

Comparaison de la porosité 3D de biomatériaux

Les granules de biomatériaux de comblement réalisent des empilements 3D poreux. Étude de leur micro-architecture et de leur composition moléculaire.

INTRODUCTION

L'utilisation de granules de biomatériaux pour le comblement de défauts osseux est une solution utilisée quotidiennement en chirurgie maxillo-faciale et odontologique. Leurs principales indications sont représentées par les soulèvements de sinus (*greffes du bas-fond sinusien-sinus lift*) (77%), les reconstructions alvéolaires et la chirurgie d'addition mandibulaire (14%), les ostéotomies de **Le Fort** (3%), les kystes osseux (3%) ou la préservation des crêtes alvéolaires (3%) [Guillaume 2017]. L'utilisation des granules est peu répandue dans la pratique orthopédique qui utilise plutôt des modèles tridimensionnels stables sous forme de blocs. En effet, il faut que le biomatériau puisse s'adapter à des cavités intra-osseuses très anfractueuses et aux contours variables. La forme « granule » permet, quel que soit le biomatériau utilisé, une mise en place en site lésionnel et le comblement est

assuré par un tassement doux avec un fouloir ; (Fig.1). De nombreux biomatériaux sont fournis sous forme granulaire par différents industriels. Il peut s'agir de matériaux d'origine naturelle (*c'est-à-dire os allo ou xénogénique*) ou de céramiques phosphocalciques dont l'emploi tend à se généraliser de plus en plus à l'heure actuelle car elles permettent de s'affranchir totalement des risques infectieux non conventionnels.

Le chirurgien doit bien prendre en compte le fait que les granules tassés réalisent ainsi un échafaudage tridimensionnel (« *scaffold* » en anglais) qui va occuper le site greffé. Il est établi que la géométrie des biomatériaux est un paramètre critique favorisant la pénétration des bourgeons conjonctivo-vasculaires et donc la formation osseuse. Si la micro-architecture des céramiques synthétiques sous forme de blocs a



les auteurs

Baptiste ARBEZ

- Ingénieur Polytech (Nantes)
- Préparation d'une thèse de doctorat d'université au laboratoire *Gerom* sur les biomatériaux



Dr Jean-Daniel KUN-DARBOIS

- Chirurgien maxillo-facial, chef de clinique au CHU d'Angers
- Thèse d'exercice et thèse de doctorat d'université au laboratoire *Gerom* sur le remodelage osseux en pathologie maxillo-faciale



Pr Daniel CHAPPARD

- Doctorats d'État en médecine (1979) et ès sciences en génie biologique et médical (1992)
- Professeur des universités et praticien hospitalier (CHU et faculté de médecine d'Angers)
- Directeur de l'unité *Inserm u922* (2003-2012) puis de l'unité de recherche *Gerom*, groupe d'études sur le remodelage osseux et les biomatériaux (depuis 2012). Directeur du *LabCom NextBone ANR*
- Co-organisateur du diplôme d'université Tissus calcifiés et implantologie dentaire
- Expert auprès des ministères de la recherche autrichien, belge et roumain.
- 498 publications (299 indexées sur PubMed h-index = 52).
- Ouvrages : *L'ostéoporose, mieux la connaître pour mieux la traiter* (Wolters Kluwer, 2009), *Tissu osseux et biomatériaux en chirurgie dentaire* (Quintessence, 2014).



Dr Bernard GUILLAUME

- Doctorat d'État en médecine (CHU Saint-Antoine à Paris - 1981)
- CES en stomatologie et chirurgie maxillo-faciale (1983)
- Assistant hospitalier en stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
- Qualifié en chirurgie maxillo-faciale (1985)
- DU : Biomatériaux tissus calcifiés et implantologie dentaire, faculté de médecine d'Angers (1998)
- Membre de l'unité de recherche *Gerom*, groupe d'études sur le remodelage osseux et les biomatériaux, faculté de médecine (Angers - 2000)
- Président fondateur du Collège français d'implantologie
- Co-organisateur du DU : Tissus calcifiés et implantologie dentaire
- Expert près la cour d'appel de Paris, de la cour administrative d'appel de Paris et Versailles
- Médecin stomatologue agréé à l'Unesco
- Expert à l'Agence française de lutte contre le dopage et auprès de l'AFSSASP
- Auteur de 50 publications et de 2 ouvrages : *Les implants dentaires* (Elsevier, 2011), *Tissu osseux et biomatériaux en chirurgie dentaire* (Quintessence, 2014)



Fig.1 : Comblement d'une cavité (créée lors d'une transposition du nerf alvéolaire inférieur) par des granules d'un biomatériau poreux, ici TCP Dental HP. Les granules ont été délicatement foulés de façon à ne pas altérer leur forme.

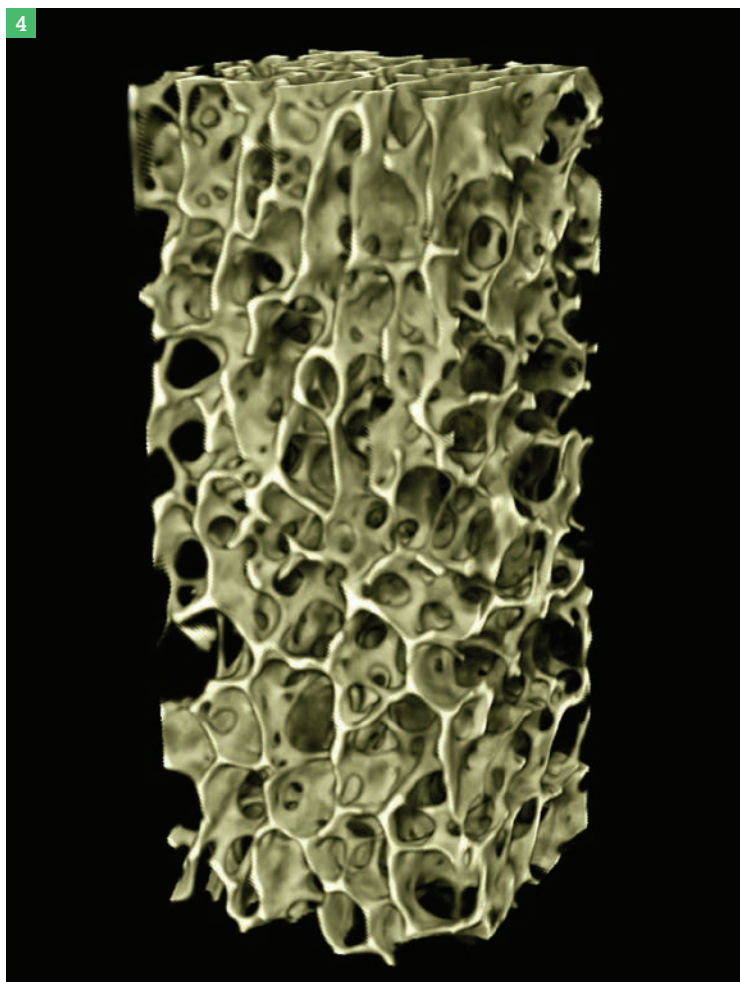
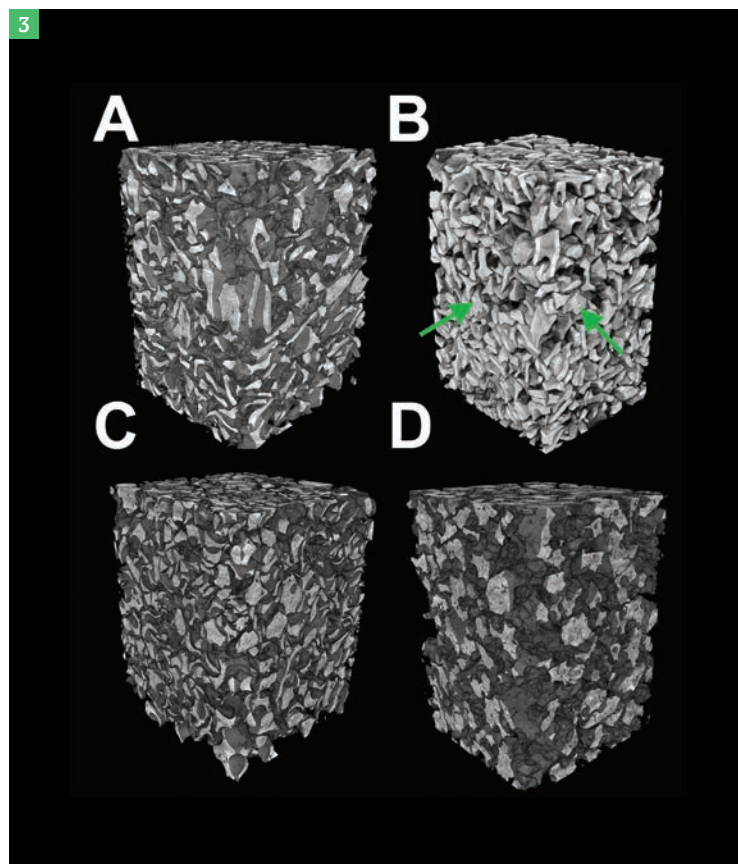
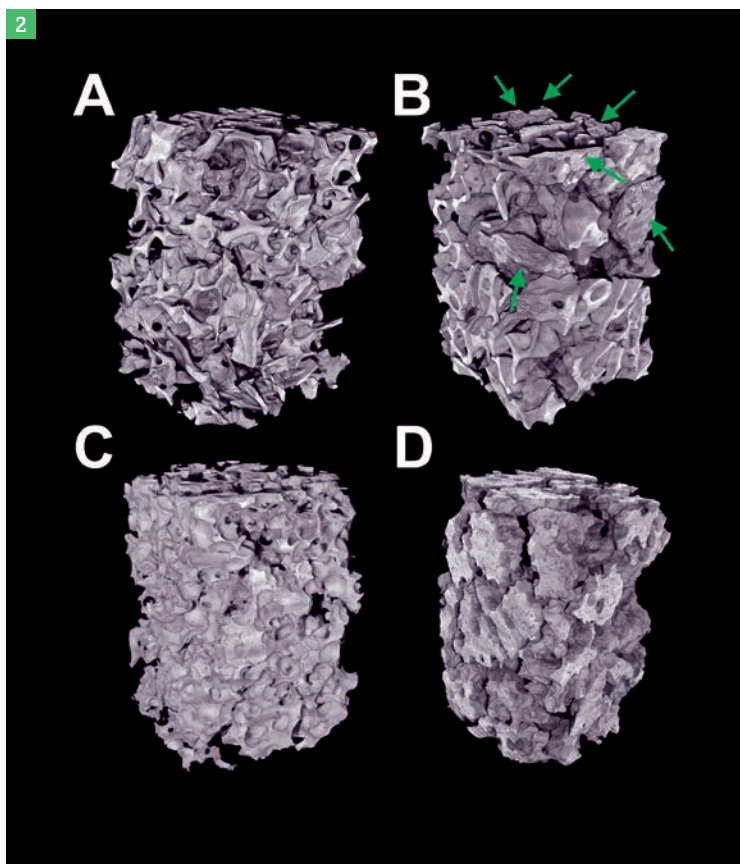


Fig.2 : Analyse en microtomographie d'empilements de granules de grande taille 1 000-2 000 µm à l'intérieur d'un tube à essai. A) CopiOs ; B) Bio-Oss ; C) TCP Dental HP ; D) TCH (mélange de 25 % de β -TCP et de 75 % d'hydroxyapatite). En B), les flèches vertes pointent sur des fragments de tissu osseux cortical de structure plus massive et comportant des ostéons bien visibles. Fig.3 : Analyse en microtomographie d'empilements de granules de petite taille 250-1 000 µm à l'intérieur d'un tube à essai. A) CopiOs ; B) Bio-Oss ; C) TCP Dental HP ; D) TCH (mélange de 25 % de β -TCP et de 75 % d'hydroxyapatite). En B), les flèches vertes pointent sur des fragments de tissu osseux cortical de structure plus massive et comportant des ostéons bien visibles. Notez que dans tous les cas la porosité générale est notablement réduite avec l'utilisation de ces granules de faible taille. Fig.4 : Aspect en microtomographie d'os humain jeune ; notez l'agencement 3D des travées osseuses et la porosité interconnectée.

fait l'objet de nombreuses études [Bose et coll., 2012, Seitz et coll., 2005], il n'est pas de même de la disposition dans l'espace des empilements de granules. Pourtant, un même biomatériau présent sous des formes variées peut induire des réactions totalement différentes. Par exemple, des pointes ou des aspérités en surface peuvent créer des lésions d'irritation aboutissant à une inflammation localisée mais chronique [Anderson 2001]. Un autre facteur important à prendre en compte dans la biocompatibilité des matériaux est leur composition chimique qui influence de nombreuses propriétés comme l'adhérence cellulaire, l'absence de cytotoxicité et d'inflammation [Sabetrsekh et coll., 2010]. La libération de substances pro-inflammatoires à partir de protéines

ou de lipides altérés (*endo-toxines*) doit aussi être recherchée par des tests précliniques et éliminée dans les procédés de fabrication industrielle [Anderson et coll., 2008, Sabetrsekh, Tiainen, Reseland, Will, Ellingsen, Lyngstadaas and Haugen 2010].

Nous avons analysé par différentes techniques la microarchitecture 3D de plusieurs biomatériaux granulaires utilisables en chirurgie maxillo-faciale. Nous avons aussi recherché leur composition par une analyse en microspectrométrie Raman (méthode qui analyse les spectres de vibration produits par les molécules excitées par faisceau laser). Enfin, pour chaque biomatériau, nous avons recherché les paramètres de porosité par différentes méthodes : micro-tomographie aux rayons X (« *microscanner* »), analyse

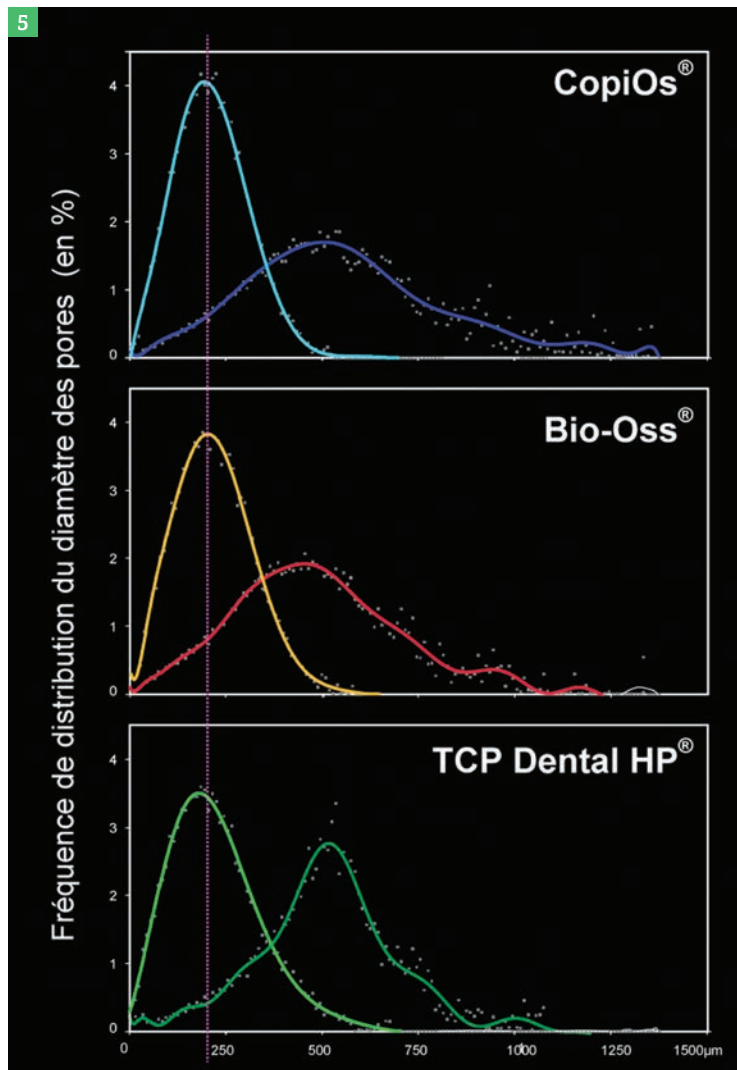


Fig.5: Fréquence de distribution du diamètre des pores obtenue dans 3 biomatériaux différents sous forme de granules. Pour chaque matériau, la courbe claire correspond aux granules 250-1 000 μm ; la courbe plus foncée et plus étalée correspond aux granules 2 000-2 000 μm . Notez que pour les granules de 250-1 000 μm , le pic est centré sur une valeur inférieure à 250 μm (ligne pointillée rose).

vectorielle, et ce sur deux types de granulométries couramment utilisées en chirurgie maxillo-faciale : petits granules de 250-1000 μm et grands granules 1 000-2 000 μm [Arbez et coll., 2018].

LES BIOMATÉRIAUX UTILISÉS

A) Allogreffes et xéno-greffes

Nous avons obtenu des granules à partir d'une hémisphère fémorale traitée par le procédé Osteopure (Ost développement, France) et broyée grâce à un broyeur à os. Des granules ont aussi été préparés à partir de blocs d'os bovin (Lubboc-Ost développement, Clermont-Ferrand, France). Pour tester l'effet de la suppression du collagène, des granules ont été pyrolysés à 800° pendant 24 heures. Des granules de Bio-Oss (Geistlich Pharma AG, Suisse), correspondant à de l'os bovin déprotéiné et traité

à 300° pendant 18 heures ont été aussi étudiés de même que des granules d'os bovin CopiOs (Zimmer Dental, Allemagne).

B) Céramiques phosphocalciques synthétiques

Les granules des céramiques phosphocalciques suivantes ont été analysés : TCP Dental, TCP Dental HP, TCH (Kasios SAS ; L'Union, France) et KeraOs (Keramit ; A Coruña, Espagne). Le TCP Dental HP présente une porosité élevée, nettement supérieure à celle du TCP Dental ; le TCH comporte 25 % de β -TCP et 75 % d'hydroxyapatite.

MÉTHODOLOGIE DE L'ANALYSE

Les granules de chacun des matériaux ont été placés dans des tubes de polyéthylène, agités gentiment pour

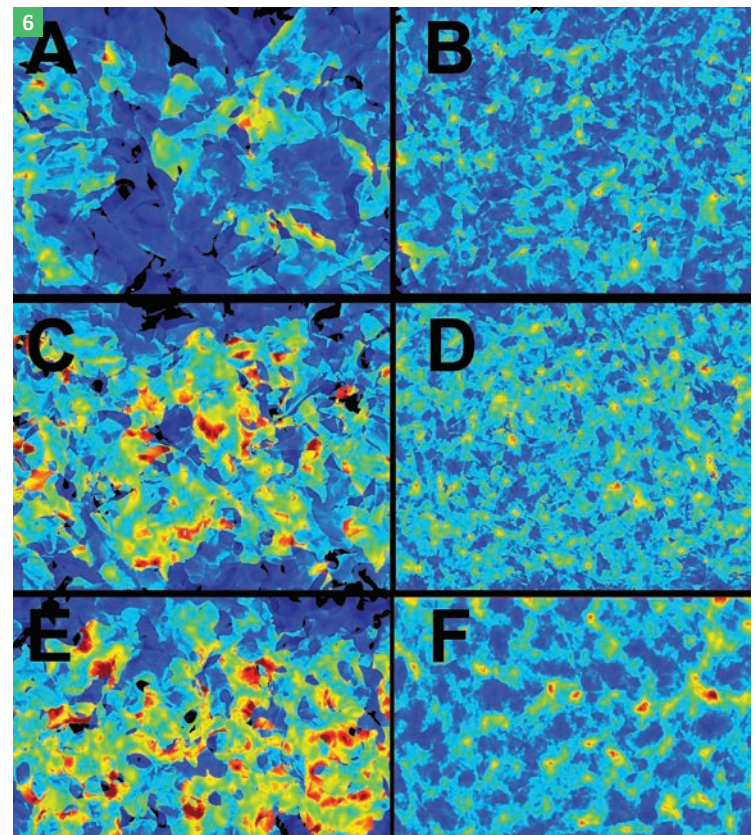


Fig.6 : Résultat de l'analyse vectorielle de différents types de biomatériaux. La présence de zones « chaudes », c'est-à-dire avec des couleurs rouge, orange et jaune indique des zones de porosité interconnectée maximale. À l'inverse, les zones « froides » c'est-à-dire noires, bleues et vertes indiquent des zones où la concentration du biomatériau est importante, sans porosité nettement interconnectée sur l'ensemble du prélèvement. Les images de la colonne de gauche (A, C, E) correspondent à des empilements de granules de grande taille 1 000-2 000 μm . Les images de la colonne de droite (B, D, F) correspondent à des empilements de granules de petite taille 250-1 000 μm . A-B) granules de xéno-greffé modifiée Bio-Oss composée d'un mélange d'os trabéculaire et cortical ; C-D) granules de xéno-greffé CopiOs composés exclusivement d'os trabéculaire ; E-F) granules de TCP Dental HP.

permettre une sédimentation des granules et optimiser leur arrangement spatial. Le volume analysé a été d'environ 330 mm^3 par échantillon et les analyses ont été reproduites trois fois pour chaque matériau. Seul le Bio-Oss a été analysé sur six échantillons en raison de particularités notées lors des premières analyses que nous avons tenu à confirmer. Les analyses ont été faites sur un microtomographe (« microscanner ») Skyscan 1172 selon un procédé décrit au laboratoire [Chappard et coll., 2015]. Des mesures ont été faites en tridimensionnel et comportaient la mesure de la porosité (en %), le diamètre moyen des pores et la fréquence de répartition de leurs diamètres. Une analyse vectorielle de la porosité a été effectuée sur les images bidimensionnelles en utilisant un algorithme déposé (Vectopor) ; ce logiciel produit des images couleur dans lesquelles on peut déterminer

quelle fraction de l'image contient des pores larges et connectés qui apparaissent avec des « couleurs chaudes » et les zones comportant de grandes quantités de biomatériau apparaissent avec des « couleurs froides ». Les spectres chimiques des différents types de granules ont été analysés par microspectrométrie Raman sur un microscope Renishaw InVia Qontor en utilisant un laser de 785 nm. L'ensemble des résultats a été analysé statistiquement et un seuil de significativité $p < 0,05$ a été retenu comme significatif.

RÉSULTATS DE L'ANALYSE EN MICRO SCANNER

Quelques images d'empilement de granules apparaissent sur la figure 2 pour les granules de 1 000-2 000 μm ; (Fig.2). La figure 3 illustre les mêmes biomatériaux sous forme de granules de 250-1 000 μm ; (Fig.3).

En ce qui concerne les granules d'os allo ou xéno-génique, ils réalisent des empilements constitués de fragments de travées brisées avec disparition de la microarchitecture normale de l'os trabéculaire. Pour mémoire, celle-ci apparaît sur un prélèvement osseux d'un sujet jeune ; (Fig.4). Il n'y avait aucune différence morphologique entre l'os allo-génique et l'os xénogénique. De même, la pyrolyse n'entraîne pas de modification morphologique des granules. La seule différence notable entre les différents matériaux d'os bovin analysés a été observée sur le *Bio-Oss* qui contenait une quantité notable de fragments d'os cortical mélangés avec l'os trabéculaire. Cependant, la fraction de cet os cortical sur le volume total ne peut être mesurée. Pour les céramiques synthétiques, la micro-architecture des empilements granulaires de *TCP Dental HP* était celle qui se rapprochait le plus de la micro-architecture de l'os humain. Les empilements de *TCP Dental* et de *TCH* étaient composés de granules plus larges. Les granules de *KeraOs* présentaient une forme plus arrondie avec une porosité interne non-connectée due probablement à la sublimation de billes d'un porogène. Pour les granules de faible taille, l'aspect 3D des empilements réalisés était très compact et pour le *Bio-Oss*, on retrouvait la présence de ces nombreux fragments d'os cortical.

ANALYSE MORPHOMÉTRIQUE

Pour chaque type de biomatériau, la porosité inter-granulaire était considérablement réduite avec les granules de petite taille comparée aux granules de grande taille. Ceci est dû à une plus grande compaction des petits granules résultant en une réduction très nette du diamètre des pores. La pyrolyse n'a aucun effet sur ce paramètre. La porosité totale obtenue avec des granules d'os allo ou xénogénique était proche de celle de l'os humain, cependant le diamètre des pores était nettement réduit. Pour le *Bio-Oss*, en raison de la quantité de fragments d'os cortical (dont certains présentent de très nets ostéons) la porosité était significativement réduite par rapport aux autres xéno-greffes analysées qui étaient, elles, constituées uniquement de tissu trabéculaire. L'analyse de la fréquence de répartition des diamètres des pores a confirmé que, pour les granules de petite taille (250-1 000 μm), le diamètre le plus fréquent était situé à 250 μm alors que l'utilisation des mêmes biomatériaux avec des granules de grande taille aboutit

à la création de pores de diamètres beaucoup plus grands ; (Fig.5). Ces données sont confirmées par l'étude avec le logiciel *Vectopor* qui montre la présence de nombreuses zones « chaudes » avec les grands granules alors que la présence de zones « froides » prédomine avec les petits granules ; (Fig.6).

ANALYSES EN MICROSPECTROMÉTRIE RAMAN

Quelques résultats d'analyses en microspectrométrie *Raman* apparaissent sur la figure 7 ; (Fig.7). Sur les matériaux d'os allo ou xénogénique, on retrouve la présence simultanée des phases organiques et minérales par l'apparition des pics spécifiques et largement connus du tissu osseux [Akkus et coll., 2004]. Les pics caractéristiques du collagène disparaissent dès lors que le matériau a été pyrolysé. Cependant, sur le biomatériau *Bio-Oss*, on retrouve les pics caractéristiques du minéral mais aussi un petit pic noté dans une zone spécifique du collagène. Le spectre caractéristique du β -TCP est retrouvé dans les matériaux *TCP Dental HP*, *TCP Dental* et *KeraOs*.

DISCUSSION

Dans cette étude, un grand nombre de biomatériaux sous forme granulaire utilisables pour le comblement de cavités osseuses en chirurgie maxillo-faciale a été analysé en microtomographie et microspectrométrie *Raman*. Tous les différents types de granules apparaissent capables de combler une cavité 3D et réalisent des « échafaudages » qui ressemblent peu ou prou à ce que le chirurgien fait lorsqu'il comble une cavité avec un biomatériau [Guillaume 2017]. La taille des granules influence considérablement l'empilement tridimensionnel. Les petits granules (250-1 000 μm) réalisent des empilements à porosité faible (à pores réduits) comparée à celle obtenue avec des granules de plus grande taille du même biomatériau.

L'analyse des courbes de distribution de fréquence du diamètre des pores montre clairement que, pour les petits granules, le maximum de fréquence est de l'ordre de 200 μm . De nombreux articles dans la littérature ont montré que la taille optimale des pores, pour un biomatériau destiné à être placé en site osseux, devait être largement supérieure à 300 μm de façon à permettre la pénétration des bourgeons conjonctivo-vasculaires et des cellules ostéo-progénitrices [Chappard, Terranova, Mallet and Mercier 2015, Karageorgiou et coll.,

2005, Knabe et coll., 2008]. Pour les granules de grande taille, la fréquence de distribution des pores est le plus souvent supérieure à 500 μm . Ces données sont confirmées par l'analyse vectorielle qui montre de nombreuses « zones chaudes » lorsque l'on utilise des granules de grande taille alors que celles-ci ont pratiquement disparu avec des granules de petite taille.

L'analyse vectorielle de la porosité est une technique qui permet l'étude d'objets complexes comme la porosité de l'os alvéolaire ou celle des épiphyses des os longs [Chappard et coll., 2016, Chappard et coll., 2015, Chappard, Terranova, Mallet and Mercier 2015, Kun-Darbois et coll., 2015]. La porosité des empilements de TCP Dental HP est similaire à celle mesurée dans l'os de sujets jeunes et il est bien connu que la porosité osseuse augmente chez le sujet âgé [Chappard, Terranova, Mallet and Mercier 2015, Riggs et coll., 2008, Seeman 2002, Thomas et coll., 2009]. Quand un défaut osseux est greffé avec des granules, il s'en suit une condensation radiologique car le matériau contient plus de calcium que la matrice osseuse (en particulier dans le cas des céramiques phosphocalciques) [Billström et coll., 2013, Gouin et coll., 2010] et aussi parce que les patients greffés sont plus souvent ostéoporotiques [Bansal et coll., 2009, Becker et coll., 2016, Lindner et coll., 2009]. Des résultats troublants ont été observés avec le matériau Bio-Oss qui apparaît composé d'une quantité non négligeable de tissu osseux cortical alors que le fabricant, sur son site ainsi que sur les boîtes et les livrets d'accompagnement du produit mentionne clairement qu'il s'agit d'un greffon préparé à partir d'os bovin trabéculaire (ou « spongieux »). Pour cette raison, nous avons utilisé plusieurs lots du produit et nous confirmons que cette quantité d'os cortical est toujours présente quelles que soient les formulations utilisées. Une analyse histologique complémentaire des granules a confirmé la présence d'os cortical haversien. Bien que la fraction os cortical/os trabéculaire ne puisse pas être mesurée à partir des empilements de granules, elle a une influence nette sur la porosité et réduit le diamètre des pores comparé aux autres matériaux préparés avec de l'os bovin.

La microspectrométrie Raman est aussi apparue intéressante dans la caractérisation des granules : il s'agit d'une technique très spécifique qui ne requiert aucun traitement pouvant dégrader les échantillons d'os ou de biomatériau. Nous avons retrouvé que les matériaux

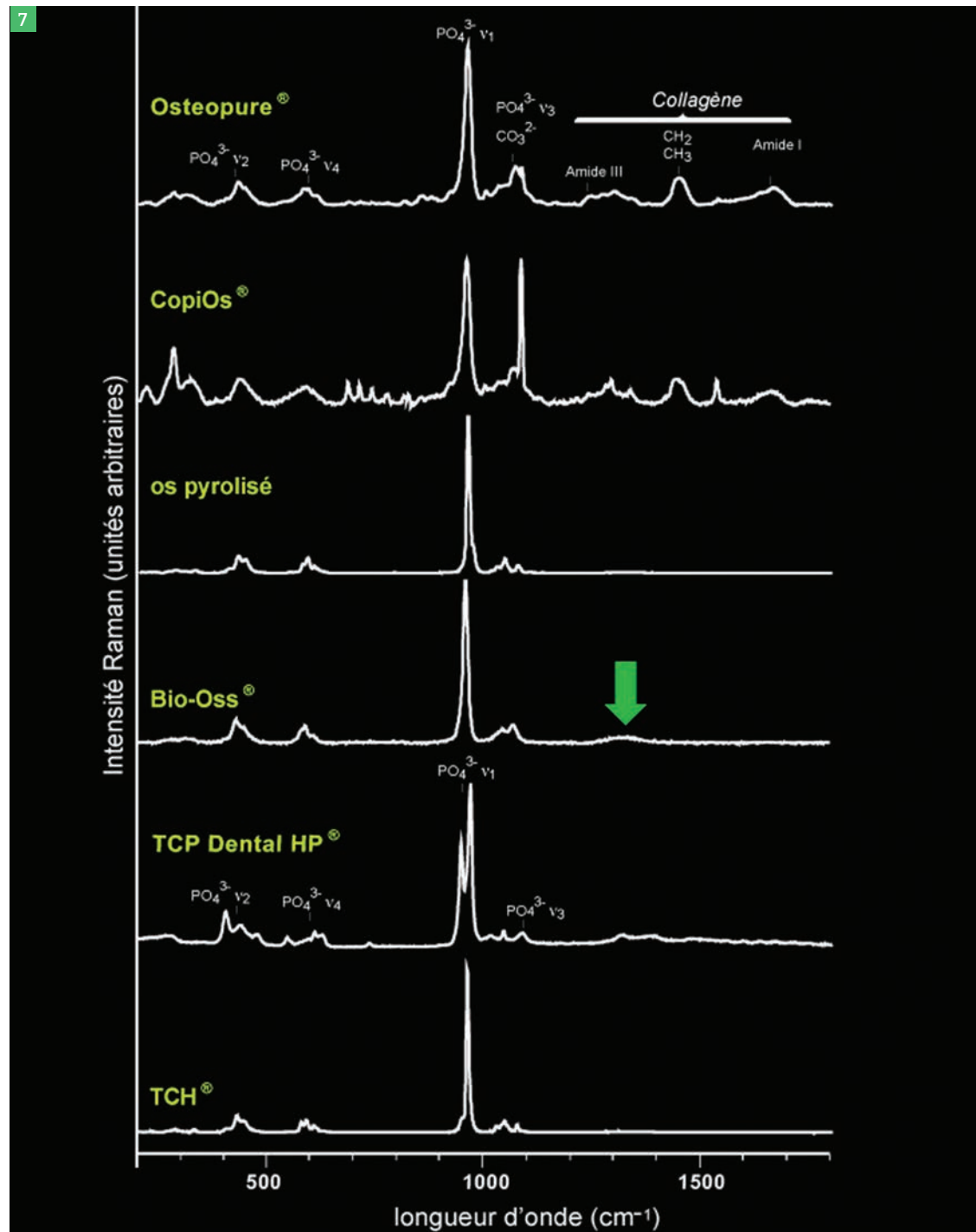


Fig.7 : Résultat de l'analyse Raman de différents types de biomatériaux. La présence de pics sur les spectres est caractéristique de la présence de certaines molécules, qu'elles soient organiques (collagène) ou minérales (phosphates et carbonates). Les phosphates sont visibles sous forme de plusieurs pics dont le principal se trouve vers 960 cm^{-1} . Dans le collagène, on dispose de plusieurs pics de vibration : l'un sur les amides III, l'autre sur les groupements CH2 et CH3, enfin un pour les groupements amides I. Notez la présence d'un pic résiduel sur le spectre du Bio-Oss dans la zone des amides III (flèche verte).

préparés à partir d'os allo ou xéno-génique présentaient les pics classiques de l'os mature excepté le CopiOs qui a semblé provenir d'animaux plus jeunes [Akkus, Adar and Schaffler 2004, Mandair et coll., 2015, Paschalis et coll., 1996]. Sur les échantillons pyrolysés, on note une disparition complète de la phase

organique laissant simplement place à l'hydroxyapatite de la matrice osseuse [Khan et coll., 2013]. Cependant, pour le Bio-Oss, le spectre était très similaire à celui de l'os pyrolysé excepté un pic supplémentaire correspondant à une fraction du collagène (amide III) [Arbez, Kun-Darbois, Convert, Guillaume, Mercier, Hubert

and Chappard 2018]. Des traces de protéines ont été rapportées dans le Bio-Oss par plusieurs auteurs par des techniques d'électrophorèse en gel de SDS polyacrylamide, par Western Blot [Schwartz et coll., 2000] ou en utilisant la méthode de Kjeldahl et l'analyse thermogravimétrique [Lee et coll., 2014].

D'autres articles ont utilisé l'analyse infrarouge à transformée de *Fourier* et n'ont pas retrouvé de traces de matériel organique dans l'os ou le *Bio-Oss* traités à une température supérieure ou égale à 500° pendant 18 heures [Benke et coll., 2001, Murugan et coll., 2003] cependant, ils ont montré la présence de reliquats organiques dans l'os chauffé à 300° [Murugan, Rao and Kumar 2003]. L'analyse *Raman* des biomatériaux à base de β -TCP est en accord avec les données publiées dans la littérature [Jillavankatesa et coll., 1998, Koburger et coll., 2014]. Dans le matériau *TCH*, c'est le spectre de l'hydroxyapatite,

majoritaire, qui est observé [Terranova et coll., 2015].

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons analysé 9 matériaux de comblement commercialisés sous forme de granules par différentes entreprises ou préparés dans notre laboratoire et que nous avons utilisés comme contrôles. Nous avons utilisé deux tailles de granules qui sont disponibles sur le marché. Tous les granules réalisent des empilements 3D dont l'analyse morphométrique peut être réalisée par micro-tomographie. Les petits granules (250-1000 μ m) produisent

des empilements avec des pores faiblement interconnectés qui ne sont pas favorables à une invasion *in vivo* par les cellules vasculaires et osseuses, en particulier lorsqu'un gros défaut osseux a été comblé. Les grands granules (1 000-2 000 μ m) donnent des empilements 3D avec une porosité élevée, nettement interconnectée et qui reproduit la micro-architecture du tissu osseux jeune. Les granules de grande taille ont donc des propriétés d'ostéoconduction bien supérieures aux granules de petites tailles et doivent, selon nous, être préférés à ces derniers en pratique clinique. Les analyses spectrométriques Raman

permettent d'identifier aisément la composition des biomatériaux et ces deux méthodes sont intéressantes conjointement pour la caractérisation des produits de greffe osseuse. ☺

REMERCIEMENTS

Ce travail a été rendu possible grâce à M^{me} N. GABORIT et S. LEMIERE pour leur aide technique dans l'analyse microCT et F. PASCARETTI pour l'histologie osseuse.

la biblio'

- AKKUS O, ADAR F, SCHAFFLER MB : Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone*, 2004; 34: 443-453.
- ANDERSON JM : Biological responses to materials. *Annual review of materials research*, 2001; 31: 81-110.
- ANDERSON JM, RODRIGUEZ A, CHANG DT : Foreign body reaction to biomaterials. Elsevier (2008), 86-100.
- ARBEZ B, KUN-DARBOIS JD, CONVERT T, GUILLAUME B, MERCIER P, HUBERT L, CHAPPARD D : Biomaterial granules used for filling bone defects constitute 3D scaffolds: porosity, microarchitecture and molecular composition analyzed by microCT and Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2018; doi: 10.1002/jbm.b.34133.
- BANSAL M, BHAGAT S, SHUKLA D : Bovine cancellous xenograft in the treatment of tibial plateau fractures in elderly patients. *International orthopaedics*, 2009; 33: 779-784.
- BECKER W, HUJOEL P, BECKER BE, WOHRLE P : Dental implants in an aged population: evaluation of periodontal health, bone loss, implant survival, and quality of life. *Clinical implant dentistry and related research*, 2016; 18: 473-479.
- BENKE D, OLAH A, MÖHLER H : Protein-chemical analysis of *Bio-Oss* bone substitute and evidence on its carbonate content. *Biomaterials*, 2001; 22: 1005-1012.
- BILLSTRÖM GH, BLOM AW, LARSSON S, BESWICK AD : Application of scaffolds for bone regeneration strategies: current trends and future directions. *Injury*, 2013; 44: S28-S33.
- BOSE S, ROY M, BANDYOPADHYAY A : Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 2012; 30: 546-554.
- CHAPPARD D, LIBOUBAN H : Vector analysis of porosity evidences bone loss at the epiphysis in the BTX rat model of disuse osteoporosis. *J. Anat. Soc. Ind.*, 2016; 65: 3-8.
- CHAPPARD D, STANCU IC : Porosity imaged by a vector projection algorithm correlates with fractal dimension measured on 3D models obtained by microCT. *J Microsc*, 2015; 258: 24-30.
- CHAPPARD D, TERRANOVA L, MALLET R, MERCIER P : 3D Porous Architecture of Stacks of beta-TCP Granules Compared with That of Trabecular Bone: A microCT, Vector Analysis, and Compression Study. *Front Endocrinol.*, 2015; 6: 161.
- GOUIN F, YAOUANC F, WAAST D, MELCHIOR B, DELECRIN J, PASSUTI N : Open wedge high tibial osteotomies: Calcium-phosphate ceramic spacer versus autologous bonegraft. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*, 2010; 96: 637-645.
- GUILLAUME B : Filling bone defects with beta-TCP in maxillofacial surgery: A review. *Morphologie*, 2017; 101: 113-119.
- JILLAVANKATESA A, CONDRADE SR R : The infrared and Raman spectra of D- and D-tricalcium phosphate [Ca₃(PO₄)₂]. *Spectroscopy letters*, 1998; 31: 1619-1634.
- KARAGEORGIOU V, KAPLAN D : Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 2005; 26: 5474-5491.
- KHAN AF, AWAIS M, KHAN AS, TABASSUM S, CHAUDHRY AA, REHMAN IU : Raman spectroscopy of natural bone and synthetic apatites. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2013; 48: 329-355.
- KNABE C, KOCH C, RACK A, STILLER M : Effect of D-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials*, 2008; 29: 2249-2258.
- KOBURGER S, BANNERMAN A, GROVER LM, MÜLLER FA, BOWEN J, PAXTON JZ : A novel method for monitoring mineralisation in hydrogels at the engineered hard-soft tissue interface. *Biomater. Sci.*, 2014; 2: 41-51.
- KUN-DARBOIS JD, LIBOUBAN H, CHAPPARD D : Botulinum toxin in masticatory muscles of the adult rat induces bone loss at the condyle and alveolar regions of the mandible associated with a bone proliferation at a muscle enthesis. *Bone*, 2015; 77: 75-82.
- LEE DS, PAIY, CHANG S : Physicochemical characterization of *InterOss* and *Bio-Oss* anorganic bovine bone grafting material for oral surgery-A comparative study. *Mater. Chem. Phys.*, 2014; 146: 99-104.
- LINDNER T, KANAKARIS N, MARX B, COCKBAIN A, KONTAKIS G, P : Fractures of the hip and osteoporosis: the role of bone substitutes. *Bone Joint Journal*, 2009; 91: 294-303.
- MANDAIR GS, MORRIS MD : Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. *Bonekey Rep*, 2015; 4: 620.
- MURUGAN R, RAO KP, KUMAR TS : Heat-deproteinized xenogeneic bone from slaughterhouse waste: physico-chemical properties. *Bull. Mater. Sci.*, 2003; 26: 523-528.
- PASCHALIS E, DICARLO E, BETTS F, SHERMAN P, MENDELSON R, BOSKEY A : FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone. *Calcified tissue international*, 1996; 59: 480-487.
- RIGGS BL, MELTON LJ, ROBB RA, CAMP JJ, ATKINSON EJ, MCDANIEL L, AMIN S, ROULEAU PA, KHOSLA S : A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2008; 23: 205-214.
- SABETRASEKH R, TIAINEN H, RESELAND J, WILL J, ELLINGSEN J, LYGSTADAAS S, HAUGEN H : Impact of trace elements on biocompatibility of titanium scaffolds. *Biomedical Materials*, 2010; 5: 015003.
- SCHWARTZ Z, WEESNER T, VAN DIJK S, COCHRAN D, MELLONIG J, LOHMANN C, CARNES D, GOLDSTEIN M, DEAN D, BOYAN B : Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *Journal of periodontology*, 2000; 71: 1258-1269.
- SEEMAN E : Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet*, 2002; 359: 1841-1850.
- SEITZ H, RIEDER W, IRSEN S, LEUKERS B, TILLE C : Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2005; 74: 782-788.
- TERRANOVA L, LIBOUBAN H, MALLET R, CHAPPARD D : Analysis of beta-tricalcium phosphate granules prepared with different formulations by nano-computed tomography and scanning electron microscopy. *J Artif Organs*, 2015; 18: 338-345.
- THOMAS CDL, MAYHEW PM, POWER J, POOLE KE, LOVERIDGE N, CLEMENT JG, BURGOYNE CJ, REEVE J : Femoral neck trabecular bone: loss with aging and role in preventing fracture. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2009; 24: 1808-1818.