



Université Paris Cité - Université Sorbonne Paris Nord

MEMOIRE
pour l'obtention du Diplôme de MASTER 2 RECHERCHE

Domaine "Sciences, Technologies, Santé"

Mention "Biologie-Santé"

Parcours « DIR Développement, inflammation, régénération »

Présenté et soutenu le 23 juin 2022

Par

Paul GALVEZ

**Développement d'une membrane amnio-chorionique humaine comme
alternative à la membrane induite pour la régénération osseuse.**

JURY

Pr. CHAUSSAIN Catherine, PU-PH, Université Paris Cité (Responsable)
Pr. FALGARONE Géraldine, PU-PH, Université Sorbonne Paris Nord
Pr. BERDAL Ariane, PU-PH, Université Paris Cité
Pr. EA Korng, PU-PH, Université Paris Cité
Dr. ISAAC Juliane, Université Paris Cité

Mémoire réalisé sous la direction de Mathilde FENELON, MCU-PH
Laboratoire INSERM - UMR 1026 BioTis
Directeur du laboratoire : Nicolas L'Heureux

Année universitaire 2021-2022

TABLES DES MATIERES

Résumé.....	3
I. Introduction	5
II. Matériel et Méthodes	8
A. Prélèvement et méthode de préservation de la membrane amnio-chorionique humaine (ACM).....	8
1. Prélèvement.....	8
2. Mise au point de la méthode de la décellularisation et de préservation de l'ACM.....	8
a) Protocole 1	9
b) Protocole 2	9
c) Protocole 3.....	10
3. Validation de la décellularisation.....	10
a) Coloration DAPI.....	10
b) Extraction et quantification d'ADN	11
c) Electrophorèse.....	11
B. Caractérisation.....	11
1. Analyse morphologique	11
2. Analyse histologique.....	12
3. Visualisation en microscopie électronique à balayage.....	12
C. Cytotoxicité <i>in vitro</i>	12
1. Cytotoxicité indirecte des extraits solubles.....	12
2. Test au rouge neutre.....	13
3. Test au MTT.....	13
D. Biocompatibilité <i>in vivo</i>	14
1. Implantation sous-cutanée	14
2. Analyse histologique.....	15
E. Propriétés ostéogéniques et angiogéniques <i>in vivo</i>	15
1. Implantation au niveau d'un défaut fémoral diaphysaire chez le rat.....	16
F. Analyses statistiques	16
III. Résultats	17
A. Validation du processus de décellularisation	17
B. Caractérisation.....	19
1. Analyse morphologique	19
2. Analyse histologique.....	20
3. Visualisation en MEB.....	21
C. Cytotoxicité <i>in vitro</i>	22
D. Biocompatibilité <i>in vivo</i>	23
E. Propriétés ostéogéniques et angiogéniques <i>in vivo</i>	24
IV. Discussion	25
V. Bibliographie	30

Résumé

Introduction: Des études ont précédemment montré que la membrane induite présentait des limites liées à son absence de pouvoir ostéoinducteur ainsi qu'à la nécessité d'un deuxième temps opératoire. En raison de leurs propriétés biologiques et de leur faible immunogénicité, les membranes placentaires (les membranes amniotiques et chorioniques) sont largement utilisées comme matériaux biologiques dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. L'intérêt de la membrane amniotique humaine (MAH) dans la régénération des défauts osseux critiques et non critiques a déjà été rapporté. Cependant, certaines limites ont été observées en raison de la finesse de la MAH qui la rend difficile à manipuler. Dans ce projet, nous avons proposé d'associer le chorion à la MAH car le chorion est trois à quatre fois plus épais que la MAH et contient des facteurs de croissance en plus grande quantité, ce qui peut optimiser les propriétés de la membrane pour les applications en ingénierie tissulaire osseuse. L'hypothèse de ce projet est donc que la membrane amnio-chorionique (ACM) pourrait remplacer avantageusement la membrane induite pour traiter les défauts osseux segmentaires. L'objectif de cette étude était de développer une nouvelle méthode de préservation de la membrane amnio-chorionique en vue de son utilisation pour la régénération osseuse.

Matériel et méthodes: Des placentas ont été récupérés après césarienne (n=10) et l'ACM a été découpée du placenta. L'ACM a été décellularisée en adaptant une méthode précédemment établie (méthode enzymatique suivie d'une méthode de décellularisation par détergent), puis elle a été lyophilisée et stérilisée aux rayons gamma (DL-ACM). L'efficacité du processus de décellularisation a été évaluée par coloration au DAPI, extraction et quantification de l'ADN, et séparation par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ACM a également été caractérisée par analyse histologique (coloration HES) et par microscopie électronique à balayage. Son épaisseur a également été mesurée. La cytotoxicité indirecte de l'ACM a été étudiée in vitro sur des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine. La DL-ACM a été implantée dans un modèle sous-cutané de rat afin d'évaluer sa biocompatibilité in vivo. Les rats ont été sacrifiés une semaine, un mois et deux mois après la chirurgie (n= 6 par condition et par temps). Enfin, la DL-ACM et la MAH ont été implantées in vivo dans des défauts osseux non critiques de fémurs de rats afin de comparer leurs propriétés ostéogéniques et angiogéniques 1 semaine et 2 semaines après la chirurgie (n= 6 par condition et par temps).

Résultats: L'efficacité du processus de décellularisation a été validée par l'extraction d'ADN et confirmée par la séparation par électrophorèse sur gel d'agarose ainsi que par une coloration HES et DAPI objectivant l'absence de matériel nucléaire résiduel. L'épaisseur de la DL-ACM était significativement augmentée par rapport à la MAH. In vitro, la méthode de préservation n'a conféré aucune cytotoxicité indirecte. In vivo, la DL-ACM était plus facile à manipuler que la MAH. L'évaluation de sa biocompatibilité selon la norme NF-EN-ISO10993-6 et de la réparation osseuse en présence de la DL-ACM sont en cours d'analyse.

Conclusion: Cette étude a permis de développer et caractériser une nouvelle membrane amnio-chorionique dont la méthode de préservation est simple et reproductible. Ce projet constitue une première étape de validation de l'ACM dans un modèle de défauts osseux simple et reproductible. La suite du projet visera à comparer l'ACM et la membrane induite dans un modèle de défauts osseux segmentaires chez le rat puis chez le gros animal.

I. Introduction

Le traitement des pertes de substance osseuse mandibulaire segmentaires demeure un problème de santé publique. Ces pertes de substances peuvent être d'origine carcinologique, traumatique, infectieuse ou iatrogène. Les étiologies traumatiques et infectieuses sont en régression en France et la principale cause des pertes de substances segmentaire de la mandibule est la chirurgie d'exérèse carcinologique. Environ 500 000 nouveaux cas de cancers des voies aéro-digestives supérieures sont diagnostiqués chaque année dans le monde. En France, ces cancers représentent 15 000 nouveaux cas par an chez l'homme et 2 000 nouveaux cas par an chez la femme. La chirurgie d'exérèse reste le traitement de première intention des lésions tumorales de la cavité orale. Lorsque la tumeur arrive au contact de l'os mandibulaire ou l'infiltré, une résection osseuse mandibulaire interruptrice ou segmentaire est réalisée. La perte de continuité de cet os a des répercussions esthétiques, fonctionnelles et psychosociales qui diminuent nettement la qualité de vie de ces patients (1,2). Si une résection interruptrice de la mandibule est nécessaire, une reconstruction mandibulaire est envisagée pour faciliter la mastication, maintenir la statique des muscles du plancher buccal et de la langue, faciliter la déglutition et conserver l'esthétique (3).

La reconstruction repose le plus souvent sur le lambeau libre de fibula, mais cette technique présente cependant des inconvénients importants tels qu'un temps opératoire long et la survenue de complications per- et post-opératoires, immédiates et tardives, au niveau des sites donneur et receveur (4,5). De plus, selon le terrain du patient (pathologies ischémiques) cette technique de reconstruction ne peut pas toujours être utilisée (6).

Pour traiter les défauts osseux segmentaires, sans avoir recours à une technique complexe de lambeau osseux vascularisé, la technique de la membrane induite a été développée au niveau des os longs par le Dr Masquelet (7). Plusieurs études précliniques et cliniques ont rapporté l'intérêt de cette technique pour la reconstruction osseuse mandibulaire (3,8–11). Il s'agit d'une technique en deux temps opératoires. Le premier temps consiste à mettre en place un ciment (méthylméthacrylate) mainteneur d'espace au sein du défaut osseux afin d'induire la formation d'une membrane autour de celui-ci, d'où le nom de la technique. Deux mois plus tard, le deuxième temps vise à venir retirer délicatement le ciment tout en maintenant la membrane en place et combler la cavité par une greffe autologue spongieuse d'origine iliaque. La membrane est suturée de façon à maintenir en place la greffe osseuse.

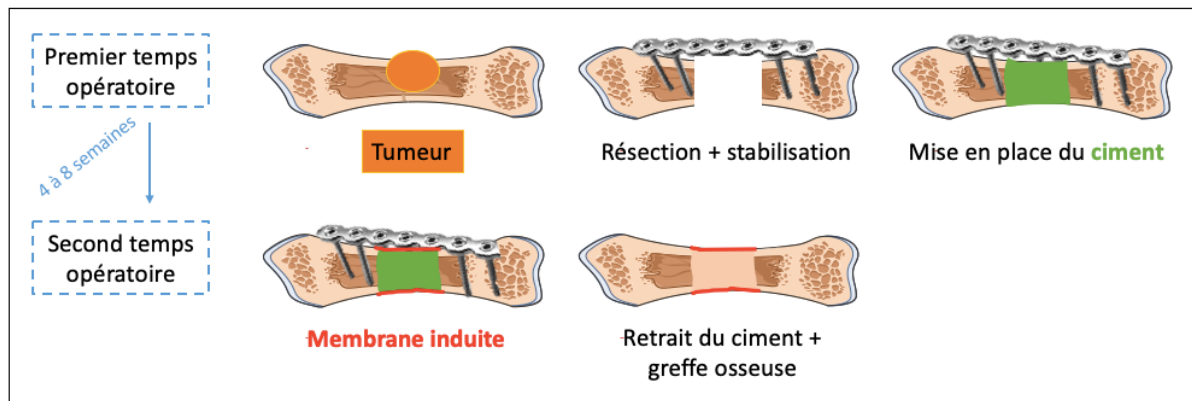


Figure 1 : Représentation schématique de la technique de la membrane induite.

Cependant, cette approche présente des limites cruciales (3,8,12–14):

- Elle nécessite un deuxième temps opératoire source de morbidité et de douleur pour le patient et est associé à une augmentation des coûts de prise en charge.
- Elle présente un risque élevé d'infection ou d'exposition du ciment, ce qui peut nécessiter son retrait prématuré et donc l'échec de l'intervention.
- Elle ne présente pas de pouvoir ostéoinducteur : absence de cellules ostéoprogénitrices et faible quantité de facteurs de croissance.

Une alternative à cette technique serait d'avoir recours à une membrane biologique déjà existante permettant ainsi de s'affranchir de ce deuxième temps opératoire.

Du fait de leurs propriétés biologiques et mécaniques, les membranes placentaires (amnion et chorion) pourraient être une alternative avantageuse à la membrane induite et permettre une approche chirurgicale moins iatrogène, en réduisant le nombre d'étape chirurgicale (c.-à-d. en s'affranchissant de l'étape chirurgicale qui consiste à insérer un mainteneur d'espace pour induire la formation de la membrane induite). De plus, les membranes d'amnion-chorion possèdent des propriétés anti-bactériennes ce qui devrait diminuer le risque d'infection et ne pas compromettre la reconstruction osseuse en cas d'exposition de la membrane au sein de la cavité buccale par rapport à la membrane induite. Par ailleurs, les membranes d'amnion-chorion possèdent des propriétés anti-inflammatoire, antalgique, anti-fibrotique, anti-tumorale et sont faiblement immunogènes (15–19). Elles contiennent des facteurs de croissance qui pourraient favoriser la cicatrisation osseuse (20,21) et la membrane amniotique présente une structure et des propriétés biologiques proches de la membrane induite et du périoste (20,22). Enfin, le placenta est un tissu abondant dont l'obtention est simple. Les membranes placentaires présentent ainsi un grand intérêt thérapeutique et sont déjà utilisées couramment dans certaines spécialités médicales (ophtalmologie, dermatologie etc) (23,24).

Des travaux ont été précédemment menés sur la MAH au sein de l'unité INSERM 1026 en collaboration avec le service d'orthopédie de Sfax en Tunisie et le service de chirurgie orthopédique de Besançon (20,22). Ils ont montré le potentiel ostéogénique de la MAH et conduit au développement d'une nouvelle méthode de préservation de la MAH, simple et reproductible (25). La réparation osseuse de défauts non critiques étaient significativement augmentait en présence de la MAH décellularisée et lyophilisée (26). De plus, la MAH a permis une réparation de défauts osseux critiques comparable à celle de la membrane induite chez le rat (27). En revanche, la membrane amniotique s'est révélée très difficile à manipuler : trop fine et difficile à appliquer sur les sites à implanter. De plus, elle se déchirait facilement lorsque l'on souhaitait la suturer au niveau du site opératoire, alors qu'il est primordial de pouvoir stabiliser la membrane (par des sutures ou autres moyens de fixation) afin de s'assurer de l'étanchéité et du bon maintien de la greffe osseuse pour la reconstruction osseuse chez l'homme.

L'utilisation de la MAH associée au chorion devrait faciliter la manipulation de cette membrane lors de la chirurgie car le chorion est trois à quatre fois plus épais que l'amnion. Cela permettrait également d'améliorer ses propriétés mécaniques, en lui conférant une meilleure résistance à la suture, et de diminuer sa vitesse de résorption. L'association de la MAH au chorion devrait également améliorer les propriétés ostéogénique et angiogénique de la membrane. Le chorion contient plusieurs facteurs de croissance, notamment le PDGF- α et le VEGF, en quantité supérieure par rapport à l'amnion (21). De plus, le chorion présente des propriétés anti-bactériennes supérieures à la MAH, ce qui améliorerait encore la résistance à l'infection en cas d'exposition de la membrane au sein de la cavité buccale (28).

Compte tenu de ces éléments ainsi que des résultats précédents au sein de l'unité INSERM 1026, nous pouvons formuler l'hypothèse que la membrane amnio-chorionique présentera des propriétés mécaniques et ostéogéniques supérieures à la MAH et qu'elle pourra avantageusement remplacer la membrane induite pour la reconstruction de défauts osseux segmentaires.

L'objectif de ce travail de master 2 était de développer une nouvelle membrane d'ACM et de montrer sa supériorité par rapport à la membrane amniotique en termes de propriétés mécaniques, propriétés ostéogéniques et angiogéniques *in vivo*.

II. Matériel et Méthodes

A. Prélèvement et méthode de préservation de la membrane amnio-chorionique humaine (ACM)

1. Prélèvement

Dix placentas humains ont été prélevés après une césarienne programmée au sein du service de gynécologie-obstétrique du CHU de Bordeaux. Les patientes devaient être en bonne santé (testées séronégatives pour le VIH, le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C et la syphilis) et fournir un consentement éclairé écrit. Leurs placentas ont été rendus anonymes. Les placentas ont été conservés dans une solution stérile contenant du PBS 1X (Gibco®) complété par 1% d'antibiotiques (Gibco®, pénicilline / streptomycine) pour être transférés au laboratoire. Ensuite, ils ont été rincés à l'eau distillée stérile et les caillots sanguins résiduels ont été éliminés. L'ACM a été découpée pour être conditionnée et congelée à -80 °C. Toutes ces étapes ont été réalisées dans des conditions stériles.

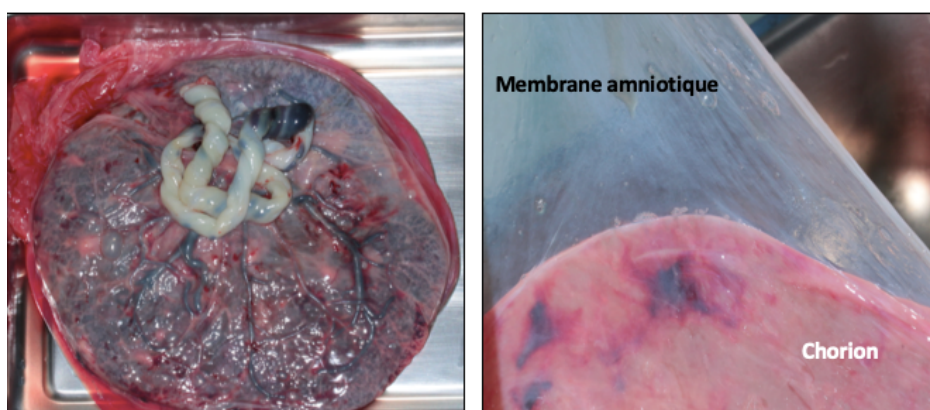


Figure 2 : Photographies de la dissection des membranes placentaires.

2. Mise au point de la méthode de la décellularisation et de préservation de l'ACM

L'ACM a été décellularisée en adaptant le protocole précédemment développé pour la décellularisation de la MAH (25). Plusieurs protocoles ont été réalisés en adaptant l'exposition à la solution de décellularisation (ESD). Un dispositif visant à maintenir l'ACM tendue pendant la décellularisation a également été mis au point.

a) Protocole 1

L'ACM a d'abord été traitée avec de la trypsine et de l'acide éthylènediaminetétraacétique (T/EDTA, 0,125 %) pendant deux minutes à 37°C. Elle a été lavée sous agitation douce avec du PBS 1X stérile pendant 5 min puis avec de l'eau distillée stérile pendant 5 min à deux reprises. Elle a ensuite été transférée dans une solution de décellularisation composée de 8 mM de CHAPS, 25 mM d'EDTA, 0,12 M de NaOH et 1 M NaCl dans du PBS, puis incubée sous agitation douce pendant 7 h à température ambiante. Après ce traitement, l'ACM a été lavée sous agitation douce avec du PBS 1X pendant 5 min puis toute la nuit dans de l'eau distillée stérile en agitant douce. Enfin, un nouveau rinçage à l'eau distillée sous agitation douce a été réalisée pendant 10 min puis l'ACM décellularisée a été congelée à -80 °C, avant d'être lyophilisée dans un lyophilisateur (Biopharma Technologies France®, Benchtop pro) pendant 24h (DL-ACM). Elle a finalement été conditionnée dans un sachet de stérilisation avant d'être stérilisée par rayonnement gamma à 25 kGy (MDS Nordion®, GammaCell 3000 Elia). La DL-ACM a été stockée dans son sachet de stérilisation à température ambiante.

b) Protocole 2

Un dispositif visant à maintenir l'ACM tendue et éviter qu'elle ne se plique a été développé pour améliorer l'ESD. Il s'agissait d'un support rectangulaire sur lequel l'ACM était étendue et maintenue en périphérie. Un fil métallique de 0,9 mm de diamètre et de 30 cm de longueur était plié en rectangle pour assurer un cadre de support. L'ACM était maintenue sur ce cadre rectangulaire par 4 cylindres de silicone creux de 4,5 cm coupés dans le sens de la hauteur pour permettre leur insertion en périphérie du cadre sur chaque côté du rectangle. L'épaisseur des cylindres de silicone assurait la surélévation du cadre rectangulaire portant la membrane tendue et permettait la diffusion de la solution de décellularisation au-dessus et en-dessous de l'ACM. L'ACM était utilisée avec son dispositif de tension dans une boîte de Petri pour toutes les étapes précédemment décrites dans le protocole 1 jusqu'à la congélation à -80 °C. La périphérie de la membrane susceptible de ne pas avoir été correctement exposée à la solution de décellularisation par la mise en place du dispositif (cylindres de silicone) était éliminée à la sortie de la cryopréservation avant la lyophilisation. L'ACM était ensuite lyophilisée dans un lyophilisateur (Biopharma Technologies France®, Benchtop pro) pendant 24h (DL-ACM). Elle a finalement été conditionnée dans un sachet de stérilisation avant d'être

stérilisée par rayonnement gamma à 25 kGy (MDS Nordion®, GammaCell 3000 Elia). La DL-ACM a été stockée dans son sachet de stérilisation à température ambiante.

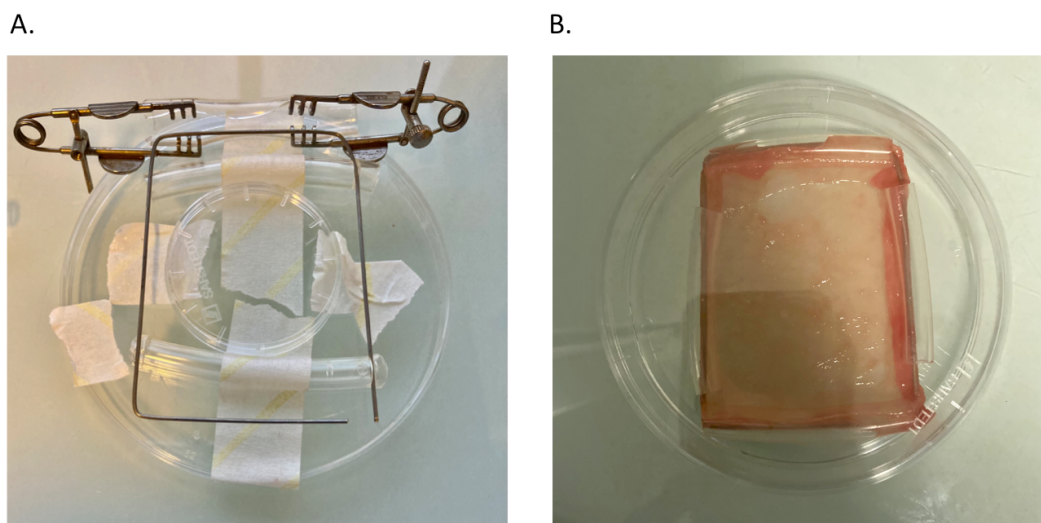


Figure 3 : Dispositif de tension de l'ACM.
(A) Plateforme de montage. (B) ACM montée sur le dispositif.

c) Protocole 3

Le protocole 1 a été repris sans dispositif de tension de l'ACM et le temps d'ESD a été augmenté de 7h à 24h. Les autres étapes étaient identiques à celles décrites dans le protocole 1.

3. Validation de la décellularisation

Pour garantir l'effectivité du processus de décellularisation, les critères de validation précédemment établis pour la décellularisation ont été utilisés (29).

a) Coloration DAPI

Tout d'abord, une évaluation qualitative par marquage des noyaux cellulaires a été réalisée avec une coloration DAPI sur l'ACM décellularisée selon les 3 protocoles. Un échantillon de chaque membrane (ACM décellularisée et ACM non décellularisée) a été placé dans une plaque 6 puits de 10 cm² et un marquage au réactif 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI)

dilué au 1/5000e a été réalisé. Un volume de 1 mL/puits a été utilisé et laissé pendant 10 min. Les échantillons ont ensuite été rincés au PBS 1X (Gibco®) et placés sur une lame. Les observations du marquage ont été réalisées au microscope confocal (Leica®, TCS SPE Modèle DMI 4000B) pour permettre un déplacement dans l'épaisseur de l'échantillon.

b) Extraction et quantification d'ADN

Après validation d'un des trois protocoles par DAPI, l'ADN résiduel a été extrait de la DL-ACM et de l'ACM non décellularisée afin d'être quantifié avec un appareil de mesure de l'ADN. Un kit d'extraction d'ADN (QIAmp® DNA Mini Kit, Qiagen, USA) a été utilisé selon les instructions du fabricant. L'ADN a ensuite été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre en déterminant son absorbance à la longueur d'onde 260 nm avec un couvercle d'une longueur de trajet de 1 mm (Implen NanoPhotometer® P-Class P330). La valeur obtenue (ng/μL) a été tracée en fonction de la masse des échantillons secs (ng/mg).

c) Electrophorèse

Enfin, pour déterminer la taille de l'ADN restant, des concentrations égales d'ADN extrait de la DL-ACM et de l'ACM non décellularisée ont été séparées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % et visualisées par transillumination ultraviolette (Thermofisher®, FastRuler low range DNA Ladder).

B. Caractérisation

1. Analyse morphologique

L'aspect morphologique de la DL-ACM a été évalué macroscopiquement. Des photographies macroscopiques de la face amniotique et de la face chorionique de la DL-ACM ont été réalisées (Canon®, EOS 6D). L'épaisseur de la DL-ACM a été mesurée à l'aide d'un pied-à-coulisse numérique (Adoric®, Digital Caliper) et comparée à l'épaisseur de la MAH décellularisée et lyophilisée (DL-MAH) et de la membrane Bio-Gide (Geistlich Bio-Gide®).

2. Analyse histologique

Des échantillons de DL-ACM et d'ACM non décellularisée et lyophilisée (L-ACM) ont été déshydratés par des bains de concentrations croissantes d'éthanol et incorporés en paraffine. Les échantillons ont ensuite été sectionnés au microtome (7 µm) et colorés à l'hématoxyline et à l'éosine-safran (HES). Les images ont été obtenues avec un microscope à lumière Eclipse 80i (Nikon®, Japon) et capturées avec une caméra CCD DXM 1200C (Nikon®, Japon).

3. Visualisation en microscopie électronique à balayage

La caractérisation de la surface de l'ACM a été réalisée à l'aide de la microscopie électronique à balayage (MEB) à émission de champ (Hitachi®, TM 4000 plus). Des échantillons de DL-ACM et d'ACM non décellularisée et lyophilisée (L-ACM) ont été traités par revêtement d'une fine couche d'or à l'aide d'une coucheuse fine à pulvérisation automatique avant l'imagerie. Les acquisitions ont été réalisées sur la face amniotique et la face chorionique de chaque échantillon. Quatre images représentatives ont été choisies (mode 15kV, grossissement X100).

C. Cytotoxicité *in vitro*

La cytotoxicité de la DL-ACM a été évaluée *in vitro* sur la viabilité et l'activité métabolique des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine (hBMSCs). Les hBMSCs ont été isolées à partir de patients consentants ayant bénéficié d'une chirurgie de la hanche (accord expérimental avec le CHU de Bordeaux et l'Etablissement Français du Sang, accord CPIS 14.14), et cultivées selon des protocoles bien établis (30). Un pool de 3 lignées cellulaires d'hBMSCs au passage 1 et 2 ont été utilisées pour cette manipulation.

1. Cytotoxicité indirecte des extraits solubles

La cytotoxicité de la DL-ACM a été évaluée de manière indirecte. Ainsi, la cytotoxicité des extraits solubles obtenus de la DL-ACM a été évaluée selon les normes NF-EN-ISO 10993-12 en mesurant la viabilité cellulaire et l'activité métabolique des hBMSCs à l'aide d'un test au rouge neutre et au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT)

respectivement. Pour les deux études, les extraits de milieu de culture cellulaire ont été préparés conformément aux normes NF-EN-ISO 10993-12. Des morceaux de DL-ACM ont été placés dans 5 mL de milieu essentiel minimal alpha (Gibco®, MEM alpha) complété par 10 % de FBS puis incubés à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ dans l'air. Les extraits de milieu ont été collectés à 72h conformément à la catégorie de dispositifs médicaux correspondantes selon les normes NF-EN-ISO 10993-12. Pour les tests au rouge neutre et au MTT, les hBMSCs ont été placées à une densité de $1,5 \times 10^4$ cellules/cm² dans des plaques de 96 puits et cultivées pendant 72 h (n= 6 puits). Après avoir éliminé le milieu de culture, les extraits solubles de la DL-ACM ont été ajoutés et incubés pendant 24h. Un contrôle positif avec du Triton 100X à 0,1% et un contrôle négatif avec du MEM alpha seul ont été utilisés. Les résultats ont été normalisés par rapport aux témoins négatifs (cellules cultivées sur des surfaces plastiques unies dans un milieu basal) comme viabilité cellulaire et activité métabolique à 100 %.

2. Test au rouge neutre

Un test au rouge neutre a été effectué pour évaluer l'effet des extraits solubles de la DL-ACM sur la viabilité cellulaire des hBMSCs. Le milieu de culture a été retiré après 24 h de contact avec les extraits solubles et une solution de 100 µL de Rouge Neutre (Sigma-Aldrich Co®), diluée dans du milieu modifié de Dulbecco d'Iscove (IMDM®) à 1,25 % complété par 10 % de FBS, a été ajoutée à chaque puits et cultivé à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ pendant 3 h. Le surnageant a ensuite été retiré et 100 µL d'une solution composée d'acide acétique à 1% dans de l'éthanol à 50% ont été ajoutés pour lyser les cellules. L'intensité de la coloration a été quantifiée en mesurant les absorbances à 540 nm avec un spectrophotomètre (Perkin Elmer®, 2030 Multilabel Reader Victor™ X3).

3. Test au MTT

Un test au MTT a été effectué pour évaluer l'activité métabolique. Le milieu de culture a été retiré après 24 h de contact et remplacé par 125 µL de solution de MTT (Sigma-Aldrich Co, 5 mg/mL dans du PBS 0,1 M, pH = 7,4), qui a été dilué à 20 % dans de l'IMDM sans rouge de phénol (Gibco®) et cultivé à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ pendant 3h. Le surnageant a ensuite été retiré et 100 µL de diméthylsulfoxyde (Sigma-Aldrich Co®, DMSO) ont été ajoutés aux plaques pour dissoudre les cristaux de formazan. L'intensité

de coloration a été quantifiée en mesurant l'absorbance à 570 nm avec un spectrophotomètre (Perkin Elmer®, 2030 Multilabel Reader Victor™ X3).

D. Biocompatibilité *in vivo*

Les expériences ont été réalisées selon les recommandations du Ministère de la Recherche et de l'Agriculture pour l'expérimentation animale (transposition nationale de la directive européenne 2010/63/UE). Ce protocole était déjà approuvé par le comité d'éthique animale de l'Université de Bordeaux et autorisé par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (agrément APAFIS n°4375-2016030408537165v8). Les animaux avaient un accès *ad libitum* à l'alimentation et pouvaient se mouvoir sans restriction sous des conditions contrôlées et constantes de température, d'humidité, d'aération et de lumière.

1. Implantation sous-cutanée

Un modèle d'implantation sous-cutanée chez le rat a été utilisé afin d'évaluer la biocompatibilité de la DL-ACM (25). Neuf rats Wistar femelles âgés de 10 semaines ont été utilisés pour cette expérimentation. L'objectif était d'implanter des patches de DL-ACM, de MAH et de membrane Bio-Gide (Geistlich Bio-Gide®) dans le tissu sous-cutané dorsal de rats adultes et de comparer leur biocompatibilité. Du fil de suture bleu non résorbable (Ethicon®, Prolene™ Visi-Black™ 6-0) a été utilisé pour fixer les quatre coins de chaque échantillon et servir de marqueur pour identifier les sites d'implantation. La chirurgie a été réalisée dans des conditions aseptiques. L'anesthésie de courte durée a été induite par l'inhalation d'isoflurane à 4 % (Air : 1,5 L/min) et maintenue à l'aide d'isoflurane à 2 % (Air : 0,4 L/min). L'analgésie a été réalisée par injection intrapéritonéale de 0,1 mg/kg de buprénorphine (Buprecare®, 0,3 mg/ ml). Le dos a été rasé, le site chirurgical a été préparé de manière aseptique et une incision sagittale médiane dorsale a été pratiquée. Trois conditions ont été implantées de chaque côté de la ligne d'incision (n = 6 conditions par rat). Les membranes étaient utilisées sèches après déballage de leur sachet stérile. En plus des trois implants, un contrôle négatif avec des sutures non résorbables seules a été réalisé. Les implants étaient espacés d'au moins 10 mm entre eux et se trouvaient à plus de 10 mm de la ligne d'incision. La peau a été fermée avec des clips chirurgicaux et un spray antiseptique

(Aluspray®, Vétquinol) a été appliqué sur la cicatrice. Après la chirurgie, les animaux ont reçu de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. L'euthanasie a été effectuée par inhalation de CO₂ à une semaine, un mois et deux mois après l'implantation (n = 6 par conditions et par temps). Après rasage des rats sacrifiés, les échantillons ont été soigneusement récoltés et fixés dans du paraformaldéhyde à 4% (Microm Microtech®, Antigenfix) pendant 24h.

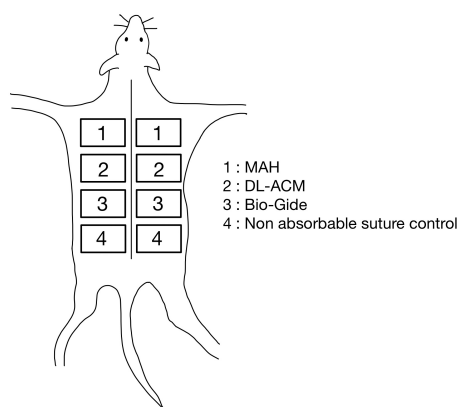


Figure 4 : Schéma de la procédure d'implantation sous-cutanée.

2. Analyse histologique

Les échantillons prélevés ont été déshydratés par des bains de concentrations croissantes d'éthanol et incorporés en paraffine dans le but d'une évaluation histologique de la réaction inflammatoire conformément à la norme NF-EN-ISO10993-6.

E. Propriétés ostéogéniques et angiogéniques *in vivo*

Les expériences ont été réalisées selon les recommandations du Ministère de la Recherche et de l'Agriculture pour l'expérimentation animale (transposition nationale de la directive européenne 2010/63/UE) et ont été approuvées par le comité d'éthique animale de l'Université de Bordeaux (APAFIS N°32504-2021072111152646 v4). Les animaux avaient un accès *ad libitum* à l'alimentation et pouvaient se mouvoir sans restriction sous des conditions contrôlées et constantes de température, d'humidité, d'aération et de lumière.

1. Implantation au niveau d'un défaut fémoral diaphysaire chez le rat

Vingt-huit rats Wistar femelles âgés de 10 semaines ont été utilisés pour cette expérimentation. L'objectif était de réaliser un défaut osseux circulaire mono-cortical non critique au niveau de la diaphyse fémorale de chaque rat (deux défauts par rat, $n = 7$ par condition et par temps). L'anesthésie de courte durée a été induite par l'inhalation d'isoflurane à 4 % (Air : 1,5 L/min) et maintenue à l'aide d'isoflurane à 2 % (Air : 0,4 L/min). L'analgésie a été réalisée par injection intrapéritonéale de 0,1 mg/kg de buprénorphine (Buprecare®, 0,3 mg/ml). Le site chirurgical a été rasé et préparé de manière aseptique. Une incision cutanée longitudinale droite a été réalisée latéralement sur les deux jambes. Une dissection entre les muscles vastus lateralis et biceps femoris a été effectuée pour exposer la diaphyse fémorale. Le périoste a été enlevé mécaniquement et un défaut mono-cortical circulaire non critique a été réalisé dans chaque diaphyse fémorale à l'aide d'une fraise de 2,3 mm de diamètre. Le site opératoire a été fréquemment irrigué avec une solution saline stérile afin de préserver l'os de la nécrose thermique et d'éliminer les débris osseux. Le défaut a été laissé vide ou recouvert d'un patch sec de 15 mm × 10 mm de MAH, DL-ACM ou Bio-Gide (Geistlich Bio-Gide®). Les membranes étaient utilisées sèches après déballage de leur sachet stérile. La face chorionique de la DL-ACM était appliquée contre le défaut osseux. Les muscles ont ensuite été repositionnés et suturés avec des sutures résorbables (Ethicon®, 5-0 Vicryl.), et la peau a été fermée avec des clips chirurgicaux. Un spray antiseptique (Aluspray®, Vétoquinol) a été appliqué sur la cicatrice. Après la chirurgie, les animaux ont reçu de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. L'euthanasie a été effectuée à une semaine et deux semaines après l'implantation par inhalation de CO₂ ($n = 7$ par condition et par temps). Les fémurs ont été disséqués, rincés dans du PBS 1X et fixés dans du paraformaldéhyde à 4% (Microm Microtech®, Antigenfix) pendant 24h, avant d'être stockés dans de l'éthanol à 70% à 4°C.

F. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne $\pm$ écart-type. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (La Jolla/CA, États-Unis). Un test de normalité omnibus D'Agostino et Pearson a tout d'abord été réalisé. Si les données supposaient une distribution gaussienne, les différences ont été évaluées par une analyse de variance (One-Way ANOVA) avec le post-test de Bonferroni. La différence statistique pour des échantillons

indépendants a été évaluée avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn. Dans les deux cas, les différences statistiques significatives sont marquées par le symbole étoile * indiquant un $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

III. Résultats

A. Validation du processus de décellularisation

L'effectivité de la méthode de décellularisation a été évaluée selon 3 critères précédemment établis (29).

Les différents protocoles de décellularisation et de préservation ont tout d'abord étaient évalués par une coloration au DAPI. Les colorations des ACM traitées suivant les protocoles 1 et 2 retrouvaient un marquage positif au DAPI sur l'ACM décellularisée révélant la présence de matériel nucléaire résiduel (fig. 5). Seule l'ACM décellularisée avec le protocole 3 ne présentait aucune coloration positive au DAPI. La méthode de décellularisation décrite dans le protocole 3 a donc ensuite été évaluée selon les autres critères (29).

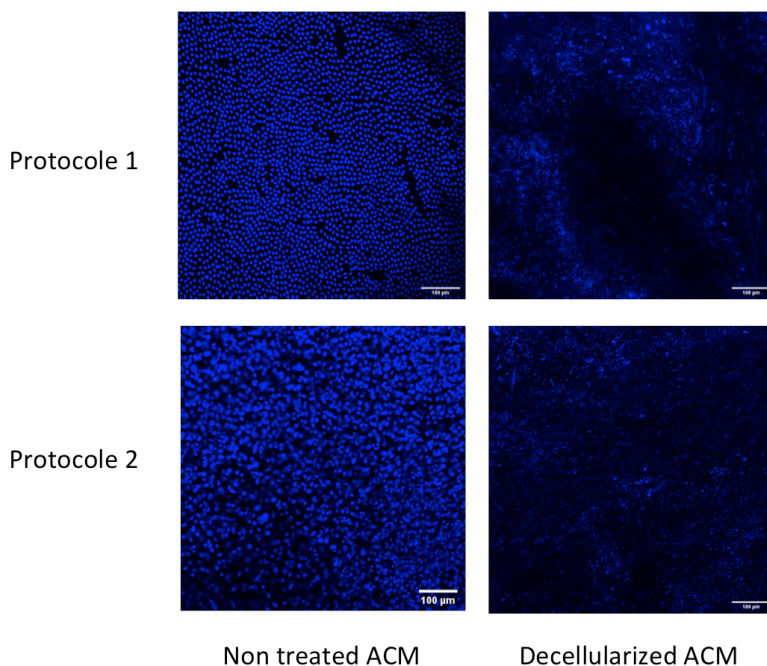


Figure 5 : Evaluation de l'effectivité de la méthode de décellularisation des protocoles 1 et 2 par une coloration au DAPI.

La quantification d'ADN (fig. 6B) a retrouvé des valeurs d'ADN résiduels de la DL-ACM significativement diminuées par rapport l'ACM non décellularisée, et légèrement au-dessus du seuil établi de 50 ng/mg (29) (ADN résiduel de la DL-ACM et de l'ACM : $71 \pm 18,32$ et $1282 \pm 183,3$ ng/mg respectivement, $p < 0,005$). Cependant, la coloration au DAPI (fig. 6A) ne retrouvait aucun marquage positif sur l'ACM décellularisée, témoignant l'absence de matériel nucléaire résiduel. Ce résultat a été confirmé par l'électrophorèse sur gel d'agarose (fig. 6C) où aucun ADN résiduel n'était visible pour la DL-ACM. La méthode de décellularisation décrite dans le protocole 3 est donc celle qui a été retenue pour la suite de l'étude.

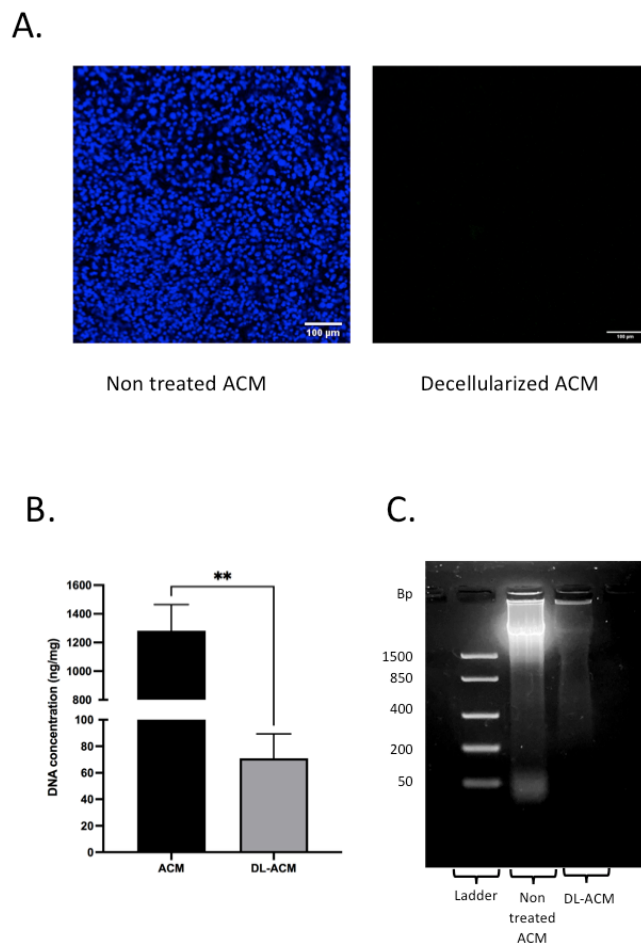


Figure 6 : Validation de la méthode de décellularisation du protocole 3.

(A) Coloration au DAPI. (B) Quantification de la concentration en ADN après extraction (n=6 par condition). (C) Electrophrèse sur gel d'agarose. (Test de Mann-Whitney, les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type. Le symbole ** indique une différence statistiquement significative par rapport à l'autre groupe avec $p < 0,005$).

B. Caractérisation

1. Analyse morphologique

La face amniotique de la DL-ACM retrouvait un état de surface lisse (fig. 7A) tandis que la face chorionique présentait une surface fibrillaire lâche d'aspect poreux (fig. 7B). Quelques échantillons présentaient un dédoublement par la perte de continuité entre le feuillet amniotique et le feuillet chorionique (fig. 8A). La mesure de l'épaisseur des membranes retrouvait une épaisseur de la DL-ACM significativement augmentée par rapport à celle de la DL-MAH (épaisseur de la DL-ACM et de la DL-MAH : $0,866 \pm 0,187$ et $0,024 \pm 0,012$ mm respectivement, $p < 0,0001$) et par rapport à celle de la membrane Bio-Gide (épaisseur Geistlich Bio-Gide® : $0,675 \pm 0,148$ mm, $p < 0,05$) (fig. 9).

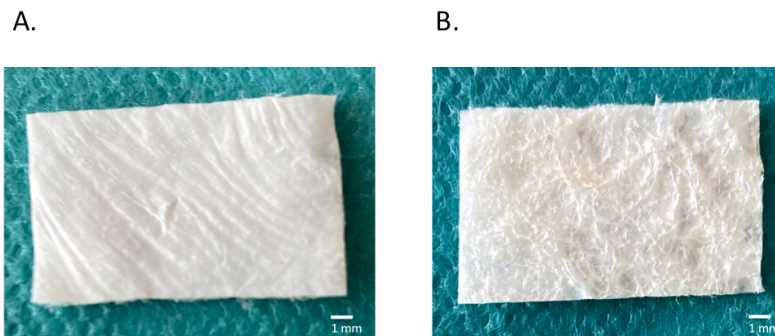


Figure 7 : Aspect macroscopique de la DL-ACM.

(A) Face amniotique de la DL-ACM. (B) Face chorionique de la DL-ACM.

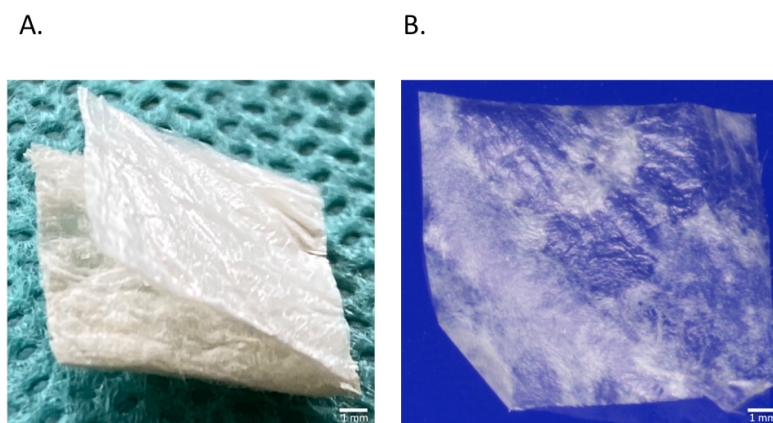


Figure 8 : Aspect macroscopique de la DL-ACM et de la DL-MAH.

(A) Dédoublement du feuillet amniotique et du feuillet chorionique de la DL-ACM.
(B) Aspect macroscopique de la DL-MAH.

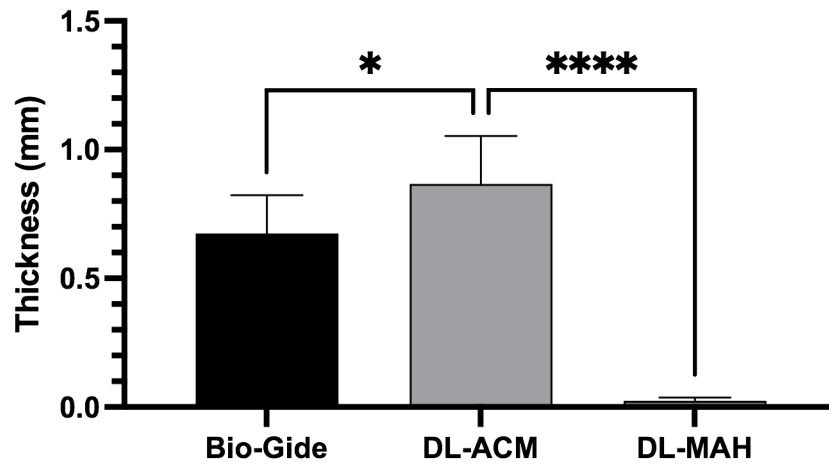


Figure 9 : Epaisseur de la DL-ACM.

Mesure de l'épaisseur de la membrane Bio-Gide (Geistlich Bio-Gide®), de la DL-ACM et de la DL-MAH (n = 8 par condition). (One-Way ANOVA avec post-test de Bonferroni, les données sont présentées sous forme de moyennes±écart-type. Les symboles * et **** indique une différence statistiquement significative par rapport à l'autre groupe avec $p < 0,05$ et $p < 0,0001$ respectivement).

2. Analyse histologique

La DL-ACM et la L-ACM ont été évaluées histologiquement par coloration HES. Les feuillets amniotiques et chorioniques étaient identifiables sur les deux membranes (fig.10). L'architecture trilaminaire de l'amnion (épithélium, membrane basale et tissu conjonctif) était identifiable sur la L-ACM (fig. 10 A et B). L'architecture du chorion retrouvait également l'épithélium de multiples cellules trophoblastiques avec une densité nucléaire importante, la membrane basale chorionique et le tissu conjonctif sus-jacent sur la L-ACM (fig. 10 A et B). L'architecture n'était plus observable sur la DL-ACM et un clivage était retrouvé entre les feuillets amniotique et chorionique (fig. 10 C et D). L'organisation de l'épithélium de l'amnion a été maintenue sous forme d'une couche unique de cellules sur la L-ACM, alors que l'absence totale de cellules résiduelles était objectivée après la décellularisation sur la DL-ACM. On retrouvait une densité cellulaire importante au niveau de l'épithélium multicouches trophoblastiques du chorion de la L-ACM tandis qu'aucune cellule n'était retrouvée sur la

DL-ACM. Ce résultat a soutenu la validation du processus de décellularisation de la DL-ACM. Une délamination de la DL-ACM été également observée.

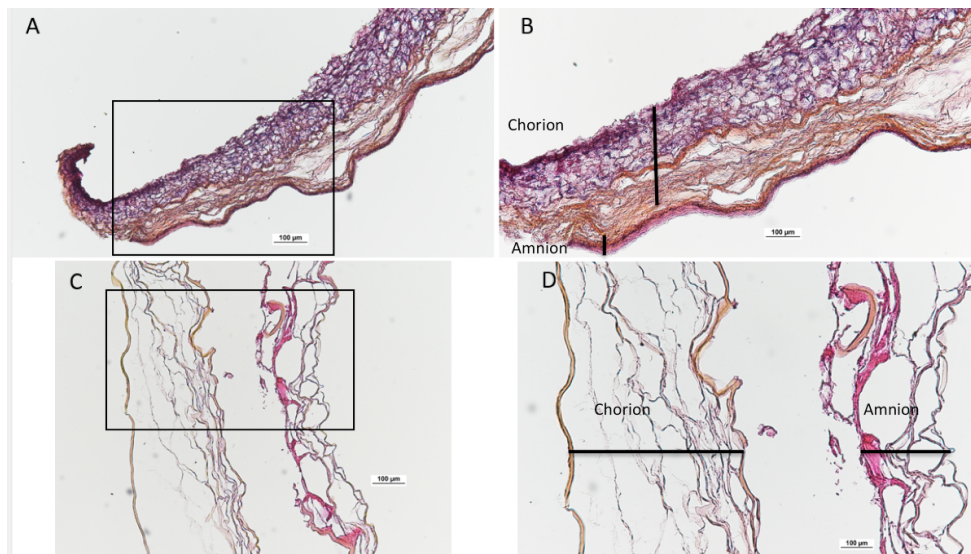


Figure 10 : Analyse histologique microscopique de la DL-ACM et de la L-ACM.

(A) L-ACM coloration HES, grossissement X10. Le rectangle correspond à la zone montrée dans l'image (B).

(B) L-ACM coloration HES, grossissement X20.

(C) Coloration HES, grossissement X10. Le rectangle correspond à la zone montrée dans l'image (D).

(D) L-ACM coloration HES, grossissement X20.

3. Visualisation en MEB

La MEB a permis de caractériser l'état de surface de la matrice extracellulaire de la DL-ACM et de la L-ACM. Les acquisitions ont été réalisées sur la face amniotique et la face chorionique de chaque échantillon (fig. 11). La face amniotique de la L-ACM retrouvait de multiples irrégularités qui indiquaient la présence des cellules de la monocouche épithéliale. A l'inverse, la face amniotique de la DL-ACM retrouvait un état de surface lisse qui laissait apparaître la structure fibrillaire de la matrice extracellulaire sous-jacente. La face chorionique de la L-ACM révélait une surface plane pavimenteuse tandis que la face chorionique de la DL-ACM montrait un réseau poreux formé par un maillage fibrillaire lâche et régulier.

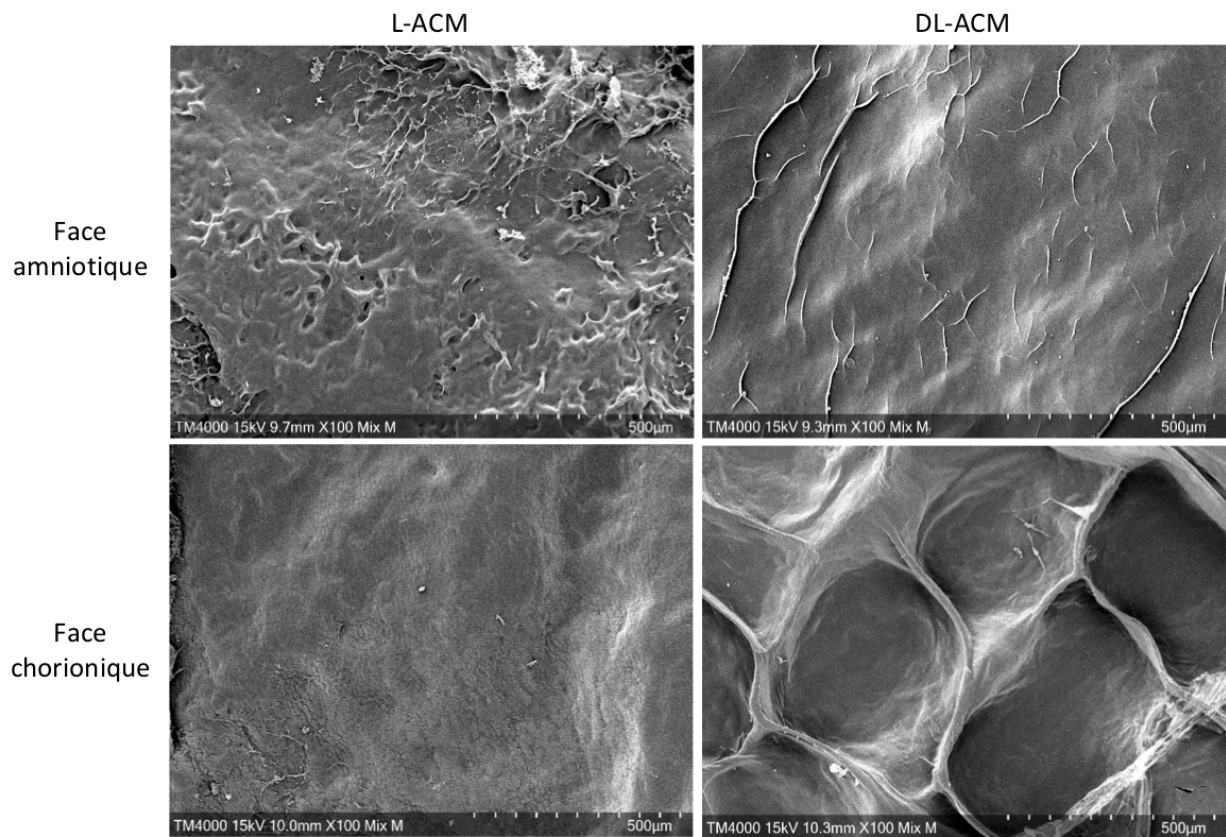


Figure 11 : Visualisation de l'état de surface de la DL-ACM et de la L-ACM au MEB.

C. Cytotoxicité *in vitro*

L'activité métabolique a été évaluée par le test au MTT. Les extraits de DL-ACM n'ont pas entraîné de diminution de l'activité métabolique des hBMSCs en-dessous du seuil calculé en fonction du témoin négatif. La viabilité cellulaire a été évaluée par le test au rouge neutre. Les extraits de DL-ACM n'ont pas entraîné de diminution de la viabilité cellulaire en-dessous du seuil calculé en fonction du témoin négatif. D'après les normes NF-EN-ISO 10993-12, l'activité métabolique et la viabilité cellulaire des hBSMCs étant toujours supérieures à 70%, la DL-ACM peut être considérée comme non cytotoxique (fig. 12).

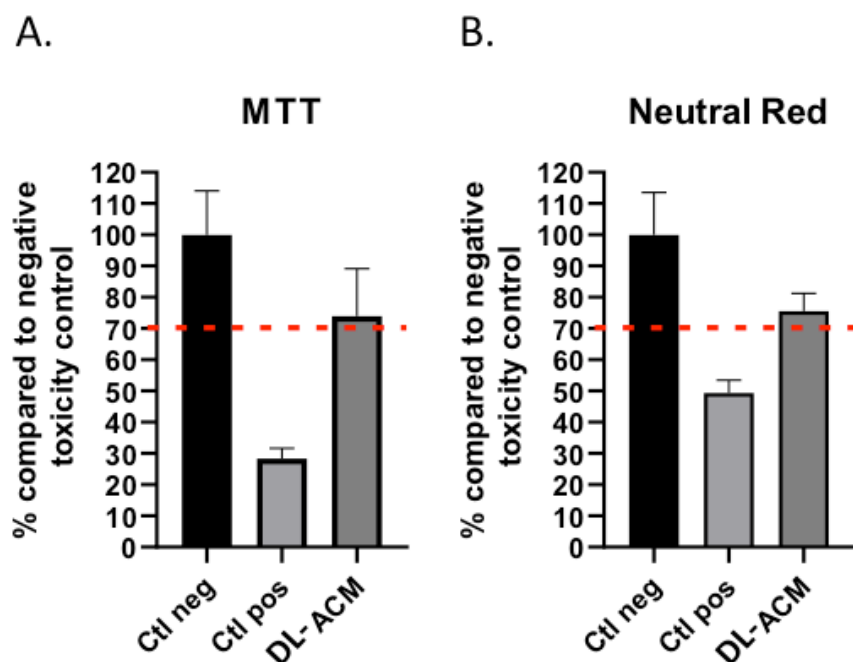


Figure 12 : Cytotoxicité *in vitro* des extraits solubles de la DL-ACM sur les cellules souches de moelle osseuse humaine (hBMSCs).

(A) Test au MTT. Activité métabolique relative exprimée en pourcentage du témoin négatif (n = 6). (B) Test au rouge neutre. Viabilité cellulaire relative exprimée en pourcentage du témoin négatif (n = 6).

D. Biocompatibilité *in vivo*

Tous les implants ont pu être suturés au tissu sous-cutané des rats pendant la chirurgie (fig. 13). Cependant, la DL-ACM était bien plus facile à manipuler et à suturer que la DL-MAH. Elle était bien plus épaisse, plus rigide, plus résistante à la déchirure et ne se pliait pas contrairement à la DL-MAH. Un dédoublement partiel entre l'amnion et le chorion a été observé sur quelques échantillons de DL-ACM, qui se réduisait à l'hydratation. L'hydratation réduisait l'épaisseur et l'opacité de la DL-ACM mais sa manipulation n'en devenait pas plus délicate. L'hydratation réduisait l'épaisseur de la DL-MAH qui se pliait et devenait très

délicate à manipuler. Les autres résultats restent en attente au jour de la rédaction de ce mémoire.

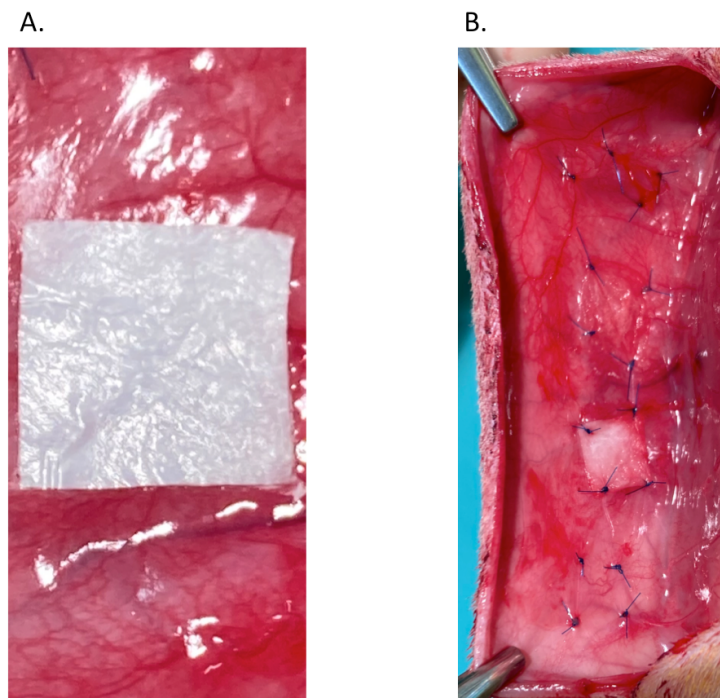


Figure 13 : Chirurgie d'implantation sous-cutanée chez le rat.

(A) Apposition de la DL-ACM sèche sur le tissu sous-cutané de rat.

(B) Disposition finale de la DL-MAH, DL-ACM, Bio-Gide (Geistlich Bio-Gide®) et contrôle négatif après hydratation.

E. Propriétés ostéogéniques et angiogéniques *in vivo*

Tous les implants ont pu être placés sur les défauts osseux fémoraux des rats (fig.14). Comme pour l'implantation sous-cutanée, la DL-ACM était bien plus facile à manipuler et à suturer que la DL-MAH pour les mêmes raisons. Le positionnement de la DL-ACM et la garantie du recouvrement total du défaut osseux étaient bien plus facilités avec la DL-ACM qu'avec la DL-MAH.

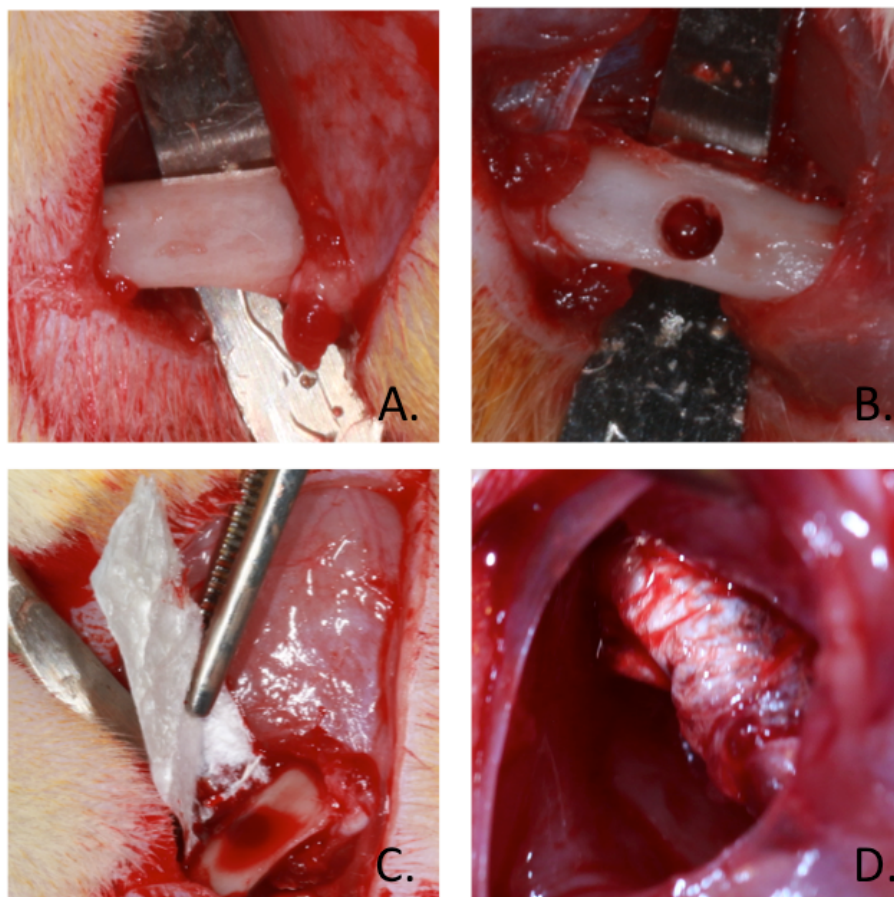


Figure 14 : Chirurgie d'implantation de la DL-ACM sur un défaut osseux non-cortical de la diaphyse fémorale chez le rat.

- (A) Exposition de la diaphyse fémorale après dissection musculaire.
- (B) Réalisation d'un défaut osseux uni-cortical circulaire de 2,1 mm de diamètre.
- (C) Mise en place de la DL-ACM sèche.
- (D) Recouvrement du défaut osseux par la DL-ACM.

IV. Discussion

Ce projet de recherche porte sur le développement d'un nouveau matériau décellularisé constitué de membranes placentaires pour une application en régénération osseuse. Ce mémoire rapporte la première partie de ce projet consacrée au développement et à la caractérisation de ce matériau. La seconde partie de ce travail va consister à étudier les propriétés de ce matériau *in vivo* pour une application en régénération osseuse et les comparer à celles de la MAH. La réaction inflammatoire sera évaluée histologiquement conformément à la norme NF-EN-ISO10993-6. Les propriétés ostéogéniques et

angiogéniques seront analysées radiologiquement par microtomographie et histologiquement par coloration au trichrome de Masson et coloration HES.

Les membranes placentaires constituent une source de tissu humain facilement disponible. Les allogreffes placentaires ont d'abord été utilisées pour le traitement des plaies cutanées dès les années 1910 par Davis (23) puis en chirurgie ophtalmique (24). Une application de l'ACM dans la guérison d'ulcères veineux et d'ulcères diabétiques a été évaluée par des essais randomisés qui ont montré son efficacité (31,32). Plus récemment, l'ACM a été utilisée comme thérapie alternative ou complémentaire dans le traitement des lésions tissulaires orthopédiques telles que la fasciite plantaire, la tendinopathie et les procédures de fusion vertébrale (33). L'ACM présentent des facteurs de croissances qui paraissent désormais être également favorables à leur utilisation pour la régénération osseuse. Ces facteurs de croissance interviennent dans la régulation de l'ostéogenèse, le chorion semblant jouer un rôle plus important que l'amnion (34,35). Kakabdze *et al.* ont montré que l'utilisation des ACM améliorerait l'ostéointégration en protégeant le greffon de l'invasion du tissu fibreux dans la reconstruction de défauts osseux mandibulaires (36). Une étude a observé une amélioration de la qualité osseuse, avec de meilleures caractéristiques histologiques et morphologiques, qui a été expliquée par la préservation de la bioactivité de l'ACM. De plus, cette étude a mis en évidence un renouvellement osseux plus rapide avec une quantité plus importante d'os et une réduction du biomatériau de comblement sur les sites traités avec l'ACM (37). La capacité de recrutement des cellules progénitrices par la membrane amniotique associée au chorion a été décrite dans la promotion de la différenciation ostéogénique et la régénération des défauts de furcation (38). Fien *et al.* proposent également d'associer l'ACM à une membrane collagénique à résorption lente pour optimiser la régénération osseuse guidée avec pose implantaire simultanée (39). Plus récemment, des rapports de cas ont illustré l'efficacité de l'ACM dans la régénération osseuse guidée pré-implantaire (40,41) notamment dans le cas des plaies laissées ouvertes pour la régénération de défauts osseux horizontaux de 2 à 3 mm (42) ainsi que dans la régénération osseuse guidée pour le traitement des péri-implantites (43). Le chorion présente en effet des propriétés anti-bactériennes supérieures à la MAH, ce qui améliorerait encore la résistance à l'infection en cas d'exposition de la membrane au sein de la cavité buccale (28). A notre connaissance, une seule membrane amnio-chorionique humaine a été commercialisée (BioXclude®, Snoasis Medical). Elle est accessible aux Etats-Unis et au Canada et a été développée pour une application en chirurgie orale et en parodontologie. Il s'agit d'une membrane amnio-chorionique désépithélialisée et déshydratée.

Nous proposons dans notre projet de recherche une autre méthode de préservation de l'ACM reposant sur une décellularisation complète de cette membrane pour une application à la régénération osseuse.

La méthode de préservation de l'ACM a été développée et adaptée à partir de celle décrite précédemment pour la MAH (25). Cette méthode a été validée après de nombreux tests qui ont conduit à augmenter le temps d'exposition à la solution de décellularisation. Cette augmentation du temps d'exposition à la solution de décellularisation par rapport à la méthode décrite pour la MAH peut s'expliquer par l'épaisseur rajoutée du chorion, trois à quatre fois supérieure à celle de la MAH. Elle comprend une première étape de décellularisation réalisée directement sur l'ACM par exposition à des agents chimiques et enzymatiques, sans action mécanique, pendant une durée de 24h suivie d'un rinçage sur la nuit. L'ACM décellularisée était ensuite lyophilisée avant une stérilisation par rayonnement gamma à 25 kGy. D'autres méthodes de préservation de l'ACM ont été retrouvées dans la littérature. Le processus Purion® est un traitement de l'ACM par désépithélialisation puis déshydratation qui a été décrit pour la membrane BioXclude (37,38,44–50). L'Amnion était désépithélialisée et stratifié sur du chorion, la membrane formée était alors déshydratée. Les membranes étaient stérilisées par rayonnement gamma ou irradiées par faisceau d'électrons à une dose d'environ 17,5 kGy. Kakabadze *et al.* décrivent une méthode de préservation similaire à la notre reposant sur une décellularisation de l'ACM, lyophilisation et stérilisation par rayonnement gamma à 15kGy (36,51). Leur protocole de décellularisation repose sur une exposition à des agents chimiques sans action mécanique et est réalisé sur la totalité du placenta par un système de cathéters insérés dans l'artère et la veine ombilicale du placenta. L'ACM est ensuite découpée à partir du placenta décellularisé avant d'être lyophilisée et stérilisée. Leur processus de décellularisation est chronophage puisqu'il s'étend sur une durée plus de trois fois supérieure à celle nécessaire dans le protocole que nous avons mis en place (51,52).

Dans notre projet, l'effectivité du processus de décellularisation a été évalué selon des critères de validation précédemment établis (29). Les résultats de la quantification d'ADN étaient exprimés en fonction de la masse des échantillons secs conformément à ces critères. Les valeurs d'ADN résiduel de la DL-ACM étaient légèrement au-dessus des seuils définis par ces critères. Cependant, la coloration au DAPI de la DL-ACM ne retrouvait plus de matériel nucléaire résiduel. Ce résultat a été confirmé par l'électrophorèse sur gel d'agarose de la DL-

ACM qui ne révélait aucun ADN résiduel. L'ensemble de ces résultats était en faveur d'une décellularisation suffisante afin d'éviter une réponse adverse de l'hôte. Un support pour tendre l'ACM et améliorer son exposition à la solution de décellularisation a été mis en place mais les résultats obtenus étaient similaires. Kakabadze *et al.* ont évalué l'effectivité de leur processus de décellularisation par une quantification d'ADN seule (36,51). Le résultat de la quantification d'ADN de l'ACM décellularisée était exprimé en pourcentage de l'ADN de la membrane non décellularisée et ne tenait pas compte des critères de validation de décellularisation établis par Crapo *et al.* (29).

Les résultats de la cytotoxicité *in vitro* ont montré l'absence de cytotoxicité de la DL-ACM. Les valeurs obtenues étaient proches du seuil de cytotoxicité. Ces valeurs ne sont pas en adéquation avec celles obtenues pour la MAH qui retrouvaient des valeurs bien éloignées du seuil de cytotoxicité (25). Les paramètres modifiés dans l'adaptation de la méthode de préservation décrite pour la MAH peuvent être à l'origine de cet écart. Le processus de décellularisation de l'ACM a nécessité d'allonger le temps d'exposition des échantillons à la solution de décellularisation de plus de trois fois celui décrit pour la MAH. Une augmentation du nombre de rinçage par rapport au protocole décrit pour la MAH pourrait ainsi contribuer à rapprocher les valeurs de cytotoxicité de la DL-ACM de celles du témoin négatif.

Dans notre projet, les membranes étaient utilisées sèches après déballage de leur sachet stérile. Kakabadze *et al.* décrivent une réhydratation en solution saline à 0,9% 30 minutes avant son utilisation. Nous avons observé que l'hydratation de la DL-ACM la rendait plus difficile à manipuler. A la sortie du sachet stérile, la DL-ACM présentait une épaisseur significativement supérieure à celle de la MAH et de la membrane Bio-Gide (Geistlich Bio-Gide®). Cette épaisseur permet d'améliorer fortement la manipulation de la DL-ACM en comparaison avec la MAH et réduit l'effet électrostatique observé dans la manipulation de la MAH seule. Pour caractériser plus en détails les propriétés mécaniques de la DL-ACM, une mesure plus précise de l'épaisseur de la membrane à l'aide d'un capteur laser (Aeroel®, XLS 13XY XACTUM™) ainsi que l'évaluation de la résistance à la suture de la membrane, comparées à la MAH, sont prévues.

Enfin, la face de la DL-ACM appliquée contre le défaut était la face chorionique dans notre projet. Les autres études ne précisaient pas ce paramètre mais certains auteurs ont apporté des réponses complémentaires par mail. La face appliquée contre le défaut n'étaient pas prise en compte pour certaines études (37,46,48) tandis qu'un auteur répond avoir respecter

l'application de la face chorionique sur le défaut (50). Notre choix d'orientation de la membrane s'est appuyé sur les propriétés respectives de l'amnion et du chorion. En effet, le chorion présente plusieurs facteurs de croissance en quantité plus importante que l'amnion et semble être plus impliqué que l'amnion dans la régulation de l'ostéogenèse (34,35). De plus, il a été montré que la MAH peut faciliter la migration des cellules épithéliales, renforcer l'adhésion des cellules basales, promouvoir la différenciation épithéliale, prévenir l'apoptose épithéliale et favoriser l'épithélialisation dans la cicatrisation des plaies (53).

Des limites ont été observées dans la manipulation de la DL-ACM. Quelques échantillons présentaient en effet un dédoublement partiel entre l'amnion et le chorion qui se réduisait avec la réhydratation *in vivo*. Des étapes dans la méthode de préservation de l'ACM peuvent être à l'origine de ce dédoublement. La découpe initiale des échantillons d'ACM depuis le placenta lors du recueil des échantillons peut engendrer un dédoublement des deux feuillets expliqué par la difficulté de la découpe à l'état frais. Ce dédoublement s'initie en périphérie de l'échantillon et peut se majorer lors de l'agitation mise en place par la méthode de décellularisation. Une recoupe périphérique de l'ACM cryopréservée avant la decellularisation a amélioré la qualité de la coupe et diminué les dédoublements observés ultérieurement lors de la manipulation de la DL-ACM.

Cette étude a permis de développer une nouvelle méthode de préservation de l'ACM simple et reproductible. L'ACM décellularisée est non cytotoxique. Elle est significativement plus épaisse que la MAH ce qui améliore sa manipulation lors de son implantation. La deuxième partie de ce travail va consister à étudier les propriétés de ce matériau *in vivo* pour une application en régénération osseuse et les comparer à celles de la MAH. Enfin, à l'issue de cette étude, les propriétés ostéogéniques *in vivo* de la membrane amnio-chorionique et de la membrane induite seront comparées dans un modèle de défauts osseux segmentaires chez le rat dans le cadre d'une thèse d'université. Si les résultats sont satisfaisants, l'approche pourra être adaptée à la reconstruction mandibulaire chez le gros animal puis chez l'homme.

V. Bibliographie

1. Yang W, Zhao S, Liu F, Sun M. Health-related quality of life after mandibular resection for oral cancer: Reconstruction with free fibula flap. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014 Jul;19(4):e414–8.
2. Warshavsky A, Fliss DM, Frenkel G, Kupersmidt A, Moav N, Rosen R, et al. Long-term health-related quality of life after mandibular resection and reconstruction. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. 2019 May;276(5):1501–8.
3. Paré A, Bossard A, Laure B, Weiss P, Gauthier O, Corre P. Reconstruction of segmental mandibular defects: Current procedures and perspectives. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2019;4(6):587–96.
4. Gu Y, Ma H, Shujaat S, Orhan K, Coucke W, Amoli MS, et al. Donor- and recipient-site morbidity of vascularized fibular and iliac flaps for mandibular reconstruction: A systematic review and meta-analysis. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS*. 2021 Jul;74(7):1470–9.
5. Ma H, Van Dessel J, Shujaat S, Bila M, Gu Y, Sun Y, et al. Long-term functional outcomes of vascularized fibular and iliac flap for mandibular reconstruction: A systematic review and meta-analysis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2020 Nov 10;74.
6. Rubin SJ, Sayre KS, Kovatch KJ, Ali SA, Hanks JE. Segmental mandibular reconstruction in patients with poor lower extremity perfusion, vessel-depleted necks and/or profound medical frailty. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2021 Oct 1;29(5):407–18.
7. Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop Clin North Am*. 2010 Jan;41(1):27–37; table of contents.
8. Zwetyenga N, Catros S, Emparanza A, Deminiere C, Siberchicot F, Fricain JC. Mandibular reconstruction using induced membranes with autologous cancellous bone graft and HA-betaTCP: animal model study and preliminary results in patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Dec;38(12):1289–97.
9. Zwetyenga N, Fricain JC, De Mones E, Gindraux F. Technique des membranes induites en chirurgie maxillo-faciale. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2012 Sep;113(4):231–8.
10. Waligora B, Neilson JC, Brookes C. Induced Membranes for Segmental Mandibular Reconstruction: Case Series and Technique Review. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2021 Aug;79(8):1751–9.
11. Yüceer-Çetiner E, Özkan N, Önger ME, Gülbahar MY, Keskin M. Is induced membrane technique effective in reconstruction of mandibular segmental bone defects? An experimental study. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg*. 2021 Dec;49(12):1130–40.
12. Morelli I, Drago L, George DA, Gallazzi E, Scarponi S, Romanò CL. Masquelet technique: myth or reality? A systematic review and meta-analysis. *Injury*. 2016 Dec 1;47:S68–76.
13. Henslee AM, Spicer PP, Shah SR, Tatara AM, Kasper FK, Mikos AG, et al. Use of porous space maintainers in staged mandibular reconstruction. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am*. 2014 May;26(2):143–9.
14. Catros S, Zwetyenga N, Bareille R, Brouillaud B, Renard M, Amédée J, et al. Subcutaneous-induced membranes have no osteoinductive effect on macroporous HA-TCP in vivo. *J Orthop Res*. 2009;27(2):155–61.
15. Kumar A, Chandra RV, Reddy AA, Reddy BH, Reddy C, Naveen A. Evaluation of clinical, antiinflammatory and antiinfective properties of amniotic membrane used for guided tissue regeneration: A randomized controlled trial. *Dent Res J*. 2015 Apr;12(2):127–35.

16. Ricci E, Vanosi G, Lindenmair A, Hennerbichler S, Peterbauer-Scherb A, Wolbank S, et al. Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model. *Cell Tissue Bank*. 2013 Sep;14(3):475–88.
17. Kang NH, Hwang KA, Kim SU, Kim YB, Hyun SH, Jeung EB, et al. Potential antitumor therapeutic strategies of human amniotic membrane and amniotic fluid-derived stem cells. *Cancer Gene Ther*. 2012 Aug;19(8):517–22.
18. Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H, Abolghasemi H. Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. *Cytotherapy*. 2014 Jan;16(1):33–40.
19. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Jun;42(7):1539–46.
20. Gindraux F, Rondot T, de Billy B, Zwetyenga N, Fricain JC, Pagnon A, et al. Similarities between induced membrane and amniotic membrane: Novelty for bone repair. *Placenta*. 2017 Nov;59:116–23.
21. Koob TJ, Lim JJ, Zabek N, Massee M. Cytokines in single layer amnion allografts compared to multilayer amnion/chorion allografts for wound healing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015 Jul;103(5):1133–40.
22. Ghanmi S, Trigui M, Baya W, Ellouz Z, Elfeki A, Charfi S, et al. The periosteum-like effect of fresh human amniotic membrane on bone regeneration in a rabbit critical-sized defect model. *Bone*. 2018 May;110:392–404.
23. Davis JS. II. Skin Grafting at the Johns Hopkins Hospital. *Ann Surg*. 1909 Sep;50(3):542–9.
24. de ROTTH A. PLASTIC REPAIR OF CONJUNCTIVAL DEFECTS WITH FETAL MEMBRANES. *Arch Ophthalmol*. 1940 Mar 1;23(3):522–5.
25. Fenelon M, B Maurel D, Siadous R, Gremare A, Delmond S, Durand M, et al. Comparison of the impact of preservation methods on amniotic membrane properties for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C*. 2019 Nov;104:109903.
26. Assessment of fresh and preserved amniotic membrane for guided bone regeneration in mice.pdf.
27. Fenelon M, Etchebarne M, Siadous R, Grémare A, Durand M, Sentilhes L, et al. Comparison of amniotic membrane versus the induced membrane for bone regeneration in long bone segmental defects using calcium phosphate cement loaded with BMP-2. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021 May;124:112032.
28. Zare-Bidaki M, Sadrinia S, Erfani S, Afkar E, Ghanbarzade N. Antimicrobial Properties of Amniotic and Chorionic Membranes: A Comparative Study of Two Human Fetal Sacs. *J Reprod Infertil*. 2017 Jun;18(2):218–24.
29. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(12):3233–43.
30. Vilamitjana-Amedee J, Bareille R, Rouais F, Caplan AI, Harmand MF. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *Vitro Cell Dev Biol - Anim*. 1993 Sep;29(9):699–707.
31. Zelen CM, Serena TE, Snyder RJ. A prospective, randomised comparative study of weekly versus biweekly application of dehydrated human amnion/chorion membrane allograft in the management of diabetic foot ulcers. *Int Wound J*. 2014 Apr;11(2):122–8.
32. Serena TE, Carter MJ, Le LT, Sabo MJ, DiMarco DT, EpiFix VLU Study Group. A multicenter, randomized, controlled clinical trial evaluating the use of dehydrated human amnion/chorion membrane allografts and multilayer compression therapy vs. multilayer compression therapy alone in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2014 Dec;22(6):688–93.

33. Lei J, Priddy L, Lim J, Koob T. Dehydrated Human Amnion/Chorion Membrane (dHACM) Allografts as a Therapy for Orthopedic Tissue Repair. *Tech Orthop*. 2017 May 19;32.
34. Go YY, Kim SE, Cho GJ, Chae SW, Song JJ. Differential effects of amnion and chorion membrane extracts on osteoblast-like cells due to the different growth factor composition of the extracts. *PLOS ONE*. 2017 Aug 10;12(8):e0182716.
35. Go YY, Kim SE, Cho GJ, Chae SW, Song JJ. Promotion of osteogenic differentiation by amnion/chorion membrane extracts. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2016 May 18;14(2):e171-180.
36. Kakabadze A, Mardaleishvili K, Loladze G, Karalashvili L, Chutkerashvili G, Chakhunashvili D, et al. Reconstruction of mandibular defects with autogenous bone and decellularized bovine bone grafts with freeze-dried bone marrow stem cell paracrine factors. *Oncol Lett*. 2017 Mar;13(3):1811–8.
37. Hassan M, Prakasam S, Bain C, Ghoneima A, Liu SSY. A Randomized Split-Mouth Clinical Trial on Effectiveness of Amnion-Chorion Membranes in Alveolar Ridge Preservation: A Clinical, Radiologic, and Morphometric Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017 Dec;32(6):1389–98.
38. Taalab MR, Gamal RM. The Effect of Amniotic Chorion Membrane on Tissue Biotype, Wound Healing and Periodontal Regeneration. :9.
39. Fien MJ, Puterman I, Mesquida J, Fitó FL, Bauza G. Use of a Sugar-Crosslinked Collagen Membrane in Conjunction With a Dehydrated Amnion/Chorion Membrane for Guided Bone Regeneration Around Immediate Implants. *Compend Contin Educ Dent Jamesburg NJ 1995*. 2022 May;43(5):E1–4.
40. The Use of a Dehydrated, Deepithelialized Amnion-Chorion Membrane in Guided Bone Regeneration Involving Staged Implant Placement: Case Series with a 5-Year Follow-up - PubMed [Internet]. [cited 2022 May 27]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34547066/>
41. Bhide VM, Tenenbaum HC. Horizontal Guided Bone Regeneration Using a Dehydrated Amnion/Chorion Membrane: A Case Report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2021 Jun;41(3):375–81.
42. Yu SH, Oh TJ, Wang HL, Chan HL. Amnion-Chorion Membrane in Open-Wound Approach for Localized Horizontal Ridge Augmentation: A Case Series Report. *Clin Adv Periodontics*. 2020 Dec 31;
43. Bhide VM, Goldberg MB, Tenenbaum HC. Surgical Treatment of Peri-implantitis with Guided Bone Regeneration Using Dehydrated Amnion-Chorion Membranes: A Case Report with a 2-Year Follow-up. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2022 Jun;42(3):e59–66.
44. Holtzclaw D. Maxillary Sinus Membrane Repair With Amnion-Chorion Barriers: A Retrospective Case Series. *J Periodontol*. 2015 Aug;86(8):936–40.
45. De Angelis N, Kassim ZH, Frosecchi M, Signore A. Expansion of the Zone of Keratinized Tissue for Healthy Implant Abutment Interface Using De-epithelialized Amnion/Chorion Allograft. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2019 Jun;39(3):e83–8.
46. Cullum D, Lucas M. Minimally Invasive Extraction Site Management With Dehydrated Amnion/Chorion Membrane (dHACM): Open-Socket Grafting. *Compend Contin Educ Dent Jamesburg NJ 1995*. 2019 Mar;40(3):178–83.
47. Holtzclaw DJ, Toscano NJ. Amnion–Chorion Allograft Barrier Used for Guided Tissue Regeneration Treatment of Periodontal Intrabony Defects: A Retrospective Observational Report. *Clin Adv Periodontics*. 2013;3(3):131–7.
48. Consecutive Case Series Using a Composite Allograft Containing Mesenchymal Cells with an Amnion-Chorion Barrier to Treat Mandibular Class III/IV Furcations [Internet]. [cited 2022 May 20]. Available from:

http://www.quintpub.com/journals/prd/abstract.php?article_id=15425#.YofUTBBBxQI

49. Nevins M, Aimetti M, Parma-Benfenati S, De Angelis N, Yu YH, Kim DM. Treatment of Moderate to Severe Buccal Gingival Recession Defects with Placental Allografts. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2016 Apr;36(2):171–7.
50. Temraz A, Ghallab NA, Hamdy R, El-Dahab OA. Clinical and radiographic evaluation of amnion chorion membrane and demineralized bone matrix putty allograft for management of periodontal intrabony defects: a randomized clinical trial. *Cell Tissue Bank*. 2019 Mar;20(1):117–28.
51. Kakabadze Z, Mardaleishvili K, Loladze G, Javakhishvili I, Chakhunasvili K, Karalashvili L, et al. Clinical application of decellularized and lyophilized human amnion/chorion membrane grafts for closing post-laryngectomy pharyngocutaneous fistulas: Clinical Application of Human Amniotic Graft. *J Surg Oncol*. 2016 Apr;113(5):538–43.
52. Protocole original decell Kaka HAM.pdf.
53. ijsr DMPR Dr Nidhi Mehrotra, International Journal of Science and Research (IJSR). Abstract of Human Amniotic Membrane: Hope in Periodontal Regen. *Int J Sci Res IJSR* [Internet]. [cited 2022 May 28]; Available from: <https://www.ijsr.net/>

Développement d'une membrane amnio-chorionique humaine comme alternative à la membrane induite pour la régénération osseuse.

Présenté et soutenu par Paul Galvez.

Introduction: Des études ont précédemment montré que la membrane induite présentait des limites liées à son absence de pouvoir ostéoinducteur ainsi qu'à la nécessité d'un deuxième temps opératoire. En raison de leurs propriétés biologiques et de leur faible immunogénicité, les membranes placentaires (les membranes amniotiques et chorioniques) sont largement utilisées comme matériaux biologiques dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. L'intérêt de la membrane amniotique humaine (MAH) dans la régénération des défauts osseux critiques et non critiques a déjà été rapporté. Cependant, certaines limites ont été observées en raison de la finesse de la MAH qui la rend difficile à manipuler. Dans ce projet, nous avons proposé d'associer le chorion à la MAH car le chorion est trois à quatre fois plus épais que la MAH et contient des facteurs de croissance en plus grande quantité, ce qui peut optimiser les propriétés de la membrane pour les applications en ingénierie tissulaire osseuse. L'hypothèse de ce projet est donc que la membrane amnio-chorionique (ACM) pourrait remplacer avantageusement la membrane induite pour traiter les défauts osseux segmentaires. L'objectif de cette étude était de développer une nouvelle méthode de préservation de la membrane amnio-chorionique en vue de son utilisation pour la régénération osseuse.

Matériels et méthodes: Des placentas ont été récupérés après césarienne (n=10) et l'ACM a été découpée du placenta. L'ACM a été décellularisée en adaptant une méthode précédemment établie (méthode enzymatique suivie d'une méthode de décellularisation par détergent), puis elle a été lyophilisée et stérilisée aux rayons gamma (DL-ACM). L'efficacité du processus de décellularisation a été évaluée par coloration au DAPI, extraction et quantification de l'ADN, et séparation par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ACM a également été caractérisée par analyse histologique (coloration HES) et par microscopie électronique à balayage. Son épaisseur a également été mesurée. La cytotoxicité indirecte de l'ACM a été étudiée *in vitro* sur des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine. La DL-ACM a été implantée dans un modèle sous-cutané de rat afin d'évaluer sa biocompatibilité *in vivo*. Les rats ont été sacrifiés une semaine, un mois et deux mois après la chirurgie (n= 6 par condition et par temps). Enfin, la DL-ACM et la MAH ont été implantées *in vivo* dans des défauts osseux non critiques de fémurs de rats afin de comparer leurs propriétés ostéogéniques et angiogéniques 1 semaine et 2 semaines après la chirurgie (n= 6 par condition et par temps).

Résultats: L'efficacité du processus de décellularisation a été validée par l'extraction d'ADN et confirmée par la séparation par électrophorèse sur gel d'agarose ainsi que par une coloration HES et DAPI objectivant l'absence de matériel nucléaire résiduel. L'épaisseur de la DL-ACM était significativement augmentée par rapport à la MAH. *In vitro*, la méthode de préservation n'a conféré aucune cytotoxicité indirecte. *In vivo*, la DL-ACM était plus facile à manipuler que la MAH. L'évaluation de sa biocompatibilité selon la norme NF-EN-ISO10993-6 et de la réparation osseuse en présence de la DL-ACM sont en cours d'analyse.

Conclusion: Cette étude a permis de développer et caractériser une nouvelle membrane amnio-chorionique dont la méthode de préservation est simple et reproductible. Ce projet constitue une première étape de validation de l'ACM dans un modèle de défauts osseux simple et reproductible. La suite du projet visera à comparer l'ACM et la membrane induite dans un modèle de défauts osseux segmentaires chez le rat puis chez le gros animal.