N.A., RICHARDS, M., STEEN, H., KUHN, J.L., GOLDSTEIN, S.A., et GOULET, J.A. (1998). Evaluation of the mechanical environment during distraction osteogenesis. *Clin. Orthop.*, 349, 225-234.

WALSH, W.R., HAMDY, R.C., et EHRLICH, M.G. (1994). Biomechanical and physical properties of lengthened bone in a canine model. *Clin. Orthop.*, 306, 230-238.

WEBER, J.N. et WHITE, E.W. (1973). Carbonate minerals as precursors of new ceramic, metal and polymer materials for biomedical applications. *Mineral Science Engineering*, 5, 151-165.

WELCH, R.D., BIRCH, J.G., MAKAROV, M.R., ET SAMCHUKOV, M.L. (1998). Histomorphometry of distraction osteogenesis in a caprine tibial lengthening model. *J. Bone Miner. Res.*, 13, 1-9.

WHITE, R.A., WEBER, J.N., et WHITE, E.W. (1972). Replamineform: a new process for preparing porous ceramic metal and polymer prosthetic materials. *Science*, 176, 922-924.

WHITE, S.H. et KENWRIGHT, J. (1991). The importance of delay in distraction of osteotomies. *Orthop. Clin. North Am.*, 22, 569-579.

WIKESJO, U.M.E., RAZI, S.S., SIGURDSSON, T.J., TATAKIS, D.N., LEE, M.B., ONGPIPATTANAKUL, B., NGUYEN, T., et HARDWICK, R. (1998). Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human transforming growth factor-ß1 on guided tissue regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, 25, 475-481.

WINN, S.R., ULUDAG, H., et HOLLINGER, J.O. (1998). Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 31, 303-318.

WOOD, M.K., LI, G., BROWNLOW, H., et SIMPSON, A.H.R.W. (1998). Which test best predicts the strength of the regenerate? X-rays, DEXA or Stiffness? *J. Bone Joint Surg. [Br.]*, 80, 264.

WRANA, J.L. (1998). TGF-β receptors and signalling mechanisms. *Miner. Electrolyte Metab.*, 24, 120-130.

YAMAMOTO, M., TABATA, Y., HONG, L., MIYAMOTO, S., HASHIMOTO, N., et IKADA, Y. (2000). Bone regeneration by transforming growth factor ß1 released from a biodegradable hydrogel. *J. Control. Release*, 64, 133-142.

YAMANE, K., OKANO, T., KISHIMOTO, H., et HAGINO, H. (1999). Effect of ED-71 on modeling of bone in distraction osteogenesis. *Bone*, 24, 187-193.

YAMASHIRO, H., YAMAMOTO, M., et VAN WOESIK, R. (2000). Tumor formation on the coral Montipora informis. *Dis. Aquat. Organ*, 41, 211-217.

YASUI, N., KOJIMOTO, H., SASAKI, K., KITADA, A., SHIMIZU, H., et SHIMOMURA, Y. (1993). Factors affecting callus distraction in limb lengthening. *Clin. Orthop.*, 293, 55-60.

YAYLAOGLU, M.B., KORKUSUZ, P., ORS, U., KORKUSUZ, F., et HASIRCI, V. (1999). Development of a calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release. *Biomaterials*, 220, 711-719.

YOSHIKAWA, H., RETTIG, W.J., LANE, J.M., TAKAOKA, K., ALDERMAN, E., RUP, B., ROSEN, V., HEALEY, J.H., HUVOS, A.G., et GARIN-CHESA, P. (1994). Immunohistochemical detection of bone morphogenetic proteins in bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer*, 74, 842-847.

YOUNGER, A.S.E., MACKENZIE, W.G., et MORRISON, J.B. (1994). Femoral forces during limb lengthening in children. *Clin. Orthop.*, 301, 55-63.

YUKNA, R.A. et YUKNA, C.N. (1998). A 5-year follow-up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (Biocoral™) bone replacement grafts in infrabony defects. *J. Clin. Periodontol.*, 25, 1036-1040.

YUPENG, S., WANQING, Z., FUCHENG, M., WANLU, C., et SHUXUN, H. (1997). Evaluation of transforming growth factor ß and bone morphogenetic protein composite on healing of bone defects. *Chin. Med., J.*, 110, 927-931.

ZAFFE, D., PALUMBO, C., et CANTONI, E. (1995). Coral granules in the repair of human mandibular defects. *Materials in Clinical Applications*, P. Vincenzini, ed, Techna Srl, Italie, 431-438.

ZANER, D.J. et YUKNA, R.A. (1984). Particle size of periodontal bone grafting materials. *J. Periodontol.*, 55 (1984), 406-409.

ZELLIN, G., BECK, S., HARDWICK, R., et LINDE, A. (1998). Opposite effects of recombinant human transforming growth factor-β1 on bone regeneration *in vivo*: Effects of exclusion of periosteal cells by microporous membrane. *Bone*, 22, 613-620.

ZENG, R., REN, C., et LI, C. (1997). Experimental study on bone formation in a denser coral used for repairing cortical defects in dogs. *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih*, 32, 16-18.

ZENG, R.S. (1991). The use of coral as a substitute for maxillofacial bone reconstruction. *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih*, 26, 389-390.

ZHOU, H., HAMMONDS JR, R.G., FINDLAY, D.M., MARTIN, T.J., et NG, K.W. (1993) Differential effects of transforming growth factor-β1 and bone morphogenetic protein 4 on gene expression and differentiated function of preosteoblasts. *J. Cell Physiol.*, 155, 112-119.

ZHUANG, H., WANG, W., SELDES, R.M., TAHERNIA, D., FAN, H., et BRIGHTON, C.T. (1997). Electrical stimulation induces the level of TGF-ß1 mRNA in osteoblastic cells by a mechanism involving calcium/calmodulin pathway. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 237, 225-229.

Annexes

Annexe 1. Études sur l'effet de cellules osseuses, de facteurs de croissance ou d'autres protéines sur la consolidation osseuse de membres allongés.

Annexe 2. Études sur les effets du TGF-ß1 exogène introduit dans différents modèles animaux.

Annexe 3. Comparaison de la composition et des concentrations du fluide osseux artificiel à ceux du milieu de relargage employé pour l'étude *in vitro*.

Annexe 1. Études sur l'effet de cellules osseuses, de facteurs de croissance ou d'autres protéines sur la consolidation osseuse de membres allongés.

Modèle animal	**Protocole de l'allongement**	**Injection**	**Résultats**
Tibia de lapins (immatures et matures) (Hamanishi *et al.*, 1994)	Distraction 7 jours post-op à 0.5 mm deux fois par jour pendant 10 jours (1 cm); consolidation jusqu'à 40 jours	Cellules de la moëlle osseuse (2 mL) injectées à la fin de la distraction	Augmentation de la formation du cal osseux
Tibia de lapins (immatures) (Takushima *et al.*, 1998)	Distraction 3 jours post-op à 1 mm/12 h pendant 10 jours (2 cm) avec fixateur externe unilatéral; consolidation jusqu'à 4 semaines	Cellules dérivées du périoste (1 mL) injecté à la fin de la distraction	Augmentation du contenu d'os minéralisé
Fémur de rats (1 an) (Richards *et al.*, 1999)	Distraction 6 jours post-op à 0.25 mm deux fois par jour pendant 12 jours (6 mm) avec fixateur externe unilatéral; 18 jours de consolidation	Cellules de la moëlle osseuse dans sérum et collagène de type I (0.5 mL) injectées aux jours 0, 6 ou12 de la distraction	Consolidation osseuse accélération, indépendant du temps de l'injection

post-op – post-opératoire

Annexe 1. Études sur l'effet de cellules osseuses, de facteurs de croissance ou d'autres protéines sur la consolidation osseuse de membres allongés (suite).

Modèle animal	Protocole de l'allongement	Injection	Résultats
Tibia de lapins (immatures) (Yamane *et al.*, 1999)	Distraction 10 jours post-op à 0.5 mm deux fois par jour pendant 10 jours (1 cm) avec fixateur externe unilatéral; jusqu'à 8 semaines de consolidation	Analogue synthétique de la vitamine D_3 dans propylène glycol injecté (0.05 μg/kg) deux fois par semaine jusqu'à 8 semaines	Accélération de la consolidation osseuse; cal plus gros; os cortical final plus épais que contrôles (sans traitement)
Tibia de mini-porcs (matures) (Raschke *et al.*, 1999)	Distraction 4 jours post-op à 1 mm deux fois par jour pendant 10 jours (2 cm) avec fixateur à mi-anneaux circulaires; 10 jours de consolidation	Hormone de croissance (100μg/kg) à chaque jour	Accélération de la rigidité du regénérat durant la consolidation
Tibia de lapins (immatures) (Hagino et Hamada, 1999)	Distraction après chirurgie à 2-3 mm/jour pendant 7 jours (2 cm) avec fixateur externe unilatéral; consolidation d'un an	100 mg de particules d'os déminéralisé injecté après fermeture du périoste	Consolidation osseuse et présence d'os mature (comparé à une non-union dans contrôles sans traitement)

Annexe 1. Études sur l'effet de cellules osseuses, de facteurs de croissance ou d'autres protéines sur la consolidation osseuse de membres allongés (suite).

Modèle animal	**Protocole de l'allongement**	**Injection**	**Résultats**
Tibia de lapins (matures) (Okazaki *et al.*, 1999)	Distraction 10 jours post-op à 1.4 mm/jour pendant 7 jours (9.8 mm) avec fixateur externe unilatéral; consolidation jusqu'à 5 semaines	200 μg bFGF dans solution saline (150 μL) injecté à la fin de la distraction	Augmentation du contenu d'os minéralisé
Tibia de lapins (immatures) (Tsubota *et al.*1999)	Distraction 7 jours post-op à 1 mm/jour pendant 10 jours (2 cm) avec fixateur externe hémilatéral; consolidation jusqu'à 8 semaines	Cellules dérivées du périoste dans solution saline (0.5 mL) à la fin de la distraction	Remodelage osseux plus rapide; cal plus épais; force ultime similaire aux contrôles
Tibia de lapins (matures) (Rauch *et al.*, 2000b)	Distraction 7 jours post-op à 0.25 mm deux fois par jour pendant 21 jours (1.5 cm) avec fixateur externe unilatéral; 0 et 21 jours de consolidation	0, 10, 20 ou 40 ng TGF-ß1/jour pendant 3 ou 6 semaines post-op	Plus de tissu fibreux dans le cal; diminution de la rigidité et de la force ultime (traction)
Radius de chiens (Sciadini *et al.*, 2000)	Transport osseux sur 2.5 cm; distraction 5 jours post-op à 1 mm/jour pendant une moyenne de 21 jours; 3 semaines de consolidation	0, 0.2, 0.5,1 ou 2 μg TGF-ß2 dans solution saline (3 mL) à mi-chemin pendant le transport osseux	Non-unions comparés aux contrôles; diminution de cartilage avec la dose

Annexe 2. Études sur les effets du TGF-ß1 exogène introduit dans différents modèles animaux.

Modèle animal	**Dose de TGF-ß1**	**Méthode de libération**	**Résultats**
Poches musculaires, cuisse de souris (Si *et al.*, 1998)	15 ng (bTGF-ß1)	Bloc céramique d'os bovin	Aucune formation d'os ectopique
Défauts osseux, crâne de souris (Okuda *et al.*, 1995)	1 μg (rhTGF-ß1)	Particules de phosphate tricalcique ß	Taux de formation osseuse plus rapide (2 et 4 semaines)
Cartilage, genou de souris (12 semaines) (Van Beuningen *et al.*, 1998)	2, 20, 200 ou 400 ng/ injection (rhTGF-ß1)	injection (simple ou triple) d'une dose	Stimulation prolongée de la synthèse de protéoglycanes; augmentation du diamètre des ligaments avec multiples injections (1 semaine)
Périostéum, os pariétaux de rats (nouveaux-nés) (Noda et Camilliere, 1989)	50, 200 ou 1000 ng (pTGF-ß1)	Injection à chaque jour pendant 12 jours	Augmentation de l'épaisseur de l'os [2x (1000 ng), 120% (200 ng) et 60% (50 ng)] (un jour après fin des injections)
Périoste, os pariétal de rats (nouveaux-nés) (Tanaka *et al.*, 1993)	200 ou 1000 ng (rhTGF-ß1)	Injection (simple ou multiple) pendant 3, 5, 7 ou 12 jours	Formation osseuse avec une seule dose de 1 μg ou une dose de 200 ng pendant 12 jours

Annexe 2. Études sur les effets du TGF-ß1 exogène introduit dans différents modèles animaux (suite).

Modèle animal	**Dose de TGF-ß1**	**Méthode de libération**	**Résultats**
Défaut osseux, crâne de rats (adultes) (Gombotz *et al.*, 1994)	7.5 ou 37.5 μg (avec polymère); 3.4 ou 26.5 μg (avec minéraux) (rhTGF-ß1)	Implants cylindriques faits de particules de la matrice osseuse avec co-polymère ou de particules de $CaSO_4$	Induction de formation osseuse plus importante avec TGF-ß1 et en présence du $CaSO_4$ (6 semaines)
Défauts osseux, mandibule de rats (adultes) (Zellin *et al.*, 1998)	0.1, 0.4, 1, 5, 10 ou 20 μg (rhTGF-ß1)	Particules de corail avec hydroxyéthyl d'amidon, méthylcellulose ou particules de co-polymère	Union partielle variant selon la dose (12 et 24 jours)
Ostéotomie, fémur de rats; fixation une semaine plus tard (Tielinen *et al.*, 1998)	5 ou 50 μg (rhTGF-ß1)	Tige d'un copolymère d'acide poly-LD-lactique	Formation du cal plus rapide avec 50 μg mais aucune accélération de la guérison osseuse (6 semaines)
Périoste, fémur de rats (nouveaux-nés) (Joyce *et al.*, 1990)	20 ou 200 ng	Injections à chaque jour pendant 14 jours	Accélération de la chondrogenèse et la formation osseuse (ossification par processus membranaire)

Annexe 2. Études sur les effets du TGF-ß1 exogène introduit dans différents modèles animaux (suite).

Modèle animal	**Dose de TGF-ß1**	**Méthode de libération**	**Résultats**
Chambres osseuses, tibias de rats (Aspenberg *et al.*, 1996)	1, 33 ou 1000 ng (rhTGF-ß1)	Hydroxyapatite corallien poreux	Croissance osseuse dans la chambre inhibée, indépendant de la dose
Périoste, crâne de lapins (immatures) (Kibblewhite *et al.*, 1993)	0.3, 3, 30 ou 75 μg (rhTGF-ß1)	Implants d'os déminéralisé	Formation osseuse et remodelage plus rapide; implant plus résorbé avec TGF-ß1 (6 semaines)
Défauts osseux, os pariétal de lapins (adultes) (Arnaud *et al.*, 1994)	1 μg (rhTGF-ß1)	Particules de corail et colle de fibrinogène, ou colle seule ou méthylcellulose	Accélération de la croissance osseuse comparé au défaut sans traitement (1 mois)
Défauts osseux, os cranial de lapins (immatures) (Zellin *et al.*, 1998)	5 ou 10 μg (rhTGF-ß1)	Particules de corail avec hydroxyéthyl d'amidon	Union plus rapide (2x) que contrôle sans traitement (28 jours)
Défaut osseux, crâne de lapins (immatures) (Yamamoto *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2000a,b)	10, 50, 100, 500 ou 1000 ng (rhTGF-ß1)	Disques d'hydrogel à base de gélatine	Formation osseuse (radioopaque) en présence du TGF-ß1 (0.1, 0.5 ou 1 μg) dans les hydrogels, comparé à TGF-ß1 seul (12 mois)

Annexe 2. Études sur les effets du TGF-ß1 exogène introduit dans différents modèles animaux (suite).

Modèle animal	**Dose de TGF-ß1**	**Méthode de libération**	**Résultats**
Défaut osseux, radius de lapins (adolescents) (Ongpipattanakul *et al.*, 1997)	10 μg (rhTGF-ß1)	particules de phosphate tricalcique dans amylopectine	Force en torsion similaire au membre opposé; taux d'union similaire aux contrôles (sans traitement); plus gros cal osseux avec TGF-ß1
Défaut osseux, radius de lapins (adultes) (Beck *et al.*, 1998)	0.2 ou 1 μg (rhTGF-ß1)	Particules de phosphate tricalcique avec amidon et gélatine	Augmentation de la grosseur du cal; meilleures propriétés mécaniques (torsion) (56 jours)
Chambre, tibias de lapins (6-12 mois) (Goodman *et al.*, 1999)	1.5 μg (rTGF-ß1)	Particules de polyéthylène à très haute masse moléculaire dans 1% d'hyaluronate de sodium	Plus grande surface osseuse comparé avec les particules seules (4 semaines)
Défaut osseux, radius de lapins (immatures) (Yupeng *et al.*, 1997)	120 μg (bTGF-ß1)	Implant d'un os trabéculaire bovin	Nouvel os remodelé et remplacé par os lamellaire (16 semaines)

Annexe 2. Études sur les effets du TGF-ß1 exogène introduit dans différents modèles animaux (suite).

Modèle animal	Dose de TGF-ß1	Méthode de libération	Résultats
Défaut osseux, crâne de lapins (adultes) (Moxham *et al.*, 1996b)	25 μg (rhTGF-ß1)	Pâte avec particules d'os déminéralisé	Réparation complète du défaut (tissus fibreux chez les contrôles) mais minéralisation moins différente du vieil os (4 semaines)
Allongement osseux, tibia de lapins (matures) (Rauch *et al.*, 2000b)	10, 20 ou 40 ng hTGF-ß1/jour, pendant distraction (3 semaines) ou 6 semaines	Pompe miniosmotique	Augmentation de la quantité de tissu fibreux; aucun effet sur le volume osseux et la densité minérale osseuse (fin de la distraction et 3 semaines après)
Défaut osseux, fémur de lapins (Baltzer *et al.*, ORS 1999)	Pas applicable	Vecteur viral ($7x10^{10}$ particles)	Augmentation de l'ossification comparé au groupe sans TGF-ß1; union dans 80% des cas (16 semaines)
Ostéotomie, tibia de lapins (Lind, 1998)	1 ou 10 μg/ jour pendant 6 semaines	Pompe miniosmotique	Aucune augmentation de la force ou de la rigidité, comparé aux contrôles (6 semaines)

Annexe 2. Études sur les effets du TGF-ß1 exogène introduit dans différents modèles animaux (suite).

Modèle animal	Dose de TGF-ß1	Méthode de libération	Résultats
Défaut osseux, radius de chiens (adultes); fixation (Heckman *et al.*, 1995)	10, 20, 40 ou 100 µg (rhTGF-ß1)	Particules de phosphate tricalcique	Meilleure stabilité et guérison osseuse, proportionnelles à la dose de TGF-ß1 (après 16 semaines)
Défaut osseux, radius de chiens (adultes); plâtre 2 premières semaines (Heckman *et al.*, 1999)	10 ng (rhTGF-ß1)	Implant d'acide polyglycolactique 50:50	Aucun effet sur la formation osseuse après 12 semaines
Résection mandibulaire, chiens (adultes); fixation (Sherris *et al.*, 1998)	250 µg	Pâte de particules d'os déminéralisé	Union après 12 semaines avec meilleures propriétés mécaniques que les contrôles sans TGF-ß1
Défaut osseux, tibia de moutons (matures) (Moxham *et al.*, 1996a)	750 µg (rhTGF-ß1)	Pâte de particules d'os déminéralisé	Union après 12 semaines avec rigidité osseuse similaire au membre opposé

Annexe 2. Études sur les effets du TGF-ß1 exogène introduit dans différents modèles animaux (suite).

Modèle animal	**Dose de TGF-ß1**	**Méthode de libération**	**Résultats**
Poche intramusculaire ventral, rectus abdominis de babouins Chacma (adultes) (Ripamonti *et al.*, 1997)	0.5-1.5 μg (rTGF-ß1)	Particules de collagène insoluble	Induction d'os endochondrial dans le site extrasquelettique après 30 jours

rTGF-ß1 – recombinant de TGF-ß1 de source non-spécifiée; rhTGF-ß1 – TGF-ß1 de recombinant humain; bTGF-ß1 – TGF-ß1 de source bovine; pTGF-ß1 – TGF-ß1 de porc; hTGF-ß1 – TGF-ß1 de plaquettes humaines; n.s. – source non-spécifiée

Annexe 3. Comparaison de la composition et des concentrations du fluide osseux artificiel à ceux du milieu de relargage employé pour l'étude *in vitro*.

COMPOSANTES	FLUIDE OSSEUX ARTIFICIEL (norme NF S 90-701)	MILIEU DE RELARGAGE
SELS MINÉRAUX ET AUTRES COMPOSÉS (mg/L)		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	73.52	44.10
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	98.60	152.70
KH_2PO_4	261.28	83
$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	47.48	156.20
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.83	0.84
NaCl	5844	7400
KCl	1640	285
$NaHCO_3$	1260	1200
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	-----	0.0025
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-----	0.029
HEPES	4766	4766
D-Glucose	2000	2000
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	54.43	-----
Acide α-cétoglutarique	29.22	29.22
BSA (albumine bovine)	1000	1000
Pyruvate de sodium	-----	110
Acide lipoïque	-----	0.21
Hypoxantine	-----	4.08
Thymidine	-----	0.73
Rouge de phénol	5	12
NaN_3	-----	0.30

Annexe 3. Comparaison de la composition et des concentrations du fluide osseux artificiel à ceux du milieu de relargage employé pour l'étude *in vitro* (suite).

COMPOSANTES	FLUIDE OSSEUX ARTIFICIEL (norme NF S 90-701)	MILIEU DE RELARGAGE
	ACIDES AMINÉS (mg/L)	
L-Alanine	250	8.91
L-Arginine	175	210.7
L-Acide aspartique	150	13.31
L-Acide glutamique	-----	14.71
L-Asparagine· H_2O	-----	15.01
L-Cystéine HCl H_2O	101	31.53
L-Glutamine	200	146.2
Glycine	800	1332.59
L-Histidine	150	20.96
L-Isoleucine	30	2.62
L-Leucine	50	13.12
L-Lysine	240	336.44
L-Méthionine	50	4.48
L-Phénylalanine	50	4.96
L-Proline	400	11.51
L-Sérine	200	322.74
L-Thréonine	75	3.57
L-Tryptophane	40	0.61
L-Tyrosine	40	2.49
L-Valine	65	3.51

Annexe 3. Comparaison de la composition et des concentrations du fluide osseux artificiel à ceux du milieu de relargage employé pour l'étude *in vitro* (suite).

COMPOSANTES	FLUIDE OSSEUX ARTIFICIEL (norme NF S 90-701)	MILIEU DE RELARGAGE
	VITAMINES (mg/L)	
Vitamine E	1	-----
Acide ascorbique	50	176.13
Biotine	0.20	0.024
Pantothénate de calcium	0.20	0.715
Chlorure de choline	50	50
Acide folique	0.20	1.32
Inositol	0.20	0.541
Nicotinamide	20	0.611
Acide para-aminobenzoïque	2	-----
Phosphate de pyridoxal	0.20	0.20
Riboflavine	0.20	0.376
Chlorhydrate de thiamine	4	1.012