



**HAL**  
open science

# Caractérisation biologique et mécanique d'un subsitit osseux biohybride et développement de scaffolds par électrospinning : vers un pansement vivant pour la reconstruction maxillo-faciale

Timothée Baudequin

## ► To cite this version:

Timothée Baudequin. Caractérisation biologique et mécanique d'un subsitit osseux biohybride et développement de scaffolds par électrospinning : vers un pansement vivant pour la reconstruction maxillo-faciale. Biomécanique [physics.med-ph]. Université de Technologie de Compiègne, 2015. Français. NNT : 2015COMP2219 . tel-01298797

**HAL Id: tel-01298797**

**<https://theses.hal.science/tel-01298797>**

Submitted on 6 Apr 2016

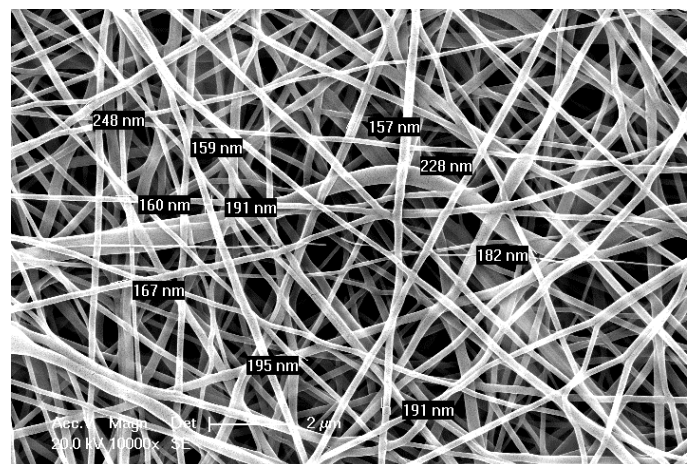
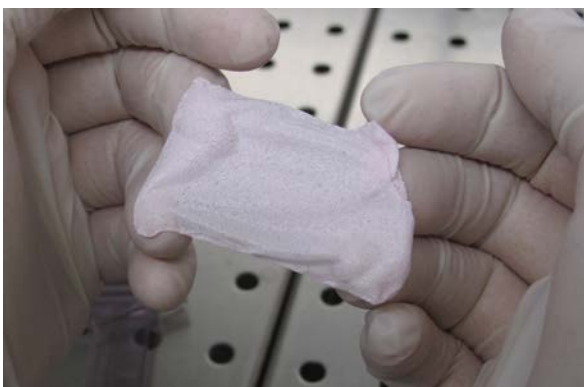
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Par **Timothée BAUDEQUIN**

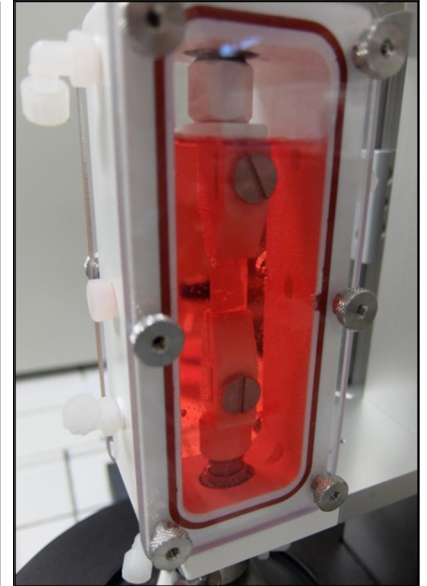
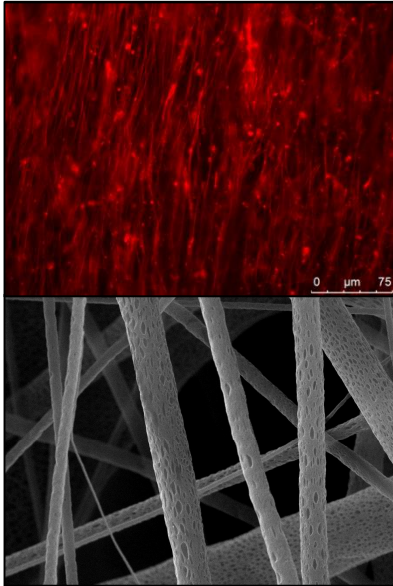
*Caractérisation biologique et mécanique d'un substitut osseux biohybride et développement de scaffolds par électrospinning : vers un pansement vivant pour la reconstruction maxillo-faciale*

Thèse présentée  
pour l'obtention du grade  
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 30 octobre 2015  
**Spécialité** : Biomécanique et Bio-ingénierie

D2219



## CARACTERISATION BIOLOGIQUE ET MECANIQUE D'UN SUBSTITUT OSSEUX BIOHYBRIDE ET DEVELOPPEMENT DE SCAFFOLDS PAR ELECTROSPINNING

*Vers un pansement vivant pour la reconstruction maxillo-faciale*

PRESENTEE PAR  
BAUDEQUIN Timothée

SOUTENUE LE  
30 octobre 2015

MEMBRES DU JURY

Dr. AMEEDÉ Joëlle, DR INSERM  
Pr. SCHLATTER Guy  
Pr. EGLES Christophe  
Pr. DEVAUCHELLE Bernard  
Dr. LEGALLAIS Cécile, DR CNRS  
Dr. BEDOUI Fahmi, MCF

*Rapporteur*  
*Rapporteur*  
*Examineur*  
*Examineur*  
*Directrice de thèse*  
*Directeur de thèse*

*À Edouard Skrzypczak  
et Alvin Sripesac*

## Résumé de la thèse

Un substitut osseux hybride, composé d'un biomatériau support (scaffold) et de cellules vivantes, a été étudié, développé par la méthode d'ingénierie tissulaire et caractérisé. Il devait répondre aux attentes spécifiques de la chirurgie maxillofaciale : un protocole standard pouvant s'adapter aux géométries complexes des défauts osseux de chaque patient, une forme souple et manipulable, une pré-vascularisation et une cohésion mécanique suffisante.

Une forme de feuillet fin et plat a ainsi été définie et développée au sein d'une chambre de culture parallélépipédique spécifique, en utilisant une monocouche de granules de phosphate de calcium comme support. Après une caractérisation biologique et mécanique complète à partir d'une lignée cellulaire, le procédé a été validé puis transposé à une coculture de cellules primaires humaines (cellules souches et endothéliales). La bonne différenciation et la pré-vascularisation ont été constatées mais le maintien mécanique pouvait être considéré comme insuffisant pour assurer une manipulation en cours d'opération chirurgicale.

La dernière partie de ce travail de thèse a donc consisté dans la mise en place d'un montage de production de fibres électrospinnées et leur utilisation comme nouveau support de culture. La formation de ces matériaux a été rendue opérationnelle de façon optimale pour différents polymères. Leur potentiel en tant que scaffold favorisant la différenciation en os ou en tendon a été vérifié et comparé à d'autres matériaux fibreux obtenus dans le cadre de collaborations nationales et internationales. La faisabilité de l'application de sollicitations mécaniques aux substituts en cours de culture a également été étudiée.

### ***Mots-clés***

Ingénierie tissulaire, os, cellules souches, cellule endothéliales, coculture, électrospinning, phosphate de calcium, polymère

## **Biological and mechanical characterization of a biohybrid bone substitute and development of electrospun scaffolds**

An hybrid bone substitute, based on a specific biomaterial (scaffold) and living cells, was studied, developed with a tissue engineered method and characterized. It should meet the expectations of the maxillofacial surgery: a standard process which could fit with the complex

geometries of each patient's bone mass loss, a flexible shape with an easy handling, a pre-vascularization and a sufficient mechanical cohesion.

A sheet-like shape was thus designed and developed in a specific flat cell culture chamber, with a monolayer of calcium phosphate granules as a scaffold. After both biological and mechanical full characterizations with a cell line, the process was adapted to a coculture of human primary cells (stem and endothelial cells). Relevant differentiation and pre-vascularization were highlighted but the mechanical cohesion could be noticed as too low to ensure an easy handling during the surgery.

The last part of this thesis project was thus the set-up of a device for electrospun polymer fibers in order to use them as a new scaffold. The production of these materials was efficiently performed for several polymers. The differentiation potential for bone and tendon lineages was studied and compared to other scaffolds from national and international collaborations. The application of mechanical solicitations to the substitutes during cell culture was also studied.

### ***Keywords***

Tissue engineering, bone, stem cells, endothelial cells, coculture, electrospinning, calcium phosphate, polymer

## **Laboratoires**

UMR CNRS 7338 : Biomécanique et Bioingénierie

Sorbonne Universités

Université de Technologie de Compiègne

Centre de Recherches UTC

Rue du Docteur Schweitzer

60200 Compiègne

UMR CNRS 7337 : Laboratoire de Mécanique Roberval

Sorbonne Universités

Université de Technologie de Compiègne

Centre de Recherches UTC

Rue du Docteur Schweitzer

60200 Compiègne

## Liste des publications et communications

### Publications :

Baudequin T., Bedoui F., Dufresne M., Paullier P. and Legallais C. **Towards the development and characterisation of an easy handling sheet-like biohybrid bone substitute**, Tissue Eng Part A. 2015 Jun;21(11-12):1895-905. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0580 (Couverture de l'édition de juin 2015).

**An easy handling sheet-like biohybrid bone substitute: primary human endothelial / mesenchymal stem cells co-culture and *in vivo* characterisation** (Rédaction en cours, collaboration avec le CHU d'Amiens).

**Review: Is there an optimal stretching protocol to induce and study the *in vitro* bone cells response to mechanical loading?** (Rédaction achevée).

### Congrès nationaux et internationaux avec actes :

Baudequin T., Dufresne M., Legallais C. and Bedoui F. Caractérisation d'un substitut osseux reconstruit en bioréacteur : Rôle du support dans le comportement mécanique, **Congrès Français de Mécanique**, Bordeaux, 26-30 août 2013, poster (<http://hdl.handle.net/2042/52874>).

Baudequin T., Dufresne M., Bedoui F. and Legallais C. Characterization of a bioreactor-made hybrid bone substitute: Biological and mechanical behavior with different scaffolds, **Congrès de la Société Européenne des Organes Artificiels (ESAO)**, Glasgow (Ecosse), 11-14 septembre 2013, poster, Int J Artif Organs 2013; 36(8): 541 ó 586, P65 (DOI: 10.5301/ijao.5000244).

Baudequin T., Gaut L., Legallais C., Duprez D., Dufresne M. and Bedoui F. Static and dynamic cell culture on electrospinning scaffolds for bone and tendon tissue engineering, **Congrès de la Société Européenne des Organes Artificiels (ESAO)**, Louvain (Belgique), 2-5 septembre 2015, présentation orale.

Baudequin T., Naudot M., Bedoui F., Dufresne M., Dupont S., Bouhlal H., Testelin S., Devauchelle B., Marolleau J.P. and Legallais C. Bone Tissue Engineering: A Sheet-like Substitute Based on Human Endothelial and Stem Cells Co-culture, **Congrès Mondial de la Société Internationale d'Ingénierie Tissulaire et Médecine Régénérative (TERMIS)**, Boston (Massachusetts), 8-11 septembre 2015, poster.

Baudequin T., Gaut L., Legallais C., Duprez D., Dufresne M. and Bedoui F. Tissue engineering of the bone/tendon interface: electrospun scaffolds and influence of mechanical stress on differentiation, **International Bone Tissue Engineering Congress**, Stuttgart (Allemagne), 8-10 octobre 2015, présentation orale.

#### **Congrès internationaux et autres communications :**

Baudequin T., Dufresne M., Bedoui F. and Legallais C. Characterization of a bioreactor-made hybrid bone substitute: Biological and mechanical behavior with different scaffolds, **1<sup>st</sup> international workshop MS2T**, Compiègne (France), 5-6 septembre 2013, poster et présentation orale et rapide.

Stand « Des gueules cassées à l'ingénierie tissulaire », **Fête de la Science**, Village des Sciences de l'UTC, Compiègne (France), 16-19 octobre 2014.

Concours « **Ma Thèse en 180 secondes** », finale régionale Sorbonne Universités, Paris (France), 23 mars 2015.



## Distinctions :

Bourse remportée pour une présentation orale lors de la Summer School « **Biomaterials and Regenerative Medicine** » de l'Université de Trento, Riva del Garda (Italie), 8-12 juillet 2013.

Prix de la meilleure présentation, **Journée Scientifique des Doctorants du laboratoire BMBI**, Compiègne, 2 juillet 2014.

**yESAO exchange award**, European Society for Artificial Organs, 2015 (Université de Hanovre, Allemagne).

Prix de la Société Française de Biologie des Tissus Minéralisés remis pour une présentation flash - poster au colloque de l'association **BIOMAT**, Île de Ré, 12-14 octobre 2015.

## Table des matières

Liste des abréviations.....	11
Liste des figures.....	14
Liste des tables.....	21
Remerciements .....	22
<b>Chapitre 1 : Bibliographie.....</b>	<b>24</b>
I. Contexte et domaine d'étude .....	25
1) Contexte historique : des Gueules Cassées à la greffe du visage.....	25
2) Les techniques actuelles de la reconstruction osseuse .....	28
3) La zone maxillofaciale et les attentes des chirurgiens.....	34
II. Os et ingénierie tissulaire .....	36
1) Croissance et remodelage osseux.....	37
2) L'ingénierie tissulaire osseuse .....	46
III. Matériaux sélectionnés pour le projet de thèse.....	54
1) Les phosphates de calcium .....	54
2) L'électrospinning .....	58
IV. Cellules sélectionnées pour le projet de thèse .....	66
1) Historique et définition des cellules souches.....	66
2) Utilisation des cellules souches mésenchymateuses .....	68
V. Enjeux et description de l'environnement cellulaire .....	71
1) Quels sont les signaux de l'environnement perçus par la cellule ?.....	71
2) Review : Is there an optimal stretching protocol to induce and study the in vitro bone cells response to mechanical loading?.....	74
VI. Bilan de la démarche.....	101
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes .....</b>	<b>103</b>
I. Matériel.....	104
1) Cellules .....	104
2) Environnement .....	106
3) Matériaux .....	109

II.	Méthodes .....	112
1)	Méthodes de culture .....	112
2)	Analyse des propriétés biologiques.....	114
3)	Analyse des propriétés mécaniques et chimiques .....	121

### **Chapitre 3 : Culture de cellules de lignée sur granules de phosphate de calcium.....125**

I.	Introduction.....	126
II.	Résultats et discussion : Article Tissue Engineering Part. A (Juin 2015).....	127
III.	Données complémentaires.....	154
1)	Répartition de la taille des granules de diamètre minimal.....	154
2)	Essais de traction sous microscopie électronique à balayage .....	155
IV.	Conclusions .....	155

### **Chapitre 4 : Coculture de cellules primaires humaines sur granules de phosphate de calcium .....157**

I.	Introduction.....	158
II.	Cultures préliminaires et mise au point de la coculture.....	159
1)	Faisabilité de la culture de CSM en cassette.....	159
2)	Faisabilité de la coculture en cassette.....	165
3)	Validation finale du protocole.....	169
4)	Conclusions des étapes de mise au point.....	173
III.	Etude complète de la coculture en cassette .....	173
1)	Introduction.....	173
2)	Résultats.....	174
3)	Discussion.....	183
4)	Conclusion .....	186
IV.	Conclusions du chapitre .....	187

### **Chapitre 5 : Développement et utilisation de fibres électrospinnées pour l'ingénierie tissulaire.....189**

I.	Introduction.....	190
II.	Caractérisation des polymères électrospinnés .....	192
	1) Résultats.....	192
	2) Discussion.....	206
	3) Conclusions.....	211
III.	Culture statique sur fibres électrospinnées.....	211
	1) Introduction.....	211
	2) Résultats.....	212
	3) Discussion.....	230
	4) Conclusion .....	236
IV.	Culture dynamique sur fibres électrospinnées.....	237
	1) Introduction.....	237
	2) Faisabilité.....	237
	3) Perspectives.....	244
V.	Conclusion du chapitre.....	245
	<b>Chapitre 6 : Conclusions et perspectives .....</b>	<b>246</b>
I.	Conclusions.....	247
II.	Perspectives .....	249
	<b>Annexes .....</b>	<b>251</b>
I.	Compléments bibliographiques.....	252
	1) Ingénierie tissulaire, généralités .....	252
	2) Propriétés des phosphates de calcium .....	257
	3) Cellules souches et niches.....	258
II.	Analyses et données complémentaires.....	259
	1) Hétérogénéité spatiale des cellules sur PLA électrospinné .....	259
	2) Culture statique sur scaffold PLA/coumarine.....	261
	3) Script SCILAB d'analyse du signal mécanique par transformée de Fourier.....	265
	Références internes au manuscrit .....	271

## Liste des abréviations

- 3D : Trois dimensions
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ANOVA : Analyse de la variance
- Aqp1 : Aquaporine 1
- ARN : Acide ribonucléique
- BCP : Phosphate bicalcique (*bicalcium phosphate*)
- BFGF : *Basic Fibroblast Growth Factor*
- BMP-2 : Bone morphogenetic protein 2
- BMSC : Bone marrow stromal cells
- BSA : *Bovine Serum Albumin*, albumine de sérum bovin
- BSP : Sialoprotéine osseuse (*Bone sialoprotein*)
- Cbfa1 : Core-binding factor alpha 1
- CE : Cellules endothéliales
- CHU : Centre Hospitalier Universitaire
- Colla1 : Collagène type I alpha 1
- Colla2: Collagène type I alpha 2
- CP : Phosphate de calcium (*calcium phosphate*)
- CPS : *count per second*
- CSM : Cellules souches mésenchymateuses
- CSM diff : Cellules souches mésenchymateuses cultivées dans du milieu de différenciation spécifique.
- Cx43 : Connexine 43
- DCM : Dichlorométhane
- DMF : Diméthylformamide
- EDX : *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*, analyse dispersive en énergie.
- ESAO : *European Society for Artificial Organs*
- Facteur vW : Facteur de von Willebrand
- EthD-1 : Ethidium homodimer-1
- FDA : Food & Drug Administration
- GAG : Glycosaminoglycanes

GAPDH : Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase  
HA : Hydroxyapatite  
ICPEES : Institut de chimie et procédés pour l'énergie, l'environnement et la santé  
(UMR CNRS 7515, Strasbourg)  
IFF : Institut Faire Face  
IMP : *Institut für Mehrphasenprozesse*, laboratoire de l'Université de Hanovre  
LNPC : Laboratoire « Lymphocyte normal et pathologique et cancers » (EA4666) du  
CHU d'Amiens  
MEB : Microscope électronique à balayage  
MEC : Matrice extra-cellulaire  
MET : Microscopie électronique à transmission  
MSC : *Mesenchymal stem cells*, voir CSM  
OCN : Ostéocalcine  
OCP : Octacalcium phosphate  
OPN : Ostéopontine  
PAL : Phosphatase alcaline  
PBS : *Phosphate Buffered Saline*  
PCL : Polycaprolactone  
PDMS : Polydiméthylsiloxane  
PEO : Poly(ethylene oxide)  
PEVOH : Poly(ethylene-co-vinyl alcohol)  
PGA : Acide polyglycolique  
PLA : Acide polylactique  
PLLA : Acide poly(l-lactic)  
PLGA : Acide poly-lactide-co-glycolide  
PMMA : Poly(methyl methacrylate)  
pNP : p-Nitrophenol  
PSM : Poste de Sécurité Microbiologique  
PVA : Alcool polyvinylique  
RT-qPCR : *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*  
SAPC : Service d'Analyse Physico-Chimique  
Scx : Sclérox  
SVF : Sérum de veau f<sup>o</sup> tal

TCM : Chloroforme (trichlorométhane)  
TCP : Phosphates tricalciques (*tricalcium phosphate*)  
TFE : 2,2,2-trifluoroéthanol  
Tnmd : Ténomoduline  
UPMC : Université Pierre et Marie Curie (Paris)  
UTC : Université de Technologie de Compiègne  
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*  
VEGFR2 : *Vascular endothelial growth factor receptor 2*

## Liste des figures

Figure 1 : L'Union des Blessés de la Face et de la Tête, dits « Gueules Cassées » <sup>1</sup> .....	26
Figure 2 : Principe des différents types de greffe.....	30
Figure 3 : Cycle général de l'ingénierie tissulaire. Adapté de <sup>50,652</sup> .....	37
Figure 4 : Os des zones crânielles et maxillo-faciales. Domaine public. ....	38
Figure 5 : Les différents acteurs du renouvellement osseux. D'après Stepien <i>et al</i> <sup>66</sup> .....	40
Figure 6 : Principe du mechanostat. Adapté de Frost <sup>70</sup> , domaine public. ....	41
Figure 7 : Principe de la mécanotransduction dans l'os. D'après Klein-Nulend <i>et al</i> <sup>60</sup> .....	43
Figure 8 : Différenciation de la lignée ostéoblastique. Les possibilités exactes de transdifférenciation (lignes pointillées) sont encore débattues aujourd'hui. D'après Aubin <i>et al</i> <sup>73</sup> .....	44
Figure 9 : Evolution des principaux marqueurs de différenciation de la lignée ostéoblastique. Adapté de <sup>59,62,65,72,675</sup> .....	45
Figure 10 : Description des principaux marqueurs de différenciation de la lignée ostéoblastique. Adapté de Samavedi <i>et al</i> <sup>76</sup> .....	46
Figure 11 : Exemples de la variété des scaffolds utilisés en ingénierie tissulaire osseuse. A : disques de polymère (diamètre 500 µm), B : granules d'hydroxyapatite de tailles variables (de 80 à 2000 µm), C : fibres de PCL. D'après Hutmacher <i>et al</i> <sup>38</sup> (A, C) et données personnelles (B).....	50
Figure 12 : Principaux bioréacteurs utilisés en ingénierie tissulaire osseuse. 1 : Perfusion, 2 : Mur rotatif avec scaffolds libres (A) ou fixés (B), 3 : Spinner flasks, 4 : Systèmes de compression directe (a) ou indirecte (b), 5 : Systèmes de traction par étirement (a) ou flexion (b) du substrat. D'après Brown <i>et al</i> <sup>112</sup> , Rauh <i>et al</i> <sup>111</sup> , Yeatts <i>et al</i> <sup>110</sup> .....	53
Figure 13 : Schéma des propriétés des phosphates de calcium affectant la réponse cellulaire. D'après Samavedi <i>et al</i> <sup>76</sup> .....	56
Figure 14: Schéma de différents dispositifs d'électrospinning. A: système vertical basique avec collecteur statique <sup>129</sup> , B: système horizontal avec collecteur cylindrique et déplacement de la source <sup>93</sup> , C: Système multi-électrodes <sup>93</sup> , D: système co-axial <sup>129</sup> , E: fibres perlées <sup>129</sup> , F: fibres de morphologie optimale <sup>129</sup> .....	60
Figure 15: Exemple de brevet déposé au début du XXème siècle sur le principe d'électrospinning <sup>132</sup> .....	61



Figure 16 : Multiples voies de différenciation des MSCs (colonnes) et leurs différents stades d'avancement (lignes). Les flèches rouges indiquent les transdifférenciations avérées ou suspectées. Source : Caplan <i>et al</i> <sup>171</sup> .....	68
Figure 17 : Sources de CSM pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Source : Wang <i>et al</i> <sup>175</sup> .....	69
Figure 18 : Déroulement de l'étude et collaboration entre les différents acteurs. ....	102
Figure 19 : Géométrie de la cassette de culture Clinicell25 (Mabio International, France)...	107
Figure 20 : Boîte de Pétri en verre de diamètre 30mm avec pose d'ergots en PDMS (flèches) .....	108
Figure 21 : Appareillage Biodynamic (Bose, Etats-Unis) complet.....	108
Figure 22 : Montage de production de fibres électrospinnées .....	110
Figure 23 : Echantillon de matériau électrospinné (PVA avec nanoparticules d'HA de 20nm) mis en place dans une boîte de Pétri avec revêtement.....	114
Figure 24 : Evaluation de l'angle de contact $\theta$ pour un matériau hydrophile (gauche) et hydrophobe (droite).....	123
Figure 25 : Binarisation d'une image MEB pour estimation de la porosité selon différents seuils. ....	124
Figure 26 : Ouverture de la cassette de culture et manipulation du tissu reconstruit.....	126
Figure 27 : Répartition de la taille des granules de phosphate de calcium au sein du groupe S .....	154
Figure 28 : Substitut reconstruit visualisé par microscopie électronique à balayage au cours d'essais de tractions (x500). Progression de la fissure (de haut en bas) pour deux échantillons différents (gauche et droite).....	156
Figure 29 : Morphologie des feuilletts observée après 24h de culture (gauche, CSM différenciées, 4 millions de cellules) et après un mois (droite, CSM, 2 millions de cellules). ....	160
Figure 30 : Activité métabolique mesurée par Alamar Blue dans les cassettes à J14. CSM = cellules cultivées dans du milieu général, CSM différenciées = cellules cultivées dans du milieu de différenciation. ....	160
Figure 31 : Activité PAL à l'issue d'un mois de culture en cassette de CSM différenciées ou non (moyenne et écart-type des réplicats techniques).....	161
Figure 32 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse à l'issue d'un mois de culture en cassette de CSM différenciées ou non.....	161

Figure 33 : Marquage fluorescent des noyaux des CSM toujours présentes après trypsination des feuillets reconstruits, pour différents temps d'incubation. ....	162
Figure 34 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse à l'issue d'un mois de culture en cassette de CSM différenciées ou non (n=3). ....	164
Figure 35 : Morphologie des feuillets après un mois de culture en fonction des différents protocoles de coculture CSM/CE. ....	166
Figure 36 : Activité PAL des différents cas de coculture à l'issue d'un mois de culture en cassette. ....	167
Figure 37 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse (en haut) ou endothéliale (en bas) à l'issue d'un mois de coculture différée en cassette. ....	168
Figure 38 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse (en haut) ou endothéliale (en bas) à l'issue d'un mois de coculture simultanée en cassette. ....	169
Figure 39 : Activité PAL chez deux donneurs à l'issue d'un mois de coculture en cassette (protocole final, essai préliminaire). ....	170
Figure 40 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse à l'issue d'un mois de coculture en cassette, augmentation par rapport aux CSM non différenciées (protocole final, essai préliminaire). ....	171
Figure 41 : Expression des gènes liés à la connexine 43, le collagène 1a2 et à la lignée endothéliales à l'issue d'un mois de coculture en cassette, augmentation par rapport aux CSM non différenciées (protocole final, essai préliminaire). ....	172
Figure 42 : Coloration PAL à l'issue d'un mois de coculture en cassette pour chaque donneur. ....	175
Figure 43 : Dosage de l'activité PAL à l'issue d'un mois de coculture en cassette, détails des résultats pour 6 donneurs (en haut) et moyenne normalisée par les résultats de la monoculture de CSM non différenciées (en bas). ....	176
Figure 44 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse à l'issue d'un mois de coculture en cassette, variations par rapport aux CSM non différenciées (moyenne sur 5 donneurs, *** : p<0,001). ....	178
Figure 45 : Expression des gènes liés aux cellules endothéliales à l'issue d'un mois de coculture en cassette, augmentation par rapport aux CSM non différenciées (moyenne sur 5 donneurs). ....	178
Figure 46 : Observation en microscopie de l'organisation et la viabilité des échantillons obtenus par coculture CSM/CE à l'issue d'un mois en cassette (donneur 1 et 2). En haut, vert :	

Calcéine AM, cellules vivantes ; rouge : EthD-1, noyaux des cellules mortes ; gris : contraste de phase, granules. Au milieu, rouge : rhodamine/phalloïdine, filaments d'actine ; vert : immunomarquage, connexine 43 ; gris : contraste de phase, granules. En bas : MEB.....	180
Figure 47 : Observation en microscopie de l'organisation et la viabilité des échantillons obtenus par coculture CSM/CE à l'issue d'un mois en cassette (donneur 3 et 4). En haut, vert : Calcéine AM, cellules vivantes ; rouge : EthD-1, noyaux des cellules mortes ; gris : contraste de phase, granules. Au milieu, rouge : rhodamine/phalloïdine, filaments d'actine ; vert : immunomarquage, connexine 43 ; gris : contraste de phase, granules. En bas : MEB.....	181
Figure 48 : Observation en microscopie de l'organisation et la viabilité des échantillons obtenus par coculture CSM/CE à l'issue d'un mois en cassette (donneur 5 et 6). En haut, vert : Calcéine AM, cellules vivantes ; rouge : EthD-1, noyaux des cellules mortes ; gris : contraste de phase, granules. Au milieu, rouge : rhodamine/phalloïdine, filaments d'actine ; vert : immunomarquage, connexine 43 ; gris : contraste de phase, granules. En bas : MEB.....	182
Figure 49 : Observation au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés à base de PVA (gauche : x2500, droite : x10000). Flèches : aspérités créées par la présence des nanoparticules. ....	193
Figure 50 : Observation au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés à base de PCL et PLA (gauche : x2500, droite : x10000).....	194
Figure 51 : Observation au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés coaxiaux et multicouches (gauche : x1000 droite : x4000). Flèches : irrégularités dans le diamètre des fibres.....	195
Figure 52 : Diamètre moyen des fibres des différents scaffolds électrospinnés.....	196
Figure 53 : Analyse par EDX de la composition d'un scaffold PVA20, superposition des mesures en 3 points différents après normalisation par le taux de carbone.....	198
Figure 54 : Analyse par EDX de la composition d'un scaffold PVA60, superposition des mesures en 3 points différents après normalisation par le taux de carbone.....	199
Figure 55 : Observation par microscopie électronique à transmission de la répartition des nanoparticules au sein des fibres de PVA.....	200
Figure 56 : Modules de Young des scaffolds électrospinnés mesurés sur échantillons secs (J0 sec, ** : p<0.01, *** : p<0.001).....	202
Figure 57 : Modules de Young des scaffolds électrospinnés mesurés sur échantillons secs ou humides (N.S. = Non significatif). ....	203

Figure 58 : Modules de Young des scaffolds électrospinnés mesurés sur échantillons secs ou humides avec effet de l'humidification (** : $p < 0.01$ , *** : $p < 0.001$ , N.S. = Non significatif). .....	204
Figure 59 : Angle de contact mesuré pour chaque scaffold électrospinné (** : $p < 0.01$ , *** : $p < 0,001$ ). .....	204
Figure 60 : Estimation de la porosité par analyse d'images pour les différents scaffolds électrospinnés et pour différents seuils de binarisation. ....	206
Figure 61 : Observations au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés à base de PVA après culture de CSM (C3H10T1/2) (gauche : x250/x150, droite : x1000). ....	213
Figure 62 : Observations au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés à base de PCL et PLA après culture de CSM (C3H10T1/2) (gauche : x250/x150, droite : x1000). .....	215
Figure 63 : Observations au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés coaxiaux et multicouches après culture de CSM (C3H10T1/2) (gauche : x250, droite : x1000). .....	216
Figure 64 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés à base de PVA (gauche : x10, droite x40/x63). Marquage des filaments d'actine par rhodamine/phalloïdine (rouge). ....	218
Figure 65 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés à base de PCL et PLA (gauche : x10, droite x40/x63). Marquage des filaments d'actine par rhodamine/phalloïdine (rouge). ....	219
Figure 66 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés coaxiaux et multicouches (gauche : x10, droite x40/x63). Marquage des filaments d'actine par rhodamine/phalloïdine (rouge). .....	220
Figure 67 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds PCLrandom (gauche) et PCLaligned (random). En haut : filaments d'actine, rhodamine-phalloïdine (rouge) et noyaux, DAPI (bleu), x40. Au milieu : Noyaux, DAPI (bleu), x40. En bas : Noyaux, DAPI (bleu), zone agrandie (carré blanc). .....	221
Figure 68 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds à base de PVA, PCL et PLA. Cellules vivantes (Calcéine AM, vert) et noyaux des cellules mortes (EthD-1, rouge), x10. ....	223

Figure 69 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés coaxiaux et multicouches. Cellules vivantes (Calcéine AM, vert) et noyaux des cellules mortes (EthD-1, rouge), x10. ....	224
Figure 70 : Expression des gènes liés à la lignée tendineuse (rouge) ou osseuse (bleu) après culture de C3H10T1/2 sur scaffolds électrospinnés de PVA et PLA (* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).....	226
Figure 71 : Expression des gènes liés à la lignée tendineuse (rouge) ou osseuse (bleu) après culture de C3H10T1/2 sur scaffolds électrospinnés à base de PCL (* : p<0.05, *** : p<0.001). ....	227
Figure 72 : Expression des gènes liés à la lignée tendineuse (rouge) ou osseuse (bleu) après culture de C3H10T1/2 sur scaffolds électrospinnés coaxiaux (* : p<0.05, ** : p<0.01). ....	228
Figure 73 : Expression des gènes liés à la lignée tendineuse (rouge) ou osseuse (bleu) après culture de C3H10T1/2 sur scaffolds électrospinnés de structure complexe (* : p<0.05, *** : p<0.001).....	229
Figure 74 : Chambre de culture du Bose Biodynamic démontée. A: bâti de la chambre, B: coulisses, C: vis de serrage des parois vitrées, D: parois vitrées, E: mors. ....	238
Figure 75 : Planning de la culture dynamique sur échantillons électrospinnés. ....	241
Figure 76 : Chambre de culture du Bose Biodynamic remplie de milieu de culture avec scaffold de PCL électrospinné. Le volume d'air conservé à l'intérieur permet la mise en place d'un filtre sur l'ouverture supérieure.....	242
Figure 77 : Exemple de validation du script d'analyse des données mécaniques. A : définition des signaux appliqués et mesurés simulés, B : résultats retournés par le script. ....	242
Figure 78 : Haut : Observation au microscope à fluorescence de MC3T3-E1 après culture sur PCL électrospinnées en conditions dynamiques (x10, gauche et x20, droite). Calcéine AM (vert, cellules vivantes) et EthD-1 (rouge, noyaux des cellules mortes). Bas : Marquage ALP de l'échantillon, les zones foncées correspondent à l'expression de l'ALP (contraste augmenté).....	243
Figure 79 : Evolution du nombre d'utilisations du terme « Tissue Engineering » dans les articles (titre, abstract et mots-clés) publiés de 1985 à 2014. Source : Scopus. ....	253
Figure 80 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) cultivées sur des scaffolds électrospinnés à base de PLA à différents plans focaux. Calcéine AM (cellules vivantes, vert), EthD-1 (noyaux de cellules mortes, points rouges) et rhodamine-phalloïdine (filaments d'actine, rouge continu, en bas).....	260

Figure 81 : Observation au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés PLA/coumarine (gauche : x250, droite : x1000).....	262
Figure 82 : Observations au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés PLA/coumarine après culture de CSM (C3H10T1/2) (gauche : x250, droite : x1000). .....	263
Figure 83 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés PLA/coumarine (gauche : x10, droite x40). Marquage des filaments d'actine par rhodamine/phalloïdine.....	263
Figure 84 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés PLA/coumarine. Cellules vivantes (Calcéine AM, vert) et noyaux des cellules mortes (EthD-1, rouge), x10. ....	264
Figure 85 : Exemple de résultats renvoyés par le script SCILAB d'analyse du signal mécanique (déformation appliquée et contraintes engendrées). ....	269
Figure 86 : Exemple de résultats renvoyés par le script SCILAB d'analyse du signal mécanique, zoom sur l'amplitude de la transformée de Fourier. ....	270

## Liste des tables

Table 1 : Variété des propriétés des biomatériaux influençant la réponse de l'hôte et principales caractéristiques de cette réponse. Adapté d'après Williams <i>et al</i> <sup>35</sup> .....	33
Table 2: Résumé des paramètres d'un montage d'électrospinning.....	63
Table 3 : Âge et sexe des donneurs des CSM utilisées .....	105
Table 4 : Paramètres de production des différents scaffolds électrospinnés. ....	111
Table 5 : Protocole d'utilisation des différents milieux lors des cocultures en cassette. ....	113
Table 6 : Marqueurs fluorescents utilisés pour l'analyse biologique.....	116
Table 7 : Primers utilisés pour l'analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR à l'issue de la coculture en cassette (Laboratoire LNPC).....	119
Table 8 : Primers utilisés pour l'analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR à l'issue de la culture sur scaffolds électrospinnés (UPMC).....	120
Table 9 : Comparaison des résultats obtenus avec les CSM de chacun des 6 donneurs étudiés. Résultats conformes aux attentes (vert) ou présentant des limites vis-à-vis de la perspective d'utilisation clinique (rouge).....	185
Table 10 : Liste des polymères électrospinnés étudiés.....	191
Table 11 : Articles cités au chapitre 1 caractérisant et exploitant des fibres électrospinnées.....	210
Table 12 : Comparaison entre les différents scaffolds électrospinnés et paramètres analysés correspondant.....	230
Table 13 : Bilan des propriétés principales des scaffolds électrospinnés étudiés. Le potentiel zeta est tiré de la littérature et concerne les polymères purs.....	231
Table 14 : Pluridisciplinarité de l'ingénierie tissulaire et variété des organes et tissus cibles. Adapté de <sup>6,236</sup> .....	254
Table 15 : Variation des taux de résorption de différents CP en fonction de leur composition chimique. D'après Szpalzki <i>et al</i> <sup>53</sup> .....	257
Table 16 : Comparaison des propriétés mécaniques de l'HA, de plusieurs bioverres et de l'os natif. D'après Rezwan <i>et al</i> <sup>36</sup> .....	258

## Remerciements

Je ne peux que commencer par remercier sincèrement mes deux directeurs de thèse, Cécile Legallais et Fahmi Bedoui, pour m'avoir permis d'étudier ce sujet et de réaliser mon doctorat dans les meilleures conditions. J'ai trouvé dans leur encadrement l'équilibre entre autonomie, liberté de choix et réponse immédiate à mes interrogations que j'espérais pour mon travail. Je leur sais gré de leur confiance tout au long de ces trois ans.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner le résultat final de mes recherches. Un grand merci aux Dr. Joëlle Amédée et Pr. Guy Schlatter, tous deux rapporteurs, pour leur relecture et leurs remarques pertinentes. Merci également au Pr. Christophe Eglès pour sa disponibilité (et ses bons mots) ainsi qu'au Pr. Bernard Devauchelle avec qui les discussions furent à chaque fois extrêmement enrichissantes.

Les premiers mois de la thèse m'ont permis de découvrir et d'apprendre à maîtriser de nombreuses techniques qui m'étaient inconnues, et l'aide des membres du laboratoire BMBI me fut très précieuse pour pouvoir me lancer rapidement dans les expérimentations. Je remercie tout particulièrement Murielle Dufresne et Ulysse Pereira pour leurs nombreux conseils en culture cellulaire, Patrick Paullier pour être prompt à nous dépanner en toutes circonstances, ainsi que Marie Naudot et Vittoria Pandolfi, notamment pour leurs précisions sur les marquages fluorescents. Merci également à Quentin Dermigny pour les formations à l'utilisation des machines mécaniques, à Isabelle Pezron pour l'accès aux mesures d'angle de contact et à Frédéric Nadaud du SAPC pour les (très) nombreuses images des feuillets osseux. Thibault Bricks, Rachid Jellali, Tony Dinis et Jérémy Hamon m'ont également apporté leur aide pour, respectivement, des techniques d'analyse biologique, la microfabrication, l'électrospinning et la conduite de raisonnements alambiqués. Je les en remercie.

Ce travail fut l'occasion de réaliser de nombreuses expériences en collaboration, et d'échanger savoir-faire et nouvelles idées. Merci au Pr. Jean-Pierre Marolleau, à Hicham Bouhlal et Sébastien Dupont de l'UPJV pour la mise en place des cultures de cellules souches, ainsi qu'à Damien Bresson et Stéphanie Dakpé pour leurs remarques sur la manipulation des échantillons électrospinnés. Je souhaite remercier également l'équipe de Biologie du



Développement de l'UPMC, Delphine Duprez et surtout Ludovic Gaut pour sa rigueur et sa clarté. J'ai eu la chance de pouvoir me rendre à l'Institut Für Mehrphasenprozesse de l'Université d'Hanovre pour un échange qui fut agréable et fructueux, un grand merci au Pr. Glasmacher, à Marc Müller, Sara Knigge et à toute l'équipe de l'IMP - et au programme d'échange yESAO !

Ce sont tout simplement ses membres qui ont fait de mon passage au laboratoire BMBI une très bonne expérience. Merci donc à vous tous, permanents ou non, thésards ou ex-thésards, Audrey, Perrine, Sarah, Eric, Anne-Virginie, Pascale, Jean-Luc, Vanessa, Muriel, Alexandra, Kamelia, Olfat, Kayla et Biao, ainsi qu'à Catherine Lacourt, Alexandra Cousin et Myriam Sawezyn, mais aussi toutes les personnes déjà citées un peu plus haut, pour leur sympathie et leur accueil. Je remercie Anne le Goff pour son aide dans la préparation des travaux pratiques. Je tiens également à exprimer toute ma gratitude aux étudiants en stage qui m'ont épaulé pour certaines phases expérimentales. Guillaume Medina, Arthur Douillet, Anaïs Balland et Angela Hüpkes, vous avez contribué à tracer la route vers plusieurs résultats de ce manuscrit.

Enfin, et même s'il est plus difficile de mettre des mots sur la façon dont ils m'ont aidé chacun à leur manière à tenir le cap, mes pensées vont vers mes proches, vers mes parents et amis, pour leur soutien et leur présence ; merci à Marianne, merci à Chorut's, merci aux volleyeurs du mercredi soir.

Je conclurai en remerciant Jorge Cham, Randall Munroe, Bill Watterson, Walter Bishop et la Bouletcorp pour avoir fréquemment attisé ma curiosité et mon enthousiasme.

# Chapitre 1 : Bibliographie

---

# Chapitre 1 : Bibliographie

## I. Contexte et domaine d'étude

### 1) Contexte historique : des Gueules Cassées à la greffe du visage

#### ***Les Gueules Cassées***

L'évolution de l'armement et la mise en place d'une guerre de tranchées, où la tête se trouvait être la partie du corps principalement voire exclusivement exposée, ont conduit à l'apparition d'un nombre important de blessures au visage lors de la première guerre mondiale<sup>1,2</sup>. Parallèlement, les progrès de la médecine permettaient de soigner les défigurés, c'est-à-dire de les maintenir en vie et d'empêcher la propagation d'infections, quand de tels traumatismes les auraient emportés au siècle précédent. Ils furent ainsi 6,5 millions d'invalides à demeurer en vie en Europe dont 300 000 « mutilés à 100% » (aveugles, amputés ou gravement défigurés)<sup>1</sup>. Mais il était alors impossible d'aller plus loin, et au-delà des soins, de reconstruire le visage : celui-ci gardait à jamais de profondes séquelles.

Ils durent alors subir le regard des autres, constamment soumis à une évaluation sociale<sup>3</sup>, tout en souffrant d'autres formes de dénigrement. Ils étaient sans emploi, leur quotidien entrecoupé par des opérations multiples, et ne bénéficiaient pourtant d'aucune aide, leurs blessures n'étant pas considérées comme une infirmité permettant l'accès à une pension d'invalidité<sup>1</sup>. L'Union des Blessés de la Face fut alors fondée en 1921 par Bienaimé Jourdain et Albert Jugon, deux « Gueules Cassées », afin de promouvoir la solidarité entre ces anciens soldats, le souhait de revendiquer leur humanité et d'assurer à tous une vie digne même sans aide de l'état (leur tombola deviendra Loterie Nationale puis Française des Jeux, dont l'association possède toujours 9,2% des parts)<sup>4</sup> (Figure 1).

En effet, au-delà des soins, et soulignant déjà l'importance d'une reconstruction du visage plus développée, se dessinaient les enjeux majeurs que sont l'identité et la dignité.



**Gueules Cassées**  
**Sourire Quand Même**

Union des Blessés de la Face et de la Tête  
Fondation des "Gueules Cassées"

Figure 1 : L'Union des Blessés de la Face et de la Tête, dits « Gueules Cassées »<sup>1</sup>

## **Aujourd'hui**

Outre les conflits qui perdurent encore aujourd'hui, de graves blessures au visage peuvent survenir suite à des accidents de la route, des accidents domestiques (incendies, morsures d'animaux), des déformations congénitales ou après le retrait de tumeurs. La reconstruction du visage est alors nécessaire pour ne pas souffrir d'un handicap social et accepter sa propre guérison<sup>5,6</sup> : « sans visage, on n'est rien », affirmait la toute première greffée du visage dont l'opération a eu lieu en novembre 2005 à Amiens, par l'équipe du professeur Devauchelle<sup>7</sup>. Comme le résume ce dernier, c'est à un triple niveau que la reconstruction travaille à redonner son identité au patient<sup>7</sup> :

- L'identité comme « ressemblance du sujet par rapport à lui-même en dépit des accidents du temps »,
- L'identité comme « appartenance au groupe dans le respect des normes qui le définissent, le rendant ainsi semblable au visage des autres, anonyme et non plus exception »,
- L'identité comme « ensemble des traits qui déterminent le caractère unique d'un individu, son impossible confusion avec l'autre ».

Tenter de répondre à cette problématique par une greffe de visage semble paradoxal, car c'est le visage d'un autre, celui du donneur, qui pourrait venir se substituer à l'identité première décrite par ces points<sup>7</sup>. Il convient en réalité de différencier la face, c'est-à-dire la structure anatomique formée de peau, de muscle et d'os, du visage, c'est-à-dire l'apparence de la personne et ses expressions<sup>3,8</sup>. Jérôme Hamon, premier patient à recevoir une greffe totale de visage en 2010, expliquait que « derrière la maladie, on ne voyait pas mon visage, on me reprochait mon absence d'expression. Avec la greffe, je peux montrer mon visage »<sup>8</sup> : le visage lui-même n'était pas détruit ou abîmé, mais dissimulé<sup>8</sup>. Comme précisé dans l'avis 82

du Comité consultatif national d'éthique pour les Sciences de la Vie et de la Santé, « on ne greffe jamais un visage mais un tissu composite »<sup>2</sup>, on greffe une face pour redonner un visage.<sup>8</sup> Selon les définitions de l'identité vues ci-dessus, l'objectif est ainsi de restaurer chez le patient la face qui fera le moins obstacle à la manifestation personnelle de son propre visage<sup>8</sup>, alors même qu'on emprunte à un autre son signe d'identité le plus saillant<sup>3</sup>.

Il apparaît ainsi que la reconstruction doit être double : une peau souple d'une part, qui va se trouver modelée par les fondements de la structure d'autre part, à savoir les os de la face<sup>7</sup>. Ceux-ci peuvent avoir été endommagés eux-aussi, et des progrès sont donc nécessaires également dans ce domaine précis, la reconstruction des os de l'aire maxillo-faciale.\*<sup>1</sup>

## **Enjeux**

Soigner le tissu osseux de l'organisme dépasse le cadre de la reconstruction du visage. Au-delà des fractures dus aux accidents et les traumatismes balistiques<sup>2</sup>, les os peuvent être atteints par différentes pathologies telles que l'ostéoporose, la maladie de Paget, des cancers ou des inflammations<sup>9</sup>. Dans de nombreux cas, la guérison apparaît spontanément avec des interventions minimales (immobilisation)<sup>10,11</sup>. Mais lorsqu'une importante perte de matière osseuse apparaît, il y a alors un besoin crucial d'utiliser un substitut osseux, et ce pour un nombre croissant de cas<sup>12</sup>. Les dépenses liées à de tels substituts avoisinaient par exemple les 1.3 milliards de dollars aux Etats-Unis en 2010, chiffre qui devrait atteindre 2.3 milliards en 2017<sup>13</sup>. En France, pour la seule année 2011, plus de 42000 substituts ont été facturés principalement pour des cas de traumatismes et de maladies ostéo-articulaires, pour un total de 10 millions d'euros<sup>14</sup>. L'ostéoporose, qui touche notamment les femmes ménopausées, ne peut être traitée en elle-même par l'utilisation de substituts mais provoque en Europe des fractures chez une femme sur deux de plus de 65 ans<sup>15</sup> (soit 17% de la population actuelle<sup>12</sup>), mais aussi un tiers des hommes<sup>16</sup>. Le nombre de fractures, quelle qu'en soit la cause, atteint 850 000 par an au Royaume-Uni.<sup>15</sup> Le cas spécifique des os de la face présente plusieurs particularités, notamment dans le cas des malformations congénitales ou les anomalies de croissance, où l'on va souhaiter « redonner un visage » quand il n'existe aucun référentiel « d'avant »<sup>17</sup>. Le souhait d'une telle restitution intervient principalement concernant les

---

\*<sup>1</sup> Par souci d'alléger la lecture, on utilisera cependant dans le présent manuscrit indifféremment les termes « face » et « visage » pour rapporter les techniques utilisées.

séquelles de traumatismes, alors que la priorité sera donnée à l'ablation plutôt que l'esthétique dans le cas d'évolutions tumorales<sup>17</sup>.

Les enjeux de la reconstruction osseuse sont donc majeurs tant au niveau de l'individu que de la société, d'un point de vue humain comme économique. Dans le contexte spécifique de la reconstruction du visage, le développement de substituts peut permettre d'en améliorer la précision en aidant à remodeler les greffes de peau. Il devient alors possible, au-delà des soins, d'améliorer le bien-être du patient et de l'aider à recouvrer son sentiment d'identité. Greffer un visage n'est pas que combler un trou, il faut un lien sanguin, nerveux, musculaire ; deux chairs doivent s'entremêler et être solidaires<sup>17</sup>. Pour débiter, il convient de s'intéresser aux techniques actuelles de réparation des os et à leurs limites concernant ces aspects spécifiques.

## 2) Les techniques actuelles de la reconstruction osseuse

La greffe est aujourd'hui encore la méthode la plus couramment utilisée, le « gold standard »<sup>11,18,20</sup>. Cependant, de nouvelles approches sont à l'étude, comme l'utilisation de biomatériaux ou plus récemment l'ingénierie tissulaire osseuse. Avant de comparer ces différentes méthodes, certains termes méritent d'être précisément définis<sup>6,21</sup>.

- *Transplant* : Organe, tissu ou cellules transférés d'une zone de l'organisme vers un site différent au sein du même individu ou d'un autre. Dans le cas d'un organe, le transplant requiert de restaurer immédiatement la microcirculation. Dans le cas de cellules ou de tissus (un greffon), l'apport nutritif est assuré progressivement par le site récepteur après quelques jours.
- *Greffon* : Transplant de tissu ou de cellules retiré de son environnement nutritionnel naturel et dont l'apport nutritif est assuré, après transplantation, par les tissus environnants.
- *Greffe* : Procédé de transplantation qui inclut le prélèvement du tissu, sa préparation et sa mise en place dans le site récepteur.
- *Autogreffe* : Procédé de transplantation de tissu ou cellules d'un site de prélèvement vers un site récepteur appartenant tous deux au même individu.
- *Allogreffe* : Procédé de transplantation de tissu ou cellules d'un site de prélèvement vers un site récepteur sur un autre individu de la même espèce.

- *Xenogreffe* : Procédé de transplantation de tissu ou cellules d'un site de prélèvement vers un site récepteur sur un individu d'une espèce différente. La xéno greffe est dite concordante si les espèces sont proches d'un point de vue phylogénétique (ex : primates non-humain vers humain) et discordante si les espèces sont éloignées (ex : peau de cochon vers humain).
- *Transplant hétérotopique* : Transplant placé dans un site récepteur anatomiquement et fonctionnellement différent du site de prélèvement. Antonyme : Orthotopique.
- *Cellules parenchymateuses* : Cellules d'intérêt d'un greffon, aptes à remplir la fonction déficiente qui nécessite son utilisation, par opposition aux cellules de soutien (fibroblastes, macrophages, mastocytes, etc.).
- *Vascularisé* : Tissu parcouru par un ensemble de microvaisseaux alimentés en sang.
- *Néovascularisation* : Croissance de nouveaux vaisseaux dans une structure qui en est dépourvu depuis le site receveur.
- *Revascularisation* : Croissance de nouveaux vaisseaux dans un greffon depuis le site receveur, par la liaison avec des vaisseaux déjà formés, ou en envahissant des porosités ou la matrice extracellulaire (MEC) préexistantes.
- *Ischémie* : Condition dans laquelle les tissus vascularisés ne reçoivent plus de flux sanguin suffisant, ou les tissus non-vascularisés n'ont pas accès à une nutrition et une élimination des déchets suffisantes.

## **La greffe**

La catégorisation principale se fait suivant la source du greffon, c'est-à-dire l'espèce dont il est issu par rapport au receveur<sup>6</sup> (Figure 2). Dans une moindre mesure, il est également possible de classer les greffes en fonction du degré de vascularisation du greffon, de l'âge du donneur (principalement pour différencier les origines embryonnaires des donneurs adultes) ou de l'application visée (structure, propriétés mécaniques, fonction de l'organe, production d'hormones).<sup>6</sup>

Concernant les plus spécifiquement, c'est bien l'autogreffe qui demeure la technique principalement utilisée<sup>19,22</sup>, de façon globale comme pour la reconstruction du visage<sup>23</sup>. La matière osseuse est prélevée au niveau d'un site sain, principalement la crête iliaque, pour être déplacée vers le site à soigner présentant un défaut de masse<sup>22,24</sup>. L'emploi d'un tel greffon présente de nombreux avantages. Composé d'os natif de l'organisme, il présente une

composition chimique et une structure pertinente, permet l'implantation aussi bien de cellules parenchymateuse que de soutien, est un tissu mature à un stade de développement avancé et offre plus de stabilité dans le site récepteur<sup>6,19,22,25</sup>. Ses caractéristiques physiques, chimiques, mécaniques et biologiques sont de plus étudiées depuis des décennies<sup>26,27</sup>, et l'utilisation chez le même patient supprime le risque de réaction immunitaire<sup>6</sup> et donc le recours à un important traitement médicamenteux d'immunosuppression<sup>2,17</sup>.

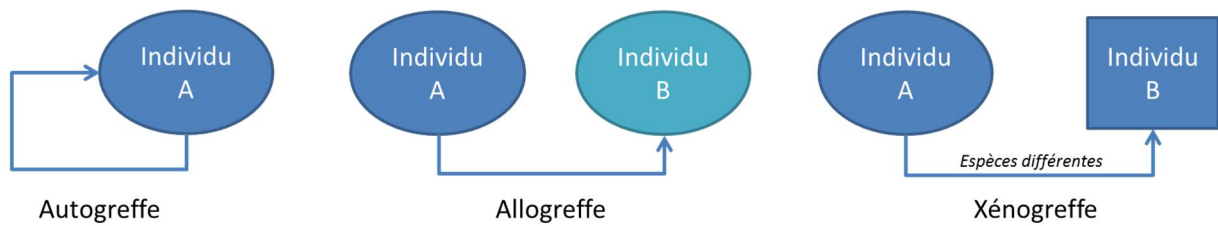


Figure 2 : Principe des différents types de greffe.

Si de nombreuses études mettent en avant un taux de succès supérieur ou égal à 90%<sup>22</sup>, cette méthode présente cependant plusieurs limitations. Un inconvénient majeur est la présence de deux sites chirurgicaux, le site de prélèvement et le site récepteur, dans un organisme potentiellement déjà affaibli par un accident ou une pathologie. Des risques de complications existent, notamment la morbidité du site donneur, des infections, des dommages causés aux nerfs, et la quantité disponible reste très limitée<sup>19,24,28,29</sup>. Il est possible de pallier ces aspects négatifs en ayant recourt aux allo- et xélogreffes, mais les problèmes sont alors d'ordre immunitaire (réaction de rejet face au greffon étranger, transmission d'infections<sup>30</sup>) voire réglementaire<sup>13</sup>. L'utilisation d'allogreffe est également liée à l'attente d'un donneur sain et compatible<sup>25</sup>, avec parfois des contraintes supplémentaires en fonction de l'application visée (contraintes morphologiques en cas de besoin d'un greffon de grande taille ou destiné à la surface du visage<sup>6</sup>). Pour tous comme pour les autres organes, les listes d'attente n'ont cessé de s'allonger au cours des dernières décennies<sup>11</sup>.

Pour tenter de s'affranchir de ces différentes limites, des biomatériaux, naturels ou synthétiques, sont couramment étudiés.

### ***Les biomatériaux pour le comblement osseux***

Un biomatériau est défini comme « une substance, ou une combinaison de substances (autres que des médicaments), naturelle ou synthétique, qui peut être utilisée pour traiter,



renforcer ou remplacer entièrement ou en partie tous tissus, organes ou fonctions de l'organisme, pour n'importe quelle durée »<sup>31,32</sup>. Les biomatériaux qui visent à compléter ou à se substituer aux autogreffes peuvent donc être d'origine naturelle ou synthétique<sup>14</sup>. En réalité, le terme de xéno greffe défini plus haut recouvre parfois (à tort, si l'on suit à la lettre cette définition) les cas des matériaux d'origine animale rendus non viables et débarrassés du matériel cellulaire<sup>14</sup>. Il s'agit principalement d'os d'espèce bovine décellularisé, mais aussi d'autres mammifères ou d'origines diverses (coraux par exemples)<sup>14</sup>. Les biomatériaux synthétiques sont eux fabriqués industriellement par des méthodes physico-chimiques variées. On s'intéressera ici aux avantages et inconvénients des biomatériaux utilisés pour le comblement de défaut osseux et le resurfaçage de zones abîmées, et non aux cas de prothèses entières telle la prothèse totale de hanche.

De nombreux biomatériaux étant commercialisés et cliniquement approuvés<sup>33</sup>, leur principal avantage va résider dans une disponibilité illimitée et immédiate<sup>30</sup>. Ils sont notamment répertoriés par la Haute Autorité de Santé<sup>14</sup>. Ils suppriment toute étape d'attente du greffon, ainsi que les complications liées au prélèvement d'une autogreffe vus plus haut, et peuvent présenter de nombreuses autres propriétés pertinentes.

### ***Cahier des charges du biomatériau osseux***

La grande variété de formes, de compositions et de structures des biomatériaux permet de répondre à un nombre important de besoins en fonction des zones et des pathologies à soigner. Cependant, la principale limite de l'usage des biomatériaux est qu'ils demeurent inertes et non-vivants au moment de leur implantation. Il existe une absence totale de vascularisation et de colonisation par les tissus<sup>10</sup> ; le substitut peut être vu comme un corps étranger et être rejeté ou encapsulé au lieu d'être intégré ; des complications et des infections peuvent également survenir<sup>34</sup>. Le biomatériau doit également concorder avec son environnement à des niveaux autres que biologique : il doit notamment présenter des propriétés mécaniques pertinentes pour éviter les descellements ou à l'inverse une hypertrophie des tissus environnants. Cette solution est donc principalement utilisée dans le cas de défauts mineurs ou directement au contact d'os sain et actif<sup>10</sup>. Tous ces inconvénients ne sont toutefois pas systématiques, et leur absence ou présence définit en fait l'enjeu majeur de l'utilisation de biomatériau : leur biocompatibilité. Sa définition principale est « la capacité d'un matériau à assurer une réponse appropriée de l'hôte dans le cas d'une application

spécifique »<sup>31</sup>. Cette définition est souvent complétée par une autre dite « négative », c'est-à-dire les effets que ne doit *pas* engendrer un matériau biocompatible.<sup>31,35</sup> Il est alors question de l'absence de réaction inflammatoire, immunogène, cancérigène et l'absence de toxicité (locale ou non)<sup>35</sup>. Cette définition traduit une attente qui est plutôt celle d'une biotolérance, voire d'une bioinertie<sup>36</sup> : l'organisme ne doit pas réagir à l'introduction du biomatériau. Cette définition ne permet donc pas de souligner les aspects positifs de la notion de biocompatibilité<sup>31</sup>, et l'attente à l'inverse d'une bioactivité<sup>35</sup> : il *doit* y avoir une réponse de l'organisme, mais celle-ci doit être pertinente et maîtrisée. Le biomatériau compatible doit pouvoir devenir une partie intégrante du tissu qu'il cherche à renforcer ou remplacer, en assurant sa fonction et en se rapprochant de propriétés spécifiques à l'application visée<sup>35</sup>.

Dans le cas des substituts osseux, la réponse cellulaire adéquate peut être résumée par les notions d'ostéoinduction, ostéoconduction et ostéointégration<sup>22,37</sup>.

- *Ostéoinduction* : capacité du matériau à recruter et à induire la différenciation en lignée osseuse des cellules immatures environnantes.
- *Ostéoconduction* : capacité du matériau à permettre la formation et la croissance de l'os à sa surface ou dans les porosités de sa structure.
- *Ostéointégration* : capacité du matériau à établir une connexion durable et fonctionnelle avec le tissu osseux environnant.

Ces trois propriétés sont donc liées et nécessaires pour soigner efficacement le tissu osseux : des cellules doivent être recrutées et aiguillées sur la voie osseuse (ostéoinduction) afin de former un nouveau tissu osseux (ostéoconduction) fonctionnel et ancré au matériau (ostéointégration)<sup>37</sup>. Toutes ces fonctions sont naturellement assurées par les autogreffes<sup>10</sup>, et le développement des biomatériaux cherche donc à s'en rapprocher.

Pour compléter le cahier des charges du biomatériau le plus pertinent, d'autres paramètres doivent être pris en compte. Siège des interactions avec l'environnement, la surface va jouer un rôle important à de nombreux aspects, comme sa composition chimique, sa rugosité, sa porosité ou le ratio surface/volume<sup>30,35</sup>. Un enjeu majeur concerne la vitesse de dégradation du biomatériau dans l'organisme après son implantation. Le terme de « biodégradation » indique que le matériau va être graduellement détérioré par l'activité biologique environnante<sup>31,38</sup>. Si la disparition est à terme totale, y compris pour les produits de dégradation sans effets secondaires à proximité ou dans un autre site de l'organisme, on parle alors de « biorésorption »<sup>31,38</sup>. La vitesse de disparition progressive par rapport à la

croissance du tissu néoformé et la question de sa résorption totale doivent être étudiées afin de permettre au biomatériau de jouer son rôle de support et d'apporter au site à soigner les propriétés énoncées ci-dessus, tout en permettant aux tissus vivants de se développer jusqu'à remplir seuls leurs fonctions<sup>38</sup>.

Il convient d'étudier le comportement du biomatériau à différents niveaux, au-delà de la réponse directe de l'hôte : notamment, le maintien des propriétés et des fonctions après la stérilisation est crucial et doit être analysée pour les différentes méthodes existantes et disponibles<sup>30,33</sup>. D'autres propriétés importantes des biomatériaux, tout comme les principales caractéristiques de la réponse de l'hôte, sont résumées dans la Table 1.

Propriétés influençant la réponse de l'hôte	Caractéristiques de la réponse de l'hôte
Composition, structure, morphologie	Adsorption et désorption des protéines
Cristallinité, cristallographie	Effets cytotoxiques
Propriétés élastiques	Activation des neutrophiles
Teneur en eau, hydrophilie/hydrophobie	Activation des macrophages
Composition chimique de surface	Fibrose
Topographie de surface	Changements microvasculaires
Energie de surface	Réponse spécifique du tissu cible
Propriétés électriques de surface	Cascade de coagulation
Corrosion (métaux)	Adhésion, activation et agrégation des plaquettes
Profils et produits de dégradation (polymères, céramiques)	Réponse immunitaire, production d'anticorps
	Hypersensibilité aigue ou retardée
	Réponse mutagène, génotoxicité
	Reprotoxicité
	Formation de tumeurs

Table 1 : Variété des propriétés des biomatériaux influençant la réponse de l'hôte et principales caractéristiques de cette réponse. Adapté d'après Williams *et al*<sup>35</sup>.

Les techniques actuelles visant à soigner les défauts de masse osseuse sont donc couramment utilisées et bien maîtrisées, mais certaines limites intrinsèques soulignent un besoin de les améliorer<sup>15</sup> ou de les combiner<sup>19</sup>, en y incluant un prélèvement de cellules<sup>39</sup>,

amenant au concept d'ingénierie tissulaire qui sera détaillé plus bas. Pour aller plus loin, il faut analyser précisément les besoins spécifiques de la reconstruction du visage.

### 3) La zone maxillofaciale et les attentes des chirurgiens

#### **Les spécificités**

Les os du visage présentent une géométrie particulièrement fine et complexe, avec une grande variété de formes et de structures<sup>6</sup>. Cette variabilité se retrouve également entre les individus, et d'autant plus d'une blessure à l'autre, et il existe donc autant de géométries différentes que de cas à soigner<sup>40</sup>. Comme vu précédemment, au-delà des fonctions biologiques à recouvrer, l'enjeu est également de pouvoir approcher ces formes spécifiques au plus près de leur état initial afin que la peau, replacée par-dessus, puisse redessiner les traits du visage du patient<sup>7,23</sup>. Le résultat final doit être suffisamment souple et dynamique pour permettre la réapparition des mimiques faciales<sup>41</sup>.

Cette importante variabilité peut devenir elle-même une limite à la réalisation de l'acte chirurgical, au même titre que les risques d'infection ou la morbidité des sites donneurs<sup>42</sup>. Il est donc crucial que les praticiens, utilisateurs finaux des substituts et des thérapies développées, soient au cœur du processus décisionnel amenant au développement d'une nouvelle méthode<sup>15</sup>.

#### **Les attentes des chirurgiens**

Les aspects cliniques de la reconstruction du visage, au-delà du cahier des charges des biomatériaux défini plus haut, vont amener un certain nombre d'attentes plus spécifiques permettant d'assurer la faisabilité et la pérennité de l'acte chirurgical.

Dans un premier temps, il est nécessaire que le substitut osseux à implanter (qu'il soit issu d'un greffon ou d'un biomatériau) soit malléable et manipulable. En effet, nous avons souligné l'extrême variabilité des défauts qui peuvent survenir, et la complexité de leur géométrie. Il est donc nécessaire que les praticiens puissent adapter le substitut *in situ* à la forme précise de la zone à soigner<sup>6</sup>. Celui-ci doit cependant présenter une certaine cohésion mécanique, pour rendre la prise en main possible<sup>15</sup>, mais également pour en assurer le maintien après l'opération<sup>22</sup>. Ce besoin peut se relier au choix de la vitesse de dégradation :

par exemple, il a été noté que l'os issu de la crête iliaque (couramment utilisé dans les cas d'autogreffe comme vu plus haut) se résorbe à un rythme trop rapide pour laisser le temps au nouveau tissu de se reformer et de s'intégrer aux zones lésées<sup>28</sup>. Il y a donc un équilibre complexe à obtenir entre la souplesse et l'adaptabilité d'une part, la cohésion mécanique et la stabilité d'autre part.

Un autre défi clinique est celui de la vascularisation du substitut<sup>10</sup>. Dans le cas de l'utilisation de biomatériaux seuls, un des inconvénients majeurs pouvant mener à une morbidité locale et un échec des soins, est la difficulté pour les microvaisseaux de recoloniser la zone pour alimenter le tissu néoformé qui tente de s'y développer de façon adéquate et fonctionnelle<sup>43,44</sup>. L'os natif, quel que soit son mode de formation (voir plus bas), est en effet irrigué par de nombreux capillaires sanguins<sup>45</sup>. Sans cette vascularisation, qui permet notamment la diffusion du liquide interstitiel, la perfusion sanguine et l'évacuation des déchets cellulaires, le substitut (matériau ou greffon) ne peut pas être intégré de façon pérenne à l'organisme et au tissu vivant environnant<sup>10,43</sup> et sa viabilité à long terme est donc compromise<sup>44</sup>. Ce risque est particulièrement important dans les échantillons épais et en trois dimensions, la diffusion naturelle initiale n'étant pas possible au-delà de 200 µm d'épaisseur de matrice<sup>10,19,46</sup> et la mort cellulaire survient alors rapidement par hypoxie au centre de l'implant<sup>43,47</sup>. Ce besoin est moins important pour des comblements de très faible taille<sup>48</sup>.

De façon logique, une autre attente des chirurgiens concerne la minimisation des risques de rejets et de transmission d'infection<sup>10,11,19,49</sup>, aussi bien dans le cas des greffes que pour les matériaux préparés juste avant l'utilisation comme les ciments<sup>33</sup>.

Enfin, le dernier besoin est celui de solutions disponibles à la demande et à tout moment<sup>10</sup>. Nous avons déjà évoqué plus haut le problème du stock disponible, dans le cas de l'autogreffe (quantité limitée et risques liés au second site chirurgical<sup>10,24</sup>) ou de l'allogreffe (augmentation constante du nombre de patient en attente de donneurs<sup>11,25</sup>). Celui-ci se pose en d'autres termes lorsqu'il est question de l'utilisation de substituts synthétiques commercialisés : l'enjeu est celui d'une solution non seulement disponible en quantité illimitée, mais aussi sous une forme standard applicable à toute géométrie de défaut osseux<sup>10</sup>. On voit ici que les différentes attentes des praticiens sont liées entre elles, puisqu'on retrouve ainsi le besoin d'un substitut malléable qui va être adapté au cas par cas entre leurs mains. Le cahier des charges du substitut osseux adéquat est donc à la fois biologique, mécanique et clinique. Pour permettre à tous ces aspects de se recouper, au-delà des greffes et des

biomatériaux utilisés indépendamment, la technique de l'ingénierie tissulaire a été développée.

## II. Os et ingénierie tissulaire

On trouvera en annexe un historique détaillé du concept général de l'ingénierie tissulaire.

En pratique, l'ingénierie tissulaire est un cycle<sup>50,52</sup> (Figure 3). Dans un premier temps, un échantillon de cellules saines est prélevé de l'organisme, dans l'idéal chez le patient à soigner *in fine*. Les cellules d'intérêt sont sélectionnées puis amplifiées *in vitro* dans des conditions de culture cellulaire classiques, puis sontensemencées sur un support de culture particulier, dit *scaffold*. Celui-ci va contribuer, combiné aux autres signaux de l'environnement perçus par les cellules, à former un tissu présentant le type cellulaire, les fonctions, la structure et la forme souhaitée. Ce substitut reconstruit est alors réimplanté dans le site à soigner<sup>48,50</sup>.

Pour adapter ce cycle à toutes les applications, il y a donc trois acteurs en jeu : l'échantillon cellulaire, le support de culture et l'environnement cellulaire, tous trois regroupés au sein d'un bioréacteur<sup>48,53</sup>. Dans son principe général et idéal, l'ingénierie tissulaire donne d'ores et déjà quelques éléments de réponse aux problématiques liées aux attentes des cliniciens : le prélèvement d'un échantillon de cellules est une opération moins lourde qu'un site de prélèvement de tissu et le processus peut démarrer dès que nécessaire pour soigner le patient. Utiliser le potentiel de régénération et de remodelage de l'os, ce que font les chirurgiens depuis des décennies, rend envisageable et pertinent l'application du principe d'ingénierie tissulaire au tissu osseux<sup>6</sup>. Pour cela, il convient tout d'abord de rappeler brièvement quelques propriétés de l'os, avant de s'intéresser plus précisément à ses mécanismes de croissance que l'on va chercher à reproduire *in vitro* par l'utilisation de cellules, *scaffolds* et bioréacteurs propres à l'ingénierie tissulaire osseuse.

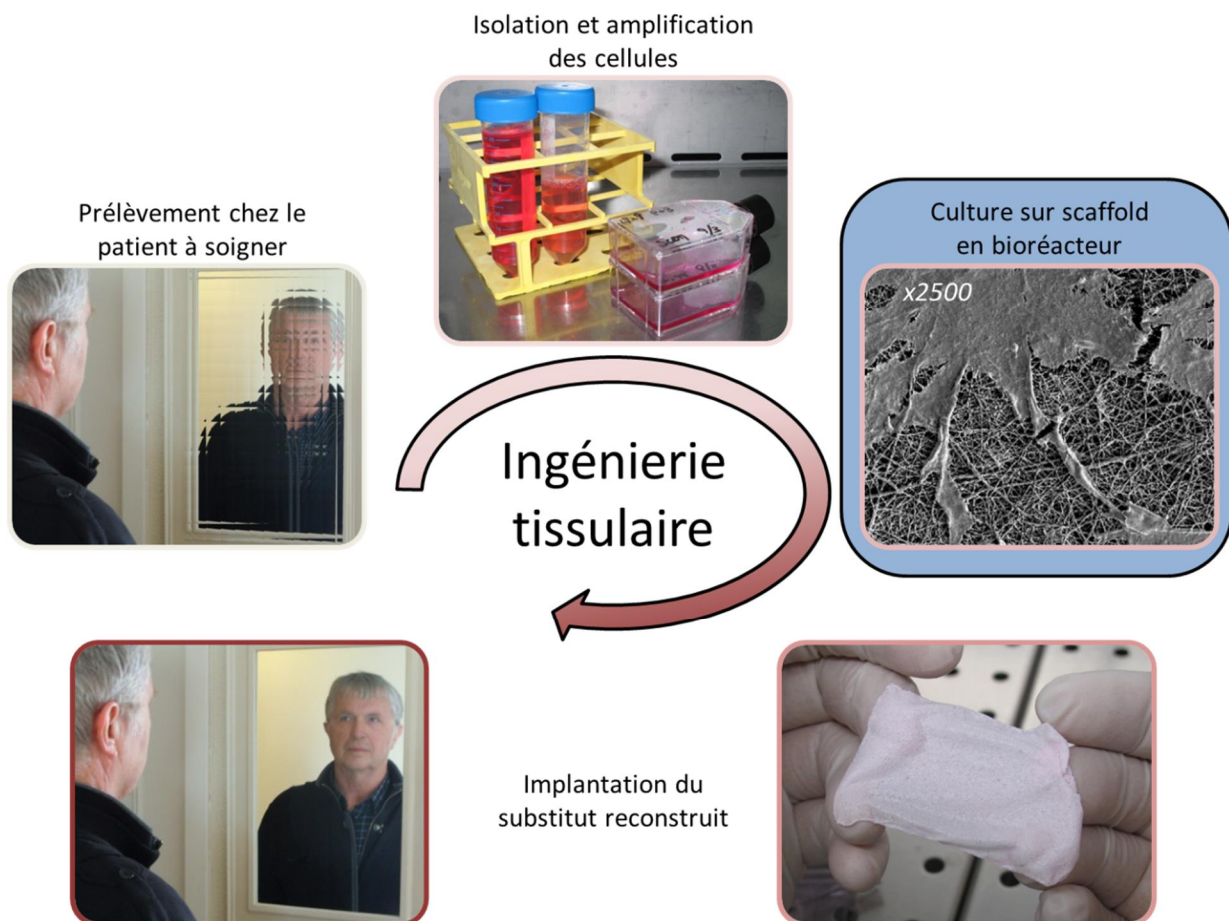


Figure 3 : Cycle général de l'ingénierie tissulaire. Adapté de <sup>50652</sup>

## 1) Croissance et remodelage osseux

### **Fonctions et composition de l'os**

L'os est un tissu vivant hautement vascularisé et minéralisé<sup>19</sup>. A l'échelle de l'organisme entier, il forme le squelette, composé de plus de 200 os<sup>54</sup>, dont les fonctions sont multiples. Il est indispensable pour assurer maintien, mouvement et protection des organes, mais il est aussi un important lieu de stockage de minéraux qu'il peut stocker ou relarguer rapidement, assurant notamment l'homéostasie du sang en ions calcium<sup>54</sup>.

Afin d'assurer ces fonctions variées, le tissu osseux présente de nombreuses structures et formes différentes. Pour le visage, les os irréguliers (mâchoire) et plats (crâne) vont nous intéresser particulièrement<sup>54</sup> (Figure 4).

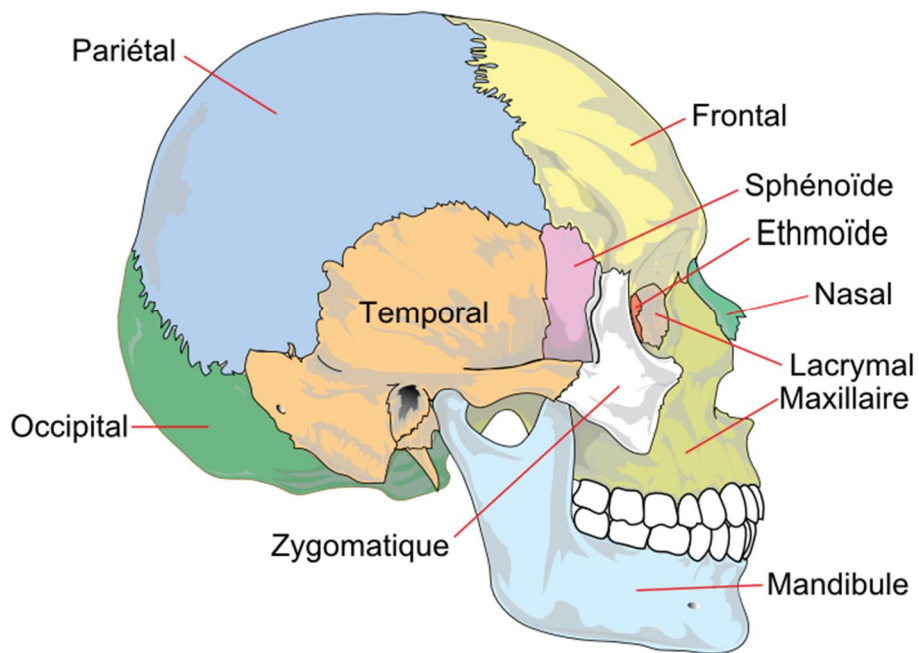


Figure 4 : Os des zones crânielles et maxillo-faciales. Domaine public.

On peut également séparer l'os cortical ou compact de l'os spongieux ou trabéculaire. Le premier constitue la partie solide du tissu osseux, dense et résistante, hautement minéralisée, donne faible porosité (<10%)<sup>19</sup> et aux importantes propriétés mécaniques (module de Young de 16-20 GPa)<sup>55</sup>. La structure spongieuse représente quant à elle les couches internes des os.<sup>55</sup> Nettement plus poreuse, moins dense, elle abrite la moelle, est hautement cellularisée<sup>22</sup> et possède des propriétés mécaniques moindres (4,6 à 15 GPa)<sup>55,56</sup>. A l'échelle du squelette, la proportion est de 80% d'os cortical pour 20% d'os spongieux, ce ratio variant drastiquement d'un type d'os à l'autre<sup>54</sup>.

L'os, dans sa partie inerte, est composé d'une matrice à la fois minérale (50 à 70%) et organique (20 à 40%), ainsi que d'eau (5 à 10%) et de lipides (environ 3%)<sup>19,54</sup>. La partie minérale est essentiellement constituée de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite (HA) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )<sup>54</sup>. Des protéines telles que le collagène (type I, composant organique principal à 90%<sup>57</sup>), des glycoprotéines (ostéonectine), la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéocalcine (OCN) et l'ostéopontine (OPN) qui permettent de lier et réguler la formation des cristaux<sup>19,54</sup> ainsi que des enzymes comme la phosphatase alcaline (PAL), sont caractéristiques de cette matrice.



Dans le cadre spécifique de la reconstruction des os de la face, et suivant les attentes des cliniciens, l'objectif ne sera pas de chercher à retrouver des fonctions et des propriétés « macroscopiques » (rôle de protection, maintien, propriétés mécaniques de l'os cortical), mais de reproduire par l'ingénierie tissulaire ses mécanismes cellulaires de croissance.

### ***Renouvellement, remodelage et mécanotransduction***

L'os est un tissu dynamique en constant renouvellement. Il subit à tout instant les actions opposées<sup>58</sup> de deux types cellulaires, les ostéoclastes (responsables de sa résorption) et les ostéoblastes (responsables de sa formation)<sup>54,59,60</sup>, ces derniers pouvant être immobilisés au sein de la matrice osseuse sous forme d'un troisième type, les ostéocytes<sup>61</sup>. Bien que totalement différents, nous allons avoir qu'ils sont tous en constante interaction pour maintenir un équilibre entre les deux phénomènes<sup>59,60</sup>. Ce sont ainsi 2 à 3% de la masse osseuse qui sont renouvelés chaque année chez un adulte sain<sup>60</sup> dans le but de maintenir les propriétés mécaniques du tissu<sup>54</sup>, l'équilibre de l'homéostasie<sup>54,62</sup> et de réparer les microdommages dus à une activité normale (marche, etc)<sup>62</sup>. Le processus consiste en la destruction de volumes discrets du tissu osseux, leur remplacement par une matrice néoformée puis sa minéralisation<sup>54</sup>, selon 4 phases successives (Figure 5). Le dérèglement de ces phases, à l'origine de pathologie comme l'ostéoporose, a ainsi été précisément étudié<sup>9,59,63,64</sup>.

- *Activation* : le renouvellement débute à de nombreux endroits de façon régulière et aléatoire<sup>54</sup>, mais peut aussi correspondre à un besoin de réparation particulier activé par la mort par apoptose ou nécrose d'ostéocytes<sup>60</sup>, qui délimitent alors la zone à renouveler<sup>62</sup>. Ce sont les ostéoblastes qui, en libérant différents facteurs, vont recruter des précurseurs d'ostéoclastes pour activer la résorption<sup>58,62</sup>.
- *Résorption* : Les préostéoclastes sont issus de monocytes macrophages<sup>54,63</sup>. Ils se lient à des protéines de la matrice osseuses pour former une cellule multinucléée qui va délimiter la zone (ou compartiment) à résorber<sup>54</sup>. Cette cellule constitue l'ostéoclaste<sup>62,63</sup>. Son fonctionnement peut être rapproché de celui des « foreign body giant cells » formées par les macrophages classiques, mais plus complexe et spécialisé, notamment par sa capacité à polariser localement l'os pour favoriser sa dégradation<sup>63</sup>. Un à deux millions de ces compartiments sont constamment présents

- chez l'adulte<sup>9</sup>, cette étape s'étalant sur 2 à 4 semaines<sup>9,54</sup>. Elle s'achève avec l'apoptose de la cellule géante et une finalisation par des monocytes à simple noyau<sup>54</sup>.
- *Inversion* : A l'issue de la résorption, on trouve donc localement des monocytes, des ostéocytes libérés de la matrice et des préostéoblastes<sup>54</sup>. Cette population, le changement local de répartition des contraintes dans le tissu osseux<sup>54</sup> ainsi que les facteurs<sup>62</sup> et ions<sup>63</sup> relargués par la dégradation aboutissent au recrutement des ostéoblastes. Des sous-groupes de ce type cellulaire vous répondre spécifiquement à certains de ces différents signaux (hormones, cytokines, contraintes, etc.)<sup>54</sup>.
  - *Formation* : Etape la plus importante dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. Pendant 4 à 6 mois<sup>9,54</sup>, les ostéoblastes synthétisent collagène et phosphate de calcium afin de reconstituer une nouvelle matrice dans la zone résorbée<sup>54</sup>. Les cellules matures qui se retrouvent entourées et piégées dans cette matrice deviennent des ostéocytes, connectés entre eux et à la surface (aux ostéoblastes et aux cellules bordantes qui recouvrent l'os<sup>61</sup>) par un réseau canaliculaire et des jonctions gap grâce à leurs longs filopodes<sup>54,62,64</sup>. Il résulte de cette phase la formation d'un ostéon<sup>54</sup> (ou demi-ostéon dans le cas de l'os spongieux<sup>18</sup>), également appelé système haversien<sup>55</sup>. Les ostéocytes peuvent alors vivre plusieurs décennies dans les zones non renouvelées<sup>54</sup> (contre 1 mois pour les autres ostéoblastes matures<sup>65</sup>) et forment ainsi la majorité des cellules vivantes de l'os à hauteur de 95%<sup>61</sup>.

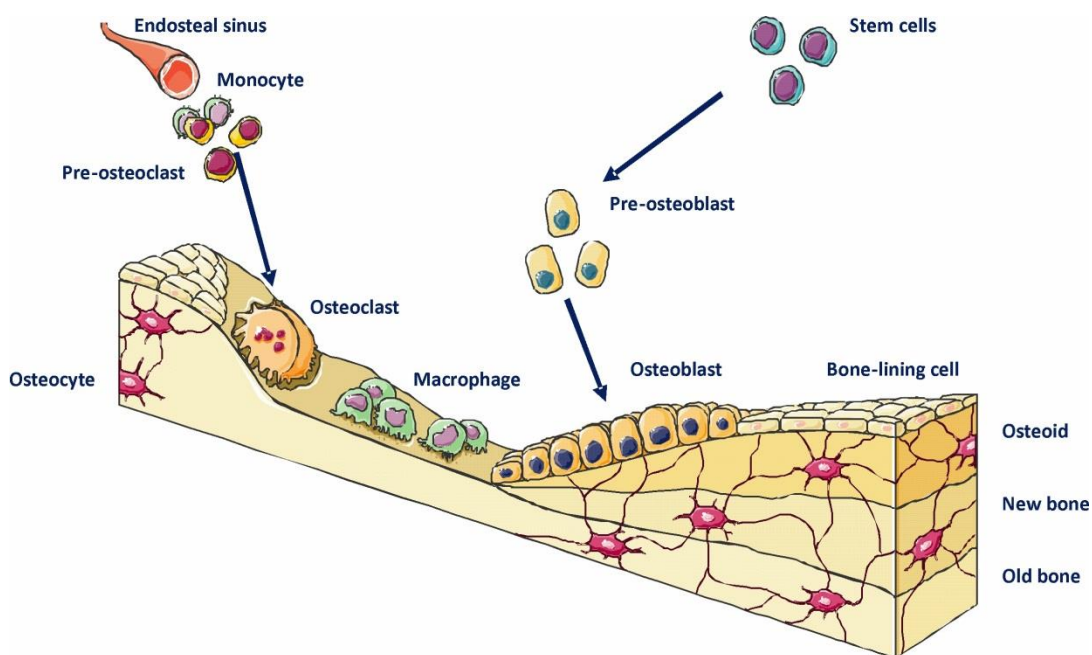


Figure 5 : Les différents acteurs du renouvellement osseux. D'après Stepien *et al*<sup>66</sup>.

Au-delà de ce renouvellement normal et permanent qui maintient les fonctions de l'os, il peut survenir un remodelage spécifique pour s'adapter aux variations des contraintes mécaniques appliquées à l'os. Ce phénomène a été constaté très tôt<sup>26</sup> et détaillé dès 1892 avec les travaux de Julius Wolff<sup>67</sup>, qui va donner son nom à la loi qui le décrit. Il se définit comme le procédé par lequel la forme générale de l'os va être ajustée graduellement en réponse à des influences physiologiques ou des forces mécaniques<sup>54</sup>. Même si toutes les hypothèses émises par J. Wolff ne se sont pas avérées exactes<sup>68</sup>, l'idée générale s'est imposée : masse et architecture des os sont gouvernées en partie par des mécanismes sensitifs qui s'adaptent à l'environnement mécanique<sup>68</sup>. Le tissu osseux se modifie en fonction des contraintes qu'on lui applique, ce qui a été régulièrement noté concernant les voyages des astronautes en apesanteur ou microgravité<sup>69</sup> ou, plus proche de notre quotidien, suite à des périodes d'immobilisation ou d'activité prolongées<sup>64</sup>. Le terme de « mechanostat », par analogie avec les thermostats, a été proposé par H. Frost<sup>70</sup> (Figure 6). Il décrit qu'une fenêtre de valeurs physiologiques des contraintes perçues ne fait intervenir que le renouvellement osseux standard, mais que s'en écarter induit des changements de masse et de structure en conséquence<sup>68</sup> pour remodeler l'os jusqu'à des propriétés mécaniques optimales<sup>62</sup>.

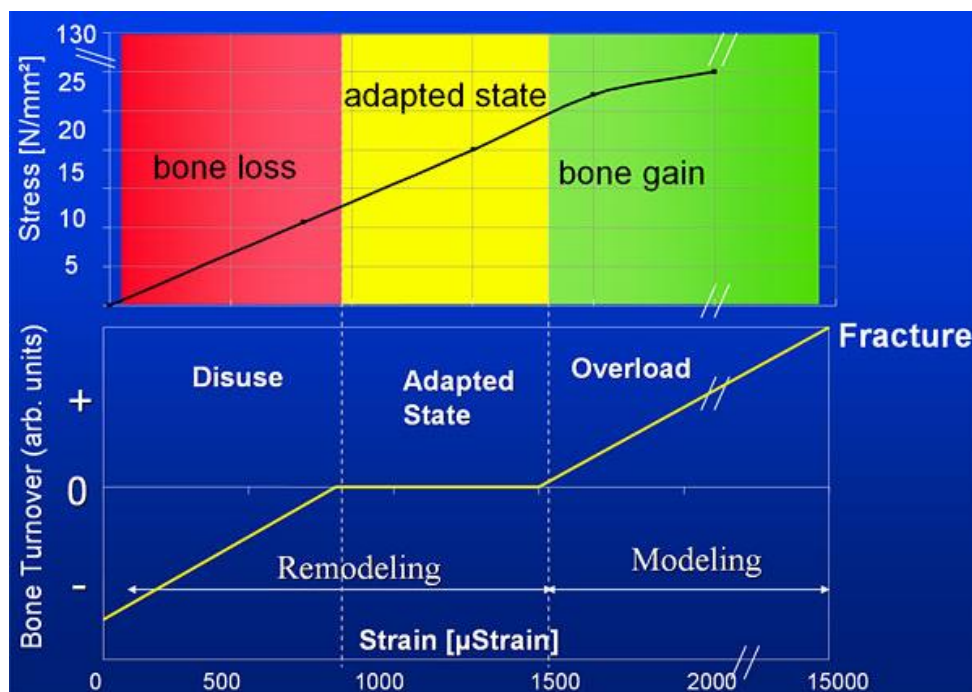


Figure 6 : Principe du mechanostat. Adapté de Frost<sup>70</sup>, domaine public.

Le mécanisme par lequel ces contraintes mécaniques sont traduites en une réponse cellulaire est décrit sous le terme de mécanotransduction, qui se déroule également suivant 4 étapes<sup>68</sup> :

- *Mechanocoupling* : transformation de la force mécanique appliquée à l'os en un signal mécanique local perçue par une cellule détectrice (« sensor cell »).
- *Biochemical coupling* : transformation du signal mécanique local en un signal biochimique puis, à terme, en l'expression de gènes spécifiques.
- Transmission du signal de la cellule détectrice aux cellules qui vont en pratique former ou résorber l'os.
- Réponse des cellules impliquées.

Ce sont ici les ostéocytes qui jouent le rôle de capteurs et qui vont transmettre l'information aux ostéoblastes et cellules bordantes en surface<sup>18,54</sup> (Figure 7). C'est principalement l'important réseau canaliculaire<sup>18,60,64</sup>, et les déplacements de fluide en son sein<sup>54,61</sup>, qui vont permettre la transformation du signal à deux niveaux. Le cisaillement provoqué par les mouvements du fluide à l'échelle des parois cellulaires va déformer les ostéocytes et modifier leur activité métabolique, d'où un signal biochimique spécifique qui va être porté jusqu'aux ostéoblastes par ce même réseau<sup>60,64</sup>. Si tous les mécanismes ne sont pas encore compris, ils font intervenir des récepteurs spécifiques à la surface des ostéocytes qui les rendent plus sensibles au déplacement du fluide que tous les autres types cellulaires présents dans le tissu osseux<sup>60</sup>. Le réseau ainsi formé, par sa capacité à percevoir les signaux extérieurs, à les analyser et les traduire, et par son potentiel de saturation/resensibilisation au cours du temps, est parfois considéré comme analogue au réseau neuronal du cerveau<sup>71</sup>.

Il apparaît donc que les différentes cellules de l'os ont des actions spécifiques, importantes et surtout en interaction les unes avec les autres. Dans l'objectif d'une reconstruction de l'os in vitro par ingénierie tissulaire, l'action de formation par les ostéoblastes va nous intéresser plus particulièrement.

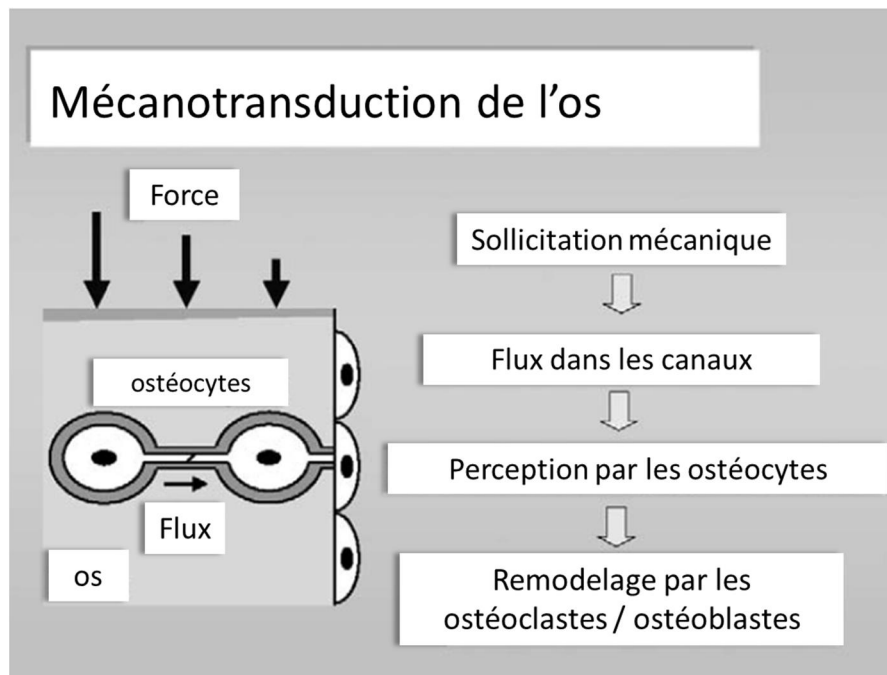


Figure 7 : Principe de la mécanotransduction dans l'os. D'après Klein-Nulend et al<sup>60</sup>

### ***Différenciation des ostéoblastes et marqueurs***

Les ostéoblastes sont issus de cellules mésenchymateuses multipotentes ayant la possibilité de se spécialiser également en chondrocytes, fibroblastes, myocytes et adipocytes<sup>59,72,73</sup> (Figure 8). Il existe un potentiel de transdifférenciation entre ces différentes voies<sup>62</sup>. Cette différenciation, l'ostéogénèse, s'effectue en plusieurs étapes : les cellules multipotentes sont recrutées en tant qu'ostéoprogéniteurs dans les tissus conjonctifs environnants<sup>65</sup>, puis vont subir une différenciation plus avancée en préostéoblastes ayant un potentiel de prolifération important<sup>72</sup>. Ils évoluent ensuite en ostéoblastes, responsables de la production de la MEC osseuse<sup>72</sup>, qui à maturation complète vont contribuer à sa minéralisation et devenir des ostéocytes ou des cellules bordantes<sup>73</sup>, comme vu plus haut.

L'ostéogénèse peut apparaître suivant deux voies distinctes. La première, appelée ossification endochondrale, concerne la majorité du squelette. Autour d'un « patron » de cartilage, les cellules différenciées en chondrocytes qui se trouvent en apoptose sont graduellement remplacées par la lignée ostéoblastique qui va former le tissu osseux<sup>72</sup>. Des études suggèrent que des chondrocytes puissent alors directement se transdifférencier en ostéoblastes<sup>73</sup>. Suivant l'autre voie, l'ossification intramembraneuse responsable de la formation des clavicules, mandibules et de certains os du crâne, les cellules progénitrices mésenchymateuses suivent directement la lignée ostéoblastique<sup>72</sup>.

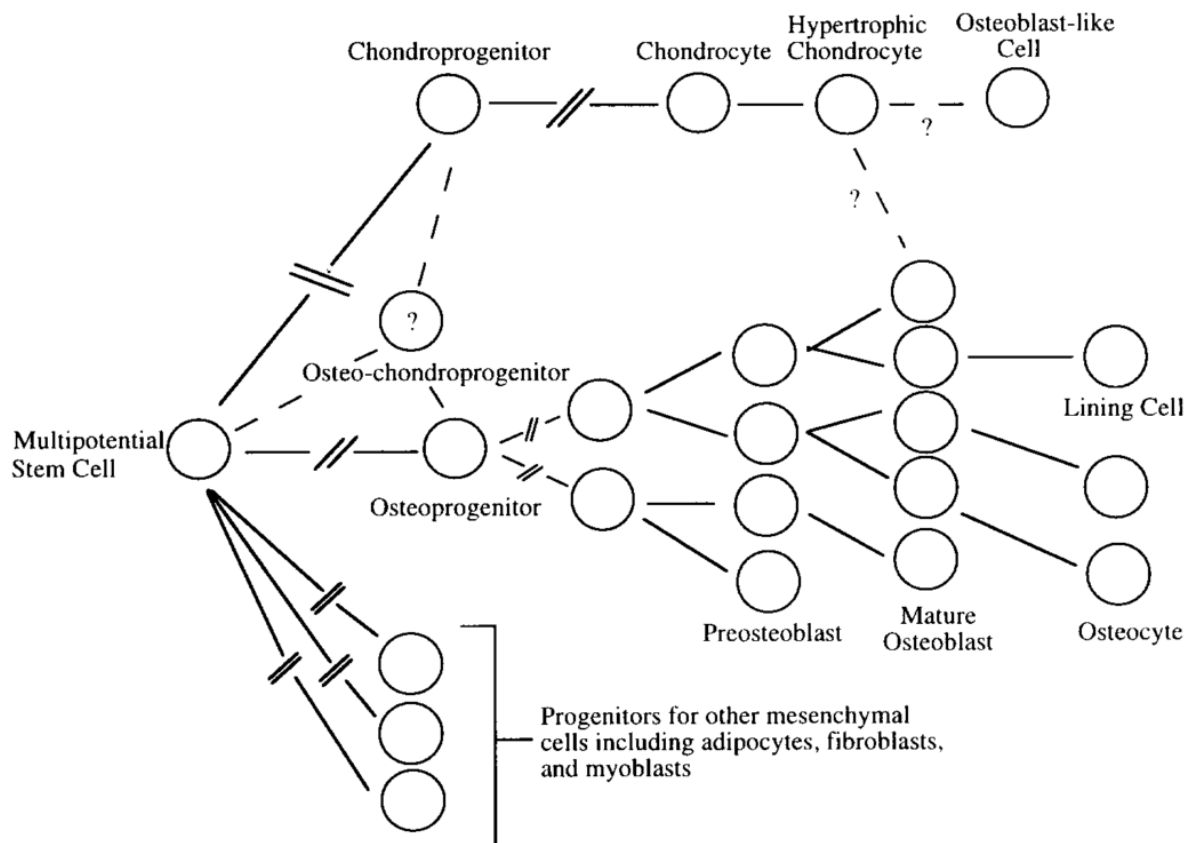


Figure 8 : Différenciation de la lignée ostéoblastique. Les possibilités exactes de transdifférenciation (lignes pointillées) sont encore débattues aujourd'hui. D'après Aubin *et al*<sup>73</sup>

Issus des mêmes cellules multipotentes, les ostéoblastes sont extrêmement proches des fibroblastes, dont ils sont morphologiquement presque indiscernables<sup>59</sup> et dont ils partagent les marqueurs de différenciation<sup>59,65</sup>. Ils peuvent être considérés comme des « fibroblastes spécialisés »<sup>59</sup>. L'unique différence se situe dans la MEC produite et les protéines qui la composent, ce qui se traduit uniquement par deux marqueurs spécifiques des ostéoblastes, le facteur de transcription Cbfa1/Runx2 et la protéine ostéocalcine (OCN)<sup>59,65</sup>.

Le premier est le plus précoce et le plus spécifique<sup>72</sup>, indispensable à la différenciation selon cette voie<sup>62</sup>. Il est activé dès les premières étapes chez les ostéoprogéniteurs et n'est inhibé qu'à la toute fin du développement lorsque débute la phase de minéralisation<sup>74</sup>. Runx2 est également lié à la capacité des ostéocytes à ressentir les sollicitations mécaniques lors des déplacements du fluide canaliculaire par l'intermédiaire des intégrines à leur surface<sup>74</sup>. Ce premier marqueur est obligatoirement suivi par l'expression d'un autre facteur de transcription, Osterix, pour permettre la suite de la différenciation<sup>62</sup>.

L'apparition des protéines collagéniques et non-collagéniques marque la fin de la phase de prolifération et le début de la production de la MEC osseuse. En particulier, on constate une importante augmentation d'ostéopontine (OPN) liée à une forte activité de la PAL dès le début de cette étape<sup>72</sup>, même si les préostéoblastes sont capables de la synthétiser dans de faibles quantités<sup>65</sup>. Ces marqueurs vont ensuite diminuer, tout comme le collagène<sup>75</sup>, soulignant que la matrice est prête pour sa minéralisation<sup>72</sup>. Le début de cette étape finale est marqué par l'apparition de l'autre protéine spécifique de la lignée ostéoblastique, l'ostéocalcine (OCN)<sup>65</sup>. Elle n'est produite que par les ostéoblastes totalement matures<sup>59</sup> et au cours de la minéralisation<sup>72</sup>.

Les ostéoblastes se distinguent donc par leur capacité à produire simultanément ou successivement un grand nombre de protéines de la MEC, spécifiques ou non, telles que collagène 1, OPN, BSP, OCN, avec une haute activité de la PAL<sup>73</sup> (voir Figure 9 et Figure 10 pour une synthèse des apparitions et rôles des principaux marqueurs). Parmi celles-ci, lors de la formation puis la minéralisation de la MEC, à terme, les ostéocytes ne produiront plus que de l'OPN<sup>62</sup>. Les variations dans les taux de productions n'interviennent donc pas seulement en fonction du stade de différenciation (préostéoblastes/ostéoblastes), mais également en fonction du stade de maturation (ostéoblastes/ostéoblastes matures/ostéocytes)<sup>75</sup>.

Tous ces marqueurs se retrouvent lors de la culture d'ostéoblastes *in vitro*, avec des changements successifs détectables dans l'expression des gènes, suivant les mêmes étapes jusqu'à la minéralisation<sup>72</sup>. Des changements de morphologie analogues à la maturation en ostéocytes ont également été notés, tributaires toutefois d'un apport d'acide ascorbique indispensable aux étapes intermédiaires de production de collagène<sup>72</sup>. Quelques différences avec *in vivo* ont été constatées, comme une baisse moins marquée de la production de PAL lors de l'avancement de la minéralisation<sup>72</sup>, mais celles-ci peuvent être dues à la variabilité normale des états de maturation<sup>75</sup>.

	Activation	Prolifération	Production		Minéralisation	
	Ostéoprogéniteur	Pré-ostéoblaste	Ostéoblaste	Ostéoblaste mature	Ostéocyte	
Runx2						
Osterix						
Collagène I			++	++		
PAL			++	++		
OPN			++	++		
BSP						
OCN						
Expression / activation : faible importante ++ très importante						

Figure 9 : Evolution des principaux marqueurs de différenciation de la lignée ostéoblastique. Adapté de <sup>59,62,65,72,675</sup>

Marqueur	Type	Fonction principale
<b>Runx2</b>	Facteur de transcription	Différenciation des cellules multipotentes en ostéoprogéniteurs.
<b>Osterix</b>	Facteur de transcription	Consécutif à Runx2, favorise l'ostéogenèse et inhibe la chondrogenèse.
<b>PAL</b>	Enzyme	Augmente la concentration locale en ions phosphate favorable à la minéralisation.
<b>Collagène type I</b>	Protéine de la MEC	Les nodules minéralisés apparaissent à la jonction entre deux groupes de fibres de collagène.
<b>OPN</b>	Protéine de la MEC	Inhibe la formation de cristaux minéraux irréguliers.
<b>BSP</b>	Protéine de la MEC	Se lie aux ions calcium et favorise l'apparition des nodules.
<b>OCN</b>	Protéine de la MEC	Régule la croissance, direction, taille et degré de minéralisation.
<b>Ostéonectine</b>	Protéine de la MEC	Similaire à l'OCN

Figure 10 : Description des principaux marqueurs de différenciation de la lignée ostéoblastique. Adapté de Samavedi et al<sup>76</sup>.

Il existe donc d'importantes variations dans l'expression des marqueurs qui reflètent l'évolution des ostéoblastes au cours du temps. Cela souligne un développement séquentiel indispensable à la formation progressive du tissu osseux, comportement qu'il est possible de retrouver *in vitro*<sup>72</sup>. Au regard de ces connaissances, il est donc possible d'étudier l'ingénierie tissulaire et son application spécifique à nos tout en analysant l'évolution du tissu reconstruit et son stade de développement.

## 2) L'ingénierie tissulaire osseuse

Les acteurs principaux de l'ingénierie tissulaire que sont les cellules, le scaffold, les signaux de l'environnement et le bioréacteur doivent alors être spécifiquement définis pour la culture d'un substitut osseux.

Le choix du type cellulaire est directement relié au tissu à reconstruire. Dans ce contexte, on s'intéresse ici aux ostéoblastes, dont le fonctionnement a été détaillé ci-dessus<sup>29</sup>, ou aux cellules souches capables de se différencier dans cette voie. L'environnement



cellulaire recouvre un ensemble de paramètres (température, nutriments, etc.) communs à toute culture cellulaire et d'autres signaux plus spécifiques qui seront modifiés par l'utilisation de scaffolds et de bioréacteurs dédiés au domaine osseux et susceptibles d'en induire la différenciation. Ce sont donc ces deux points que nous allons étudier plus particulièrement. On trouvera en annexe une description générale des types et sources cellulaires envisagés pour l'ingénierie tissulaire, ainsi que de l'environnement *in vitro* classique.

## **Scaffold**

Il s'agit d'un « biomatériau biocompatible, naturel ou synthétique, utilisé temporairement ou de façon permanente, poreux, perméable et tridimensionnel »<sup>48</sup>. Littéralement déchafaudage, il est le siège de l'adhésion cellulaire puis du développement du tissu néoformé<sup>50</sup> et tend à mimer l'action de la MEC qui tient habituellement ce rôle<sup>51,53</sup>. Il peut alors s'intégrer totalement à ce tissu pour être réimplanté avec lui, ou progressivement disparaître au profit unique du tissu vivant<sup>38,51</sup>. Lors de la culture, il peut contribuer à la modification de l'environnement, notamment par la libération de facteurs chimiques dans le milieu de culture, d'où un choix crucial du biomatériau utilisé outre les aspects de biocompatibilité<sup>48,77</sup>. Différentes propriétés telles que l'hydrophobicité, le potentiel de surface, la perméabilité aux gaz doivent ainsi être également définies<sup>51</sup>. Cependant, c'est avant tout sa structure qui doit être précisément choisie, afin de déterminer la géométrie générale, le degré de porosité, la taille et l'interconnectivité des pores, la rugosité et les propriétés mécaniques<sup>50,51</sup>. Ces paramètres sont importants tant pour la réponse cellulaire qu'ils engendrent (capacité d'adhésion, potentiel de différenciation notamment) que pour la praticité clinique du substitut obtenu à terme (une culture sur hydrogel n'aura pas les mêmes conditions d'utilisation qu'un bloc poreux solide)<sup>48</sup>.

Concernant les spécifiquement, de nombreuses études se basent sur l'utilisation de biomatériaux de formes et de compositions déjà approuvées pour leur utilisation seuls (sans étape de culture tissulaire *in vitro* avant réinsertion). C'est le cas notamment des céramiques, telles l'HA et les phosphates tricalciques (TCP), dont nous avons vu qu'ils composent la majorité de la partie minérale de l'os, et qui sont commercialisées sous forme de blocs, de ciments ou de poudres<sup>11,25,53,78</sup> (Figure 11). Aux céramiques classiques et fabriquées industriellement peuvent être ajoutées les céramiques naturelles, comme les coraux, utilisés en

ingénierie tissulaire pour leur porosité et leurs propriétés mécaniques (très proche de l'os spongieux)<sup>29</sup>. Ces matériaux ont l'avantage d'être déjà bien connus des cliniciens qui les utilisent pour combler des défauts, avec les limitations vues plus haut en termes de néo-vascularisation et de géométries fines adéquates. Ils peuvent donc être optimisés par la culture de cellules. Mastrogiacomo *et al*<sup>79</sup> ont ainsi exploité l'interconnectivité des pores des éponges de céramique. Arinzeh *et al*<sup>80</sup> et Gamblin *et al*<sup>16</sup>, en se basant sur des blocs poreux classiques, ont évalué l'influence de compositions variables entre HA, TCP et d'autres structures chimiques. Des disques de céramique déjà commercialisés ont également été étudiés par Unger *et al*<sup>81</sup>, de même que des ciments par Xu *et al*<sup>82</sup>. Ces derniers ont comme avantage une certaine adaptabilité face aux différentes géométries, tout comme les mousses, qui peuvent être utilisées comme comblement temporaires (Mastrogiacomo *et al*<sup>79</sup>, Kim *et al*<sup>83</sup>). Des tissus reconstruits ont également été obtenus à partir de céramiques sous forme de nanograins<sup>84,85</sup> ou de microsphères de HA<sup>86</sup>, dont les dimensions et le ratio surface/volume reproduisent plusieurs propriétés de la MEC.

Outre leur utilisation sous forme pure et les mélanges de céramique, de nombreux procédés font appel à des scaffolds dits composites qui mélangent plusieurs types et formes de matériaux. Aux céramiques sont ainsi ajoutés des polymères, l'autre grande classe de matériaux la plus couramment utilisée<sup>36</sup>, ou des métaux. Ces derniers sont plus difficiles à adapter aux différentes géométries de défauts osseux, et leur utilisation s'oriente donc plus vers des prothèses (acier inox, alliages de cobalt et de titane) que vers l'ingénierie tissulaire.<sup>25</sup> Toutefois, ils peuvent être étudiés dans le cas de ces matériaux composites, additionnés sous d'autres formes<sup>11</sup>. Ainsi, des mélanges de nanograins céramiques/métaux ont été exploités pour l'ingénierie tissulaire par Webster *et al*<sup>84</sup>, avec comme résultat une amélioration de l'ostéointégration. Les autres cas de matériaux composites concernent principalement l'ajout de céramique dans des solutions de polymère pour en améliorer les propriétés liées à la culture spécifique de tissu osseux. Gkioni *et al*<sup>20</sup> et Fricain *et al*<sup>87</sup> ont ainsi amélioré le potentiel de minéralisation de polymères par l'ajout de particules de HA. Un tel ajout de particules, voire de nanoparticules, dans des scaffolds de polymère sous forme de réseau de fibres est une des techniques les plus étudiées (voir par ailleurs le détail du principe de l'électrospinning)<sup>88,89</sup>, dans des tailles et concentrations variées<sup>90</sup>.

Les polymères sont également utilisés seuls, purs ou en mélange. Collagène, acide polyglycolique (PGA), acide polylactique (PLA) et polycaprolactone (PCL), approuvés par la *Food & Drug Administration* (FDA) américaine, sont les plus couramment rencontrés<sup>25,38</sup>. Ils

peuvent se présenter sous la forme de gels<sup>91</sup>, de films et membranes<sup>38,92</sup>, de fibres<sup>53,93</sup> ou de structures 3D<sup>38</sup> (Figure 11). Des polymères d'origine naturelle, comme la chitine, le chitosan ou les glycosaminoglycanes (GAG) sont également étudiés dans une stratégie de biomimétisme<sup>25,94,95</sup>. Les rythmes de dégradation sont fréquemment analysés lors de l'utilisation de ces matériaux<sup>11,38</sup>, notamment car les procédés mis en jeu (hydrolyse chimique) sont indépendants de l'activité enzymatique des tissus cellulaires et sont donc invariants d'un patient à l'autre<sup>25</sup>. Les nanofibres obtenues par électrospinning peuvent présenter des structures complexes : Grey *et al*<sup>96</sup> et Nedjari *et al*<sup>97</sup> ont travaillé sur des gradients respectivement de diamètre de fibres et de porosité du scaffold, Srouji *et al*<sup>98</sup> sur des multicouches, Pereira *et al*<sup>99</sup> sur des fibres coaxiales et Subramony *et al*<sup>100</sup> sur des fibres alignées, ce dernier cas provoquant une stimulation mécanique anisotrope augmentant les possibilités de différenciation osseuse. Meinel *et al*<sup>92</sup> ont utilisé l'interconnectivité des pores d'éponges de collagène, Goldstein *et al*<sup>46</sup> celle de mousse de polymères variés tout en y appliquant des contraintes mécaniques, et Depan *et al*<sup>101</sup> un réseau 3D d'un composite chitosan-graphène améliorant les propriétés physicochimiques de leur scaffold comparé aux composants purs. Lee *et al*<sup>102</sup> ont étudié les possibilités de transport et de protection dans l'organisme des cellules osseuses en encapsulant des ostéoprogéniteurs dans des billes d'alginate. Enfin, toujours par l'utilisation d'un scaffold de polymère, Holzapfel *et al*<sup>103</sup> ont conçu un scaffold tubulaire en 3D permettant de promouvoir une néo-hématopoïèse en plus de la croissance du tissu osseux.

Concernant les autres classes de biomatériaux, on peut citer les os décellularisés et déminéralisés<sup>104</sup> (provenant en général d'espèces bovines), en poudre ou travaillés pour mimer une forme anatomique<sup>42</sup>. Le prototypage rapide, ou imprimante 3D, est également à l'étude pour optimiser l'adaptabilité et le sur-mesure des produits de l'ingénierie tissulaire<sup>105</sup>, mais aussi pour envisager d'« imprimer » directement des substituts cellulaires<sup>105,106</sup>. On rencontre aussi l'utilisation de nanotubes de carbone<sup>85</sup> ou d'autres composés naturels comme la soie, favorisant l'ostéogénèse<sup>92,107,108</sup>.

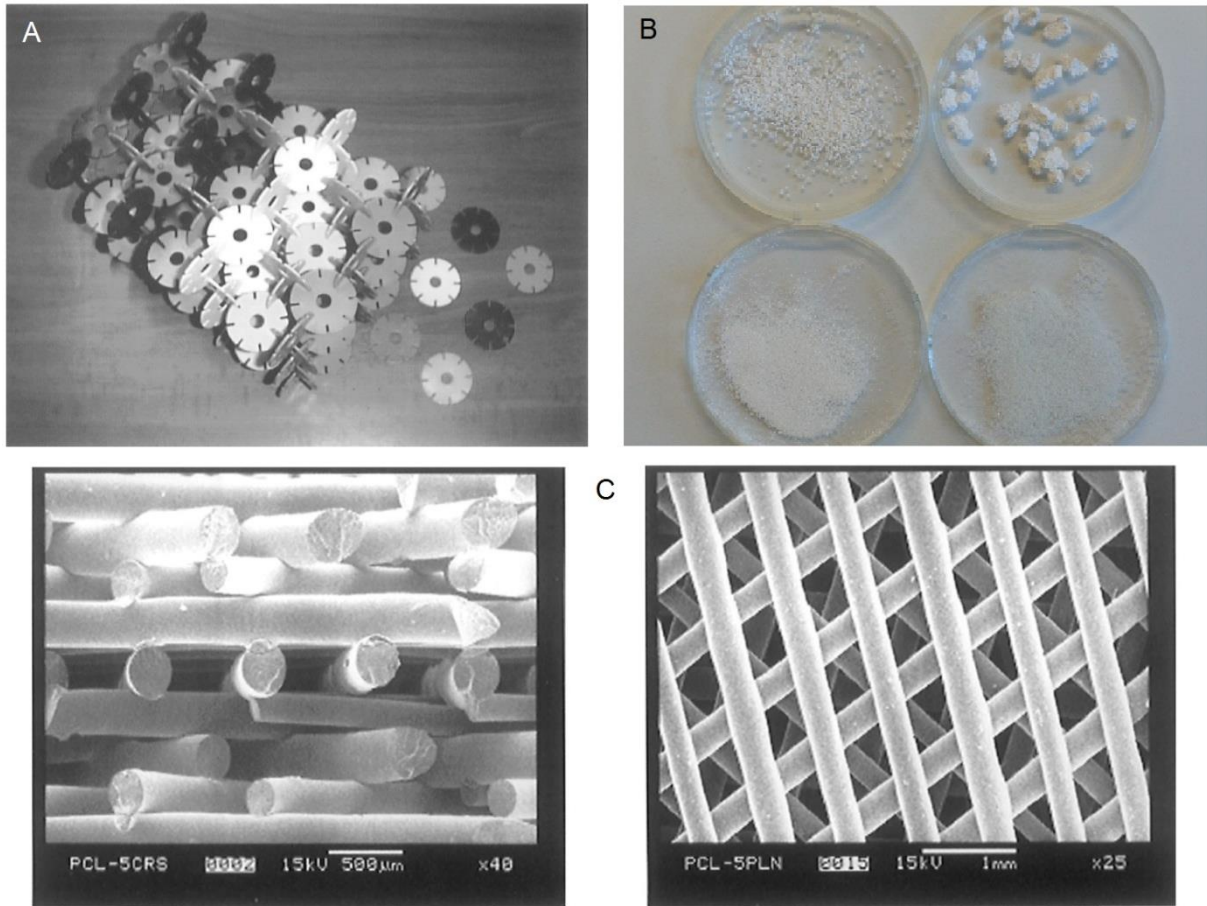


Figure 11 : Exemples de la variété des scaffolds utilisés en ingénierie tissulaire osseuse. A : disques de polymère (diamètre 500  $\mu\text{m}$ ), B : granules d'hydroxyapatite de tailles variables (de 80 à 2000  $\mu\text{m}$ ), C : fibres de PCL. D'après Hutmacher et al<sup>38</sup> (A, C) et données personnelles (B).

## Bioréacteurs

Les trois acteurs de l'ingénierie tissulaire, cellules, scaffolds et environnement spécifique, peuvent être regroupés au sein d'un bioréacteur, défini comme une enceinte dans laquelle des processus biologiques et/ou biochimiques sont recréés sous des conditions contrôlés<sup>109</sup>. Si de tels dispositifs ont pu être utilisés à des fins industrielles (traitement des eaux usées, agroalimentaire, production de végétaux, de protéines ou de composés pharmaceutiques<sup>52</sup>) ou pour étudier de nouveaux biomatériaux<sup>109</sup>, ils ont par la suite été adaptés à la formation de tissus *in vitro*<sup>109</sup>. En effet, une telle enceinte va permettre d'appliquer et de contrôler les conditions environnementales vues plus haut (notamment pH, température, pression, oxygène, nutriments, évacuation des déchets<sup>52</sup>) et pourra faciliter l'utilisation d'un scaffold précis en présentant une géométrie adaptée. Mais l'intérêt de l'utilisation d'un bioréacteur sera également d'apporter d'autres types de sollicitations aux

cellules, par l'intermédiaire du déplacement du milieu (forces de cisaillement fluide<sup>110</sup>) ou l'application directe de sollicitations mécaniques (forces engendrées en traction ou compression<sup>64</sup>). Ces changements dans l'environnement de la cellule, eux aussi dictés par le souhait de mimer *in vivo*, auront un impact fort sur son développement. Les systèmes les plus couramment utilisés pour l'ingénierie tissulaire osseuse ont fait l'objet de nombreuses revues, notamment par les équipes de Yeatts<sup>110</sup>, Rauh<sup>111</sup> et Brown<sup>112</sup> ainsi qu'au sein du laboratoire BMBI (Carpentier *et al*<sup>52</sup>).

On distingue tout d'abord les bioréacteurs à perfusion (Figure 12.1). Une boucle fermée de milieu alimente une chambre où a lieu la culture sur scaffold<sup>52</sup>. L'apport en oxygène est réalisé à l'aide d'un oxygénateur branché sur le circuit ou par des tuyaux perméables aux gaz<sup>52,111</sup>. La circulation du milieu peut être continue ou intermittente et s'arrêter pour certaines phases (adhésion notamment)<sup>52</sup>. Par rapport à une culture statique, ce dispositif permet un transport plus efficace des nutriments, l'évacuation des déchets, et impose au tissu des contraintes de cisaillement fluide à l'origine de nombreux mécanismes de régulation (comme vu plus haut sur l'action des ostéocytes)<sup>52,111</sup>. On distingue les perfusions à lit fluidisé, où le scaffold (souvent sous forme granulaire) est mis en mouvement et se déploie sous l'effet du flux<sup>52</sup>, et les perfusions directes à travers un scaffold immobile (bloc 3D, membrane)<sup>52</sup>. Dans ce dernier cas, il est impératif d'utiliser un scaffold avec une porosité et des pores interconnectés de façon importante, ce qui limite l'utilisation de ce procédé à des structures spécifiques.

Un autre bioréacteur courant en ingénierie tissulaire osseuse est la fiole rotative, ou « spinner flask », ou plus simplement « spinner » (Figure 12.2). Il s'agit d'un réservoir où le milieu est mis en agitation et où les scaffolds sont en général suspendus par un axe vertical lié au bouchon de la flasque<sup>52,110</sup>. Des ouvertures latérales permettent généralement l'accès au scaffold et le renouvellement du milieu<sup>110</sup>. On retrouve les mêmes avantages qu'en perfusion (cisaillement, transport, évacuation<sup>52,110</sup>) avec un dispositif simple et souvent bon marché<sup>111</sup>. Cependant, des turbulences peuvent apparaître, augmentant considérablement le stress perçu par les cellules et affectant alors leur viabilité. Un gradient d'accès aux nutriments est parfois maintenu, avec un moins bon apport au centre du scaffold, dont la taille maximale est donc limitée par le procédé<sup>110</sup>. Une géométrie adéquate permet cependant une croissance du tissu au centre de l'échantillon et plus seulement en périphérie comme rencontré parfois en statique<sup>92</sup>.

Les bioréacteurs à mur rotatif (« rotating wall vessel bioreactors ») présentent une géométrie proche des spinners (Figure 12.3). Ici, un cylindre interne est immobile et un cylindre externe est mis en mouvement, l'espace entre les deux étant rempli de milieu<sup>52,110</sup>. Un équilibre entre les différents paramètres (diamètre, vitesse, fluide) permet la mise en place de conditions de microgravité<sup>52,110,111</sup>. Laissés libres dans le milieu, les scaffolds expérimentent alors de hauts transferts d'oxygène et de nutriments tout en ne subissant que des forces de cisaillement très inférieures à celles engendrant la mort cellulaire<sup>52,110</sup>, ce qui provoque une prolifération et une différenciation supérieures à celles obtenues en spinner<sup>111</sup>. Marolt *et al*<sup>107</sup> précisent que cette amélioration dans le transfert de masse a été « décisive » pour l'obtention d'un tissu reconstruit en bioréacteur rotatif. Les applications sont cependant limitées à des scaffolds présentant une densité particulière permettant leur « chute libre »<sup>52</sup> sans heurter les parois, ce qui n'est jamais réellement assuré<sup>110</sup>. Il est possible de fixer les scaffolds aux parois d'un des cylindres, mais l'accès des nutriments jusqu'à leur centre n'est pas toujours efficace.<sup>111</sup>

Les autres systèmes de bioréacteurs fréquemment utilisés sont des dispositifs d'application de forces mécaniques<sup>52,112</sup>. Le plus simple correspond à l'application de forces de compression<sup>112</sup> (Figure 12.4) ; les premiers essais utilisaient ainsi des machines dédiées aux tests d'analyse mécanique<sup>111</sup>. L'homogénéité spatiale des contraintes appliquées à l'échantillon est aisément assurée, et les sollicitations peuvent être facilement imposées de façon cyclique ou continue<sup>112</sup>. En revanche, la présence des gaz d'incubation doit être prise en compte au moment d'appliquer les pressions<sup>112</sup> et les gammes ressenties sont souvent éloignées des valeurs physiologiques ressenties *in vivo*<sup>52</sup>.

Les contraintes mécaniques peuvent également être imposées en traction (Figure 12.5). Par étirement du substrat, on retrouve la possibilité de programmer des sollicitations périodiques, et de nombreux paramètres techniques peuvent être réglés très finement<sup>112</sup>. Mais cette technique se limite à des scaffolds spécifiques déformables voire mous<sup>52</sup>, et la nécessité d'une préculture et/ou la mise en place entre des clamps peuvent elles-mêmes avoir un impact non souhaité sur les échantillons<sup>112</sup>. Il est donc possible de solliciter en traction par une flexion du substrat (« four-point bending »)<sup>112</sup>, ce qui assure une meilleure stabilité et une répartition plus homogène des contraintes<sup>112</sup>. Il est toutefois plus difficile d'appliquer des paramètres précis dans les gammes physiologiques<sup>112</sup>.

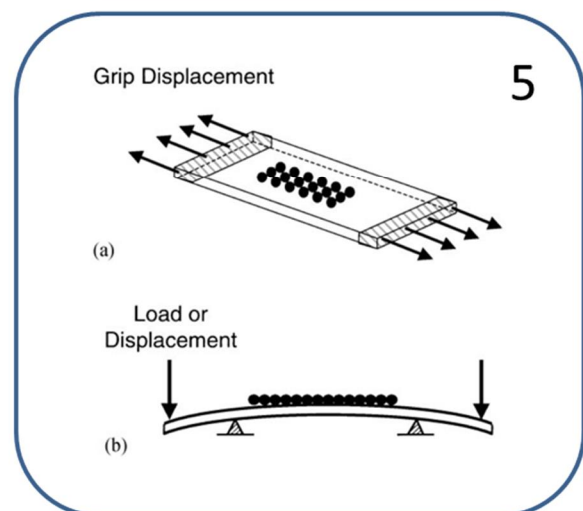
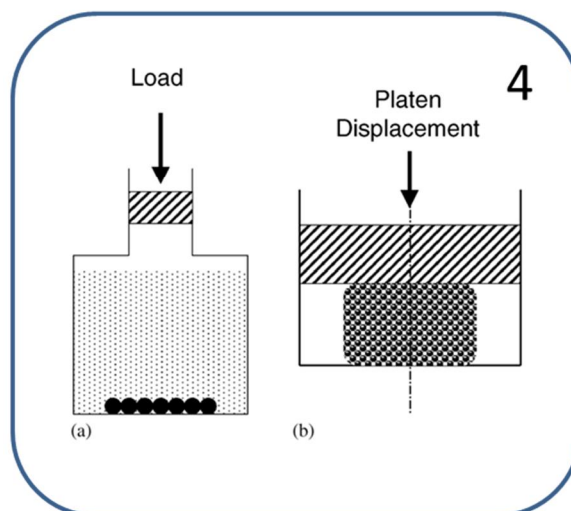
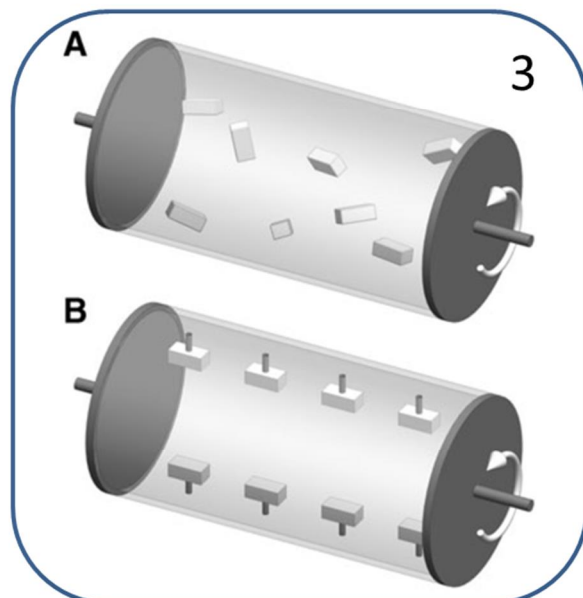
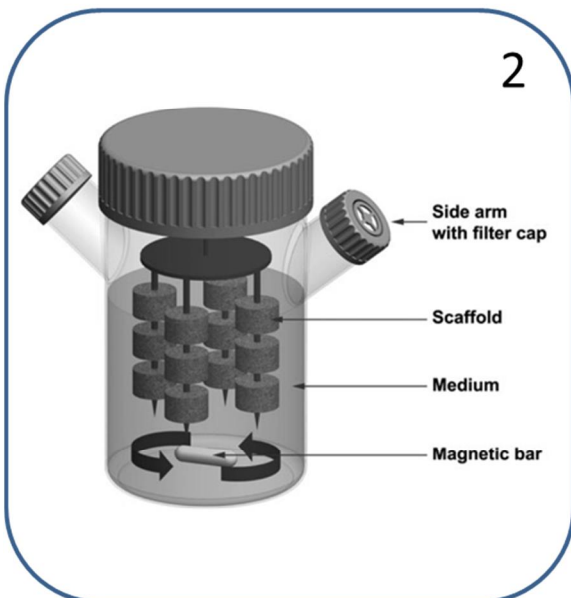
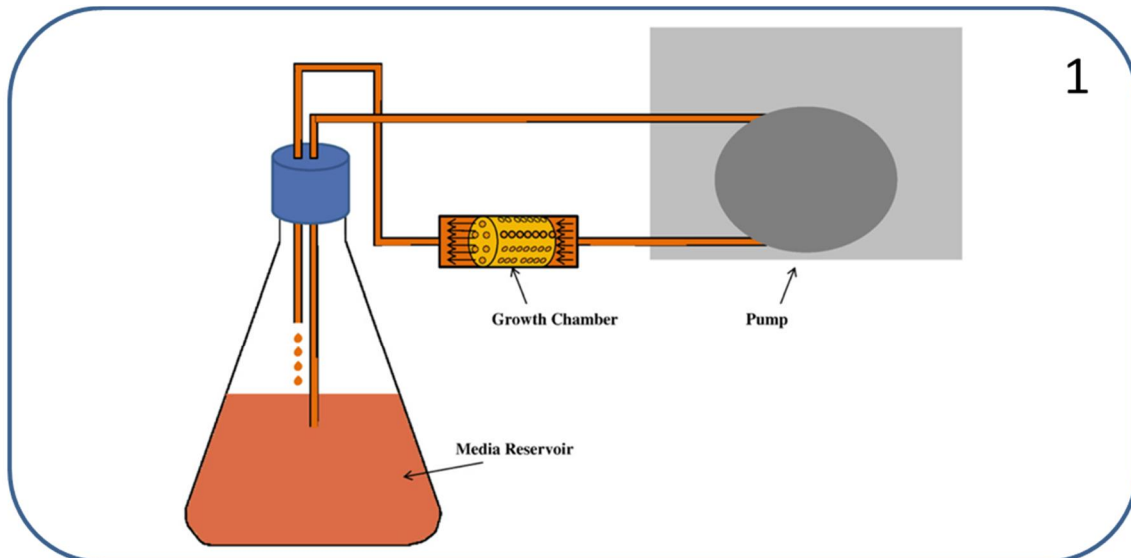


Figure 12 : Principaux bioréacteurs utilisés en ingénierie tissulaire osseuse. 1 : Perfusion, 2 : Mur rotatif avec scaffolds libres (A) ou fixés (B), 3 : Spinner flasks, 4 : Systèmes de compression directe (a) ou indirecte (b), 5 : Systèmes de traction par étirement (a) ou flexion (b) du substrat. D'après Brown *et al*<sup>112</sup>, Rauh *et al*<sup>111</sup>, Yeatts *et al*<sup>110</sup>.

Ces différentes techniques peuvent bien sûr être utilisées en combinaison en fonction de leurs avantages et inconvénients, et adaptées en fonction des scaffolds utilisés<sup>111,112</sup>. Meinel *et al*<sup>92</sup>, par exemple, obtiennent avec un bioréacteur à perfusion des effets positifs moins marqués qu'ils ne l'attendaient à cause de changements dans la vitesse de dégradation du support dus au flux. D'autres techniques moins répandues à l'heure actuelle sont également à l'étude, comme l'utilisation de nanovibrations<sup>113</sup>, les sollicitations par champ magnétique<sup>111</sup> ou les « bioréacteurs *in vivo* » qui utilisent une implantation dans un organisme vivant comme une étape temporaire de maturation du substitut<sup>111,114</sup>. La réalisation de systèmes artisanaux (« custom-made ») augmente encore la variété des bioréacteurs utilisés, tout comme le paramétrage des systèmes commerciaux (vitesse de rotation notamment)<sup>111</sup>.

L'ingénierie tissulaire osseuse présente donc une grande variété de paramètres tant au niveau des scaffolds que des bioréacteurs à l'étude. Afin d'effectuer des choix, il convient de se recentrer sur l'application précise visée, la reconstruction du visage, et ses enjeux spécifiques. Cette analyse a mené au choix pour le présent travail de plusieurs acteurs pour la triade « cellules ó scaffold ó environnement », qui vont à présent être justifiés et détaillés dans les paragraphes suivants.

### III. Matériaux sélectionnés pour le projet de thèse

#### 1) Les phosphates de calcium

##### **Définition et classification**

Les céramiques regroupent une large classe de matériau définis comme étant inorganiques et non-métalliques<sup>115</sup>. On retrouve en son sein les composés de phosphate de calcium (CP) qui vont nous intéresser plus particulièrement.

Dans le cas de leur utilisation dans les sciences du vivant, les céramiques et CP sont divisés en trois groupes en fonction de la réponse cellulaire qu'ils engendrent<sup>25,30,57,115</sup>. Outre une biocompatibilité générale<sup>36,57</sup> ils peuvent être bioinertes (alumine, zircone), bioactifs (bioverres, HA) ou biorésorbables (TCP, octacalcium phosphate (OCP) ). Les deux dernières catégories, dans le cadre d'une biocompatibilité active définie plus haut, sont donc les plus



pertinents pour une utilisation au contact de cellules. Ils sont couramment utilisés seuls (c'est-à-dire sans culture *in vitro* dans le cadre d'un procédé d'ingénierie tissulaire) depuis plusieurs décennies, notamment pour des applications maxillo-faciales et dentaires<sup>79,116,117</sup>, et leurs propriétés mécaniques ont également été étudiées depuis longtemps<sup>118</sup>. Ce long retour d'expérience a notamment permis d'en optimiser la structure des pores et la composition chimique précise<sup>116</sup>. Les TCP sont présents sous deux formes cristallines notées  $\beta$  et  $\gamma$ , la forme  $\beta$ -TCP étant la plus couramment employée en ingénierie tissulaire, et présentent un ratio calcium/phosphate de 1,5 dans des conditions stœchiométriques<sup>76</sup>. Associés à l'HA, de ratio 1,67<sup>76</sup>, ils forment un composé nommé phosphate bicalcique ou BCP<sup>53,80,119</sup>. Le OCP correspond aux précurseurs des cristaux d'HA<sup>53</sup> et les bioverres sont formés d'environ 50% de silice (SiO<sub>2</sub>), 25% et 6% de dérivés respectifs de calcium et phosphate<sup>36</sup>.

Les propriétés des CP qu'il convient d'étudier dans le cadre général de la culture de cellules osseuses à leur contact, hors application précise en ingénierie tissulaire, sont détaillées en annexe.

### ***Avantages et limites***

Comme vu plus haut, l'HA est le principal composant de la matrice minérale de l'os. Le principal intérêt de l'utilisation d'un biomatériau à partir d'HA synthétique est donc sa très grande similitude de composition avec le tissu que l'on souhaite remplacer<sup>30,36,53</sup>. Les cliniciens ont de plus une grande expérience de ce type de matériaux qu'ils utilisent déjà seuls pour des comblements en tant que « *in vitro* autologous bone »<sup>30,57</sup>. Ils sont facilement disponibles industriellement et peu coûteux. Sous forme de poudre ou de granules, ils présentent un haut ratio surface/volume, et sous forme de blocs, leur porosité permet d'approcher celle de l'os spongieux natif<sup>57</sup>. Cette porosité permet également d'envisager la libération de facteurs de croissance ou médicamenteux *in situ* après ajout<sup>57</sup>. Leur aspect « bioactif » permet d'envisager une régénération en plus d'un simple remplacement, ce qui est une des clés du principe d'ingénierie tissulaire<sup>57</sup>. Surtout, leur principal avantage va résider dans la grande variété de compositions, de mélanges et de géométrie, assurant adaptabilité et flexibilité pour le taux de résorption, l'ostéoconduction et l'ostéoinduction aux besoins des. Le choix de la vitesse de résorption, notamment, va jouer un rôle à la fois biologique (la minéralisation du tissu dépend de la concentration extracellulaire en phosphate et calcium, ici relargués par le scaffold) et mécanique (une dégradation à long terme assure une cohésion

pendant la colonisation par le nouveau tissu)<sup>53</sup>. Un équilibre complexe entre toutes les propriétés doit donc être étudié (Figure 13).

Cet équilibre doit toutefois être trouvé, les propriétés des différents CP vues plus haut (par exemple l'absence totale d'ostéoinduction de l'HA) limitant leur utilisation sous forme pure. Leur utilisation traditionnelle a ainsi souligné un problème d'ostéointégration en conséquence<sup>115</sup>. Si plusieurs études s'y intéressent spécifiquement et donnent des indications sur les ratios HA/TCP à privilégier en fonctions des applications, ils sont encore débattus<sup>53,80</sup>. D'autres propriétés comme la macroporosité des substituts ou la structure interne sont également étudiés pour trouver les paramètres optimaux<sup>79,120</sup>. Il a également été relevé que certains degrés de cristallisation des bioverres les rendaient totalement bioinertes<sup>36</sup>. D'un point de vue mécanique, les blocs peuvent être jugés trop rigides et fragiles en pratique<sup>25</sup>, quand les poudres et granules risquent de migrer du site d'implantation<sup>57</sup>.

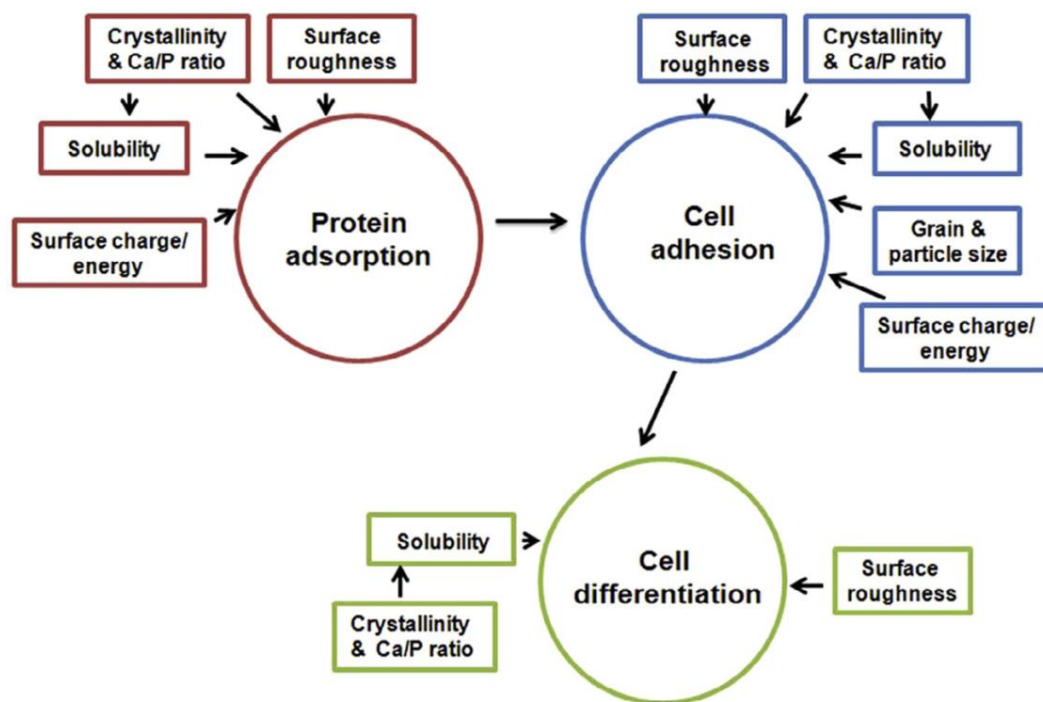


Figure 13 : Schéma des propriétés des phosphates de calcium affectant la réponse cellulaire. D'après Samavedi *et al*<sup>76</sup>.

## Utilisations en ingénierie tissulaire osseuse

Les phosphates de calcium représentent à l'heure actuelle 60% des biomatériaux osseux implantés<sup>14</sup>. Toutes les propriétés vues précédemment ont permis une large utilisation en tant que comblement osseux, qu'il s'agisse de défauts de masse dans les zones mandibulaire, crâniale, tibiale ou fémorale<sup>10,53</sup>. Ainsi, quand l'HA est injectée afin d'augmenter le volume facial squelettique, aucune atrophie ou résorption du tissu natif n'est détectable et aucune infection n'est à déplorer<sup>23</sup>. Les CP sont ainsi de parfaits candidats pour une exploitation en ingénierie tissulaire en tant que scaffolds, en étantensemencées de cellules avant leur implantation. Nous allons étudier ici ces cas précis et non plus seulement les études de la réponse cellulaire au contact de ces biomatériaux.

Pour ce type d'application, les formes les plus utilisées sont les poudres/granules et blocs poreux, même s'il a été montré par Krebsbach *et al* que ces derniers peuvent présenter de moins bons résultats<sup>121</sup>. Les blocs ont cependant l'avantage de pouvoir être structurés de façon plus complexe. Buckley *et al*<sup>122</sup>, par exemple, ont compartimenté des cylindres d'HA afin de faciliter à la fois l'ensemencement des cellules puis leur accès aux nutriments pendant la phase de culture *in vitro*. Les CP restent toutefois utilisés en général sous forme de granules tels qu'ils sont commercialisés. Mankani *et al*<sup>123</sup>, après culture de cellules de moelle osseuse (Bone Marrow Stromal Cells, BMSC) sur BCP et implantation chez la souris, obtient une formation d'os autour de l'implant pour une taille optimale de granules (100-250  $\mu\text{m}$ ). Cette apparition d'os mature au sein du biomatériau, détectée grâce aux marqueurs de différenciation définis plus haut, va en effet être constatée par de nombreuses études. Jiang *et al*<sup>124</sup> montrent ainsi une régénération du sinus maxillaire chez le lapin avec utilisation de -TCP et de cellules souches. Brennan *et al*<sup>49</sup> rapportent la formation dans les 2 mois d'os mature après l'implantation d'un mélange de BCP (granules ou disques) et de BMSC chez la souris. A partir de cellules souches cultivées également sur granules de BCP (ratio 20/80 et taille identique à celle trouvée par Mankani<sup>123</sup>), Gamblin *et al*<sup>16</sup> ont montré après culture à long terme (90 jours) l'apparition *in vitro* d'une différenciation complète en ostéoblastes avec production de MEC et structuration 3D. De façon générale, de nombreux travaux de l'équipe du professeur Pierre Layrolle détaillent l'utilisation particulière d'un lit de granules de BCP comme d'un scaffold pour favoriser l'ostéogénicité, la différenciation, la maturation complète de l'os et l'obtention de construction 3D<sup>125,6128</sup>. D'autres études s'intéressent à l'utilisation de cellules souches dérivées d'adipocytes cultivées sur -TCP et soulignent le potentiel

d'ostéodifférenciation ainsi que d'angiogenèse<sup>53</sup>. Il est noté également que l'utilisation des BCP pour l'ingénierie tissulaire permet la régénération osseuse *in vivo* selon le modèle de l'ostéogenèse endochondrale définie plus haut<sup>53</sup>. En résumé, les revues sur l'utilisation de CP en ingénierie tissulaire rapportent toujours une amélioration nette de l'ostéogenèse comparée aux matériaux et cellules utilisés seuls respectivement, ainsi qu'à la guérison naturelle quand celle-ci est possible<sup>10</sup>. Petite *et al*<sup>29</sup>, par exemple, en font la conclusion après la culture de cellules souches sur des céramiques naturelles (coraux) et leur implantation dans des défauts osseux, sans pré-différenciation ni utilisation de facteurs ostéogéniques.

Les phosphates de calcium présentent donc un fort potentiel pour l'utilisation en tant que scaffold pour l'ingénierie tissulaire osseuse, avec de nombreux avantages tant des points de vue biologique et mécanique que clinique, étant commercialisés et exploités depuis plusieurs décennies. La possibilité d'adapter leurs propriétés en fonction des compositions ainsi que la grande variété de taille et de formes vont particulièrement nous intéresser dans le cadre de l'application visée. Certaines valeurs optimales pour des ratios HA/TCP ou pour la taille des particules semblent se dessiner de plusieurs études, mais des limites demeurent, comme le potentiel d'ostéoinduction ou les risques de migration du site d'implantation. La solution pour les nuancer peut se situer dans l'utilisation de composites, en particulier en combinant les CP à une autre grande classe de biomatériaux, les polymères.

## 2) L'électrospinning

### **Principe général et historique**

Une des techniques largement étudiées actuellement pour recourir aux polymères dans le cadre de l'ingénierie tissulaire est celle de l'électrospinning, ou électrofilage. Le principe général est le suivant<sup>50,51,93,1296131</sup> : Une solution de polymère, placée dans une seringue à laquelle on applique un débit constant, circule à travers une fine aiguille au-dessus d'un collecteur métallique (Figure 14A). Une forte différence de potentiel électrique, de l'ordre de plusieurs dizaines de kilovolts, est ensuite imposée entre l'aiguille et le collecteur. Plusieurs forces sont alors en compétition: la tension de surface et les forces viscoélastiques de la solution d'une part, qui tendent à maintenir une goutte au bout de l'aiguille, et le champ électrique ainsi que la gravité (en configuration verticale descendante) d'autre part<sup>50,51</sup>. Au-delà d'un certain seuil, la forte tension permet une accumulation de charges suffisante pour

déformer la goutte apparue à l'extrémité de l'aiguille sous la forme d'un cône dit «cône de Taylor» stable (Figure 14A). La solution de polymère se retrouve alors projetée vers le collecteur sous la forme d'une fine et unique fibre continue. D'abord rectiligne, sa trajectoire est perturbée par des instabilités avant d'atteindre le collecteur et prend alors la forme d'une spirale<sup>93,131</sup>. Ces instabilités induisent une évaporation du solvant engendrant une diminution du diamètre de la fibre, aboutissant au dépôt, à plusieurs mètres par seconde<sup>130</sup>, du polymère sur le collecteur sous la forme d'un réseau constitué d'une fibre unique.

Ce principe est une extension de celui d'électrospraying, constaté à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par Lord Rayleigh (1882) et qui permettait de projeter de fines gouttelettes de la solution grâce au champ électrique (sous le phénomène qui allait prendre le nom d'instabilité de Rayleigh)<sup>51</sup>. De nombreux brevets furent déposés au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Figure 15), mais il faut attendre l'année 1993 pour voir apparaître le terme d'électrospinning<sup>93,129</sup>, un regain d'intérêt s'expliquant par le développement des nanotechnologies (soit l'échelle des fibres obtenues)<sup>51,129</sup>.

A partir de ce montage général, des variations ou des complexifications sont possibles. Le champ électrique contribuant majoritairement à l'attraction vers le collecteur, le dispositif peut être placé à la verticale ou à l'horizontale (Figure 14B)<sup>51</sup>. Le collecteur peut prendre la forme d'un cylindre rotatif qui va permettre une plus grande uniformité du tapis de fibres<sup>93,129</sup>, mais surtout leur alignement à haute vitesse de rotation<sup>50,51</sup> (Figure 14B). Il est également possible d'utiliser une roue dont la tranche est affinée pour l'obtenir sur une grande longueur et une fine épaisseur<sup>50</sup>. Outre ces techniques où une partie du montage est en mouvement, des fibres alignées peuvent être formées en utilisant deux électrodes espacées (Figure 14C) ou deux sources électriques fonctionnant alternativement<sup>51,129</sup>. En utilisant 4 électrodes, il est possible de créer un réseau tissé<sup>93</sup>. L'électrospinning permet également de filer des mélanges de polymère (co-spinning)<sup>50</sup>, des fibres co-axiales<sup>50</sup> (Figure 14D) ou d'utiliser des jets multiples simultanément<sup>50,51,93</sup>.

Pour fonctionner, cette technique nécessite d'équilibrer un très grand nombre de paramètres, et les principes en jeu n'ont pas forcément tous été élucidés<sup>51</sup>. Nous allons à présent détailler ces différents paramètres.

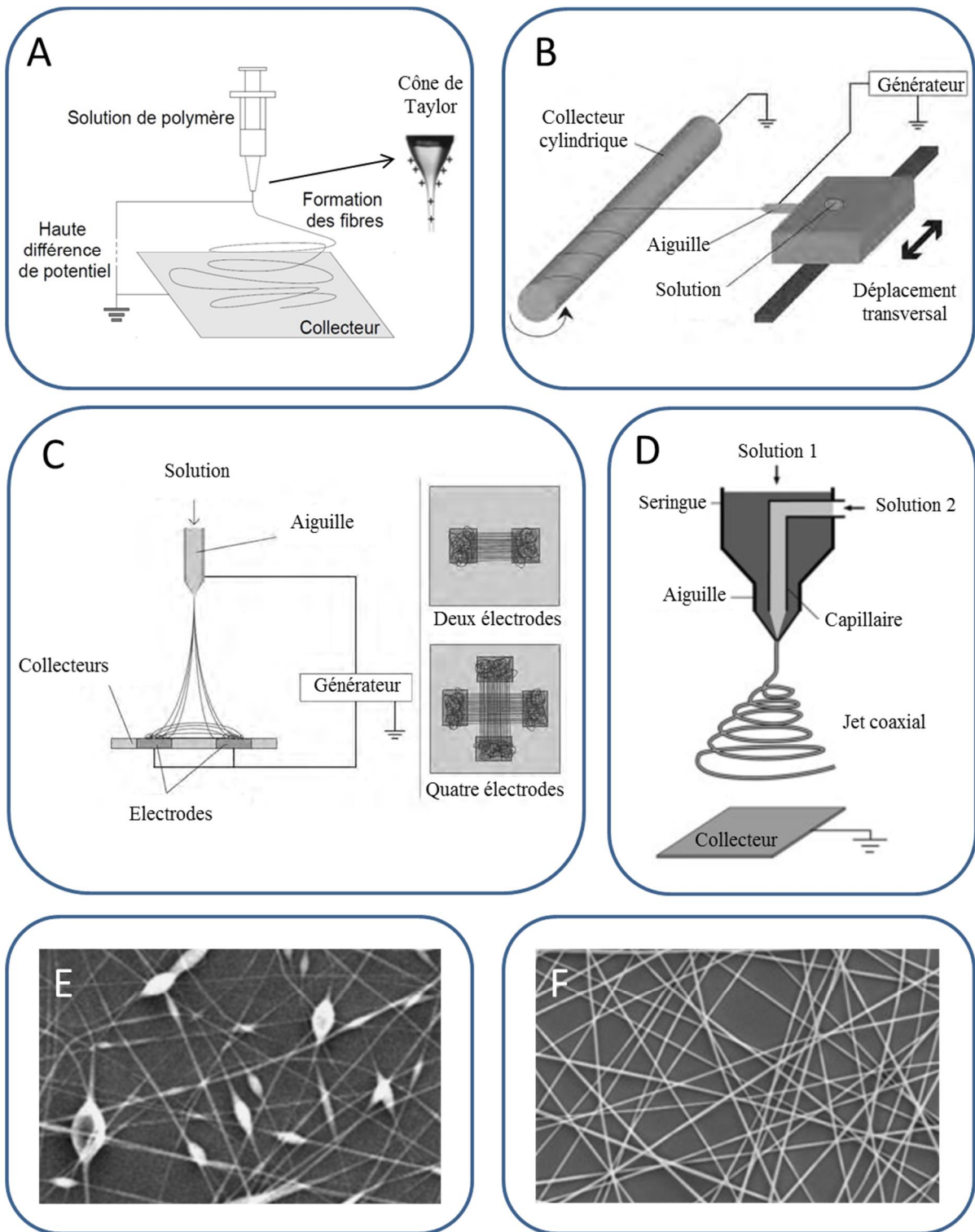


Figure 14: Schéma de différents dispositifs d'électrospinning. A: système vertical basique avec collecteur statique<sup>129</sup>, B: système horizontal avec collecteur cylindrique et déplacement de la source<sup>93</sup>, C: Système multi-électrodes<sup>93</sup>, D: système co-axial<sup>129</sup>, E: fibres perlées<sup>129</sup>, F: fibres de morphologie optimale<sup>129</sup>.

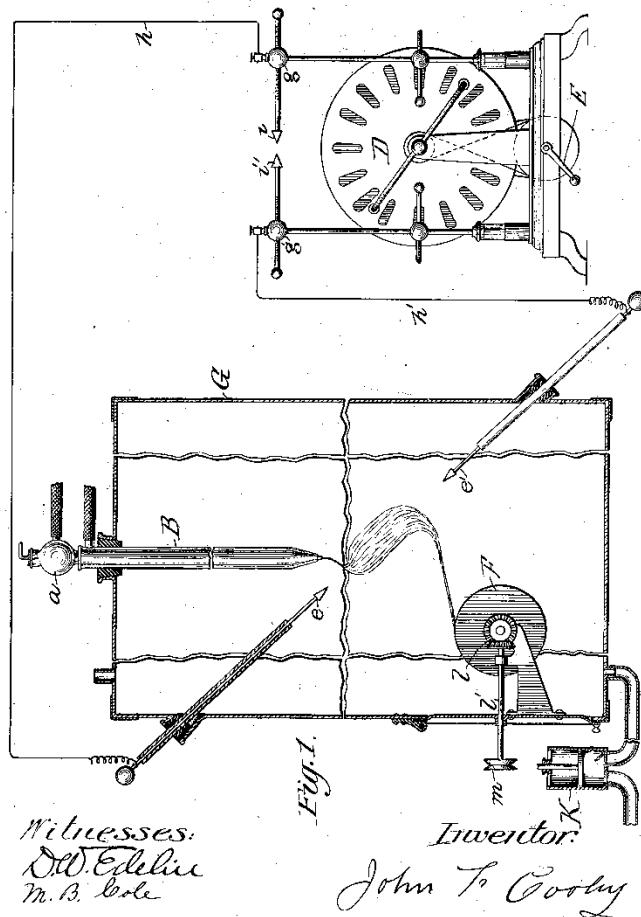


Figure 15: Exemple de brevet déposé au début du XXème siècle sur le principe de l'électrospinning<sup>132</sup>

### Paramètres techniques

Il est possible de distinguer trois catégories: les paramètres du système, de la solution, et de l'environnement. Les deux premières sont dites intrinsèques, la dernière extrinsèque<sup>51,129</sup>. Tous ont principalement une influence sur la faisabilité du procédé, sur le diamètre des fibres et leur morphologie<sup>50</sup>.

Les paramètres du système regroupent la tension appliquée, le débit, le diamètre de l'aiguille, la distance aiguille-collecteur et la forme du collecteur. La tension doit atteindre une valeur seuil pour permettre l'apparition du cône de Taylor et le début de la formation des fibres. Plus elle est importante, plus le diamètre des fibres sera faible<sup>50</sup>. Certains travaux relatent une stabilisation pour un très fort potentiel<sup>131</sup>, d'autres l'apparition de perles liées par

un très fin filament<sup>50,129</sup>. Une aiguille d'un plus fort diamètre conduit à des fibres plus grosses<sup>131</sup>. Une augmentation du débit, celui-ci étant généralement imposé par un pousse-seringue classique, entraîne à l'inverse une augmentation du diamètre<sup>129</sup>. Comme nous l'avons vu plus haut, la forme (et les mouvements) du collecteur influent sur la morphologie du réseau de fibres, notamment leur alignement<sup>50</sup>. La distance-aiguille collecteur va influencer sur l'équilibre général et donc principalement sur la valeur seuil de la tension, ainsi que sur la surface recouverte par le matériau électrospinné<sup>51</sup>.

Les paramètres de la solution vont regrouper quant à eux le solvant, la nature du polymère, son poids moléculaire, sa viscosité, sa conductivité et sa polarité. De nombreux polymères peuvent être utilisés en électrospinning (voir plus bas), chacun ayant son propre poids moléculaire. La viscosité, directement liée à la concentration de la solution et au poids moléculaire du polymère, est un paramètre crucial<sup>51,131</sup> : si elle est trop faible, le procédé ne permet d'obtenir que des gouttes (on retrouve alors l'électrospraying)<sup>50</sup>, ou des fibres perlées<sup>51,129,131,133</sup>. On note également que le diamètre des fibres augmente avec la concentration<sup>50,51,129,131,133</sup>. La conductivité doit être en général assez élevée pour assurer la faisabilité de la technique, d'où un ajout de produits dédiés dans le solvant, notamment du diméthylformamide (DMF), qui présente une haute constante diélectrique et un moment dipolaire, ou différents sels ioniques<sup>50,51</sup>. Une augmentation de la charge va alors aboutir à une plus grande attraction vers le collecteur et à une baisse du diamètre des fibres<sup>50,51,129</sup>.

Enfin, les paramètres de l'environnement concernent la température, l'humidité ambiante et les flux d'air présents. En effet, concernant ce dernier point, l'utilisation de solvants forts à caractère toxiques et/ou cancérigènes oblige bien souvent à installer le dispositif sous une hotte aspirante, quand bien même le procédé nécessite une certaine stabilité pour maintenir la formation des fibres en continue<sup>51</sup>. Des parois doivent alors isoler au maximum le montage. Température et humidité ambiantes vont affecter le taux d'évaporation du solvant pendant son trajet de l'aiguille au collecteur, ce qui résulte en un changement de diamètre des fibres<sup>93</sup>. Une enceinte d'atmosphère contrôlée ou l'injection de gaz faisant varier l'équilibre des pressions peuvent permettre de contrôler ces paramètres<sup>93</sup>. Une humidité inadaptée provoquera également une dispersion des fibres sur d'autres zones à proximité du collecteur<sup>93</sup>.

En résumé, le système présente trois paramètres principaux que sont la tension appliquée, le débit et la géométrie du collecteur<sup>51</sup>. En parallèle, deux propriétés cruciales de la



solution, sa viscosité/concentration et sa conductivité, vont principalement déterminer le diamètre des fibres et l'apparition (ou non) de perles<sup>51</sup> (Figure 14E et 12F).

		<b>Influence d'une hausse du paramètre</b>
Paramètres du système	Tension	Valeur seuil ; diminue le diamètre des fibres
	Débit	Augmente le diamètre des fibres
	Aiguille	Augmente le diamètre des fibres
	Distance	Equilibre général ; surface recouverte
	Collecteur	Morphologie ; uniformité ; alignement
Paramètres de la solution	Polymère	Equilibre général ; choix du solvant
	Poids moléculaire	Equilibre général ; augmente le diamètre des fibres
	Viscosité / concentration	Faisabilité ; augmente le diamètre des fibres
	Conductivité	Faisabilité ; diminue le diamètre des fibres
	Polarité	Faisabilité ; diminue le diamètre des fibres
	Solvant	Modifie la conductivité
Paramètres de l'environnement	Température	Modifie le diamètre des fibres
	Humidité	Equilibre général ; modifie le diamètre ; surface recouverte
	Flux d'air	Stabilité

Table 2: Résumé des paramètres d'un montage d'électrospinning.

### **Avantages et limites**

L'électrospinning apporte plusieurs avantages par rapport à d'autres procédés de fabrication de fibres de polymère (citons par exemple la séparation de phase, l'extrusion ou l'auto-assemblage<sup>134</sup>). Elle est la seule technique permettant la fabrication de scaffolds non seulement à l'échelle d'un laboratoire de recherche, mais aussi potentiellement la fabrication de masse<sup>51,134</sup>. Bien que des dispositifs commerciaux existent, la plupart des montages sont artisanaux et assemblés de toute pièce (« custom-made »)<sup>135</sup>, ce qui reflète l'adaptabilité et la flexibilité du procédé, un grand avantage pour une utilisation versatile dans de nombreux domaines concernés par l'ingénierie tissulaire, quel que soit l'organe et l'application visés<sup>50,51,134</sup>. La possibilité d'orienter ou de tisser la structure et d'imposer ou non une anisotropie à l'échelle moléculaire est notamment un point important<sup>50,93,129</sup>, tout comme la large gamme de vitesses de dégradation accessibles<sup>134</sup>. Un autre attrait est la morphologie particulière du réseau de fibres obtenu<sup>51</sup>, et surtout la taille essentiellement sub-micrométrique de leur diamètre. En effet, au sein de la MEC, les fibres de collagène présentent un diamètre

d'environ 50-500nm<sup>50</sup>, qui se trouve donc être exactement du même ordre de grandeur que les échantillons électrospinnés qui vont donc pouvoir en mimer la structure<sup>50,93</sup>. Cette morphologie permet d'améliorer significativement la réponse cellulaire par rapport aux fibres d'un diamètre supérieur au micromètre<sup>51</sup>. Toujours concernant la structure, la porosité du matériau est très importante (évaluée jusqu'à 91,6% par porosimétrie au mercure<sup>51</sup>), avec un haut ratio surface/volume<sup>51,134</sup> et des pores nettement interconnectés<sup>51</sup>, ce qui favorise l'adhésion cellulaire<sup>51,136</sup>. Les pores eux-mêmes ont une taille estimée de 0,1 à 3 µm environ<sup>129</sup>. D'un point de vue mécanique, le comportement d'un scaffold électrospinné peut approcher celui de certains tissus, notamment la peau<sup>50</sup>, et présente de meilleures propriétés que les autres matrices synthétiques fabriquées en laboratoire<sup>50,93</sup> grâce à une structure stable et comportant moins de défauts<sup>51,134</sup>.

Il est cependant possible de soulever quelques limites, comme une difficile « infiltration » des cellules à l'intérieur du matériau, même en cas de très bonne adhésion. Ce problème peut être résolu en établissant une double porosité à plusieurs échelles<sup>93</sup>. Le principal frein dans l'utilisation de l'électrospinning est la mise en place empirique des paramètres du montage : même si certaines données comme la concentration du polymère et le solvant utilisé peuvent être déduites de la littérature, la fabrication d'un nouveau dispositif implique une démarche d'essai-erreur pour optimiser toutes les autres variables<sup>133</sup>. Cet équilibre complexe limite les possibilités de modéliser le fonctionnement du procédé<sup>133</sup>.

Fort de ces nombreux avantages, études à présent l'usage de l'électrospinning dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse.

### ***Utilisation en ingénierie tissulaire osseuse***

De nombreux scaffolds électrospinnés ont été étudiés pour leur utilisation en ingénierie tissulaire osseuse, à partir de procédés simples (un seul polymère et des fibres aléatoires) jusqu'à des montages et mélanges plus complexes. Parmi les nombreuses revues de la littérature existante, Huang *et al*<sup>137</sup> relèvent 44 solutions différentes testées, et Jang *et al*<sup>138</sup> 32 scaffolds différents qu'ils classent selon les catégories suivantes : polymères synthétiques, naturels, mélanges, inorganiques, composites, fonctionnalisés et destinés au relargage de médicaments. Comme vu plus haut, les polymères les plus fréquemment rencontrés sont les PLA, PCL et PGA<sup>25</sup>, ainsi que le PLGA (acide poly-lactide-co-glycolide), biocompatible et dont les produits de dégradation sont non toxiques<sup>115,139</sup>. Dans le cadre du présent travail, la

forme plane et souple permettant un remodelage in situ par les chirurgiens est un avantage. Le potentiel de différenciation en cellules osseuses, mais aussi la vascularisation et les possibilités de nanostructuration à l'origine de plusieurs synergies avec l'environnement<sup>140,141</sup>, font du scaffold électrospinné un candidat pertinent comme substitut osseux pour la reconstruction du visage.

Bien qu'ils avancent des perspectives pour la réparation de l'os, un certain nombre de travaux ne s'intéressent qu'à la validation du procédé. Huang *et al*<sup>142</sup>, Carlisle *et al*<sup>143</sup> et Croisier *et al*<sup>144</sup> étudient ainsi respectivement la formation de fibres de gélatine, de fibrinogène et de PCL, ces derniers analysant leurs propriétés mécaniques. D'autres équipes illustrent la versatilité de l'électrospinning et en éprouvent les différentes techniques, comme en alignant des fibres de PVA (alcool polyvinylique) en les formant entre deux tiges<sup>145</sup>, en cherchant à obtenir des fibres poreuses<sup>130</sup> ou en projetant du PEVOH (poly(éthylène-co-vinyl alcool)) directement sur une main humaine jusqu'à la recouvrir<sup>146</sup>. Il est à noter qu'électrospinner directement une suspension cellulaire est également un procédé à l'étude.<sup>93</sup>

La plupart des travaux s'intéressent cependant aux composites, en mélangeant les polymères les plus utilisés entre eux ou en y ajoutant d'autres produits<sup>147</sup>. Il s'agit principalement de nanofibres et nanotubes de carbone<sup>115,147,148</sup>, de céramiques sous forme de nanoparticules<sup>90,115,149</sup> et/ou de composés médicamenteux<sup>131,148,150</sup>. La faisabilité en fonction de la concentration en nanoparticules est alors étudiée<sup>90</sup>, mais dès lors, les scaffolds vont être testés en culture cellulaire pour déterminer leur potentiel d'ostéoconduction, ostéoinduction et ostéogénicité, et le rapport des facteurs ajoutés. Song *et al*<sup>151</sup> et Zhang *et al*<sup>152</sup> constatent ainsi adhésion et prolifération des cellules osseuses, avec une augmentation significative des composites par rapport aux solutions pures, pour des mélanges respectivement de PVA/collagène/HA et PCL/collagène/HA. Fujihara *et al*<sup>153</sup> trouvent quant à eux de meilleurs résultats avec le PCL pur qu'avec un mélange PCL/carbonate de calcium. D'autres travaux s'intéressent plus particulièrement à la différenciation en cellule osseuse grâce au support<sup>134</sup>. Venugopal *et al*<sup>88</sup> obtiennent une augmentation de l'expression de la PAL et de la minéralisation à partir de PCL/gélatine/HA. Lee *et al*<sup>149</sup> concluent sur la bonne différenciation de CSM humaines grâce à des particules de HA ajoutées à du PLGA, tout comme Li *et al*<sup>154</sup> grâce au relargage efficace de BMP-2 (Bone morphogenetic protein 2) dans un composite soie/HA/BMP2.

Des techniques de culture plus complexes sont également mises en place pour tester les matériaux électrospinnés dans le contexte de l'ingénierie tissulaire, notamment par

l'insertion dans un bioréacteur dynamique. Il s'agit en général d'un bioréacteur cylindrique rotatif, et une bonne minéralisation est obtenue après culture<sup>155,157</sup>. Pour obtenir un substitut de forme adéquate, des structures particulières sont également étudiées. Bonani *et al*<sup>157</sup> analysent l'anisotropie de fibres de PCL et fibroïne mêlées et leur potentiel pour la revascularisation du tissu. En augmentant graduellement la concentration de la solution, Grey *et al*<sup>96</sup> obtiennent un gradient de diamètre de fibre entre chaque couche du matériau, et donc une porosité évolutive (permettant de s'affranchir des limites d'infiltration des cellules vues plus haut). En fabriquant un scaffold électrospinné microstructuré en nid d'abeille<sup>158</sup>, Nedjari *et al*<sup>159</sup> ont permis l'organisation des ostéoblastes en une structure mimant les héli-ostéons.

L'étape suivante pour s'approcher de l'application clinique est bien sûr l'implantation *in vivo*, réalisée par exemple chez le rat par Shin *et al*<sup>155</sup> (PCL) et Son *et al*<sup>160</sup> (PCL/PMMA, poly(méthyl méthacrylate)) avec une forme maintenue et une formation d'os minéralisé après implantation. Yang *et al*<sup>161</sup> ont réussi à favoriser *in vivo* la voie endochondrale grâce à une technique modifiée de « wet electrospinning » : des fibres de PLGA/PCL sont formées dans un bain d'éthanol à la place d'un collecteur solide, permettant de créer une éponge fibreuse proche d'un coton. En implantant chez la souris des fibres de PLLA alignées et fonctionnalisées, Lee *et al*<sup>140</sup> ont constaté une migration des CSM et la croissance de l'os *in vivo* avec une synergie entre l'alignement et la libération des médicaments.

## IV. Cellules sélectionnées pour le projet de thèse

### 1) Historique et définition des cellules souches

#### **Historique**

De nombreuses publications<sup>30,65,162,164</sup> s'accordent pour voir dans les études de Friedenstein *et al*<sup>165</sup>, en 1968, les travaux précurseurs qui permettront de nombreuses découvertes dans le domaine des cellules souches adultes. Il était déjà connu depuis les années 1950 que l'on trouvait dans la moelle osseuse un réservoir de cellules permettant la formation des différentes cellules sanguines<sup>166</sup>. Friedenstein *et al* ont étudié, après rinçage de ces cellules non-adhérentes, le comportement *in vitro* d'autres cellules présentes dans la moelle. D'une population à la morphologie hétérogène bien que proche des fibroblastes, ils ont pu à

peu observé une homogénéisation et l'apparition de tissu proche de l'os. Les cellules présentaient une importante prolifération mais aussi des phases temporaires d'inactivité totale. La présence de cellules non-hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse, capables de différenciation en plusieurs types cellulaires, était ainsi découverte<sup>162</sup>.

### **Définition**

Cette catégorie de cellules particulières, appelées cellules souches, est définie par trois de leurs propriétés<sup>30,65,166</sup> : un fort potentiel de division, un état non-spécialisé (ou indifférencié, immature) et la capacité à se différencier en de nombreux types cellulaires différents\*<sup>2</sup> en fonction des signaux externes. On distingue les cellules souches embryonnaires, à l'origine de la formation des cellules de l'organisme entier dans les 3 à 5 jours après fécondation<sup>166</sup>, et les cellules adultes ou somatiques<sup>30,166,167</sup>. Ces dernières ont pour rôle la régénération des tissus tout au long de la vie, qu'il s'agisse d'un renouvellement normal ou à la suite de blessures ou de pathologies<sup>162,166</sup> (cela consiste bien dans ce cas à une régénération, et non à une réparation aboutissant à une cicatrice, la formation d'un tissu fibroblastique et des fonctions réduites<sup>168</sup>). Les divisions successives peuvent conduire à l'apparition de deux cellules souches filles, ou de cellules spécialisées, et ces divisions peuvent intervenir même après de longues périodes d'inactivité<sup>166</sup>.

On distingue trois types de cellules souches, en fonction de leur potentiel de différenciation<sup>30</sup>. Elles sont dites totipotentes si elles permettent de créer tous les types cellulaires de l'organisme ainsi que les tissus extraembryonnaires (placenta), ce qui concerne les cellules zygotes<sup>30,166</sup>. Elles sont pluripotentes si elles ont la capacité de former tout l'organisme (cellules souches embryonnaires), et multipotentes lorsqu'elles peuvent se différencier en plus d'un type cellulaire (cellules souches adultes)<sup>166,169</sup>. Les différentes sources de cellules souches au sein de l'organisme sont rapportées en annexe.

Parmi les cellules adultes, on distingue les cellules souches dites « mésenchymateuses ». Présentes dans la moelle, elles tirent leur nom des tissus mésenchymateux, issus du feuillet mésodermique, qu'elles sont capables de former : os, cartilage, tendon, ligament, muscle principalement<sup>6,30,164,170,172</sup> (Figure 16). Représentant une source de cellules souches autologues disponibles en de nombreux endroits<sup>162,169</sup>, faciles

---

\*<sup>2</sup> Certains auteurs jugent que les cellules souches sont reconnues non par une rigoureuse définition *in vivo*, mais par ce qu'il est possible de leur faire faire *in vitro*<sup>162,169</sup>.

d'accès<sup>172</sup> et permettant la formation d'os<sup>170,171</sup>, c'est donc à l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses que nous allons particulièrement nous intéresser.

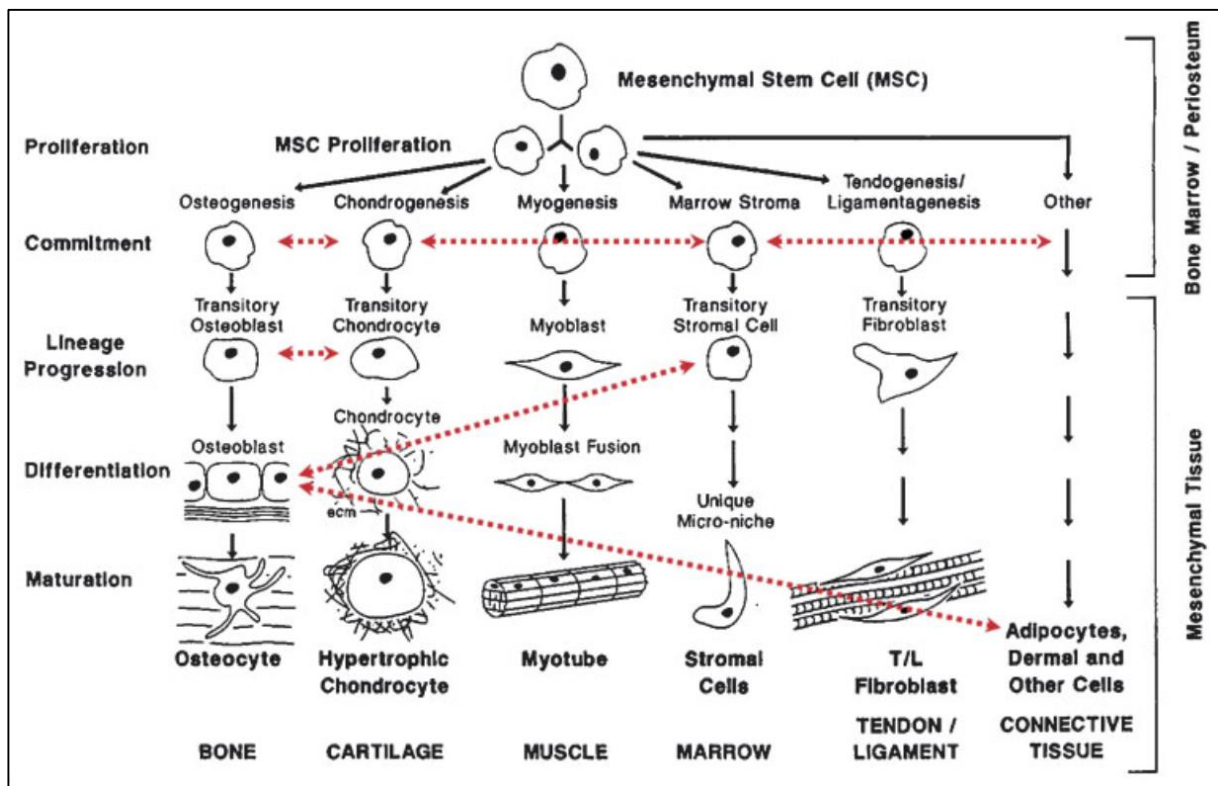


Figure 16 : Multiples voies de différenciation des MSCs (colonnes) et leurs différents stades d'avancement (lignes). Les flèches rouges indiquent les transdifférenciations avérées ou suspectées. Source : Caplan *et al*<sup>171</sup>.

## 2) Utilisation des cellules souches mésenchymateuses

### Culture *in vitro*

Suite à leur découverte, les cellules souches, en particulier mésenchymateuses, ont rapidement été étudiées pour mener à bien leur culture *in vitro*. Elle a été rendue possible dès le début des années 1980 à partir d'embryon de souris, en utilisant des fibroblastes comme un tapis nourricier (« feeder layer »)<sup>166</sup>. Cet aspect va majoritairement disparaître au fur et à mesure que la technique se développe tout au long de la décennie<sup>171</sup>. Dans les années 1990, les cellules d'origine humaine sont également cultivées à partir d'embryons non utilisés issus de fécondation *in vitro*<sup>166</sup>. Des premiers essais de réimplantation *in vivo* sont également menés<sup>173</sup>. Ces études permettent de comprendre des mécanismes fondamentaux<sup>166</sup>, mais bien que le potentiel de prolifération des cellules embryonnaires soit nettement supérieur à celui

des cellules souches adultes (plus d'un an en laboratoire, contre une quarantaine de passage avant la senescence<sup>30,169</sup>), leur obtention soulève de nombreux problèmes éthiques<sup>30,167</sup>. Les propriétés de régénération des cellules souches adultes et les nombreux sites de prélèvement (Figure 17) en font alors de parfaites candidates pour une utilisation en médecine régénérative et ingénierie tissulaire<sup>162,166</sup>. Même si elles constituent une réserve diminuant graduellement avec l'âge<sup>30,174</sup>, la possibilité de les prélever pour les injecter dans les zones à soigner, où elles vont pouvoir se différencier au contact d'un environnement pertinent, va être étudiée<sup>172</sup>.

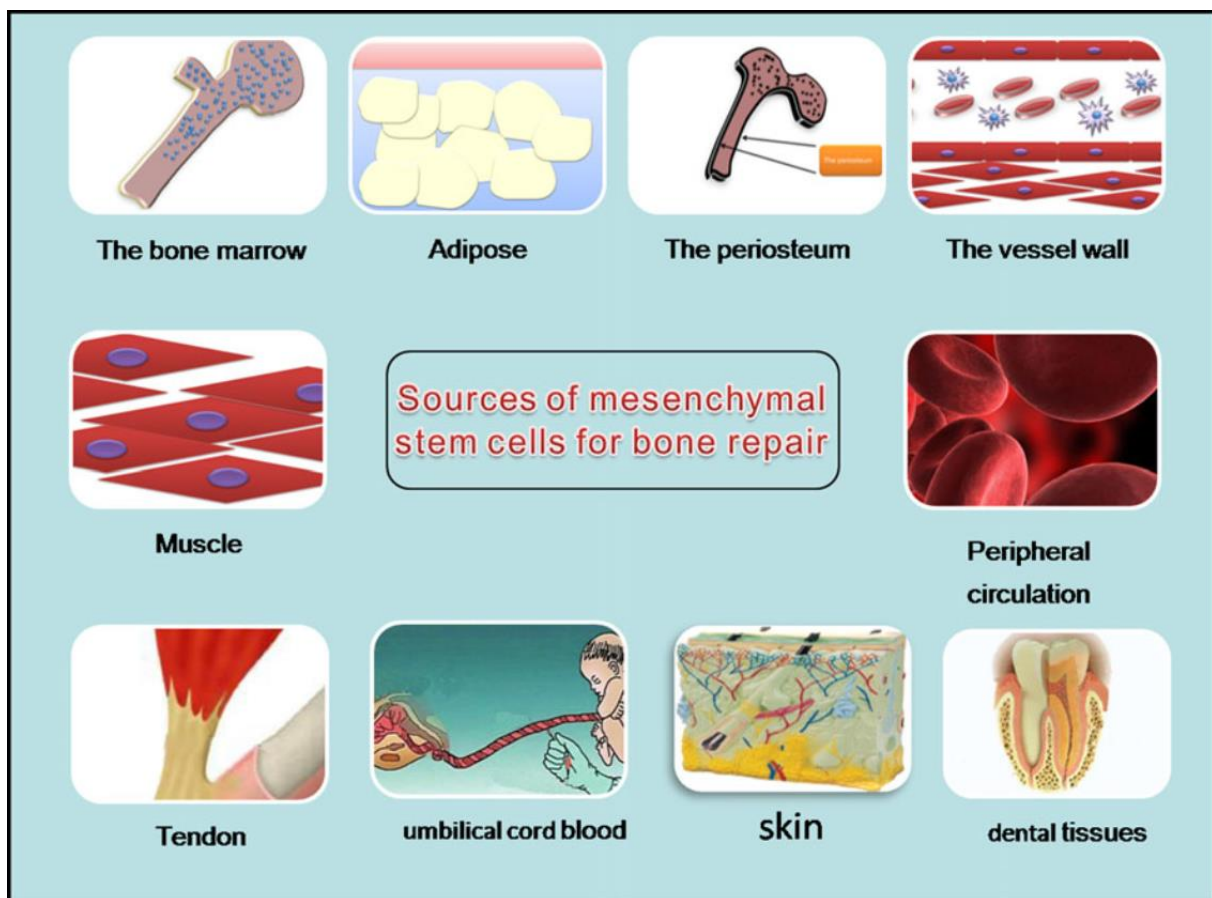


Figure 17 : Sources de CSM pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Source : Wang *et al*<sup>175</sup>.

### **Thérapie cellulaire et CSM**

Les premières études vont justement concerner l'os<sup>30</sup>, la voie « par défaut » spontanée des CSM en culture étant la lignée ostéoblastique<sup>169</sup>, avec l'injection de CSM pour augmenter localement la formation d'os en promouvant l'ostéogénèse<sup>169,171</sup>. En effet, dans le cas de l'ostéoporose notamment, la baisse de production de tissu osseux pourrait être directement liée à une baisse du nombre de CSM<sup>171</sup>. L'injection de cellules issues d'une autre niche

apparaît donc logiquement comme un moyen thérapeutique, les effets bénéfiques pouvant être autant dus à l'apport de cellules saines aptes à se différencier qu'aux facteurs de croissance qu'elles produisent<sup>169</sup>. Ce principe a récemment été étudié par Charoenpanich *et al*<sup>176</sup>, qui ont vérifié la faisabilité de la régénération osseuse à partir de cellules issues de patientes ménopausées et atteintes d'ostéoporose. L'injection est également envisagée dans les cas de fracture<sup>175</sup> ou comme complément d'une greffe osseuse après des traitements lourds telle la chimiothérapie<sup>171</sup>.

Cependant, la forte variabilité entre individus et entre espèces<sup>164</sup> rend complexe la mise au point de modèles : par exemple, les CSM humaines se différencient en os au contact de la dexaméthasone, mais les CSM murines peuvent également se différencier aisément en adipocytes<sup>174</sup>. Toutefois, l'utilisation de la lignée de CSM murines C3H10T1/2 peut améliorer la répétabilité des études<sup>65,177</sup>. D'autres limitations sont que les CSMs présentent un fort potentiel de migration<sup>167,171</sup>, et doivent être mises au contact de facteurs adéquats pour suivre une différenciation complète<sup>171</sup>. Contrebalancer ces deux aspects peut être envisagé, en utilisant un environnement cellulaire maîtrisé et un scaffold diminuant la dispersion<sup>30</sup>, grâce à l'ingénierie tissulaire. Sa faisabilité à partir de CSM a ainsi été validée de nombreuses fois, notamment sur les matériaux détaillés précédemment comme des granules de CP ou des composites fibres électrospinnés / nanoparticules de HA<sup>16,29,149</sup>. En particulier, McBeath *et al*<sup>178</sup> relèvent l'importance particulière du scaffold en détectant que la forme de la cellule fait partie des signaux qui aiguille la différenciation (en ostéoblaste ou adipocyte ici). Kagami *et al*<sup>179</sup> ont récemment analysé plusieurs cas clinique de médecine régénérative faisant appel aux CSM pour conclure de la faisabilité et la sûreté du procédé, en relevant toutefois le risque important d'atrophie *in vivo* et les problèmes liés à la grande variabilité, tant entre individu que du point de vue des protocoles de culture. Il n'existe donc aujourd'hui aucun standard de préparation des CSM pour l'ingénierie tissulaire.

### ***Cellules souches et cellules endothéliales***

Comme nous l'avons vu plus haut concernant les attentes des chirurgiens, une des limites de l'utilisation de substituts osseux en remplacement des greffes est leur difficile vascularisation une fois implantés. Insuffisante, celle-ci remet en cause la viabilité et l'efficacité du substitut à long terme, particulièrement pour des remplacements de volume important<sup>43,44,47</sup>.



Une des solutions est la prévascularisation *in vivo* du substitut. Celui-ci est implanté dans l'organisme au niveau d'un axe vasculaire, puis après maturation, est retiré pour être implanté à nouveau dans la zone à soigner<sup>48</sup>. On retrouve ici l'inconvénient des deux sites opératoires déjà rencontrés avec les autogreffes. Afin de profiter des avantages de l'ingénierie tissulaire, une autre méthode à l'étude est donc la coculture des cellules d'intérêt, ostéoblastes ou cellules souches mésenchymateuses, avec des cellules endothéliales (CE) responsables de la formation des vaisseaux<sup>48</sup>. Cette méthode permet de mimer au mieux la structure au sein du tissu reconstruit *in vitro*<sup>47</sup>. Un apport positif de cette coculture après l'implantation a été montré<sup>47</sup>, cependant, un intérêt existe également à l'étape même de la culture *in vitro*. Il a été noté que la préculture des CSM en condition d'hypoxie favorisait l'angiogenèse après injection *in vivo*. En effet, les facteurs de croissance des CSM (le *vascular endothelial growth factor*, ou VEGF, étant produit par les ostéoblastes sous l'effet de BMP-2) favorisent l'angiogenèse et la croissance des CE<sup>44</sup>. Réciproquement, la présence des CE a un effet significatif sur la prolifération et la différenciation des CSM<sup>180,181</sup>. Il y a donc un apport mutuel et un développement interdépendant entre CSM et CE, aboutissant à des substituts mieux vascularisés que les monocultures respectives<sup>43,64,5,180,182</sup>. L'équilibre de la coculture nécessite toutefois un environnement 3D, d'où le développement de cette technique au contact de scaffold pour l'ingénierie tissulaire<sup>44,48,183</sup>. Elle n'est cependant à l'heure actuelle pas encore optimisée *in vitro*, avec des paramètres tels que le ratio CSM/CE et les protocoles de mise en commun des cellules (coculture à J0 ou ajout d'un type cellulaire à un autre après un temps donné) nécessitant d'être optimisés car présentant encore des résultats contradictoires dans la littérature<sup>44,180,183</sup>.

En envisageant l'ajout d'un second type cellulaire, on vient en réalité d'étudier un premier moyen pour modifier l'environnement de nos cellules d'intérêts destinés à la formation de tissu osseux.

## V. Enjeux et description de l'environnement cellulaire

### 1) Quels sont les signaux de l'environnement perçus par la cellule ?

Le micro-environnement cellulaire est un ensemble complexe : les cellules voisines du même type ou de types différents, la MEC, les conditions d'apport en oxygène et nutriments,

le support de culture ou encore les mouvements de celui-ci sont autant de signaux extérieurs qui peuvent modifier son comportement<sup>115</sup>. Un certain nombre sont indispensables à sa viabilité, comme nous l'avons vu plus haut, tels que la température, l'humidité ou le pH, et vont influencer sur l'adhésion, la prolifération ou la migration cellulaire<sup>115</sup>. Mais l'environnement peut également avoir des effets plus variés, antagonistes ou entrant en synergie, en modifiant l'organisation et l'orientation du tapis cellulaire, l'activité métabolique de la population, et surtout la différenciation dans le cas des CSM<sup>115</sup>. Isolées, ces dernières peuvent, même *in vitro*, demeurer non-spécialisées<sup>166</sup>. Placées dans des conditions adéquates, dont l'équilibre est complexe, elles vont en revanche se différencier selon les différentes voies accessibles. Contrôler ces voies et permettre ainsi une « différenciation dirigée » est un enjeu crucial de la modification de l'environnement en ingénierie tissulaire<sup>166</sup>, les interactions entre la cellule et les signaux extérieurs amenant des modifications dans l'expression des gènes, dites épigénétiques, qui pourront être transmises lors des divisions successives<sup>166</sup>.

### ***Signaux chimiques***

Comme nous l'avons vu plus haut, et dans le cas des structures complexes *in vivo*, l'environnement d'un type cellulaire est modifié par la présence d'autres lignées et les molécules qu'elles produisent et relarguent<sup>65</sup>. Dans le cas d'une culture *in vitro*, il est possible d'ajouter au milieu de culture des facteurs de croissance, qui vont aiguiller la différenciation des cellules. La lignée ostéoblastique est ainsi classiquement induite par l'utilisation d'acide ascorbique, de dexaméthasone et de  $\beta$ -glycérophosphate<sup>184,186</sup>. Ces différents facteurs peuvent également être encapsulés dans le scaffold, tout comme sa composition chimique intrinsèque peut jouer un rôle, telle l'utilisation des CP et de l'HA qui miment l'environnement osseux natif<sup>53</sup>. La chimie de surface, qui définit par exemple les propriétés d'hydrophobie du matériau ou l'adsorption des protéines, va notamment influencer sur les capacités d'ostéoinduction et ostéoconduction<sup>10,115</sup>. Il est à noter que certains additifs, comme les sérums d'animaux très utilisés en culture cellulaire, peuvent présenter des risques au moment de l'application clinique et ne sont donc pas tous approuvés pour une utilisation chez l'homme<sup>48,187,188</sup>. D'autres moyens d'aiguiller la différenciation et le comportement des cellules doivent donc être trouvés.

## ***Signaux mécaniques***

Nous avons vu en abordant le remodelage, les contraintes mécaniques subies par le tissu osseux sont traduites par les ostéocytes jusqu'à des signaux biologiques pour modifier l'équilibre du comportement des ostéoblastes et ostéoclastes. Contrairement aux produits chimiques, les signaux mécaniques présentent l'avantage de pouvoir être aisément arrêtés ou inversés *in vitro*, sans que cela ne se répercute sur la phase clinique, et sont donc d'un intérêt particulier pour l'ingénierie tissulaire. Ils permettent de plus d'étudier le comportement du matériau comme du tissu vivant sous les contraintes que subira le substitut après implantation<sup>115,189</sup>. Il est possible de distinguer plusieurs catégories principales.

- Cisaillement fluide : A l'origine de la mécanotransduction au sein des canaux qui relient les ostéocytes, le cisaillement fluide peut être reproduit par le mouvement du milieu de culture environnant la culture cellulaire *in vitro*, imposé par les bioréacteurs à perfusion détaillés plus haut<sup>110</sup>. Ces systèmes présentent également l'avantage de transporter nutriments, oxygène et déchets, ce qui influe également directement sur la croissance des cellules<sup>110</sup>. La différenciation des CSM en ostéoblastes, leur prolifération, adhésion et production de matrice se trouvent alors favorisées et directement liées à la durée du cisaillement et la valeur des contraintes<sup>190</sup>. Il a été souligné que ce type de sollicitations créait une synergie favorisant l'ostéogénèse quand couplé aux facteurs chimiques<sup>186</sup>. Il peut toutefois être difficile d'évaluer les contraintes précises ressenties par les cellules, notamment au fur et à mesure que le tissu se développe, même si modélisation mathématique et imagerie en temps réelle permettent de nuancer ces limites<sup>110</sup>.
- Vibrations : des études s'intéressent à l'application de vibrations, voire nanovibrations, comme sollicitations mécaniques imposées à la même échelle que la cellule<sup>113,191</sup>. De telles contraintes de faible amplitude mais très haute fréquence pourraient sensibiliser les cellules avant l'application de déformations plus importantes, augmentant ainsi le potentiel de différenciation<sup>191</sup>. Cette technique présente l'avantage de pouvoir être appliquée à des supports de culture classique (boîte de Pétris, incubateur standard) sans modification importante<sup>113</sup>.
- Structure et topographie : Toujours à l'échelle cellulaire, la rugosité du scaffold et ses propriétés mécaniques (élasticité notamment), en modifiant la réaction du support

ressentie par la cellule, vont modifier sa perception de l'environnement et son comportement<sup>115,192,193</sup>. Le recours à des scaffolds aux propriétés mécaniques anisotropes, comme des fibres électrospinnées alignées, est ainsi pertinent pour des tissus vivants qui présentent le même comportement, comme les tendons et ligaments<sup>51</sup>. La forme même que vont prendre les cellules en adhérant au support peut avoir une influence sur leur différenciation<sup>178</sup>.

- Traction et compression : tout comme le cisaillement, des contraintes peuvent être directement imposées au tissu par des dispositifs qui vont par exemple pouvoir étirer le scaffold pendant la culture des cellules, comme vu plus haut<sup>64</sup>.

Ce dernier cas est particulièrement intéressant car il permet, en plus de la différenciation dirigée, de mesurer les propriétés mécaniques des substituts et leur possible évolution à mesure que le tissu cellulaire s'y développe<sup>194</sup>. Il convient cependant de concilier deux échelles mécaniques différentes, celle des forces ressenties par les cellules, et les propriétés mécaniques globales du substitut reconstruit<sup>10</sup>. Concernant la problématique de la reconstruction du visage, en se conformant aux attentes des chirurgiens, l'objectif n'est pas de retrouver un comportement final semblable à celui de l'os natif, mais une tenue mécanique cohérente avec leurs attentes de maniabilité et de maintien.

L'application de contraintes mécaniques à des échantillons cellulaires a été largement étudié, cependant il ne semble se dégager aucun lot de paramètres standard pour induire la différenciation, mesurer les forces engendrés, voire pour d'autres objectifs de culture. L'étude qui va suivre, présentée sous la forme d'un article de review, se propose d'analyser l'existence d'un tel protocole optimal.

## *2) Review : Is there an optimal stretching protocol to induce and study the in vitro bone cells response to mechanical loading?*

# Is there an optimal stretching protocol to induce and study the *in vitro* bone cells response to mechanical loading?

## Abstract

It is well known that bone remodelling *in vivo* is strongly linked to external mechanical signals. Such solicitations are widely used *in vitro* for bone tissue engineering by the application of mechanical stress to cell culture to trigger different cell responses, but devices and protocols show a huge variability. We compared here 35 different studies regarding all the biological, mechanical and technical parameters of *in vitro* tensile stress application on bone cells in order to analyse which values are mainly used and whether an optimal protocol does exist. This work could be used as a decision-making tool for the development of future experiments. First, we found out that a shift is occurring from fundamental comprehension of bone formation to its application for rebuilt tissues and clinical fields. Then it appeared that there was no standard protocol, but optimal range of values could be highlighted and were relevant and efficient. They were often guided by *in vivo* results or physiological values, but moving to out-of-range conditions had not necessarily a negative impact, especially when the main objectives were to obtain a rebuilt tissue. There were consensus on several parameters, such as strain frequency or the use of rest periods, but other points weren't fully established, especially the duration of the respective phases and the eventual synergies with other kind of solicitations.

## Introduction

Bone is a living tissue which is constantly renewed by the conjugated actions of osteoclasts (bone resorption) and osteoblasts (bone formation)<sup>1,2</sup>. It is well known that this remodelling is enhanced by mechanical strain. Wolff<sup>3</sup> first suggested in 1892 a strong response from the living bone tissue to external mechanical stresses, leading to resorption or increase in formation. This behaviour was thus experimented<sup>4</sup> and, in 1987, Frost proposed the principle of *mechanostat*<sup>5</sup> to explain this remodelling. *In vivo*, the understanding of what is now mainly called bone mechanotransduction went further year after year, with a set of "key early findings"<sup>6</sup> especially based on the work of Rubin and Lanyon<sup>7-10</sup>. During mechanotransduction process, the mechanical signal is translated in a biological one with a strong role of fluid movements in the lacuna-canalicular network<sup>11</sup> and

osteocytes (mature osteoblasts stuck into the extracellular matrix) playing the role of sensor cells<sup>12</sup>. Even if not all the involved mechanisms are perfectly understood, they have been many times reviewed<sup>6,12-14</sup>, with propositions for the *in vivo* threshold values<sup>14</sup>.

All these findings could thus allow researchers from biomechanics and bioengineering fields to adapt these *in vivo* mechanisms for *in vitro* experiments, not only to refine our understanding of bone behaviour at the cell level, but also to use them as a strong means for developing clinical applications with tissue engineering. The general concept of bone tissue engineering is a cycle<sup>15-17</sup>: cells of interest are removed from the patient's body and are cultured on a specific biomaterial, known as a scaffold, to improve adhesion and proliferation and to induce differentiation. The rebuilt tissue, a hybrid substitute made from both material and cells, is then used to heal the patient<sup>18</sup>. To ensure the differentiation, a common method is to modify the culture environment and thus the external signals applied to the cells<sup>19,20</sup>. Considering the strong influence of strain on bone remodelling *in vivo*, we will focus here on mechanical signals, especially stretching, and the *in vitro* response of bone forming cells. Several parameters should then be carefully studied, the "key mechanical parameters"<sup>6</sup>, i.e. frequency, magnitude and rest periods, but also the main factors of tissue engineering (scaffold, cells and bioreactor<sup>18,21</sup>) as well as the biological and technical issues: pre-culture and recovery steps, device geometry and total duration. Many devices with various mechanical solicitations have been used and reviewed<sup>22,23</sup>, as well as the consecutive conclusions for current investigations such as stem cells differentiation<sup>24</sup>. However, the specific values for each parameter could show a huge variability according to the whole literature, and the question of an optimal setting when establishing a new protocol is not clear.

We proposed here a review of all these parameters in order to analyse which values are mainly used and whether an optimal protocol does exist. We focused on the application of tensile stress to *in vitro* bone cell culture. To the best of our knowledge, such a specific study on culture schedules and on the mechanical, biological and technical parameters has never been performed. It could be used as a decision-making tool for the development of future experiments.

We selected 35 articles published over the 25 past years (1990-2014). Articles were selected if they involved (a) *in vitro* cell culture, (b) tensile stress application and (c) bone tissue. They should have focused enough on these points to provide all the requested information, i.e. (1) a main objective based on the use of tensile stress, (2) the presence or lack of a specific scaffold, (3) the geometry of the mechanical device, (4) the studied cells, (5) the duration of the loading phase, (6) the frequency and (7) magnitude of strain, (8) the presence or lack of a static cell pre-culture, (9) the presence or lack of a rest period, (10) the schedule of stress application and (11) a conclusion highlighting the specific influence of the stress.

After a first screening, 35 articles were chosen based on the “relevant results” of usual search engines (Pubmed, Scopus, Google Scholar) and were found to be spontaneously distributed over the 25 past years and to fit the total number of articles with the same keywords (Figure 1). It had been previously decided not to go further than 1990 because Murray 1990<sup>25</sup> was reported as the first publication studying the effect of mechanical load on *in vitro* cell culture<sup>26</sup>.

The questions we proposed to answer here, which correspond to the title of the following sections, are summarised in Table 1. They were defined before the complete review of the selected articles and before extracting the requested key parameters.

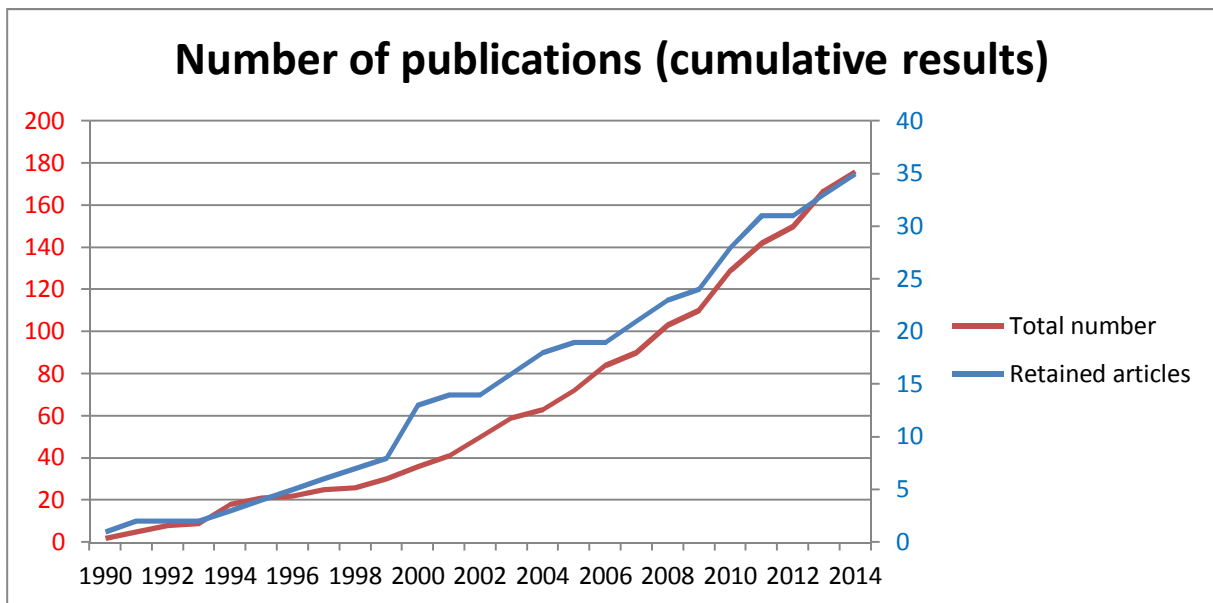


Figure 1: Cumulative distribution of the retained articles (blue line) and of the total number of publications with the keywords “bone tensile mechanical loading in vitro” according to Scopus (red line).

	Questions	Main topic
1	What are the main objectives when applying tensile stress in vitro?	General overview
2	Are specific scaffolds used?	Bone tissue engineering parameters
3	Is there a standard geometry for the tensile testing machine?	
4	Which kind of cells is used?	
5	Are the tensile stresses continuous or periodic?	Technical parameters
6	What is the duration of the tensile stress application phase?	
7	Are there optimal frequency and magnitude?	
8	Is a static pre-culture phase essential before mechanical loading?	Side phases
9	Are there rest periods during the mechanical solicitations phase?	
10	Is there a recovery phase between the end of the dynamic culture phase and the analysis?	
11	Are results always positive?	Discussion
12	Could other solicitations than tensile stress be needed?	
13	Discussion: should we really try to mimic in vivo and physiological conditions?	

Table 1 : Questions investigated in the present review.

## 1) What are the main objectives when applying tensile stress in vitro?

All the publications aimed at studying the influence of the mechanical loading on the cell behaviour, but we were able to define several groups of more detailed objectives (Figure 2):

- The study of *in vitro* bone cell response mechanisms<sup>25,27-40</sup>
- The study of the influence of a specific parameter: strain magnitude<sup>41,42</sup>, differentiation state<sup>43</sup>, added factors<sup>44,45</sup> or stress phase duration<sup>46</sup>.
- The study of the influence of a specific response: cell differentiation<sup>44,47-50</sup>, cell proliferation<sup>43,47</sup>, cell alignment<sup>50,51</sup>, collagen production<sup>51</sup> or apoptosis<sup>43</sup>.
- The comparison with another method of solicitation: fluid shear stress<sup>52,53</sup>, vibrations<sup>54</sup>, chemical method<sup>55</sup> or scaffold nanostructuring<sup>56</sup>.
- The study of the balance between osteogenesis and other functions: adipogenesis<sup>57</sup> or bone/tendon interface<sup>58</sup>.
- The application to clinical methods: distraction osteogenesis<sup>59</sup> or osteoporosis treatment<sup>60</sup>.

Some of the articles announced more than one objective but most of them remained in the same group<sup>47,50,51</sup>. From all of these, it is possible to identify two main tendencies. On one hand, articles focusing on the understanding of cell response mechanisms, mostly in the early years (before 2001)<sup>25,27-35</sup>. On the other hand, the use of these cell behaviours for clinical applications<sup>59,60</sup> and tissue engineering<sup>57,58</sup>, with several mentions of this term in introduction<sup>50,55</sup> and the first publication in the eponym journal<sup>49</sup> around 2010.

*In summary, the present review highlighted a logical shift from fundamental comprehension of bone cell response to external solicitation, to its application for rebuilt tissues and clinical fields, by using mechanical loading in vitro.*



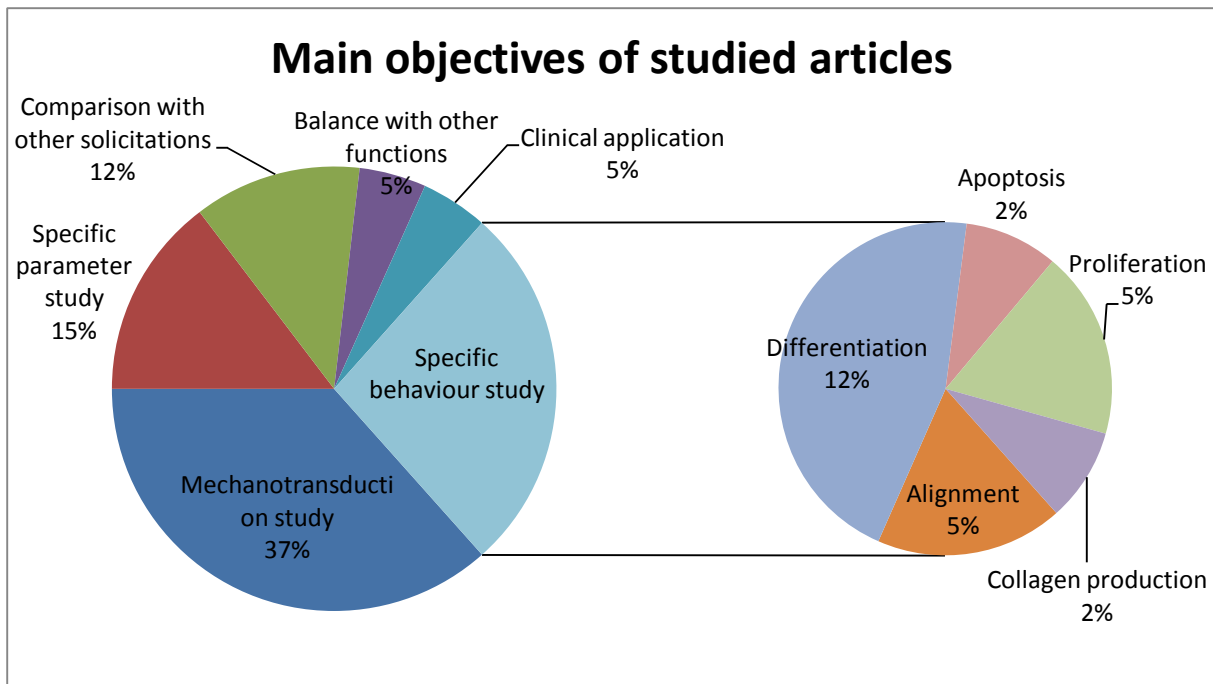


Figure 2: Distribution of the main objectives as announced in the respective introductions (some studies announced several objectives).

## 2) Are specific scaffolds used?

We refer here to scaffolds as a specific 2D or 3D biomaterial used in addition to a usual substrate during the dynamic phase, to perform and enhance cell culture. The majority of the studies did not use such a biomaterial but only a standard culture surface (membrane, plate, or bottom of a well or a dish), sometimes with a coating to improve cell adhesion (collagen or fibronectin, see for instance Peake *et al*<sup>35</sup>).

However, 8 articles were found to use a specific scaffold. It could be knitted<sup>47</sup> or electrospun<sup>50</sup> polymer fibers (respectively polyethylene terephthalate and polycaprolactone), fibrin or collagen gels<sup>30,49,54,60</sup>, a 3D collagen structure<sup>46</sup>, or a nanostructure obtained by lithography<sup>56</sup>. Nevertheless, these scaffolds were used as neutral culture structures, as well as the flat surfaces, and their own influence weren't analysed to focus on the mechanical stress. Only Prodanov *et al*<sup>56</sup> studied the impact on cell behaviour and concluded that a synergy could appear between a relevant nanostructure and mechanical solicitations. Bruinink *et al*<sup>47</sup> compared the results of cells on scaffold, not to the same sample without the material, but to a non-cultured scaffold to estimate the variations in the mechanical properties due to the living tissue.

It has to be noticed that 7 of the 8 articles using a scaffold were published in the second half of the studied period (after 2001). We could thus suggest that the shift from fundamental analyses to

tissue engineering applications, field where scaffold use is predominant<sup>21</sup>, could lead to an increasing number of studies combining culture on scaffolds and tensile stress.

*In summary, a very low number of articles used scaffolds, and their specific influence on cell behaviour was not directly analysed. It could be however very interesting to perform further studies about this parameter, because the only publication focusing on it showed a positive synergy<sup>56</sup>. This point would be more relevant today with the application of mechanical solicitations for tissue engineering.*

### 3) Is there a standard geometry for the tensile testing machine?

In order to apply the tensile stress to the biological samples, these ones were mounted into different devices. Regarding the culture substrate itself (besides an additional scaffolds seen above), it was possible to distinguish three cases: culture wells on elastic plates (15 articles), direct culture on dishes / plates / elastic membranes (14 articles), and the use of a specific culture chamber (6 articles). There were also different ways of applying the tensile stress to the cells: with a 4-point bending (7 articles), by applying a negative pressure to the substrate (12 articles), by mounting the samples directly into clamps (11 articles), or by using a specific design (3 articles).

It has to be noticed that 12 articles actually used the same commercial device known as "Flexcell" (Flexcell International, Mckeesport, PA, USA) which applied a deformation to flexible 6-well plates by using a vacuum pump (negative pressure). Such a device could draw the first steps of a standard to compare the results of each study, but it could have limits when magnitude and frequency values are out of range, or when specific scaffolds have to be used. The articles using scaffolds (see above Question 2) could confirm it: 7 of this 8 ones used indeed original or even custom-made devices. The last one used a Flexcell device with collagen gels<sup>60</sup>.

Some reviews<sup>15,22,23,61</sup> described all the encountered mechanical stretching devices and bioreactors and how they run, with comparisons between different models, but we didn't add such publications to the present work because they did not mention all the parameters we aimed at studying here, and focused on technical aspects and feasibility.

*In summary, system geometries were not extremely diversified, but to date there is no gold standard. The use of a commercial device could lead to this harmonization, but with the slide to clinical applications and tissue engineering, it would be difficult to find a system relevant for all kind of scaffolds and all shapes of aimed rebuilt tissues<sup>21,62,63</sup>.*

#### 4) Which kind of cells is used?

We focused in this review on *in vitro* culture, so specific cell lines or isolated primary cells had to be used for the experiments. Cell sources were thus various with different species (rats and mice, bovines, chicken, humans), functions (osteoblasts, osteocytes), differentiation states (stem or differentiated cells) and origins (primary cells or cell lines). The total distribution were summarised on Figure 3 and Figure 4.

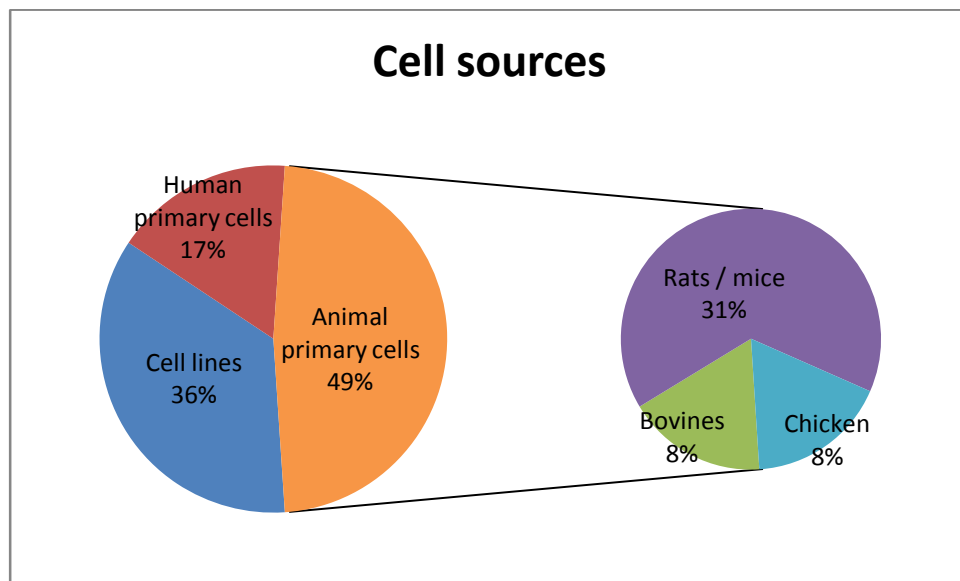


Figure 3: Distribution of the cell sources regarding species and origins (primary cells / cell lines).

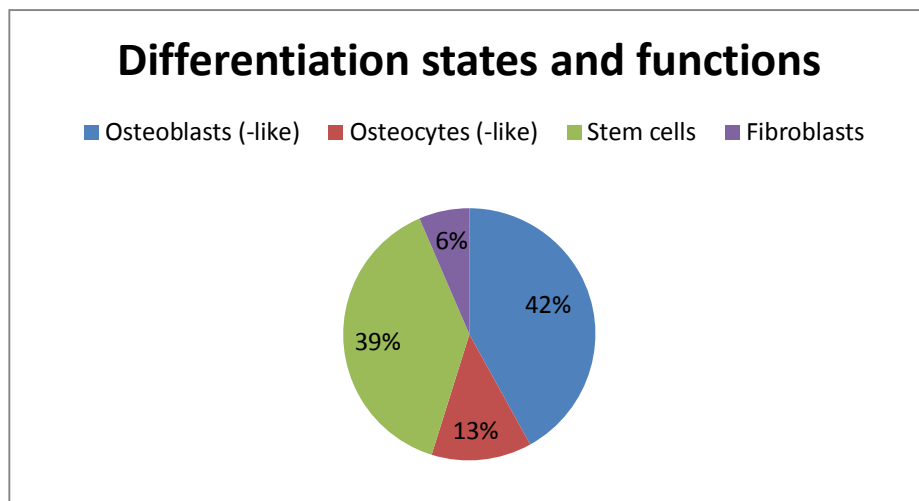


Figure 4: Distribution of the cell sources regarding differentiation states and functions

We noticed 8 different cell lines (MC3T3-E1<sup>36,40,52,54</sup>, UMR106-01<sup>38,52</sup>, ROS17/2.8<sup>36,37,52</sup>, SaOS2<sup>33,39</sup>, MG-63<sup>35,46</sup>, hFOB1.19<sup>53</sup>, SV40<sup>42,43</sup> and ST2<sup>48</sup>). The use of fibroblasts in 2 cases corresponded to an implicit control<sup>52</sup> or was based on the specific study of the bone/tendon interface<sup>58</sup>. Cell types explicitly used as a control group or as a “feeder layer”<sup>45</sup> were not included in the analysis.

This variety of cell sources could be partly explained by technical issues similar to any study’s ones, such as the available animals, ethical considerations, skills, costs, time constraints or state of progress. Considering more than one cell type for the same experiments could also allow to check results repeatability and to avoid bias due to the respective use of cell lines or primary cells<sup>27,31,34–38,46,52</sup>. The cases in which the choice of the cell source was directly guided by the main objectives should be noticed, for instance the work of Charoenpanich *et al*<sup>60</sup> who analysed the feasibility of tissue engineering based on post-menopausal osteoporotic patients’ mesenchymal stem cells.

However, there could be specific interests in using several cell sources for the study of the influence of tensile stress. Jones *et al*<sup>27</sup> found a significant difference between the various cultured cell types (primary osteoblasts from several localisations) regarding the sensibility to the mechanical solicitations. The state of differentiation could also be a crucial parameter, as reported by Thomas *et al*<sup>29</sup> and Weyts *et al*<sup>43</sup>. Our study highlighted that primary human cells were in a minority (17%), but it would be of a clear interest to use them to consider the clinical phases of the tissue engineered constructs.

In order to evaluate the global influence of the mechanical loading on cells behaviour, a specific control group is needed. The main control, and it appeared a logical choice, was the culture of cells in the same condition but without applying tensile stress. It was used by 80% of the studied articles, which confirmed that the use of mechanical solicitations was the main objective of these publications.

Some articles added details to this generic control group. Bruinink *et al*<sup>47</sup> also compared their results to cells killed after the pre-culture phase (and thus before the dynamic culture phase). Cillo *et al*<sup>33</sup> specified that unstrained substrates were non-elastic. Qi *et al*<sup>59</sup> set the samples in running culture chambers (the loading cycles were launched) but without mounting them in clamping. This way, samples were unsolicited but the eventual influence of fluid shear stress due to the movements of the sliding guides could be evaluated. Such an evaluation could be relevant and we might consider that movements of the clamps without samples in the medium-filled chambers could modify the measured forces for some particular geometries of the systems.

Moreover, other articles compared the results obtained with cells of interest to other cell lines in order to analyse the specific response of the bone lineage. These control cells were fibroblasts<sup>27</sup>, different osteoblasts or osteocytes sources<sup>53</sup>, respective monocultures of main cells<sup>58</sup> or

cells from donors of another age bracket<sup>60</sup>. Finally, some articles studied a static loading in addition to<sup>56</sup> or instead of<sup>58</sup> the unstrained samples.

*In summary, cell sources were various but all led to the detection of cell response to mechanical solicitations. They could thus be chosen regarding the general constraints of the conventional in vitro cell culture, but several studies reported different sensibilities to the tensile stress depending on cell types and the differentiation state. Using the same samples without applying the tensile stress was the main control group. This standard case was sometimes refined or completed to analyse the technical noise (fluid displacement due to clamps' movements) or the specific response of the bone lineage.*

### 5) Are the tensile stresses continuous or periodic?

Almost all studied articles used a periodic loading, with sinusoidal cycles in the general case, some square signals<sup>33,36,52</sup> and a few examples of triangle<sup>53,57</sup> and trapezoidal signals<sup>51</sup>. This choice appeared to be based on pioneering works such as Lanyon *et al*<sup>9</sup>.

Zhong *et al*<sup>40</sup> was the only publication in the studied set to use a continuous loading which was compared to compression assays. They consecutively applied several one-hour static loadings to the samples with a higher magnitude step after step, so it could be possible to analyse this process as a periodic square signal with an increasing magnitude and a 1-hour period.

*In summary, there is a complete consensus among the use of periodic solicitations, as suggested by the first seminal works on in vivo mechanical stimulation.*

### 6) What is the duration of the tensile stress application phase?

We were able to sort the articles depending on the duration of the tensile stress application phase, i.e. the total time from the very first mechanical solicitation to the last cycle, even if rest periods occurred between these points. We will refer to this step as the “dynamic culture phase”. We defined the following groups (Table 2). Just as the main objectives (Question 1), some articles studied different durations and so appears twice or more in this distribution.

Group	Duration	Number of articles	Percentage	Articles
Very short	<1 hour	11	31,43	28,29,31,34,35,37–39,52,53,59
Short	1h – 12h	4	11,43	25,30,33,64
Medium	Around 24h	3	8,57	33,49,56
Long	1 day – 7 days	12	34,29	32,36,41–44,47–49,54,55,58
Very long	>7 days	7	20	27,45,49–51,57,60

Table 2: Distribution of the durations of the dynamic culture phase.

The majority of the articles took place in two groups: a very short (<1 hour) or a long (1 day – 7 days) time of dynamic culture. From a technical point of view, short times could be more suitable to study the early cell response to tensile stress, with a regular sampling, when long times offer to study the global long-term behaviour or even tissue reconstruction. To test this hypothesis, we performed then a cross-analysis of the dynamic phase duration and the announced objectives, in terms of “Mecanotransduction study” or “Applications” (Global tissue behaviour, balance with other functions and clinical approach). Indeed, we noticed that short times corresponded to the fundamental research on bone cell response, while long times corresponded to studies closer to a specific application (Figure 5).

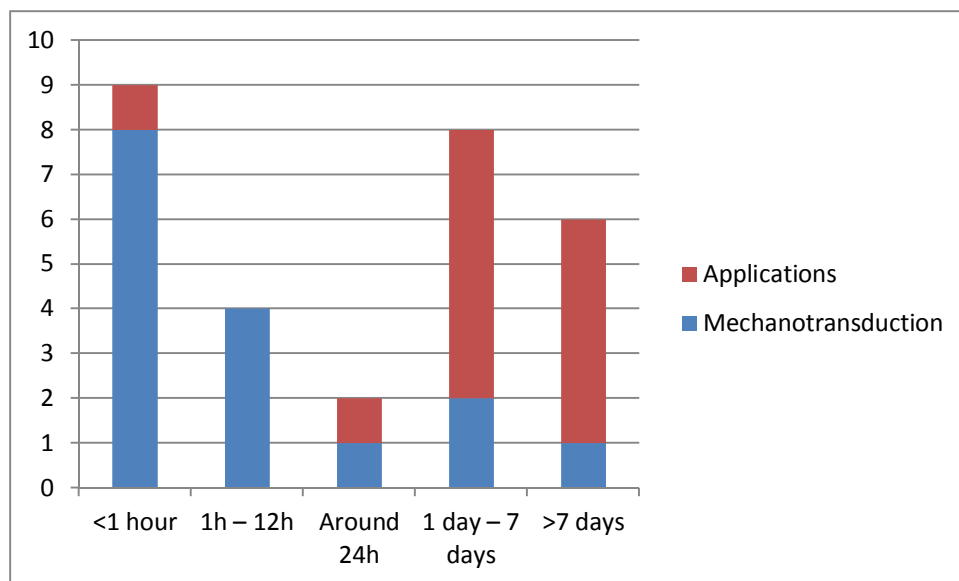


Figure 5: Distribution of the articles depending on the dynamic culture phase duration and the announced main objectives.

We suggested above (question 1) that a slide from fundamental mechanisms research to applications could be occurring. We studied then the same cross-analysis but regarding the date of publication (first or second half of the 25 years of this review). We found a similar profile, with older publications using short times when more recent publications used longer times for the dynamic culture phase (Figure 6). This result strengthened our hypothesis about a shift from an “older publications; short time; fundamental research” studies group on one hand, to a “recent publications; long time; applications” one on the other hand. It could highlight that the field of *in vitro* mechanical tensile loading is currently growing to maturity.

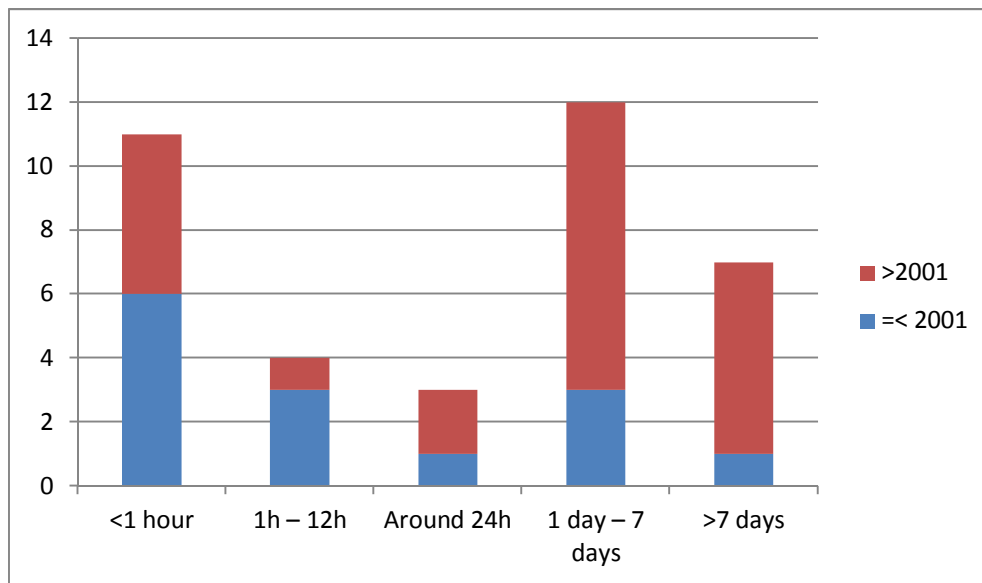


Figure 6: Distribution of the articles depending on the dynamic culture phase duration and the date of publication.

Some articles detailed a comparison between different durations, either for short times<sup>33,40</sup>, or several days or even weeks<sup>45,50,55</sup>. The results of such studies showed that some parameters, especially gene expressions, had non-monotonic variations with a peak at a specific duration<sup>33,40</sup>, when other values continuously increased or decreased (respectively mechanical properties<sup>50</sup> and MTT activity<sup>55</sup>). Connelly et al<sup>49</sup> suggested that these various behaviours could occurred because of successive effects and different mechanism triggers, and so noticed the need of both short and long term studies. For instance, the cell response began with an increase in proteins and proteoglycans production, then these ones decreased and an increase of collagen production appeared<sup>49</sup>. Diederichs *et al*<sup>46</sup> confirmed this need. The study of several durations was sometimes not an intrinsic objective, but a way to obtain a regular sampling for the analysis<sup>50</sup>. As these non-monotonic variations sometimes occurred for a very short time, it could be interesting to use a high sampling even for long term studies, because quick adaptive responses could be missed (for instance gradual

or cyclic responses), just as the real period of a periodic signal could be lost if the sampling doesn't satisfy the Nyquist-Shannon theorem<sup>65</sup>.

Besides the successive triggers, Huang *et al*<sup>55</sup> and Diederichs *et al*<sup>46</sup> hypothesised a strong adaptation, or even accustoming of the cells to the solicitations. After a short-term response and a reorganisation (alignment or specific matrix production), cells adapted to the new environment "Substrate with tensile stresses" and showed a stagnation or a decrease of the studied parameters until a new balance was reached.

*In summary, the duration of the dynamic culture phase is both a means, directly linked to the study's objectives, and an end, as a parameter which should be analysed to understand its influence on the cell response.*

## 7) are there optimal frequency and magnitude?

As the mechanical loading was found to be periodic (question 5), a specific frequency had to be applied to the samples. It appeared to be the least variable parameter, with 22 articles of 35 using a sinusoidal signal with a 1-Hz frequency. It was often argued that this value was chosen as a physiological one (see Kaspar *et al*<sup>32</sup> for instance), based on pioneering works<sup>5,7</sup>.

The remaining studies differed in frequency with lower values, such as 0.05 Hz<sup>33</sup>, 0.1 Hz<sup>47,55</sup>, 0.2 Hz<sup>45</sup>, 0.25 Hz<sup>36</sup>, 1/3 Hz<sup>30</sup>, 0.4 Hz<sup>34</sup> or 0.5 Hz<sup>43,59</sup>. Tanaka *et al*<sup>54</sup> was the only one who used a frequency above 1 Hz (3 Hz). Some articles used a square signal<sup>25,33,36-39,52</sup> and rare ones used a triangle<sup>53,57</sup> or trapezoidal<sup>51</sup> signal. It has to be noticed that Bruinink *et al*<sup>47</sup> used a frequency of 0.01 Hz as a physiological value for rest periods, which was in fact close to the solicitation's frequency chosen by Cillo *et al*<sup>33</sup> (0.05 Hz). Significant results were however obtained with this low value. As seen above (question 3), only Zhong *et al*<sup>40</sup> used a static loading and not a periodic one.

Even if the 1-Hz frequency was sometimes justified by a physiological point of view, only two articles performed a comparison between different frequencies. Jones *et al*<sup>27</sup> compared values of 0.5, 1, 2 and 3 Hz (with the same number of cycles and the same magnitude), but the results were not significant. Matsugaki *et al*<sup>51</sup> analysed 1, 2, 5 or 10 cycles/minute of a trapezoidal signal. They highlighted that too high frequencies involved cell death, and according to cell alignment at confluence state after 1 week, the value of 2 cycles/minute was chosen for the whole study.

Contrary to the frequency, the maximum magnitude of the applied strains varied a lot from one study to another. It was reported either with the microstrain unit ( $\mu$ strain) or with elongation percentage. We chose here to convert all data to  $\mu$ strain (1000  $\mu$ strain = 0,1%). When different



strains were successively applied on the same sample during the experiment, we analysed the maximum value. The distribution of the magnitude is showed on Figure 7. The number of cases is much bigger than 35 because lots of article studied more than one elongation rate.

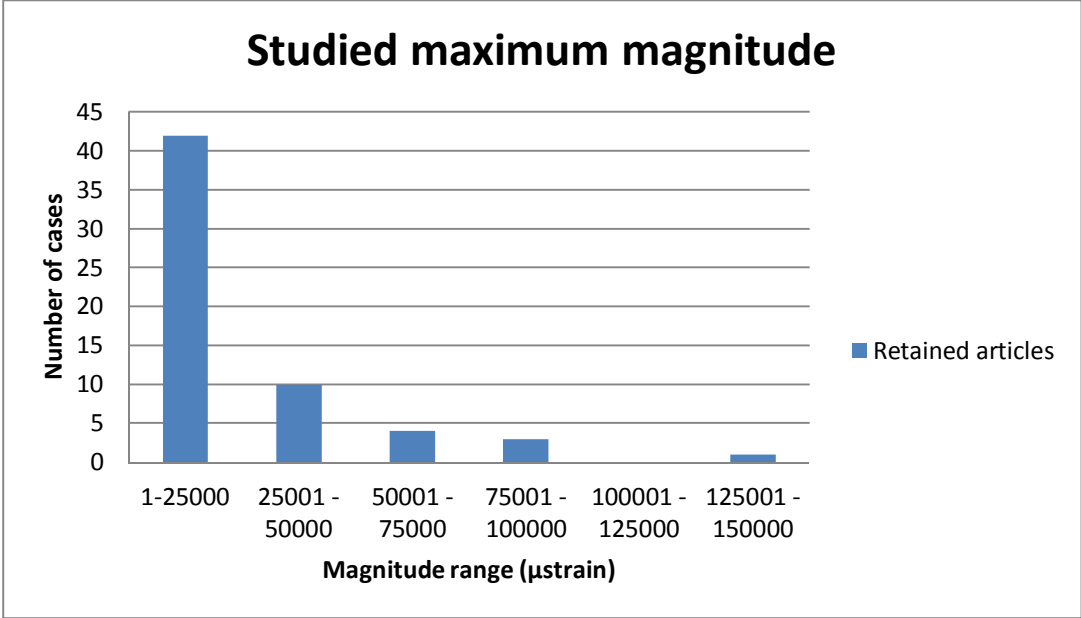


Figure 7: Distribution of the articles regarding the studied maximum magnitude of the applied strains.

The majority of the articles used a magnitude below 25000 µstrain (2.5% elongation). The detailed distribution of this range can be found on Figure 8.

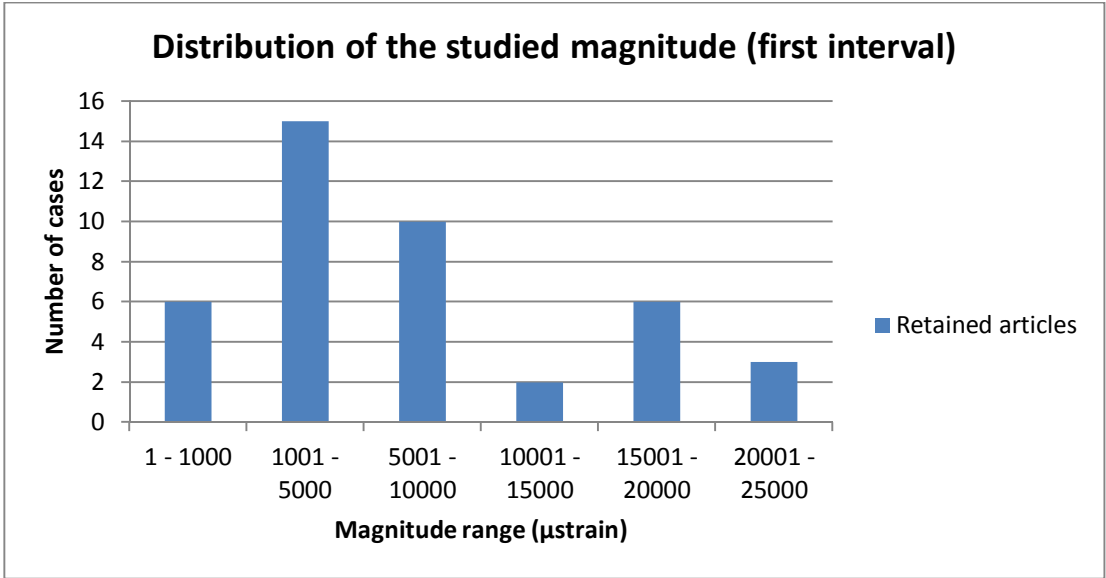


Figure 8: Distribution of the articles regarding the studied maximum magnitude of the applied strains in the first interval [1-25000 µstrain].

In this specific magnitude range, the most used values were between 1001 and 5000  $\mu$ strain, which is indeed considered as a physiological range. Duncan *et al*<sup>14</sup> summarised all the different ranges from the pioneering works<sup>3,5,7-10</sup>: bone resorption below 200  $\mu$ strain, physiological range up to 2500  $\mu$ strain, overused window with increasing formation up to 5000  $\mu$ strain and pathological overloading above. Such a scale, or values close to these ones, were often given as a reference for the chosen magnitude: Murray *et al*<sup>25</sup>, first of the studied articles, wrote that the elastic section of cortical bone is located up to 3000  $\mu$ strain with a failure after plastic deformation around 30000  $\mu$ strain. The values are 400  $\mu$ strain during walking and 950  $\mu$ strain during running in humans, based on the work of Lanyon and Rubin<sup>8,10</sup>, also mentioned by Kaspar *et al*<sup>32</sup>. Jones *et al*<sup>27</sup> and Bruinink *et al*<sup>47</sup> described similar magnitude ranges for maintaining bone mass and for failure values. Kawata *et al*<sup>30</sup> noticed that young osteocytes were the most sensitive to mechanical solicitations with a 4000- $\mu$ strain deformation. Finally, Pitsillides *et al*<sup>28</sup> and You *et al*<sup>53</sup> justified the used magnitude of 3800 and 5000  $\mu$ strain as “physiological” and “routine” values.

However, many studies used values out of this physiological window. Bruinink *et al*<sup>47</sup> first cited the value of 2000  $\mu$ strain as a part of this range, but then specified that 4000  $\mu$ strain would be relevant to analyse the cell response, and that 20000  $\mu$ strain would thus be a “macroscopic strain”. Here, the main objective was to have a more important and more easily detectable *in vitro* response due to a magnitude above the usual *in vivo* response. Zhu *et al*<sup>42</sup> used the same strategy and, after a first step of finite element modelling, chose to multiply the obtained values by 20 before *in vitro* culture to ensure the cell response. Nevertheless, it remains important to use magnitudes below a threshold which would lead to cell death and bone resorption, against what Bruinink *et al*<sup>47</sup> explicitly warned (here 50000  $\mu$ strain). It has to be noticed that the maximum magnitude could also be limited by the behaviour of the substrate itself: we could assume that a plastic deformation of the culture scaffold under solicitations would impact the culture and the stresses applied to the cells. It should therefore be avoided.

Moreover, using magnitudes different from the physiological ones could allow the comparison with “supraphysiological” values<sup>43</sup>. Magnitude is indeed one of the most important parameters for the determination of the bone remodeling<sup>66</sup>. With a deformation above the physiological range, it could thus become possible to compare physiological and pathological behaviours<sup>25</sup> and to confirm that the same values would be relevant from *in vivo* whole organs to *in vitro* cell culture. Most of the articles which studied several magnitudes actually compared physiological values and bigger ones, with<sup>25,42,43</sup> or without<sup>27,29,41,48,51,56</sup> this justification.

We analysed further the results of such comparisons. The main cell response was centred around the physiological range in terms of prostaglandin E2 (PGE2) production<sup>25</sup>, proliferation<sup>27,41</sup> or alkaline phosphatase (ALP) production<sup>48</sup>. However, an upturn sometimes appeared for the higher

values, for instance a second peak of PGE2 production above 28000  $\mu$ strain<sup>25</sup> or a fibrous response in addition to the proliferation above 10000  $\mu$ strain<sup>27</sup>. Murray *et al*<sup>25</sup> suggested that these results showed the repair mechanisms which could occur for the failure range. In other articles, the analysed parameters remained stable for any range of magnitude, in terms of cell viability<sup>41</sup>, proliferation<sup>43</sup> or apoptotic response<sup>43</sup>. Finally, some responses were shifted, highlighting the difficulty to adapt *in vivo* principles to *in vitro* experiments. For instance, Thomas *et al*<sup>29</sup> found an ALP production peak for 230  $\mu$ strain (compared to 35 and 2500  $\mu$ strain), which is lower than expected (no hypothesis was given). But the shift was often towards too high values, as found by Jagodzinski *et al*<sup>44</sup> (ALP, osteocalcin (OCN) and Cbfa1 production for 80000  $\mu$ s), Koike *et al*<sup>48</sup> (proliferation for 150000  $\mu$ strain), Zhu *et al*<sup>42</sup> (OCN, collagen, runx2 production for 32000  $\mu$ strain), Prodanov *et al*<sup>56</sup> (continuously increased alignment from 10000 to 80000  $\mu$ strain) and Matsugaki *et al*<sup>51</sup> (alignment peak for 40000  $\mu$ strain).

Other articles<sup>46,49,50,55,58,60</sup> used thus a magnitude higher or far higher (up to 100000  $\mu$ strain) than the physiological range. We suggest here that this choice, as seen above, was done to ensure the detection of the cell response. The chosen values were sometimes motivated by the response obtained in a previous work<sup>50,55,60</sup>.

We noticed a specific case regarding the elongation rate: You *et al*<sup>53</sup> and Zhong *et al*<sup>40</sup> applied increasing magnitudes to the same samples. The analysis was conducted all along the culture by Zhong *et al*<sup>40</sup>, so the influence of the increase could not be dissociated from the influence of the duration since the first solicitation, but You *et al*<sup>53</sup> performed another experiment with the same values decreasing and thus showed a calcium ions production specifically enhanced by the supraphysiological strain (100000  $\mu$ strain).

*In summary, there is a broad consensus on a 1-Hz frequency considered as physiological. However, a very low number of publications reported studies about the influence of this parameter, eventually because its impact is less significant. The magnitude of the applied strains had a crucial influence on the cell response and should thus be carefully chosen. The majority of the studies used values from the in vivo physiological range, but using higher values could be interesting to ensure the response detection, to analyse further behaviours (responses to failure), and because the in vitro environment remains totally different from the in vivo one.*

## 8) Is a static pre-culture phase essential before mechanical loading?

We studied here the presence and the influence of a period of static cell culture, i.e. without mechanical solicitation, before the first cycle of tensile loading.

It has been noticed that almost all of the articles (we discuss the exceptions below) used such a static phase after seeding the cells, in most cases to allow cells to adhere, spread and proliferate on the substrate until a specific confluence state. A lower foetal calf serum rate compared to the basic culture medium was often applied few hours before the beginning of the mechanical loading (2-24 hours) to synchronise all cells in the same development phase (see for instance<sup>27,29,31,32,35,41</sup>). The work of Koike *et al*<sup>48</sup> is a specific case: at the end of the pre-culture, cells which already expressed a mature osteoblast phenotype were suppressed.

Different durations of the static period were sometimes used in the same article in order to study the influence of this specific parameter. Thomas *et al*<sup>29</sup> in particular assumed that the cell differentiation state when the loading started was a factor which strongly modified the cells' sensibility to loading. We found the hypothesis that this duration affects the global behaviour of the experiment also in the work of Bruinink *et al*<sup>47</sup>, and Weyts *et al*<sup>43</sup> confirmed that results were linked to this pre-culture phase. Connely *et al*<sup>49</sup> studied this point in a short-term first step to evaluate its influence, but it did not become a main part of the analysis. They noticed that it should need further studies. Finally, Li *et al*<sup>45</sup> reported a comparison between several schedules (from the static pre-culture to a rest period after the solicitations) and the optimal results were obtained for a planning which included a static phase.

In other publications, the duration wasn't clearly defined<sup>27,33,37,38,56,64</sup>, but no article explicitly said that they avoided such a pre-culture, so the authors of this review assumed that an adhesion and proliferation step was always performed.

*In summary, there is a broad consensus among the use of a static pre-culture phase promoting cell adhesion and proliferation. This could also be essential to include in the analysis the differentiation state and then the cell sensibility to loading, but this point needs further studies as suggested<sup>49,50</sup>.*

## 9) Are there rest periods during the mechanical solicitations phase?

We saw above that the dynamic culture phase could take place over a long-term period. We thus investigated the presence or lack of rest periods (without solicitations) between the mechanical loading cycles.

Indeed, *in vivo* studies of the cells' behaviour suggested that the cell sensibility to tensile stresses could saturate, but would be quickly recovered<sup>7,66,67</sup>. It means that cells are able to recover their capacity of translating mechanical signals to a specific biological response after a short or very

short rest period. It was found that many studies mimicked this concept *in vitro*, in different ways (Figure 9).

- Only a low number of mechanical loading cycles every day<sup>27,32,41,44,45,50,54,57,58,60</sup>. The majority of the culture day was thus dedicated to rest periods.
- No rest period because of a single short dynamic culture phase (less than 1 hour)<sup>28,29,31,34,35,37-39,52,59</sup>.
- No rest period but a single long dynamic culture phase (more than 1 hour, eventually several days)<sup>33,36,40,42,43,48,55</sup>.
- An alternating between short mechanical loading periods and rest periods of the same range<sup>30,45,46,53,54,56</sup>.
- An alternating between long mechanical loading periods and rest periods of the same range<sup>44,46,47,49</sup>.

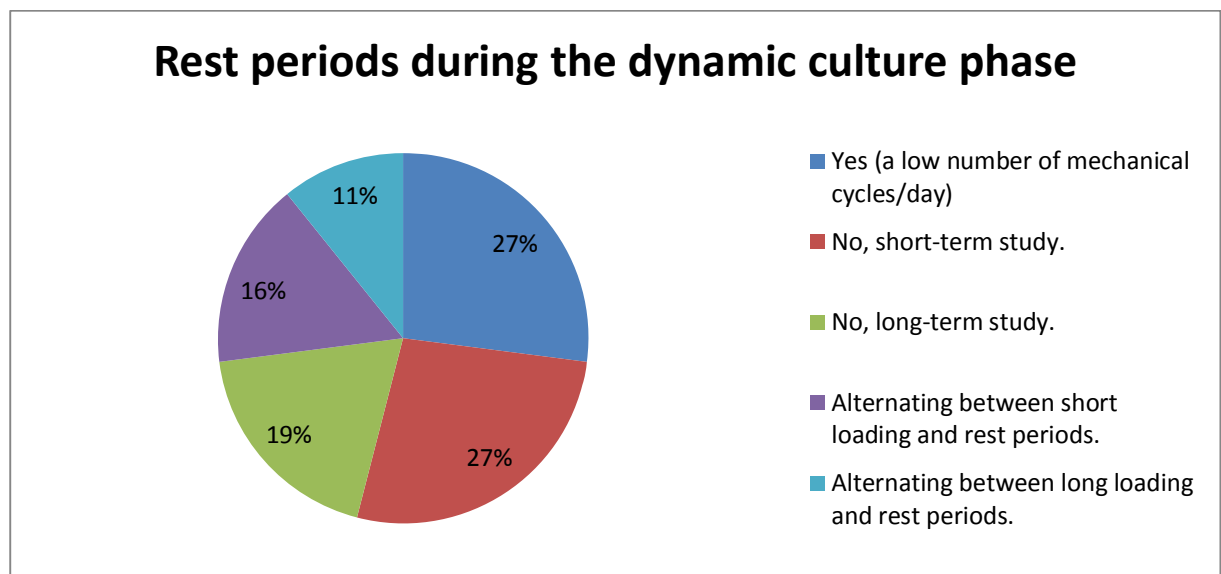


Figure 9: Repartition of the different ways to apply rest periods to the cell culture *in vitro*.

The studied articles appeared to be well distributed into these different groups. We noticed several exceptions about the use of rest periods. Matsugaki *et al*<sup>51</sup> started their experiments with a continuous dynamic culture phase then split the cycles with rest periods. Other teams<sup>44-46,54</sup> used two methods by applying rest periods of two ranges, for instance short rest periods between each mechanical loading cycle, then a long rest period until the next day of culture. Finally, Baker *et al*<sup>50</sup> and Bruinink *et al*<sup>47</sup> did not use complete rest periods but let the samples respectively under agitation or with low-frequencies solicitations (0,01 Hz). However, they referred to these phases as

“resting phase”<sup>47</sup>. We could assume that this method also mimicked the *in vivo* behaviour, where cells never feel a complete rest, due to the muscle tone or the body’s own weight.

*In summary, even if we were able to sort the rest periods schedules, they were well distributed and showed absolutely no consensus. No publication considered the analysis of this parameter as a main objective, and it was thus difficult to highlight an optimal protocol.*

## 10) Is there a recovery phase between the end of the dynamic culture phase and the analysis?

We focused here on the time between the last cycle of tensile stress and the end of the culture, i.e. the beginning of invasive methods of analysis. Some articles<sup>27,34,42,47,49,50,57</sup> did not mention such a period of rest and we assumed that, in this case, there was no recovery phase with a specific duration.

Other studies<sup>31,33,36,43,46,48,53,58,60,64</sup> detailed that the analysis was performed immediately after the last mechanical solicitation. The absence of a recovery phase could be explained by technical analysis issues to evaluate the production of a molecule of interest which quickly disappears, or to detect the first step of a cascade of reactions. We noticed this for instance for nitric oxide measurements<sup>28,31,52</sup>, and Pitsillides *et al*<sup>28</sup> mentioned that normal conditions (before mechanical stress) could be restored within 80 minutes. The lack of recovery could also highlight that non-invasive analyses were used during the dynamic culture phase<sup>53</sup>.

In a third group, in order to study the evolution of different markers, the analyses began immediately then were distributed all along the post-dynamic culture phase, i.e. for 4 days<sup>44</sup>, 24 hours<sup>59</sup>, 15 hours<sup>25</sup>, 70 minutes<sup>28</sup> or 60 minutes<sup>30,52</sup>. These durations appeared thus to be varying from one experiment to another.

Finally, in some articles, the analysis began only after a concrete recovery phase with a specific duration: from 1<sup>35</sup>, 2<sup>32</sup>, 8<sup>56</sup>, 24<sup>38,39,51,54</sup> or 48 hours<sup>37</sup> to 4<sup>41</sup>, 7<sup>45</sup> or 9 days<sup>55</sup>. As seen above, the choice of the duration could be explained by the study of a particular factor which needed a long time to develop, such as matrix mineralisation<sup>55</sup>. The influence of the mechanical loading on viability and sustainability should also be studied after a rest phase. Diederichs *et al*<sup>46</sup> underlined the importance of analysing the behaviour after tensile stress in the long run. However, the specific durations appeared to be quite arbitrary and were not explicitly justified, and we found no interrelation with another parameter (dynamic culture phase duration, main objective, etc.).

*In summary, the recovery phase duration could be guided by the methods of analysis, but a comparison study on a long-term period could be essential to detect all mechanisms and to validate analysis protocols.*

### **11) Are results always positive?**

We won't discuss here the advantages of applying tensile stress to cell culture, which is not the main purpose of the present review. Moreover, "negative" conclusions would be a non-sense when the main objective is to understand fundamental mechanisms. However, we propose here to briefly analyse how the pernicious effects on the cell culture were reported.

As expected (see question 7), results were sometimes worse than the control group regarding some parameters, especially the maximum magnitude: no cell response below a specific strain<sup>27</sup>, decrease in gene expressions after a specific duration<sup>33</sup>, decrease in cell alignment<sup>51</sup> and proliferation<sup>41</sup> for high magnitudes. These decreases in the positive effects could be explained by the adaptation of cells to their new environment "Substrate with tensile stresses" as seen above<sup>46,55</sup> or by the saturation of the cell sensibility<sup>66</sup>.

It has to be noticed that, in some studies, there was a lack of expected results regarding the rest of the literature, for instance no cell alignment<sup>27,41</sup>, no proliferation<sup>29,47</sup>, no cytokines production<sup>33</sup>, or a decrease in the cell differentiation<sup>47</sup>. These lacks or decreases were sometimes reported as a result of the slide to a new environmental balance, as highlighted by Kaspar *et al*<sup>32</sup> who showed that the magnitude physiological range increased osteoblasts activity of matrix production but decreased mineralisation. These inconsistent results from one study to another could also be explained by the absence of a standard protocol, with a huge variety of durations, magnitudes and cell types.

*In summary, the majority of the studied articles concluded that mechanical solicitations had a positive influence, but not all parameters sets were relevant. A huge variability of the applied protocols could sometimes conduct to conflicting results from one study to another.*

### **12) Could other solicitations than tensile stress be needed?**

The choice of the studied articles was guided by the application of tensile stress and we didn't focus on other kinds of solicitations for the analysis. However, some interesting results have to be noticed.

*Tensile stress and vibrations:* Tanaka *et al*<sup>54</sup> simultaneously studied the influence of tensile stress of classical frequency and magnitude (regarding the other publications), and tensile stress with a far more important frequency but a lower magnitude. This second case was treated as vibrations (50 Hz, deviation of 350  $\mu$ strain). A synergy between the two kinds of solicitations was thus detected. It appeared that the vibrations enhanced the sensibility of osteoblasts to the classical tensile stress, with an amplified response. Tanaka *et al* described this behaviour as an example of stochastic resonance, a phenomenon also reported by Rubin *et al*<sup>68</sup>.

*Tensile stress and chemical factors:* Huang *et al*<sup>55</sup> tested the addition of proteins from the extracellular matrix to the culture medium with or without applying tensile stress. In the presence of mechanical solicitations, a synergy was reported which enhanced the influence of some molecules on the osteogenic differentiation, especially fibronectin and laminin.

*Tensile stress and nanostructuration:* A synergy appeared again when tensile stress was applied to cell cultured on a nanostructured scaffold obtained by lithography, in terms of cell alignment and specific genes activation<sup>56</sup>.

*Tensile stress and fluid shear stress:* Smalt *et al*<sup>52</sup> and You *et al*<sup>53</sup> used separately tensile stress and shear stress generated by a dynamic flow of medium. In contrast, here, the influence of tensile stress was found to be inefficient compared to the fluid movements, which appeared more relevant in terms of nitric oxide and prostaglandin production. This result was also found in other publications, however, these studies did not focus on a combination of both kind of stress, and thus could not conclude on an eventual synergy.

*In summary, other solicitations could be used and could be efficient regarding the same main objectives as previously described. A synergy on the osteoblastic lineage was often reported when different methods were simultaneously applied to the cell culture. However, some solicitations were studied separately, and further studies are thus needed to detect more possible synergies.*

### 13) Discussion: should we really try to mimic in vivo and physiological conditions?

Pioneering works on *in vivo* or explants experiments were able to discover generalities on bone behaviour and its response to mechanical loading<sup>3,5,7,9,10</sup>, especially saturation to mechanical signal, sensibility recovery or magnitude influence<sup>66</sup>. We reported above (see question 7) that *in vitro* studies were based on these principles to elaborate protocols, for instance by using the physiological range for frequency and magnitude, or by applying rest period to the samples.



However, these values could not be exactly the same: cells could not experience individually the same stresses as the whole organ *in vivo* when the same elongation was applied, monocultures could have a simplified balance state compared to organotypic cultures, culture duration would always be rather different than a living organism lifetime and bones never experience an absolute rest *in vivo*. Despite these differences, some studies tried to further conciliate *in vitro* issues and *in vivo* principles. Bruinink *et al*<sup>47</sup> applied lower tensile stresses as a rest period, David *et al*<sup>57</sup> and Struwer *et al*<sup>58</sup> respectively analysed the balance osteogenesis/adipogenesis and the interface bone/tendon.

To understand with *in vitro* experiments the *in vivo* behaviour of cells and tissues, it appears relevant to approximate as close as possible the physiological conditions. But would it be a crucial need for the field of tissue engineering? If the main objective is to obtain a differentiated and sustainable rebuilt substitute with specific cell alignment and molecules production, it wouldn't matter whether the optimal results were found with a set of parameters close to physiological ones or not; the important point would be to have a living tissue in a relevant state when you need it for the surgery.

*In summary, we suggest here that the physiological range could be an initial set of parameters, but not a limit we should avoid to exceed in vitro.*

### General conclusion.

To date, there is no standard protocol for applying tensile stress to *in vitro* cell culture, nor specific protocol depending on aimed applications or cell sources. However, for some technical parameters, optimal range of values could be highlighted and appeared to be relevant and efficient. They were often guided by *in vivo* results or physiological values, but moving to out-of-range conditions had not necessarily a negative impact, especially when the main objectives were to obtain a rebuilt tissue. It appeared furthermore that a slide from fundamental mechanisms studies to tissue engineering applications could be occurring.

## References

1. Ducky, P. The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science* (80- ). **289**, 1501–1504 , 2000.
2. Klein-Nulend, J., Bacabac, R. G. and Mullender, M. G. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol. Biol.* **53**, 576–580 , 2005.
3. Wolff, J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen.* , 1892.
4. Glucksmann, A. Studies on Bone mechanics in vitro: II. The role of tension and pressure in chondrogenesis. *Anat Rec* **73**, 39–55 , 1939.
5. Frost, H. M. Bone ‘mass’ and the ‘mechanostat’: a proposal. *Anat. Rec.* **219**, 1–9 , 1987.
6. McBride, S. H. and Silva, M. J. Adaptive and injury response of bone to mechanical loading. *Bonekey Rep.* **1**, 192 , 2012.
7. Rubin, C. and Lanyon, L. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Jt. Surg Am* **66**, , 1984.
8. Rubin, C. T. Skeletal strain and the functional significance of bone architecture. *Calcif. Tissue Int.* **36**, 11–18 , 1984.
9. Lanyon, L. E. and Rubin, C. T. Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *J. Biomech.* **17**, 897–905 , 1984.
10. Lanyon, L. E., Hampson, W. G., Goodship, A. E. and Shah, J. S. Bone deformation recorded in vivo from strain gauges attached to the human tibial shaft. *Acta Orthop. Scand.* **46**, 256–268 , 1975.
11. Burger, E. H. and Klein-Nulend, J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J.* **13 Suppl**, S101–S112 , 1999.
12. Mullender, M. et al. Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue. *Med. Biol. Eng. Comput.* **42**, 14–21 , 2004.
13. Ehrlich, P. and Lanyon, L. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos. Int.* 688–700 , 2002. doi:10.1007/s001980200095
14. Duncan, R. L. and Turner, C. H. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif. Tissue Int.* **57**, 344–358 , 1995.
15. Carpentier, B., Layrolle, P. and Legallais, C. Bioreactors for bone tissue engineering. *Int. J. Artif. Organs* **34**, 259–270 , 2011.
16. Li, C., Vepari, C., Jin, H.-J., Kim, H. J. and Kaplan, D. L. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3115–24 , 2006.

17. Nair, L. S., Bhattacharyya, S. and Laurencin, C. T. in *Nanotechnologies for the Life Sciences* 1–16 (2006). doi:10.1002/9783527610419.ntls0095
18. Payne, K. F. B., Balasundaram, I., Deb, S., Di Silvio, L. and Fan, K. F. M. Tissue engineering technology and its possible applications in oral and maxillofacial surgery. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **52**, 7–15 , 2014.
19. Khademhosseini, A. *Micro and Nanoengineering of the Cell Microenvironment: Technologies and Applications.* (Artech House, Incorporated, 2008).
20. Hughes, F. J., Turner, W., Belibasakis, G. and Martuscelli, G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol.* 2000 **41**, 48–72 , 2006.
21. Szpalski, C., Wetterau, M., Barr, J. and Warren, S. M. Bone tissue engineering: current strategies and techniques - part I: Scaffolds. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **18**, 246–57 , 2012.
22. Brown, T. D. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *J. Biomech.* **33**, 3–14 , 2000.
23. Riehl, B. D., Park, J.-H., Kwon, I. K. and Lim, J. Y. Mechanical stretching for tissue engineering: two-dimensional and three-dimensional constructs. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **18**, 288–300 , 2012.
24. Cohen, D. M. and Chen, C. S. Mechanical control of stem cell differentiation. *StemBook* 1–16 , 2008. doi:10.3824/stembook.1.26.1
25. Murray, D. W. and Rushton, N. The effect of strain on bone cell prostaglandin E2 release : a new experimental method. *Calcif. Tissue Int.* **47**, 35–39 , 1990.
26. Basso, N. and Heersche, J. N. M. Characteristics of in vitro osteoblastic cell loading models. *Bone* **30**, 347–351 , 2002.
27. Jones, D. B., Nolte, H., Scholubbers, J. G., Turner, E. and Veltel, D. Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* **12**, 101–110 , 1991.
28. Pitsillides, a a et al. Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? *FASEB J.* **9**, 1614–1622 , 1995.
29. Thomas, G. P. and El Haj, a. J. Bone marrow stromal cells are load responsive in vitro. *Calcif. Tissue Int.* **58**, 101–108 , 1996.
30. Kawata, a and Mikuni-Takagaki, Y. Mechanotransduction in stretched osteocytes--temporal expression of immediate early and other genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 404–408 , 1998.
31. Zaman, G. et al. Mechanical Strain Stimulates Nitric Oxide Production by Rapid Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Osteocytes. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 1123–1131 , 1999.
32. Kaspar, D., Seidl, W., Neidlinger-Wilke, C., Ignatius, a. and Claes, L. Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. *J. Biomech.* **33**, 45–51 , 2000.

33. Cillo, J. E., Gassner, R., Koepsel, R. R. and Buckley, M. J. Growth factor and cytokine gene expression in mechanically strained human osteoblast-like cells: implications for distraction osteogenesis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **90**, 147–154 , 2000.
34. Miyauchi, A. et al. Parathyroid hormone-activated volume-sensitive calcium influx pathways in mechanically loaded osteocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 3335–3342 , 2000.
35. Peake, M. a, Cooling, L. M., Magnay, J. L., Thomas, P. B. and El Haj, a J. Selected contribution: regulatory pathways involved in mechanical induction of c-fos gene expression in bone cells. *J. Appl. Physiol.* **89**, 2498–2507 , 2000.
36. Boutahar, N., Guignandon, A. and Vico, L. Mechanical Strain on Osteoblasts Activates Autophosphorylation of Focal Adhesion Kinase and Proline-rich Tyrosine Kinase 2 Tyrosine Sites Involved in ERK Activation \*. *J. Biol. Chem.* **279**, 30588–30599 , 2004.
37. Armstrong, V. J. et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **282**, 20715–20727 , 2007.
38. Sunters, A. et al. Mechano-transduction in osteoblastic cells involves strain-regulated estrogen receptor  $\alpha$ -mediated control of insulin-like growth factor (IGF) I receptor sensitivity to ambient IGF, leading to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent Wnt/LRP5 receptor-i. *J. Biol. Chem.* **285**, 8743–8758 , 2010.
39. Galea, G. L. et al. Sost down-regulation by mechanical strain in human osteoblastic cells involves PGE2 signaling via EP4. *FEBS Lett.* **585**, 2450–2454 , 2011.
40. Zhong, Z., Zeng, X.-L., Ni, J.-H. and Huang, X.-F. Comparison of the biological response of osteoblasts after tension and compression. *Eur. J. Orthod.* 1–7 , 2011. doi:10.1093/ejo/cjr016
41. Neidlinger-Wilke, C., Wilke, H. J. and Claes, L. Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. *J. Orthop. Res.* **12**, 70–8 , 1994.
42. Zhu, J., Zhang, X., Wang, C., Peng, X. and Zhang, X. Different Magnitudes of Tensile Strain Induce Human Osteoblasts Differentiation Associated with the Activation of ERK1/2 Phosphorylation. *Int. J. Mol. Sci.* **9**, 2322–2332 , 2008.
43. Weyts, F. a a, Bosmans, B., Niesing, R., Van Leeuwen, J. P. T. M. and Weinans, H. Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation. *Calcif. Tissue Int.* **72**, 505–512 , 2003.
44. Jagodzinski, M. et al. Effects of cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Eur. Cell. Mater.* **7**, 35–41; discussion 41 , 2004.
45. Li, M., Li, X., Meikle, M. C., Islam, I. and Cao, T. Short Periods of Cyclic Mechanical Strain Enhance Triple-Supplement Directed Osteogenesis and Bone Nodule Formation by Human Embryonic Stem Cells In Vitro. *Tissue Eng. Part A* **19**, 2130–2137 , 2013.

46. Diederichs, S., Bo, S., Peterbauer, A., Kasper, C. and Scheper, T. Application of different strain regimes in two-dimensional and three-dimensional adipose tissue – derived stem cell cultures induces osteogenesis : Implications for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* **94A**, 927–936 , 2010.
47. Bruinink, a et al. The stiffness of bone marrow cell- knit composites is increased during mechanical load. *Biomaterials* **22**, 3169–3178 , 2001.
48. Koike, M., Shimokawa, H. and Kanno, Z. Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2. *J Bone Min. Metab* **23**, 219–225 , 2005.
49. Connelly, J. T., Vanderploeg, E. J., Mouw, J. K., Wilson, C. G. and Levenston, M. E. Tensile loading modulates bone marrow stromal cell differentiation and the development of engineered fibrocartilage constructs. *Tissue Eng. Part A* **16**, 1913–1923 , 2010.
50. Baker, B. M., Shah, R. P., Huang, A. H. and Mauck, R. L. Dynamic tensile loading improves the functional properties of mesenchymal stem cell-laden nanofiber-based fibrocartilage. *Tissue Eng. Part A* **17**, 1445–1455 , 2011.
51. Matsugaki, A., Fujiwara, N. and Nakano, T. Continuous cyclic stretch induces osteoblast alignment and formation of anisotropic collagen fiber matrix. *Acta Biomater.* **9**, 7227–7235 , 2013.
52. Smalt, R., Mitchell, F. T., Howard, R. L. and Chambers, T. J. Induction of NO and prostaglandin E2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain. *Am. J. Physiol.* **273**, E751–E758 , 1997.
53. You, J. et al. Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow. *J. Biomech. Eng.* **122**, 387–393 , 2000.
54. Tanaka, S. M. et al. Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *J. Biomech.* **36**, 73–80 , 2003.
55. Huang, C., Chen, M., Young, T., Jeng, J. and Chen, Y. Interactive Effects of Mechanical Stretching and Extracellular Matrix Proteins on Initiating Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J. Cell. Biochem.* **1273**, 1263–1273 , 2009.
56. Prodanov, L. et al. The interaction between nanoscale surface features and mechanical loading and its effect on osteoblast-like cells behavior. *Biomaterials* **31**, 7758–7765 , 2010.
57. David, V. et al. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology* **148**, 2553–2562 , 2007.
58. Struwer, J. et al. Influence of cyclical mechanical loading on osteogenic markers in an osteoblast-fibroblast co-culture in vitro: Tendon-to-bone interface in anterior cruciate ligament reconstruction. *Int. Orthop.* **38**, 1083–1089 , 2014.

59. Qi, M. C. et al. Mechanical strain induces osteogenic differentiation: Cbfa1 and Ets-1 expression in stretched rat mesenchymal stem cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **37**, 453–458 , 2008.
60. Charoenpanich, A. et al. Cyclic Tensile Strain Enhances Osteogenesis and Angiogenesis in Mesenchymal Stem Cells from Osteoporotic Donors. *Tissue Eng. Part A* **20**, , 2013.
61. Martin, I., Wendt, D. and Heberer, M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **22**, 80–6 , 2004.
62. Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **21**, 2529–43 , 2000.
63. Baudequin, T., Bedoui, F., Dufresne, M., Paullier, P. and Legallais, C. Towards the development and characterisation of an easy handling sheet-like biohybrid bone substitute. *Tissue Eng. Part A* , 2015. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0580
64. Zhong, Z., Zeng, X., Ni, J. and Huang, X. Comparison of the biological response of osteoblasts after tension and compression. *Eur. J. Orthod.* **35**, 59–65 , 2011.
65. Shannon, E. C. Communication In The Presence Of Noise. *Proc. IRE* **37**, 10–21 , 1949.
66. Burr, D. B., Robling, a G. and Turner, C. H. Effects of biomechanical stress on bones in animals. *Bone* **30**, 781–6 , 2002.
67. Robling, A. G., Hinant, F. M., Burr, D. B. and Turner, C. H. Improved bone structure and strength after long-term mechanical loading is greatest if loading is separated into short bouts. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 1545–1554 , 2002.
68. Rubin, C., Xu, G. and Judex, S. The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli. *FASEB J.* **15**, 2225–2229 , 2001.

## VI. Bilan de la démarche

Le présent travail de thèse se propose donc de faire appel à l'ingénierie tissulaire osseuse pour obtenir un substitut hybride, composé de cellules et d'un matériau support, dans le cadre spécifique de la reconstruction du visage. Il fait suite au travail de Benoît Carpentier<sup>195</sup> concernant le choix de la chambre de culture et l'utilisation de granules de phosphate de calcium. Suite à de nombreuses discussions avec les équipes des professeurs Bernard Devauchelle (responsable du service de chirurgie maxillo-faciale du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Amiens et de l'Institut Faire Face ou IFF) et Jean-Pierre Marolleau du CHU d'Amiens (EA4666 Lymphocyte Normal et Pathologique et Cancers), chaque choix a été guidé par les attentes cliniques pour obtenir un comportement biologique, mécanique et une forme pertinentes : un tissu plan, flexible et malléable, avec une cohésion suffisante pour permettre les manipulations lors de l'opération.

Au sein d'un bioréacteur adapté, il a fallu concilier les différentes possibilités de cellules et de biomatériaux pour s'approcher d'un résultat conforme, chaque étape de culture permettant de réajuster les paramètres au regard de l'application finale. La démarche générale du présent travail peut ainsi être résumée par le diagramme suivant (Figure 18), chaque chapitre de résultats correspondant à une progression dans la réponse au cahier des charges clinique.

Après une description des méthodes et techniques utilisées au cours de ce travail de thèse (chapitre 2), la caractérisation biologique et mécanique d'un premier substitut obtenu avec une lignée de cellules osseuses cultivée sur des granules de phosphate de calcium sera rapportée (chapitre 3). On étudiera ensuite comment le procédé d'obtention d'un tel substitut a été adapté à une coculture CSM/CE primaires humaines puis caractérisé pour 6 donneurs différents (chapitre 4). L'ajout des cellules endothéliales visait d'une part à améliorer la réponse cellulaire, mais aussi à favoriser la néo-vascularisation une fois le tissu implanté. Ces expérimentations ont été réalisées conjointement à l'UTC et dans l'unité EA4666 du CHU d'Amiens. Cette coculture a souligné le besoin d'améliorer la cohésion mécanique globale du tissu. Pour cela, le chapitre 5 rapporte le développement de nouveaux matériaux obtenus par électrospinning, ainsi que leur potentiel pour la différenciation d'une lignée de CSM étudiée en collaboration avec le laboratoire de Biologie du Développement de l'UPMC. Les scaffolds fabriqués sur place ont été comparés à d'autres polymères également obtenus dans le cadre de

collaborations avec l'ICPEES de Strasbourg et l'IMP de Hanovre. Le chapitre 6 apportera une conclusion générale et les perspectives pour l'amélioration du substitut osseux obtenu.

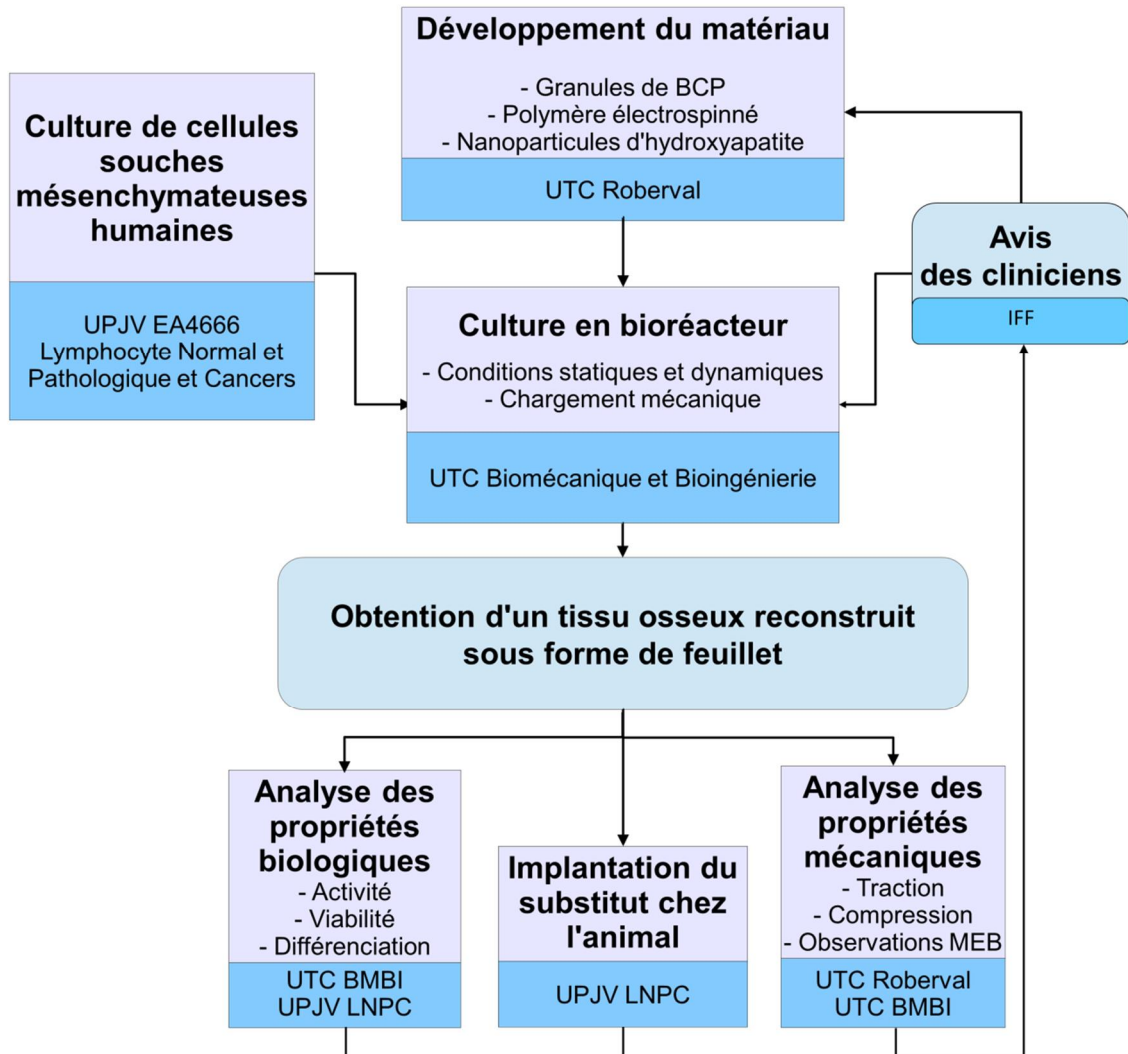


Figure 18 : Déroulement de l'étude et collaboration entre les différents acteurs.



## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

---

## Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

### I. Matériel

#### 1) Cellules

##### ***Lignée de préostéoblastes***

La lignée de cellules murines préostéoblastiques MC3T3-E1 sous-clone 4 (ATCC CRL-2593) a été cultivée dans du milieu  $\alpha$ -MEM Eagle avec glutamine stabilisée (Pan-Biotech, Allemagne) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco Invitrogen, Etats-Unis), 1% de Pénicilline-Streptomycine (Gibco Invitrogen, Etats-Unis) et 1% de Pyruvate de Sodium (Gibco Invitrogen, Etats-Unis). Les cellules ont été conservées en incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, ces conditions étant valables pour tous les types cellulaires étudiés au cours du présent travail de thèse. Après les phases de prolifération en flasque, les cellules ont été récoltées à 95% de confluence et de l'acide ascorbique (50mg/L, Sigma Aldrich, Etats-Unis) a été ajouté au milieu pour les expérimentations. Le milieu était renouvelé entièrement tous les 2 à 3 jours. Le sous-clone 4 présente l'intérêt de ne pas exprimer la PAL avant d'être totalement différencié en ostéoblaste<sup>196</sup>.

##### ***Lignée de cellules souches mésenchymateuses***

La lignée de cellules souches mésenchymateuses murines C3H10T1/2<sup>177</sup> (ATCC CCL-26) a été cultivée dans du milieu DMEM avec 1g/L de glucose (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) complémenté avec 10% de SVF (Gibco Invitrogen, Etats-Unis), 2% de Pénicilline-Streptomycine (Gibco Invitrogen, Etats-Unis), 2% de L-glutamine 200mM (Gibco Invitrogen, Etats-Unis). Après les phases de prolifération en flasque, les cellules ont été récoltées à 95% de confluence et un milieu identique, sans ajout de facteur de croissance ou de différenciation, a été utilisé pour les expérimentations. Le milieu était renouvelé entièrement tous les 2 à 3 jours. Ces cellules sont un don de l'Université Pierre et Marie Curie (UMR 7622, Biologie du Développement).

## ***Cellules souches mésenchymateuses primaires***

Des cellules souches mésenchymateuses primaires d'origine humaine ont été cultivées dans du milieu de culture de prolifération -MEM Eagle (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) complétement avec 10% de SVF (Eurobio, France), 1% de Pénicilline-Streptomycine (Gibco Invitrogen, Etats-Unis), 1% de L-glutamine 200mM (Gibco Invitrogen, Etats-Unis). Du BFGF (Basic Fibroblast Growth Factor, 10µL pour 50 mL de milieu complet, TebuBio, France) était ajouté après chaque changement de milieu, 1 à 2 fois par semaine, en flasque comme en cassette. L'ensemencement en cassette était effectué à P4 ou P5.

Après une phase de prolifération en flasque et en début d'expérimentations, un milieu de culture de différenciation DMEM (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) complétement avec 10% de SVF (Gibco Invitrogen, Etats-Unis), 1% de Pénicilline-Streptomycine (Gibco Invitrogen, Etats-Unis), 1% de L-glutamine 200mM (Gibco Invitrogen, Etats-Unis), du - glycérophosphate (1,08g pour 500 mL de milieu, Sigma-Aldrich, Etats-Unis), de la dexaméthasone (10µL pour 500 mL de milieu, Merck, Allemagne) et de l'acide ascorbique (50 µg/mL, Sigma Aldrich, Etats-Unis) a été utilisé pour orienter les CSM sur la voie osseuse.

<b>Donneur</b>	<b>Âge (années)</b>	<b>Sexe</b>
<b>1</b>	35	Femme
<b>2</b>	44	Homme
<b>3</b>	47	Femme
<b>4</b>	39	Homme
<b>5</b>	55	Homme
<b>6</b>	56	Femme

**Table 3 : Âge et sexe des donneurs des CSM utilisées**

Ces cellules ont été obtenues à partir d'excès de prélèvement de moelle de donneurs sains dans le cadre de don de moelle (sont exclus les patients atteints : d'infection virale (VIH, hépatite B ou C) ; de pathologie auto-immunes ; de troubles de la coagulation ; d'emphysème pulmonaire ; de tuberculose ; de syndrome d'apnée du sommeil ; de fibrose pulmonaire ; de cancer ; d'insuffisance cardiaque ; d'insuffisance rénale ; de diabète insulino-dépendant). Ces prélèvements ont été effectués auprès du service de thérapie cellulaire (hématologie clinique)

du CHU d'Amiens, puis les cellules ont été précultivées au sein de l'EA4666 de l'UPJV. Ils sont anonymes et aucune étude sur les caractéristiques phénotypiques ou génotypiques n'a été entreprise. Les données d'âge et de sexe sont reportées à la Table 3.

La démarche d'obtention des cellules est la suivante : le médecin propose au patient de participer à cette recherche et l'informe de l'objectif et du traitement informatisé des données le concernant qui seront recueillies au cours de cette recherche. Il lui précise également ses droits d'accès, d'opposition et de rectification à ces données. Le médecin vérifie également les critères d'éligibilité. Si la personne accepte de participer, il donne oralement son accord. Le patient est informé dès que possible et son accord de participation lui est demandé pour la poursuite éventuelle de cette recherche et pour l'utilisation des données qui le concernent et qui sont recueillies dans le cadre de cette recherche. Le participant peut, à tout moment, s'opposer à l'utilisation de ses données dans le cadre de la recherche.

### ***Cellules endothéliales primaires***

Des cellules endothéliales (CE) primaires d'origine humaine ont été cultivées dans du milieu de culture spécifique EGM-2 (Lonza, Suisse) préparé selon les recommandations du fabricant (référence du kit). Le milieu était renouvelé entièrement tous les 2 à 3 jours. Ces CE ont été obtenues à partir de sang placentaire prélevés au niveau du cordon ombilical du service de gynéco-obstétrique du CHU d'Amiens (Cas de non-inclusion : éclampsie ; HELLP syndrome ; CIVD ; suspicion d'infection materno-fœtale ; infection virales: syphilis, hépatite B ou C, VIH, HTLV1, herpès génital, varicelle ; infection bactérienne ; portage streptocoque B sans couverture antibiotique ; séroconversion en cours de grossesse : toxoplasmose, rubéole ; IMG ; mort fœtale in utero). La démarche d'obtention est similaire à celle présentée au paragraphe précédent concernant les CSM. Elles ont également été précultivées au laboratoire EA4666 de l'UPJV.

## ***2) Environnement***

### ***Cassettes de culture***

Les expérimentations rapportées dans les chapitres 3 et 4 ont été menées au sein de chambre de culture Clinicell25 (Mabio-International, France), auxquelles on se référera

également sous le terme de « cassettes ». Il s'agit d'une enceinte parallélépipédique pouvant être entièrement remplie de 10 mL de milieu présentant une surface principale de 24 cm<sup>2</sup> (Figure 19). Les parois sont perméables aux gaz et traitées au plasma pour l'adhésion cellulaire. Elles ont ici été utilisées en conditions de culture statique bien que les embouts Luer-lock permettent la mise en place d'une perfusion dynamique de milieu. Elles sont livrées stériles et sont à usage unique. Dans le cas de l'utilisation de scaffolds, les matériaux ont été insérés dans les cassettes au laboratoire sous PSM de type 2 afin de conserver la stérilité du système.

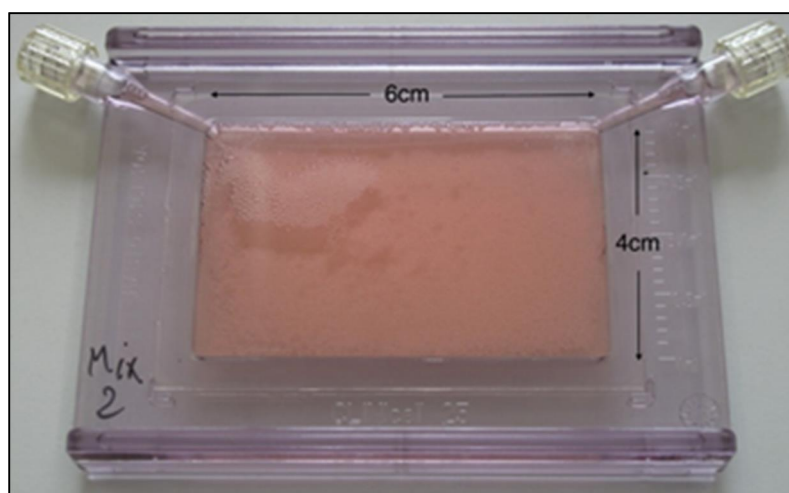


Figure 19 : Géométrie de la cassette de culture Clinicell25 (Mabio International, France)

### ***Culture statique en boîtes de Pétri***

Des cellules ont également été cultivées en boîte de Pétri (chapitre 5). Les boîtes utilisées sont en verre sodocalcique, de diamètre 40mm et d'épaisseur 12mm (Duran, Allemagne). Des ergots en polydiméthylsiloxane (PDMS) ont été formés au laboratoire sur les couvercles afin de permettre les échanges gazeux avec l'environnement extérieur en conservant les boîtes fermées (Figure 20). Un revêtement limitant l'adhésion des cellules (Sigmacote, Sigma Aldrich, Etats-Unis) a été appliqué au fond des boîtes, afin de favoriser le développement d'un tissu cellulaire sur les scaffolds placés à l'intérieur au détriment de la surface en verre. Brièvement, les boîtes de Pétri sont lavées puis chauffées (minimum 120°C et 30 minutes). Elles sont remplies de Sigmacote sous hotte aspirante puis le produit est retiré après quelques secondes. Elles sont ensuite rincées à l'eau permutée puis autoclavées (121°C, 1 bar, 20 minutes) avant utilisation. Les témoins cellulaires sans matériau sont cultivés au fond de boîtes autoclavées sans revêtement.

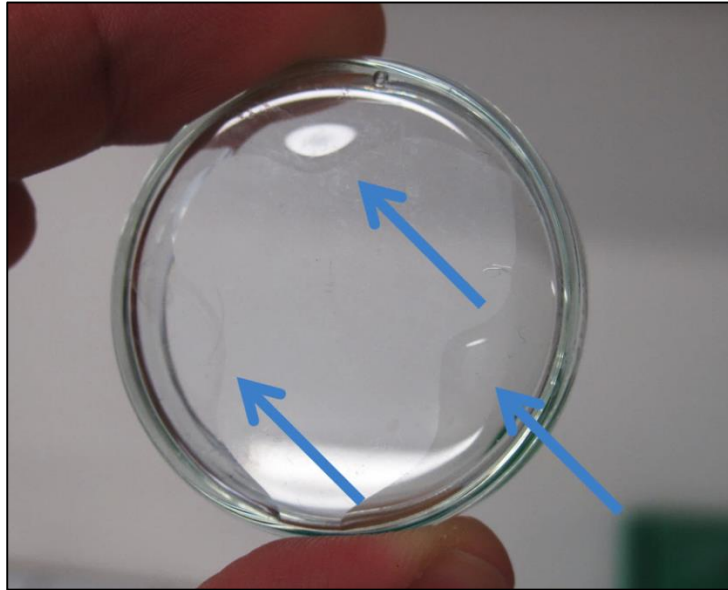


Figure 20 : Boîte de Pétri en verre de diamètre 30mm avec pose d'œrgots en PDMS (flèches)

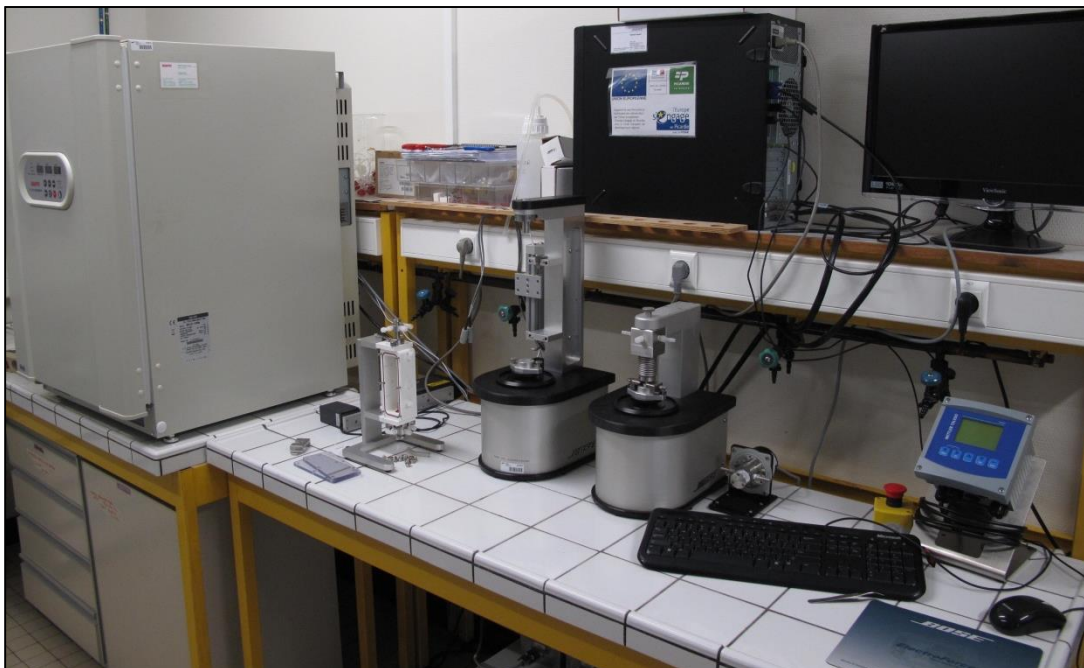


Figure 21 : Appareillage Biodynamic (Bose, Etats-Unis) complet.

## ***Culture dynamique***

Les essais de culture sous sollicitations mécaniques ont été conduits au sein de la chambre de l'appareil Biodynamic (Bose, Etats-Unis) (Figure 21). Il s'agit d'une enceinte de culture d'un volume d'environ 300 mL, autoclavable, permettant la saisie d'un échantillon entre des mors pour lui appliquer des contraintes mécaniques en cours de culture. Le dispositif et son utilisation sont rapportés en détail au chapitre 5.

### ***3) Matériaux***

#### ***Phosphate de calcium***

Des granules de phosphate de calcium (20 % HA  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , 80 % TCP  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France) ont été utilisés au sein des cassettes de culture comme scaffold pour la croissance du tissu cellulaire. Trois tailles différentes ont été étudiées :  $<80 \mu\text{m}$ ,  $80\text{-}200 \mu\text{m}$ ,  $500\text{-}1000 \mu\text{m}$ . Les granules ont été utilisés sous conditionnement stérile ou stérilisés au laboratoire avant insertion (four,  $160^\circ\text{C}$ , 2 heures). Ils sont un don du Dr. Pierre Layrolle.

La distribution de taille des granules avec un diamètre annoncé « inférieur à  $80 \mu\text{m}$  » a été analysée avec un compteur et analyseur de taille Coulter Z Series (Beckman Coulter, Etats-Unis). Un échantillon du matériau est dilué dans une solution d'Isosflow Sheath Fluid (Beckman Coulter, Etats-Unis) dans une cuve de l'appareil puis homogénéisé par agitation avant mesures.

Les nanoparticules d'HA ont été fournies par MKNano (Canada). Elles se présentent sous la forme d'aiguilles de 20nm (99% de pureté) et 60nm (96% de pureté).

#### ***Polymères bruts***

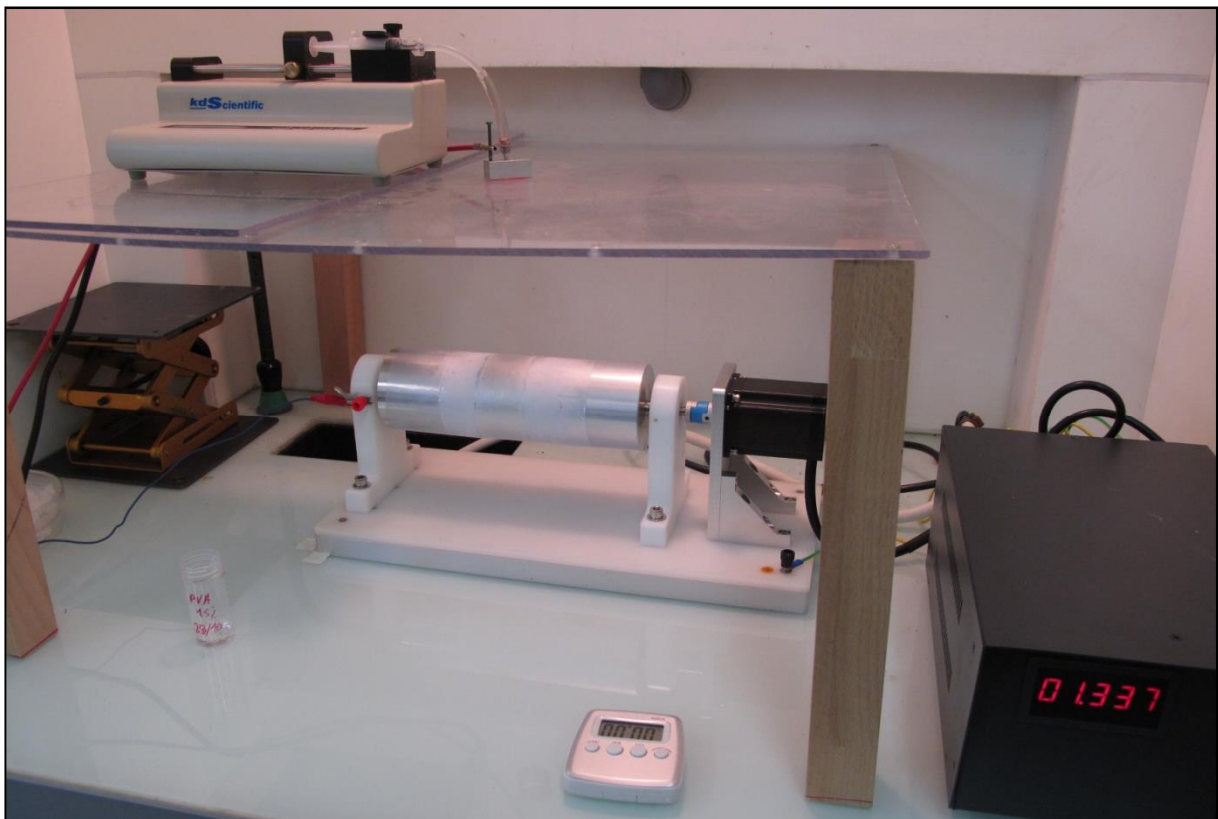
Les polymères utilisés pour fabrication de fibres électrospinnés au Laboratoire Roberval ont été acquis sous forme de poudre chez Sigma-Aldrich (Etats-Unis). Il s'agit d'alcool polyvinylique (PVA, poids moléculaire moyen 70000 ó 100000) et d'acide polylactique (PLA, 59000 ó 101000, basse viscosité).

## ***Solvants***

Les différents solvants utilisés pour dissoudre le PLA étaient du chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ , Sigma-Aldrich, Etats-Unis), du dichlorométhane (DCM,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , VWR, Etats-Unis) et de l'acétone ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ , Labgros, France). Le PVA était dissous dans de l'eau déminéralisée.

## ***Polymères électrospinnés***

Le montage d'électrospinning est composé d'un générateur haute tension (Gamma High Voltage, Etats-Unis), un pousse-seringue (Kd Scientific, Etats-Unis), une aiguille 19G (Cadence Science, Etats-Unis) et un collecteur cylindrique rotatif de 75mm de diamètre (Nabond, Chine) (Figure 22). D'abord installé à l'intérieur d'une cage en plexiglas pour les étapes de mise au point, il a été déplacé sous hotte aspirante pour permettre l'utilisation de polymères nécessitant des solvants forts.



**Figure 22 : Montage de production de fibres électrospinnées**



Les paramètres de production des scaffolds électrospinnés réalisés avec ce montage sont résumés dans la Table 4. Dans le cas de l'addition de nanoparticules, le pourcentage indiqué correspond à la proportion de polymère brut remplacée par les nanoparticules (exemple : « HA 20nm 10% wt/wt » signifie que 10% de la masse de PVA est remplacé par des nanoparticules). Cette proportion correspond à la concentration maximale en nanoparticules ayant permis un fonctionnement stable du dispositif.

Polymère	Concentration	Solvant	Additif	Distance	Voltage	Débit	Vitesse
PVA	15% wt/v	Eau permutée	/	10cm	22,5kV	14μL/min	50rpm
PVA	15% wt/v	Eau permutée	HA 20nm 10% wt/wt	10cm	22,5kV	14μL/min	50rpm
PVA	15% wt/v	Eau permutée	HA 60nm 5% wt/wt	10cm	22,5kV	14μL/min	50rpm
PLA	10% wt/wt	70% DCM, 30% acétone	/	10cm	12.5kV	67μL/min	50rpm
PLA	10% wt/wt	70% CHCl <sub>3</sub> , 30% acétone	/	10cm	12.5kV	67μL/min	50rpm

Table 4 : Paramètres de production des différents scaffolds électrospinnés.

Les fibres de PCL aléatoires sont un don de l'ICPEES. Les fibres PCL/gélatine aléatoires (PCL poids moléculaire moyen 70000 ó 90000, Sigma-Aldrich, Etats-Unis ; gélatine de bovin type B, Sigma-Aldrich, Etats-Unis) sont un don de l'AMP. Les scaffolds coaxiaux PCL/PLA et PCL multicouches ont été réalisés dans le cadre d'un programme d'échange de la Société Européenne des Organes Artificiels (ESAO) avec l'AMP (PCL identique, PLA : poids moléculaire 150000, Natureplast, France). Les concentrations sont de 133 mg/mL et 66 mg/mL pour le PCL et le PLA respectivement dans le cas des fibres coaxiales. Elles sont de 100 mg/mL et 200 mg/mL pour les couches externes et internes respectivement dans le cas des fibres multicouches de PCL. Le solvant utilisé était du 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE, ABCR, Allemagne) dans chacun de ces cas.

## II. Méthodes

### 1) Méthodes de culture

#### ***Monoculture en cassette***

Les granules de phosphate de calcium sont insérés en condition stérile à l'intérieur des cassettes de culture Clinicell25, puis celles-ci sont préincubées 48h avec du milieu complet avant ensemencement. Les cellules MC3T3-E1 sous-clone 4 sont précultivées en flasque jusqu'à l'obtention de 10 millions de cellules par cassette étudiée. Elles sont récoltées à l'aide de trypsine (0,25% EDTA, Gibco Invitrogen) puis injectées dans les cassettes et placées en incubation pendant un mois. La trypsine utilisée au cours du présent travail était identique pour tous les types cellulaires et toutes les expérimentations. Les granules sont maintenus entre eux par le tissu cellulaire dès 3 jours, ce qui permet de renouveler le milieu sans détériorer le substitut en culture. Le même protocole sans insertion de granules est suivi pour les groupes témoins.

Dans le cas de l'utilisation de CSM humaines primaires, les cassettes sont également préincubées 48h avec du milieu de prolifération. Après ensemencement avec 2 ou 4 millions de cellules, les échantillons sont conservés dans le milieu de prolifération pendant une semaine, puis en milieu de différenciation pendant 3 semaines. Un groupe témoin de CSM non différenciées est également étudié en conservant le milieu de prolifération pendant les 4 semaines de culture.

A l'issue du mois de culture, la face supérieure des cassettes est découpée au scalpel et les substituts obtenus (granules et tissu vivant) sont retirés pour conduire les analyses.

#### ***Coculture en cassette***

Deux protocoles de coculture en cassette ont été étudiés dans le cadre des essais préliminaires. Les expériences ont été effectuées conjointement au sein du laboratoire BMBI et de l'EA4666 de l'UPJV par les Dr. Sébastien Dupont et Marie Naudot. Une coculture différée d'une part, avec ensemencement d'1 million de CSM à J0 et ajout d'1 million de CE à J14 ; une coculture directe d'autre part, avec ensemencement simultané des deux types

cellulaires à J0. Dans ce second cas, deux ratios ont été utilisés : 1:1 (1 million de CSM, 1 million de CE) et 1:4 (500 000 CSM pour 1,5 millions de CE).

La coculture menée pour l'étude complète a consisté en un protocole différé avec ensemencement de 2 millions de CSM à J0 et l'ajout de 2,5 millions de CE à J14.

Dans chaque cas de coculture, les monocultures respectives ont été cultivées comme groupe témoin. Les autres paramètres (un mois de culture, préincubation des cassettes, insertion des granules, renouvellement du milieu) sont identiques aux protocoles de monoculture détaillés ci-dessus.

Les milieux de culture utilisés pour les différents groupes sont résumés dans la Table 5. Dans le cas général, le milieu de prolifération est utilisé pendant une semaine. Il est ensuite remplacé par le milieu de différenciation puis par le milieu spécifique des cellules endothéliales à l'ajout de celles-ci.

Groupe	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4
<b>Coculture directe</b>	Milieu spécifique CE	Milieu spécifique CE	Milieu spécifique CE	Milieu spécifique CE
<b>Coculture différée</b>	Milieu de prolifération	Milieu de différenciation	Milieu spécifique CE	Milieu spécifique CE
<b>Monoculture CSM (témoin CSM)</b>	Milieu de prolifération	Milieu de prolifération	Milieu de prolifération	Milieu de prolifération
<b>Monoculture CSM différenciée (témoin CSM diff)</b>	Milieu de prolifération	Milieu de différenciation	Milieu spécifique CE	Milieu spécifique CE
<b>Monoculture CE (témoin CE)</b>	Milieu spécifique CE	Milieu spécifique CE	Milieu spécifique CE	Milieu spécifique CE

Table 5 : Protocole d'utilisation des différents milieux lors des cocultures en cassette.

### ***Culture statique sur fibres électrospinnées***

La lignée C3H10T1/2 a été cultivée sur les matériaux obtenus par électrospinning déposés dans les boîtes de Pétri couvertes avec un revêtement de Sigmacote (voir ci-dessus).

Des échantillons de fibres électrospinnées sous la forme de carré de 17mm de côté sont placés dans les boîtes de Pétri (Figure 23) et recouverts d'éthanol 70% (Sigma Aldrich,

Etats-Unis) pendant 30 minutes sous PSM de type II. L'éthanol est ensuite retiré puis les matériaux rincés trois fois au PBS 7,4 (Phosphate Buffered Saline, Gibco Invitrogen, Etats-Unis) pendant 5 minutes. Le dernier volume de PBS est retiré juste avant l'ensemencement.

Après une phase de préculture permettant l'obtention de 300 000 cellules par échantillon étudié, les cellules sont récoltées et déposées dans 200 $\mu$ L de suspension au centre des matériaux. Les échantillons sont incubés pendant 1h puis sont complétés avec 1,8 mL de milieu de culture. Ils sont ensuite cultivés pendant 96h avec un changement complet de milieu à 48h environ. La même densité initiale de cellules au sein de boîtes de Pétri sans revêtement et sans matériau est utilisée comme groupe témoin.



Figure 23 : Echantillon de matériau électrospinné (PVA avec nanoparticules d'HA de 20nm) mis en place dans une boîte de Pétri avec revêtement.

## 2) Analyse des propriétés biologiques

### ***Observations en microscopie électronique à balayage***

Les échantillons sont immergés dans une solution de Rembaum<sup>197</sup> pendant 1h minimum puis rincés trois fois à l'eau permutée. Ils sont ensuite observés par microscopie électronique à balayage (Philips XL30 ESEM-FEG, Pays-Bas et quanta FEG 250, FEI, Etats-Unis) après métallisation.

### ***Observations en microscopie à fluorescence sur échantillons vivants***

Un test de viabilité dit Live/Dead (Invitrogen, Etats-Unis) a été utilisé suivant les recommandations du fabricant. Brièvement, les échantillons sont rincés une fois au PBS 7,4 (Gibco Invitrogen) à la fin de la culture et mis en contact avec deux marqueurs fluorescents simultanément. La Calcéine AM (1  $\mu$ M) et l'Ethidium homodimer-1 (EthD-1) permettent de visualiser respectivement les cellules vivantes et les noyaux des cellules mortes. Les résultats ont été observés par microscopie à fluorescence (Leica Microsystems, Allemagne) pour déterminer la morphologie et la viabilité des tapis cellulaires.

Le marqueur Hoechst 33342 (0,5  $\mu$ g/mL, Invitrogen, Etats-Unis) a également été utilisé afin de visualiser la totalité des noyaux cellulaires et d'estimer ainsi quantitativement la viabilité par comparaison aux noyaux morts marqués par l'EthD-1. Les images ont été traitées automatiquement à l'aide du logiciel gratuit CellProfiler ([www.cellprofiler.org](http://www.cellprofiler.org)). Brièvement, les images couleur sont converties en niveaux de gris, puis une opération morphologique (érosion) est appliquée pour séparer les noyaux les uns des autres. Les cellules sont alors comptées en fonction de la taille et de l'intensité de fluorescence des noyaux. Les zones étudiées ont été choisies aléatoirement le long des échantillons.

### ***Observations en microscopie à fluorescence sur échantillons fixés***

Des marquages fluorescents et immunofluorescents ont été réalisés sur échantillons fixés afin de visualiser la morphologie interne des cellules (filaments d'actine) et la présence de jonctions gap (traduite par la présence de connexine 43).

Après rinçage au PBS 7,4 (trois fois 5 minutes, Gibco Invitrogen, Etats-Unis), les échantillons sont déplacés sous hotte aspirante et immergés dans du paraformaldéhyde (Agar Scientific, Royaume-Uni) pendant 10 minutes à température ambiante. Ils sont à nouveau rincés.

Les échantillons sont perméabilisés dans une solution de Triton X-100 (VWR, Royaume-Uni) à 0,5% pendant 10 minutes à température ambiante puis rincés. Ils sont ensuite immergés dans une solution identique complétée avec 1%wt/v d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma-Aldrich, Etats-Unis) pendant 20 minutes à température ambiante (solution de blocage).

Dans le cas du marquage par immunofluorescence, les échantillons sont ensuite mis en contact avec des anticorps de souris anti-connexine 43 (1/400 dans la solution de blocage, cibles humaines et murines, Invitrogen, Etats-Unis) pendant une heure à température ambiante, puis rincés (trois fois 10 minutes). Une solution d'anticorps secondaires (1/500 dans la solution de blocage, Donkey anti-mouse 488, Invitrogen, Etats-Unis) est alors ajoutée pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les échantillons sont à nouveau rincés (trois fois 10 minutes) avant visualisation en microscopie à fluorescence (Leica Microsystems, Allemagne).

Dans le cas du marquage fluorescent, les échantillons sont immergés après la fixation dans une solution de rhodamine/phalloïdine (5u/mL, Invitrogen, Etats-Unis) pendant 45 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis rincés. Ils sont ensuite mis en contact avec une solution de DAPI (1 g/L, Invitrogen, Etats-Unis) pendant 30 secondes afin de visualiser également la totalité des noyaux cellulaires. Les échantillons sont rincés une dernière fois (trois fois 5 minutes) puis conservés dans du PBS avant visualisation en microscopie à fluorescence (Leica Microsystems, Allemagne).

Dans le cas des cocultures CSM/CE, les trois marquages (Connexine 43, filaments d'actine, noyaux) ont été effectués simultanément sur les mêmes échantillons.

La Table 6 résume les sondes fluorescentes utilisées au cours du présent travail de thèse.

Marqueur	Concentration	Longueur d'onde (excitation/émission)	Couleur	Objectif	Fixation
<b>Calcéine AM</b>	1 µM	494/517nm	Vert	Cellules vivantes	Non
<b>EthD-1</b>	1 µM	517/617nm	Rouge	Noyaux morts	Non
<b>Hoechst 33342</b>	0,5 µg/mL	346/460nm	Bleu	Noyaux	Non
<b>DAPI</b>	1 g/L	358/461nm	Bleu	Noyaux	Oui
<b>Rhodamine Phalloïdine</b>	5 u/mL	540/565nm	Rouge	Filaments d'actine	Oui
<b>Anticorps anti-Cx43</b>	1/400 (primaires) 1/500 (secondaires)	495/519nm	Vert	Jonctions gap	Oui

Table 6 : Marqueurs fluorescents utilisés pour l'analyse biologique.

## ***Activité métabolique***

L'activité métabolique des cellules a été évaluée en utilisant une solution de Bleu Alamar (AlamarBlue, Invitrogen, Etats-Unis). En cours de culture, le milieu des cassettes étudiées est retiré et remplacé à l'abri de la lumière par une solution de milieu complétement avec 10% de Bleu Alamar. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 45 minutes à 37°C, puis le milieu complétement est retiré et l'intensité de fluorescence mesurée (excitation : 560nm, émission : 595nm). Les variations de fluorescence correspondent à la réduction biochimique du Bleu Alamar par activité métabolique des cellules (réaction d'oxydo-réduction intervenant dans les mitochondries). L'intensité de fluorescence du milieu complétement incubé sans contact avec les cellules est retranchée aux résultats avant analyse.

## ***Coloration et dosages***

La coloration de la PAL dans les échantillons a été effectuée au laboratoire BMBI par méthode histochimique semi-quantitative en utilisant un kit Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) pour les cellules de lignée et au laboratoire LNPC par le Dr. Marie Naudot avec une solution BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) pour les CSM, conformément aux recommandations du fabricant. Les résultats ont été observés par loupe binoculaire (Leica Microsystems, Allemagne).

Un kit ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Cloud-Clone Corp., Etats-Unis) a été utilisé conformément aux recommandations du fabricant pour évaluer la production d'OCN à l'issue de la culture de lignée en cassette. Brièvement, le milieu de culture a été retiré des cassettes au jour 30 après 24h d'incubation et placé dans une plaque revêtue d'anticorps spécifiques de l'OCN. Après incubation avec les réactifs du kit, les changements de coloration ont été mesurés par spectrofluorimétrie à 450nm pour quantifier la concentration d'OCN grâce à une courbe étalon. Les résultats ont été comparés à la masse totale de protéines dans les échantillons évaluée par un test de Bradford. Les lyses cellulaires ont été effectuées avec un tampon RIPA (Fisher Scientific, Etats-Unis) puis du bleu de Coomassie (Interchim, France) a été ajouté et l'absorbance mesurée à 570nm. La courbe étalon a été établie à partir de BSA (Interchim, France).

L'activité de la PAL a été mesurée au laboratoire LNPC du CHU d'Amiens grâce à un kit « Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay » (Biovision, Etats-Unis) par le Dr.

Marie Naudot. Brièvement, les échantillons sont placés dans 500 µL de tampon fourni, vortexés puis centrifugés 3 minutes à 13 000 g. Les surnageants sont récupérés et 80µL de chaque échantillon sont placés dans une plaque 96 puits. La réaction enzymatique est lancée par l'ajout de 50µL de substrat de la PAL à 5mM. La plaque est alors agitée puis placée 60 min à 25°C à l'obscurité. La réaction est stoppée par ajout de 20µL de solution stop fournie par le kit. La plaque est brièvement agitée, puis la mesure de la densité optique est réalisée par un lecteur de plaque à 405nm. Une gamme étalon est réalisée à 0, 4, 7, 12, 16 et 20nmol/puits de substrat. 10µL d'enzyme PAL fournie dans le kit sont placés dans chaque puits de la gamme étalon pour permettre la synthèse du produit : le p-Nitrophenol (pNP, coloration jaune). A partir de la gamme étalon, l'activité de la PAL est évaluée selon le calcul suivant : activité PAL (U/mg) = A/V/T/C, avec :

A : la quantité (µmol) de produit pNP généré

V : le volume d'échantillon placé par puits (mL)

T : le temps de réaction (min)

C : la concentration protéiques (mg/mL)

### ***Expression des gènes***

L'expression des gènes de cellules à l'issue de la coculture CSM/CE a été étudiée par RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction) dans le laboratoire LNPC du CHU d'Amiens par les Dr. Sébastien Dupont et Marie Naudot. Brièvement, les échantillons sont lysés et centrifugés plusieurs fois à 12000g dans différentes solutions jusqu'à extraire les ARN (Acide Ribonucléique). La quantité d'ARN est évaluée par photométrie (ng/µL, Nano Photometer Pearl, Implen, Allemagne), les échantillons étant dilués dans de l'eau RNase Free si besoin. L'ARN est alors transcrit en ADN (Acide Désoxyribonucléique) complémentaire en utilisant un kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription » (Applied Biosystems, Etats-Unis) conformément aux recommandations du fabricant. L'expression de chaque gène d'intérêt est ensuite mesurée par méthode dite SYBR Green. Les primers utilisés pour l'analyse de la coculture finale (6 donneurs) sont résumés dans la Table 7. Les résultats sont exprimés par rapport au gène lié à la GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), utilisé comme référence traduisant le nombre de cellules par échantillon.



Gène	Primer séquences
<b>GAPDH</b>	Forward 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCGA-3'
	Reverse 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'
<b>Runx2</b>	Forward 5'-GGACTGTGGTACTGTCATGGC-3'
	Reverse 5'-AAACTCTTGCCTCGTCCACTC-3'
<b>PAL</b>	Forward 5'-ACGAGCTGAACAGGAACAACG-3'
	Reverse 5'-TCAATTCTGCCTCCTTCCACC-3'
<b>Col1a2</b>	Forward 5'-TGGATGAGGAGACTGGCAACC-3'
	Reverse 5'-TCAGCACCACCGATGTCCAAA-3'
<b>OCN</b>	Forward 5'-ACCACATCGGCTTTCAGGAGG-3'
	Reverse 5'-GGGCAAGGGCAAGGGGAAGAG-3'
<b>OPN</b>	Forward 5'-GCCGAGGTGATAGTGTGGTT-3'
	Reverse 5'-AACGGGGATGGCCTTGTATG-3'
<b>BSP</b>	Forward 5'-AGATGACAGTTCAGAAGAGGAGG-3'
	Reverse 5'-CATAGCCCAGTGTTGTAGCAGA-3'
<b>Vegfr2</b>	Forward 5'-TGCCTCAGAAGAGCTGAAAATT-3'
	Reverse 5'-CACAGACTCCCTGCTTTTGCT-3'
<b>Facteur de von Willebrandt</b>	Forward 5'-CGGCTTGCACCATTAGCTA-3'
	Reverse 5'-TGCAGAAGTGAGTATCACAGCCATC-3'

Table 7 : Primers utilisés pour l'analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR à l'issue de la coculture en cassette (Laboratoire LNPC).

L'expression des gènes à l'issue de la culture sur scaffolds électrospinnés a été évaluée selon une technique semblable au Laboratoire de Biologie du Développement (UPMC, Paris) par Ludovic Gaut. Les cellules ont été lysées par dépôt de 350µL de Buffer RLT (Qiagen, Allemagne) sur les matériaux pendant 30 minutes avant pipetage énergétique. Les échantillons ont ensuite été traités à l'UPMC avec un kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription » (Applied Biosystems, Etats-Unis) et la méthode SYBR Green. Les primers utilisés sont résumés dans la Table 8.

Gène	Primer séquences
<b>Scleraxis</b>	Forward 5'-CCTTCTGCCTCAGCAACCAG-3'
	Reverse 5'-GGTCCAAAGTGGGGCTCTCCGTGACT-3'
<b>Tenomodulin</b>	Forward 5'-AACACTTCTGGCCCGAGGTAT-3'
	Reverse 5'-AAGTGTGCTCCATGTCATAGGTTTT-3'
<b>Col1a1</b>	Forward 5'-TGGAGAGAGCATGACCGATG-3'
	Reverse 5'-GAGCCCTCGCTTCCGTACT-3'
<b>Aquaporin1</b>	Forward 5'-CAATCACTTGGCCGCAATGACCT-3'
	Reverse 5'-TACCAGCTGCAGAGTGCCAATGAT-3'
<b>Runx2</b>	Forward 5'-GGTCCCCGGAACCAA-3'
	Reverse 5'-GGCGATCAGAGAACAACACTAGGTTTT-3'
<b>Dlx5</b>	Forward 5'-CGTCTCAGGAATCGCCAAC-3'
	Reverse 5'-AGTCAGAATCGGTGGCCG-3'
<b>OCN</b>	Forward 5'-CAGCGGCCCTGAGTCTGA-3'
	Reverse 5'-TTATTGCCCTCCTGCTTGGA-3'

Table 8 : Primers utilisés pour l'analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR à l'issue de la culture sur scaffolds électrospinnés (UPMC).

### ***Significativité des résultats***

Au moins 6 expériences indépendantes ont été effectuées pour chaque étude menée, sauf mention d'étape préliminaire. Les CSM primaires utilisées en coculture proviennent de 6 donateurs différents. La significativité des résultats a été testée par analyse de variance (ANOVA) avec test de Tukey dans le cas des comparaisons entre cas multiples, et par test de Student dans le cas des comparaisons deux à deux.

### 3) Analyse des propriétés mécaniques et chimiques

#### **Tests de traction sur tissu reconstruit**

Les tests de traction ont été conduits sur les substituts présentant un maintien suffisant avec l'appareil Electroforce 3200 (Bose, Etats-Unis) à la vitesse de 0,1mm/s jusqu'à la rupture. Les échantillons consistaient en des bandelettes de tissu reconstruit (1cm sur 3cm, granules de phosphate de calcium et cellules) retirés des cassettes à l'issue d'un mois de culture et saisis entre des mors en plastique non strié. Les essais étaient contrôlés en déplacement et les forces engendrées enregistrées (cellule de force de 250g, logiciel WinTest7, Bose, Etats-Unis). Le module de Young a été mesuré à partir de la pente de la zone élastique de chaque courbe contrainte/déformation (outil droite de régression, MS Excel, Microsoft, Etats-Unis) pour une épaisseur de 200  $\mu\text{m}$  (épaisseur estimée de la monocouche de granules 80-200  $\mu\text{m}$ ).

Des essais avec visualisation sous microscopie électronique à balayage ont également été menés à l'aide d'une micromachine de traction dédiée (Deben Microtest 300, Royaume-Uni), à la même vitesse et sur les mêmes échantillons, pour évaluer la propagation des fissures et les mécanismes d'endommagement. Afin de visualiser précisément la zone d'intérêt, une encoche était réalisée au milieu des bandelettes avant le début des tractions. Le déplacement était temporairement arrêté à intervalle régulier afin de permettre l'acquisition d'images.

#### **Tests de traction sur fibres électrospinnées**

Les tests de traction ont été conduits sur chaque scaffold électrospinné avec l'appareil Electroforce 3200 (Bose, Etats-Unis) à la vitesse de 0,1mm/s jusqu'à déformation plastique. Les échantillons consistaient en des bandelettes de matériau (5mm sur 30mm) saisis entre des mors métalliques striés. Les essais étaient contrôlés en déplacement et les forces engendrées enregistrées (cellule de force de 22N, logiciel WinTest7, Bose, Etats-Unis). Le module de Young a été mesuré à partir de la pente de la zone élastique de chaque courbe contrainte/déformation (outil droite de régression, MS Excel, Microsoft, Etats-Unis) pour une épaisseur mesurée au cas par cas au pied à coulisse (graduation minimale : 0,1 mm). Compte-tenu de la porosité variable des fibres électrospinnées, il est à noter qu'il s'agit en réalité d'un module de Young estimé permettant principalement la comparaison entre les différents

scaffolds étudiés. Leur épaisseur pouvant varier légèrement d'un échantillon à l'autre, il était donc nécessaire de recourir à cette approximation afin de travailler en termes de contrainte et non de forces engendrées.

Pour chaque matériau, les essais ont été effectués dans 3 conditions expérimentales : sur échantillon sec, sur échantillon humidifié immédiatement avant traction et sur échantillon humidifié pendant 5 jours dans de l'eau déminéralisée.

### ***Morphologie et composition des fibres électrospinnées***

Les échantillons sont immergés dans une solution de Rembaum<sup>197</sup> pendant 1h minimum puis rincés trois fois à l'eau permutée. Ils sont ensuite observés par microscopie électronique à balayage (Philips XL30 ESEM-FEG, Pays-Bas et quanta FEG 250, FEI, Etats-Unis) après métallisation. Le diamètre des fibres est mesuré sur les images en différents points (mesures à l'aveugle effectuées par le Service d'Analyse Physico-Chimique (SAPC) de l'UTC).

La composition chimique des échantillons électrospinnés comportant des nanoparticules d'HA a été évaluée par dispersion des rayons X (MEB-EDX, xflash 6130, Bruker, Allemagne) sous le même microscope, également par le SAPC. Les résultats sont donnés sous la forme des spectres du nombre de particules détectées (cps, *count per second*) en fonction de la gamme d'énergie (eV). La répartition des nanoparticules au sein des fibres a été observée par microscopie électronique à transmission (JEM-2100F, tension d'accélération de 200kV, JEOL, Etats-Unis) après projection du matériau sur grilles dédiées (Electron Microscopy Sciences, Etats-Unis) pendant 1 seconde.

### ***Angle de contact***

La mouillabilité des scaffolds électrospinnés a été évaluée par mesure de l'angle de contact en utilisant un appareil Krüss DSA10-mk2 (Krüss GmbH, Allemagne) et le logiciel Drop Shape Analysis (Krüss GmbH, Allemagne). Brièvement, une goutte d'eau est déposée par une seringue sur la surface du matériau et une image est acquise immédiatement. L'angle formé entre la surface horizontale et la base de la goutte est alors calculé par la méthode tangente-2 du logiciel. Un angle faible correspond à une surface hydrophile et un angle élevé à une surface hydrophobe (Figure 24).

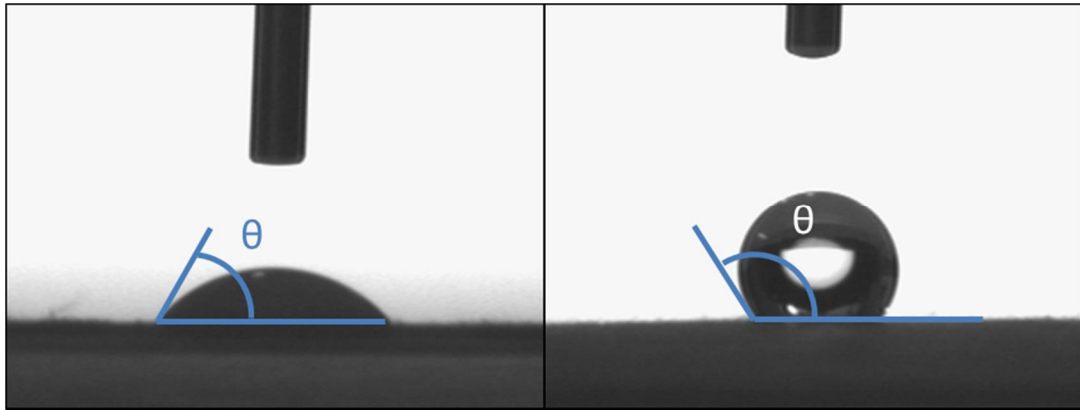


Figure 24 : Evaluation de l'angle de contact  $\theta$  pour un matériau hydrophile (gauche) et hydrophobe (droite)

### **Porosité**

La porosité des réseaux de fibres obtenus par électrospinning a été estimée par analyse d'image selon la méthode proposée par Ghasemi-Mobarakeh *et al*<sup>198</sup>.

Brièvement, les images acquises par MEB sont transformées en images binaires (noir et blanc sans niveaux de gris) en fonction de différents seuils. Au-dessus du seuil, les pixels sont changés en pixels blancs (présence de matériau) et en-dessous, en pixels noirs (pores entre les fibres). Le rapport entre pixels noirs et pixels blancs permet alors d'obtenir une porosité estimée du scaffold électrospinné (Figure 25).

Soit  $\mu$  et  $\sigma$  respectivement la moyenne et l'écart-type de l'histogramme de l'image originale, les trois seuils considérés sont  $\mu + \sigma$  (on ne conserve que les fibres supérieures),  $\mu$  (fibres supérieures et intermédiaires) et  $\mu - \sigma$  (quasi-totalité des fibres).

Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel gratuit Scilab (Version 5.4.1, Scilab Enterprises, France).

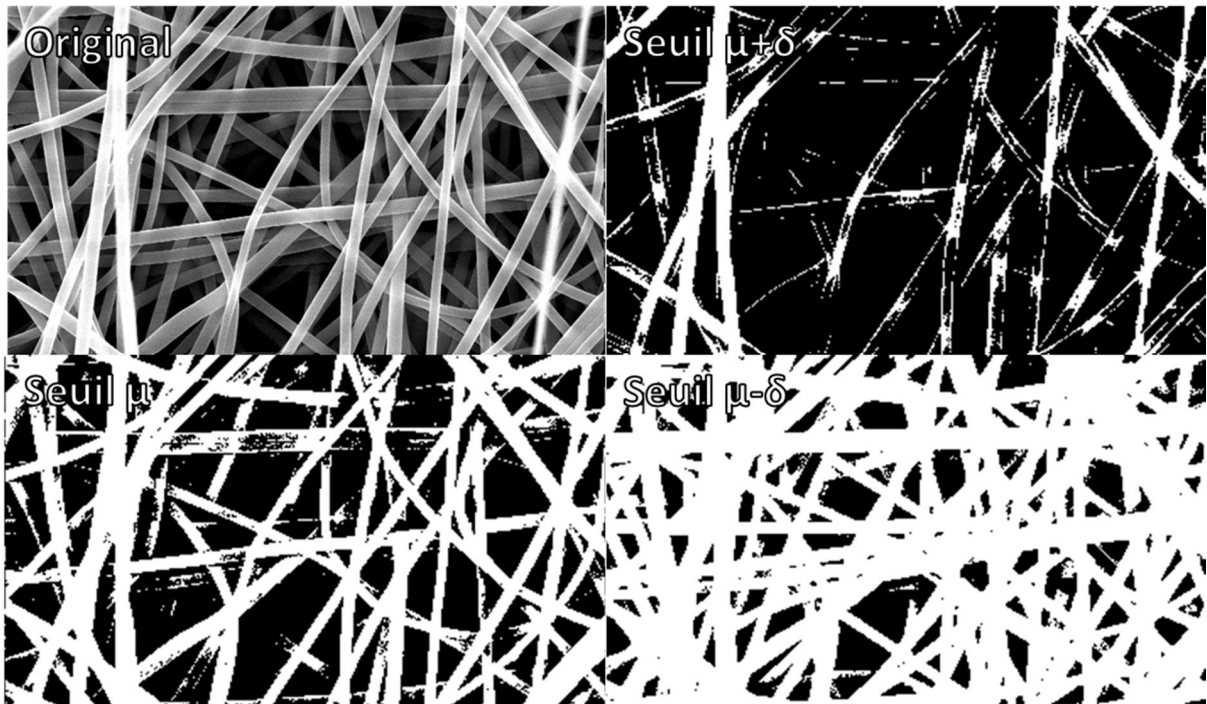


Figure 25 : Binarisation d'une image MEB pour estimation de la porosité selon différents seuils.

### ***Traitement du signal***

Le traitement des données fournies par les machines de tractions (fichiers texte) a été réalisé à l'aide du logiciel gratuit Scilab (Version 5.4.1, Scilab Enterprises, France). Un exemple de script utilisé est donné en annexe du présent document.

### ***Significativité des résultats***

Au moins 6 expériences indépendantes ont été effectuées pour chaque étude menée (sauf mention d'étape préliminaire). La significativité des résultats a été testée par analyse de variance (ANOVA) avec test de Tukey.

## Chapitre 3 : Culture de cellules de lignée sur granules de phosphate de calcium

---

## Chapitre 3 : Culture de cellules de lignée sur granules de phosphate de calcium

### I. Introduction

L'analyse du contexte, de l'application visée (la reconstruction maxillo-faciale) ainsi que des attentes spécifiques des chirurgiens effectuée au chapitre précédent a dégagé le besoin d'une forme pertinente pour le substitut osseux reconstruit par ingénierie tissulaire. Ainsi, la faisabilité d'une forme de feuillet, malléable et manipulable, a été établie au cours du travail de thèse de Benoît Carpentier au laboratoire BMBI (2006-2009)<sup>195</sup>. À l'issue de cette étude, il était cependant nécessaire d'aller plus loin dans l'optimisation et la caractérisation biologique du tissu reconstruit, mais aussi de la corréler à sa caractérisation mécanique, afin d'assurer son maintien et un ressenti adéquat au cours de l'opération chirurgicale. Ce dernier point pourrait alors être le critère principal déterminant le substitut le plus pertinent.

Le présent chapitre présente donc les résultats de la caractérisation d'un substitut osseux obtenu par ingénierie tissulaire au sein d'un bioréacteur spécifique, une cassette parallélépipédique. Cette dernière a permis la stabilité pendant la culture d'une monocouche de granules de phosphate de calcium, utilisée comme scaffold, jusqu'à l'apparition de la forme de feuillet. L'étude a permis de déterminer la taille de granules la plus adaptée, les conditions de culture optimale permettant le retrait et la manipulation du tissu à l'extérieur de la cassette afin de réaliser les tests mécaniques attendus (Figure 26).



Figure 26 : Ouverture de la cassette de culture et manipulation du tissu reconstruit.



L'utilisation de cellules de lignées, bien documentées et assurant une bonne répétabilité, était pertinente dans l'optique d'une optimisation avant d'envisager des cultures primaires plus proches des conditions cliniques. De même, le choix d'un biomatériau à base de phosphate de calcium apportait tous les avantages en termes de réponse cellulaire détaillés au chapitre I. Les granules assuraient également, combinés au bioréacteur, une géométrie plane sur une large surface.

L'ensemble des résultats et de la discussion menés dans le cadre de cette étude sont rapportés ci-après sous la forme d'un article, publié en juin 2015 dans le journal *Tissue Engineering Part. A*<sup>199</sup>. Il est suivi de données et illustrations complémentaires.

## **II. Résultats et discussion : Article *Tissue Engineering Part. A* (Juin 2015)**

## Towards the development and characterisation of an easy handling sheet-like biohybrid bone substitute.

Timothée BAUDEQUIN, M.S.<sup>1</sup>, Fahmi BEDOUI, PhD<sup>2</sup>, Murielle DUFRESNE, PhD<sup>1</sup>,  
Patrick PAULLIER<sup>1</sup>, Cécile LEGALLAIS, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, UMR CNRS 7338  
Laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie, Compiègne, France.

<sup>2</sup> Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, UMR CNRS 7337  
Laboratoire de mécanique Roberval, Compiègne, France.

### Abstract

We designed a sheet-like bone substitute capable of adapting to different geometries and becoming a standard tissue-engineered process for bone surgery. Preosteoblastic cells were seeded on to a monolayer of calcium phosphate granules and cultured in a flat parallelepipedic cell culture chamber for one month. From the various diameters of the granules examined, the 80 ó 200 µm group exhibited the most homogeneous performances regarding both biological (cell morphology, viability, differentiation and simple metabolic activity) and mechanical (cohesion and stress-strain behaviour) properties. This sheet was easy to handle after extraction from the culture chamber and showed versatile geometry and flexibility, making it easy to use for surgeons, especially for small defects of the maxillofacial area.

### 1) Introduction

Tissue engineering is considered to be the most powerful alternative to autologous grafts in bone surgery. It consists of culturing autologous cells from the patient on a biomaterial with a specific shape and composition, known as a scaffold, and leading to *in vitro*-built bone tissue that can then be implanted<sup>1,2</sup>. This approach should allow clinicians to

circumvent the limitations both of allografts, namely rejection and the number of donors<sup>3</sup>, and of pure biomaterial implants that cannot be colonised<sup>4,5</sup>.

Despite a tremendous number of studies with a variety of cells, materials, shapes or bioreactors, to date there is still no consensus on the best process leading to adequate bone substitutes based on tissue engineering<sup>6,9</sup>. Various materials have been studied and considered as possible scaffolds for *in vitro* bone ingrowth, such as ceramics<sup>10,11</sup>, polymers<sup>12,13</sup>, natural biomaterials such as silk or chitosan<sup>14,16</sup> or to a lesser extent metals<sup>7</sup>, as well as composites of these different groups<sup>17</sup>. Relevant shapes for the scaffold have also been debated, with different studies on granules and microspheres<sup>18</sup>, fibres<sup>19,20</sup>, hydrogels<sup>21</sup> or engineered complex structures<sup>22,23</sup>. In addition, a bioreactor's ability to mimic *in vivo* environmental conditions is still an unsolved issue, with a wide variety of systems using mechanical stretching, flow perfusion, spinner flasks, rotating wall vessels<sup>24,26</sup> or specifically designed chambers<sup>27</sup>.

Targeted applications may be helpful for making choices from among all the possibilities. Besides intrinsic mechanical and biological properties (micro- and macroporosity<sup>28,29</sup>, pore interconnectivity<sup>30</sup>, osteoconduction and osteoinduction<sup>31</sup>), specific clinical requirements also have to be satisfied by the target substitute: it must be adaptable, and fit with all geometries of the bone mass loss in the surgical area, for instance the complex geometry of the oral and maxillofacial area ; it must have optimal cell viability and differentiation, and be stretched or folded during surgery without damage, thanks to the relevant mechanical properties<sup>32</sup>. From this point of view, current solutions have limitations in terms of their mechanical and biological behaviour<sup>7</sup>, the vascularisation of the scaffold<sup>33</sup> and the cost for a standard bioreactor process<sup>34</sup>.

Following a previous study of these clinical requirements<sup>35</sup>, we selected a set of parameters for a new *in vitro*-built bone substitute to be applied in bone surgery. A monolayer of calcium phosphate (CP) granules was selected as the scaffold, inside a specific flat cell culture chamber with a large culture surface. Calcium phosphate ceramics have been widely used for bone and dental tissue engineering<sup>36</sup> thanks to their relevant properties, especially osteoconduction and osteoinduction<sup>10</sup>. In addition, stacking granules may create the required porous interconnected structure and high surface-to-volume ratio<sup>2</sup>, and it showed better results than CP blocks<sup>37</sup>. This biomaterial was colonised by MC3T3-E1 preosteoblastic cells, a usual cell line to determine the potential of new scaffolds for proliferation, adhesion and differentiation of bone tissue<sup>38,40</sup>. No growth factor was added to the culture medium as we expected the system culture chamber + biomaterial to be efficient in promoting cell growth

and differentiation. After one month of culture, both the biological and mechanical properties of the substitute were examined, depending on the CP granules' mean diameter. We focused particularly on the morphology and shape relevance of the bone substitute for clinical applications, especially the small geometry of defects in the maxillofacial area.

## 2) Materials and methods

### **Cell culture chamber**

We used the Clinicell25® culture cassette (Mabio-International, France) as a specific flat cell culture chamber in order to obtain the *in vitro*-built tissue. The geometry is a parallelepipedic chamber with a 24 cm<sup>2</sup>-culture surface for a 10 mL-volume filled with medium, with 2 Luer Lock connections (Fig. 1). It is gas permeable and plasma treated to promote cell adhesion. After one month of culture, the upper side of the chamber was opened to remove the tissue and to perform the analysis.

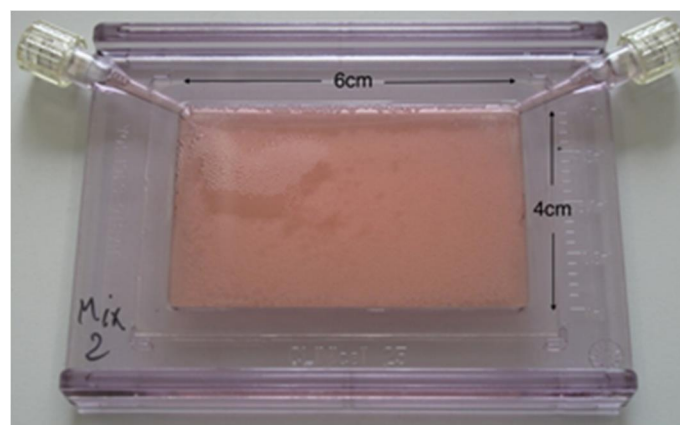


Figure 1 : Geometry of the Clinicell25® cell culture chamber (Mabio International).

### **Biomaterial**

Calcium phosphate granules (20 % hydroxyapatite (HA)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , 80 % - tricalcium phosphate (TCP)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , Biomatlante, France) were inserted as the scaffold material inside the culture chamber in order to obtain a single monolayer covering the whole surface. The layer was stable enough after 2 days of culture to prevent displacements of the biomaterial when the culture medium was changed. Different mean diameters of granule were

investigated: <80  $\mu\text{m}$ , 80-200  $\mu\text{m}$ , 500-1000  $\mu\text{m}$  and mixed composition (Table 1). Hereafter we refer to these groups as the S (small), M (medium), L (large) and Mix groups, respectively. A group without CP granules inside the culture chamber was studied as a control.

The cell culture chambers with CP granules were preincubated with complete medium for 48 hours before cell seeding.

<b>Group</b>	<b>Metabolic activity</b>	<b>Cell differentiation</b>	<b>Cell viability</b>	<b>Microscopy observations</b>	<b>Macroscopy observations</b>
<b>S</b>	Increasing profile	Heterogeneous	+	Cell spots	Heterogeneous tissue sheet
<b>M</b>	Stable profile	Homogeneous	+/-	Homogeneous tissue	Cohesive tissue sheet
<b>L</b>	Increasing profile	No differentiation	+/-	Growth inside granules $\emptyset$ holes	No tissue sheet
<b>Mix</b>	Stable profile	Heterogeneous	-	Homogeneous tissue	No tissue sheet
<b>Control</b>	Stable profile	Homogeneous	+/-	Homogeneous tissue	No tissue sheet

**Table 1 : Summary of the analysis and observations of the *in vitro*-built tissue after one month of culture, for each range of CP granules $\emptyset$ mean diameter.**

### **Cell culture**

The murine preosteoblastic cell line MC3T3-E1 subclone 4 (ATCC® CRL-2593) was cultured in -MEM Eagle medium with stabilised glutamine (Pan-Biotech, Germany) supplemented with 10 % FBS (Gibco Invitrogen, USA), 1 % Penicillin-Streptomycin (Gibco Invitrogen, USA), 1 % sodium pyruvate (Gibco Invitrogen, USA) and maintained at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. To develop the substitute, cells were harvested at P24 and seeded in a specific cell culture chamber (10 million cells in each chamber) for one month with the same supplemented medium and 50 mg/L of ascorbic acid (Sigma Aldrich, USA). The medium was changed every 2 or 3 days.

### ***Scanning Electronic Microscopy (SEM) observations***

After the substitute was removed from the culture chamber, tissue morphology and cell adhesion were observed using SEM (Philips XL30 ESEM-FEG, the Netherlands). The samples were immersed in Rembaum solution (as described in Rajaraman *et al*<sup>41</sup>) for 24 hours, rinsed with de-mineralised water and then coated with gold before observation.

### ***Viability test***

Cell viability was estimated by a Live/Dead® kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, Calcein AM (1µM) and Ethidium homodimer-1 (EthD-1, 1 µM) fluorescent dyes were respectively employed to stain viable and dead cells. The samples were observed using fluorescence microscopy (Leica microsystems, Germany), allowing us to qualitatively determine cell viability and morphology of leaving cells. Holes in the CP granule monolayer were observed with phase contrast. Cell nuclei were counterstained by Hoechst 33342 dye (Invitrogen, USA, 0.5 µg/mL) to estimate the viability rate. Image processing was carried out with the free software CellProfiler ([www.cellprofiler.org](http://www.cellprofiler.org)). Briefly, colour images were converted to greyscale images, then erosion was applied (a morphological operation to separate close nuclei from each other) and cells were counted based on size and intensity of the nuclei. At least 5 areas were randomly chosen for image acquisition on the sheet-like substitute for each group.

### ***Metabolic activity test***

The cell metabolic activity was quantitatively measured with the AlamarBlue® Assay (Invitrogen, USA). One day per week, the culture medium was removed from the culture chamber in a dark room and replaced with culture medium complemented with 10 % of AlamarBlue® solution. The culture chamber was incubated for 45 minutes at 37°C. The complemented medium was then removed and fluorescence intensity was measured (excitation wavelength: 560 nm, emission wavelength: 595 nm). The changes in fluorescence correspond to the biochemical reduction of the AlamarBlue® solution in the culture medium resulting from cell metabolic activity (redox reaction in the mitochondria). The fluorescence intensity of the complemented medium without contact with the cells was subtracted from the results before the analysis.

### ***Differentiation test***

Alkaline phosphatase (ALP) activity, an early marker of osteoblast differentiation, was assessed by a histochemical semi-quantitative approach, using an Alkaline phosphatase kit (Sigma-Aldrich, USA) according to the manufacturer's protocol. Samples were observed with a binocular magnifier (Leica Microsystems, Germany).

An Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit (ELISA kit, Cloud-Clone Corp., USA) for osteocalcin (OCN) was also used according to the manufacturer's protocol to study the late-stage differentiation of samples. Briefly, the culture medium removed from the chambers at day 30 after 24h of incubation was added in a plate pre-coated with an antibody specific to OCN. After incubation with the kit's reagents, color changes were measured with spectrofluorimetry at 450nm and linked to the concentration of OCN with a standard curve. The results were compared to the protein total mass using a standard Bradford assay. Lysis was performed with RIPA buffer (Fisher Scientific, USA), then Coomassie blue was added (Interchim, France) and absorbance was read at 570nm. The standard curve was obtained with bovine serum albumin (Interchim, France).

### ***Stress-strain tests***

Using the Electroforce 3200® system (Bose, USA), conventional tensile tests were conducted on preloaded tissue strips (1 cm x 3 cm) at the speed of 0.1 mm/s until failure. Forces vs displacement were recorded. *In situ* tests were performed with SEM observations and a specific tensile testing machine (Deben Microtest 300, UK), with the same speed and sample's size as standard tensile tests, as a tool for understanding the relationship between the tissue's microstructure and its mechanical properties. In order to spot easily the region of interest, a cutout was made in the middle of the strip before mounting. Displacement was regularly stopped to perform image acquisition of the crack propagation and evaluate damage mechanism.

### ***Statistic tests***

At least six independent experiments were performed for each group (S, M, L, Mix or control), then means and standard deviations were calculated. Two-way analysis of variance

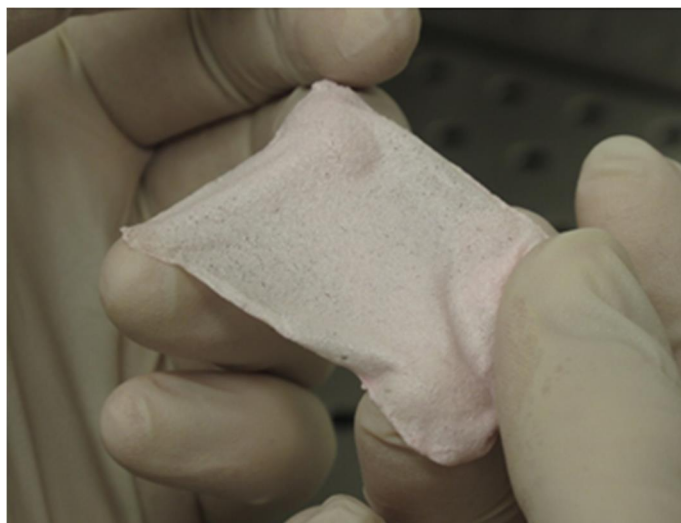
with Tukey's test (metabolic activity) and unpaired t-test (viability, OCN production) were used to define the significance of the results.

### *3) Results*

Cell culture chambers were filled with CP granules of a specific size (S, M, L, Mix) inserted as a monolayer. Ten million MC3T3-E1 cells were seeded in the medium-filled chamber. Cell colonisation was assured via the follow-up of metabolic activity. After a 4-week incubation, each culture chamber was opened to collect the reconstructed tissue.

#### ***Tissue Cohesion***

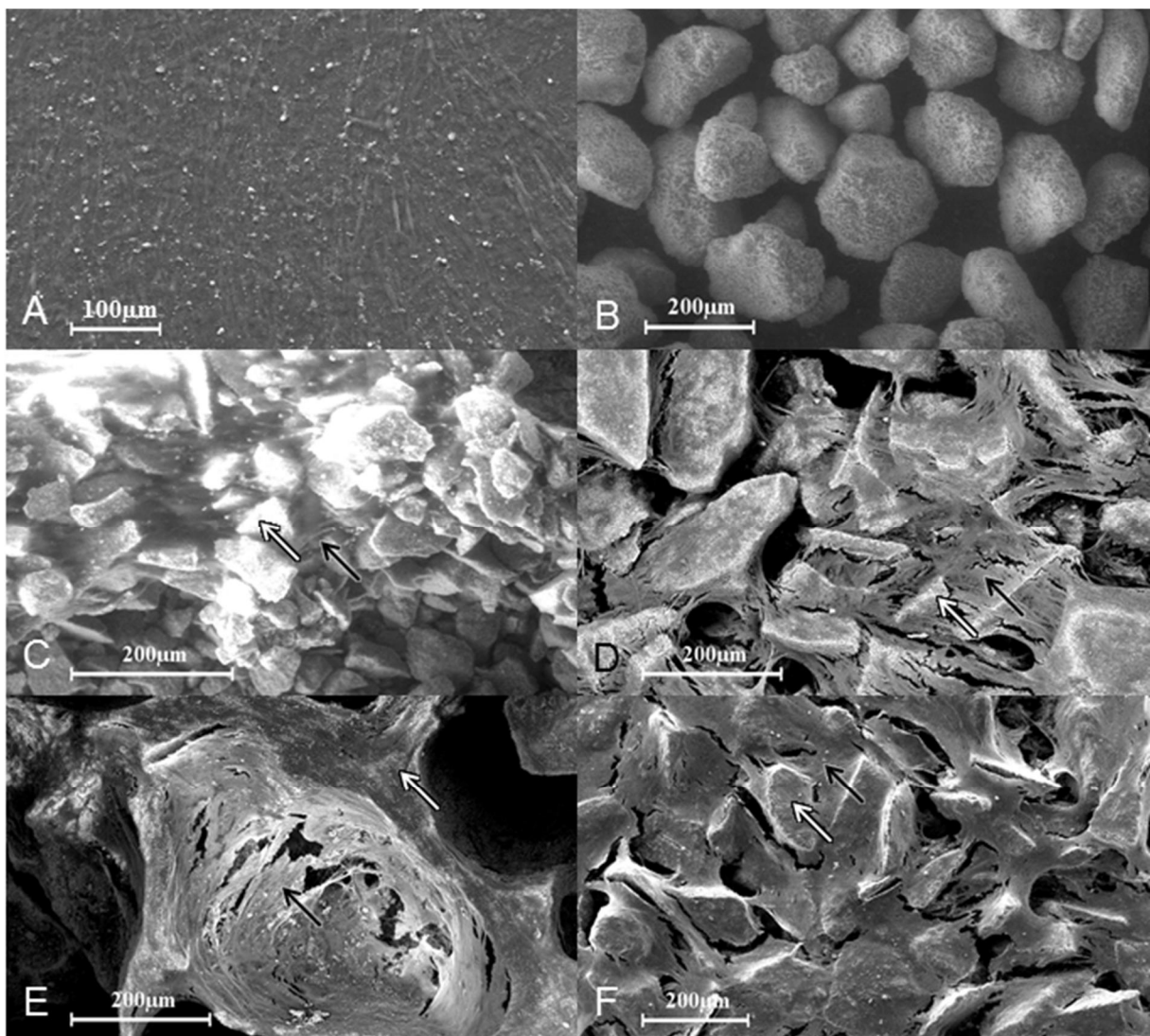
After one month of culture in the chamber, we investigated the possibility of extracting a biohybrid sheet-like substitute made of bone cell tissue and CP granules from the chamber. The most cohesive sheet was the M group: it was possible for the substitute to be stretched or folded and for it to stay cohesive (Fig. 2). The S group offered the most heterogeneous results, with, in some tissue areas, the worst handling (no possibilities for removing the tissue from the chamber) and in other areas a tissue as cohesive as that of the M group. The other groups (L and Mix) had a sheet-like morphology inside the chamber, but the substitute lost its integrity once removed. In the control group (chamber without CP granules), cells organised in a layer that we were not able to remove.



**Figure 2 : Tissue cohesion of the M group's sheet-like substitute removed from the cell culture chamber (cells on 80-200µm calcium phosphate granules after one month of culture).**



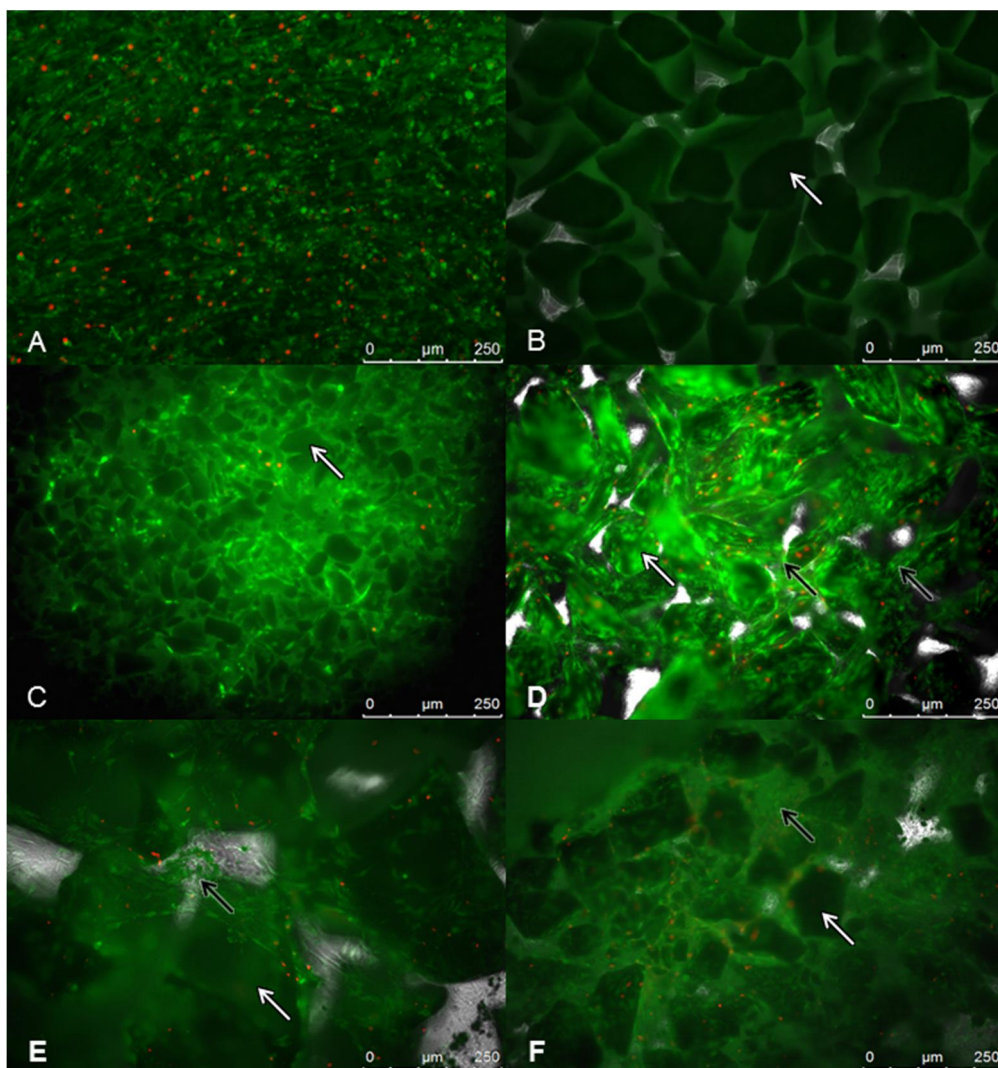
To explain these different tissue cohesions, SEM observations were conducted. The control group (Fig. 3A) showed a dense and continuous cell tissue. CP granules without cells can be seen on fig. 3B. We found the same homogeneous tissue covering the granule monolayer for the M and Mix groups (Fig. 3D, 3F). Concerning the L group, the cells were more likely to attach and grow inside the macroporosity of the granules (Fig. 3E). There was only heterogeneous tissue with cell spots when samples from the S group were observed (Fig. 3C).



**Figure 3 : Scanning Electronic Microscopy observations of the *in vitro*-built tissue after one month of culture. MC3T3 subclone 4 cells (control group, A), CP granules alone (B) and cells on CP granules: S group (C), M group (D), L group (E) and Mix group (F). Two magnifications were used, 250x and 200x. White arrows: CP granules, black arrows: cell tissue covering or bounding together the granules.**

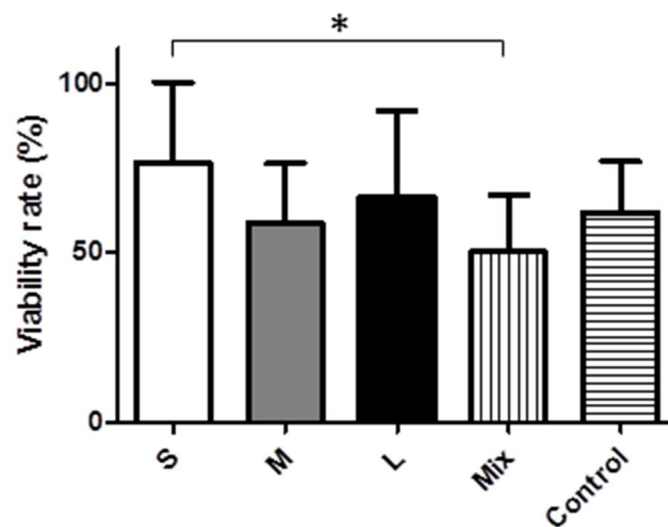
## Cell Viability

We visualised granules colonisation by living cells of each group under fluorescence microscopy using Calcein AM. As seen above with SEM observations, the control group showed a continuous cell tissue (Fig. 4A) that we found also on the CP granule layer for M and Mix groups (Fig. 4D, 4F, CP granules autofluorescence can be seen on fig. 4B). The S group tissue was heterogeneous with only spots of living cells (Fig. 4C). We noticed few cell bridges between granules for the L group (Fig. 4E).



**Figure 4 :** Fluorescence microscopy observations of the *in vitro*-built tissue after one month of culture. MC3T3 subclone 4 cells (control group, A), CP granules alone (B) and cells on CP granules: S group (C), M group (D), L group (E) and Mix group (F). Calcein AM (green) dye stands for living cells membranes and identifies the cell tissue on the CP granules. EthD-1 dye (red dots) stained dead cells nuclei. Holes in the CP granules monolayer appear white, using phase contrast. White arrows: CP granules, black arrows: cell tissue bridges bounding together the granules.

Analysis of fluorescence microscopy images allowed us to evaluate the viability percentage from the ratio between dead cells nuclei (visualised with EthD-1 dye) and all existing nuclei (Hoechst 44432 dye) (Fig. 5). The S and L groups showed the highest viability rates ( $76\pm 24\%$  and  $66\pm 25\%$  respectively), but with relatively high standard deviations due to the heterogeneity of the tissue as seen above. Viability dropped to  $59\pm 18\%$  for the M group and to  $50\pm 17\%$  for the Mix group. Standard deviations were lower than in the S and L groups, due to better homogeneity. However, the viability rates of each group showed values not statistically different from control condition ( $62\pm 15\%$ ), suggesting that the CP granules did not induce specific cell mortality.



**Figure 5 :** Viability rate of each group after one month of culture measured with fluorescence microscopy images treatment: S, M, L, Mix and without CP granules (control). Ratio between the number of dead nuclei seen with EthD-1 dye and all nuclei seen with Hoechst 33342 dye with standard deviations (\*:  $p < 0.05$ ).

### ***Metabolic activity***

The metabolic activity of the cells in each group was investigated once a week throughout the culture period, using the AlamarBlue® assay to evaluate mitochondrial reduction activity. The results, expressed with arbitrary units of the spectrofluorimeter, allowed us to estimate the cell viability and global proliferation of the rebuilt tissue.

In order to show the variation profiles during the culture, data were normalised by the fluorescence intensities recorded on day 7 (Fig. 6). We were so able to highlight changes in the metabolic activity throughout the month of culture and to perform a statistical study. Two main profiles were noticed : on the one hand, S and L groups showed increasing metabolic

activity week after week, with the highest increase for the S group (statistically different from the control group at day 14,  $p < 0.05$  and day 21,  $p < 0.0001$ ). On the other hand, stable profiles were obtained for M and Mix groups, where metabolic activity appeared to remain constant, as it was noticed for the control too.

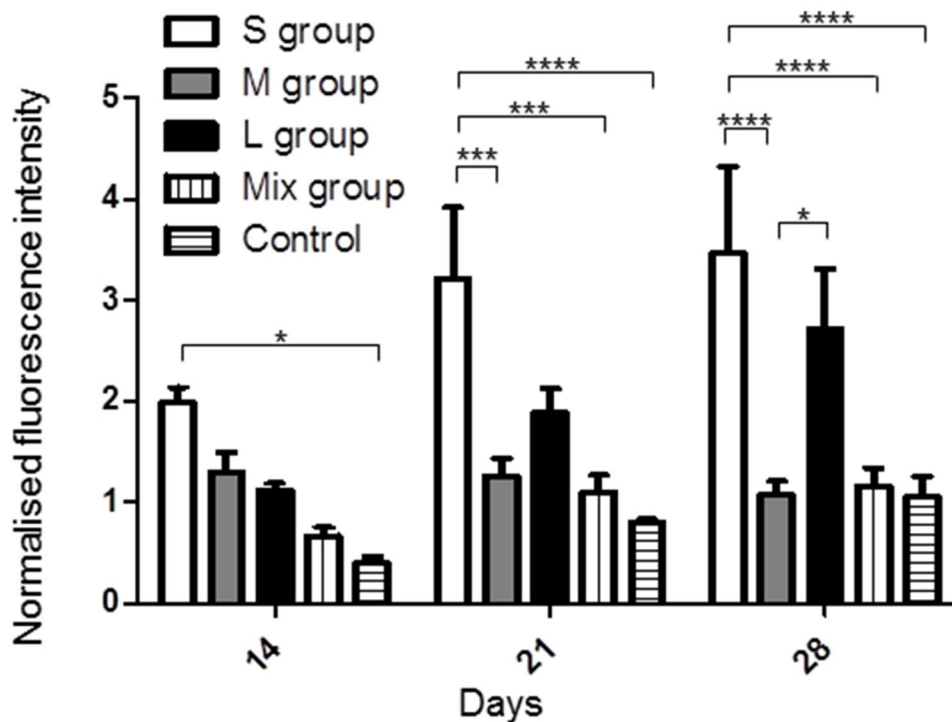


Figure 6 : Metabolic activity for each group measured with Alamar Blue, mean and standard deviation for each group. Data were normalised from the results at day 7 by the spectrofluorimetry arbitrary unit (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).

To explain these two profiles, untreated data were compiled to show the evolution in metabolic activity between the first (Y axis) and the last (X axis) measurements, ie between 7 and 28 days (Fig. 7). For each chamber, data points were included in elliptic domains where the major axis was defined using the linear regression line and the minor axis using the corresponding correlation coefficient (MS Excel software). It appeared that groups previously described with stable metabolic profiles (M and Mix groups) showed higher values of metabolic activity, except for the control group. Especially, most of the points of the M group were located near the diagonal, which means that metabolic activity was stable over time of culture, despite the variability.

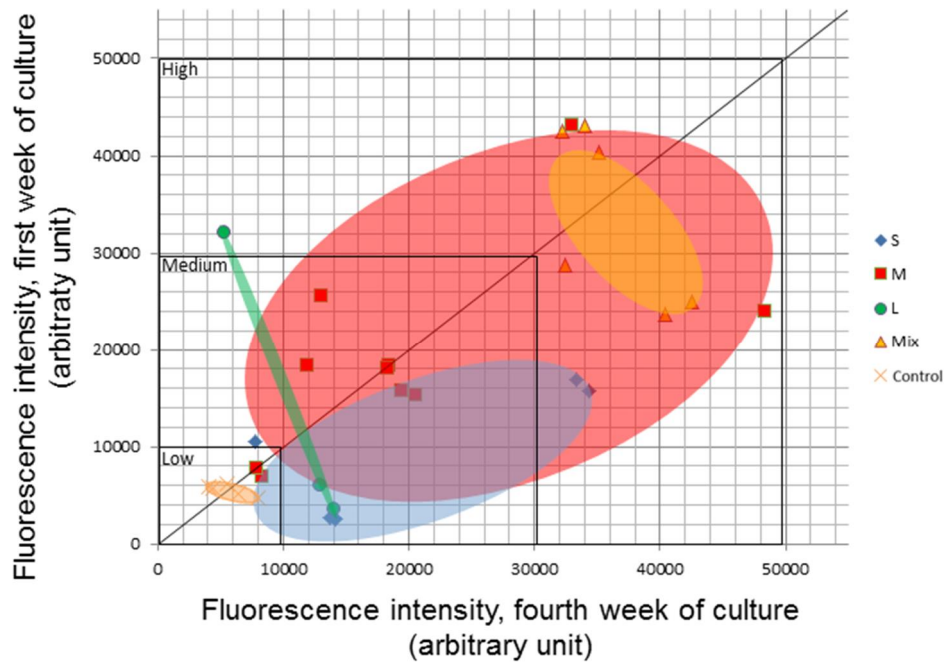


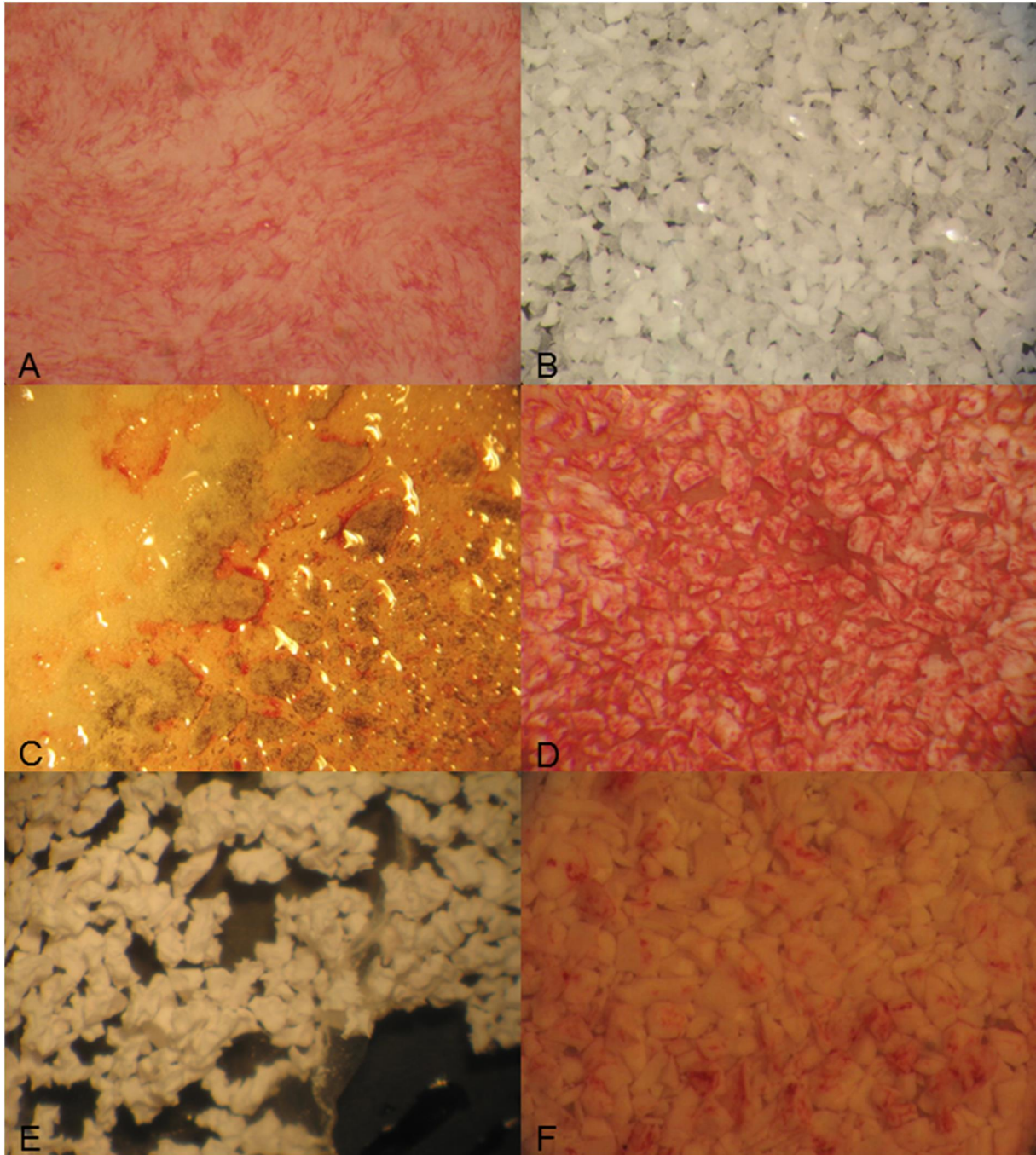
Figure 7 : Metabolic activity for each group measured with Alamar Blue, evolution between the first and the fourth weeks of culture. Decreasing and increasing metabolic activities over time take place respectively in the upper left area and in the lower right area, and data on the  $x=y$  line stand for stable activity. Data points are included in elliptic domains for each group. The major axis of each domain was defined using the linear regression line and the minor axis using the corresponding correlation coefficient (MS Excel software).

## Differentiation

Subclone 4 cells from the preosteoblastic MC3T3-E1 line are not able to produce ALP in conventional culture while they are not totally differentiated into osteoblast cells<sup>38</sup>. This enzyme was therefore a suitable marker for investigating the influence of CP granules size on cell differentiation after one month of culture in the chamber. In addition, staining for ALP activity on the whole sheet-like substitute allowed us to identify the high differentiation areas and to characterise the homogeneity of the tissue.

After staining, the red areas were representative of significant ALP activity, whereas CP granules themselves remained white (Fig. 8B). The control group showed a homogeneous medium staining (Fig. 8A). The differentiation was higher with M group where the presence of 800-200 $\mu$ m CP granules did not create heterogeneity compared to the control (Fig. 8E). A heterogeneous repartition of differentiated cells areas was obtained with the Mix group, in which ALP activity appeared at the edges of the substitute, where the cells were in contact with the chamber's edges (this area can be seen on fig. 8F). The S group's substitutes also

showed heterogeneous areas, with red spots in various locations (Fig. 8C), but without specific repartition. The L group (Fig. 8D) did not show any red areas, indicating that this size of CP granules did not promote the ALP activity.



**Figure 8 : Alkaline phosphatase staining on the *in vitro*-built tissue after one month of culture. MC3T3 subclone 4 cells (control group, A), CP granules (B) and cells on CP granules: S group (C), M group (D), L group (E) and Mix group (F). Red areas stand for alkaline phosphatase expression.**

We investigated then the stage of differentiation of M group's samples, which showed the best results in terms of ALP activity as well as mechanical cohesion. Using ELISA kit and Bradford assay, we were able to detect the production of OCN by the cells inside the culture chamber ( $485 \pm 97$  pg/ $\mu$ g/24h, Fig. 9). This showed that the substitute reached the latest stage of osteoblast differentiation<sup>42</sup>. The same range was found, without significant difference, for the control group ( $554 \pm 120$  pg/ $\mu$ g/24h, Fig. 9), which offered no cohesion as seen above.

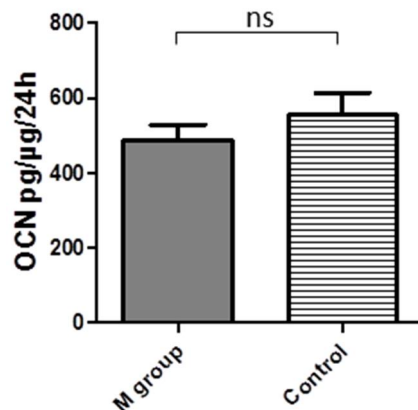


Figure 9 : Osteocalcin production rate at the end of the one-month culture for M and control group (ns = no significant difference). Mass of osteocalcin per mass of total proteins for 24h.

### ***Summary of biological characterisation***

Macroscopic and microscopic observations, along with the biological behaviour described above, are summarised in Table 1. From all the groups, only the M group's substitutes remained cohesive and could be handled without breaking outside of the culture chamber (Fig. 2). The M group showed same levels of ALP activity, OCN production and viability as the control group, and the CP granules homogeneously covered over the whole surface of the monolayer by the cell tissue as well (Fig. 4D). Its stable metabolic activity between the first and fourth week was coherent with the high differentiated state of cells (Fig. 6, 7). Concerning the other groups, it was found that (1) the CP granules were not efficiently bound together by the cell tissue in the L group, because the cells grew inside the pores of the biggest granules (Fig. 3D), that (2) the Mix group's samples revealed heterogeneous ALP activity, with a gradient from the centre of the substitute (no differentiation) to its edges (medium differentiation) (Fig. 8D), and (3) the cell proliferation of the S group's samples was heterogeneous with spots of living cells (Fig. 4C).

Because the sheet-like substitute from the M group was cohesive and could be correctly handled, further studies were performed on this sample to investigate its mechanical behaviour and to establish the relationship between biological response, tissue microstructure and its macroscopic mechanical properties. Despite results close to M group's ones for some biological properties, the other groups were dismissed from the mechanical characterization due to their consistent lack of cohesion.

### ***Mechanical behaviour***

The sheet-like substitute covered a surface area of approximately 24 cm<sup>2</sup> (as seen in Fig. 1), so at least three strips (3 cm by 1.5 cm) of this tissue could be obtained from each culture chamber dedicated to the mechanical study. Conventional tensile tests were performed as described above on 13 samples, leading to an analysis of the maximum stress as a function of strain, the mean breaking strain and the Young's modulus (Fig. 10). As the substitute developed from a single layer of 80-200 μm CP granules, a thickness of 200 μm was hypothesised to estimate the generated stress. The strips reached a maximum mean stress of 34±15 kPa for 28% of strain. The mechanical behaviour appeared to be linear elastic and we could estimate a mean Young's modulus of 160±0.3 kPa for the reconstructed tissue (Fig. 10).

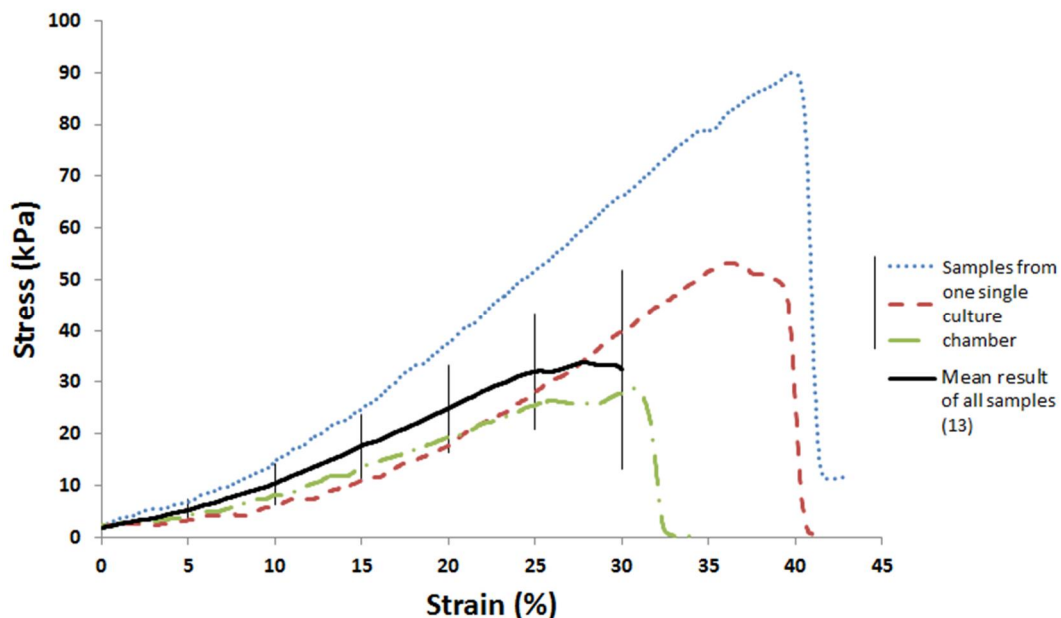
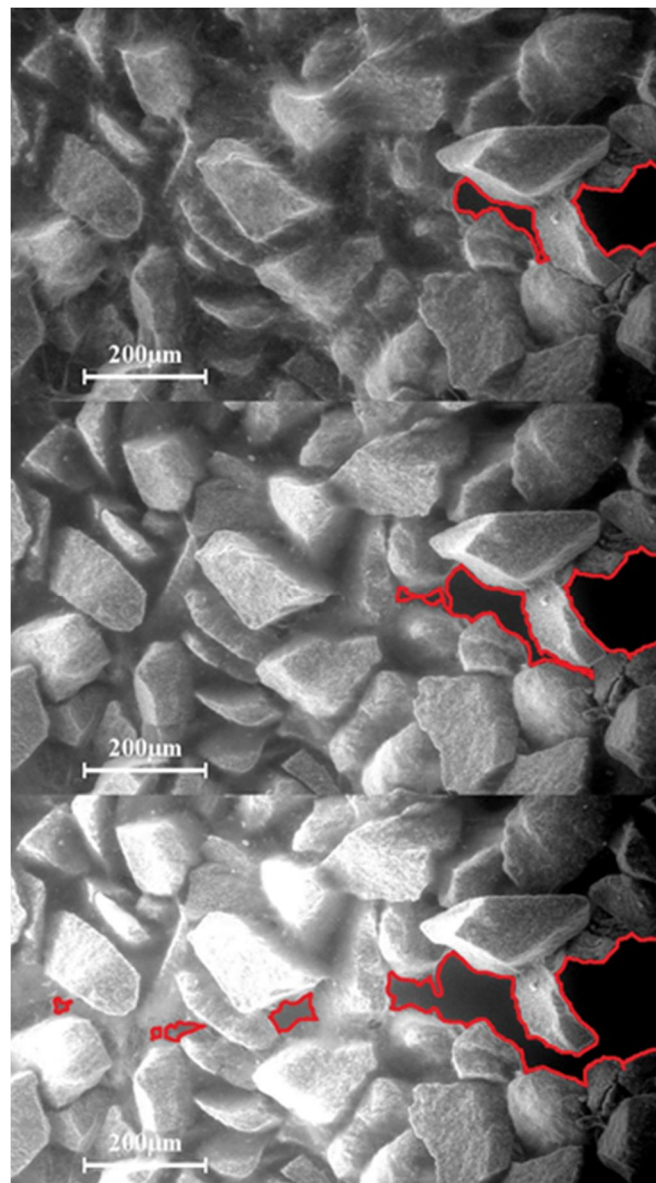


Figure 10 : Measured stresses during tensile tests on *in vitro*-built tissue strips (1.5 cm x 3 cm), depending on the strain. Mean result of 13 samples from 4 culture chambers after one month of culture on 80-200μm CP granules (M group) with standard deviation (black solid line) and results of 3 samples from one single culture chamber (blue, red and green dashed lines). Mean calculation was stopped when the first failure appeared.



*In situ* tensile tests were also performed under SEM, using the specific module Deben Microtest 300 mounted on the SEM device (Philips XL30 ESEM-FEG), in order to observe failure propagation and local damage mechanisms, and more specifically the interactions between the CP granules and bone tissue. This analysis led to the conclusion that the reconstructed tissue presented a strong adhesion between the cellular matrix and the CP granules. Hence, the extracellular matrix (ECM) was identified as the part of the tissue which broke, without any displacement of the granules on either side of the tear (Fig. 11). There was no loosening of the granules within the substitute when tensed.



**Figure 11 : Scanning Electronic Microscopy observations of the *in vitro*-built substitute (M group) during a tensile test, at three different times (from top to bottom). The cell tissue broke (red lines) but the CP granules remained cohesive on both sides of the break.**

#### 4) Discussion

Bone can be affected by a lot of diseases<sup>43</sup> or damage caused by accidents. As previously stated, tissue engineering is considered to be a promising method for improving healthcare and repairs<sup>44</sup>. Our choices in terms of biomaterial, cell culture chamber, and tissue geometry were determined by the clinicians' expectations. CP ceramics are well known for their osteoconduction and osteoinduction properties<sup>10</sup>, especially the hydroxyapatite / tricalcium phosphate compounds<sup>45</sup>. Used as a granule monolayer in a parallelepipedic cell culture chamber, they led to a hybrid bone substitute with a flexible geometry which could be relevant for several clinical fields, for instance maxillofacial surgery: it would be suitable for the small different complex shapes needed in this area. The culture chamber, able to be completely filled with medium and with an adequate surface, was specifically chosen to obtain such a geometry of rebuilt tissue. Moreover, when HA powders are used to fill bone defects, they are usually mixed with other matrices to avoid migration out of the implant region<sup>46</sup>. Because the granules are bound together by the cell tissue, our process could avoid this need of an additional substance.

In this study, we did not expect to mimic the exact mechanical properties of native bone, but we aimed to obtain a cohesive substitute with a relevant shape for clinical issues. The biological and mechanical properties of the *in vitro*-built tissue with different mean diameters of CP granules used as a scaffold were therefore investigated to determine their optimal size. Biological and mechanical behaviours are strongly bound together, with mechanical stimuli playing an important role in bone cell development, known as mechanotransduction<sup>47</sup>. These induced biological modifications in turn modify the mechanical properties of bone with changes in the production of tissue components and cell alignment<sup>47</sup>.

The goal of the global process was to meet clinicians' expectations for both aspects. Changing the mean diameter of the CP granules modified the macroporosity of the monolayer, known to be an important factor for cell attachment and cell viability<sup>48,51</sup>. In particular, for HA/TCP particles, Mankani *et al* investigated *in vivo* bone formation for several size ranges<sup>52</sup>. Bone marrow stromal cells and HA/TCP particles were transplanted into mice for at least 4 weeks, and bone formation was estimated by semi-quantitative

observations and histomorphometric methods. The behaviour of the different groups of rebuilt tissues appeared to be clearly different, showing a strong link between particle size and the properties of the tissue. We observed the same tendency: the M group (80 ó 200 µm) was more suitable for the target shape of a sheet-like substitute than the other ones. It showed homogeneous cell tissue, with CP granules bound together by the ECM, and high and homogeneous differentiation. In addition, it was the only group providing these positive results for all of the biological properties investigated (Table 1), with results closed to control ones in terms of viability, cell tissue morphology and OCN production, but with higher ALP activity and metabolic activity. After removal from the culture chamber and manipulations, M group substitutes remained stable and cohesive. The lack of early development and/or homogeneous renewal noticed in the other groups led to a heterogeneous, non-differentiated and non-cohesive tissue. These results were coherent with the work of Mankani *et al*<sup>52</sup>, who used the same size range as the M group in order to obtain the greatest bone formation.

It should be highlighted that, for the M group, the homogeneous and high differentiation shown by the ALP staining test was achieved with only acid ascorbic, but without other traditional added factors (such as beta-glycerophosphate or dexamethasone<sup>53,54</sup>) or specific differentiation medium, which is actually a common method<sup>2,8,15,18</sup>. Our process, based on a parallelepipedic cell culture chamber and a CP granule monolayer, was thus efficient enough to promote the differentiation of the MC3T3 subclone 4 cells. It has been shown that the use of additional growth factors, such as transforming growth factor beta (TGF- ), bone morphogenetic protein (BMP) or fibroblast growth factors (FGF), may create complications during the clinical step<sup>55</sup>, with the need for accurate and precautionary validation for the patient's safety<sup>56</sup>. For these reasons, our factor-free process seems relevant for both industrial and clinical validations, with further studies needed concerning the use of fetal bovine serum.

Because the M group substitutes were stable and cohesive, we were able to investigate the mechanical properties of the biohybrid tissue. The study of breaking mechanisms under SEM observations showed a complete break but no loosening of the CP granules, which were maintained together by the ECM on both sides of the failure. Quantitatively, it was difficult to estimate which range of maximal stress and strain needs to be targeted. Native bone tissue effectively shows high variability in its mechanical properties *in vivo*, especially due to the constant remodeling<sup>57</sup> and the composite nature of the tissue:

Guilak *et al*<sup>58</sup> found a Young's modulus of 0.6kPa for the cartilage ECM, and Rho *et al*<sup>59</sup> estimated it at 10.4±3.5 GPa for trabecular bone with a mechanical method. During the tensile tests on tissue strips, low stress values (mean stress < 35kPa) and estimated Young's modulus (< 200kPa) were measured. These results showed thus an improvement compared to the ECM alone and the M group's substitutes remained cohesive during manipulations, but these values would not be adequate to avoid failures during clinical operations. For these reasons, the main goal of further studies should be the investigation of a new biomaterial with inherent mechanical resistance before cell growth. Sun *et al*<sup>60</sup> found a Young's modulus of around 15 MPa for a commercial skin tissue matrix. This value could thus be a target threshold for a substitute which would be resistant to handling by the clinician.

The mechanical cohesion showed that our sheet-like bone substitute could meet clinicians' expectations regarding the easy handling issue. The biological behaviour should be confirmed with future *in vivo* trials (subcutaneous then intramuscular implantations on mice to investigate mineralisation and bone integration). Recent *in vivo* studies about calcium phosphate granules used alone without *in vitro* tissue engineering step suggest a relevant response of our substitute<sup>61,62</sup>.

## 5) Conclusion

In this study, we proposed a new bone tissue engineering method based on a CP granule monolayer and a specific cell culture chamber. We showed that our process, with an optimal mean diameter for the granules (80 ó 200 µm), allowed us to generate a sheet-like bone substitute with properties close to clinicians' expectations, especially for maxillofacial applications, such as versatile geometry, flexibility, mechanical resistance and elastic behaviour, without the use of traditional growth factors. It has to be improved in order to guarantee better mechanical cohesion during surgery, but it is a promising construct for *in vivo* trials, which should confirm that it is an adaptable, autologous and factor-free alternative to grafts and biomaterials used alone.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Pierre Layrolle for providing the biomaterials (Biomatlante, Vigneux de Bretagne, France) and for initial discussions, Prof. Bernard

Devauchelle (Head of Maxillofacial Surgery), and the team of Prof. Jean-Pierre Marolleau (Haematology department) at the University Hospital, Amiens, France, for fruitful discussions regarding surgeons' requests and regulations.

This research was supported by the Picardie region and the Equipex FIGURES. This project was co-financed by the European Union and the European Regional Development Fund. Timothée Baudequin acknowledges the financial support of the CNRS and the Collegium INSIS-UTC.

### References

1. Langer, R. and Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **260**, 92066, 1993.
2. Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R. and Petite, H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 72684, 2005.
3. Arrington, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., Bucknell, A. L. and Davino, N. A. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 30069, 1996.
4. Petite, H., Viateau V., Bensaïd W., Meunier A., de Pollak C., Bourguignon M., Oudina K., Sedel L. and Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat. Am.* 9596 963, 2000.
5. Rubin, J. P. and Yaremchuk, M. J. Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery: a comprehensive review of the literature. *Plast. Reconstr. Surg.* **100**, 1336653, 1997.
6. Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **21**, 2529643, 2000.
7. Liu, Y., Lim, J. and Teoh, S.-H. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnol. Adv.* **31**, 6886705, 2013.
8. Szpalski, C., Wetterau, M., Barr, J. and Warren, S. M. Bone tissue engineering: current strategies and techniques - part I: Scaffolds. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **18**, 246657, 2012.

9. Tevlin, R, McArdle, A., Atashroo, D., Walmsley, G. G., Senarath-Yapa, K., Zielins, E. R., Paik, K. J., Longaker, M. T. and Wan, D. C. Biomaterials for Craniofacial Bone Engineering. *J. Dent. Res.*, 2014. [Epub ahead of print]
10. Samavedi, S., Whittington, A. R. and Goldstein, A. S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* **9**, 8037645, 2013.
11. Xu, H. H. K., Zhao, L., Detamore, M. S., Takagi, S. and Chow, L. C. Umbilical cord stem cell seeding on fast-resorbable calcium phosphate bone cement. *Tissue Eng. Part A* **16**, 2743653, 2010.
12. Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J. and Boccaccini, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3413631, 2006.
13. Sabir, M. I., Xu, X. and Li, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *J. Mater. Sci.* **44**, 571365724, 2009.
14. Correia, C., Bhumiratana, S., Yan, L. P., Oliveria, A. L., Gimble, J. M., Rockwood, D., Kaplan, D. L., Sousa, R. A., Reis, R. L., and Vunjak-Novakovic, G.. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. *Acta Biomater.* **8**, 2483692, 2012.
15. Liu, H., Peng, H., Wu, Y., Zhang, C., Cai, Y., Xu, G., Li, Q., Chen, X., Ji, J., Zhang, Y. and OuYang, H. W.. The promotion of bone regeneration by nanofibrous hydroxyapatite/chitosan scaffolds by effects on integrin-BMP/Smad signaling pathway in BMSCs. *Biomaterials* **34**, 4404617, 2013.
16. Park, S. Y., Ki, C. S., Park, Y. H., Jung, H. M., Woo, K. M. and Kim, H. J.. Electrospun silk fibroin scaffolds with macropores for bone regeneration: an in vitro and in vivo study. *Tissue Eng. Part A* **16**, 127169, 2010.
17. Minton, J., Janney, C., Akbarzadeh, R., Focke, C., Subramanian, A., Smith, T., McKinney, J., Liu, J., Schmitz, J., James, P. F. and Yousefi A. M.. Solvent-free

- polymer/bioceramic scaffolds for bone tissue engineering: fabrication, analysis, and cell growth. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1619, 2014. [Epub ahead of print]
18. Fu, H., Rahaman, M. N., Brown, R. F. and Day, D. E. Evaluation of bone regeneration in implants composed of hollow HA microspheres loaded with transforming growth factor  $\beta$  1 in a rat calvarial defect model. *Acta Biomater.* **9**, 5718627, 2013.
  19. Haslauer, C. M., Avery, M. R., Pourdeyhimi, B. and Lobo, E. G. Translating textiles to tissue engineering: Creation and evaluation of microporous, biocompatible, degradable scaffolds using industry relevant manufacturing approaches and human adipose derived stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 2014. [Epub ahead of print]
  20. Shim, J., Huh, J. B., Park, J. Y., Jeon, Y. C., Kang, S. S., Kim, J. Y., Rhie, J. W. and Cho, D. W.. Fabrication of blended polycaprolactone/poly(lactic-co-glycolic acid)/ - tricalcium phosphate thin membrane using solid freeform fabrication technology for guided bone regeneration. *Tissue Eng. Part A* **19**, 317628, 2013.
  21. Gkioni, K., Leeuwenburgh, S. C. G., Douglas, T. E. L., Mikos, A. G. and Jansen, J. A.. Mineralization of Hydrogels for Bone Regeneration. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **16**, 577-85, 2010.
  22. Butscher, A., Bohner, M., Hofmann, S., Gauckler, L. and Müller, R. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. *Acta Biomater.* **7**, 907620, 2011.
  23. Papenburg, B. J, Liu, J., Higuera, G. A., Barradas, A. M. C., de Boer, J., van Blitterswijk, C. A., Wessling, M. and Stamatialis, D.. Development and analysis of multi-layer scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **30**, 6228639, 2009.
  24. Carpentier, B., Layrolle, P. and Legallais, C. Bioreactors for bone tissue engineering. *Int. J. Artif. Organs* **34**, 2596270, 2011.
  25. Rauh, J., Milan, F., Günther, K.-P. and Stiehler, M. Bioreactor systems for bone tissue engineering. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **17**, 263680, 2011.

26. Riehl, B. D., Park, J.-H., Kwon, I. K. and Lim, J. Y. Mechanical stretching for tissue engineering: two-dimensional and three-dimensional constructs. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **18**, 2886300, 2012.
27. Gardel, L. S., Correia-Gomes, C., Serra, A., Gomes, M. E. and Reis, R. L. A novel bidirectional continuous perfusion bioreactor for the culture of large-sized bone tissue-engineered constructs. *J Biomed Mater Res Part B* **101**, 137761386, 2013.
28. Bignon, A., Chouteau, J., Chevalier, J., Fantozzi, G., Carret, J. P., Chavassieux, P., Boivin, G., Melin, M. and Hartmann, D.. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **14**, 1089697, 2003.
29. Gauthier, O., Bouler, J. M., Aguado, E., Pilet, P. and Daculsi, G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* **19**, 13369, 1998.
30. Mastrogiacomo, M., Scaglione, S., Martinetti, R., Dolcini, L., Beltrame, F., Cadedda, R. and Quarto, R.. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* **27**, 323067, 2006.
31. Albrektsson, T. and Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 966101, 2001.
32. Kneser, U., Schaefer, D. J., Polykandriotis, E. and Horch, R. E. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J. Cell. Mol. Med.*, 2006.
33. Kaully, T., Kaufman-Francis, K., Lesman, A. and Levenberg, S. Vascularization - the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **15**, 159669, 2009.
34. Salter, E., Goh, B., Hung, B., Hutton, D., Ghone, N. and Grayson W. L.. Bone tissue engineering bioreactors: a role in the clinic? *Tissue Eng. Part B. Rev.* **18**, 62675, 2012.
35. Carpentier, B. Development, characterization and optimization of a bioreactor-based system dedicated to the production of bone graft substitutes [thesis]. *Biomechanics and Bioengineering Laboratory, University of Technology of Compiègne*, 2009.



36. Chang, K. C., Chang, C. C., Chen, W. T., Hsu, C. K., Lin, F. H. and Lin, C. P.. Development of calcium phosphate/sulfate biphasic cement for vital pulp therapy. *Dent. Mater.* **169**, 2014. [Epub ahead of print]
37. Krebsbach, P. H., Kuznetsov, S. A. and Satomura, K. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* **63**, 1059-69, 1997.
38. Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H. and Franceschi, R. T.. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 893-903, 1999.
39. Pandit, V., Zuidema, J. M., Venuto, K. N., Macione, J., Dai, G., Gilbert, R. J. and Kotha, S. P.. Evaluation of Multifunctional Polysaccharide Hydrogels with Varying Stiffness for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part A* **19**, 2013.
40. Visser, R., Arrabal, P. M., Santos-Ruiz, L., Fernandez-Barranco, R., Becerra, J. and Cifuentes, M.. A Collagen-Targeted Biomimetic RGD Peptide to Promote Osteogenesis. *Tissue Eng. Part A* **20**, 34644, 2014.
41. Rajaraman, R., Rounds, D. E., Yen, S. P. S. and Rembaum, A. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp. Cell Res.* **88**, 327-339, 1974.
42. Aubin, J. E., Liu, F., Malaval, L. and Gupta, A. K. Osteoblast and Chondroblast Differentiation. **17**, 1995.
43. Rodan, G. A. Therapeutic Approaches to Bone Diseases. *Science (80-. )*. **289**, 1508-1514, 2000.
44. Payne, K. F. B., Balasundaram, I., Deb, S., Di Silvio, L. and Fan, K. F. M. Tissue engineering technology and its possible applications in oral and maxillofacial surgery. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **52**, 7615, 2014.
45. Daculsi, G., Laboux, O., Malard, O. and Weiss, P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **14**, 195-200, 2003.

46. Roveri, N. and Palazzo, B.. Hydroxyapatite Nanocrystals as Bone Tissue Substitute. In: Kumar, C. S. S. R., eds. *Nanotechnologies for the Life Sciences Volume 9*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007, pp 2836307.
47. Mullender, M., El Haj, A. J., Yang, Y., van Duin, M. A., Burger, E. H. and Klein-Nulend, J.. Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue. *Med. Biol. Eng. Comput.* **42**, 14621, 2004.
48. Hing, K. A. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2**, 1846199, 2005.
49. Bigerelle, M., Giljean, S. and Anselme, K. Existence of a typical threshold in the response of human mesenchymal stem cells to a peak and valley topography. *Acta Biomater.* **7**, 3302611, 2011.
50. Itälä, A. I., Ylänen, H. O., Ekholm, C., Karlsson, K. H. and Aro, H. T. Pore diameter of more than 100  $\mu\text{m}$  is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.* **58**, 679683, 2001.
51. Jones, A. C., Arns, C. H., Hutmacher, D. W., Milthorpe, B. K., Sheppard, A. P. and Knackstedt, M. A.. The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials* **30**, 1440651, 2009.
52. Mankani, M. H., Kuznetsov, S. A., Fowler, B., Kingman, A. and Robey, P. G. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 966107, 2001.
53. Yan, X. Z., Yang, W., Yang, F., Kersten-Niessen, M., Jansen, J. A. and Both, S. K.. Effects of Continuous Passaging on Mineralization of MC3T3-E1 Cells with Improved Osteogenic Culture Protocol. *Tissue Eng. Part C. Methods* **20**, 1986204, 2014.
54. Stern, A. R., Stern, M. M., van Dyke, M. E., Jähn, K., Prideaux, M. and Bonewald L. F.. Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice. *Biotechniques* **52**, 361673, 2012.

55. Woo, E. J. Adverse events after recombinant human BMP2 in nonspinal orthopaedic procedures. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **471**, 1707611, 2013.
56. Lieberman, J. R., Daluiski, A. and Einhorn, T. A. The Role of Growth Factors in the Repair of Bone. *J. Bone Jt. Surg.* **84**, 103261044, 2006.
57. Butler, D. L., Goldstein, S. A. and Guilak, F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J. Biomech. Eng.* **122**, 57065, 2000.
58. Guilak, F., Jones, W. R., Ting-Beall, H. P. and Lee, G. M. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 59670, 1999.
59. Rho, J. Y., Ashman, R. B. and Turner, C. H. Young's modulus of trabecular and cortical bone material: Ultrasonic and microtensile measurements. *J. Biomech.* **26**, 1116119, 1993.
60. Sun, W. Q. and Gouk, S.-S. Aging of a regenerative biologic scaffold (AlloDerm native tissue matrix) during storage at elevated humidity and temperature. *Tissue Eng. Part C. Methods* **15**, 23631, 2009.
61. Cordonnier, T., Langonné, A., Corre, P., Renaud, A., Sensebé, L., Rosset, P., Layrolle, P. and Sohier, J. Osteoblastic differentiation and potent osteogenicity of three-dimensional hBMSC-BCP particle constructs. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **8**, 364676, 2014.
62. Brennan, M., Renaud, A., Amiaud, J., Rojewski, M. T., Schrezenmeier, H., Heymann, D., Trichet, V. and Layrolle, P. Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 114, 2014.

### III. Données complémentaires

#### 1) Répartition de la taille des granules de diamètre minimal

##### Résultats

Les données du fabricant annoncent, pour le groupe S, une taille moyenne de granules de phosphate de calcium « inférieure à 80  $\mu\text{m}$  ». Afin d'affiner la compréhension de la réponse cellulaire sur les différents granules utilisés, la répartition exacte des tailles au sein de ce groupe a été étudiée. Les résultats sont reportés sur la Figure 27.

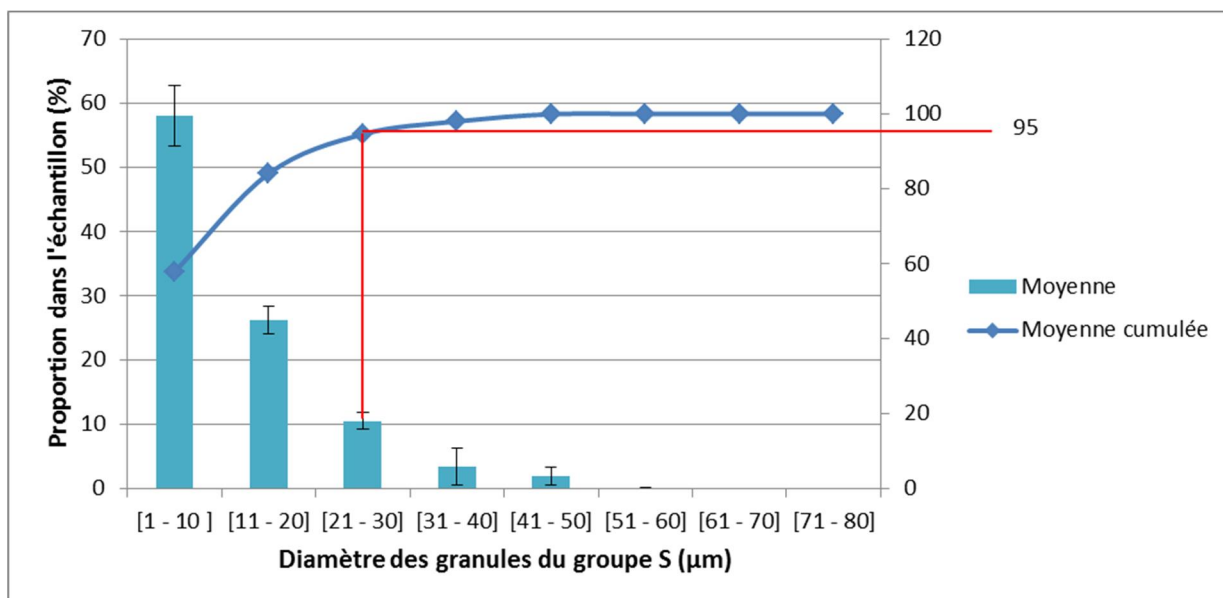


Figure 27 : Répartition de la taille des granules de phosphate de calcium au sein du groupe S

La majorité (près de 58%) des granules présentent un diamètre inférieur à 10  $\mu\text{m}$ . La répartition est ensuite inversement proportionnelle à la taille, de 26 % de granules [11-20]  $\mu\text{m}$  jusqu'à 2% de [41-50]  $\mu\text{m}$ . Leur faible nombre ne permet pas d'en rendre compte sur la figure, mais des granules ont été détectés pour les 3 diamètres supérieurs (respectivement 0.07, 0.006 et 0.004% pour [51-60], [61-70] et [71-80]  $\mu\text{m}$ ). Au total, 95% des granules mesurés se situaient sous la barre des 30  $\mu\text{m}$  de diamètre.

## ***Discussion***

Après vérification, le groupe S est bien composé de granules ayant une taille inférieure à 80  $\mu\text{m}$ , mais cette appellation apparaît assez imprécise. En effet, dans 95% des cas, le diamètre est même inférieur à 30  $\mu\text{m}$ . Il existe donc un écart important avec la taille du groupe directement supérieur (groupe M, 80-200  $\mu\text{m}$ ). Cette information éclaire les résultats obtenus lors de la culture, qui montraient une différence nettement significative de comportement entre les deux groupes, notamment en termes d'homogénéité, d'activité métabolique et de cohésion mécanique. Ces variations importantes s'expliquent donc par des tailles de granules éloignées.

## ***2) Essais de traction sous microscopie électronique à balayage***

### ***Illustrations complémentaires et commentaire***

La Figure 28 présente la propagation d'une fissure le long du substitut reconstruit, imagée par microscopie électronique à balayage au cours d'un essai de traction. Ces illustrations complètent la figure 11 de l'article présenté plus haut. La rupture du tissu est ici observée à un grossissement plus important (x500). La stabilité mécanique des granules, maintenus ensemble par le tapis cellulaire et immobiles les uns par rapport aux autres de part et d'autre de la fissure, est confirmée : la composante vivante se déchire progressivement sans qu'il y ait un descellement du matériau.

## **IV. Conclusions**

La culture d'une lignée de préostéoblastes sur un scaffold composé d'une monocouche de granules de CP a permis de montrer qu'il était possible d'obtenir un substitut osseux sous forme de feuillet. La comparaison entre plusieurs diamètres moyens de granules a établi l'existence d'une taille optimale, pour laquelle le feuillet a pu être manipulé et caractérisé mécaniquement.

Si cette forme s'est avérée pertinente sous de nombreux aspects pour satisfaire les attentes spécifiques des chirurgiens, il ne s'agissait encore que d'une étape préparatoire

éloignée de l'application clinique, notamment par l'utilisation d'une lignée murine déjà engagée sur la voie osseuse. Afin de se rapprocher des conditions finales d'utilisation et de répondre au besoin de vascularisation, une autre vague d'expérimentation basée sur une coculture de cellules primaires humaines a été menée.

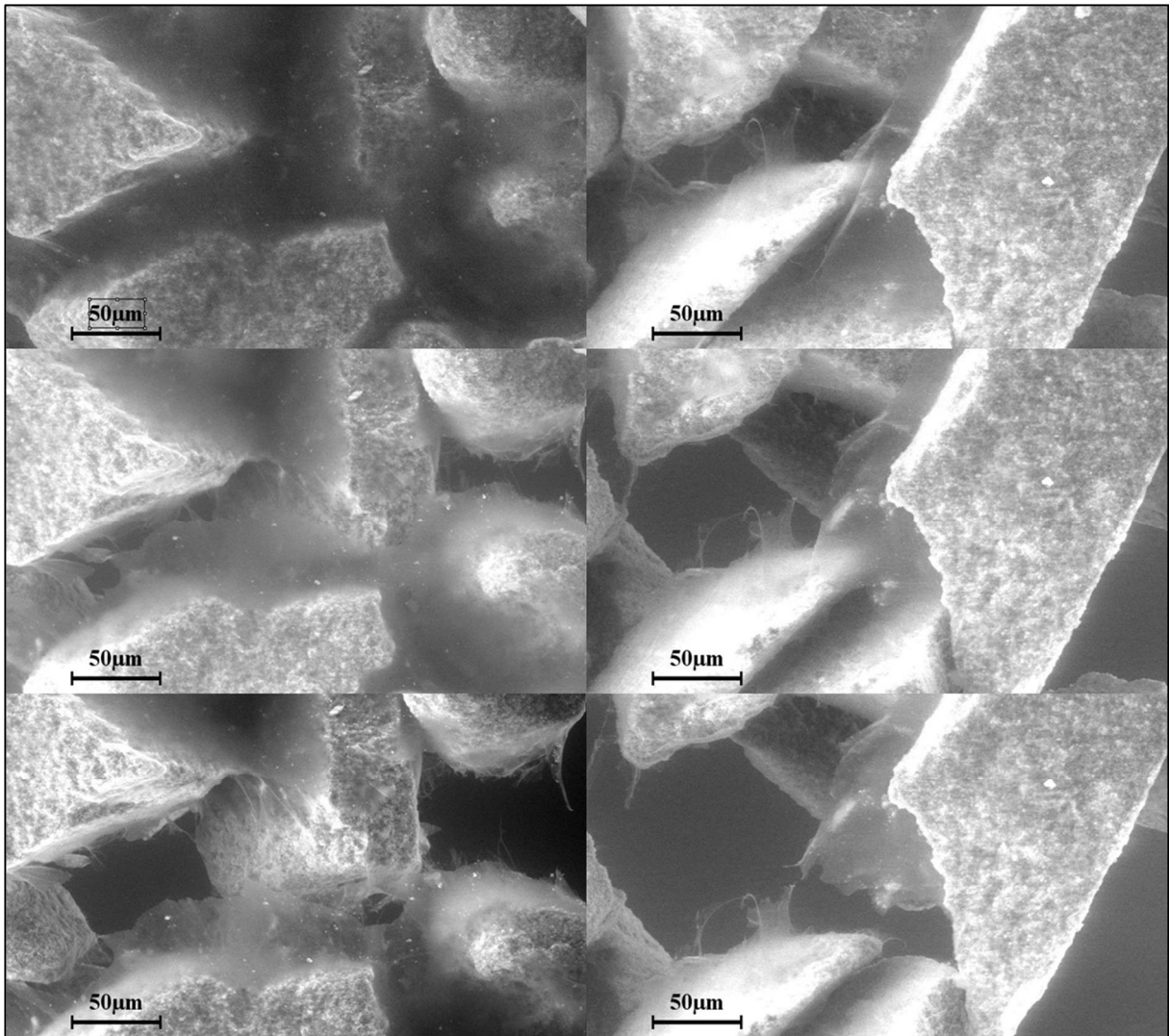


Figure 28 : Substitut reconstruit visualisé par microscopie électronique à balayage au cours d'essais de tractions (x500). Progression de la fissure (de haut en bas) pour deux échantillons différents (gauche et droite).

# Chapitre 4 : Coculture de cellules primaires humaines sur granules de phosphate de calcium

---

# Chapitre 4 : Coculture en bioréacteur de cellules primaires humaines sur granules de phosphate de calcium

## **I. Introduction**

Les résultats présentés dans ce chapitre détaillent l'adaptation du procédé d'obtention d'un substitut osseux sous forme de feuillet, présenté plus haut, à la culture de cellules souches primaires d'origine humaine. Ces dernières sont obtenues à partir d'excès de dons de moelle osseuse réalisés au CHU d'Amiens et sont sélectionnées et amplifiées sur place avant leur utilisation à l'Université de Technologie de Compiègne. Mésoenchymateuses, elles sont donc capables de se différencier en ostéoblastes, comme cela a été détaillé au chapitre 1. L'ensemble des travaux présentés ci-après a donc été obtenu en étroite collaboration avec l'équipe du Professeur Marolleau, principalement les chercheurs post-doctorants Dr. Sébastien Dupont puis Dr. Marie Naudot. Les informations sur le consentement des donneurs et l'obtention des cellules primaires sont rapportées au chapitre 2.

Nous avons vu, un des enjeux de l'ingénierie tissulaire est d'obtenir des substituts dont la vascularisation pourra être efficacement assurée après implantation, ce qui constitue fréquemment une limite des biomatériaux utilisés seuls. Nous avons choisi d'améliorer cet aspect en ayant recours à une coculture des CSM avec des cellules endothéliales, dans le but de faciliter la néovascularisation du feuillet. Cette coculture présente également l'avantage d'amener une synergie entre les réponses cellulaires des populations osseuses et endothéliales menant au développement d'un substitut minéralisé et fonctionnel. Ce second type cellulaire étant lui aussi d'origine humaine (sang de cordon), cette étude est pertinente pour faire un nouveau pas vers la perspective d'application clinique.

On s'intéressera ci-après aux résultats obtenus au cours d'expérimentations préliminaires validant l'utilisation des CSM au sein du même bioréacteur parallélépipédique, avant de vérifier la faisabilité de l'addition de cellules endothéliales, le tout aboutissant à la mise en place d'un protocole final de coculture en cassette. Les données obtenues sur des échantillons issus de 6 donneurs différents seront ensuite rapportées et discutées.



## II. Cultures préliminaires et mise au point de la coculture

Les travaux présentés dans cette partie sont rapportés par ordre chronologique afin de détailler les analyses successives ayant conduit à la préparation d'un protocole complet de coculture en cassette.

### 1) Faisabilité de la culture de CSM en cassette

#### ***Influence de la densité d'ensemencement***

Ce tout premier essai de culture de cellules souches mésenchymateuses en cassette avait pour objectif d'en vérifier la faisabilité, c'est-à-dire essentiellement de constater leur survie et leur activité métabolique au cours et à l'issue du mois de culture. Il comportait donc un nombre réduit d'échantillons et de conditions d'expérimentation sur des cellules provenant d'un même donneur :

- Deux cassettes ensemencées de 2 millions de CSM avec un milieu de culture sans facteurs de différenciation,
- Une cassette ensemencée de 2 millions de CSM avec un milieu de culture de différenciation,
- Une cassette ensemencée de 4 millions de CSM avec un milieu de culture de différenciation.

Les autres paramètres étaient communs au groupe optimal identifié par la culture de cellules de lignée en termes de durée (4 semaines), de quantité et de taille de granules (400mg, 80-200  $\mu$ m).

#### ***Résultats***

La morphologie des feuillets dès le lendemain de l'ensemencement a permis de constater l'adhésion des cellules, qui modifiaient la structure du lit de granules. Cela était particulièrement visible pour la haute densité d'ensemencement (Figure 29). Cependant, à terme, la couche de granules présentait parfois des trous fragilisant la structure entière, sans que cela soit relié à l'utilisation d'une densité d'ensemencement ou d'un milieu particulier. La Figure 30 rapporte l'activité métabolique mesurée dans les cassettes à J14. Celle-ci apparaît

plus importante que le témoin sans cellule dans chaque cassette, traduisant la présence et donc la survie des cellules.

Ces données ont été confirmées par l'étude de l'activité PAL (Figure 31) et de l'expression des gènes liés à la lignée osseuse (runx2, Osterix, PAL, OCN, Figure 32) à J28. Leur détection a été possible, ce qui constitue l'information principale recherchée ici. Ces résultats préliminaires suggèrent une possible augmentation de l'expression dans les cassettes utilisant du milieu de différenciation (PAL et Osterix principalement), l'influence de la densité d'ensemencement ne faisant quant à elle émerger aucune tendance.

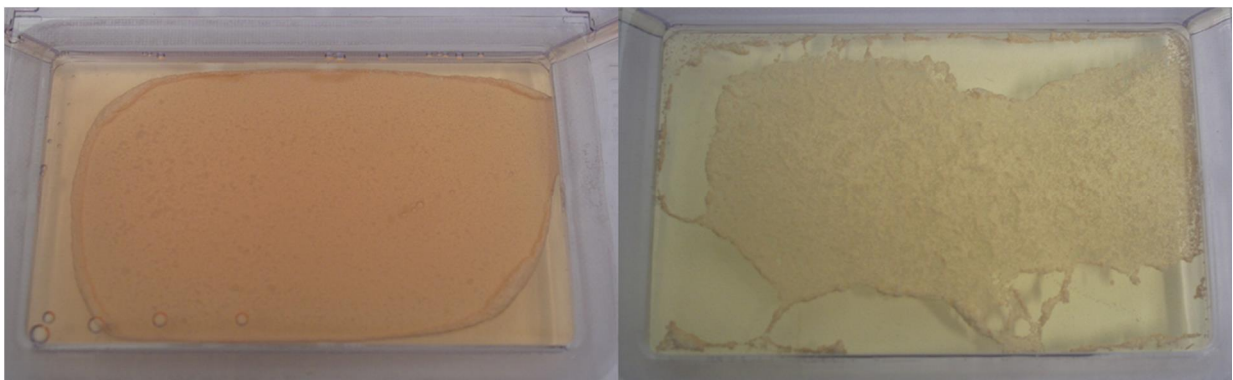


Figure 29 : Morphologie des feuillets observée après 24h de culture (gauche, CSM différenciées, 4 millions de cellules) et après un mois (droite, CSM, 2 millions de cellules).

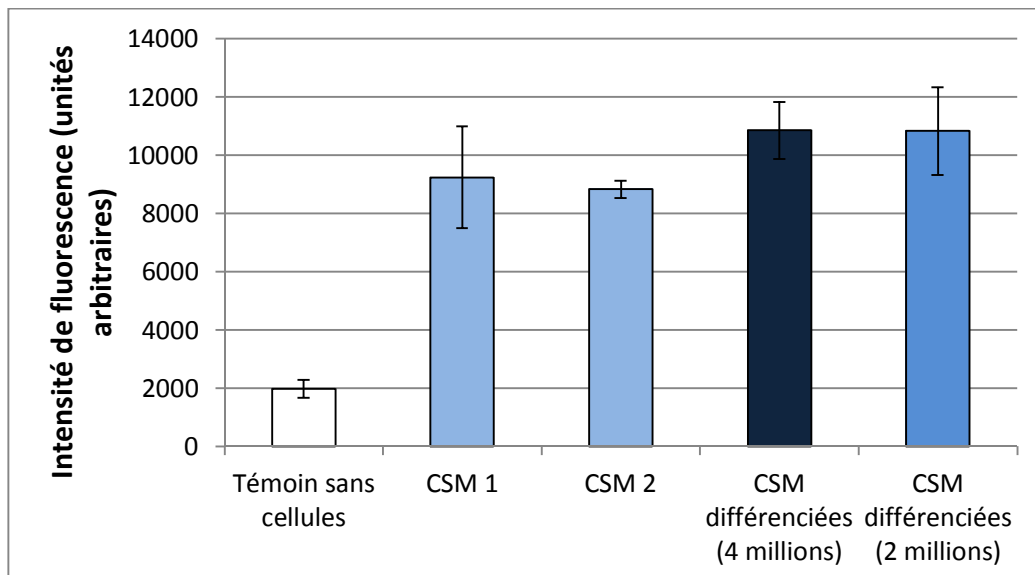


Figure 30 : Activité métabolique mesurée par Alamar Blue dans les cassettes à J14. CSM = cellules cultivées dans du milieu général, CSM différenciées = cellules cultivées dans du milieu de différenciation.

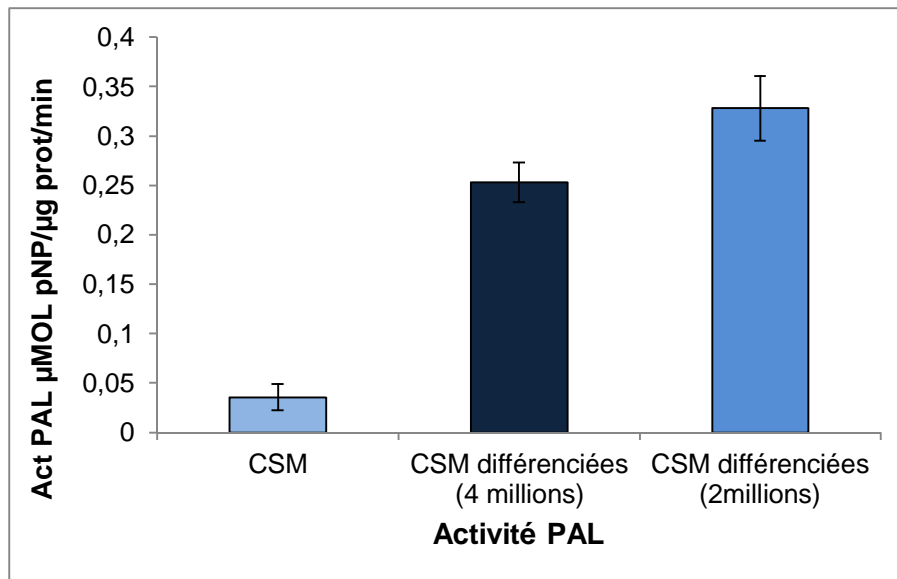


Figure 31 : Activité PAL à l'issue d'un mois de culture en cassette de CSM différenciées ou non (moyenne et écart-type des réplicats techniques).

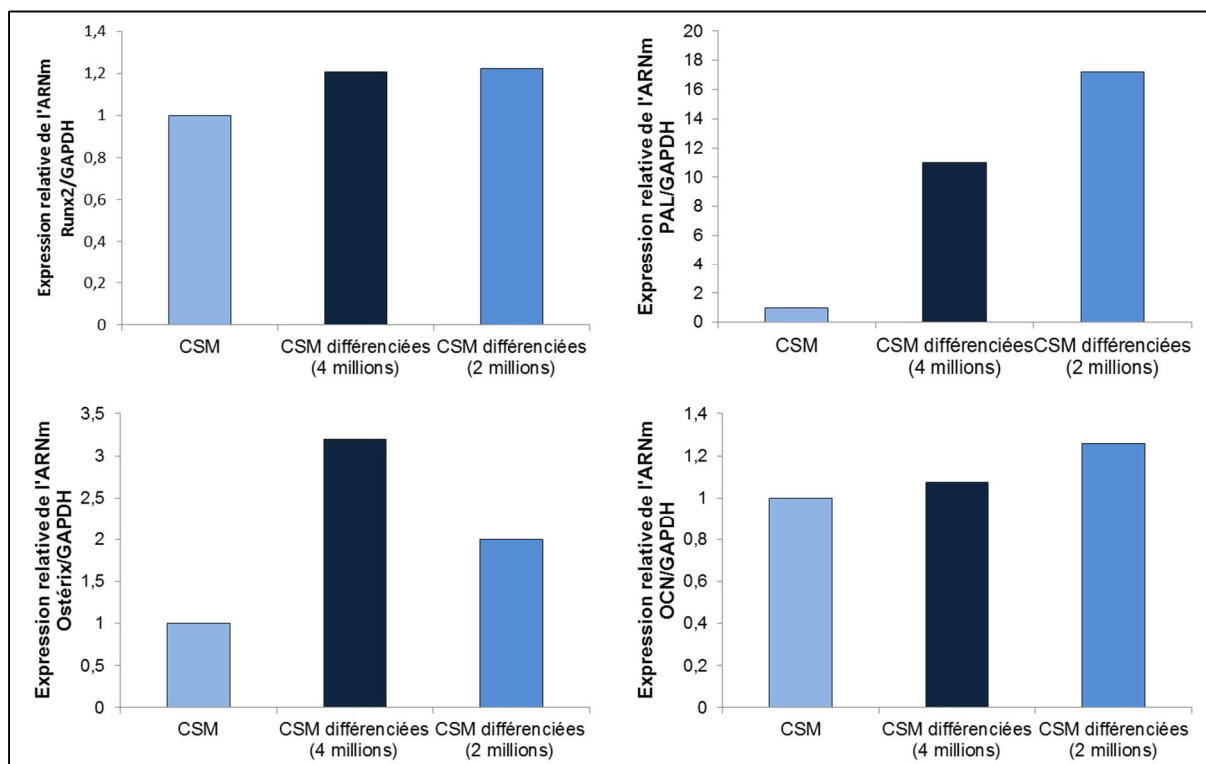
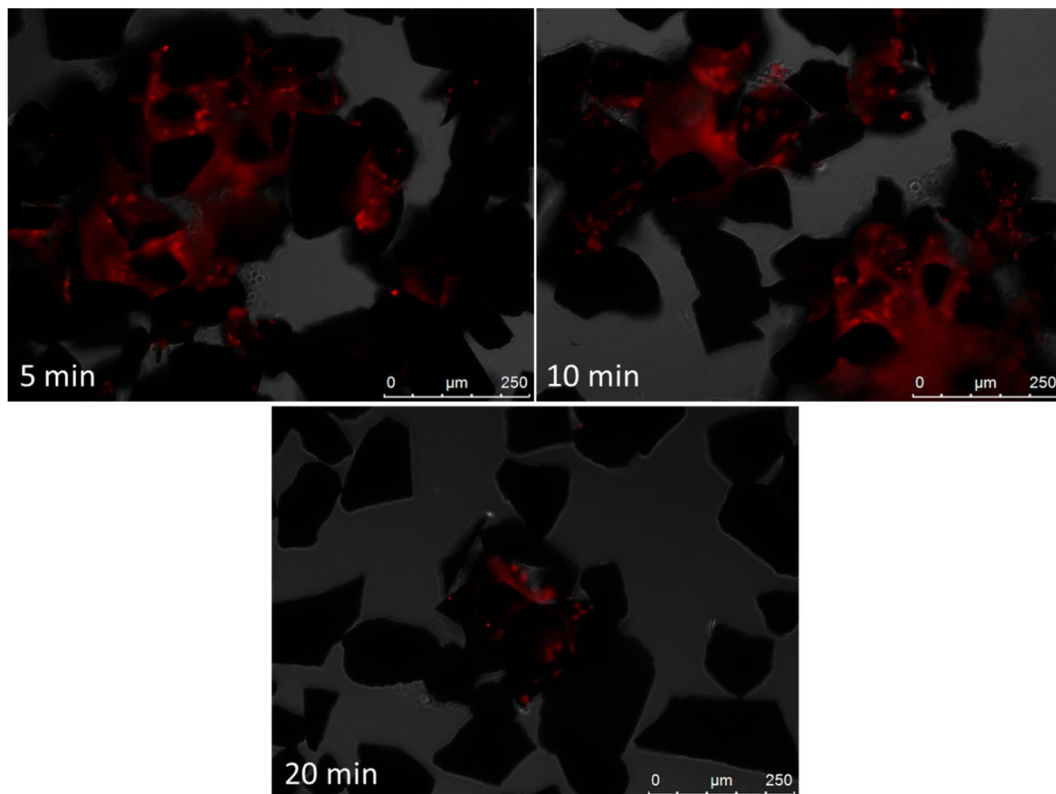


Figure 32 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse à l'issue d'un mois de culture en cassette de CSM différenciées ou non.

Afin d'évaluer les autres analyses biologiques réalisables, des essais de trypsination (dissociation des cellules) sur les échantillons à terme ont été réalisés. Trois différents temps d'incubation en présence de l'enzyme ont été testés avant que les substituts ne soient passés au tamis, de façon à isoler les granules : la présence de cellules résiduelles n'ayant pas été

efficacement détachées du scaffold pouvait alors être étudiée. Les résultats de la visualisation de ces échantillons par microscopie à fluorescence sont présentés sur la Figure 33. La présence d'un nombre important de cellules (noyau marqué en rouge) pour des temps inférieurs à 20 minutes souligne le besoin d'un temps d'incubation long par rapport aux conditions de culture classique en flasque (5 minutes). Quatre fois supérieur, il a été envisagé que celui-ci pouvaient endommager les cellules et que la technique était donc à éviter pour des analyses visant à conserver l'intégrité du tissu vivant.



**Figure 33 : Marquage fluorescent des noyaux des CSM toujours présentes après trypsination des feuillets reconstruits, pour différents temps d'incubation.**

### ***Discussion***

Le premier mois de culture de CSM dans les conditions d'obtention du feuillet a permis de valider la faisabilité du protocole : les cellules étaient capables d'adhérer et de proliférer (apparition du feuillet, recouvrement des granules), d'être actives (mesure de l'activité métabolique et l'activité PAL) et de survivre jusqu'au terme en un nombre suffisant pour assurer la détection de l'expression de gènes d'intérêt. Si le faible nombre de réplicats n'a

permis aucune analyse significative, ceux-ci ont tout de même suggéré l'importance du milieu de différenciation, ce dont n'avaient pas besoin les cellules de lignées, déjà orientées sur la voie ostéoblastique. Les deux densités d'ensemencement ayant permis la détection des marqueurs, un nombre de cellules réduit a été choisi par souci d'économie, le nombre d'échantillons disponibles et leur potentiel de prolifération étant incertains en fonction des dons.

La dissociation du feuillet est apparue difficilement réalisable dans des conditions optimales (temps nécessaire supérieur à 20 minutes) assurant l'intégrité des cellules. Les études suivantes devraient donc être établies en prenant en compte cet aspect, ce qui les oriente vers des analyses nécessitant une lyse complète (et donc la destruction) des cellules.

Enfin, les feuillets présentaient à terme un manque de cohésion mécanique empêchant leur retrait d'une seule pièce de la cassette. Des trous sont apparus dans le lit de granules, ces derniers étant regroupés par le tissu vivant, comme cela avait été constaté par Benoît Carpentier lors de la culture de cellules primaires de rats<sup>195</sup>.

### ***Influence de la masse de granules***

Suite à ces premières indications, il a été émis l'hypothèse qu'une quantité légèrement supérieure de matériau pouvait limiter l'apparition des trous dans le lit de granules et ainsi apporter la stabilité mécanique aux feuillets. Une seconde vague de culture a donc été réalisée pour deux groupes de cassettes comportant respectivement 400mg (cas général) et 600mg de granules de phosphate de calcium, en conservant les mêmes témoins.

### ***Résultats***

La morphologie des échantillons après 4 semaines a été modifiée par la masse de granules. L'apparition d'un feuillet avec de nombreux trous a été retrouvée dans les cas 400mg, alors que les cas 600mg ont conservé un lit plus complet mais sans pouvoir distinguer la formation du tissu cellulaire. Des granules étaient encore en mouvement à l'issue du mois de culture et le nombre de cellules vivantes trop faible pour mener d'autres analyses.

L'expression des gènes a en revanche pu être étudiée sur les cassettes 400mg (Figure 34). L'utilisation du milieu de différenciation a augmenté significativement ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ) les

gènes liés au facteur de transcription runx2 et à la production de PAL. Les résultats de collagènes 1a1 et 1a2 suggèrent également une augmentation non validée statistiquement au cours de ce second essai.

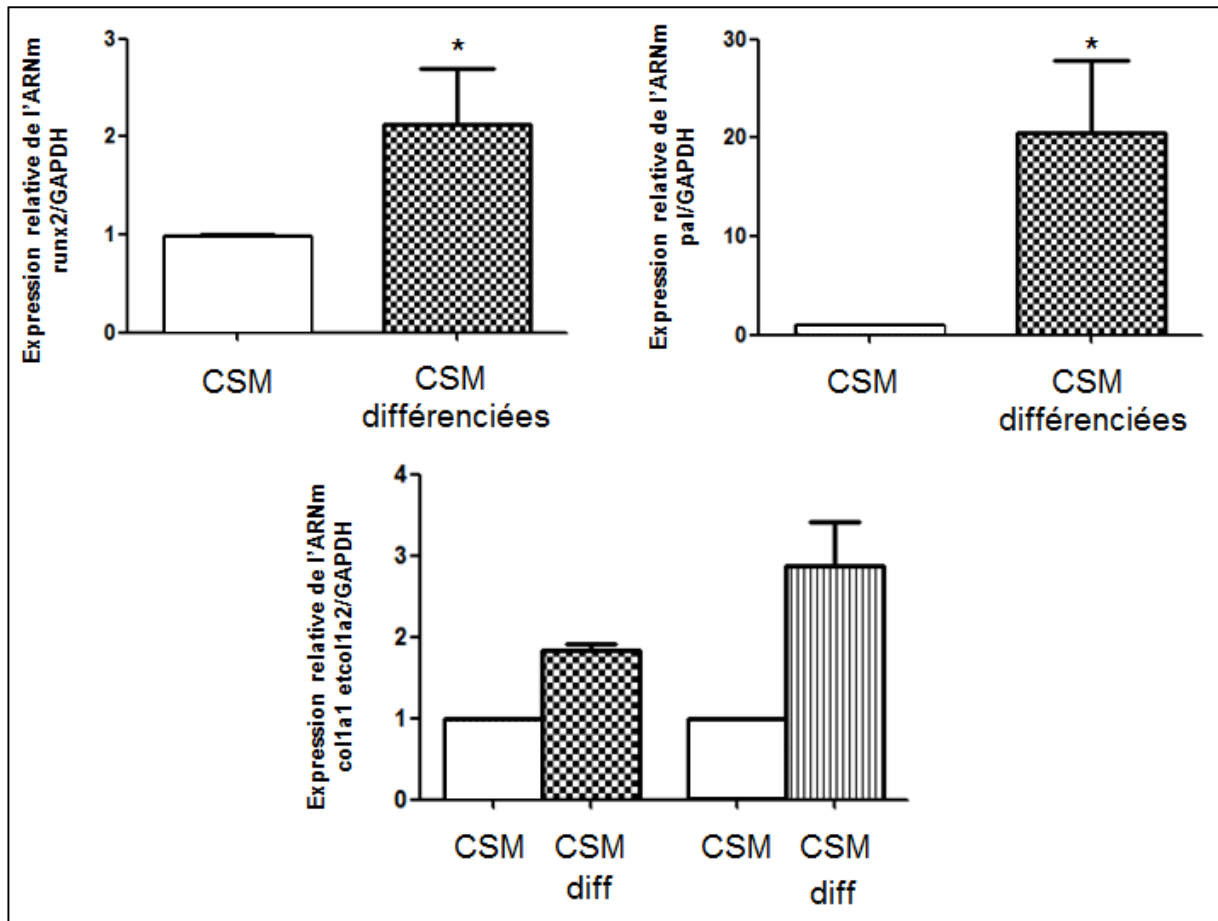


Figure 34 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse à l'issue d'un mois de culture en cassette de CSM différenciées ou non (n=3).

### Discussion

Une masse supérieure à 400mg a conduit à la présence de granules sur plusieurs couches superposées par endroit, contrairement à l'utilisation d'une simple monocouche dans le cas habituel. Bien qu'une telle construction en 3D pour un scaffold soit fréquemment utilisée et rapportée comme profitable dans la littérature<sup>36,138,200,201</sup>, en mimant les structures *in vivo*, cela n'a pas permis dans notre cas la bonne adhésion des cellules. La stabilité du support, remise en cause par les mouvements des granules superposés les uns par rapport aux

autres, n'a pas permis la production d'un tapis cellulaire continu assurant la cohésion, la production et un début de minéralisation rencontrés habituellement.

Les réplicats supplémentaires de 400mg ont cependant permis de confirmer le début de différenciation des CSM sur la voie osseuse (résultats significatifs pour runx2 et PAL, marqueurs non spécifique) et l'apport du milieu de différenciation. L'amélioration de la cohésion mécanique du feuillet reconstruit n'a cependant pas pu se faire par modification du scaffold. L'étude de la coculture avec cellules endothéliales devait donc être étudiée, tant pour l'apport de la vascularisation que pour les possibilités de synergie favorisant la différenciation et l'activité des ostéoblastes (voir chapitre 1). La masse de 400mg a été conservée.

## 2) Faisabilité de la coculture en cassette

Tout comme pour l'insertion des CSM seules dans les cassettes, la faisabilité de la coculture avec cellules endothéliales a tout d'abord été validée par un faible nombre d'échantillons et pour plusieurs groupes de culture différents :

- Insertion différée des CSM (J0) puis des CE (J14)
- Insertion directe des deux types cellulaires à J0 (ratio 1:1),
- Insertion directe des deux types cellulaires à J0 (ratio 1:4).

Les monocultures respectives ont également été cultivées parallèlement comme témoins.

### **Résultats**

Les photographies des cassettes à l'issue des 4 semaines (Figure 35) ont permis de constater une morphologie semblable entre les différents cas avec CSM (mono- et coculture) avec apparitions des trous dans le lit de granules et formation du tissu cellulaire visible au niveau des bords. Une forme de feuillet très prononcée a cependant été observée dans le cas particulier de la coculture différée (panneau en haut à droite). De façon attendue, la monoculture des CE, sans production de matrice minéralisée, n'a que peu modifié la structure du lit de granules qui étaient encore mobiles à la fin de la culture.

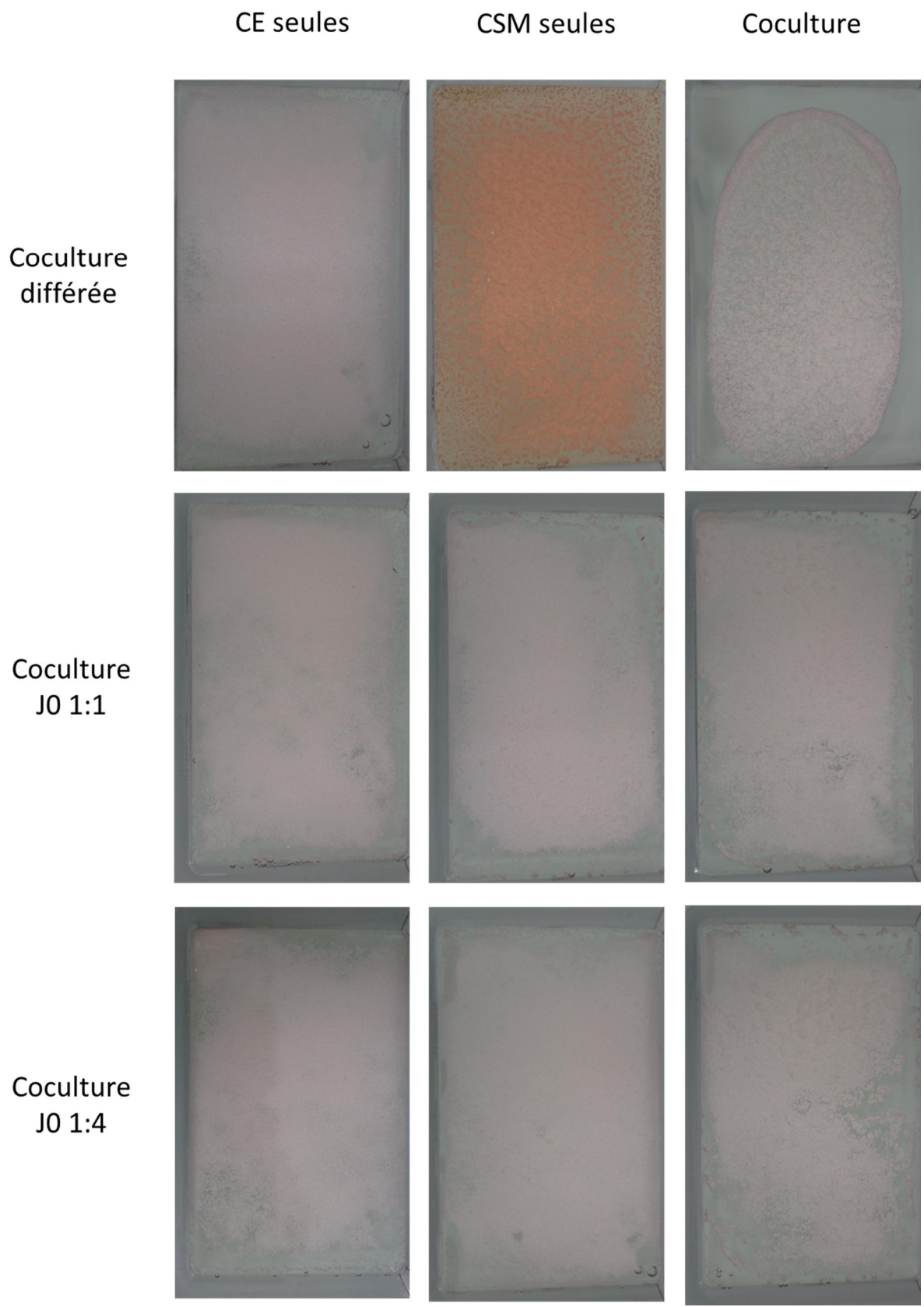


Figure 35 : Morphologie des feuillets après un mois de culture en fonction des différents protocoles de coculture CSM/CE.



Les premières mesures de l'activité PAL (Figure 36) ont suggéré une conservation en coculture de la haute activité des CSM différenciées déjà évaluée précédemment. La comparaison des ratios 1:1 et 1:4 peut souligner une augmentation plus prononcée pour le ratio 1:4. Cette tendance, à relativiser dans le cadre de cet essai préliminaire, a également été notée concernant l'expression des gènes (*runx2*, *PAL*). Il est surtout intéressant de noter que l'expression des gènes spécifiques de l'activité des endothéliales (*vascular endothelial growth factor receptor 2* (*vegfr2*), Facteur de von Willebrand (Facteur vW)) a été convenablement détectée dans les cocultures et monoculture CE à l'issue du mois de culture, reflétant leur survie (Figure 37 et Figure 38). Les résultats concernant *runx2* et *PAL* obtenus dans le cas de la coculture différée étaient du même ordre de grandeur que la monoculture de CSM différenciées, mais baisses ou augmentations devaient être confirmées significativement avec plus d'échantillons (Figure 37).

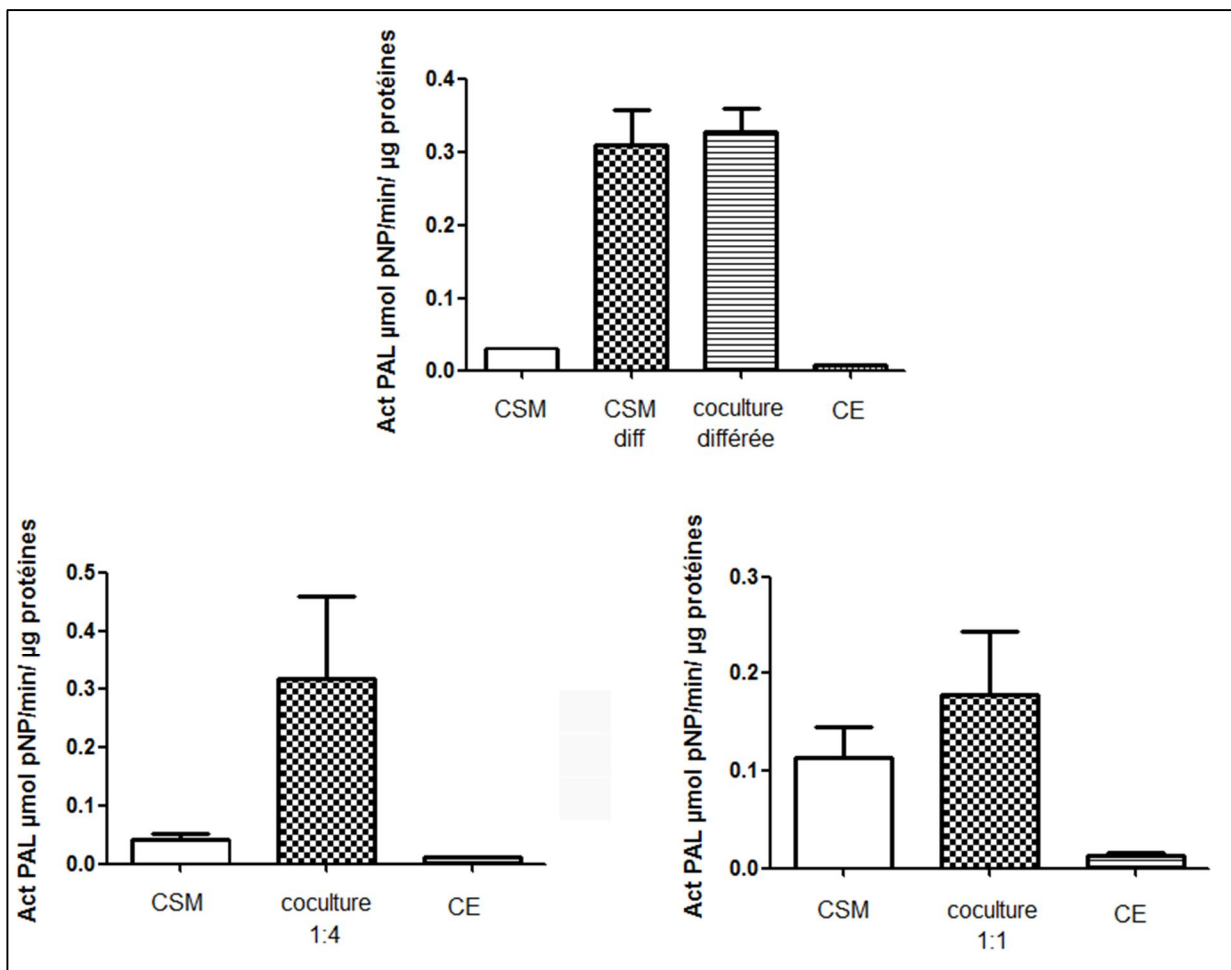


Figure 36 : Activité PAL des différents cas de coculture à l'issue d'un mois de culture en cassette.

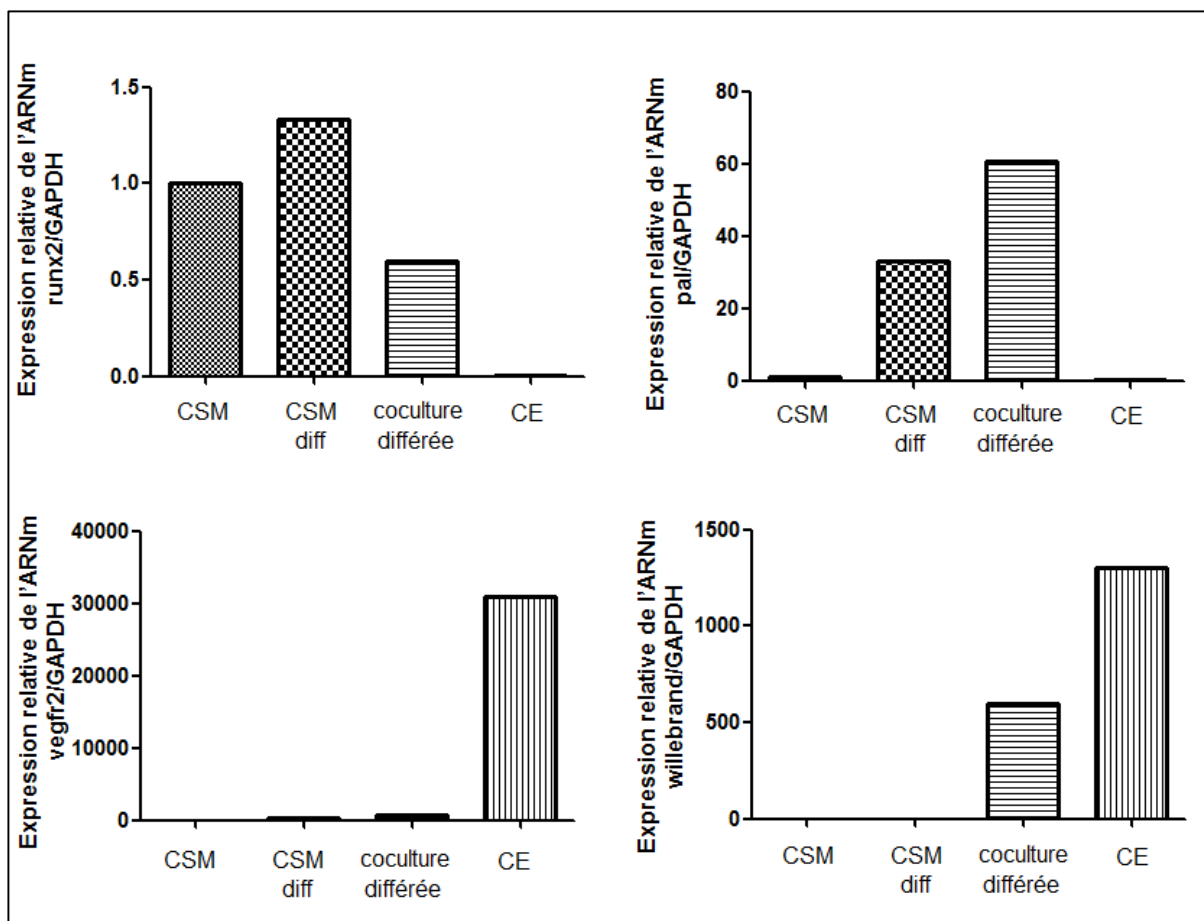


Figure 37 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse (en haut) ou endothéliale (en bas) à l'issue d'un mois de coculture différée en cassette.

## Discussion

Le maintien de la population de cellules endothéliales en cassette, en mono comme en coculture, a pu être vérifié au cours cet essai préliminaire par la détection de l'expression de gènes spécifiques à l'issue du mois de culture (vegfr2, Facteur vW). L'augmentation de l'activité des ostéoblastes attendue a été suggérée mais nécessitait bien entendu un plus grand nombre d'expériences. Le choix d'appliquer par la suite une coculture différée a été arrêté suite à cette première vague, basé sur la forme très prononcée du feuillet ainsi obtenu. Cet aspect, l'obtention du substitut manipulable et vascularisé, restait en effet l'objectif principal de l'étude. L'addition des CE pourrait alors jouer le rôle d'un renforcement après une première phase de développement de la population de CSM, déjà validée en monoculture. De même, souligné par ces résultats, le ratio 1:4 a été préféré au ratio 1:1. Une telle proportion entre CSM et CE a déjà été étudiée lors d'autres études, même si le ratio optimal reste sujet à

discussion et qu'il pourrait ne pas avoir une influence importante sur les cultures ne dépassant pas un mois<sup>180,182</sup>. Ces choix effectués, un essai « en condition » sur deux donneurs a été réalisé.

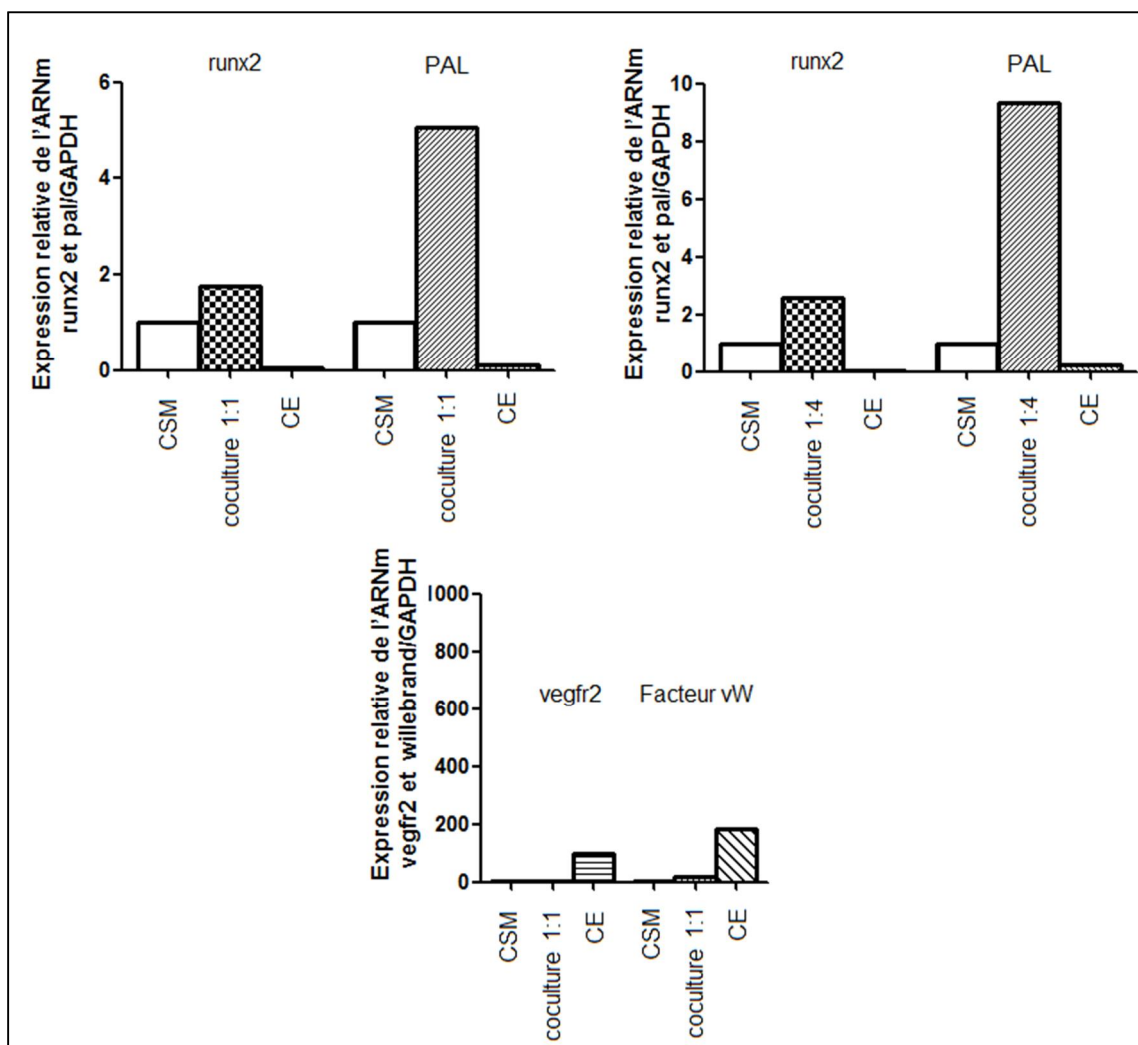


Figure 38 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse (en haut) ou endothéliale (en bas) à l'issue d'un mois de coculture simultanée en cassette.

### 3) Validation finale du protocole

#### **Résultats**

Une étude complète de l'expression des gènes et de l'activité PAL a été conduite sur des cellules issues de deux donneurs différents, en suivant les choix définis grâce aux vagues d'expérience précédentes. L'objectif était une validation finale avant l'adoption du protocole,

qui serait alors appliqué à donneurs, parallèlement à la mise au point d'expérimentation *in vivo*. L'activité PAL (Figure 39) présente le même profil que lors des premiers essais : très faible pour les CSM en monoculture, elle montre une forte augmentation dans le cas des mêmes cellules différenciées. Cette hausse est du même ordre de grandeur pour la coculture, et est totalement absente pour les endothéliales seules. Les comportements des deux donneurs sont ici comparables.

Tous les résultats de l'expression des gènes mesurée par RT-qPCR sont exprimés par rapport aux valeurs obtenues avec les témoins de monoculture de CSM non différenciées. L'expression de Runx2 est semblable entre les différents groupes, exceptée pour la monoculture de CE (Figure 40) où elle est absente. Les gènes liés à la PAL sont également moins exprimés chez les CE mais présentent une augmentation très importante pour les CSM différenciées (environ 40 fois) et la coculture (environ 60 fois) (Figure 40). On constate une importante disparité entre les différents donneurs concernant colla2, avec un facteur 4 entre les donneurs 1 et 2 pour chaque groupe (Figure 41). Cet écart se retrouve pour l'OPN, notamment dans le cas des CSM différenciées (Figure 40). Pour les autres gènes, l'ordre de grandeur est le même entre les deux donneurs, mais les expressions des cocultures sont légèrement ou nettement inférieures au témoin de CSM non différenciées (Cx43, OCN, BMP2). Vegfr 2 et le Facteur vW sont exprimés dans les cocultures, et sont logiquement surexprimés de façon importante dans la monoculture CE (Figure 41).

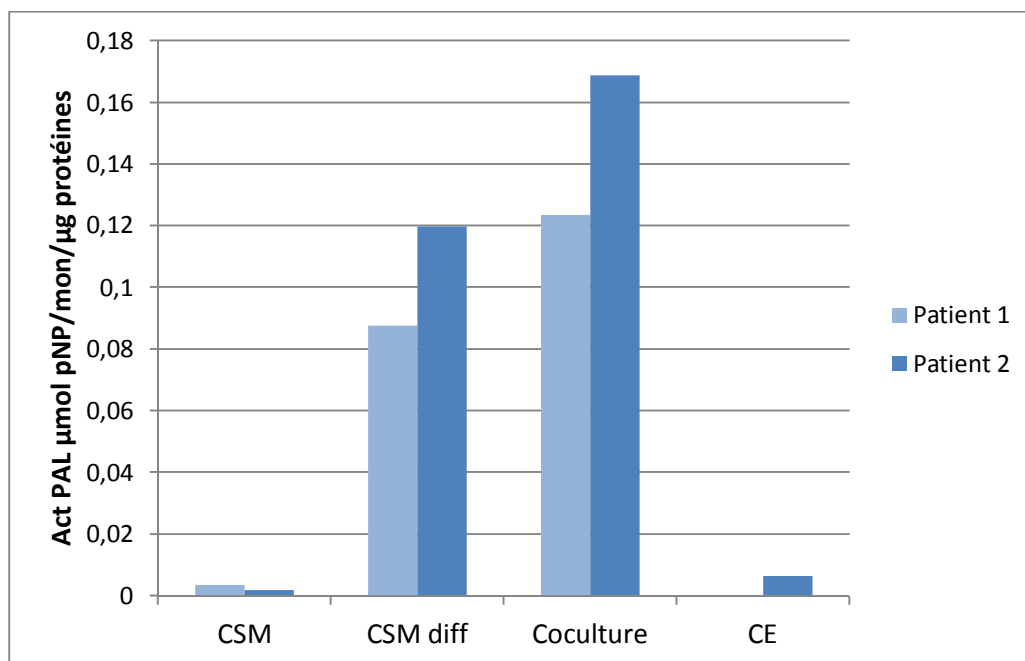


Figure 39 : Activité PAL chez deux donneurs à l'issue d'un mois de coculture en cassette (protocole final, essai préliminaire).

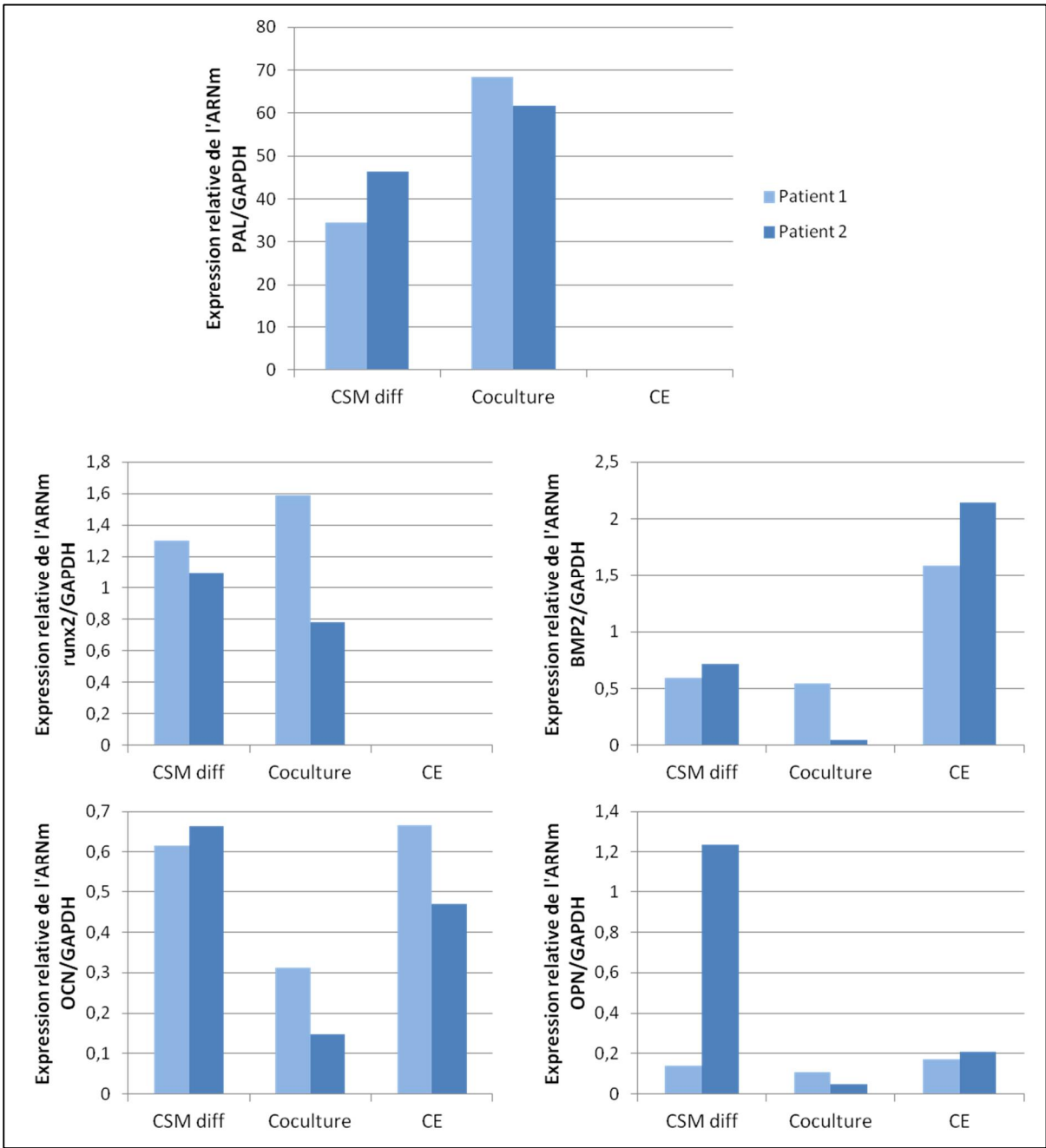


Figure 40 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse à l'issue d'un mois de coculture en cassette, augmentation par rapport aux CSM non différenciées (protocole final, essai préliminaire)

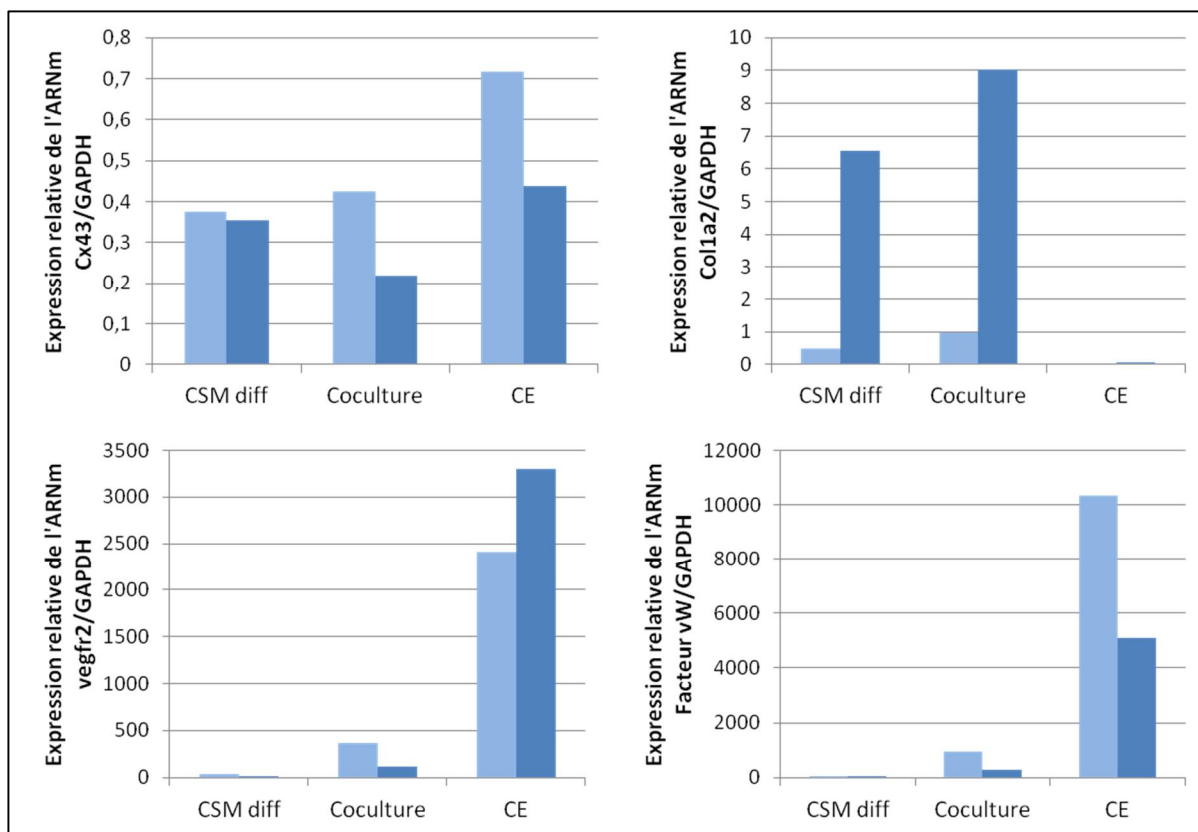


Figure 41 : Expression des gènes liés à la connexine 43, le collagène 1a2 et à la lignée endothéliales à l'issue d'un mois de coculture en cassette, augmentation par rapport aux CSM non différenciées (protocole final, essai préliminaire)

## Discussion

Les résultats suggérés lors des premières expériences et lors de cet essai en condition ont été cohérents, notamment concernant l'activité PAL et les marqueurs des CE (vegfr2 et Facteur vW). La surexpression des gènes PAL et runx2 induite par la coculture doit maintenant être confirmée par des résultats significatifs. L'analyse de l'expression de marqueurs tardifs de la lignée osseuse, notamment OCN et OPN ici en baisse dans la coculture, sera alors un point principal de l'étude pour déterminer le stade de différenciation du feuillet. L'existence de jonctions gap entre les cellules, également, est un bon indicateur de la formation d'un tissu continu et fonctionnel formé par les deux types cellulaires, la connexine 43 étant la protéine majoritaire de ces jonctions à la fois pour les ostéoblastes et les CE<sup>47,202</sup>. L'expression de cette protéine ayant été faiblement détectée ici, une étude supplémentaire de ce point par marquage fluorescent doit être menée. Enfin, il a été noté l'importante variabilité entre les donneurs concernant des aspects précis (ici, la production de collagène). La conduite de l'étude sur 6 donneurs devrait permettre de dégager les tendances

plus précisément. Elle permettra d'analyser statistiquement les résultats et de les discuter au regard des données de la littérature.

#### 4) Conclusions des étapes de mise au point

Le passage d'une lignée immortalisée de cellules prédifférenciées à des cellules souches primaires n'est pas immédiat et nécessite des étapes d'adaptation des protocoles. Ici, la mise au point de la culture de CSM en cassette a souligné l'importance d'un milieu de différenciation. Viabilité et activité à l'issue du mois de culture ont été vérifiées efficacement. La faisabilité de la coculture a également été validée, même si seule une étude complète peut permettre de conclure sur l'apport des cellules endothéliales et sur le stade de différenciation du substitut reconstruit à terme. Le ratio CSM:CE, la densité d'ensemencement, le planning de culture et les témoins ont pu être définis, tout comme les analyses indispensables à mener. Nous allons maintenant étudier les résultats obtenus sur 6 donneurs.

### **III. Etude complète de la coculture en cassette**

#### 1) Introduction

L'étude finale de la coculture en cassette a été réalisée à partir de cellules souches mésenchymateuses primaires humaines provenant de 6 donneurs différents, cultivées avec des cellules endothéliales primaires humaines issues d'un donneur commun. Les paramètres définis suite aux étapes préliminaires ont été conservés : 400mg de granules de phosphate de calcium 80-200  $\mu$ m, ajout différé des CE, monocultures témoins. Aux analyses validées précédemment (activité PAL, expression des gènes) ont été ajoutées la caractérisation morphologique des substituts obtenus (MEB, marquage des filaments d'actine et jonctions gap) ainsi que l'étude de la viabilité (marquage Live/Dead) sur les cassettes de coculture. L'étude devait permettre de conclure sur l'apport de la coculture, la cohésion mécanique et les possibilités d'utiliser les substituts pour des essais in vivo.

Coloration et activité PAL ainsi que l'étude de l'expression des gènes ont été réalisées au laboratoire LNPC du CHU d'Amiens par le Dr. Marie Naudot, toutes les observations par

microscopie étant effectuée à l'UTC. Le maintien en culture au sein des cassettes était également réalisé à Amiens.

## 2) Résultats

En raison de délais techniques et de la vitesse de croissance de certains lots de cellules, les données d'expression génique rapportées et discutées ici ne concernent que des cellules provenant de 5 donneurs différents sur 6 prévus.

### ***Coloration et activité PAL***

Dans un premier temps, l'expression de la PAL, un marqueur précoce de la différenciation en ostéoblaste (voir Figure 9), a été évaluée par méthode qualitative sur les substituts reconstruits. L'apparition de la couleur violette sur les échantillons analysés (Figure 42) indique les zones où l'enzyme a été produite au cours de la culture.

On note tout d'abord une variabilité importante d'un donneur à l'autre concernant le maintien des échantillons. Les échantillons du donneur 4 ont par exemple permis l'apparition d'un feuillet maintenu pour les cas de coculture et de monoculture de CSM avec milieu de différenciation, tandis que tous les substituts obtenus avec les cellules du donneur 3 se sont désagrégés après ouverture de la cassette. Dans tous les cas, on constate que le maintien est meilleur pour les cocultures et les CSM diff que pour les CSM et les cellules endothéliales, où il est inexistant. On trouve les mêmes différences avec la coloration de la PAL : les cocultures et CSM diff sont nettement marquées (violet prononcé) alors que les autres cas, restés blancs, ne montrent pas la production de l'enzyme. On remarque à nouveau la variabilité entre les individus, la couleur étant plutôt rose à violet pâle pour les échantillons concernés des donneurs 5 et 6.

Afin de confirmer ces résultats, l'activité de la PAL a également été évaluée par mesure quantitative de l'activité enzymatique (Figure 43). On retrouve la variabilité dans ces résultats, mais l'analyse donneur par donneur révèle une nette augmentation pour les cas de CSM différenciées et la coculture (en moyenne 15 à 20 fois par rapport aux CSM seules). Les cellules endothéliales seules montrent une activité faible à nulle.



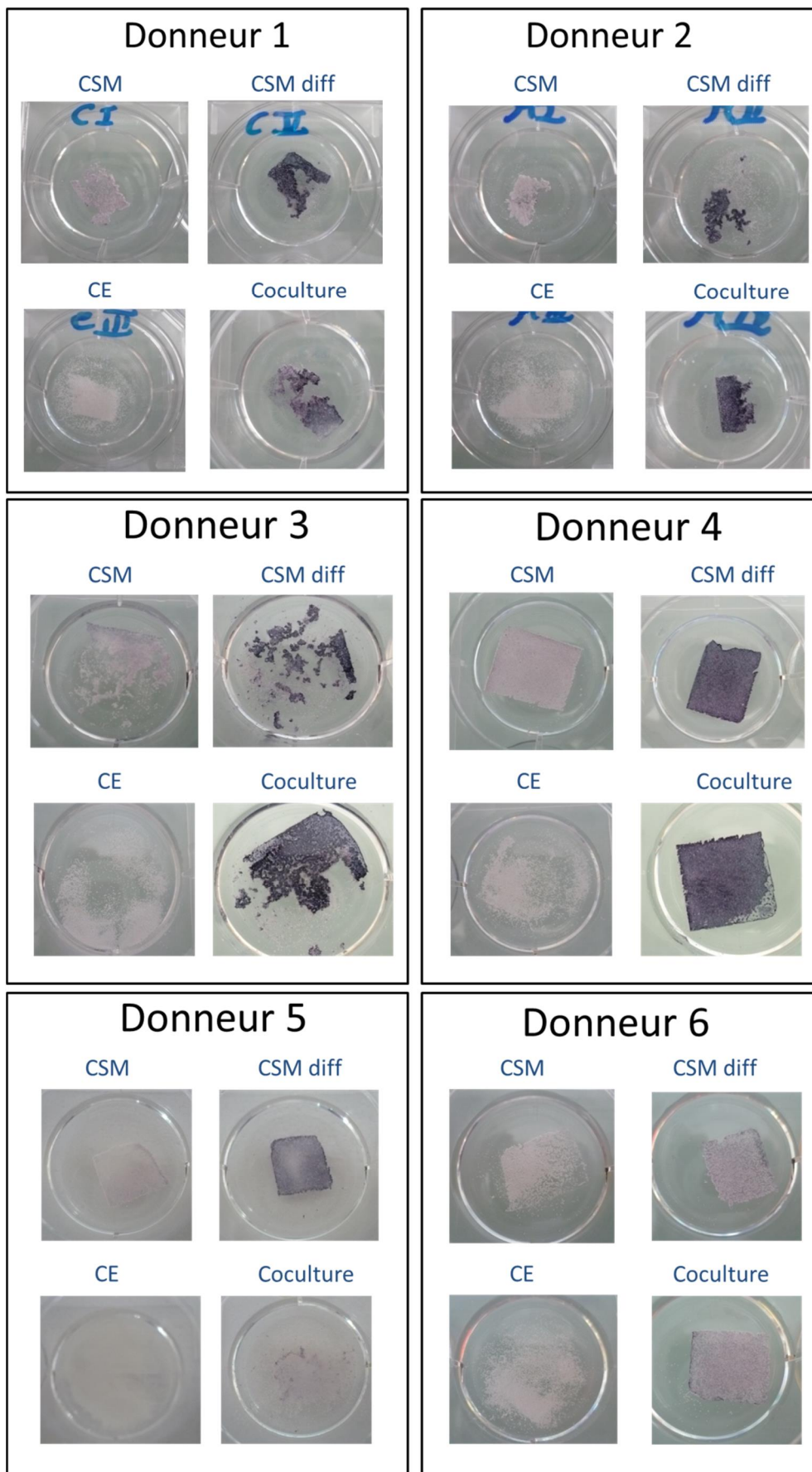


Figure 42 : Coloration PAL à l'issu de 6 mois de coculture en cassette pour chaque donneur.

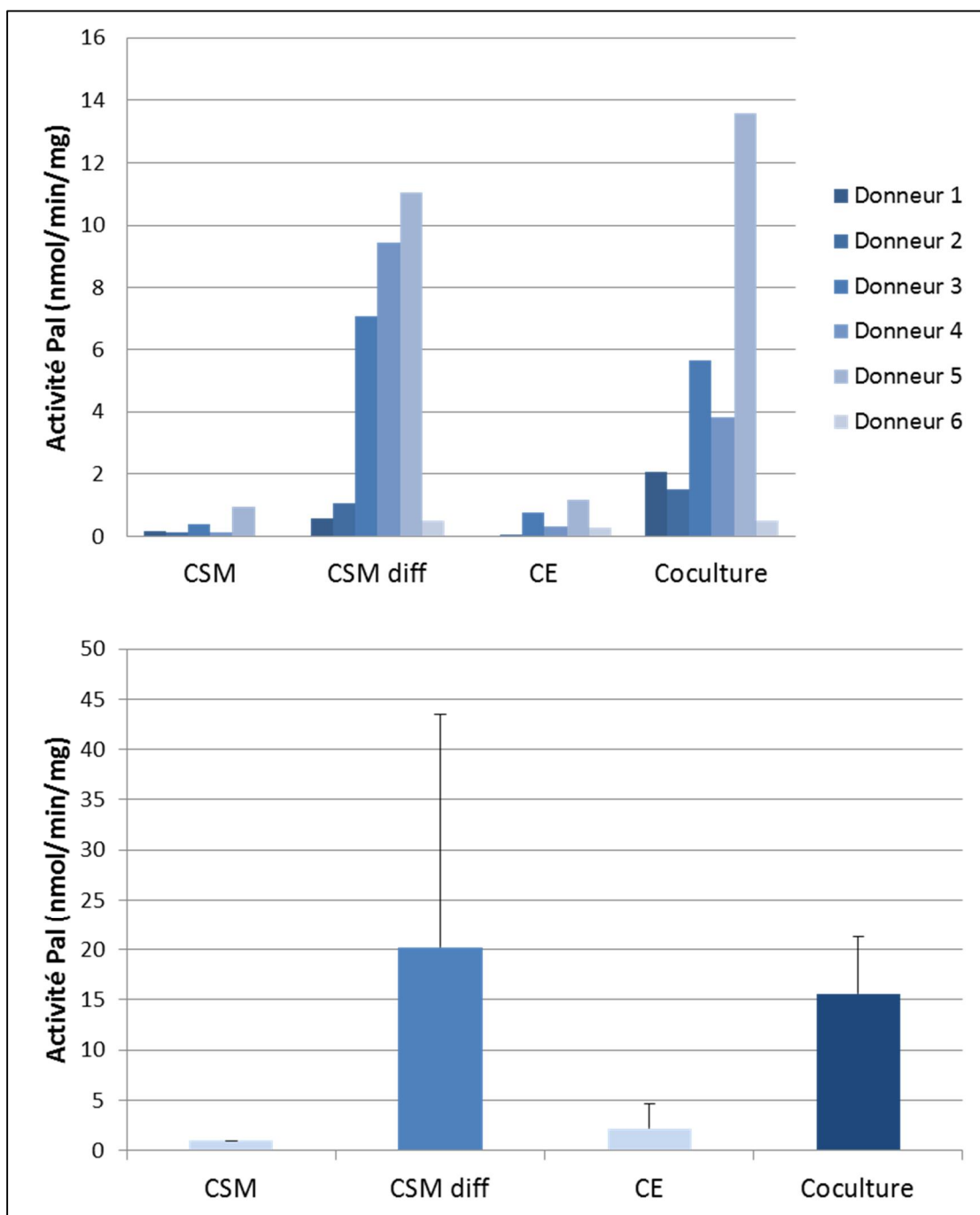


Figure 43 : Dosage de l'activité PAL à l'issue d'un mois de coculture en cassette, détails des résultats pour 6 donneurs (en haut) et moyenne normalisée par les résultats de la monoculture de CSM non différenciées (en bas).

## ***Expression des gènes***

L'expression de gènes d'intérêt pour la différenciation en ostéoblastes (Runx2, PAL, Colla2, OCN, OPN et BSP) et pour la survie et l'activité des cellules endothéliales (Vegfr2, Facteur vW) a été analysée par RT-qPCR à l'issue du mois de culture. Les résultats ont été normalisés par l'expression des CSM cultivées seules sans milieu de différenciation.

Les expressions des gènes liés à Runx2 et PAL (Figure 44), marqueurs précoces, ont respectivement montré des comportements différents. On peut noter une baisse significative par rapport aux CSM pour tous les groupes (expression relative de 0,4 pour la coculture) dans le cas de Runx2, et une hausse importante pour la PAL (jusqu'à 11 fois pour la coculture). L'expression de Colla2 suggère une hausse dans le cas de la coculture mais laisse apparaître une importante variabilité. Tous les marqueurs tardifs de minéralisation (OCN, OPN, BSP) présentent des baisses par rapport aux CSM. Il est à noter que les expressions de la monoculture de cellules endothéliales sont toujours inférieures à celle des CSM, comme attendu.

Concernant les gènes liés aux cellules endothéliales (Figure 45), en dépit de la variabilité inter-donneurs, on trouve une expression relative conséquente (2000 fois pour le Vegfr2, près de 6 millions de fois pour le Facteur vW) pour la monoculture de celles-ci par rapport aux CSM non différenciées. La coculture montre cependant également une expression importante avec des augmentations d'environ 42 et 600000 fois pour ces deux gènes respectivement. Le groupe CSM diff présente des valeurs faibles, inférieures aux CSM (0,23 et 0,29 fois), traduisant l'absence des cellules endothéliales dans ces deux cas.

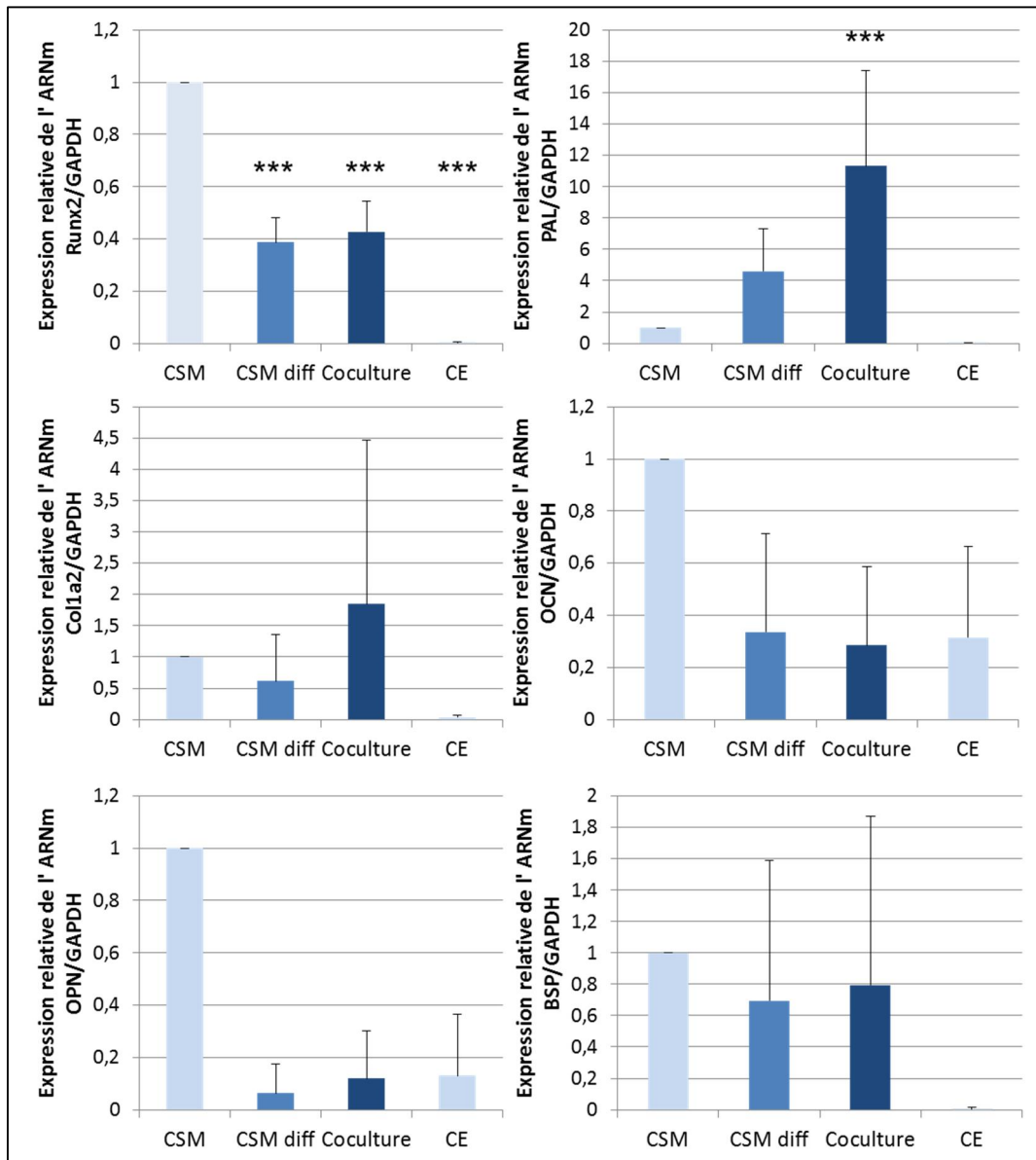


Figure 44 : Expression des gènes liés à la lignée osseuse à l'issue d'un mois de coculture en cassette, variations par rapport aux CSM non différenciées (moyenne sur 5 donneurs, \*\*\* :  $p < 0,001$ ).

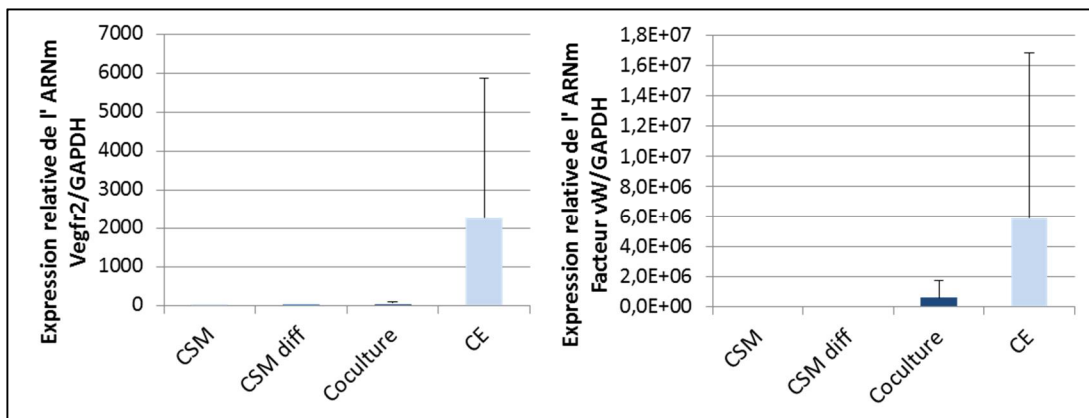


Figure 45 : Expression des gènes liés aux cellules endothéliales à l'issue d'un mois de coculture en cassette, augmentation par rapport aux CSM non différenciées (moyenne sur 5 donneurs).

## ***Organisation et viabilité***

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation du substitut dont on envisage à terme l'utilisation clinique, c'est-à-dire les échantillons avec coculture CSM/CE, ces derniers ont été visualisés par microscopie à fluorescence et MEB (Figure 46 à Figure 48).

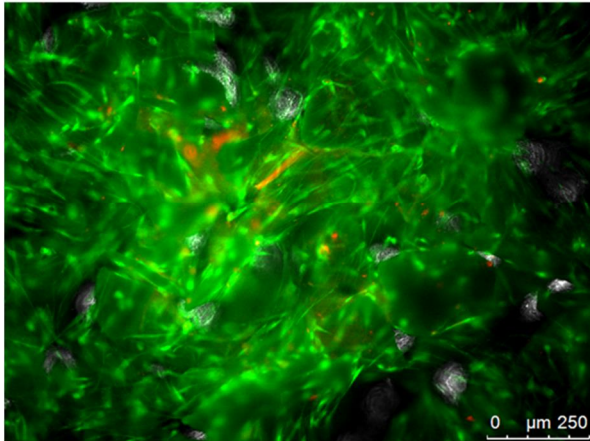
Les donneurs 1 et 2 avaient permis d'obtenir ci-dessus une coloration et une activité PAL ainsi qu'une cohésion mécanique présentes mais moyennes. Ici, on peut voir sur chaque procédé de microscopie un tapis de cellules qui recouvre en continu le scaffold. Des ponts visibles par marquage de la membrane (calcéine AM) et des filaments d'actine (rhodamine phalloïdine) sont présents par endroit (Figure 46). Les cellules sont dans l'ensemble très étalées et la morphologie ainsi que la viabilité, qualitativement bonne, sont semblables entre les deux cas étudiés. La connexine 43, qui traduit la présence de jonctions gap entre les cellules et donc d'un début d'organisation du tissu, peut être observée par immunomarquage chez les deux donneurs. On ne distingue cependant pas de localisation précise ou de structure particulière dans sa répartition.

Activité et coloration PAL étaient plus prononcées chez les donneurs 3 et 4. Ces résultats se trouvent corrélés à un bon maintien, un tapis continu et viable et un marquage fréquent de la connexine 43, celle-ci demeurant non localisée précisément (Figure 47). En revanche, le donneur 4 ne présentait qu'un tissu très hétérogène, avec des portions de granules non recouvertes de cellules, menant à un maintien mécanique inexistant. La connexine 43 était cependant bien présente dans des proportions égales voire supérieures aux autres donneurs.

Enfin, les donneurs 5 et 6 n'avaient pas permis d'obtenir une coloration PAL prononcée. Ils ont présenté en termes de morphologie et d'homogénéité du tapis cellulaire des résultats moyens, avec quelques zones très peu densément peuplées, notamment dans le cas du donneur 5 (Figure 48). La continuité du tissu cellulaire obtenu avec le cas 6, légèrement meilleure, se rapprochait des deux premiers donneurs. Ces deux derniers échantillons différaient également par l'expression de la connexine 43, quasi-absente chez le donneur 5 (moins bon résultat obtenu parmi tous les cas) mais assez fréquente chez le donneur 6.

Il est à noter que la viabilité cellulaire a été notée qualitativement très bonne chez la totalité des donneurs selon les observations des marquages Live/Dead.

Donneur 1



Donneur 2

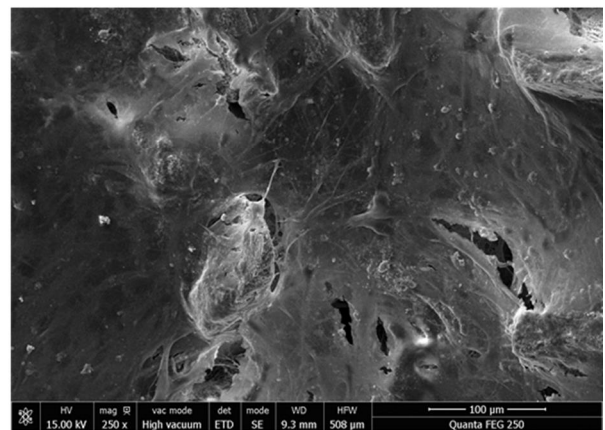
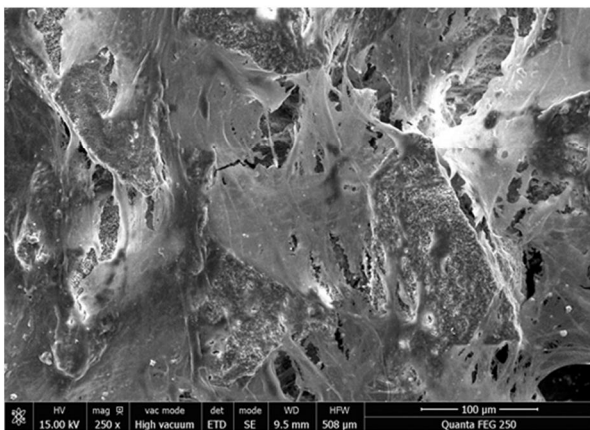
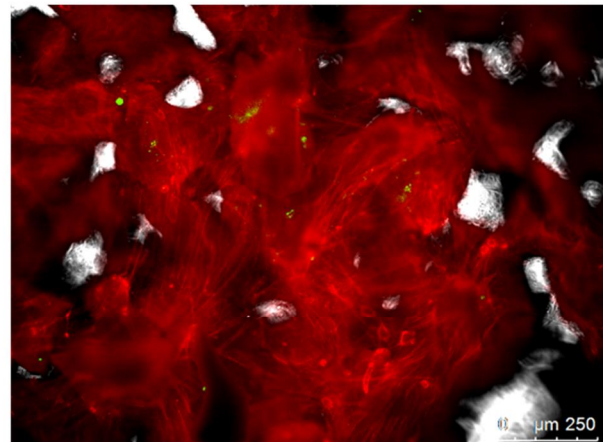
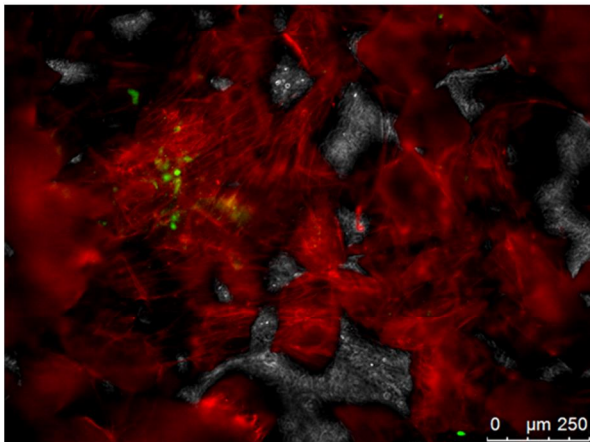
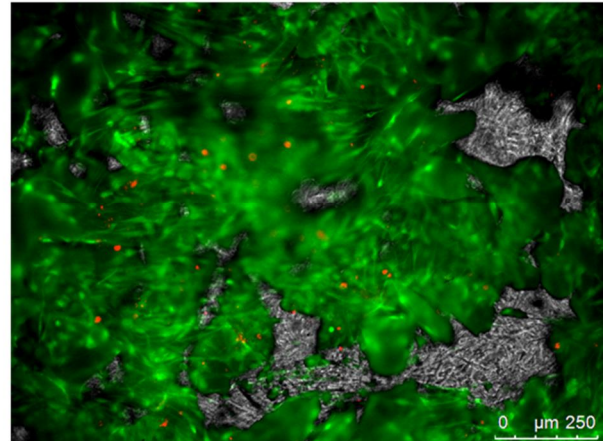
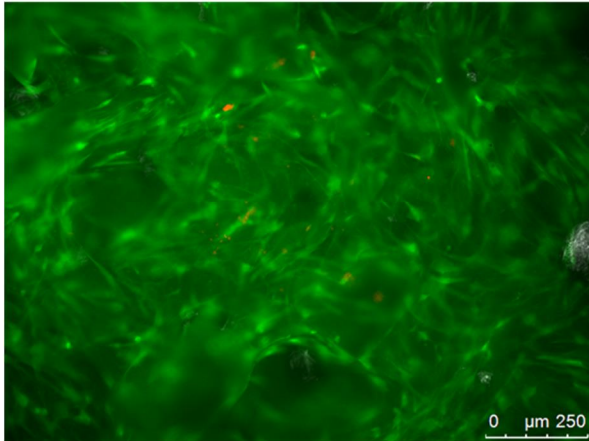


Figure 46 : Observation en microscopie de l'organisation et la viabilité des échantillons obtenus par coculture CSM/CE à l'issue d'un mois en cassette (donneur 1 et 2). En haut, vert : Calcéine AM, cellules vivantes ; rouge : EthD-1, noyaux des cellules mortes ; gris : contraste de phase, granules. Au milieu, rouge : rhodamine/phalloïdine, filaments d'actine ; vert : immunomarkage, connexine 43 ; gris : contraste de phase, granules. En bas : MEB.

Donneur 3



Donneur 4

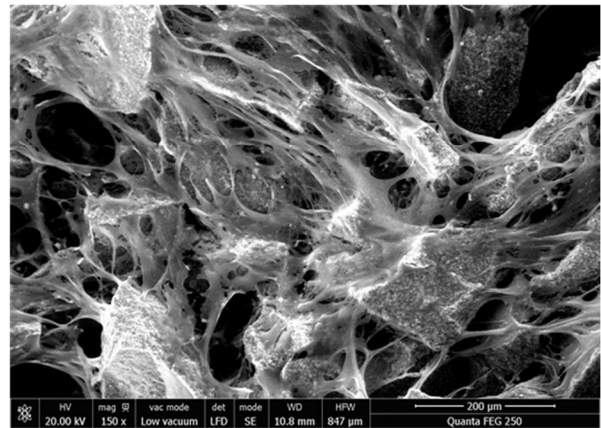
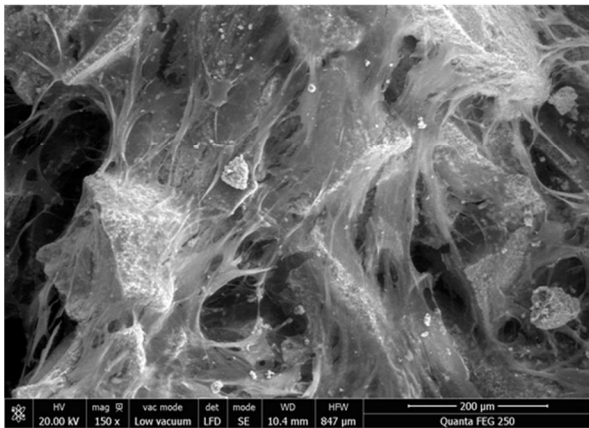
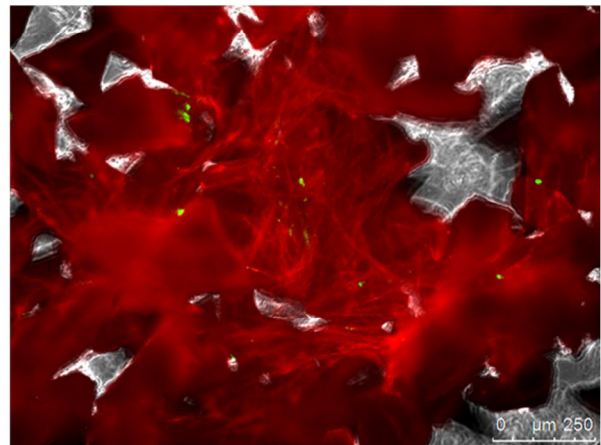
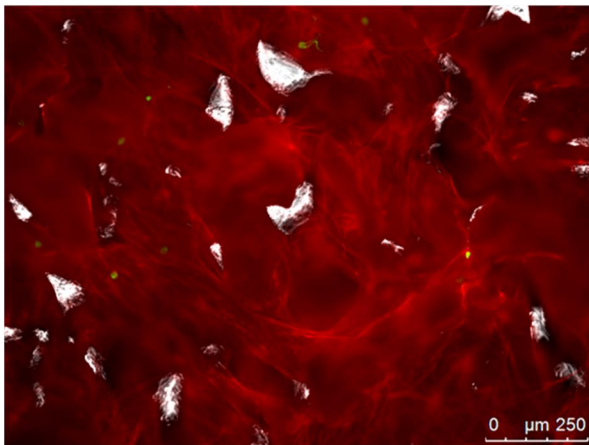
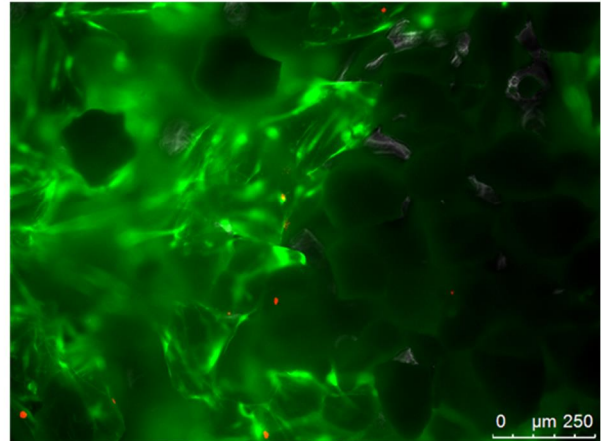
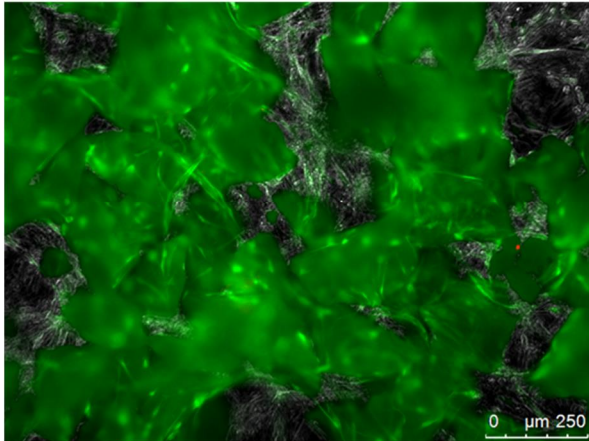


Figure 47 : Observation en microscopie de l'organisation et la viabilité des échantillons obtenus par coculture CSM/CE à l'issue d'un mois en cassette (donneur 3 et 4). En haut, vert : Calcéine AM, cellules vivantes ; rouge : EthD-1, noyaux des cellules mortes ; gris : contraste de phase, granules. Au milieu, rouge : rhodamine/phalloïdine, filaments d'actine ; vert : immunomarquage, connexine 43 ; gris : contraste de phase, granules. En bas : MEB.

Donneur 5



Donneur 6

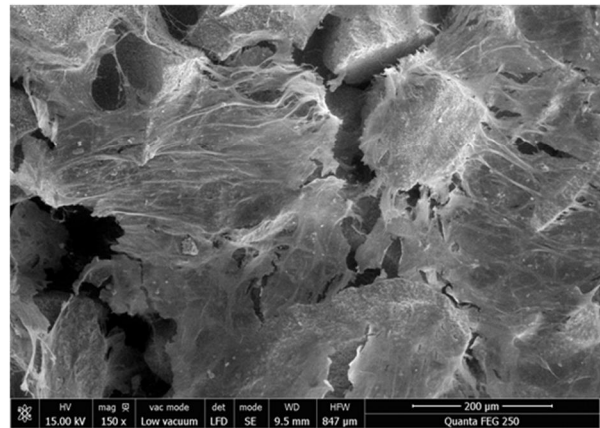
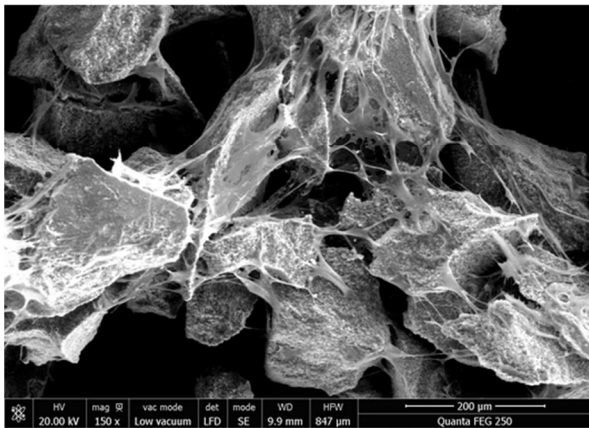
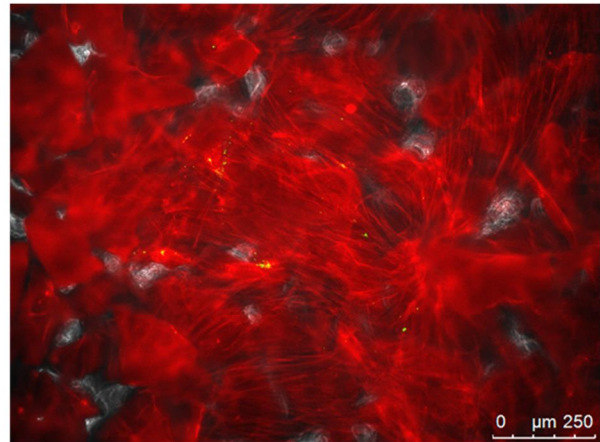
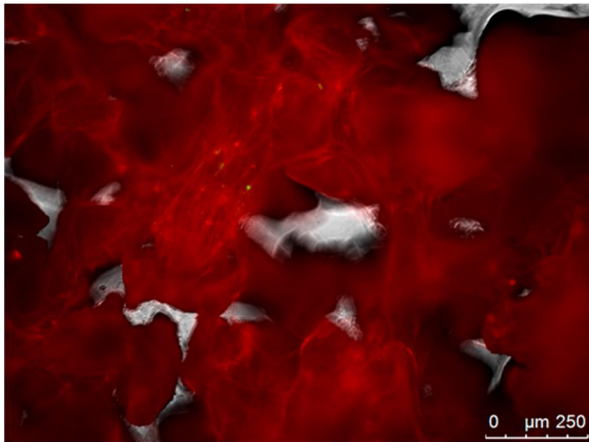
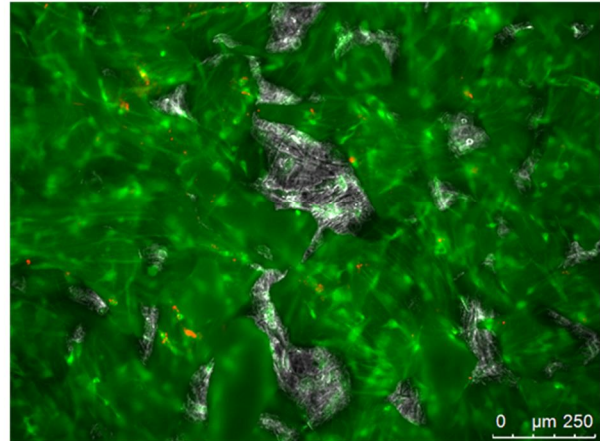


Figure 48 : Observation en microscopie de l'organisation et la viabilité des échantillons obtenus par coculture CSM/CE à l'issue d'un mois en cassette (donneur 5 et 6). En haut, vert : Calcéine AM, cellules vivantes ; rouge : EthD-1, noyaux des cellules mortes ; gris : contraste de phase, granules. Au milieu, rouge : rhodamine/phalloïdine, filaments d'actine ; vert : immunomarquage, connexine 43 ; gris : contraste de phase, granules. En bas : MEB.



### 3) Discussion

Le protocole final de coculture CSM/CE établi plus haut suite aux expériences préliminaires a été appliqué à des CSM primaires humaines provenant de 6 donneurs différents auxquelles sont ajoutées des CE après 14 jours. Les substituts ont été comparés à la culture en cassette des monocultures respectives, c'est-à-dire CSM en prolifération, CSM avec milieu de différenciation et CE seules.

Les observations en microscopie ont montré qu'il était possible d'obtenir un tissu continu de cellules englobant les granules, avec une bonne viabilité et une structure commençant à s'organiser (présences de jonctions gap) pour plusieurs donneurs (Table 9). Les ponts entre granules et l'étalement constatés efficacement avec cellules de lignées (chapitre 3) ont été retrouvés ici, mais le tissu présente beaucoup plus de fissures ou des zones non recouvertes dans le cas d'un potentiel de prolifération moindre (donneur 5). Il est moins continu et homogène, même s'il couvre très nettement les granules par endroit. Il existait cependant une importante variabilité dans la tenue mécanique, avec un faible nombre d'échantillons offrant une cohésion suffisante pour être manipulé et permettre une caractérisation par tests de tractions. Il est intéressant de noter que la cohésion mécanique ne montrait aucune corrélation avec l'activité des cellules (expression des gènes, activité et coloration PAL, production de connexine 43), certains donneurs avec un bon maintien ayant montré une activité faible (donneur 6) et inversement (donneur 4). Pour l'expression de tous les gènes étudiés comme pour la coloration et l'activité de la PAL, les résultats obtenus en coculture sont toujours supérieurs ou équivalents à ceux obtenus avec CSM différenciés. Les conditions de coculture ont donc permis d'assurer au moins le même stade de différenciation que la monoculture de CSM, voire pour certains paramètres de l'améliorer (gènes PAL et Colla2 notamment). De plus, l'expression des gènes liés au Vegfr2 et au Facteur vW montre que, même si l'ordre de grandeur n'est pas le même que dans le cas de la monoculture de CE, ces dernières sont bien présentes et actives à l'issue du mois de coculture.

Il est toutefois possible de discuter cette baisse dans l'expression des marqueurs de cellules endothéliales entre monoculture des CE et coculture. La première hypothèse serait une compétition entre les deux types cellulaires pour l'espace et les nutriments disponibles dans le système fermé que représente la cassette. Les CE étant ajoutées à J14, elles pourraient ne pas accéder qu'à une surface d'adhésion limitée, les CSM ayant déjà adhéré et proliféré sur la

couche de granules. Cependant, leur potentiel d'adhésion est nettement limité même en coculture : la surface des cassettes n'est pas traitée spécifiquement pour la culture endothéliale, avec notamment l'absence d'un coating de collagène nécessaire à leur bonne adhésion. Cet aspect est confirmé par le dosage des ARN effectué par le CHU d'Amiens et nécessaire à la réalisation des RT-qPCR (données non présentées) : il y a en réalité plus de cellules endothéliales dans les cassettes de coculture qu'en monoculture CE à l'issue des 4 semaines. La présence des CSM ne limite donc pas l'espace mais au contraire, par un début de production de collagène, facilite l'adhésion des CE. Il existe bien une baisse dans l'expression des gènes liés au Vegfr2 et au Facteur vW en coculture, mais le niveau reste élevé est les CE demeurent actives dans notre cas. On peut donc souligner qu'en dépit de cette baisse, notre procédé permet la survie, la prolifération et l'activité des deux types cellulaires conjointement après un mois de culture. Cette durée de culture pourra cependant être modifiée pour de futures expérimentations. En effet, la variabilité entre les différents donneurs a également été observée concernant la vitesse de prolifération des cellules lors de la préculture en flasque, le temps nécessaire pour en obtenir la quantité souhaitée étant parfois allongé de plusieurs semaines. Il pourra donc être intéressant à l'avenir d'ajuster la durée totale de culture en cassette en fonction de la vitesse de prolifération constatée en flasque.

Parallèlement, un des enjeux principaux de l'utilisation de cellules souches était d'assurer leur différenciation vers la lignée osseuse grâce à ce procédé et aux autres acteurs de l'ingénierie tissulaire : le scaffold (granules de phosphate de calcium) et l'environnement (milieu de différenciation, présence des cellules endothéliales).

Si l'on se réfère à l'ordre chronologique d'apparition des marqueurs de différenciation (Chapitre 1, Figure 9), le haut degré de coloration, activité et expression génique liées à la PAL laissent supposer que les CSM cultivées en coculture sont désormais des ostéoblastes en phase de production de matrice extracellulaire. La baisse dans l'expression de Runx2 apparaît cohérente avec ce stade de différenciation, ce facteur de transcription étant lié à la différenciation des cellules multipotentes, son activité doit donc décroître à mesure que le nombre de cellules non différenciées dans l'échantillon diminue. La forte présence de PAL en coculture (expression génique 11 fois supérieure à celle des CSM, 3 fois supérieure à celle des CSM diff), ainsi que l'absence d'OCN et de BSP, pourraient traduire que la phase de minéralisation de la matrice n'a pas encore débuté (Figure 9). En revanche, la phase de production aurait dû permettre de détecter des augmentations d'OPN et de collagène. Si

l'expression du gène Col1a2 et la présence d'un grand nombre de cellules endothéliales soulignent une tendance à l'apparition du collagène dans les échantillons, la très faible teneur en OPN est un résultat incohérent avec le reste de l'étude.

Donneur	Maintien	Densité	Viabilité	Cx43	Coloration PAL	Gènes surexprimés	Âge	Sexe
1	Très bon	Forte	Très bonne	Ponctuelle	Forte	PAL, Vegfr2	35	F
2	Très bon	Forte	Très bonne	Ponctuelle	Forte	PAL, Col1a2, Vegfr2	44	M
3	Bon	Forte	Très bonne	Fréquente	Forte	PAL, BSP, Vegfr2	47	F
4	Très faible	Faible et hétérogène	Très bonne	Très fréquente	Forte	PAL, Col1a2, BSP, OCN, Vegfr2	39	M
5	Faible	Moyenne à faible	Très bonne	Quasi absente	Très faible	PAL, Col1a2	55	M
6	Bon	Forte	Très bonne	Fréquente	Très faible	/	56	F

Table 9 : Comparaison des résultats obtenus avec les CSM de chacun des 6 donneurs étudiés. Résultats conformes aux attentes (vert) ou présentant des limites vis-à-vis de la perspective d'utilisation clinique (rouge).

Afin d'expliquer cette incohérence, un dosage de l'OCN par d'autres méthodes (ELISA notamment, expérience programmée dans le laboratoire du CHU d'Amiens au moment de la rédaction de ce manuscrit) pourra être réalisé. S'il permet de mettre en lumière la présence significative d'OCN dans les substituts obtenus par coculture, la phase de minéralisation devrait donc avoir commencé au sein de ceux-ci. L'absence d'OPN pourrait donc provenir d'un problème technique au cours de la réalisation des RT-qPCR (hypothèse discutée et envisagée par Marie Naudot, expérimentatrice pour cet essai), notamment dû aux primers utilisés. Dans le cas où aucune trace d'OCN ne serait détectée, les ostéoblastes différenciés se situeraient donc bien en phase de production. Il conviendrait dans tous les cas de valider la teneur en OPN par une méthode alternative, afin d'évaluer si l'on se situe plutôt au début de cette phase (pas ou peu d'OPN) ou en milieu ou fin (présence nette d'OPN).

#### 4) Conclusion

Il a été montré au cours de cette étude que la coculture de CSM et CE primaires humaines au sein des cassettes sur couche de granules pouvait efficacement être menée. Celle-ci présente un intérêt particulier pour le développement de substitut osseux utilisables cliniquement, en favorisant leur vascularisation et leur intégration une fois implantés<sup>43,44,47</sup>. L'apport mutuel de chaque type cellulaire sur l'autre<sup>43,180,181</sup> peut en effet permettre de favoriser le développement du tissu et sa pré-vascularisation *in vitro* comparativement aux monocultures, selon de nombreuses études. Dans notre cas, à l'issue du mois de croissance du substitut, les deux types cellulaires sont présents et actifs, sans inhibition de la prolifération de l'un par l'autre. Les CSM se sont différenciées en ostéoblastes de façon égale ou supérieure à la monoculture de CSM en milieu spécifique, et les cellules osseuses sont au moins en phase de production de matrice extracellulaire. L'amorce de la phase de minéralisation pourra être étudiée plus finement par des expériences supplémentaires concernant l'OCN et l'OPN.

Comparée au substitut obtenu avec cellules de lignées (chapitre 3), la limite principale du procédé est ici le manque de cohésion mécanique. La prise en main du feuillet, déjà limitée, n'a pas pu être retrouvée dans les mêmes conditions ici. Les observations en fluorescence permettent de constater que, si le tapis cellulaire recouvrant les granules est bien présent, il n'a pas la même densité que celui observé avec la lignée de préostéoblastes.

Une des techniques pour remédier à ce problème pourrait donc être d'augmenter le potentiel de prolifération des cellules utilisées. La première solution serait une plus grande densité d'ensemencement. Cela s'avère limité sur le plan clinique (hausse du temps nécessaire pour obtenir un nombre suffisant de cellules), et il peut être émise l'hypothèse qu'au-delà d'un certain seuil, le nombre de CSM pour une surface donnée ne fasse plus évoluer le comportement de l'échantillon (les résultats de nos expériences préliminaires sur monoculture de CSM en cassette étant conformes à cette tendance). En conservant la même densité, une autre possibilité serait alors de favoriser la prolifération par des moyens chimiques, notamment d'autres facteurs de croissance. Toujours dans la perspective clinique, cet aspect est alors limité par des points de réglementation (le SVF déjà présent étant lui-même un composant dont il faudra limiter l'usage). Cellules et environnement n'offrant pas de solutions envisageables, c'est donc au niveau du scaffold qu'il pourrait être possible d'améliorer notre procédé d'ingénierie tissulaire. L'utilisation d'un nouveau matériau pourrait à la fois augmenter le potentiel biologique (inclusion de collagène pour augmenter l'adhésion des endothéliales, composants relargués graduellement favorisant la prolifération) et le potentiel mécanique (cohésion intrinsèque avant la croissance des cellules et la production de matrice) du scaffold.

C'est donc à cette dernière solution, le développement d'un nouveau matériau support, qu'ont été consacrées les études suivantes.

#### **IV. Conclusions du chapitre**

Au cours de ce chapitre, la démarche de mise au point d'un protocole pour adapter le substitut sous forme de feuillet à une coculture de cellules primaires humaines, cellules souches et endothéliales, a été présenté. Ce protocole a ensuite été validé par un essai sur des cellules provenant de 2 donneurs avant d'être appliqué pour une caractérisation complète sur 6 donneurs.

Il a été montré que la coculture en cassette au contact de granules de phosphate de calcium permettait la survie et l'activité des deux types cellulaires, avec un apport de leur mise en commun par rapport aux monocultures respectives pour plusieurs paramètres, notamment les marqueurs de la phase de production de matrice extracellulaire des ostéoblastes. La différenciation des CSM en ostéoblastes semble donc efficacement amorcée,

tout comme l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales. Nous avons donc validé ici une étape supplémentaire vers l'application clinique d'un substitut qui soit autologue et favorable à une néovascularisation. Ces aspects devront être confirmés par des essais *in vivo* chez le petit animal (insertion intramusculaire et sous-cutanée chez la souris).

La tenue mécanique des substituts, déjà limitée après culture d'une lignée de préostéoblastes, est apparue nettement insuffisante pour permettre la prise en main au cours d'une opération chirurgicale. Parmi les possibilités discutées pour l'améliorer, comme la hausse de la densité cellulaire à l'ensemencement ou l'utilisation de facteurs de croissance supplémentaires, il a été choisi pour la suite du présent travail d'étudier le développement d'un nouveau scaffold permettant de retrouver les mêmes avantages biologiques tout en améliorant les propriétés mécaniques du feuillet hybride. L'intérêt s'est porté vers les fibres de polymère obtenues par électrospinning.

# Chapitre 5 : Développement et utilisation de fibres électrospinnées pour l'ingénierie tissulaire

---

# Chapitre 5 : Développement et utilisation de fibres électrospinnées pour l'ingénierie tissulaire

## **I. Introduction**

Même si les indicateurs biologiques des substituts développés au cours ce travail étaient dans l'ensemble satisfaisants, il a été noté que leurs propriétés mécaniques étaient insuffisantes pour être manipulables sans risquer de les endommager. En effet, les essais de traction réalisés sur les tissus obtenus à partir de cellules de lignée ont montré une rupture pour une déformation et des forces engendrées trop faibles pour assurer un maintien pendant une opération chirurgicale. Les tests *in situ* sous MEB ont permis d'identifier les mécanismes de rupture, le tissu vivant supportant seul la charge et rompant entre les granules. Ce phénomène s'est trouvé accentué avec la coculture de cellules primaires, la cohésion des feuillets étant insuffisante pour permettre la caractérisation mécanique complète.

Afin de garantir l'intégrité mécanique des substituts, il était donc nécessaire d'en assurer les propriétés mécaniques avant même la maturation complète du tissu vivant et la production de MEC : cela implique que le support lui-même participe à la cohésion désirée. Il doit également être cohérent avec la forme déjà établie. Le choix s'est porté sur des tissus électrospinnés à partir de polymères biocompatibles. Fin et plat, résistant mais souple tel du papier, ce type de « scaffold » offre d'après l'étude bibliographique une importante versatilité concernant les polymères et les structures envisageables. Ce choix est ainsi justifié par les performances modulables de ce type de procédé, dépendantes des paramètres de fabrication détaillés au chapitre 1. Les fibres électrospinnées peuvent notamment garantir une porosité nécessaire à la colonisation cellulaire et une raideur du substitut permettant sa manipulation. L'obtention d'un scaffold par électrospinning pertinent pour l'ingénierie tissulaire osseuse, tant en termes de réponse cellulaire que de propriétés mécaniques, a donc constitué l'objectif de ce chapitre de résultats.

Le montage d'électrospinning réalisé au cours du présent travail de thèse et décrit au chapitre 2 a permis la fabrication de scaffolds à partir de plusieurs polymères. L'alcool polyvinylique, ou PVA, a été utilisé dans un premier temps pour la validation du dispositif. En effet, hydrosoluble et disponible en grande quantité, il a permis de conduire un travail par



essai-erreur sans être limité par le volume de solution ni contraint par les vapeurs de solvants forts. Après la mise en place d'un premier lot de paramètres permettant la formation stable d'un tapis de fibres, l'ajout d'un cylindre rotatif a conduit à l'obtention d'une surface homogène équivalente à celle des cassettes précédemment utilisées. Les paramètres pour l'inclusion de nanoparticules d'hydroxyapatite au sein du PVA puis pour la fabrication de fibres d'acide polylactique (PLA) ont également été étudiés, ce second matériau étant l'un des polymères les plus utilisés dans la littérature. L'ajout de ces particules devait apporter certains des avantages des CP déjà présentés plus haut, notamment l'hydrophobie (pour contrebalancer l'hydrosolubilité du PVA) et le potentiel d'ostéoconduction. A ces scaffolds préparés au laboratoire Roberval ont été comparés d'autres matériaux électrospinnés préparés par l'Institut de chimie et procédés pour l'énergie, l'environnement et la santé (ICPEES, UMR CNRS 7515, Strasbourg) et l'Institut für Mehrphasenprozesse (IMP) de l'Université d'Hanovre (Allemagne). Ils ont pour base le polycaprolactone (PCL), l'autre polymère le plus couramment utilisé pour ce type d'applications. La liste complète des polymères et leurs dénominations au cours de cette étude sont rapportées dans la Table 10 (se référer au chapitre 2 : Matériel et Méthodes pour le détail des procédés de fabrication).

<b>Scaffold</b>	<b>Dénomination</b>	<b>Provenance</b>
PVA	<b>PVA</b>	Fabriqué à l'UTC
PVA + 10% de nanoparticules d'HA 20nm	<b>PVA20</b>	Fabriqué à l'UTC
PVA + 5% de nanoparticules d'HA 60nm	<b>PVA60</b>	Fabriqué à l'UTC
PCL	<b>PCL</b>	ICPEES
PCL / gélatine	<b>PCLg</b>	IMP
PLA (solvant : chloroforme/acétone)	<b>PLA<sub>tc</sub>m</b>	Fabriqué à l'UTC
PLA (solvant : dichlorométhane/acétone)	<b>PLA<sub>dc</sub>m</b>	Fabriqué à l'UTC
PCL / PLA coaxiaux (PCL externe)	<b>PCL<sub>out</sub></b>	IMP
PCL / PLA coaxiaux (PCL interne)	<b>PCL<sub>in</sub></b>	IMP
PCL multicouches aléatoires	<b>PCL<sub>random</sub></b>	IMP
PCL multicouches, couches externes alignées	<b>PCL<sub>aligned</sub></b>	IMP

Table 10 : Liste des polymères électrospinnés étudiés.

Il convenait tout d'abord de permettre la production des fibres au laboratoire par la mise en place d'un montage complet, avant d'en ajuster les paramètres et de caractériser les

matériaux ainsi formés. Ceux-ci ont ensuite étéensemencés de cellules souches pour analyser en particulier leur potentiel de différenciation. Enfin, des essais préliminaires en conditions dynamiques, par l'application de contraintes cycliques en cours de culture, ont été conduits afin d'évaluer les synergies entre les signaux chimiques (scaffold) et mécaniques (contraintes appliquées) perçus par la cellule.

## II. Caractérisation des polymères électrospinnés

### 1) *Résultats*

#### ***Morphologie***

L'observation au MEB des scaffolds électrospinnés au MEB (Figure 49 à Figure 51) permet de constater qu'une morphologie optimale a pu être obtenue pour chacun des polymères testés, c'est-à-dire sans formation de perles le long des fibres. Celles-ci devaient être évitées afin de garantir des propriétés mécaniques et une porosité homogènes pour les scaffolds<sup>142</sup>.

On peut cependant remarquer quelques aspérités dans les fibres de PVA comportant des nanoparticules de 60 nm (PVA60, Figure 49), tout comme des irrégularités de certaines fibres de PCL (Figure 50) et localement dans le diamètre des fibres des scaffolds multicouches (PCLrandom et PCLaligned, Figure 51). Les PLAdcm et PLAtcm apparaissent légèrement moins denses, et les couches de fibres supérieures sont peu liées au reste du scaffold (Figure 50, PLAtcm, les fibres sont floues au premier plan). Il est à noter que ce comportement est visible sur certains échantillons à l'œil nu, ce qui donne alors au matériau un aspect « pelucheux ». De plus, les fibres de PLA, en particulier le PLAdcm, présentent une morphologie particulière qui apparaît rugueuse voire nanoporeuse à leur surface (Figure 50), ce qui a déjà été constaté dans la littérature pour ce polymère en particulier<sup>130,203</sup>.

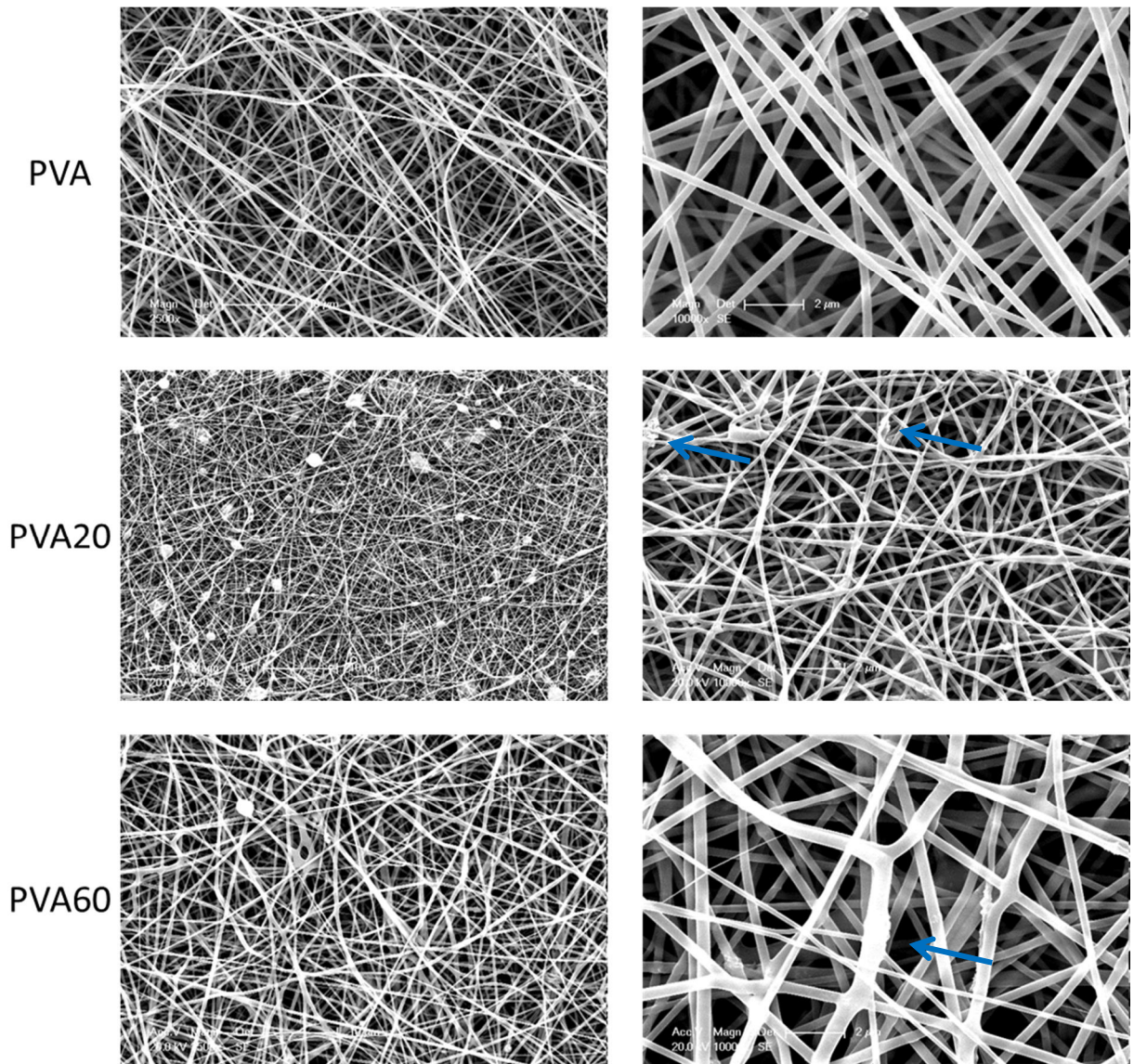


Figure 49 : Observation au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés à base de PVA (gauche : x2500, droite : x10000). Flèches : aspérités créées par la présence des nanoparticules.

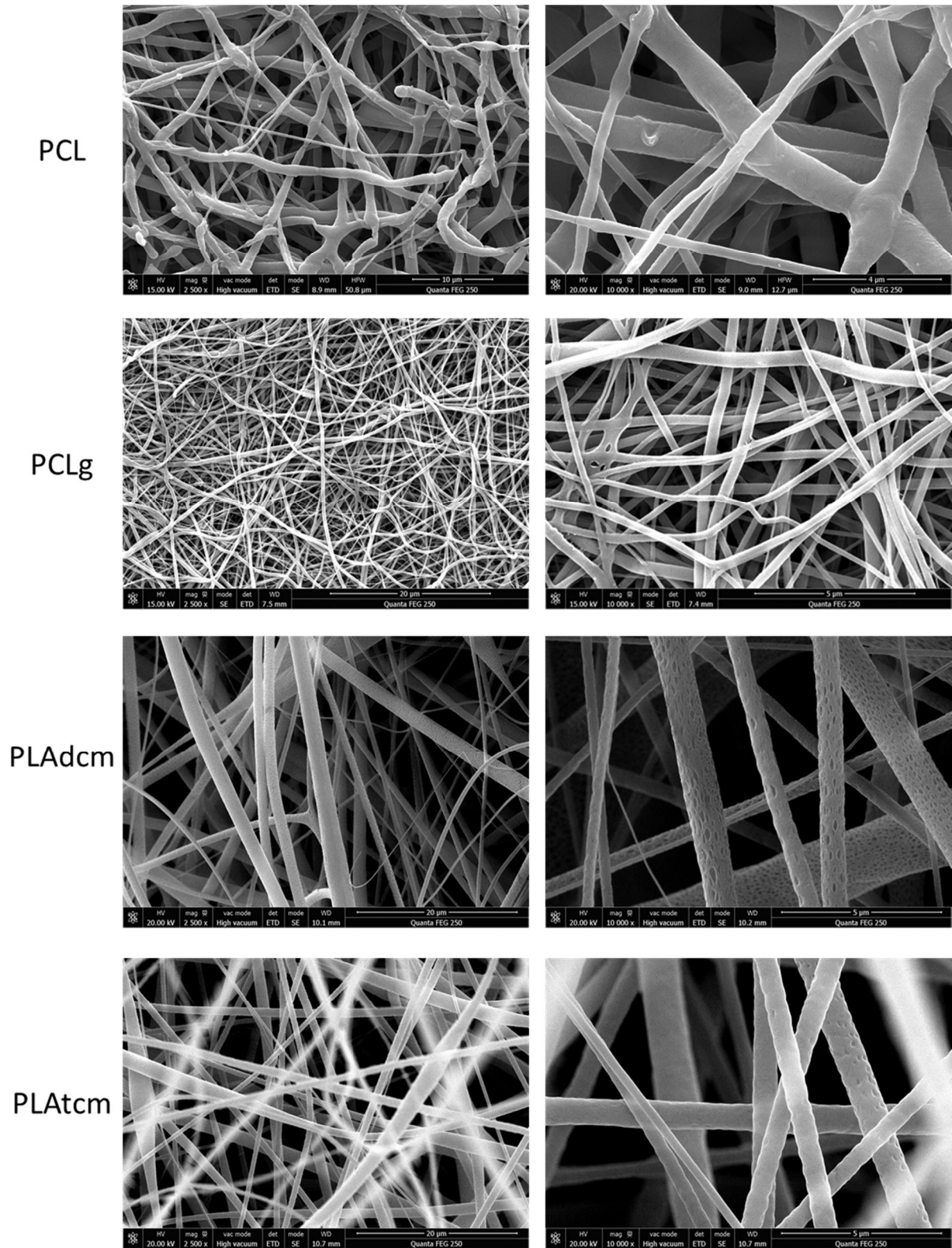


Figure 50 : Observation au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés à base de PCL et PLA  
(gauche : x2500, droite : x10000)

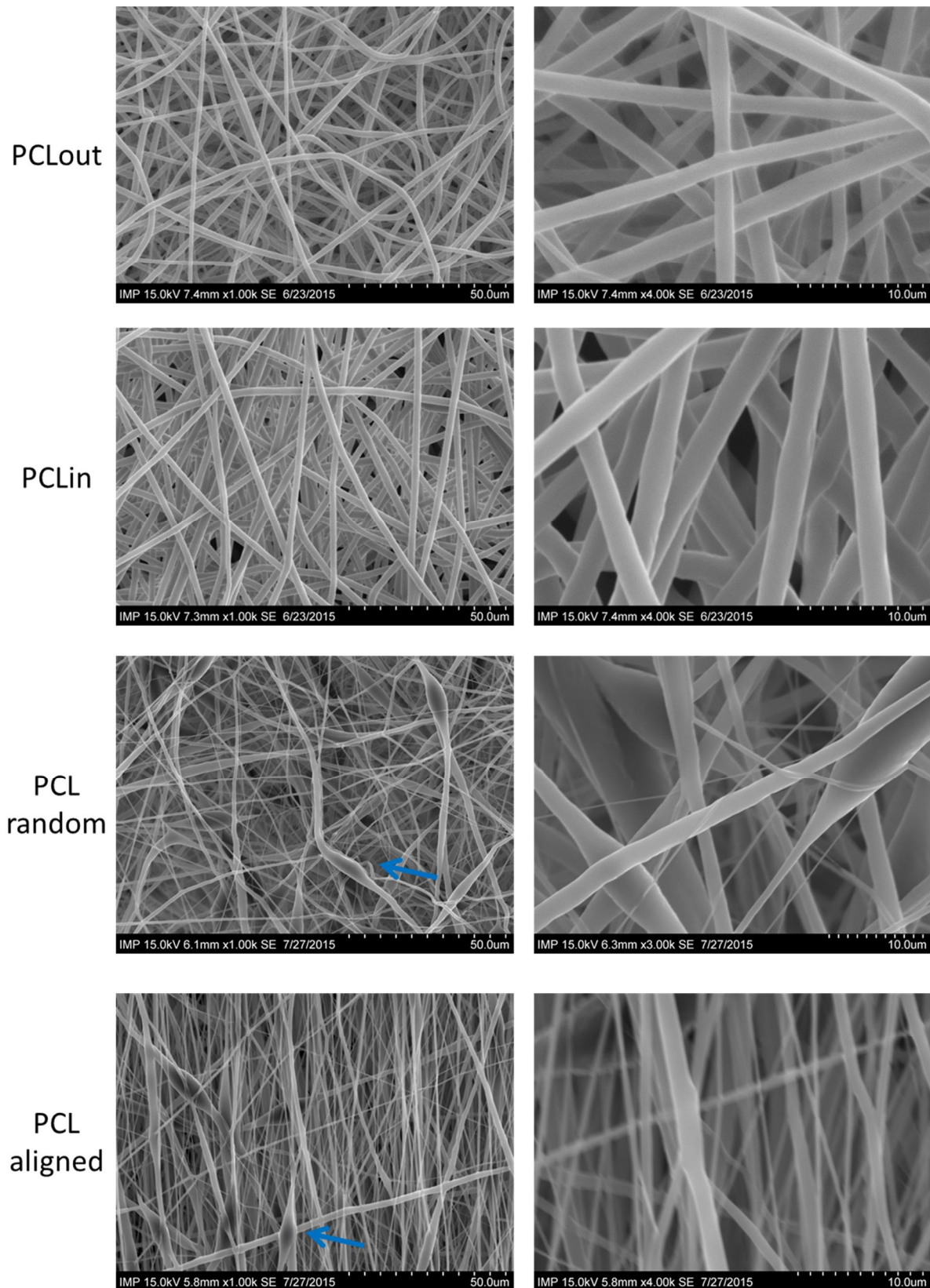


Figure 51 : Observation au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés coaxiaux et multicouches (gauche : x1000 droite : x4000). Flèches : irrégularités dans le diamètre des fibres.

Le caractère aléatoire du dépôt des fibres est constaté, la vitesse de rotation inférieure à 500rpm du cylindre ne permettant pas l'alignement mais seulement une meilleure homogénéisation du matériau. Une vitesse de 1000rpm a permis l'alignement des fibres dans le cas particulier du PCLaligned (Figure 51). Il n'est pas possible de distinguer au MEB la couche interne supposée aléatoire de ce scaffold.

### ***Diamètre des fibres***

Les images acquises au MEB ont permis d'analyser le diamètre moyen des fibres de chaque scaffold. Les résultats sont rapportés à la Figure 52.

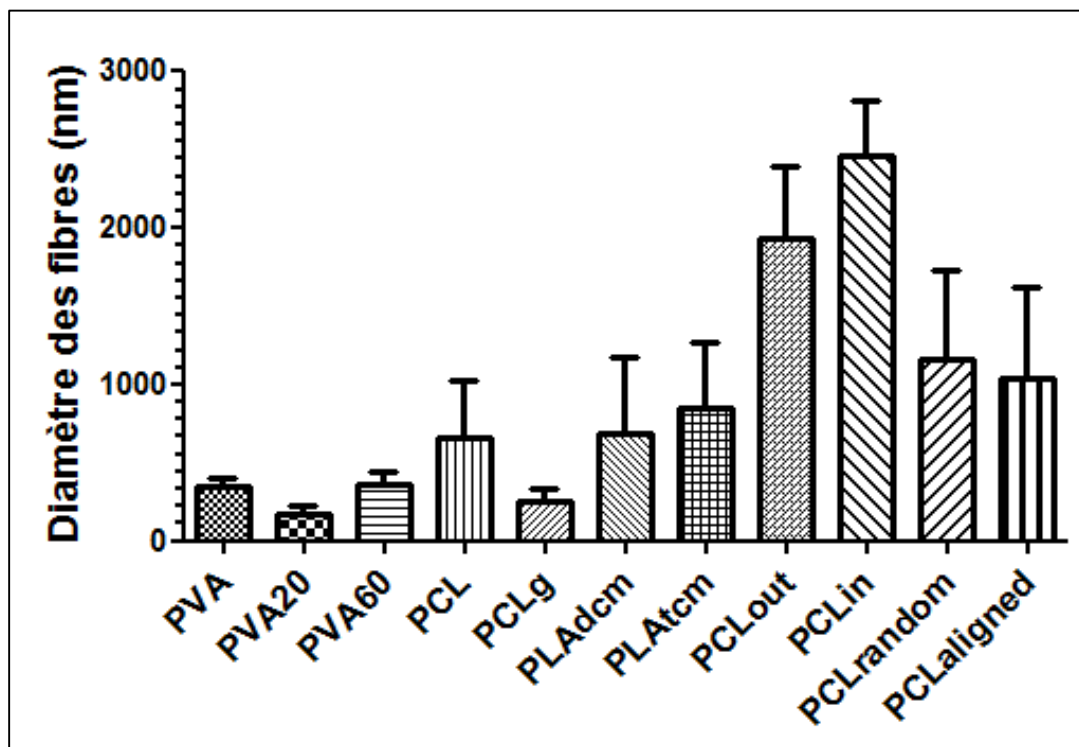


Figure 52 : Diamètre moyen des fibres des différents scaffolds électrospinnés.

Il est possible de distinguer trois groupes : le scaffold PCLg et ceux à base de PVA ont un diamètre de fibres inférieur à 500nm, le minimum étant de  $172 \pm 54$ nm pour le PVA20. Les scaffolds PCL et à base de PLA se situent entre 500 et 1000nm de diamètre. Les structures complexes (coaxiaux et multicouches) ont quant à eux un diamètre d'environ 1000nm ou supérieur, la valeur maximale étant atteinte par le PCLin avec  $2461 \pm 353$ . Il est à noter que les différents PVA, avec ou sans nanoparticules, n'ont pas montré de diamètres significativement

différents ( $p > 0,05$ ), de même pour ceux de PLAtcm et PLAdcm d'une part et PCLrandom et PCLaligned d'autre part. Les deux scaffolds coaxiaux (PCLin et PCLout) ont en revanche des diamètres différents ( $p < 0,001$ ).

### ***Inclusion de nanoparticules***

Parallèlement à l'acquisition d'image, l'utilisation du MEB sur les scaffolds à base de PVA a permis d'en analyser la composition par EDX en différents points des feuillets de fibres, afin de vérifier l'homogénéité de la répartition des nanoparticules d'hydroxyapatite. En effet, si celles-ci sont convenablement mélangées dans la solution de PVA et que l'homogénéité est conservée pendant le procédé de fabrication, l'amplitude des pics du spectre EDX caractéristiques du phosphore et du calcium dont elles sont formées doit être similaire en tout point du matériau.

Afin de comparer les différentes mesures, les spectres ont été normalisés par le taux de carbone inhérent au PVA (de formule  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]_n$ ) avant d'être superposés. On remarque effectivement sur les Figure 53 (PVA20) et Figure 54 (PVA60) deux pics principaux à 0.277 et 0.525 keV correspondant au carbone (C) et à l'oxygène (O). Les éléments phosphore (P, 2.013 keV) et calcium (Ca, 3.690 keV) apparaissent clairement, les spectres des différentes localisations analysées le long du même scaffold se superposant parfaitement sans qu'il soit possible de les distinguer. La présence des nanoparticules a donc été vérifiée et leur répartition macroscopique apparaît homogène. La différence entre les proportions de nanoparticules, respectivement de 10% et 5% pour les scaffolds PVA20 et PVA60, est également confirmée par la différence d'amplitude des pics entre les deux cas : de 0,4 cps/eV pour le cas 10%, elle baisse sous les 0,2 cps/eV pour le cas 5%.

On remarque aussi, à une faible amplitude, le pic caractéristique de l'aluminium (Al, 1.486 keV) qui sert de support à la production des fibres et dont il reste donc quelques résidus après détachement du matériau.

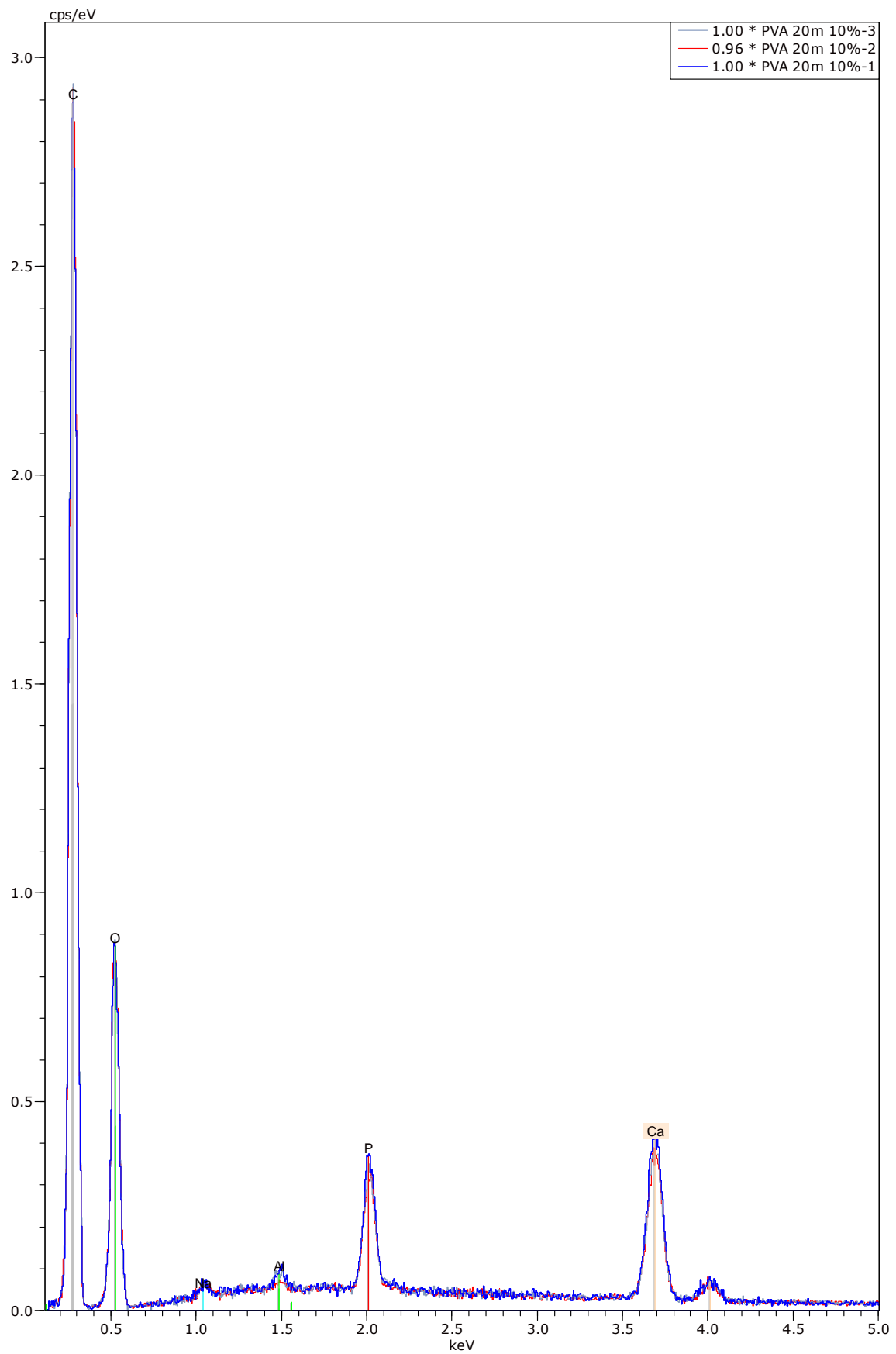


Figure 53 : Analyse par EDX de la composition d'un scaffold PVA20, superposition des mesures en 3 points différents après normalisation par le taux de carbone.



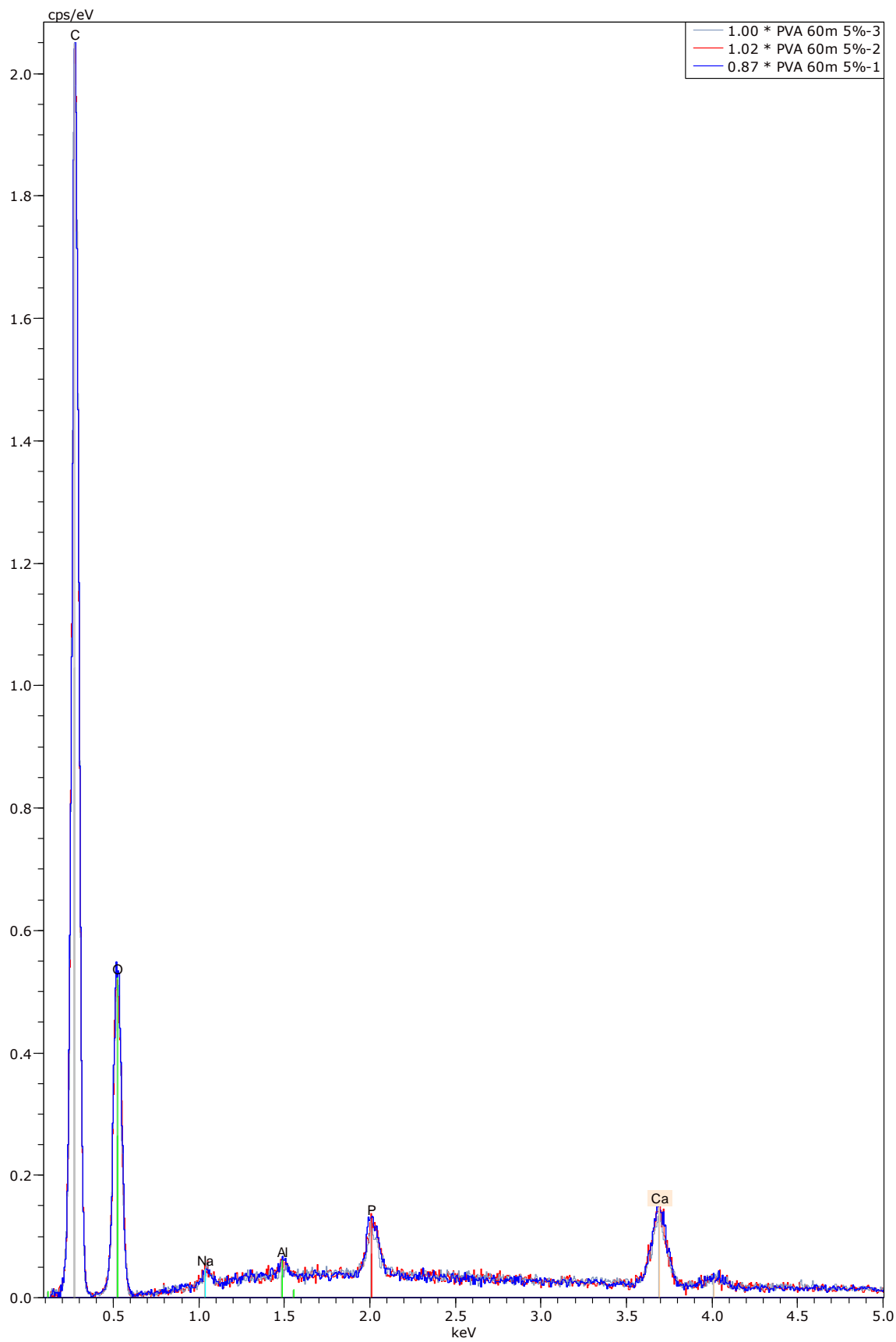


Figure 54 : Analyse par EDX de la composition d'un scaffold PVA60, superposition des mesures en 3 points différents après normalisation par le taux de carbone.

L'homogénéité a également été analysée à l'échelle nanométrique en observant la répartition des nanoparticules au sein des fibres par microscopie électronique à transmission (MET, Figure 55). Le cas PVA20 (10% de nanoparticules 20nm) présente de nombreux agrégats de petite ou moyenne taille répartis le long des fibres, les plus gros affleurant à la surface et les déformant. Le cas PVA60 (5% de nanoparticules 60nm) montre moins d'agrégats, en général de petites tailles, et plus de particules isolées. Dans le cas général, l'hydroxyapatite est répartie de façon homogène tout au long des fibres quel que soit l'échantillon. L'effet des différences de morphologie entre les deux configurations sur les propriétés biologiques et mécaniques des tissus sera traité dans les paragraphes suivants.

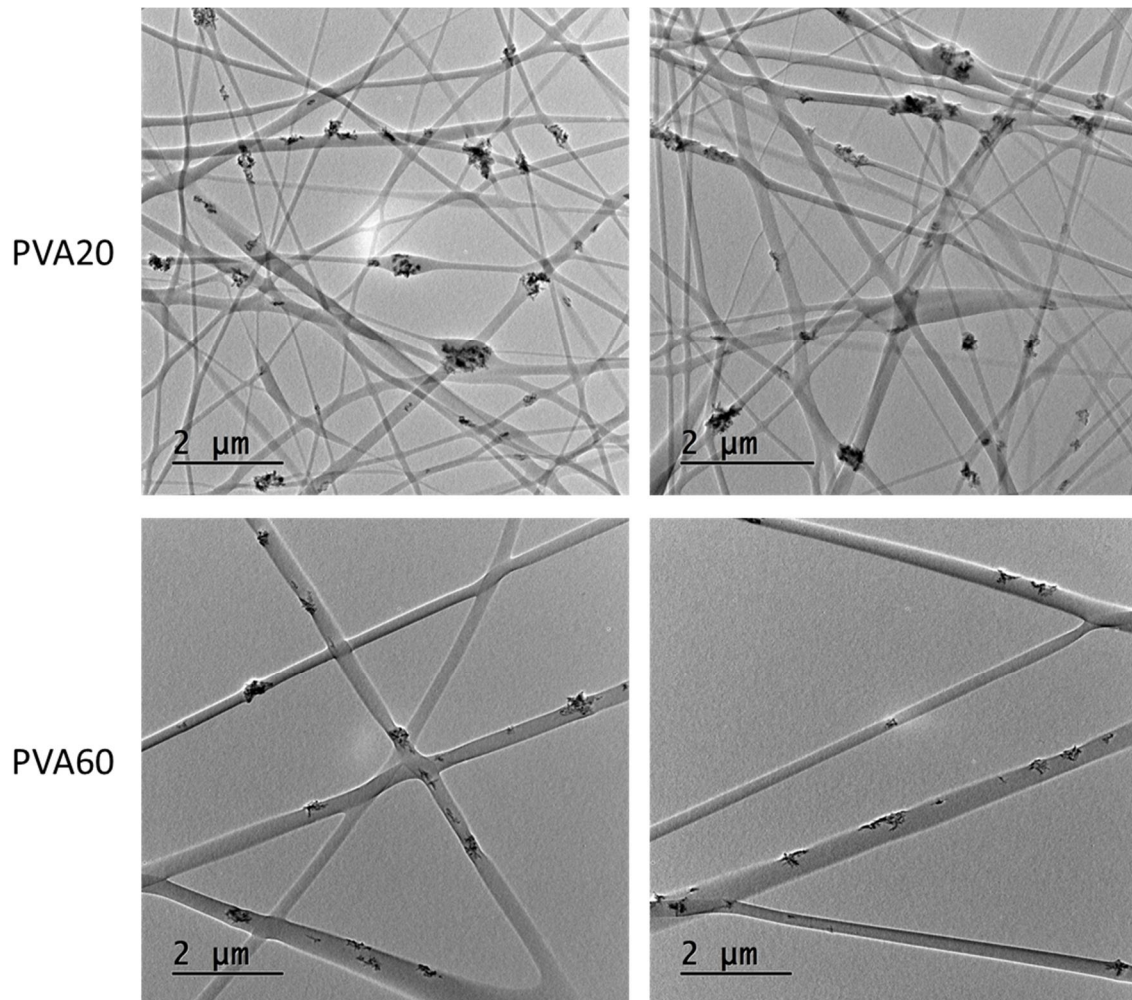


Figure 55 : Observation par microscopie électronique à transmission de la répartition des nanoparticules au sein des fibres de PVA.

## ***Elasticité***

Le module de Young de chaque matériau a été mesuré au cours de essais de traction sur des scaffolds secs, humidifiés immédiatement avant l'essai ou immergés dans l'eau déminéralisée pendant 5 jours, c'est-à-dire pour ce dernier cas dans les conditions environnementales envisagées pour les premières cultures cellulaires. Ces trois humidifications différentes sont désignées respectivement par J0 sec, J0 humide et J5 humide. Rappelons qu'il s'agit de modules estimés à partir de l'épaisseur de chaque échantillon pour permettre une comparaison entre les différents scaffolds, la porosité n'étant pas prise en compte. De plus, cette épaisseur n'a été mesurée qu'au pied à coulisse (pas de 0,1mm). Le recours à des cryocoupes des réseaux de fibres observées au MEB permettrait d'affiner les résultats avec une meilleure précision.

La Figure 56 présente les résultats des mesures effectuées à J0 sec. On distingue trois groupes différents. Les modules de Young des scaffolds à base de PVA (environ 120 à 350 MPa) sont significativement différents ( $p < 0.001$ ) de ceux de tous les autres polymères. Parmi ces derniers, le module de PCLout (environ 60 MPa,  $p < 0.001$  ou  $p < 0.01$ ) diffère lui-même des autres (environ 13 à 30 MPa). Il est à noter que les valeurs ne sont pas significativement différentes entre PVA et PVA20 (ajout de 10% de nanoparticules de 20 nm), PCLout et PCLin (structures coaxiales différentes) ainsi que PLAdcm et PLAtcm (différence de solvant). En revanche, l'addition de 5% de nanoparticules de 60 nm (PVA60) a significativement augmenté la rigidité du PVA électrospinné ( $p < 0.001$ ).

La comparaison entre les différentes conditions d'humidification est rapportée pour chaque scaffold sur la Figure 57. Pour l'ensemble des cas, aucune différence significative n'a été constatée entre J0 humide et J5 humide. L'humidification immédiate (différence entre J0 sec et J0 humide) n'a eu également aucun effet sur la majorité des matériaux (notés N.S. sur la figure).

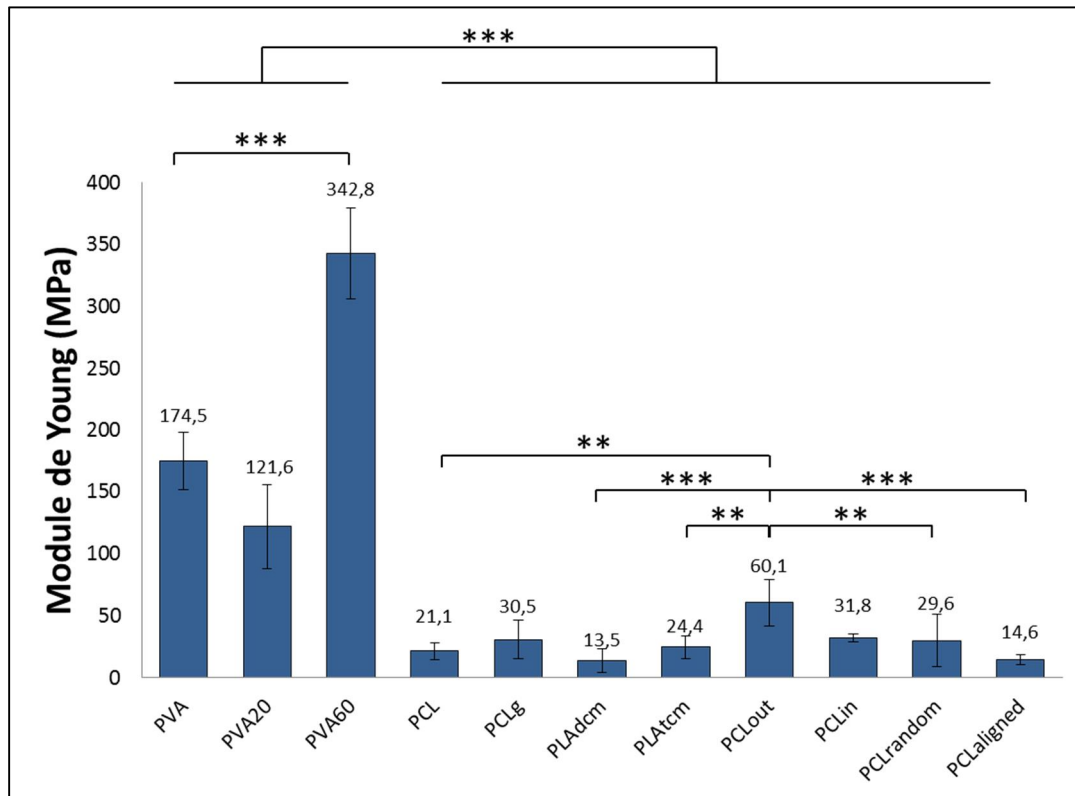


Figure 56 : Modules de Young des scaffolds électrospinnés mesurés sur échantillons secs (J0 sec, \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

Le détail des cas pour lesquels l'humidification a engendré une modification de la rigidité est présenté sur la Figure 58. On constate une importante diminution du module de Young ( $p < 0.001$ ) dans les cas du PCLg et des scaffolds à base de PVA. Il est à noter que le PCL sans additif ne présente pas cette baisse. L'ajout de nanoparticules n'a pas modifié l'influence de l'humidification (résultats non significatifs entre PVA, PVA20 et PVA60 à J0 humide, et J5 humide). Les variations du PCLaligned sont totalement opposées et *a priori* inattendues puisque la rigidité a augmenté avec l'humidification des échantillons ( $p < 0.01$  pour J0 humide et  $p < 0.001$  pour J5 humide).

### Angle de contact

L'angle de contact entre les tapis de fibres et une goutte d'eau déposée a été mesuré pour chaque matériau électrospinné. Il est à noter que les scaffolds de PLA présentant un aspect pelucheux, ils ont été doucement « lissés » à l'aide d'une pince afin de faire apparaître une surface plane et de pouvoir effectuer efficacement les mesures. Les résultats sont rassemblés sur la Figure 59.

Un angle de 0° indique que la goutte était totalement et instantanément absorbée par le matériau, rendant impossible la mesure (ces cas n'ont donc pas été inclus dans l'analyse statistique). Ce comportement hydrophile a été observé pour le PVA pur et le PVA60 ainsi que pour le PVA20 et le PCLg pour plusieurs répliques. Ces deux derniers cas ont donc présenté des angles faibles lorsque la goutte restait visible (respectivement 34,9° et 44,1° en moyenne, résultats significativement différents de tous les autres). Les autres scaffolds à base de PCL et/ou PLA ont montré un profil hydrophobe avec des valeurs d'angle de contact de 122,7° pour le PLAtcm à 130,0° pour le PCLout, valeur la plus importante.

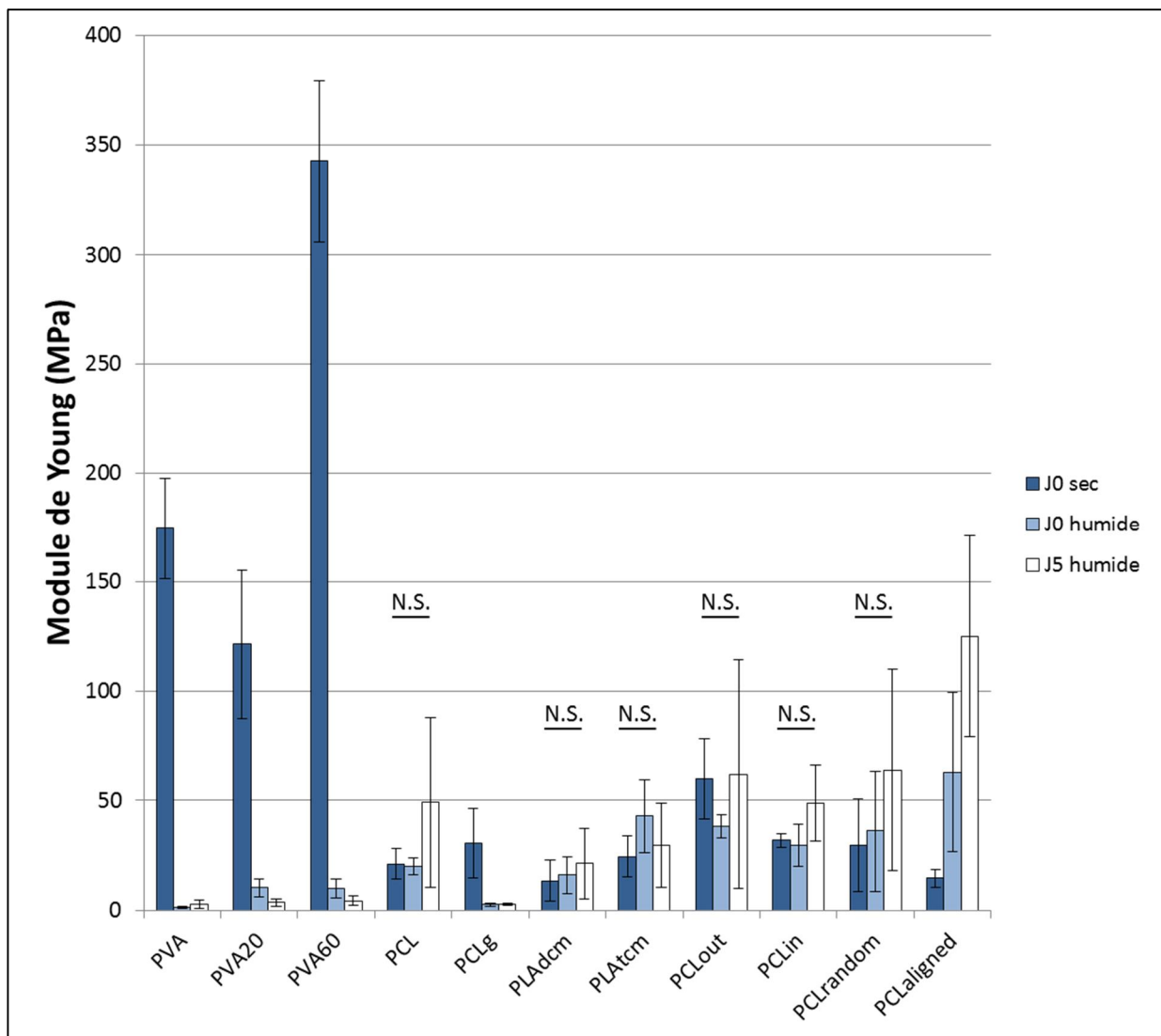


Figure 57 : Modules de Young des scaffolds électrospinnés mesurés sur échantillons secs ou humides (N.S. = Non significatif).

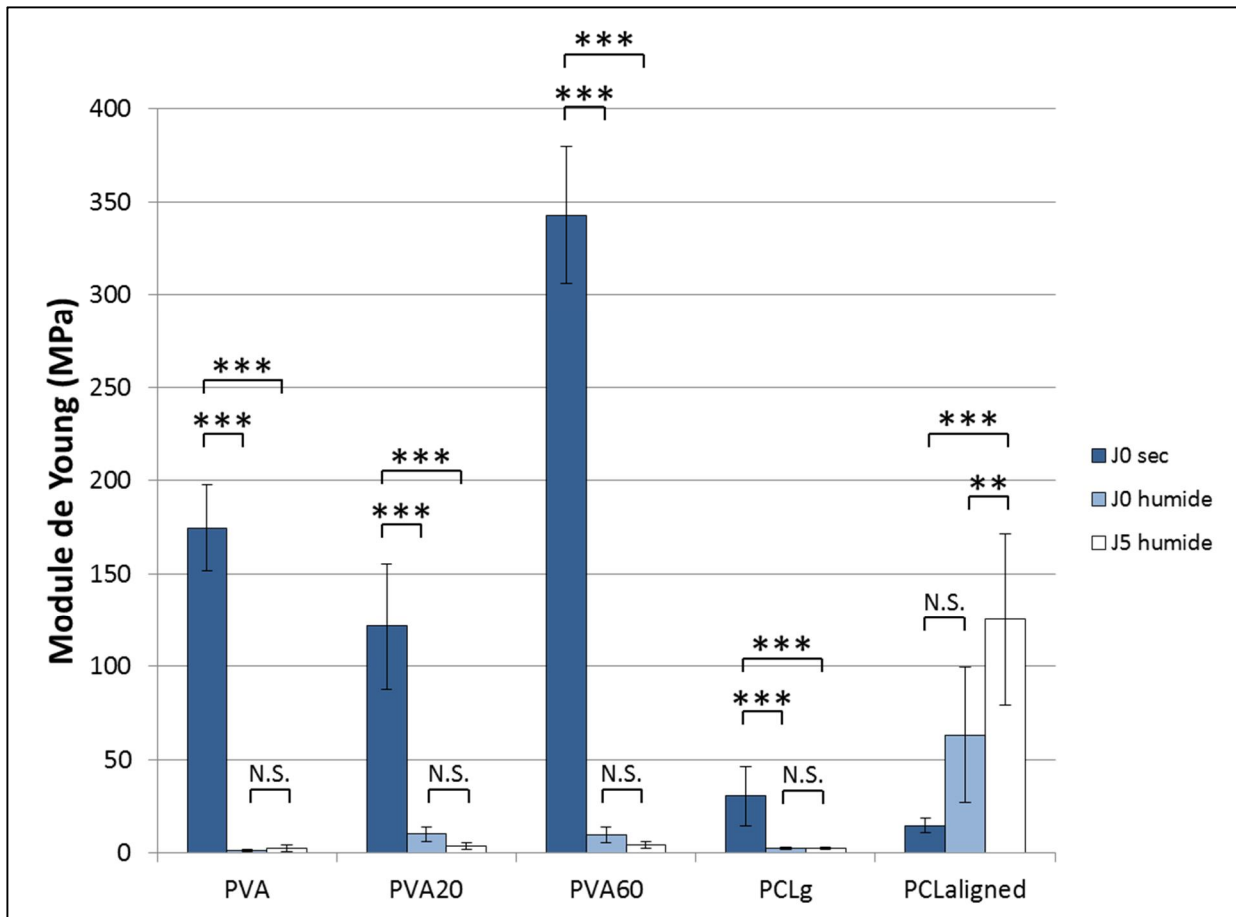


Figure 58 : Modules de Young des scaffolds électrospinnés mesurés sur échantillons secs ou humides avec effet de l'humidification (\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ , N.S. = Non significatif).

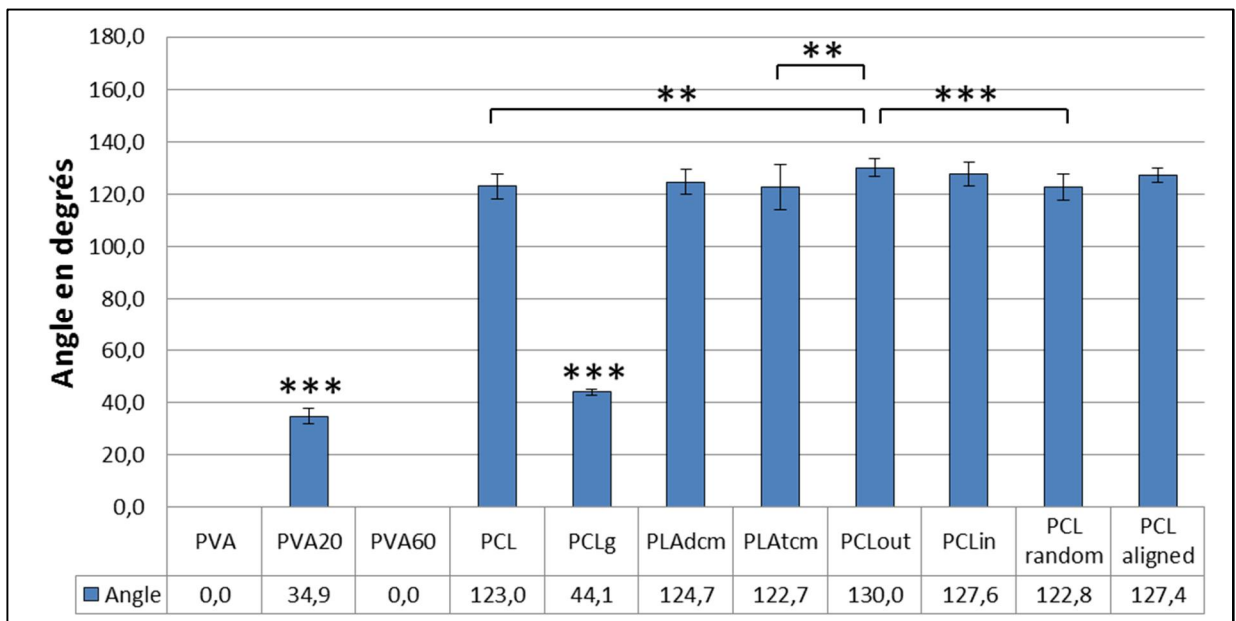


Figure 59 : Angle de contact mesuré pour chaque scaffold électrospinné (\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

## **Porosité**

Les résultats de l'estimation de la porosité par analyse des images MEB sont rapportés à la Figure 60. Les images originales sont transformées en images binaires (noir et blanc sans niveaux de gris) en fonction de différents seuils. Au-dessus du seuil, les pixels sont changés en pixels blancs (présence de matériau) et en-dessous, en pixels noirs (pores entre les fibres). Le rapport entre pixels noirs et pixels blancs permet alors d'obtenir une porosité estimée du scaffold électrospinné.

Le seuil  $\mu_+$  montre les porosités les plus hautes car il ne prend en compte que les couches de fibres supérieures après binarisation des images. La majorité des scaffolds présente des valeurs comprises entre 80 et 84% de porosité. On distingue cependant des valeurs plus faibles pour les réseaux de fibres à base de PVA, et une valeur maximale pour le PCL pur.

Le seuil  $\mu$  permet d'évaluer la porosité pour les fibres supérieures et intermédiaires, d'où des résultats plus faibles que le seuil précédent. On a ici une répartition sans tendance précise entre 47 et 54%. Le PLAtcm présente la plus forte variation entre les deux seuils, ce qui peut s'expliquer par les fibres « pelucheuses » qui ont pu modifier les valeurs  $\mu$  et de l'histogramme (écart plus important entre les fibres supérieures et les fibres intermédiaires). Le PCLrandom conserve une porosité haute par rapport aux autres scaffolds.

Le seuil minimum permet de prendre en compte la quasi-totalité des fibres apparentes, la porosité était donc la plus faible dans ce cas. On constate principalement une baisse importante pour les scaffolds à structure complexe, qui sont désormais ceux présentant la porosité la plus faible.

Il est à noter que la plupart des écarts entre les différents matériaux sont statistiquement significatifs, notamment entre les scaffolds à base de PVA et ceux à structure complexe (de  $p < 0,05$  à  $p < 0,0001$ , ANOVA). Les informations de significativité n'ont cependant pas été rapportées sur les figures par souci de lisibilité.

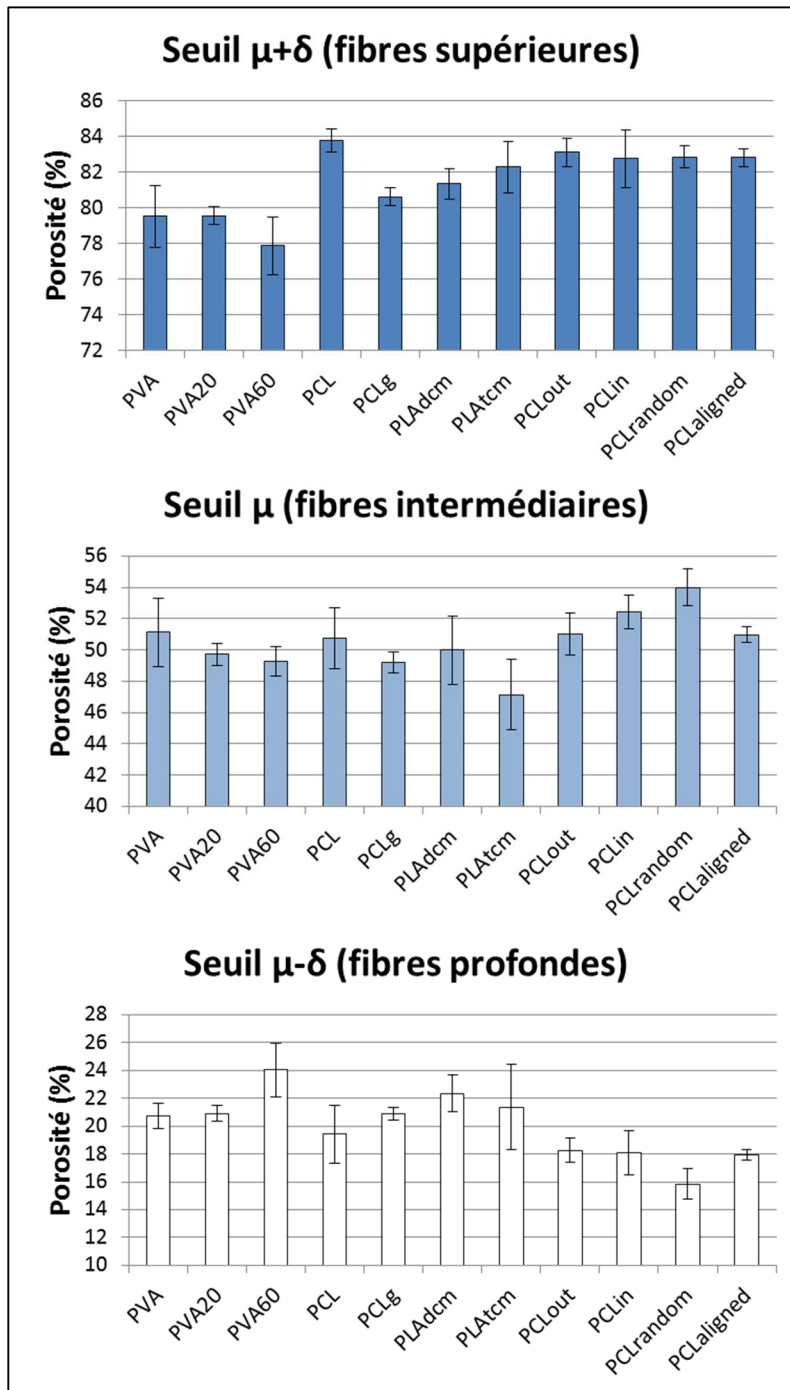


Figure 60 : Estimation de la porosité par analyse d'images pour les différents scaffolds électrospinnés et pour différents seuils de binarisation.

## 2) Discussion

L'ensemble des résultats montre que les scaffolds électrospinnés étudiés ont tous été efficacement produits à partir de paramètres techniques optimaux permettant d'obtenir la morphologie souhaitée, c'est-à-dire un réseau de fibres de polymère homogène et non perlé,



même dans le cas de mélanges ou d'inclusions. Ces résultats sont discutés au regard de la bibliographie effectuée au chapitre 1 concernant l'utilisation de l'électrospinning pour l'ingénierie tissulaire. On trouvera à la Table 11 un résumé des références les plus pertinentes pour l'analyse.

Dans le cas de l'ajout de nanoparticules d'hydroxyapatite, l'homogénéité a été vérifiée à l'échelle du matériau entier (EDX, Figure 53 et Figure 54) comme à l'échelle nanoscopique (TEM, Figure 55), mais la morphologie des fibres est parfois légèrement modifiée en fonction du pourcentage utilisé, ce que l'on retrouve dans la littérature<sup>90,151</sup>. La présence d'agrégats affleurant suspectée après les observations MEB (Figure 49) a ainsi été confirmée au TEM. Les mesures d'angle de contact ont montré que l'ajout de 10% de nanoparticules de 20 nm a permis de légèrement nuancer le caractère hydrophile du PVA, mais ces scaffolds montrent cependant une mouillabilité beaucoup plus forte que ceux à base de PCL ou de PLA purs.

Comme attendu, l'utilisation d'un collecteur sous la forme d'un cylindre rotatif à faible vitesse (<500rpm) a permis une homogénéisation du tapis de fibre sans alignement<sup>90,93,96</sup>, et l'utilisation d'une vitesse de 1000 rpm pour les couches externes a permis l'alignement du cas PCL aligné. Il a été montré que l'utilisation de scaffolds présentant une structure alignée permettait d'orienter fortement la différenciation des cellules<sup>90,140</sup>, en particulier dans le cas de neurones et de fibroblastes<sup>140</sup>, mais aussi dans le cas de l'os, tissu anisotrope<sup>90</sup>. L'obtention d'un substitut anisotrope ne faisait cependant pas partie des objectifs principaux du présent travail, le feuillet devant s'adapter à tous les cas de petites géométries de zones à soigner (au besoin en le repliant). L'analyse d'un cas aligné demeure tout de même intéressante pour en étudier l'influence sur la différenciation des CSM, ainsi que les possibilités de bifurquer de la voie osseuse vers, notamment, la voie du tendon, en conservant le même polymère électrospinné mais en modifiant sa structure.

Les différents scaffolds présentent des diamètres de fibre variables de l'un à l'autre, ce qui pourra exercer par la suite une influence sur l'adhésion et la prolifération des cellules<sup>203</sup>, de même que les valeurs de porosité estimées par analyse d'images. Si ces valeurs ne sont que des estimations qu'il est difficile de relier à d'autres méthodes telle la porosimétrie au mercure<sup>198</sup>, elles pourront être utiles pour comparer relativement les scaffolds entre eux. Les effets de surface étant prépondérant dans la réponse des cellules face au support de culture, on pourra analyser principalement le seuil  $\mu+$  correspondant à la porosité des couches externes de fibres. Dans le cadre général, pour les diamètres, les ordres de grandeur sont les mêmes que dans la littérature étudiée (Table 11). Il conviendra d'étudier également l'influence de la

nature du polymère, de l'inclusion des nanoparticules et de l'élasticité des matériaux. Sur ce dernier point, parmi les trois différents groupes dégagés par la mesure du module de Young, le maintien après humidification des propriétés mécaniques des scaffolds autres qu'à base de PVA et PCLg en fait de bons candidats pour la formation par ingénierie tissulaire d'un feuillet maintenu et résistant. Les mesures d'angle de contact ont en effet montré une faible mouillabilité pour ces matériaux (PCL, PLAtcm, PLAdcm et structures complexes), la gélatine ayant apporté une importante hydrophilie au scaffold PCLg. Les résultats de culture cellulaire seront à étudier au regard de ces différentes valeurs d'élasticité. On observe dans la littérature une grande variété pour ces valeurs, parfois au sein d'une même étude (Table 11). Les modules de Young rapportés vont de 8,4 kPa à 2840 MPa, cette variabilité pouvant s'expliquer par le grand nombre de paramètres différents permettant la production des scaffolds. Dans notre cas, les modules estimés (environ 13 à 340 MPa) recourent les valeurs de la littérature en se situant dans des gammes moyennes à faibles. Ils sont ainsi éloignés du comportement de l'os natif, qu'il soit cortical (16 - 20 GPa)<sup>55</sup> ou spongieux (4,6 - 15 GPa)<sup>55,56</sup>. Cependant, rappelons que nous ne cherchons pas ici à mimer directement le comportement mécanique de l'os, mais à obtenir une réponse cellulaire adéquate tout en assurant un ressenti satisfaisant aux chirurgiens lors de l'utilisation des substituts. Après avoir fait manipuler à des praticiens différents échantillons, ceux présentant un module de Young d'environ 80 MPa ont été jugés comme un bon compromis entre risque de déchirement et rigidité importante. La moyenne générale du module de Young de tous les matériaux secs étant de 78,6 MPa, les scaffolds présentés ici sont donc d'un point de vue général pertinents concernant les attentes de maniabilité des chirurgiens. Cela suppose qu'ils conservent leur propriétés mécaniques une fois immergés, ce qui est bien le cas pour plusieurs d'entre eux (Figure 57). L'influence de la présence du tissu cellulaire, créant un équilibre entre renforcement (production de matrice) et fragilisation (dégradation du scaffold par les cellules) devra être prise en compte mais pourrait être négligeable après 5 jours.

On retrouve dans plusieurs références un lien entre diamètre des fibres et module de Young, une baisse du premier paramètre impliquant une hausse du second<sup>142,203,205</sup>. Si l'absence de significativité de certains cas (Figure 52 et Figure 56) ne permet pas de conclure directement, la tendance générale des résultats obtenus ici semble confirmer cette corrélation. Il en est de même pour l'amélioration des propriétés mécaniques par l'ajout de gélatine dans un scaffold de PCL<sup>88,204</sup>.

Il est à noter qu'aucune différence significative n'a été relevée entre les cas J0 humide et J5 humide, soulignant que la dégradation des scaffolds en milieu humide pendant 5 jours était limitée et n'affectait pas les propriétés mécaniques. S'il est souhaitable que les substituts soient biorésorbables à long terme afin d'être remplacés *in vivo* par le tissu néoformé, il est toutefois positif que leur cohésion mécanique soit maintenue au cours de la culture *in vitro* et jusqu'à l'opération pour en assurer la maniabilité. La différence de solvant entre les deux cas de PLA n'a pas non plus montré d'influence. L'ajout de gélatine, hydrophile<sup>206,207</sup>, a drastiquement modifié la rigidité des fibres électrospinnées à base de PCL, non affectées par l'humidification quand utilisé pur. Le comportement des matériaux à base de PVA après humidification était attendu, ce polymère étant hydrophile et hydrosoluble à basse température<sup>6</sup>, de même que les modifications de l'élasticité dues à l'ajout de nanoparticules. En effet, il a été rapporté qu'une faible proportion de nanoparticules dans des fibres électrospinnées (<10%) pouvait jouer le rôle d'un « nanorenforcement », augmentant le module de Young, mais qu'un pourcentage plus important (>10 - 20%) altérerait ensuite les propriétés mécaniques du scaffold<sup>90</sup>. On retrouve ici ces résultats pour les mêmes ordres de grandeur, même si la baisse n'est pas apparue statistiquement significative.

Toujours concernant le comportement en traction, les structures complexes (coaxiales ou multicouches) ont présenté une très grande variabilité après 5 jours en milieu humide. Une augmentation significative de la rigidité après humidification a même été notée pour le PCL aligné. L'augmentation du module de Young après humidification a déjà été montrée pour certains cas particuliers de copolymères possédant une combinaison de segments hydrophiles et hydrophobes<sup>208</sup>, mais n'a pas été rapportée à notre connaissance pour l'électrospinning et le PLA. L'augmentation n'était, de plus, pas significative pour les autres scaffolds utilisant ce matériau. D'autres études seront donc nécessaires pour tenter d'expliquer ce résultat en réduisant la variabilité et/ou en déterminant ses causes, afin de le rectifier ou de le valider. Dans le cas des géométries complexes, les écarts pourraient s'expliquer par une mauvaise liaison entre les différentes couches de fibres ayant parfois provoqué des glissements perturbant les tractions, par une plus grande hétérogénéité des scaffolds entre le centre et les bords des tapis de fibres, ou par une répétabilité plus difficile de ces procédés. L'étude du relargage à court, moyen et long terme des nanoparticules par analyse de la composition du milieu après culture sera également nécessaire avant d'envisager des tests *in vivo* et des perspectives cliniques.

Article	Polymère principal	Additifs	Diamètre fibres	Module de Young	Structure des fibres	Application visée	Résultats
Carlisle 2009	Fibronectine	/	208nm	7,2MPa	Aléatoires	Caractérisation mécanique	Faisabilité d'une technique à base de microscopie à force atomique.
Huang 2004	Gélatine	/	100 à 1900nm	117 à 174MPa	Aléatoires	Choix concentration	Les billes affaiblissent le comportement mécanique ; les fibres fines l'augmentent.
Croisier 2012	PCL	/	250 à 700nm	3,8MPa	Aléatoires	Caractérisation mécanique	Caractérisation mécanique également d'une fibre unique.
Fujihara 2005	PCL	Nanoparticules de carbonate de calcium	600 à 900nm	/ (projection des fibres sur une membrane)	Aléatoires	Régénération osseuse	Potentiel pour l'adhésion et la prolifération de cellules osseuses (lignée).
Shin 2004	PCL	/	100 à 5000nm	/	Aléatoires	Régénération osseuse	Adhésion, prolifération, minéralisation et production de collagène I par des CSM détectées.
Yoshimoto 2003	PCL	/	400nm	/	Aléatoires	Régénération osseuse	Adhésion, prolifération, minéralisation et production de collagène I par des CSM détectées.
Son 2013	PCL	PMMA	1980 à 2400nm	/	Aléatoires	Régénération osseuse	Augmentation du diamètre et amélioration des propriétés mécaniques avec ajout de PMMA; validation du potentiel pour la régénération osseuse
Venugopal 2008	PCL	Nanoparticules HA et gélatine	411 à 856nm	3,9 à 28,7MPa	Aléatoires	Régénération osseuse	Apport des nanoparticules et de la gélatine sur la culture de cellules osseuses de lignée (prolifération, activité PAL, minéralisation) ; Augmentation des propriétés mécaniques avec ajout de gélatine seule.
Grey 2013	PCL	/	Gradient de 250 à 1000nm	/	Aléatoires ou alignées	Fabrication et caractérisation	Validation de matériaux avec gradient de taille de fibres.
Lee 2008	PCL	Gélatine	200 à 1300nm	8,4 à 500kPa	Aléatoires	Fabrication et caractérisation	Baisse du diamètre et augmentation des propriétés mécaniques avec ajout de gélatine.
Bonani 2011	PCL / fibroïne (multicouche)	/	192 à 421nm	5 à 15MPa (nombreux cas différents)	Alignées	Caractérisation mécanique	Influence de l'alignement sur les propriétés mécaniques ; anisotropie.
Kwon 2005	PCL/PLLA (mélanges)	/	4300 à 7000nm	0,8 à 17,2MPa	Aléatoires	Caractérisation et potentiel clinique	Augmentation des propriétés mécaniques avec la baisse du diamètre ; meilleure prolifération de cellules endothéliales sur fibres fines.
Kenawy 2003	PEVOH	/	200 à 800nm	/	Aléatoires	Fabrication	Validation
Wittmer 2014	PLA	Microparticules de PEO ou PCL	500nm	2MPa (structuré), 17MPa (PLA simple)	Aléatoire / nanostructurés (nid d'abeille)	Fabrication et caractérisation	Validation de la production et des propriétés mécaniques
Lee 2010	PLGA	Nanoparticules HA	600 à 800nm	/	Aléatoires	Régénération osseuse	Apport des nanoparticules sur la culture de CSM (activité PAL, gènes ostéogéniques, minéralisation) sans baisse de viabilité.
Zhang 2010	PLGA	Nanotubes de carbone, nanoparticules HA	503 à 1257nm	/	Aléatoires	Régénération osseuse	Apport des nanoparticules sur la culture de CSM (prolifération, viabilité)
Jose 2009	PLGA	Nanoparticules HA	300 à 700nm	724MPa (maximum)	Alignées	Caractérisation mécanique	Augmentation du diamètre avec ajout des nanoparticules ; propriétés mécaniques optimales pour une concentration intermédiaire donnée en nanoparticules.
Lee 2013	PLLA	Revêtement polydopamine	env. 1000µm	/	Aléatoires ou alignées	Régénération osseuse	Synergie alignement et revêtement
Chuangchote 2006	PVA	/	340nm	480 à 2840MPa	Alignées	Fabrication et caractérisation	Validation
Song 2012	PVA	Collagène, nanoparticules HA	362 à 552nm	1 à 100MPa	Aléatoires	Potentiel comme revêtement d'implants	Variations du diamètre avec la teneur en HA ; augmentation du module de Young avec augmentation de la concentration en HA.

Table 11 : Articles cités au chapitre 1 caractérisant et exploitant des fibres électrospinnées.

### 3) Conclusions

On se proposait ici d'étudier et analyser la morphologie et l'élasticité de différents scaffolds électrospinnés. Les observations ont montré que les réseaux de fibres avaient tous été produits à l'aide de paramètres optimaux permettant d'éviter la formation de perles ou une inhomogénéité. Outre la nature du polymère et la structure, ils présentent des différences significatives concernant le diamètre des fibres et la rigidité mécanique. Ils seront donc tous utilisés pour des étapes de culture cellulaire afin d'analyser l'influence de ces paramètres sur la réponse cellulaire, en particulier l'adhésion, la prolifération et la différenciation des CSM. Le PVA, originellement choisi pour la validation technique du montage, sera donc conservé car l'ajout de nanoparticules et son module de Young à sec le rendent nettement différent des autres matériaux. La littérature souligne également le potentiel des composites à base de PVA pour la culture de cellules osseuses<sup>151</sup>.

## III. Culture statique sur fibres électrospinnées

### 1) Introduction

Les scaffolds électrospinnés présentent donc de nombreuses différences susceptibles d'influer sur la réponse cellulaire: nature du polymère et inclusion d'autres matériaux, diamètre des fibres, structure aléatoire ou alignée, élasticité. Afin d'analyser l'influence sur l'adhésion, la prolifération, la viabilité et la différenciation, des cellules ont été cultivées sur ces matériaux dans des conditions neutres : milieu basique sans facteurs de croissance ou de différenciation, conditions statiques (pas de sollicitations mécaniques ni de mouvement du fluide), boîte de Pétri classique, courte durée (96 heures). Le changement de scaffold était donc la seule variable susceptible de modifier le comportement du tissu. Afin d'étudier en particulier la différenciation induite, une lignée de cellules souches mésenchymateuses (C3H10T1/2) a été utilisée et les marqueurs des voies osseuses et tendineuses analysés. Ce choix permettait de vérifier si les cellules pouvaient aisément être orientées vers un tissu d'intérêt autre que l'os, voie par défaut des CSM<sup>169</sup>. Le tendon a été choisi dans la perspective d'utiliser certains des matériaux étudiés, si la réponse cellulaire s'avérait pertinente, pour la

reconstruction de l'interface os/tendon. L'étude de cette voie de différenciation a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Delphine Duprez du Laboratoire de Biologie du Développement de l'UPMC, où l'analyse de l'expression des gènes a été conduite par Ludovic Gaut, étudiant en thèse.

## 2) Résultats

### ***Adhésion et prolifération cellulaire***

L'adhésion et la prolifération cellulaires à l'issue de la culture ont été étudiées qualitativement par observations au MEB (aspect général du tapis cellulaire) et en microscopie à fluorescence (morphologie des cellules par visualisation des filaments d'actine). Les résultats obtenus au MEB sont présentés de la Figure 61 à la Figure 63.

Les différents cas de scaffolds à base de PVA (Figure 61) montrent des comportements différents. Les cellules ont peu adhéré sur le PVA pur, ne formant que des groupes épars de quelques individus. Elles se sont peu étalées et n'ont pas proliféré. En revanche, le tissu cellulaire est plus important et plus étendu après l'ajout de nanoparticules de HA, le cas PVA20 montrant l'effet le plus marqué avec un tapis cellulaire couvrant une grande partie du support. Le PVA60 n'a permis quant à lui que l'apparition de groupes épars plus importants que sur le PVA pur. Là où les cellules ne se sont pas développées, on peut remarquer que les fibres de PVA humidifiées ont changé de morphologie par rapport aux échantillons secs (Figure 49, panneau en haut à droite : il n'est plus possible de distinguer les fibres entre elles). Elles semblent fusionner et le scaffold apparaît moins poreux.

Tous les autres scaffolds (Figure 62 et Figure 63) ont permis l'obtention d'un tissu cellulaire continu qui couvre la totalité du réseau de fibres. On aperçoit cependant des fissures en nombre plus ou moins important sur toutes les observations. Celles-ci sont survenues après la culture et peuvent être dues à la préparation des échantillons avant observation : en effet, on peut constater que les fibres sont également rompues au niveau de ces fissures et que leurs bords se suivent parfaitement. Il s'agit donc d'une rupture du substitut après la formation du tissu. Ces fissures peuvent cependant traduire les différences de maintien entre chaque cas.

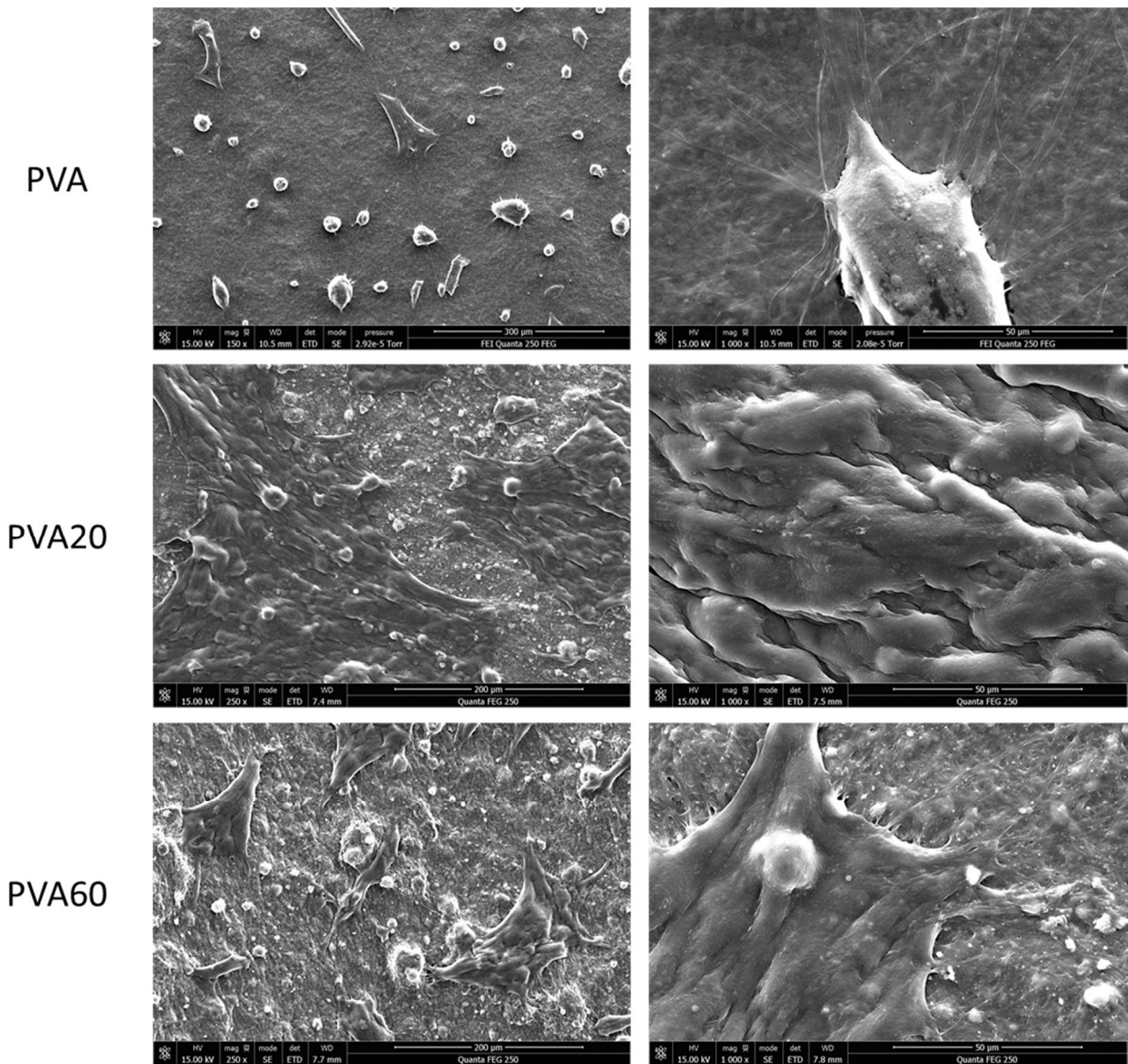


Figure 61 : Observations au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés à base de PVA après culture de CSM (C3H10T1/2) (gauche : x250/x150, droite : x1000).

Le PCL présente le tissu cellulaire le plus complet et homogène, les fibres du scaffolds n'étant visibles que sous les fissures (Figure 62). Adhésion et prolifération ont également été très importantes sur le PCLg, mais la couche de cellules semble moins épaisse et laisse entrevoir à travers elle la morphologie des fibres par endroits (Figure 62). Il a été noté plus haut que le PCLg subissait une modification importante de ses propriétés mécaniques après humidification, cependant, on ne constate pas ici de modification de la morphologie des fibres comme c'est le cas pour les scaffolds à base de PVA (Figure 61). La comparaison entre ces deux cas permet également de souligner que la morphologie des cellules elles-mêmes est différente sur les PVA (Figure 61) par rapport au tapis vivant recouvrant les autres scaffolds

(Figure 62) et à des cellules cultivées sur support classique (voir la figure 3.E du chapitre 3). Même dans le cas du PVA20 où le tapis est plus important, les cellules sont moins étalées, le tissu apparaît hétérogène avec un relief irrégulier. Dans tous les autres cas, en revanche, les fibres sont recouvertes d'un tapis plus lisse et continu avec peu d'aspérités.

L'analyse du PLA au MEB avant culture a montré un manque d'adhérence des couches externes de fibres sur le reste de scaffold (Figure 50). Ce comportement a résulté ici en une croissance des cellules sous ces couches externes, « à l'intérieur » du scaffold (Figure 62). Cela n'a pas empêché l'adhésion et la prolifération des cellules qui ont colonisé le matériau (même avec la présence de quelques perles le long des fibres de PCLdcm utilisées pour cette analyse, qui souligne la sensibilité du processus de production aux conditions atmosphériques). On observe cependant un tissu moins homogène que sur les scaffolds à base de PCL.

Un tapis cellulaire continu a également été obtenu sur les scaffolds coaxiaux et multicouches (Figure 63), même si ceux-ci montrent un nombre important de fissures. Les cas PCLout, PCLin et PCLrandom présentent des résultats équivalents, seule la morphologie du PCLaligned laisse suggérer un alignement du tissu (Figure 63). Ce résultat doit toutefois être confirmé par l'étude de la morphologie des cellules par marquage des filaments d'actine.

Les filaments d'actine sont en effet un des composants principaux du cytosquelette des cellules, et leur marquage par une sonde fluorescente permet de visualiser le cytosquelette de la cellule et par là sa morphologie, notamment l'étalement et l'orientation. Les résultats obtenus sur tous les scaffolds sont rapportés sur les Figure 64 à Figure 66.

Les différences de réponse cellulaire entre les scaffolds de PVA avec ou sans nanoparticules constatées par observation au MEB (Figure 61) sont confirmées ici : les groupes réduits et épars de cellules sur le PVA forment en revanche un tapis étendu avec l'addition de 10% de nanoparticules d'HA 20nm (PVA20, Figure 64). L'effet n'est pas visible avec 5% de nanoparticules d'HA 60nm (PVA60), mais les groupes de cellules sont toutefois mieux étalés et semblent mieux adhérer (structure moins ronde et plus étirée) que dans le cas du PVA pur.



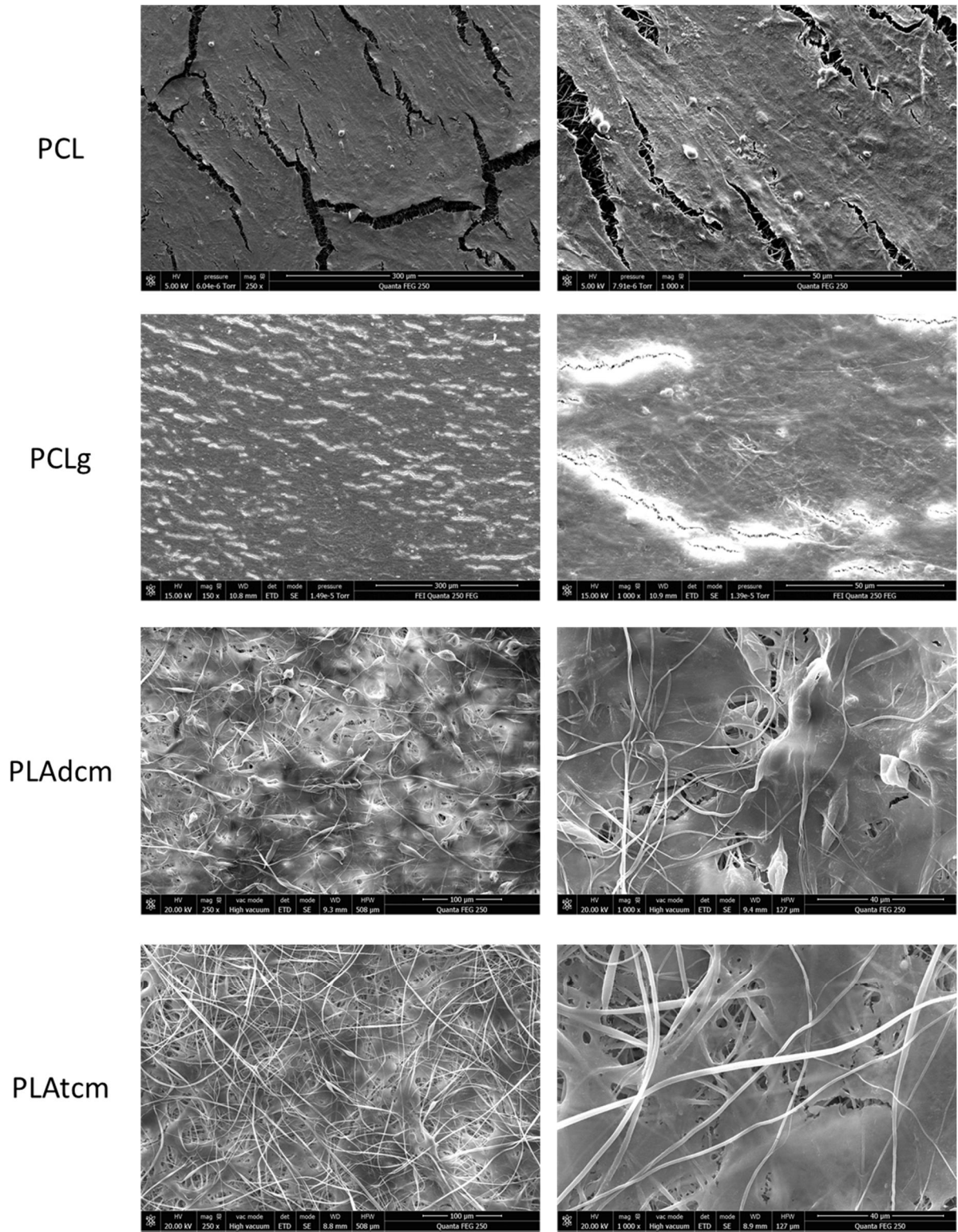
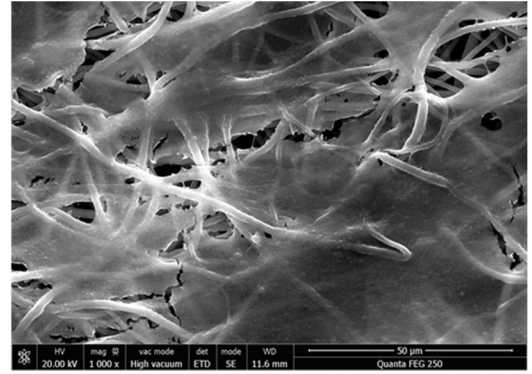
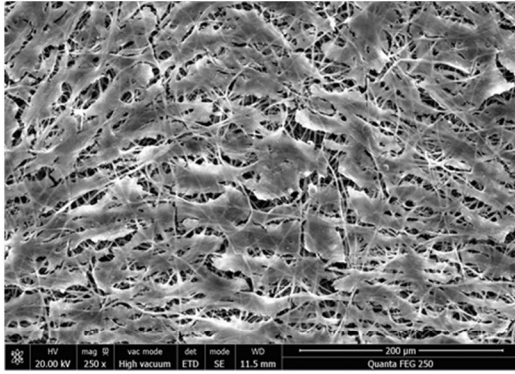
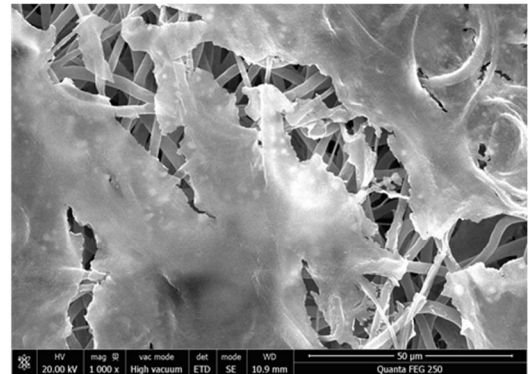
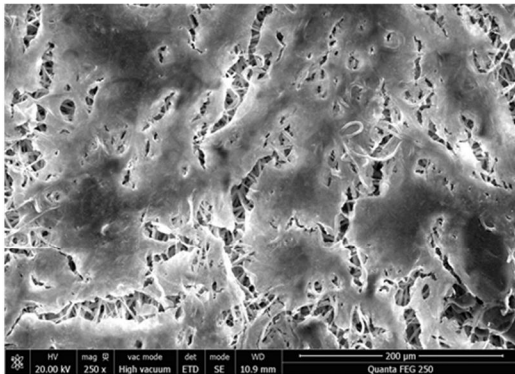


Figure 62 : Observations au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés à base de PCL et PLA après culture de CSM (C3H10T1/2) (gauche : x250/x150, droite : x1000).

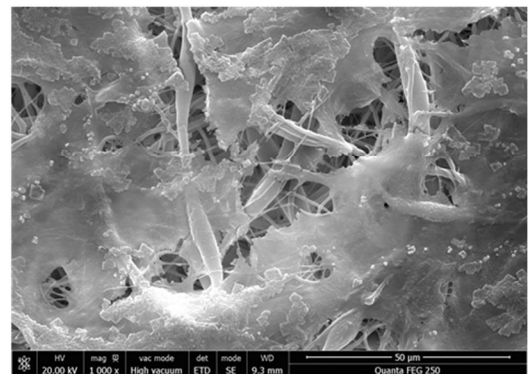
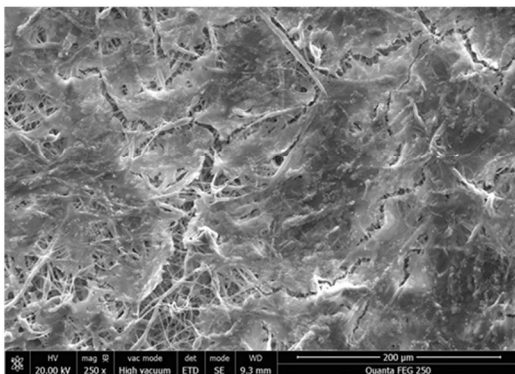
PCLout



PCLin



PCL  
random



PCL  
aligned

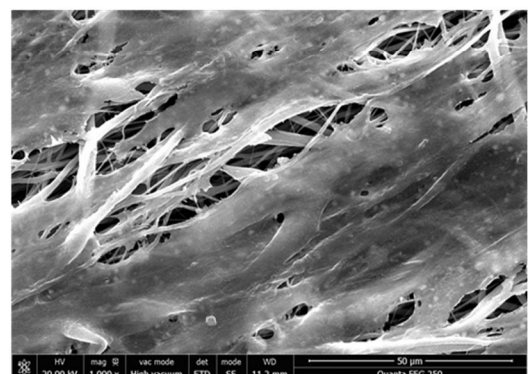
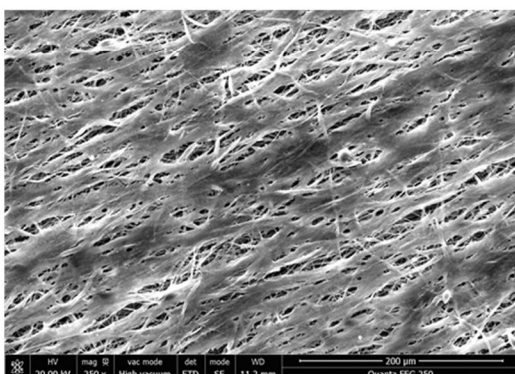
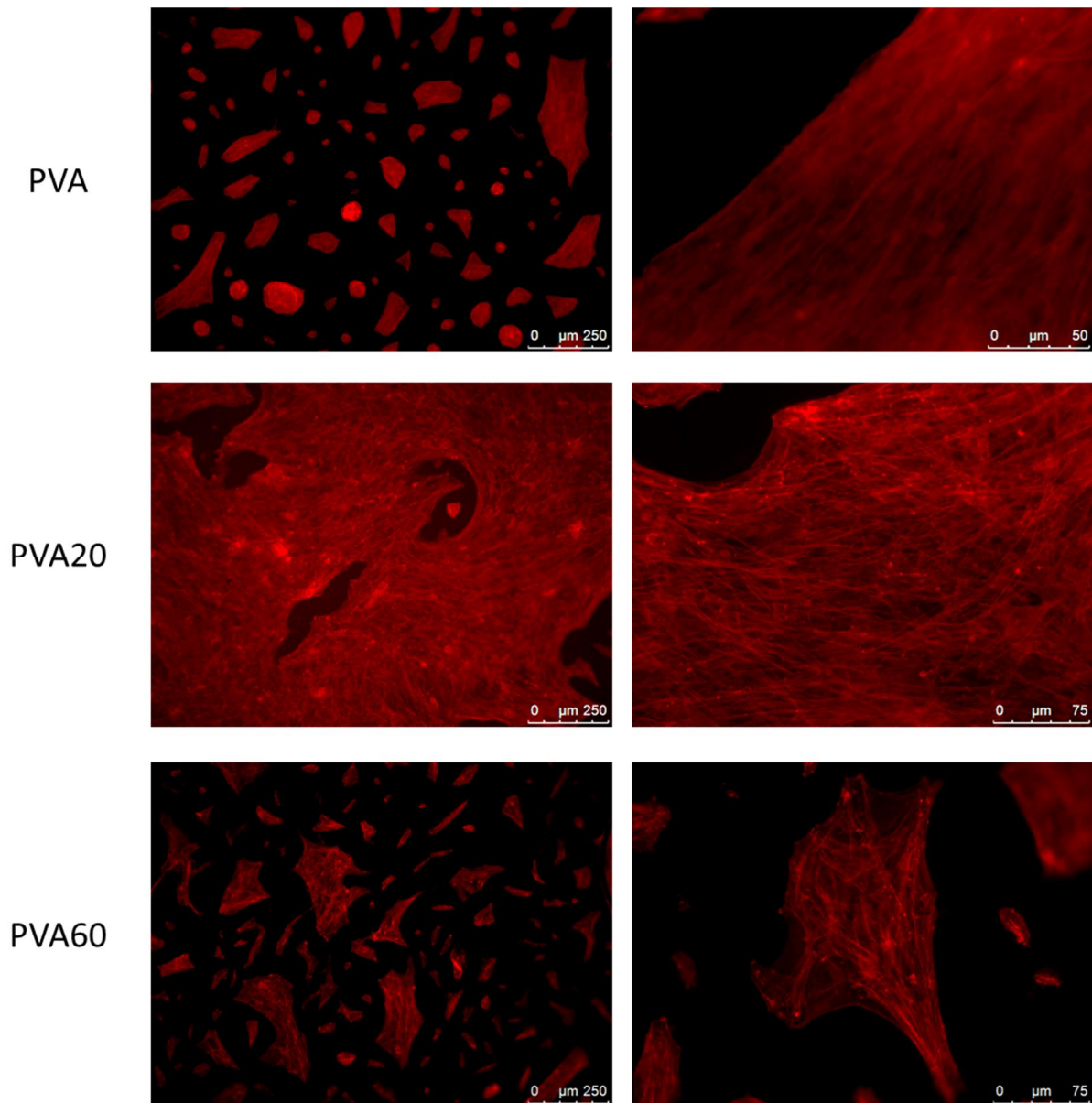


Figure 63 : Observations au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés coaxiaux et multicouches après culture de CSM (C3H10T1/2) (gauche : x250, droite : x1000).

La morphologie cellulaire révélée par les filaments d'actine ne permet pas de différencier les scaffolds à base de PVA (tapis cellulaire « boursoufflé » visible au MEB, Figure 61) des autres. En réalité, dans le cadre général, la morphologie des cellules ne présente aucune différence notable entre tous les cas (Figure 65, Figure 66). En revanche, la taille et la densité du tapis cellulaire continu recouvrant les fibres électrospinnées apparaît variable, comme constaté avec les observations MEB. Le PCL pur, notamment, a permis l'apparition d'un tissu très dense recouvrant totalement l'échantillon de fibres électrospinnées. On observe sur les scaffolds de PLA un tapis de cellules denses par endroit, mais plus hétérogène : on remarque des filaments d'actine sur d'autres plans, les cellules ayant poussé sur les différentes couches de fibres comme déjà constaté au MEB. Des images illustrant plus précisément le phénomène sont disponibles en annexe du présent manuscrit (Figure 80). A fort grossissement (colonne de droite), la densité et l'épaisseur de la couche de cellules pourraient être légèrement supérieures dans le cas du PCLrandom par rapport aux autres structures complexes (Figure 66, le PCLout apparaissant le moins dense des quatre). Les zones non marquées, en noir sur les images, sont en effet moins nombreuses sur ce scaffold. De l'analyse morphologique, il ressort donc que les scaffolds à base de PCL sont les plus adaptés à l'adhésion et la prolifération cellulaire.

La seule différence majeure de structure est visible dans le cas du PCLaligned, où l'alignement des cellules suspecté après observations MEB apparaît clairement. Les filaments d'actine sont orientés parallèlement les uns aux autres (Figure 66).

Cette orientation a été confirmée en visualisant les noyaux des cellules par marquage au DAPI (Figure 67). Alors que les noyaux apparaissent ronds sur le PCLrandom, ils sont étirés et elliptiques sur le PCLaligned, les directions de leurs grands axes étant parallèles.



**Figure 64 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés à base de PVA (gauche : x10, droite x40/x63). Marquage des filaments d'actine par rhodamine/phalloïdine (rouge).**

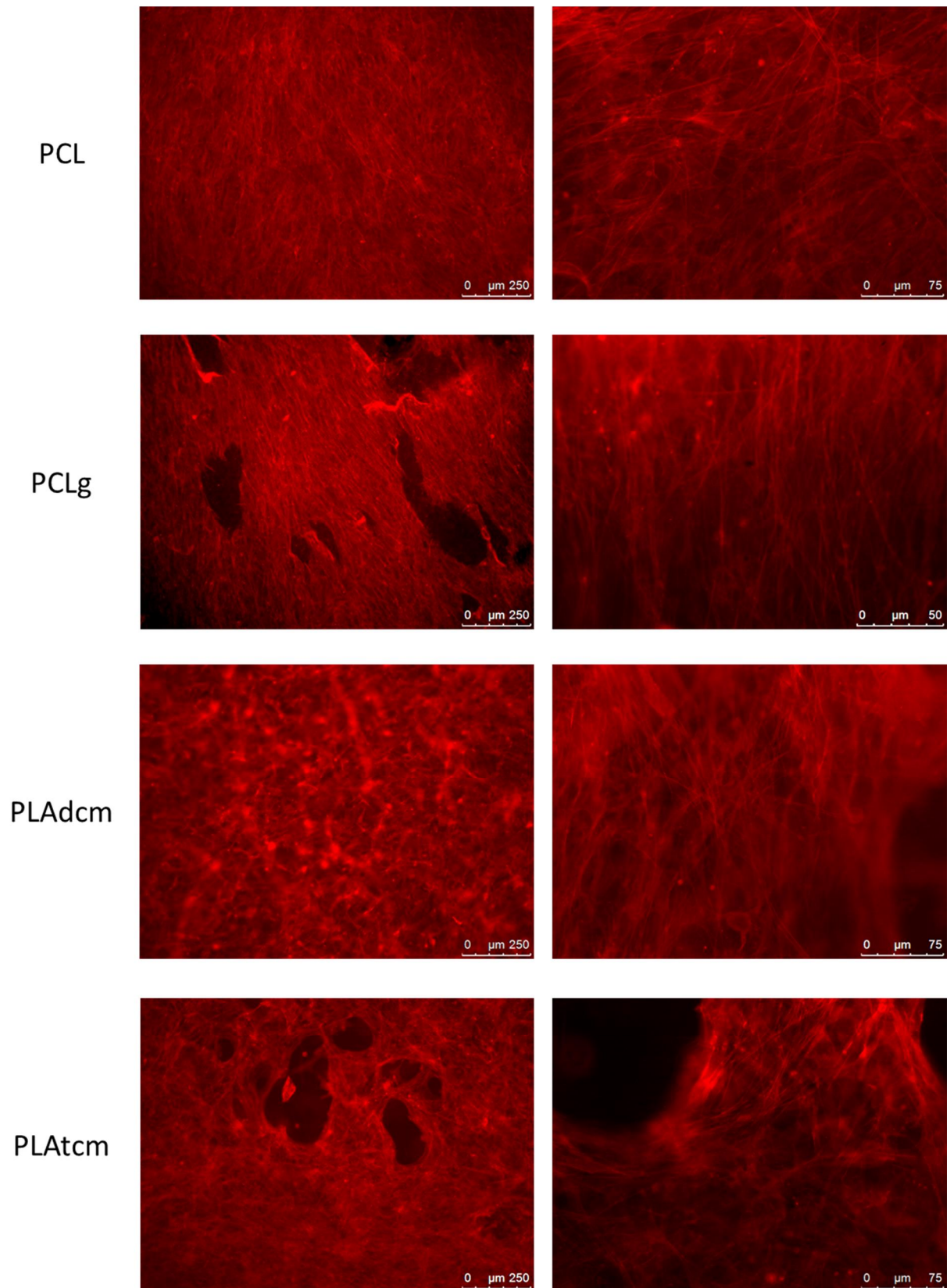


Figure 65 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés à base de PCL et PLA (gauche : x10, droite x40/x63). Marquage des filaments d'actine par rhodamine/phalloïdine (rouge).

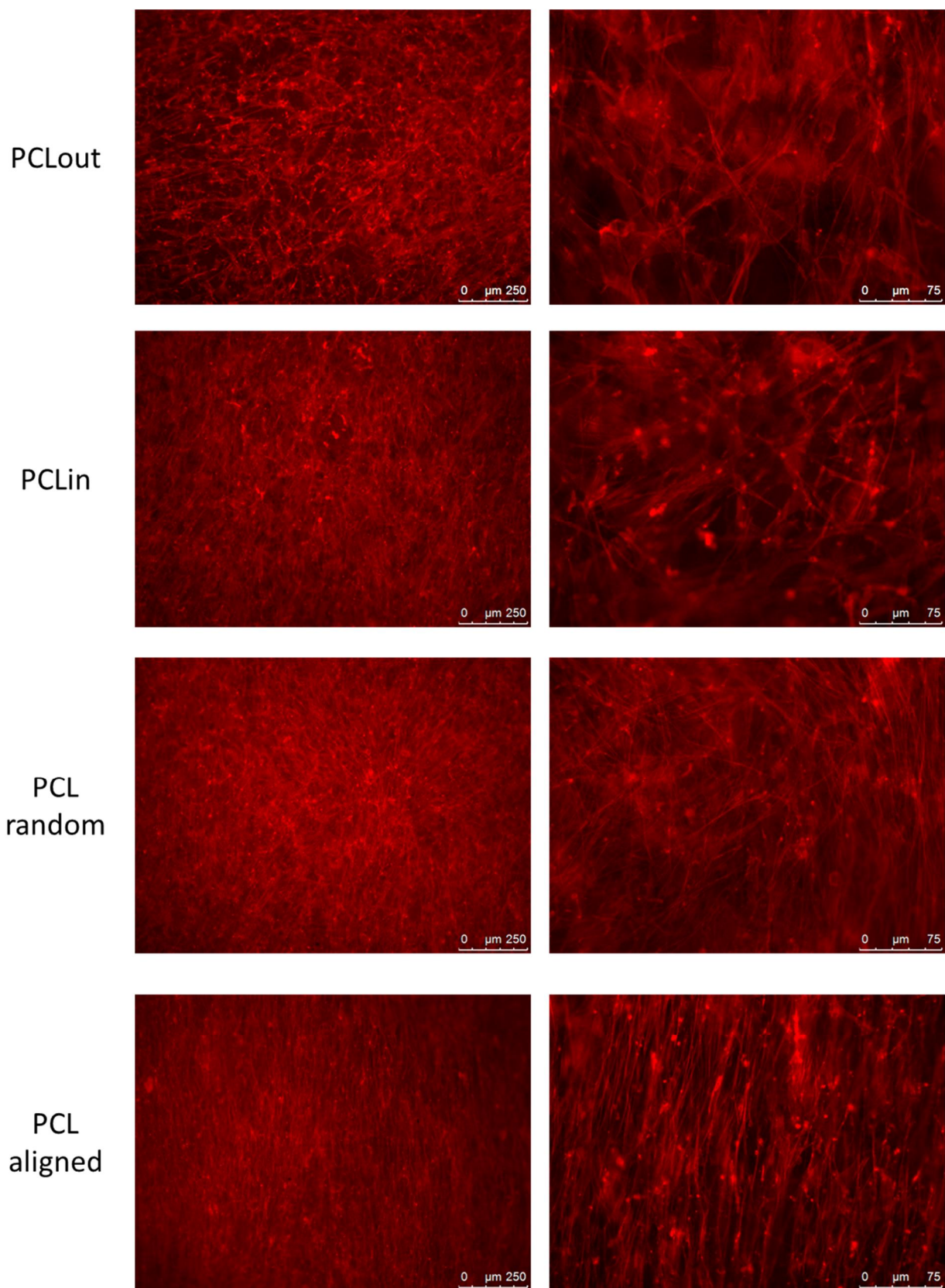


Figure 66 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés coaxiaux et multicouches (gauche : x10, droite x40/x63). Marquage des filaments d'actine par rhodamine/phalloïdine (rouge).

PCLrandom

PCLaligned

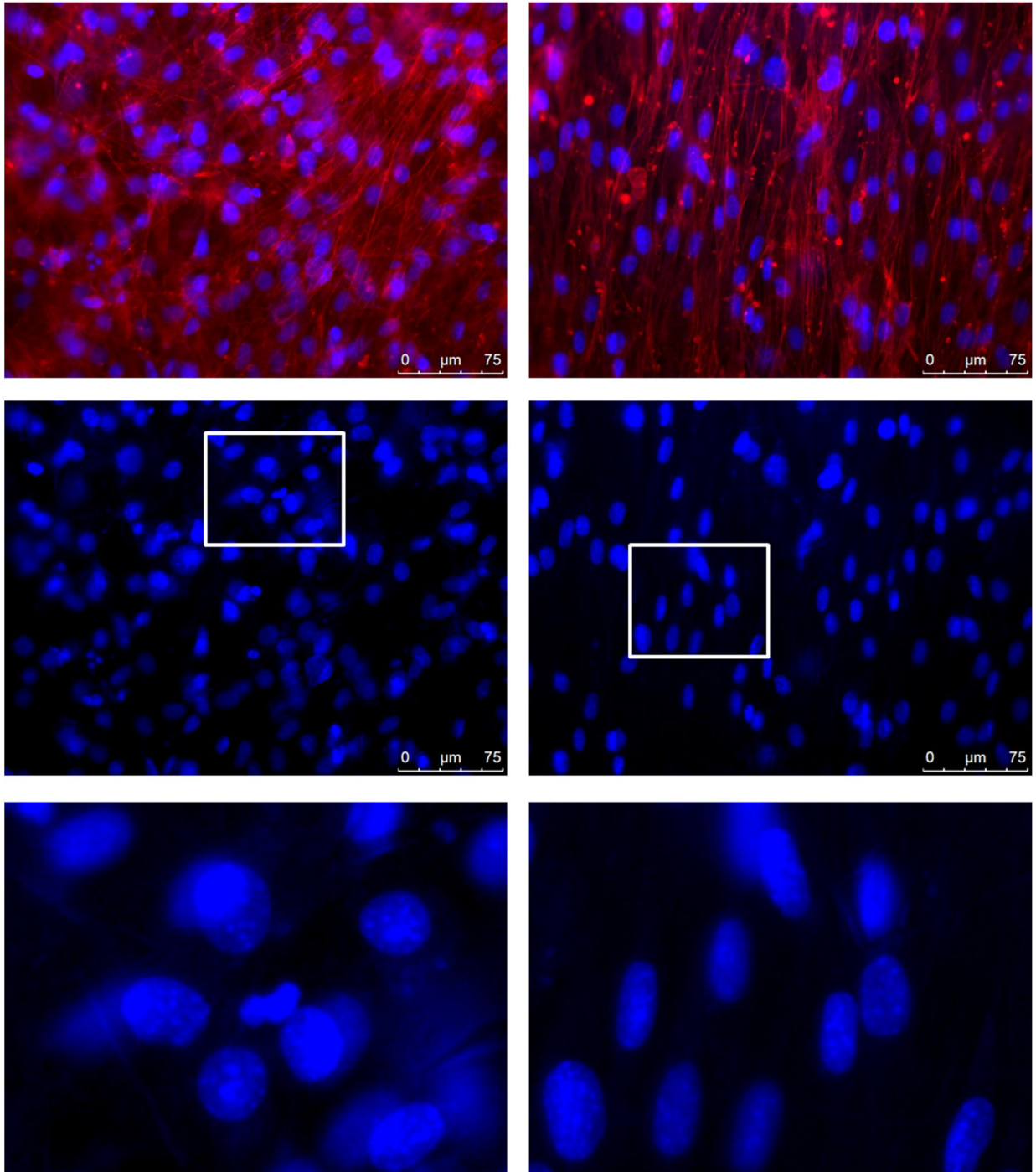


Figure 67 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds PCLrandom (gauche) et PCLaligned (droite). En haut : filaments d'actine, rhodamine-phalloïdine (rouge) et noyaux, DAPI (bleu), x40. Au milieu : Noyaux, DAPI (bleu), x40. En bas : Noyaux, DAPI (bleu), zone agrandie (carré blanc).

Il est à noter que dans certaines zones où le tapis de cellules apparaît plus épais (densité supérieure des filaments d'actine comme constaté plus haut sur le PCLrandom), l'alignement était présent mais moins marqué. Les couches supérieures de cellules pourraient peu à peu perdre l'influence du support et se désorganiser. Le contact direct avec les fibres orientées (et pas seulement avec les couches inférieures de cellules se étant alignées elles-aussi) serait donc indispensable<sup>3\*</sup>.

### ***Viabilité cellulaire***

Un marquage dit « Live/Dead » permettant de visualiser simultanément cellules vivantes (Calcéine AM, en vert) et les noyaux des cellules mortes (EthD-1, en rouge) a été effectué à l'issue de la période de culture.

Dans les cas où l'adhésion et la prolifération cellulaires sont limitées (PVA et PVA60, Figure 68), les cellules mortes sont apparues isolées ou en bordure des petits groupes de cellules vivantes. Elles pourraient donc correspondre aux cellules n'ayant pas réussi à adhérer sur ces matériaux. Concernant le PVA20, dont il a été montré plus haut que l'ajout de nanoparticules permettait une meilleure adhésion, les cellules mortes sont réparties en nombre assez faible dans les zones de tissu continu (Figure 68).

Sur tous les autres scaffolds étudiés, on retrouve le tapis homogène et continu de cellules vivantes déjà constaté plus haut (Figure 68 et Figure 69). Il présente cependant quelques zones plus hétérogènes dans les cas PLAdcm et PLAtcm, ce qui est cohérent avec les précédentes observations. Les cellules mortes sont éparses et en faible nombre, similaire d'un matériau à l'autre. Seul le résultat du PCLrandom suggère une quantité plus importante de cellules mortes (Figure 68). Il est à noter que l'on remarque également ici l'alignement des cellules sur le PCLaligned.

---

<sup>3\*</sup> Un marquage DAPI a également été réalisé sur les autres échantillons mais n'est pas affiché sur les figures : la densité très importante de cellules sur certains scaffolds rendait l'information illisible, tant qualitativement que par analyse d'image, et masquait les autres marquages.



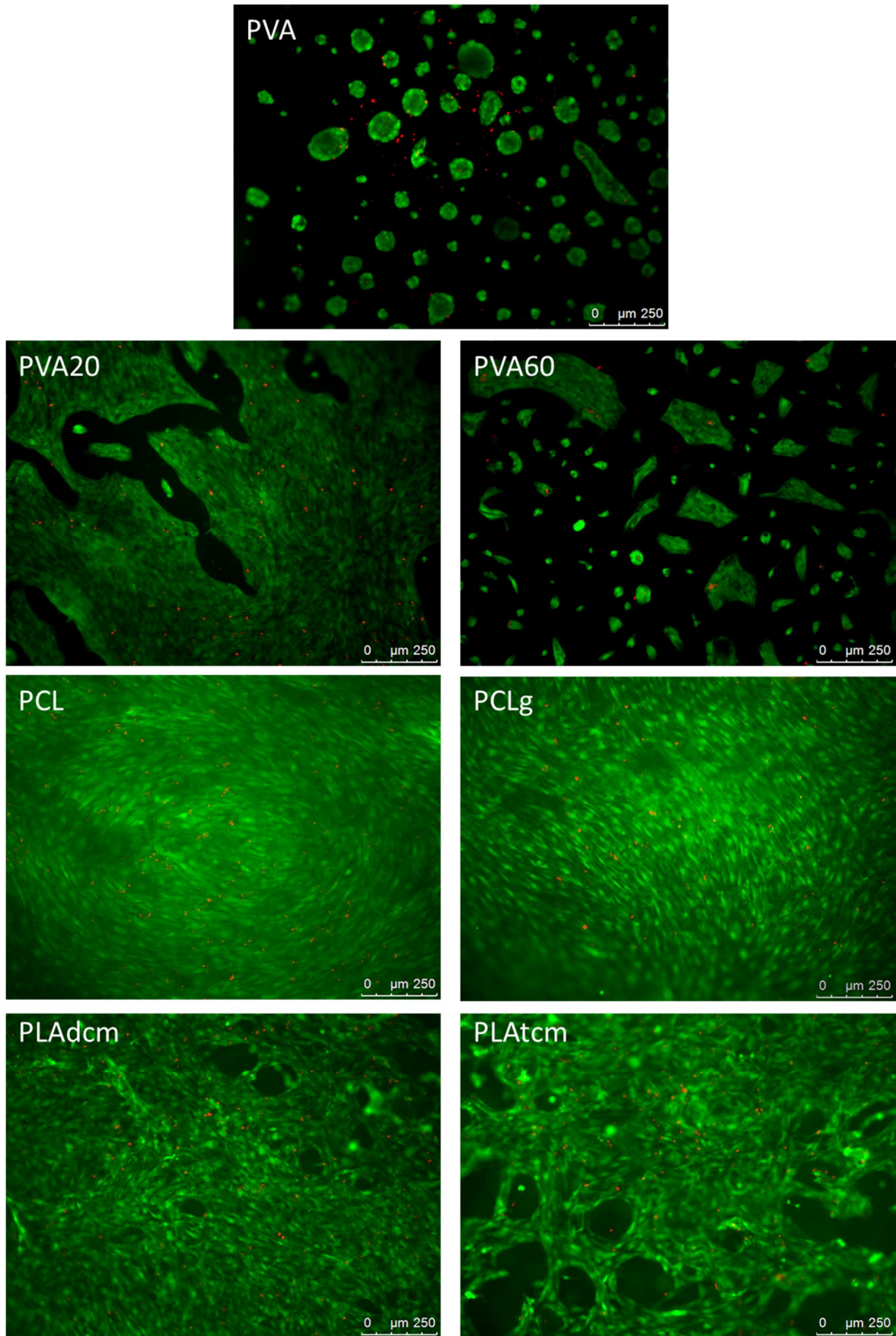


Figure 68 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds à base de PVA, PCL et PLA. Cellules vivantes (Calcéine AM, vert) et noyaux des cellules mortes (EthD-1, rouge), x10.

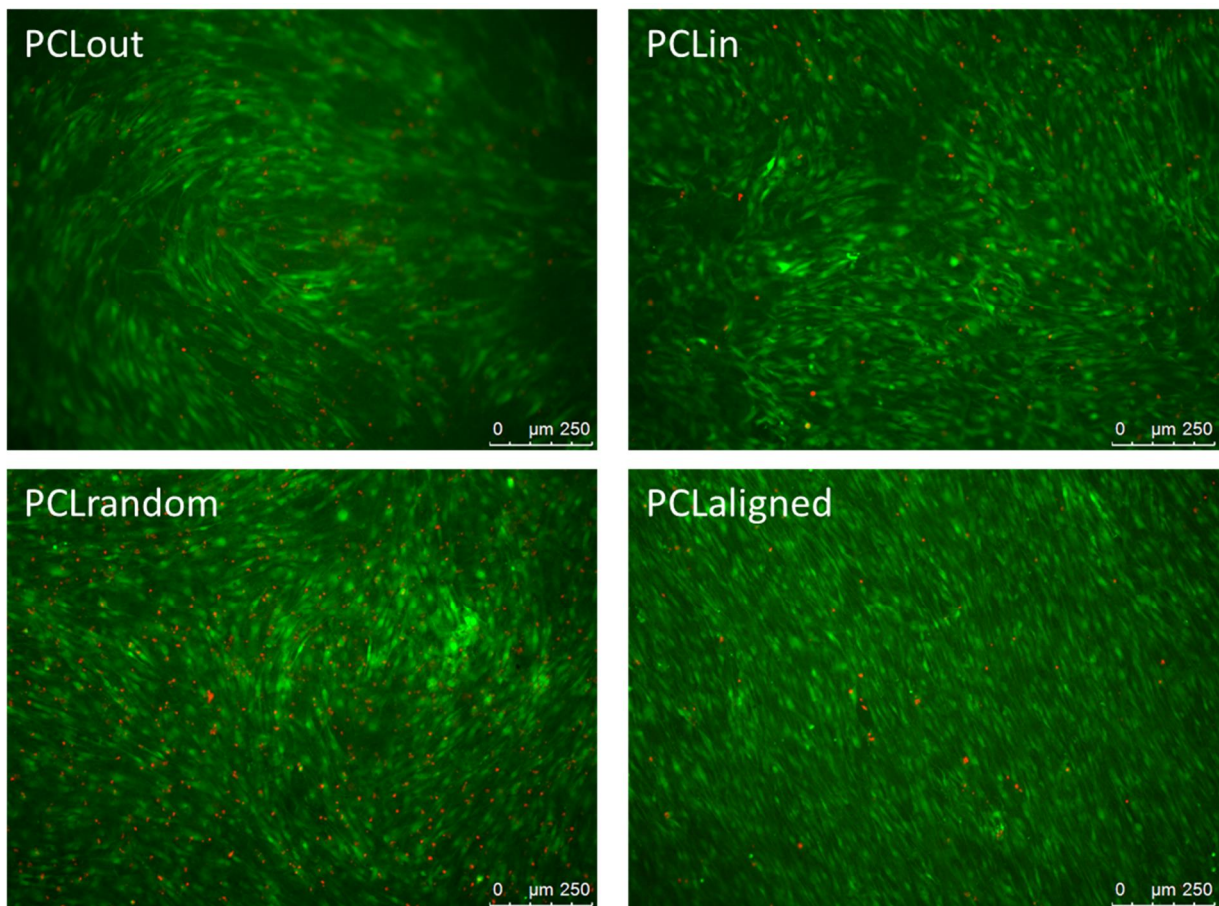


Figure 69 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés coaxiaux et multicouches. Cellules vivantes (Calcéine AM, vert) et noyaux des cellules mortes (ÉthD-1, rouge), x10.

### ***Différenciation cellulaire***

La voie de différenciation empruntée préférentiellement par les cellules souches cultivées sur chaque support a été analysée par étude de l'expression des gènes par RT-qPCR, menée au laboratoire de Biologie du Développement de l'UPMC par Ludovic Gaut. Des marqueurs de la lignée tendineuse (Scleraxis Scx, ténomoduline Tnmd, aquaporine Aqp1 et collagène 1a1 Coll1a1) et de la lignée osseuse (Runx2, Dlx5 et OCN) ont été étudiés conjointement pour chaque échantillon. Il est à noter que le Coll1a1, non spécifique, peut également être produit par les cellules osseuses.

Les résultats des différents scaffolds sont rapportés sur les Figure 70 à Figure 73. L'expression de chaque gène est exprimée relativement au gène contrôle GAPDH. Les échantillons PVA20, PVA60 et PLAdcm n'ont pas permis d'obtenir assez de matériel génétique pour effectuer les mesures. La faible prolifération des deux premiers cas peut

expliquer ce résultat, mais les observations en microscopie ont montré un tissu cellulaire développé pour le PLAdcm. Il est donc probable que la cause soit un problème technique pour ce troisième cas (par exemple un tampon de lyse cellulaire inefficace). Pour la suite de l'étude, l'analyse de la prolifération et de la viabilité cellulaire ayant montré des résultats équivalents entre PLAdcm et PLAtcm sans influence du solvant (censé s'évaporer au cours du procédé de production), ces deux scaffolds seront regroupés sous le terme PLA pour être discutés. La réalisation de réplicats supplémentaires en nombre deux fois plus important pour les cas PVA20 et PVA60 ayant conduit à nouveau à une absence de détection, l'hypothèse du faible taux de prolifération a pu être confirmée pour ces matériaux.

Les trois scaffolds électrospinnés composés de polymères purs (PVA, PLA et PCL) ont engendré des réponses cellulaires différentes en termes de différenciation (Figure 70 et Figure 71). Notamment, le PVA a permis d'obtenir une expression élevée de tous les marqueurs osseux, avec une baisse de l'expression du Scx mais une légère hausse de l'Aqp1. On trouve un comportement similaire avec le PCL, même si seule l'OCN a subi une hausse significative. L'expression de tous les gènes liés au tendon tend toutefois à diminuer. Le PLA ne permet pas de conclure sur une voie préférentielle, avec certes une baisse de Scx et Colla1 mais également des hausses simultanées de Tnmd (tendon) et d'OCN (os), celles-ci n'étant pas statistiquement significatives. L'addition de gélatine au PCL a provoqué des changements, avec la disparition de la hausse d'OCN au profit de la Tnmd (Figure 71). L'expression de Scx a très significativement baissé alors qu'une hausse de Runx2 reste présente.

Les résultats des scaffolds coaxiaux formés de PCL et PLA sont apparus très similaires (Figure 72). On constate une importante surexpression de la Tnmd, plus importante pour le PCLin, ce dernier faisant également disparaître toute expression significative des marqueurs osseux. Le scaffold PCLrandom, présentant une structure multicouche complexe mais composé de PCL pur, a montré un profil semblable à ce dernier avec une haute expression de l'OCN au dépend des gènes liés au tendon (Figure 73). On retrouve strictement les mêmes variations avec le PCLaligned, la significativité étant cependant atténuée par une plus grande variabilité dans les résultats (Figure 73).

La différenciation engagée apparaît donc différente d'un scaffold à l'autre. Les modifications de la réponse cellulaire vont à présent être discutées au regard des autres paramètres analysés dans la première partie du chapitre (composition, structure, comportement mécanique et diamètre des fibres notamment).

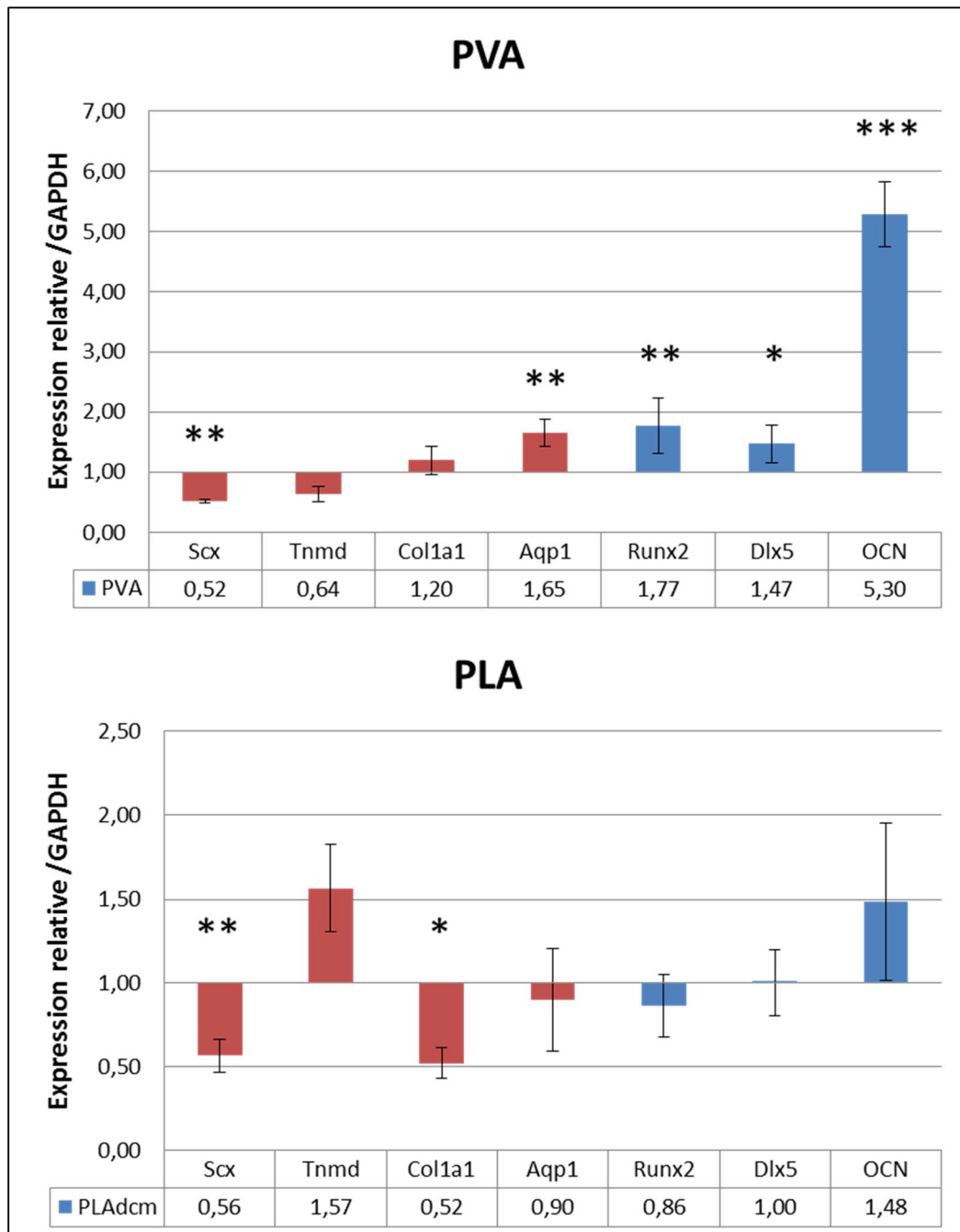


Figure 70 : Expression des gènes liés à la lignée tendineuse (rouge) ou osseuse (bleu) après culture de C3H10T1/2 sur scaffolds électrospinnés de PVA et PLA (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

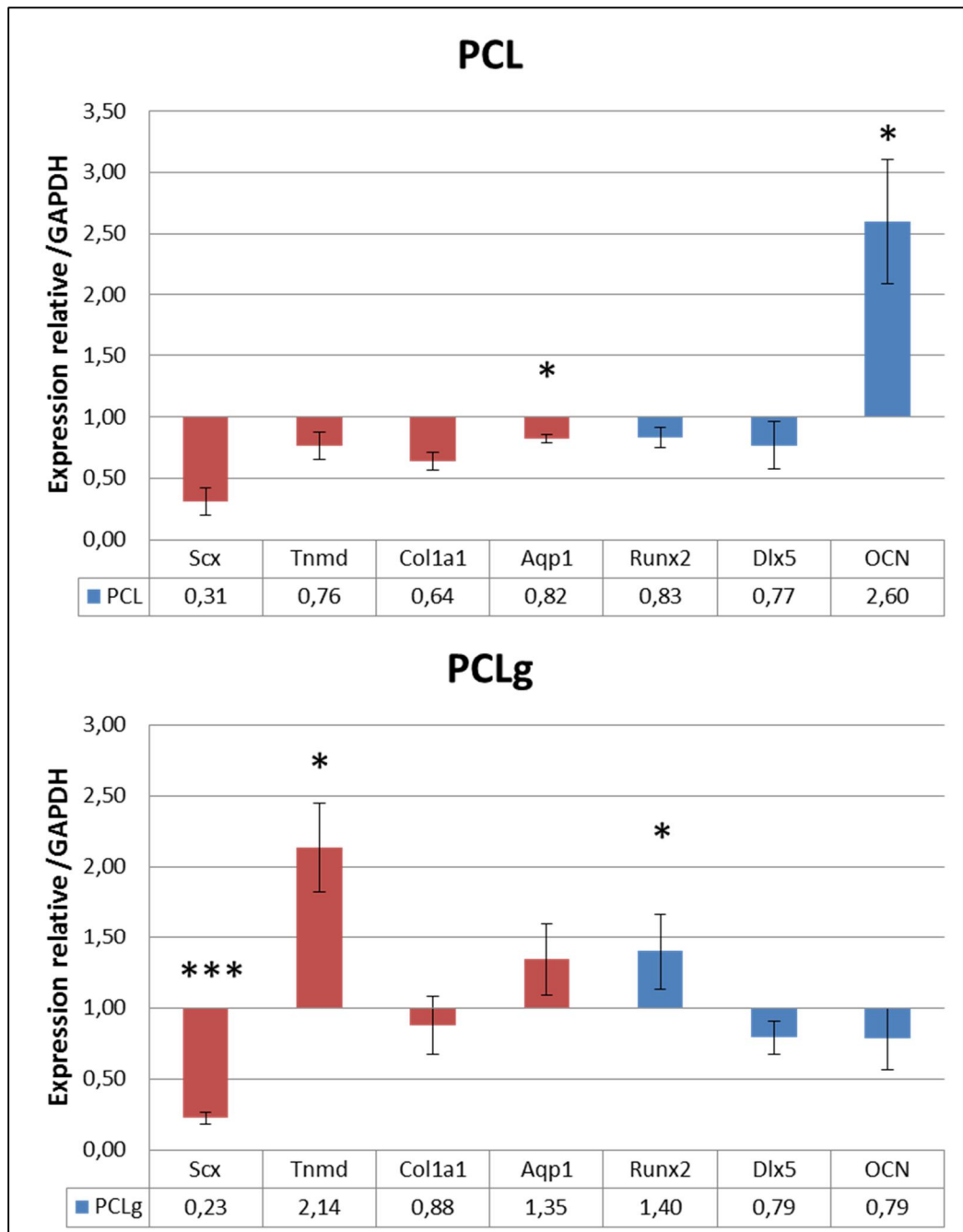


Figure 71 : Expression des gènes liés à la lignée tendineuse (rouge) ou osseuse (bleu) après culture de C3H10T1/2 sur scaffolds électrospinnés à base de PCL (\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

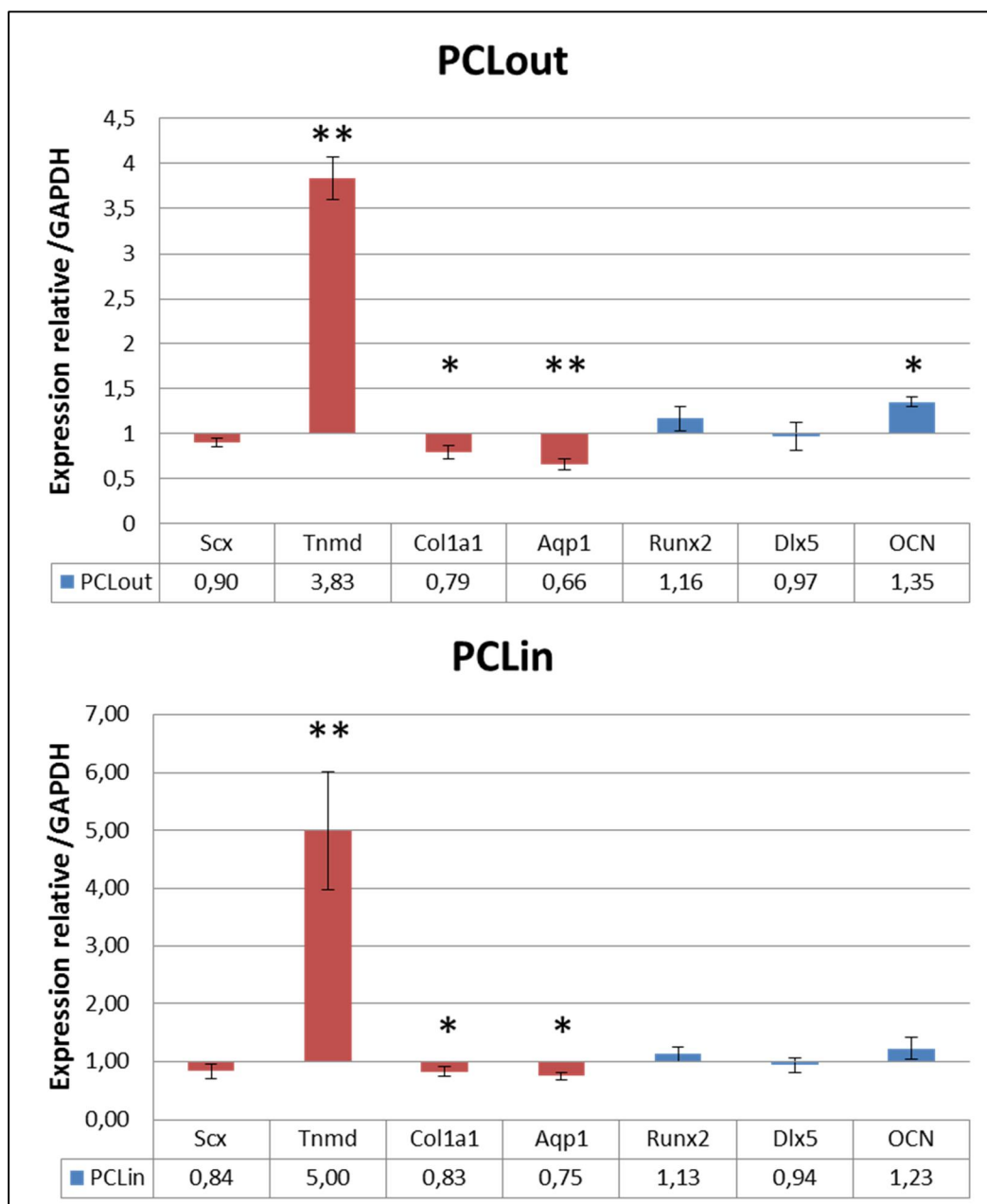


Figure 72 : Expression des gènes liés à la lignée tendineuse (rouge) ou osseuse (bleu) après culture de C3H10T1/2 sur scaffolds électrospinnés coaxiaux (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ).

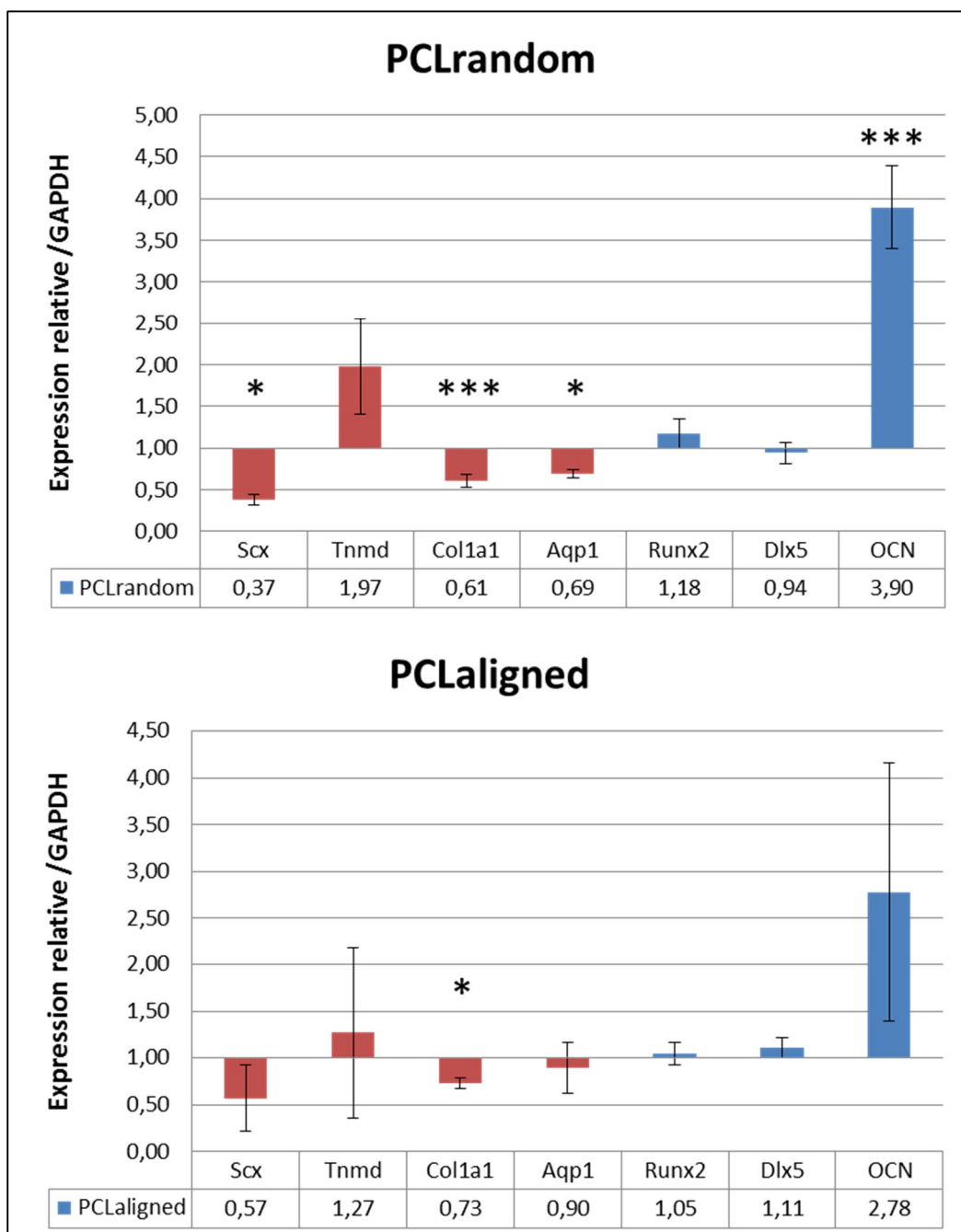


Figure 73 : Expression des gènes liés à la lignée tendineuse (rouge) ou osseuse (bleu) après culture de C3H10T1/2 sur scaffolds électrospinnés de structure complexe (\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

### 3) Discussion

Cette étude consistait en une caractérisation biologique d'un ensemble de scaffolds obtenus par électrospinning sous conditions de culture statique. Une lignée de cellules souches mésenchymateuses a été utilisée pour analyser la réponse cellulaire après 96h de culture, en termes d'adhésion, de prolifération et de viabilité cellulaire, mais aussi de différenciation concernant deux voies différentes : l'os et le tendon. Basée sur un protocole « neutre » sans utilisation de facteurs spécifiques, la culture ne différait d'un cas à l'autre que par le changement du scaffold utilisé. La comparaison des résultats obtenus permet ainsi de souligner l'influence de différents paramètres. Ces comparaisons sont résumées dans la Table 12. On retrouve ici que certains facteurs jouant sur les propriétés de surface, comme soulevé au cours de l'étude bibliographique concernant les phosphates de calcium, affectent l'adhésion et la différenciation cellulaire (Figure 13). La nature du polymère et les différents additifs (nanoparticules d'HA, gélatine, mélanges) peuvent notamment modifier ces propriétés, l'hydrophobicité, la solubilité, conduisant à des différences dans l'adsorption de protéines et le comportement des cellules. La taille des nanoparticules tout comme la structure et l'orientation des fibres peuvent également avoir une influence allant jusqu'à affecter la voie de différenciation. Dans notre cas, nous avons bien retrouvé ces différences de réponse dans les résultats présentés plus haut et résumés dans la Table 13.

Polymères		Paramètre analysé	
PVA		PCL, PLAs	Nature du polymère
PVA		PVA20, PVA60	Ajout de nanoparticules HA
PCL		PCLg	Ajout de gélatine
PLAdcm	Comparé(s) à :	PLAtcm	Solvant
PCL, PLAdcm, PLAtcm		PCLin, PCLout	Mélange coaxial
PCL		PCLrandom	Structure multicouche
PCLrandom		PCLaligned	Orientation des fibres

Table 12 : Comparaison entre les différents scaffolds électrospinnés et paramètres analysés correspondant.



Scaffold	Angle de contact (°)	Potentiel zeta (mV)	Module de Young (MPa)			Diamètre des fibres (nm)	Porosité $\mu+$ (%)	Réponse cellulaire
			J0sec	J0hum	J5hum			
PVA	0	-2 <sup>209</sup>	175	1	3	351	79,5	-- Os
PVA20	34,9	/	122	10	4	172	79,5	= (manquant)
PVA60	0	/	343	10	4	363	77,9	- (manquant)
PCL	123	-12 à -28 210,211	21	20	49	665	83,8	+++ Os
PCLg	44,1	/	31	3	3	251	80,6	+ Indéterminé
PLAdcm	124,7	-5 <sup>212</sup>	24	43	30	681	81,3	+ Indéterminé
PLAtcm	122,7	-5 <sup>212</sup>	14	16	21	844	82,3	+ Indéterminé
PCLout	130	/	60	38	62	1928	83,1	++ Tendon
PCLin	128	/	32	30	49	2461	82,7	++ Tendon
PCLrandom	123	/	30	36	64	1159	82,8	++ Os
PCLaligned	127	/	15	63	125	1032	82,8	++ Os

Alignement

Table 13 : Bilan des propriétés principales des scaffolds électrospinnés étudiés. Le potentiel zeta est tiré de la littérature et concerne les polymères purs.

Le PVA, comparé aux autres polymères, a montré un potentiel d'adhésion et de prolifération cellulaire nettement plus faible, ne permettant pas l'obtention d'un tissu continu. Hydrosoluble et hydrophile (comme vérifié par mesure de l'angle de contact), son comportement une fois immergé (baisse importante de la rigidité, changement de morphologie faisant disparaître la porosité du scaffold) n'a pas permis aux cellules d'adhérer

et de s'étaler pour assurer leur survie. La porosité des couches supérieures, plus faibles que pour les autres supports, pourrait également avoir entravé la bonne adhésion des cellules. Cet aspect serait cohérent avec les densités fortes de cellules constatées par imagerie sur les scaffolds à base de PCL qui ont quant à eux montré les porosités les plus importantes.

En dépit de ce potentiel limité, un impact fort des nanoparticules d'hydroxyapatite au sein du PVA a cependant été relevé. Dans le cas du PVA20, dont les agrégats de particules affleuraient à la surface des fibres (contrairement au PVA60), un tissu cellulaire nettement plus développé a pu être formé. Il est donc intéressant de noter qu'un apport de nanoparticules pertinentes, l'hydroxyapatite étant ici connue pour ses effets sur la lignée osseuse et sa différenciation (voir Chapitre 1 et Annexes), permet une forte amélioration de la réponse cellulaire même sur un matériau au départ peu adapté. Cet aspect est important dans la perspective d'améliorer des scaffolds utilisés pour leurs propriétés mécaniques mais au potentiel d'adhésion insuffisant. La prolifération est toutefois restée relativement faible, même avec l'apparition d'un tapis continu, ce qui a rendu difficile l'obtention de suffisamment de matériel génétique pour l'analyse de l'expression des gènes des cellules cultivées sur ces scaffolds. Aucun résultat n'a ainsi été obtenu à l'heure actuelle pour les PVA20 et PVA60. Des essais seront cependant menés à nouveau sur un plus grand nombre d'échantillons pour assurer la détection.

Lorsque le scaffold électrospinné assure l'adhésion et la prolifération cellulaires, l'étude de la morphologie seule ne permet pas de dégager une influence précise des différents paramètres. L'alignement des cellules engendré par l'orientation des fibres du PCL aligné demeure l'unique effet clairement constaté, et dans une moindre mesure l'épaisseur de la couche de cellules observée grâce aux filaments d'actine en fonction de la structure. Ce dernier point permet de nuancer les différences de viabilité suggérées par le test de Live/Dead entre le PCL random et les autres cas : les cellules mortes visibles y sont plus nombreuses car le nombre total de cellules est lui-même plus important.

L'étude de l'expression des gènes par RT-qPCR était donc nécessaire pour évaluer plus précisément l'effet des paramètres des scaffolds sur la différenciation des CSM. L'analyse a dégagé des tendances vers l'une ou l'autre voie, parfois de façon très marquée. La lignée osseuse était étudiée grâce aux gènes liés à Dlx5 (facteur de transcription impliqué dans l'activation des marqueurs spécifiques de l'os<sup>2136216</sup>), Runx2 (marqueur précoce, facteur

de transcription spécifique<sup>59,65</sup>) et OCN (marqueur tardif indiquant la minéralisation, protéine spécifique<sup>59,65</sup>), et la lignée tendineuse grâce aux gènes liés au scleraxis et à la ténomoduline (tous deux spécifiques, le premier, précoce, activant l'expression du second avant de s'atténuer<sup>217,6220</sup>) ainsi qu'à l'aquaporine 1. Il a été montré récemment par l'équipe de Delphine Duprez de l'UPMC (Laboratoire de Biologie du Développement) que cette protéine était également impliquée dans le développement du tendon<sup>221</sup>. Le collagène 1a1, dont la production est possible dans ces deux tissus, était également étudié.

Le PVA pur a permis d'augmenter l'expression de tous les gènes osseux en diminuant parallèlement le Scx sans augmenter la Tnmd. Ce scaffold favorisait donc particulièrement la lignée osseuse, avec un effet qui pourrait être encore favorisé par les nanoparticules d'hydroxyapatite (ce qui sera étudié à nouveau, comme précisé ci-dessus). Le fort potentiel de l'HA en matière d'ostéoconduction (voir Chapitre 1 et Annexes) ainsi que d'autres études l'utilisant comme additif à l'électrospinning sous forme de particules<sup>88,149,151,152</sup> appuient cette hypothèse. Le PCL pur a également privilégié cette voie, de façon moins marquée mais présente (augmentation de l'OCN et baisse de l'AQP significatives), de même que le PCLrandom, constitué du même matériau mais avec une structure multicouche plus complexe. Celle-ci n'a donc pas engendré de modifications: les effets de surface ont été prépondérants et le comportement des cellules a été induit par la couche externe. Il pourra donc être possible, pour le développement de futurs scaffolds, d'intégrer des couches internes différentes (comme une structure alignée modifiant les propriétés mécaniques du réseau de fibres) sans que cela modifie la réponse cellulaire attendue grâce aux couches externes. Dans l'ensemble, le potentiel des scaffolds de PCL pur pour la voie osseuse était attendu conformément à d'autres études<sup>153,155,156</sup>.

PCLg, PCLin et PCLout ont en revanche orienté la différenciation des CSM vers le tendon, avec notamment une hausse de l'expression de la Tnmd dans la totalité des cas. Comme précisé plus haut, les baisses dans l'expression du Scx parfois présentes conjointement ne sont pas incohérentes avec ces résultats, ce facteur de transcription s'atténuant naturellement après l'activation des gènes liés à la Tnmd<sup>217,6220</sup>. Le PCL pur favorisant la voie osseuse, ces données suggèrent donc que l'apport de gélatine ou de PLA a réorienté les cellules vers une autre voie. On peut cependant noter que runx2 reste hautement exprimé pour le scaffold PCLg, tout comme avec le PCL pur, alors que Tnmd augmente : on semble avoir un état hybride entre les deux voies. Des analyses supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier s'il s'agit d'une transition entre les deux tissus, d'une population

double ou dans l'ensemble d'un faible potentiel de différenciation, la littérature faisant parfois état d'un apport de la gélatine pour la lignée osseuse<sup>88</sup>. Le PLA est couramment utilisé pour de nombreux scaffolds, en particulier électrospinnés, visant à la régénération du tendon et du ligament<sup>222,223</sup>. Des études ont montré que ce matériau favorisait mieux ces tissus que d'autres polymères comme le PCL<sup>224</sup>, le PGA<sup>225</sup> ou le PLGA<sup>225</sup>. Cependant, ici, le PLA pur n'a induit aucune différenciation claire vers l'une ou l'autre voie, contrairement aux scaffolds coaxiaux PCL/PLA ayant augmenté les marqueurs du tendon. On peut émettre l'hypothèse que nous avons d'un côté le PCL pouvant favoriser l'os mais avant tout l'adhésion et la prolifération des cellules ; de l'autre, le PLA pourrait favoriser l'expression des gènes liés au tendon, mais peut présenter un potentiel de prolifération légèrement moins important, comme constaté qualitativement par microscopie. A court terme, nos résultats indiqueraient donc une forme de synergie. Les cellules n'ont pas assez proliféré sur le PLA pur et n'ont donc pas conduit par la suite à la différenciation attendue, mais en combinant les deux polymères, il est possible d'obtenir une prolifération optimale (grâce à la présence de PCL) suivie de la différenciation, préférentiellement vers le tendon (grâce à la présence de PLA).

Concernant ces scaffolds coaxiaux PCLin et PCLout, même si les analyses en microscopie n'ont pas souligné de différence entre les deux cas, il semble que les deux polymères ne se soient pas mélangés pendant le processus. En effet, des tests menés à l'IMP d'Hanovre avec de l'eau comme solution interne ont montré que le montage utilisé pour la production des scaffolds étudiés ici fonctionnait efficacement et permettait la formation de fibres creuses, l'eau de la couche interne s'évaporant. De plus, le PCLin, qui présente donc des fibres avec une couche externe de PLA, est celui des deux scaffolds coaxiaux qui a orienté le plus les cellules vers le tendon. Si, comme supposé, l'augmentation provient bien de l'apport en PLA, celui-ci est donc plus efficace quand il se trouve à l'extérieur : il y a bien une influence de la production coaxiale sur la différenciation.

Il est à noter que la différence de morphologie des fibres constatée entre PLAtcm et PLAdcm (forme de nanoporosité sur le deuxième) n'a pas engendré de différence quantifiable quant au développement du tapis de cellules. Cette morphologie a déjà été constatée par d'autres équipes, sans qu'un impact clair sur la réponse cellulaire soit décelé<sup>130,203</sup>. La taille des pores pourraient se situer en-dessous du seuil de détection des cellules ou n'avoir qu'une faible influence. L'effet pourrait également être négligeable par rapport à la porosité inter-fibres ou aux signaux chimiques dus à la nature du polymère.

Les résultats ont également montré une influence forte de l'orientation des fibres sur l'alignement des cellules, dont le cytosquelette s'est développé selon la même direction (analyse des filaments d'actine par microscopie à fluorescence). Cependant, cette influence ne s'est pas du tout traduite dans l'expression des gènes, avec des résultats nettement semblables entre les deux cas (avec quelques différences de significativité). Un temps de culture plus long pourrait être nécessaire pour voir apparaître d'importantes modifications dues à la direction des fibres. L'alignement pourrait alors favoriser la voie du tendon, selon Bashur *et al*<sup>217</sup> et Shang *et al*<sup>226</sup>, après 7 à 14 jours de culture. Il pourrait être nécessaire d'aligner les fibres d'un polymère qui induit déjà cette différenciation avec des fibres aléatoires pour obtenir un effet renforcé.

En résumé, il se dégage donc principalement de cette étude que les scaffolds coaxiaux tendent à favoriser la différenciation des CSM en tendon, et le PVA et le PCL purs en os. Il est cependant possible d'éliminer le PVA des futures études à cause de son potentiel d'adhésion limité, et l'on peut aussi envisager un temps de culture plus long pour affiner la compréhension de l'influence des fibres alignées ainsi que du PLA pur. L'étude de la littérature concernant le potentiel zeta des différents matériaux (Table 13) n'a pas permis de dégager un effet précis, étant donné la difficulté de comparer les différents articles entre eux (pH, concentration, forme liquide ou solide, structure du matériau). Les valeurs sont de plus toutes négatives, ce qui ne permet pas de conclure sur l'influence de ce paramètre sur la réponse cellulaire. Si l'on s'intéresse à la caractérisation mécanique et morphologique du PCL et des scaffolds coaxiaux, c'est donc un support de culture avec des fibres plus fines et un module de Young parmi les plus élevés qui a orienté la différenciation vers l'os, quand des fibres plus épaisses avec un module de Young faible ont favorisé la voie du tendon. Il est cependant difficile de clairement distinguer le rôle respectif de ces deux propriétés dans l'orientation de la différenciation. Nam *et al*<sup>227</sup> ont noté qu'un module plus élevé pouvait favoriser l'ostéogénèse au détriment de la chondrogénèse, mais n'analysent pas les marqueurs du tendon. Le lien entre diamètre faible et module important, cohérent avec notre analyse morphologique et mécanique, a déjà été relevé concernant les fibres électrospinnées mais sans étude de la différenciation engendrée<sup>205</sup>. Wanasekara *et al*<sup>205</sup> font toutefois l'hypothèse qu'un module de Young élevé oppose plus de résistance au déplacement des cellules, freinant leur adhésion et leur insertion dans le scaffold. Ce comportement serait cohérent avec la prolifération faible obtenue sur PVA, et pourrait avoir été compensé par un matériau plus

adapté sur PCL. Les résultats de mesure de l'angle de contact ont confirmé les caractères hydrophiles (PCLg, PVA) ou hydrophobes (base PCL) des scaffolds suspectés par caractérisation mécanique en milieu humide. Le PVA ayant montré une claire tendance pour la lignée osseuse quand le PCLg ne présentait qu'un état incertain, l'hydrophilie ne peut expliquer seule ces résultats. Elle valide donc cependant l'origine de la baisse des propriétés mécaniques de ces scaffolds après immersion. Les scaffolds optimaux pour chaque voie sont ainsi ceux dont les propriétés sont conservées en milieu humide, car ils permettront d'assurer un maintien suffisant et une manipulation aisée lors d'une potentielle utilisation clinique comme substitut sous forme de feuillet. Cet aspect, ainsi que la nature chimique du polymère utilisé, sont donc les paramètres les plus importants pour choisir le scaffold le plus adapté à l'application visée. La versatilité du procédé de production ainsi que des résultats prometteurs pour l'une et l'autre voie de différenciation permettront également l'étude de scaffolds doubles pour la reconstruction de l'interface os/tendon.

#### 4) Conclusion

Il a été mené dans le présent chapitre une caractérisation mécanique et biologique de 11 scaffolds électrospinnés différents. Si la littérature rapporte de nombreux cas d'utilisations de matériaux électrospinnés, les protocoles exacts de production des fibres comme de culture à leur contact sont nettement variables d'une étude à l'autre et ne s'intéressent généralement qu'à l'influence d'un ou deux scaffolds par rapport à un témoin sans matériau. Nous avons donc analysé ici un grand nombre de supports différents dans des conditions identiques. Il a ainsi été possible de dégager les matériaux les plus adaptés à la culture cellulaire en termes d'adhésion et de prolifération, mais également de détecter la différenciation privilégiée vers l'os ou le tendon et de corréliser cette réponse à des propriétés morphologiques et mécaniques. Cette étude était cependant avant tout phénoménologique et s'intéressait à la réponse cellulaire globale et à la formation macroscopique du tissu. La littérature donne d'ores et déjà des éléments de réponse quant à l'origine des différents comportements (influence chimique des polymères utilisés, importance de la porosité et des autres caractéristiques de surface), mais des études en ce sens peuvent également être conduites, à la suite du présent travail ou parallèlement aux expérimentations en condition dynamique. En effet, on se propose à présent d'évaluer l'apport de sollicitations mécaniques imposées au support au cours de la culture sur le développement des cellules, et en particulier leur différenciation.

## IV. Culture dynamique sur fibres électrospinnées

### 1) Introduction

Comme présenté au chapitre 1, l'application de sollicitations aux cellules en cours de culture *in vitro* est une des possibilités de modification de leur environnement. Ces signaux présentent notamment l'intérêt d'agir sur le potentiel et l'orientation de la différenciation, pour les os mais aussi pour le tendon, les deux voies étudiées au cours des essais statiques du présent travail. Les contraintes mécaniques nécessaires pour l'un ou l'autre des types cellulaires pourraient cependant ne pas être du même ordre de grandeur<sup>228</sup>. De plus, nous avons vu que l'étude de telles conditions dynamiques n'a pas encore abouti à un consensus sur les nombreux paramètres techniques à définir.

La démarche de mise au point d'un protocole de sollicitations mécaniques en cours de culture de scaffolds électrospinnés va donc être présentée ici. L'objectif de ces expérimentations était d'évaluer les possibles synergies entre facteurs chimiques (milieu de culture, matériau utilisé, signaux cellulaires) et facteurs mécaniques (contraintes en traction cycliques) en les appliquant aux scaffolds choisis suite à la phase de culture statique. Il convenait donc de déterminer les paramètres de traction les plus adéquats et de lever un certain nombre de verrous techniques pour assurer la faisabilité de la culture dynamique.

### 2) Faisabilité

#### **Verrous techniques**

L'étude a concerné l'utilisation de l'appareil Bose Biodynamic, qui comporte une chambre de traction d'un volume intérieur d'environ 300 mL pouvant être entièrement remplie de milieu de culture (Figure 74). La géométrie plane des scaffolds électrospinnés permet d'envisager une prise du matériau entre des mors standards afin d'y appliquer les sollicitations par tractions.

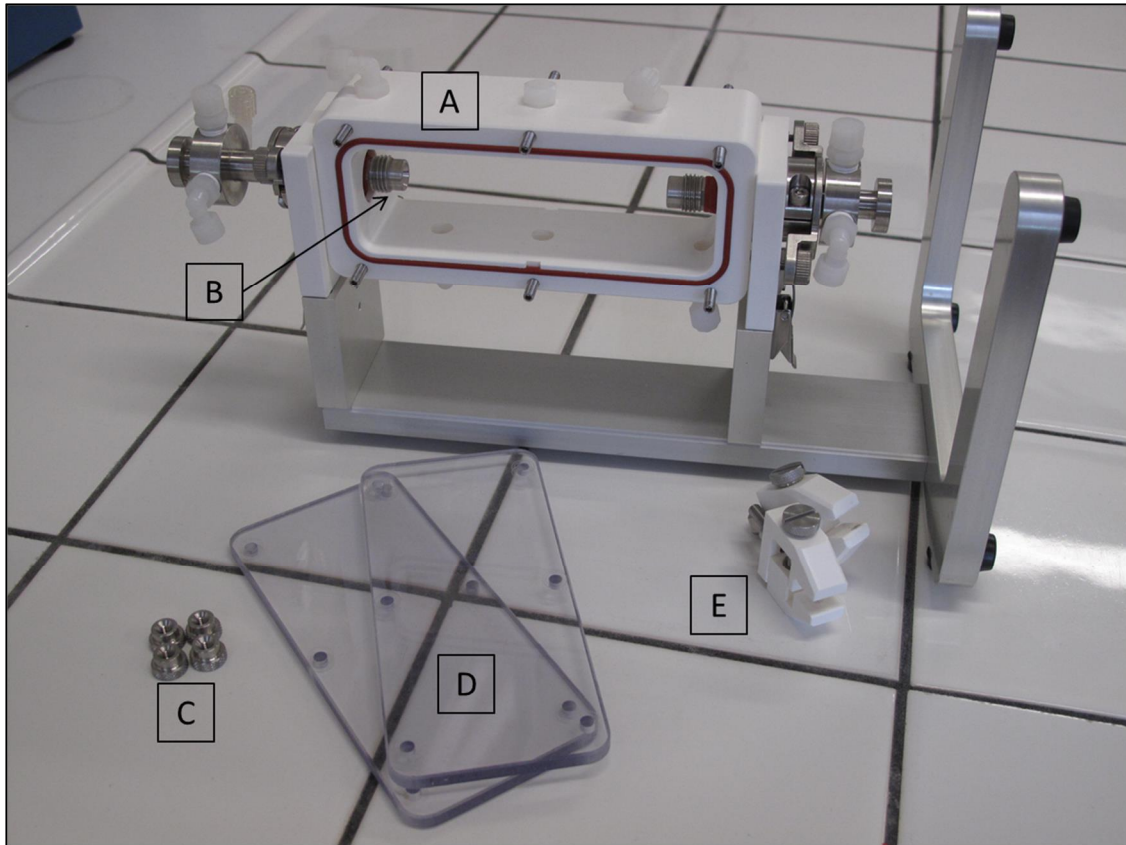


Figure 74 : Chambre de culture du Bose Biodynamic démontée. A: bâti de la chambre, B: coulisses, C: vis de serrage des parois vitrées, D: parois vitrées, E: mors.

Le premier enjeu était la conservation des conditions indispensables de culture, c'est-à-dire l'apport en nutriment, en oxygène, l'équilibre des gaz, le maintien de la température et l'évacuation des déchets. Il fallait alors garantir l'étanchéité du dispositif, mais également assurer la stérilité de la chambre et son maintien au cours des différentes étapes : ensemencement, fermeture, remplissage, installation.

Les autres étapes de la mise au point concernaient les paramètres liés à l'application des tractions, tels que définis dans le chapitre 1 : étape de préculture, fréquence et amplitude de la déformation, nombre de cycles, durée des phases de repos, etc.

Enfin, des méthodes d'analyses supplémentaires devaient être définies, afin de corrélérer le comportement biologique des échantillons (prolifération, viabilité et différenciation comme étudiées en statique) à leur comportement mécanique (évolution des propriétés mécaniques pendant la culture).



## ***Solutions apportées***

La chambre de culture montée sur le dispositif qui va appliquer les déformations peut être entièrement installée dans un incubateur de culture cellulaire standard. Le maintien en température (37°C) peut donc être aisément assuré, tout comme les échanges gazeux (apport en oxygène, 5% de CO<sub>2</sub>) sous couvert du branchement d'un filtre à air sur une des sorties de la chambre. Cette dernière comportant un volume de milieu très important comparé aux conditions habituelles pour cette taille d'échantillons (2 mL en Pétri contre plus de 200 mL ici), l'absence de changement de milieu pour renouveler les nutriments et évacuer les déchets a été jugé acceptable pour une culture de 72h.

Conformément aux recommandations du constructeur, un cycle autoclave standard (1 bar, 121°C, 20 minutes) a permis de stériliser efficacement tous les composants de la chambre en contact avec les échantillons cellulaires : bâti, coulisses, mors, joints, vitres et vis. La mise en commun de tous les éléments doit cependant être effectuée rigoureusement à l'aide de pinces et de gants stériles, et sous poste de sécurité microbiologique (PSM) de type 2.

La mise en place des coulisses et des joints correspondants a posé des problèmes d'étanchéité, une fuite lente mais régulière du milieu étant constatée après installation de la chambre à la verticale. Un démontage complet des éléments avant remise en place a permis de régler ce problème : l'installation des coulisses à travers les joints en un seul mouvement, sans torsions ou allers-retours inutiles supplémentaires, a permis d'assurer facilement l'étanchéité.

Concernant l'élaboration du protocole d'application des contraintes mécaniques, l'ensemble des recherches bibliographiques menées au cours de la rédaction de l'article de review présenté au chapitre 1 a conduit au choix d'un premier lot de paramètres. Les cycles de tractions suivent une sinusoïde de 1Hz (gamme physiologique) oscillant entre un minimum de 0,5% de déformation et un maximum de 1,5% (gamme physiologique à supraphysiologique censée assurer une réponse cellulaire détectable *in vitro*). Ces valeurs doivent permettre de rester dans la zone linéaire élastique des scaffolds, afin de ne pas créer de déformation plastique permanente au cours de l'expérience. L'échantillon reste également tendu à 0,5% de déformation, sans risque de repliement, au cours des phases de repos.

La même durée totale de culture, 4 jours soit 96 heures, a été conservée afin de comparer les résultats à l'étape statique. Il a été décidé d'appliquer une pré-culture statique de 24h en maintenant la chambre (et l'échantillon) à l'horizontal pour permettre l'adhésion et la prolifération des cellules avant le début de la phase dynamique, qui s'étale donc sur les 3 jours (72 heures) restants. Cette phase est composée de périodes de sollicitations et de périodes de repos pour permettre le recouvrement de la sensibilité des cellules. On applique ainsi 600 cycles de déformation (10 minutes) puis 5h50 de repos, ce motif se répétant 12 fois jusqu'à la fin de la culture (Figure 75). Celle-ci s'achève donc par une phase de repos avant les analyses.

Afin d'évaluer l'influence des signaux mécaniques sur le comportement biologique, les mêmes analyses qu'à l'issue de la culture statique doivent être menées. A cela s'ajoute l'étude de l'évolution des propriétés mécaniques, les contraintes engendrées par les déformations étant enregistrées en continu au cours de la phase dynamique. Il a été décidé de s'intéresser en particulier au déphasage entre les cycles imposés et ceux mesurés, et à l'évolution de ce déphasage au fur et à mesure de la croissance du tissu cellulaire. Noté  $\delta$ , il est lié au rapport entre la composante élastique  $E'$  et la composante visqueuse  $E''$  du module de Young dynamique  $E^*$  :

$$E^* = E' + i.E'' \quad \tan(\delta) = E''/E'$$

On se situe volontairement au début de l'expérience dans la zone linéaire de la réponse du scaffold pour rester dans ce cadre lors des premières déformations. Dans l'hypothèse où un déphasage est détecté en cours de culture, il correspondrait donc à une apparition du comportement visqueux dû au développement du tissu cellulaire. L'objectif de la double analyse, biologique et mécanique, sera ainsi de corréler l'évolution de  $E'$  et  $E''$  en fonction du temps avec la voie de différenciation (os ou tendon) empruntée par les cellules.

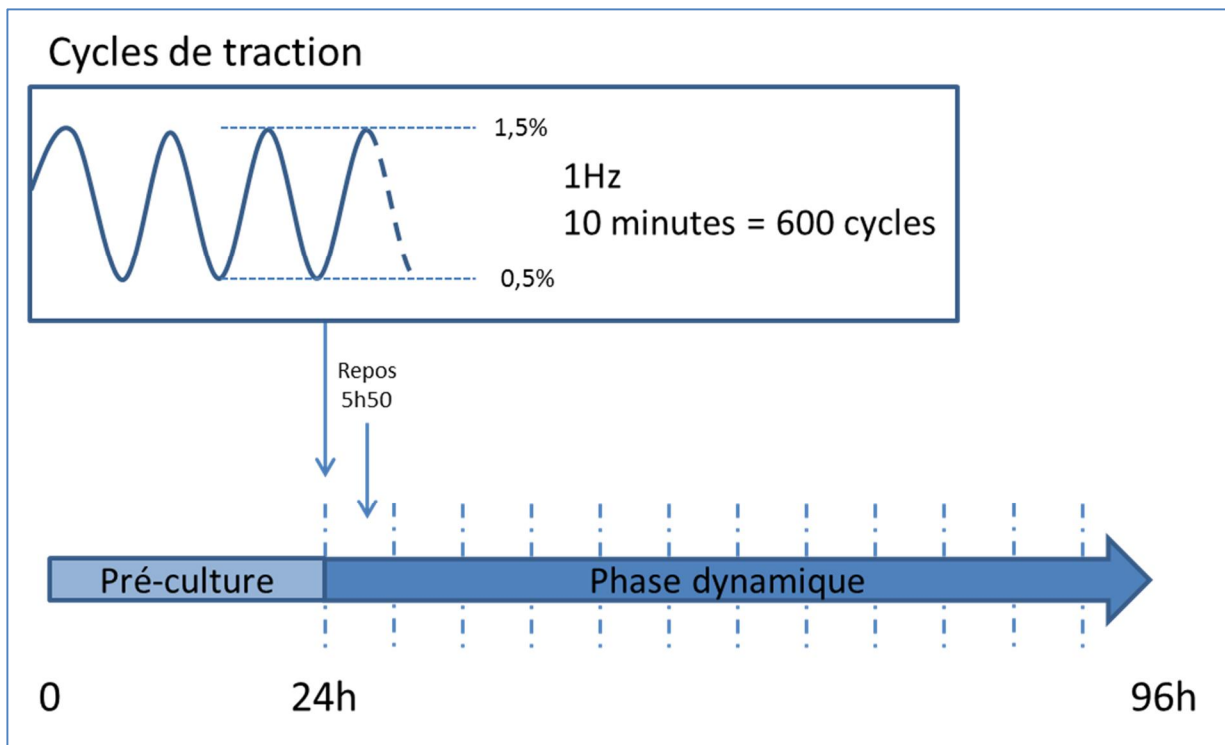


Figure 75 : Planning de la culture dynamique sur échantillons électrospinnés.

### Validation

Les absences de fuite et de contamination bactérienne ont pu être constatées après remplissage de la chambre et mise en incubation pendant 72h (Figure 76). Les transferts de gaz ont également été vérifiés par une absence d'acidification du milieu (l'indicateur de pH qui y est ajouté, le rouge de phénol, n'ayant pas vu sa couleur modifiée).

Un script pour le logiciel libre Scilab a été rédigé afin d'exploiter les données mécaniques de sortie. Le fichier texte fourni par le logiciel d'acquisition, qui regroupe les contraintes engendrées mesurées, est traité automatiquement afin de calculer la transformée de Fourier du signal, et par là sa fréquence principal et le déphasage avec la déformation imposée. La validité du programme a été vérifiée à l'aide de sinusoides parfaites simulées (Figure 77) puis avec des données expérimentales préliminaires. Il est à noter que la décomposition du signal par la transformée de Fourier permet de faire apparaître des pics de fréquences parasites dues aux autres manipulations (et claquements de porte) à proximité de la machine, qui pourront donc être filtrées si besoin. On trouvera le script complet en annexe.



Figure 76 : Chambre de culture du Bose Biodynamic remplie de milieu de culture avec scaffold de PCL électrospinné. Le volume d'air conservé à l'intérieur permet la mise en place d'un filtre sur l'ouverture supérieure.

```

1 t = [0.01:0.01:20];
2 sin1 = sin(50*t); //sinus simulant la déformation appliquée
3 sin2 = sin(50*t+0.2348); //sinus simulant les contraintes mesurées
-->exec('C:\Users\Timothée B\Documents\Scilab\tractionNBiodynamic.sce', -1)

Frequence de déplacement imposée : 7.953977 Hz.
Frequence de contraintes mesurée : 7.953977 Hz.
Déphasage de -0.2347675 radians.

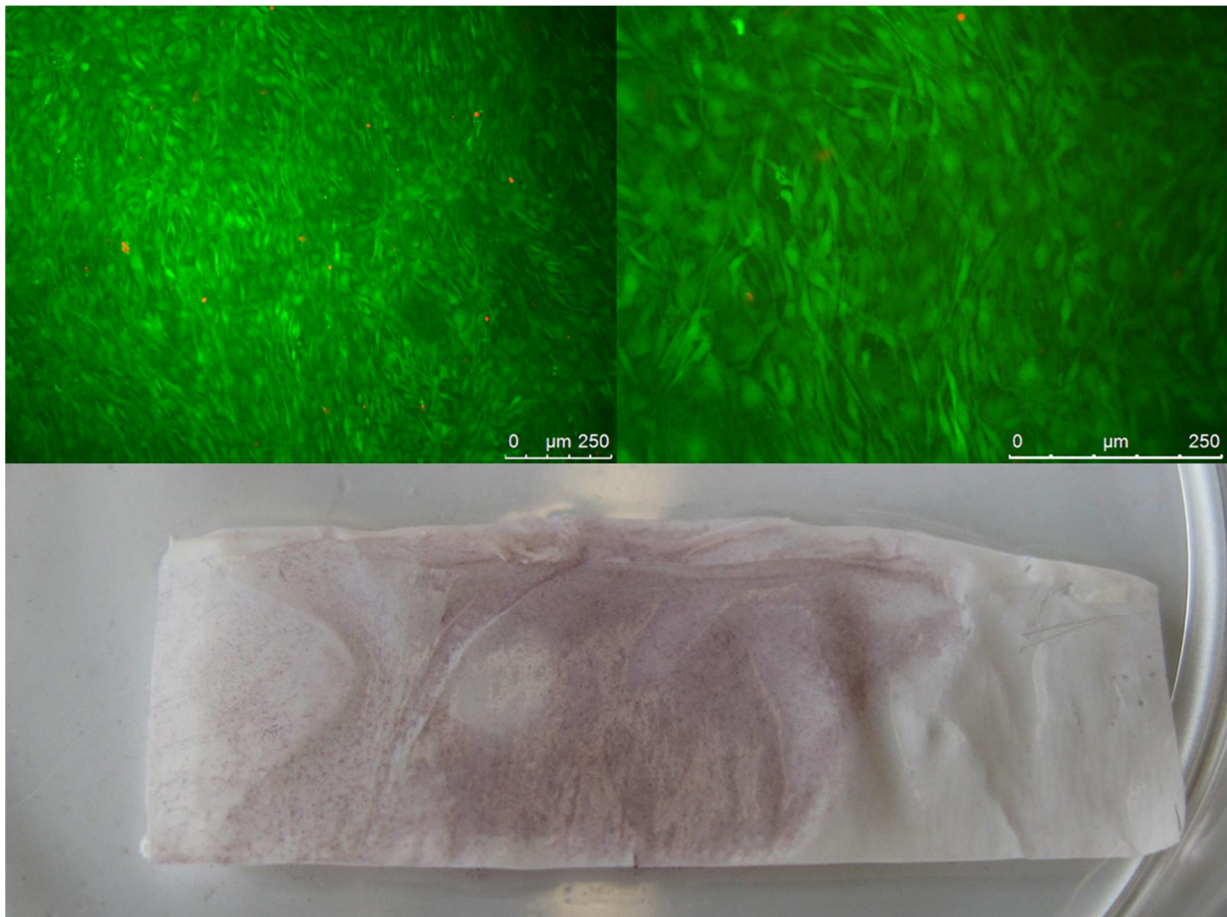
```

Figure 77 : Exemple de validation du script d'analyse des données mécaniques. A : définition des signaux appliqués et mesurés simulés, B : résultats retournés par le script.

Enfin, une culture en condition a été effectuée sur PCL électrospinné en suivant le protocole établi ci-dessus pour en valider la faisabilité. La même lignée de préostéoblastes que lors des premiers tests en cassette (MC3T3-E1 clone 4) a été utilisée, pour un nombre de cellulesensemencées identique aux conditions statiques de culture sur électrospinning. La

taille du matériau dépassant des mors correspondait à celle des scaffolds utilisés en Pétris. Un marquage fluorescent Live/Dead ainsi qu'un marquage ALP ont été effectués sur l'échantillon.

La Figure 78 montre les résultats de ces analyses. Les cellules sont bien présentes à l'issue des 96 heures, elles ont convenablement adhéré et proliféré (fluorescence, en haut). On retrouve un tapis cellulaire dense et continu semblable aux meilleurs cas constatés en condition statique. Le nombre de cellules mortes apparaît très faible. Le marquage ALP a permis de faire apparaître des zones où l'enzyme a été exprimée, le scaffold restant blanc dans les zones ayant servi de prise aux mors.



**Figure 78 : Haut : Observation au microscope à fluorescence de MC3T3-E1 après culture sur PCL électrospinnées en conditions dynamiques (x10, gauche et x20, droite). Calcéine AM (vert, cellules vivantes) et EthD-1 (rouge, noyaux des cellules mortes). Bas : Marquage ALP de l'échantillon, les zones foncées correspondent à l'expression de l'ALP (contraste augmenté).**

Il a donc été montré que le protocole était applicable à la culture de CSM sur scaffolds électrospinnés, permettait l'adhésion et la prolifération des cellules et rendait possible une analyse à la fois mécanique et biologique de la réponse de l'échantillon.

### *3) Perspectives*

Afin d'étudier l'influence de sollicitations mécaniques sur la culture de CSM au contact de scaffolds électrospinnés, un protocole de culture dynamique a été élaboré et sa faisabilité vérifiée. Les possibilités d'analyses corrélant réponse biologique et comportement mécanique ont également été validées. Le protocole est donc prêt à être éprouvé par des expérimentations sur les biomatériaux jugés les plus intéressants suite à la culture statique, en nombre d'échantillons suffisant pour conclure sur les possibles synergies entre signaux chimiques et mécaniques.

Les paramètres techniques choisis (amplitude, fréquence et durée des phases de repos notamment), se basent sur une revue de la littérature pour leurs ordres de grandeur, comportent une part d'arbitraire concernant les valeurs précises utilisées. Ils pourront donc être ajustés en fonction des premiers résultats afin, par exemple, d'assurer une réponse cellulaire suffisante pour comparer significativement les différents scaffolds étudiés, pour optimiser la viabilité ou pour s'adapter respectivement aux lignées de l'os et du tendon. L'alignement des cellules potentiellement engendré par ces sollicitations uniaxiales devra être étudié.

Il est à noter que des essais de fonctionnement sans échantillon mais avec la chambre totalement immergée ont montré une légère influence sur les forces mesurées des mouvements du liquide (engendrés par les mouvements des coulisses). Ce point doit être analysé plus précisément pour le prendre en compte dans les futurs calculs.

Enfin, si la littérature montre qu'il est possible de détecter les changements de propriétés mécaniques des tissus en cours de culture<sup>194</sup>, il pourra être nécessaire d'augmenter la durée de culture dynamique jusqu'à plusieurs semaines pour obtenir des variations mesurables.

## V. Conclusion du chapitre

Ce chapitre a permis de démontrer que la production de scaffolds sous la forme de fibres électrospinnées était opérationnelle au laboratoire Roberval pour différents polymères et dans des conditions optimales. Adaptable, le montage pourra être encore amélioré pour affiner le contrôle des fibres pendant leur fabrication (mise en place d'une caméra filmant le cône de Taylor) et paramétré pour de nouveaux matériaux.

Les scaffolds produits sur place, ainsi que d'autres échantillons obtenus dans le cadre de collaborations avec des laboratoires français et internationaux, ont été caractérisés d'un point de vue biologique et mécanique en conditions statiques. Le choix du protocole et des analyses menées ont été faits au regard des études précédentes s'intéressant spécifiquement à l'ingénierie tissulaire osseuse pour la reconstruction du visage, mais aussi en élargissant le champ d'application : l'étude des marqueurs du tendon et du potentiel de différenciation dans cette voie met en lumière les possibilités de travail aux interfaces entre les tissus.

Enfin, l'application de sollicitations mécaniques dans le cadre d'une culture dynamique sur les scaffolds électrospinnés a été étudiée. Il s'agissait d'analyser ici plus en détail le facteur « environnement » de l'ingénierie tissulaire et les synergies qui peuvent y avoir lieu. Un protocole complet et pertinent avec les spécificités du matériau a été établi et sa faisabilité validée, et les outils d'analyse ont été développés. Les étapes suivantes de culture pourront donc être rapidement menées lors des futures études, dans la perspective d'améliorer la tenue mécanique du substitut osseux sous forme de feuillet.

## Chapitre 6 : Conclusions et perspectives

---



## Chapitre 6 : Conclusions et perspectives

### I. Conclusions

Ce travail s'inscrit dans un projet plus global de développement d'un substitut osseux pour la reconstruction du visage, porté par l'UTC, le service de chirurgie maxillo-faciale du CHU d'Amiens et l'équipe EA4666 de l'UPJV. Notre approche dans le cadre de cette thèse a consisté en la mise en place d'un cycle itératif visant à obtenir les propriétés biologiques et mécaniques identifiées pour le substitut biohybride. Dans ce sens, les trois chapitres de résultats présentés constituent chacun une itération permettant d'en évaluer les propriétés ou de les améliorer afin de s'approcher d'un résultat final cliniquement exploitable. Outre des enjeux de biocompatibilité et de disponibilité communs aux techniques existantes de comblement de défauts osseux, il devait répondre à des attentes spécifiques des cliniciens concernant la zone maxillo-faciale, telles que la malléabilité, la tenue mécanique, l'adaptabilité aux géométries complexes et la néovascularisation. C'est pourquoi le choix s'est porté sur un substitut sous forme de feuillet, résistant mais souple, formé d'un matériau et de cellules vivantes. Obtenu par un procédé standard, c'est *in situ*, au cours de l'opération chirurgicale, qu'il est destiné à être manipulé pour s'adapter au cas particulier de chaque patient. Les publications et communications autour de cette approche originale ont montré que la communauté scientifique tout comme le grand public étaient sensibles aux enjeux de cette problématique et aux avancées obtenues : un feuillet hybride manipulable reconstruit par ingénierie tissulaire osseuse, un « pansement vivant » pour la reconstruction du visage.

Dans un premier temps, un feuillet reconstruit à partir de granules de phosphate de calcium et de cellules de lignée a été caractérisé biologiquement et mécaniquement, complétant les travaux initiés précédemment dans le laboratoire (Thèse de Benoît Carpentier et collaboration avec l'équipe du Prof. Pierre Layrolle). Cette étude a conduit à mieux définir le protocole de culture et à l'optimiser par le choix d'une taille de granules pertinente. Le procédé pouvait toutefois être optimisé selon différents axes de recherche. D'une part, une approche translationnelle devait permettre d'approcher la perspective d'utilisation clinique, notamment par l'utilisation de cellules humaines primaires et en améliorant le potentiel de pré-vascularisation du substitut. D'autre part, la caractérisation mécanique ayant révélé des

propriétés mécaniques en traction trop faibles pour assurer le maintien en toute circonstance, un nouveau scaffold présentant un meilleur maintien pouvait être étudié.

Ces deux axes différents ont été traités au cours de ce travail. Le protocole de culture en cassette a été adapté avec succès à une coculture de cellules humaines primaires, cellules souches mésenchymateuses et cellules endothéliales, ce second type cellulaire devant permettre un début de vascularisation *in vitro* afin d'assurer la bonne intégration du substitut après implantation. Le choix des CSM a permis d'approcher la perspective clinique d'utilisation de cette source autologue, la collaboration avec les équipes du Prof. Jean-Pierre Marolleau du CHU d'Amiens apportant l'expertise de leur culture et de l'analyse de leur comportement. Le potentiel de différenciation et le développement effectif des deux populations cellulaires ont complété la caractérisation biologique déjà menée sur lignée. Un maintien mécanique insuffisant des feuillets a cependant été souligné.

Parallèlement, un nouveau matériau possédant une tenue mécanique intrinsèque et apte à former un scaffold pour l'ingénierie tissulaire osseuse a été recherché. La technique d'électrospinning, versatile et pertinente d'un point de vue morphologique comme biologique, a été mise en place au sein du laboratoire de mécanique Roberval. Elle a été développée, validée et caractérisée, puis exploitée au laboratoire BMBI pour la culture cellulaire. Le montage a subi plusieurs évolutions à partir des travaux des Prof. Christophe Eglès à Tufts University et Dr. Fahmi Bedoui avec l'Université d'Akron afin de s'adapter à plusieurs matériaux et à l'application finale visée. De nombreux paramètres différents ont été étudiés et comparés à des scaffolds obtenus en lien avec l'ICPEES de Strasbourg et l'Institut für Mehrphasenprozesse de l'Université d'Hanovre jusqu'à dégager les plus pertinents. Si l'orientation d'une lignée de cellules souches vers la voie osseuse a été efficacement obtenue à partir des fibres de PCL, la voie du tendon induite par l'ajout de PLA a également été analysée grâce à l'expertise de l'équipe du Dr. Delphine Duprez du Laboratoire de Biologie du Développement de l'UPMC. De plus, les protocoles sont prêts techniquement pour appliquer des cas de culture complexe avec sollicitations mécaniques *in situ* pendant la croissance du tissu afin d'étudier l'augmentation du potentiel de différenciation des substituts.

A l'issue de ce travail de thèse, plusieurs étapes ont donc été franchies vers l'utilisation clinique d'un substitut répondant aux attentes des chirurgiens pour le domaine maxillo-facial. Elles ont été l'occasion à la fois de conforter et améliorer des méthodologies existantes et de développer de nouveaux savoir-faire dans les laboratoires de l'UTC. Ces

étapes ne sont cependant pas les dernières mais ont ouvert de nombreuses perspectives pour les études à venir.

## II. Perspectives

A court terme, il est possible de poursuivre les pistes issues de la discussion de nos résultats. La suite logique des travaux consistera en l'application de contraintes mécaniques aux scaffolds électrospinnés pendant la culture. L'étude pourra se concentrer sur les matériaux jugés les plus pertinents suite aux étapes statiques, et devra comporter un nombre suffisant de réplicats pour mettre en lumière les synergies entre signaux mécaniques et chimiques. Les fibres électrospinnées pourront alors être utilisées sur une plus large surface afin de retrouver la forme de feuillet, avec une éventuelle utilisation en cassette, et à terme la coculture CSM/CE primaires humaines. Le montage d'électrospinning lui-même pourra être perfectionné et paramétré pour de nouveaux polymères. Dans l'optique de l'application clinique, l'influence sur la viabilité des forces subies au cours de l'opération chirurgicale (repliement, découpage, compression) pourra également être analysée.

Ces perspectives dessinent à long terme d'autres projets et mettent en lumière d'autres enjeux technologiques et scientifiques. La problématique majeure de l'utilisation de cellules souches est leur bonne différenciation en fonction de l'application visée, et par là l'influence de toutes les composantes de leur environnement. Afin d'en augmenter encore le potentiel de différenciation et de le maîtriser plus finement, les procédés établis au cours du présent travail pourront être complexifiés à l'aide de tout ce qu'offre l'ingénierie tissulaire et le savoir-faire des laboratoires BMBI et Roberval : culture statique en cassette puis sollicitations mécaniques (ou inversement), apport d'un flux circulant, mais surtout synergie entre ces différents signaux, comme flux et tractions. Si de nombreux facteurs de l'environnement sont couramment étudiés, certaines combinaisons pourraient faire l'objet d'analyses supplémentaires au regard d'applications spécifiques et permettre d'aller plus loin dans le développement de substituts pertinents.

Un autre enjeu concerne l'étude, et à terme la reconstruction, des interfaces entre les tissus. Faciliter l'intégration des tendons ou des muscles sur l'os, ou les liens entre os et dure-mère dans la zone du crâne, s'inscrit dans la même logique que les attentes liées à la néovascularisation. Le substitut obtenu par ingénierie tissulaire doit tendre vers un organe artificiel complexe, proche de l'*in vivo*, pour qu'il puisse s'y insérer naturellement et y être

incorporé de toute part. On a démontré ici la possibilité d'orienter la différenciation de cellules souches sur les voies de l'os ou du tendon par ajout d'un matériau sans rien modifier d'autre du protocole de culture. Les scaffolds électrospinnés semblent donc particulièrement pertinents pour la reconstruction d'interfaces. Grâce à leur forme, il est alors possible d'envisager la fabrication et la réalisation de matériaux bifaces voire multicouches, de cocultures séparées par les réseaux de fibres jouant le rôle de membranes, et la formation de substituts mimant les interfaces os/tendon voire os/tendon/muscle. L'ingénierie tissulaire apparaissant toujours plus interdisciplinaire.

# Annexes

---

## Annexes

### I. Compléments bibliographiques

#### 1) Ingénierie tissulaire, généralités.

##### **Définition et historique de l'ingénierie tissulaire**

L'ingénierie tissulaire est un domaine en pleine expansion, comme le montre le nombre d'utilisation des mots «Tissue engineering» dans les publications scientifiques au cours des 30 dernières années (Figure 79). Si certaines mentions de la discipline ont été constatées à une date antérieure<sup>\*4</sup>, notamment lors de conférences (Figure 79), l'adoption du terme en tant que concept précisément défini est en général accordée à Langer et Vacanti en 1993<sup>229</sup>. On note cependant son utilisation dès 1984 quand Wolter *et al* analysent la formation de néo-tissu autour de matériaux implantés au niveau de la cornée<sup>230</sup>. D'autres travaux suivent à la fin des années 1980 notamment par les équipes de Matsuda *et al*<sup>231</sup> et Nerem *et al*<sup>232</sup>, avec des premiers articles de review<sup>233</sup> et une première solution inspirée de l'ingénierie tissulaire commercialisée dès le début de la décennie 1990 (un substitut de peau bioartificiel à destination des grands brûlés)<sup>25,50</sup>. La définition générale avancée par Langer et Vacanti est la suivante :

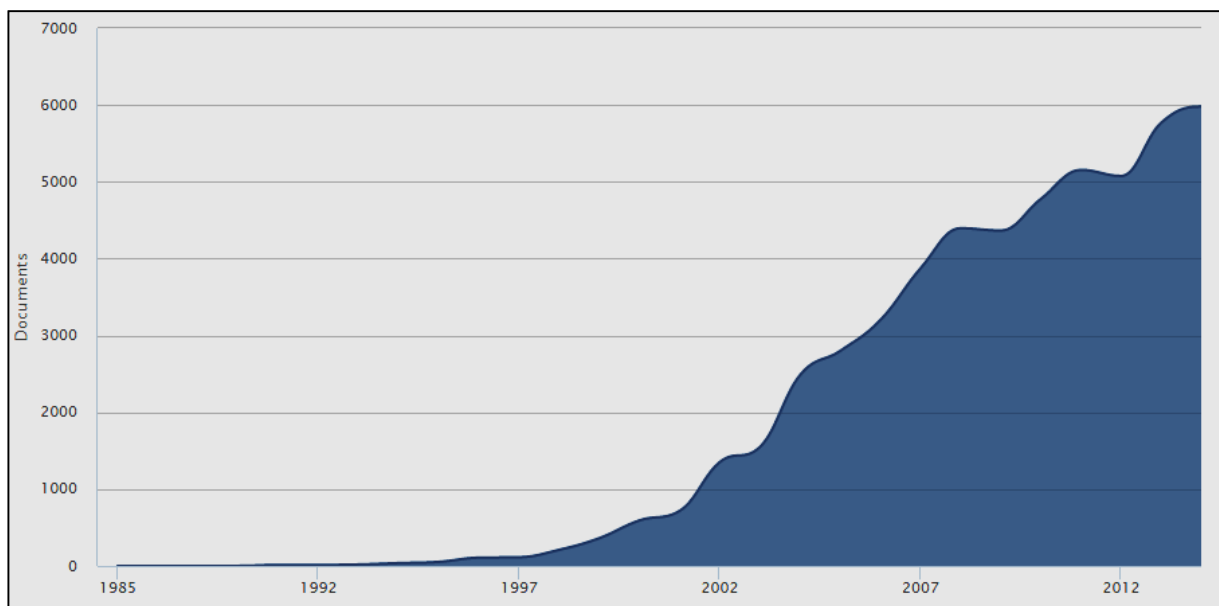
*«Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function.»*<sup>229</sup>

Il est donc question d'appliquer toutes les techniques générales des sciences de l'ingénieur et du vivant à la fabrication de tissus biologiques, et ce *in vitro*, dans le but de les réimplanter dans l'organisme<sup>30</sup>. L'objectif final est de remplacer ou restaurer un organe vital,

---

<sup>\*4</sup> Certains auteurs<sup>6</sup> n'hésitent pas à voir dans la création d'Ève depuis une côte d'Adam le premier acte d'ingénierie tissulaire

des tissus lésés voire manquants lorsque le corps n'arrive pas lui-même à effectuer cette régénération, en raison de son âge, de pathologies ou de la gravité des blessures. L'apport doit permettre par la suite le redémarrage des fonctions cellulaires et tissulaire natifs, les mécanismes *in vivo* reprenant alors un développement normal après l'insertion du substitut reconstruit<sup>50</sup>. De même, le recours à l'ingénierie tissulaire peut être que temporaire dans le cas de pathologies aiguës, avec l'utilisation de dispositifs extracorporels, concernant le foie notamment<sup>234,235</sup>.



**Figure 79 : Evolution du nombre d'utilisations du terme « Tissue Engineering » dans les articles (titre, abstract et mots-clés) publiés de 1985 à 2014. Source : Scopus.**

On remarque dès la définition de Langer et Vacanti la notion de pluridisciplinarité, qui va intervenir tant dans la variété des organes cibles que dans les différents domaines des sciences de l'ingénieur, du vivant mais aussi des sciences cliniques<sup>6</sup> abordés par l'ingénierie tissulaire. Une liste non exhaustive des tissus considérés et des champs de recherche utilisés dès les premières années d'étude est rapportée dans la Table 14.

Si il existe donc une variété des organes et tissus cibles, il est toutefois possible de dégager des principes techniques généraux de l'ingénierie tissulaire et de déterminer quels sont les choix possibles pour chaque paramètre (cellules, scaffold, environnement, bioréacteur).

<b>Domaines de recherche</b>	<b>Disciplines</b>	<b>Organes et tissus cibles</b>
<i>Ingénierie</i>	<i>procédés</i>	Intestins
	<i>biomédical</i>	Os et cartilage
	<i>biomatériaux</i>	Reins
	<i>électronique</i>	Foie
	<i>mécanique</i>	Muscles
Biologie	cellulaire	Système nerveux
	moléculaire	Système cardiovasculaire
	génétique	Vessie
	Biochimie	Urètre
	Immunologie	Pancréas
	Histologie	Cornée
<i>Chirurgie</i>	<i>reconstructrice</i>	Peau
	<i>orthopédique</i>	
	<i>orale et maxillo-faciale</i>	
	<i>dentaire</i>	
	<i>Transplantations</i>	
Médecine	Dermatologie	
	Endocrinologie	
	Immunologie	
	Hématologie	
	Oncologie	
	Néphrologie	
	Neurologie	
<i>Techniques</i>	<i>Microscopie</i>	
	<i>Imagerie</i>	
	<i>Modélisation</i>	
	<i>Spectroscopie</i>	

Table 14 : Pluridisciplinarité de l'ingénierie tissulaire et variété des organes et tissus cibles. Adapté de <sup>6,236</sup>



## Cellules

Le type cellulaire ciblé est directement relié au tissu à reconstruire, et on doit donc s'intéresser pour l'os aux ostéoblastes. Concernant les cellules cibles pour d'autres organes, citons par exemple les chondrocytes (cartilage)<sup>237</sup>, fibroblastes (tendon, ligament)<sup>238</sup>, cellules nerveuses (système nerveux central et périphérique)<sup>239</sup>, hépatocytes (foie)<sup>235</sup> ou kératinocytes (peau)<sup>240</sup>.

Il est possible d'utiliser des cellules dites «de lignée» ou «primaires». Les premières sont des cellules commerciales, disponibles à l'achat auprès d'organismes dédiés<sup>241</sup>, et rendues immortelles (source cancéreuse, manipulation génétique)<sup>236</sup>. Elles sont donc considérées comme ayant un comportement identique d'un lot à l'autre et permettant une utilisation «infinie», quel que soit le nombre de dédoublement et de repiquages<sup>236</sup> (une limite de passages est toutefois conseillée en fonction de la lignée pour s'assurer du maintien de ses fonctions<sup>242</sup>). L'avantage de ces cellules est d'être disponibles en grand nombre et à tout moment, d'être aisément cultivées *in vitro* et de permettre la comparaison entre les études qui les utilisent<sup>10</sup>. Cependant, elles restent un modèle et ne peuvent traduire que partiellement le comportement de cellules saines et non manipulées. Il est donc possible d'utiliser des cellules dites primaires, c'est-à-dire directement issue d'un organisme vivant<sup>236</sup>. Génotype et phénotype sont non modifiés et identiques au tissu natif, avec un comportement cellulaire identique au début de la culture *in vitro*. Au même titre que des allo- ou autogreffes, l'application clinique est ainsi envisageable. Ces cellules sont, en contrepartie, plus fragiles, nécessitent des protocoles plus complexes et sont plus difficiles à conserver<sup>52</sup>: une baisse du potentiel de prolifération et un changement de comportement interviennent après un temps et un nombre de passages très faibles<sup>168</sup>. Elles supportent moins bien la cryoconservation que les cellules de lignées, et sont beaucoup plus sujettes à des variations d'un prélèvement à l'autre en fonction de l'âge et de l'état de santé de l'organisme donneur<sup>168</sup>. De plus, le problème de stock disponible rejoint celui des dons d'organes entiers. Ces deux sources potentielles ont donc chacune leurs avantages et leurs limites. Outre les contraintes financières et de disponibilité, le choix de l'une ou l'autre peut être dicté par l'avancée de l'étude, en favorisant les cellules de lignée pour des étapes de mise au point et de faisabilité, puis les cellules primaires pour les validations *in vivo* et les perspectives d'applications cliniques.

Pour des raisons identiques, il convient de choisir également entre des cellules issues de l'homme ou d'espèces animales, et à quel stade de différenciation les utiliser : cellules

spécialisées (ostéoblastes, fibroblastes, hépatocytes, etc.) ou cellules non-différenciées (cellules souches pluri- ou multipotentes, voir par ailleurs). D'une monoculture (un seul type cellulaire cultivé *in vitro*), il est possible de complexifier le processus d'ingénierie tissulaire en étudiant des cocultures<sup>81,243</sup> ou des pluricultures<sup>244</sup>. On va ainsi s'approcher des échanges qui existent au sein des tissus ou organes à reconstruire.

## **Environnement**

En augmentant de cette façon le degré de complexité du système, on cherche en réalité à mimer plus profondément le comportement cellulaire tel qu'il existe *in vivo*. C'est le deuxième facteur à prendre en compte, l'environnement, qu'il faut adapter et modifier en fonction de l'application visée, et ce à plusieurs niveaux :

- *Nutriments* : La culture s'effectue en général immergée dans un milieu de culture liquide afin d'apporter les ressources nécessaires au développement tissulaire, notamment du glucose, des sels, des vitamines et des acides aminés<sup>245</sup>.
- *Température* : pour leur survie, les cellules *in vitro* sont maintenues à une température semblable à celle de l'organisme dont elles sont issues, principalement 37°C pour l'homme et le petit animal (rat, souris).
- *Atmosphère* : un taux de 5% de CO<sub>2</sub> est imposé dans les incubateurs afin de favoriser les échanges gazeux avec l'intérieur des flasques et chambres de culture, où le CO<sub>2</sub> produit par la consommation des cellules pourrait s'accumuler et acidifier le milieu de culture.
- *Stérilité* : Les tissus reconstruits *in vitro* ne bénéficient pas du système immunitaire de l'organisme pour les protéger des bactéries, champignons et virus. La stérilité des échantillons doit donc être assurée, avec un ajout éventuel d'antibiotique au milieu de culture par sécurité. Les contaminations croisées, aboutissant à des cocultures ou des substitutions non désirées, peuvent ainsi être également évitées.
- *Facteurs chimiques* : outre les nutriments indispensables à la survie et le développement des cellules, d'autres composants peuvent être ajoutés au milieu de culture, notamment des facteurs de croissance qui vont permettre d'augmenter le potentiel prolifératif ou d'appuyer la différenciation vers une fonction particulière<sup>115</sup>.
- *Support de culture ou scaffold* : Voir chapitre principal de bibliographie.

## 2) Propriétés des phosphates de calcium

Deux propriétés principales des phosphates de calcium vont guider le choix de leur utilisation pour la culture de cellules osseuses : leur résorbabilité d'une part, et les caractéristiques d'ostéoconduction et ostéoinduction d'autre part.

La catégorie dite « biorésorbable » comprend, comme nous l'avons vu, essentiellement les TCP et l'OCPC, par opposition à l'HA présentant un très faible taux de résorption<sup>53</sup>. Il s'agit toutefois de résorption à long terme (plusieurs mois voire années<sup>36</sup>), mais la durée exacte peut être ajustée en fonction de la composition exacte des CP (Table 15). Dans les composés BCP, c'est donc la proportion de TCP qui gouvernera la vitesse de disparition du biomatériau<sup>80</sup>.

<i>Scaffold material</i>	<i>Composition</i>	<i>Resorption rate</i>
$\beta$ -Tricalcium phosphate	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Very slow (>3 years)
Hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Very slow (~years)
Bicalcium phosphate	Variable	Rapid (~days-weeks) <sup>a</sup>
Octacalcium phosphate	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_{6.5}\text{H}_2\text{O}$	Slow (~6–12 months)
Calcium sulfate	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Rapid (4–12 weeks)

<sup>a</sup>Hydroxyapatite/tricalcium phosphate (HA/TCP) ratio dependent.

**Table 15 : Variation des taux de résorption de différents CP en fonction de leur composition chimique. D'après Szpalczi *et al*<sup>53</sup>.**

De façon générale, les CP sont pour la plupart très bons ostéoconducteurs, mais seuls quelques-uns vont présenter des propriétés d'ostéoinduction qui resteront limitées<sup>76</sup>. L'HA, notamment, permet la meilleure ostéoconduction mais est totalement dépourvue de potentiel d'ostéoinduction et ostéogénèse<sup>30,36,53</sup>. L'OCPC, à l'inverse, présente le meilleur potentiel ostéogénique<sup>53</sup>. Les bioverres sont considérés les plus bioactifs, c'est-à-dire établissant le plus de lien avec le tissu cellulaire environnant<sup>57</sup>. Cela est dû à une évolution graduelle de leur surface, tout d'abord déficiente en calcium mais présentant une couche externe de phosphate, qui va permettre l'attachement à l'os<sup>36</sup>. De plus, leurs produits de dégradation peuvent favoriser l'ostéogénèse et la libération de facteurs de croissance<sup>36</sup>. Les  $\beta$ -TCP sont également ostéoconducteurs mais, lorsqu'ils sont dits amorphes (présence de défaut, absence de réseau cristallin de grande taille ou de conditions stœchiométriques), vont subir de nombreux

substitutions dans qu'ils pourront aisément relarguer *in situ*<sup>53,76</sup>. Ils sont donc responsables du potentiel d'ostéoinduction qui apparaît dans les différents mélanges de BCP<sup>76</sup>. Il va donc exister une échelle d'ostéoinduction<sup>76</sup> : BCP > TCP > HA. En particulier, après comparaison de différents ratio HA/TCP, c'est un rapport de 20/80 qui a présenté les meilleurs résultats concernant cette propriété, et qui apparaît donc comme le meilleur choix en termes d'équilibre résorption / ostéoconduction / ostéoinduction<sup>76</sup>.

Il convient également de s'intéresser aux propriétés mécaniques de ces biomatériaux. Le HA, stable et peu soluble, est donc principalement responsable de l'intégrité mécanique des différents BCP<sup>53,76</sup>. Il y a donc là aussi un équilibre à trouver avec la quantité de TCP dont le comportement en compression et traction est faible et proche de celui de l'os spongieux<sup>53</sup>. La Table 16 présente une comparaison des propriétés mécaniques entre l'os natif et plusieurs céramiques.

Ceramics	Compressive strength (MPa)	Tensile strength (MPa)	Elastic modulus (GPa)
Hydroxyapatite (HA)	>400	~40	~100
45S5 Bioglass <sup>®</sup>	~500	42	35
Glass-ceramic A/W	1080	215	118
Porous bioactive glass 70S30C (82%)	2.25	—	—
Porous Bioglass <sup>®</sup> -derived glass-ceramic (>90%)	0.2-0.4	—	—
Porous HA (82-86%)	0.21-0.41	—	0.83-1.6 × 10 <sup>-3</sup>
Cortical bone	130-180	50-151	12-18
Cancellous bone	4-12	—	0.1-0.5

Table 16 : Comparaison des propriétés mécaniques de l'HA, de plusieurs bioverres et de l'os natif. D'après Rezwan *et al*<sup>36</sup>.

### 3) Cellules souches et niches

Les cellules souches adultes, depuis leur découverte, ont été localisées à de nombreux endroits, bien plus qu'attendu alors par les chercheurs, au sein de compartiment spécialisés appelés « niches »<sup>166,169</sup> : moelle osseuse donc, muscle, peau, dents, intestins, foie, mais aussi cerveau, ur, ou sang menstruel<sup>162,166,167,169</sup> (il est à noter que ce concept de niche est encore particulièrement étudié aujourd'hui afin de comprendre par quel mécanisme les cellules souches peuvent rester indifférenciées dans un environnement particulier entourées de cellules spécialisées<sup>30,166</sup>). On distingue principalement 5 classes différentes :

- Hématopoïétiques : Les premières des cellules souches de moelle osseuse (*Bone Marrow Stromal Cells*, BMSCs), responsable de la formation des cellules sanguines, globules rouges, blancs et plaquettes<sup>30,166</sup>.
- Mésenchymateuses (CSM) : Également présentes dans la moelle, elles tirent leur nom des tissus mésenchymateux, issus du feuillet mésodermique, qu'elles sont capables de former : os, cartilage, tendon, ligament, muscle principalement<sup>6,30,164,170,172</sup> (Figure 16). On en rencontre également dans l'os compact, les tissus adipeux, le liquide amniotique, le sang de cordon ombilical et le sang périphérique<sup>162,169</sup>.
- Neuronales : Localisées dans le cerveau, elles sont responsables de la formation des neurones, astrocytes et oligodendrocytes<sup>30</sup>.
- Epidermiques : Responsables de la formation de l'épiderme, des kératinocytes et des follicules<sup>30</sup>.
- Epithéliales : Responsables du renouvellement des différents épithéliums<sup>30</sup>.

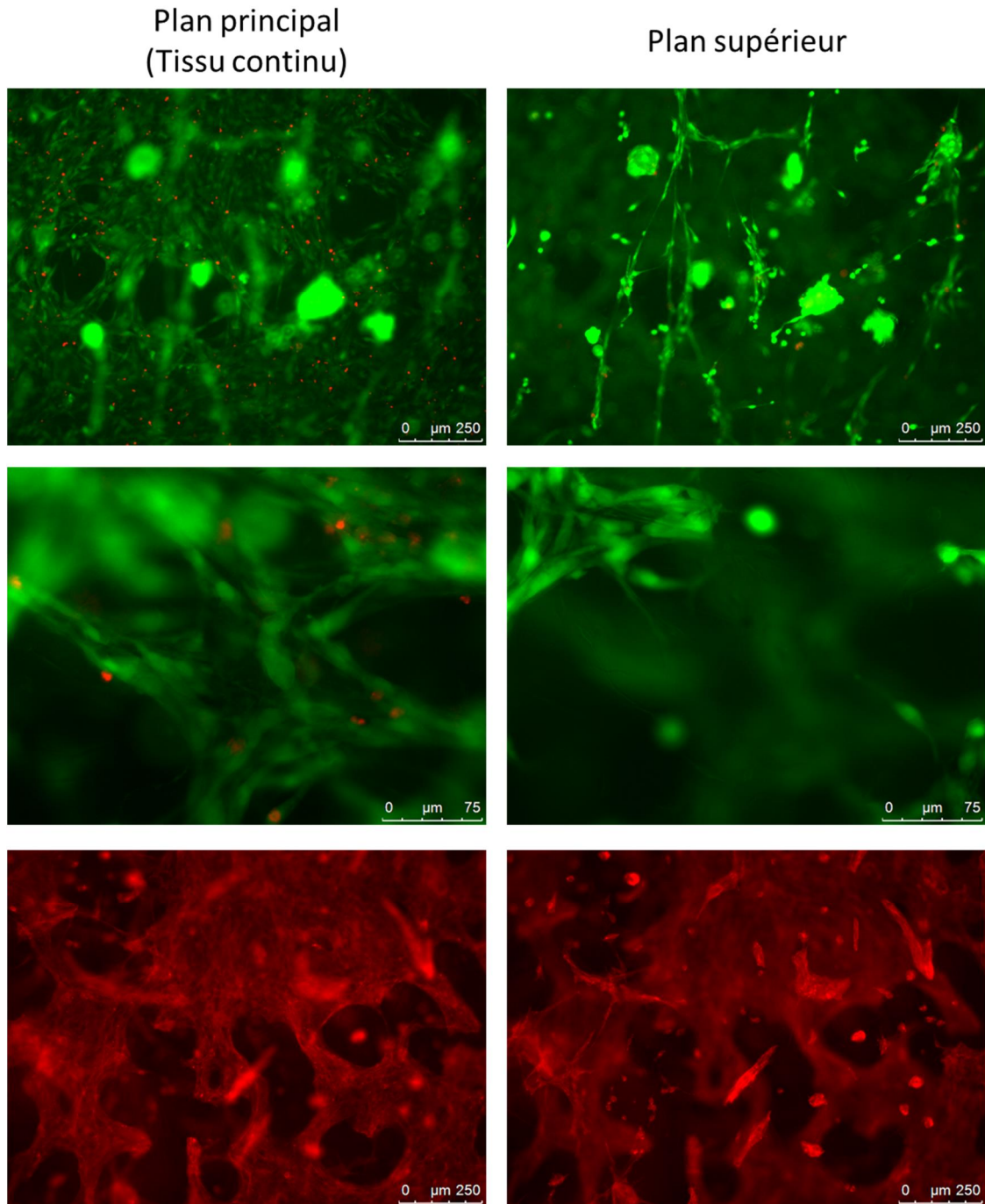
Les cellules souches adultes ont donc pour principale fonction la régénération du type d'organe dans lequel elles sont stockées, même si cet aspect est encore débattu<sup>65,166</sup> : en présence de signaux adéquats, chaque source pourrait avoir le potentiel de se différencier dans d'autres types cellulaires, et effectuer des transdifférenciations, comme le passage os/cartilage<sup>166,171</sup>. Il est à noter que l'ingénierie tissulaire a permis de vérifier des possibilités de différenciation des CSM au-delà du feuillet mésodermique, notamment en cellules nerveuses et épidermiques matures quoique imparfaitement fonctionnelles<sup>30,164,167</sup>.

## II. Analyses et données complémentaires

### 1) Hétérogénéité spatiale des cellules sur PLA électrospinné

Ces données complètent l'étude menée au chapitre 5 sur les scaffolds PLAdcm et PLAtcm, pour lesquels il a été constaté que les couches de fibres supérieures de fibres étaient peu denses et peu adhérentes au reste du matériau. Une croissance de cellules sur plusieurs plans, un tapis continu hétérogène « à l'intérieur » du scaffold et des cellules éparpillées sur les fibres décollées, a donc été observée. La Figure 80 présente plusieurs images de microscopie

à fluorescence illustrant ce phénomène. Chaque paire d'images (ligne) a été obtenue au même endroit sans changer les paramètres d'acquisition, au niveau du tapis continu (colonne de gauche) ou des couches de fibres externes (colonne de droite). Les changements de morphologie et d'intensité observés soulignent l'adhésion des cellules sur des plans différents.



**Figure 80 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) cultivées sur des scaffolds électrospinnés à base de PLA à différents plans focaux. Calcéine AM (cellules vivantes, vert), EthD-1 (noyaux de cellules mortes, points rouges) et rhodamine-phalloïdine (filaments d'actine, rouge continu, en bas).**

## 2) Culture statique sur scaffold PLA/coumarine

### **Introduction**

Outre les scaffolds électrospinnés déjà étudiés dans le présent manuscrit, il a été proposé l'idée d'utiliser une autre solution de polymère à base de coumarine. Ce composé naturel et ses dérivés, présents dans de nombreux végétaux<sup>246</sup>, ont déjà été étudiés pour la culture cellulaire et ont montré un potentiel certain notamment pour la différenciation d'ostéoblastes<sup>246,247</sup>, la culture de neurones<sup>248</sup> et des traitements anticancéreux<sup>249</sup>. Cependant, le nombre de publications présentant conjointement les termes « coumarin » et « electrospinning » demeure particulièrement faible (1 à 2 par an selon le moteur de recherche Scopus sur les 5 dernières années). Il a ainsi été envisagé d'incorporer une proportion de coumarine aux scaffolds de PLA pour en étudier l'influence sur la réponse cellulaire par rapport aux autres polymères électrospinnés. Du fait de la faible quantité de matériau disponible et parce qu'il convenait d'attendre l'optimisation des fibres de PLA pur, ce support n'a pu être testé qu'en partie, tardivement et pour un faible nombre de répliqués. C'est pourquoi ces résultats préliminaires sont rapportés en annexe.

### **Matériel et méthode**

La coumarine sous forme solide a été obtenue dans le cadre du projet MAPS soutenu par Sorbonne Universités, en collaboration avec le Polymer Science department de l'University of Akron (Etats-Unis). Il s'agit d'un don du Prof. Abraham Joy. Elle a été mélangée dans des concentrations de 10 et 30%wt au PLA (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) utilisé au cours des expérimentations principales. Le solvant était du chloroforme (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) et les paramètres de production par électrospinning du PLA ont été appliqués pour former le scaffold.

Les fibres ainsi obtenues ont été imagées par MEB (Quanta FEG 250, FEI, Etats-Unis) avant et après culture de C3H10T1/2 dans les conditions définies au chapitre 5 (1 répliquat). Un marquage fluorescent Live/Dead (2 répliqués) et des filaments d'actine (2 répliqués) ont été réalisés selon les techniques définies dans le chapitre principal de Matériel et Méthodes.

## Résultats

Les deux concentrations en coumarine (10 et 30%wt) ont permis la formation de fibres de morphologie optimale sans billes ni défauts (Figure 81) et ont donc été conservées pour les essais de culture cellulaire. Le diamètre moyen des fibres relevé sur les observations était de  $648\pm 375$  nm et  $403\pm 238$  nm pour les cas 10 et 30% respectivement. Un tapis continu de cellules a été obtenu sur les deux scaffolds, comme le montrent les observations au MEB (Figure 82). Cela a également été constaté par visualisation des filaments d'actine, le réseau était bien étalé (Figure 83), surtout pour le cas 30% qui semble présenter un tapis plus dense. On peut également noter les différences de niveaux dues à l'irrégularité de la surface, pelucheuse, déjà observées sur les scaffolds de PLA pur. Qualitativement, la viabilité s'est également révélée très bonne (Figure 84).

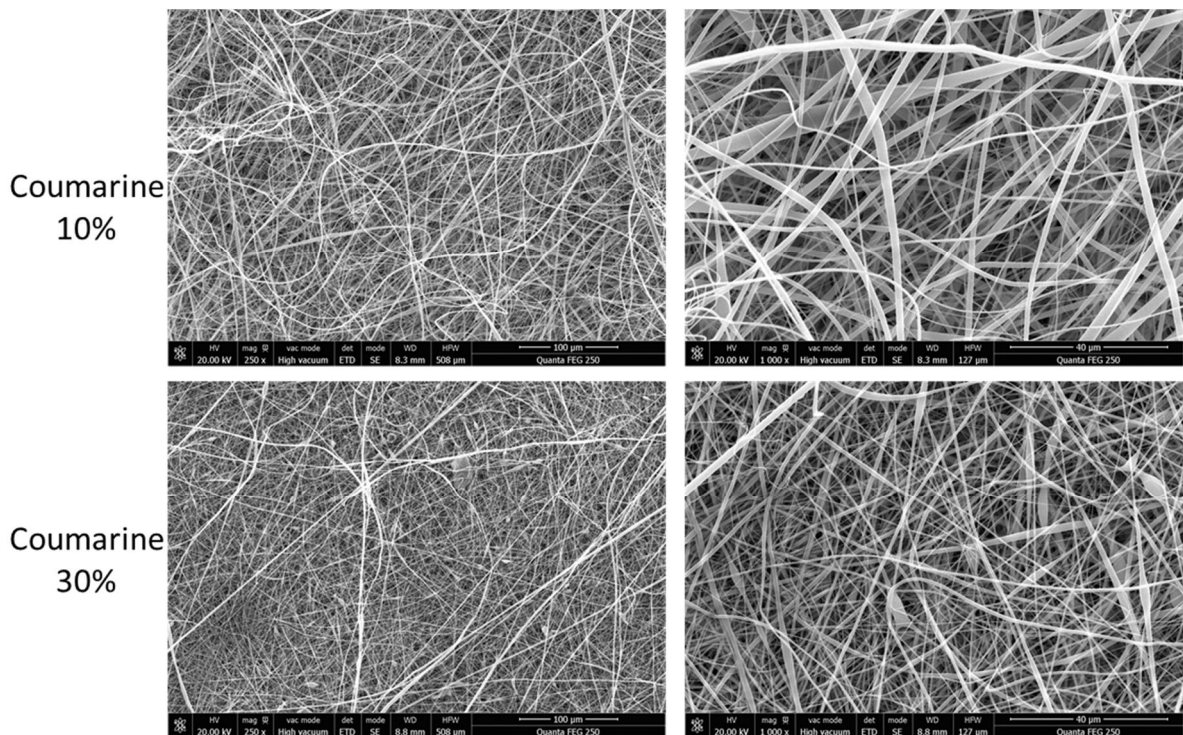


Figure 81 : Observation au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés PLA/coumarine (gauche : x250, droite : x1000).



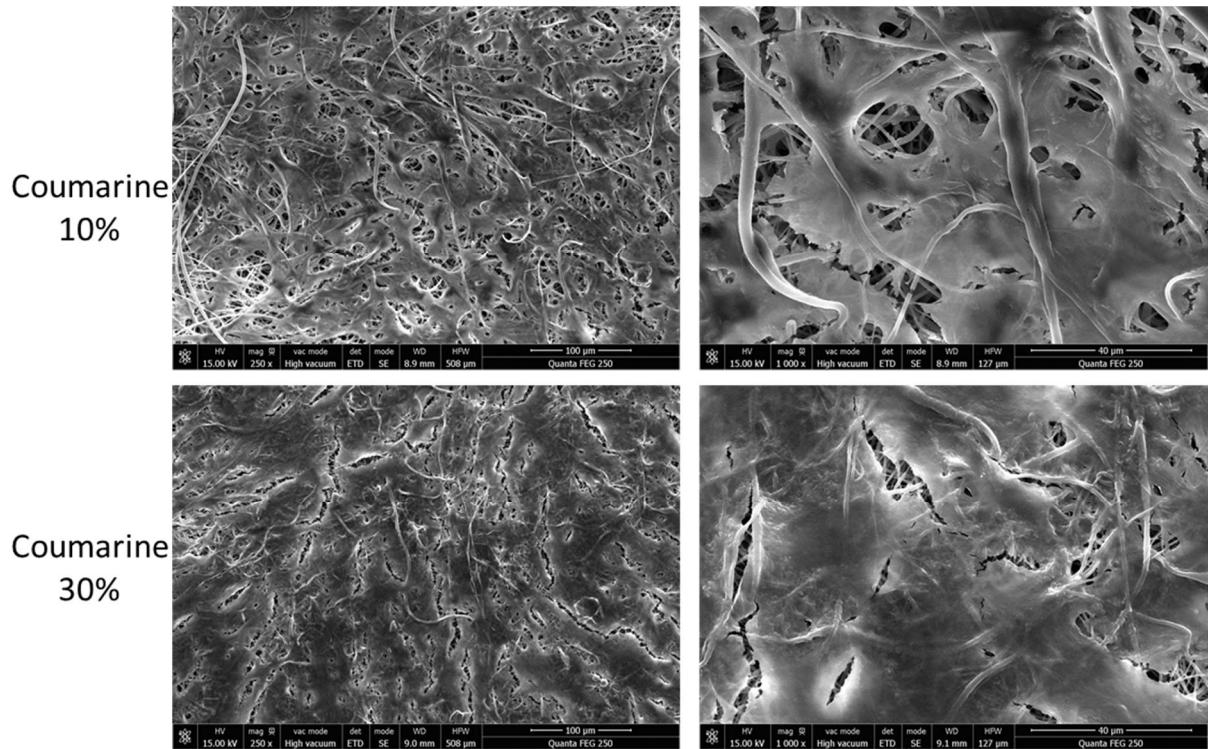


Figure 82 : Observations au microscope électronique à balayage des scaffolds électrospinnés PLA/coumarine après culture de CSM (C3H10T1/2) (gauche : x250, droite : x1000).

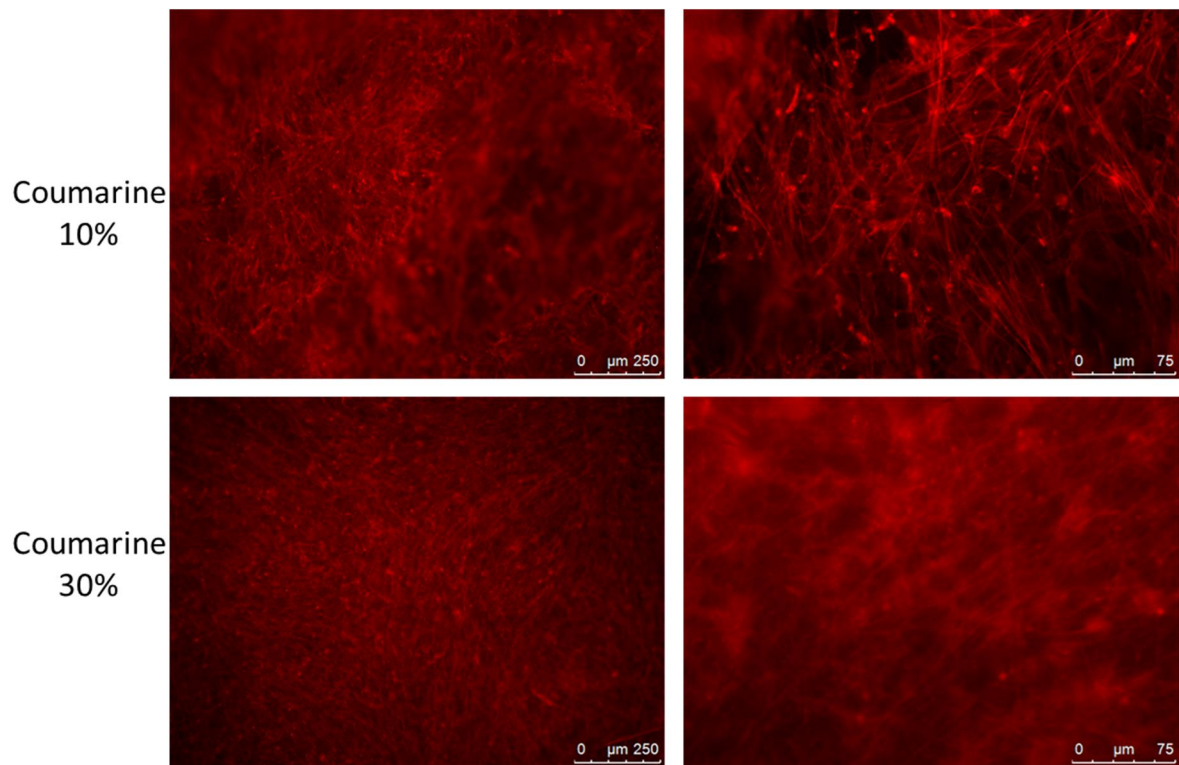


Figure 83 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés PLA/coumarine (gauche : x10, droite x40). Marquage des filaments d'actine par rhodamine/phalloïdine.

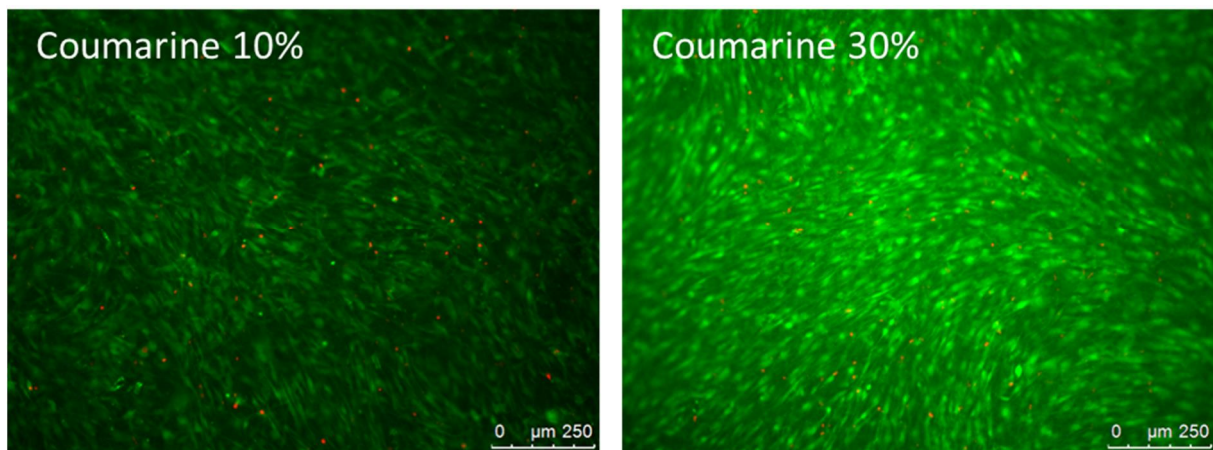


Figure 84 : Observation en microscopie à fluorescence de CSM (C3H10T1/2) après culture sur scaffolds électrospinnés PLA/coumarine. Cellules vivantes (Calcéine AM, vert) et noyaux des cellules mortes (EthD-1, rouge), x10.

## Discussion

L'ajout de la nouvelle substance, la coumarine, a permis de former des fibres par électrospinning dans les mêmes conditions que les scaffolds de PLA pur. Par rapport au PLAtcm (844 nm), la coumarine semble avoir fait légèrement diminuer le diamètre des fibres, d'autant plus que sa concentration augmentait. Le PLA pur ayant permis l'obtention d'un tissu cellulaire important et la littérature soulignant le potentiel de la coumarine pour la culture d'ostéoblastes<sup>246,247</sup>, les résultats obtenus confirment les attentes d'un scaffold coumarine/PLA pertinent pour l'ingénierie tissulaire. Ces résultats préliminaires, effectués sur un faible nombre d'échantillons, sont à confirmer, mais la tendance semble être à une augmentation de la densité du tapis de cellule avec la concentration en coumarine, comparativement au PLAtcm (Figure 65). Si le potentiel d'adhésion et de prolifération se trouve amélioré par l'ajout de coumarine, les futures études devront également déterminer en particulier si la différenciation se trouve réorientée. Les cas d'utilisations de la coumarine s'intéressent particulièrement à la lignée osseuse<sup>246,247</sup>. Il convient donc de savoir si, pour le protocole établi au cours du présent travail, l'effet du PLA pur (différenciation indéterminée) sera modifié, et si oui, vers quelle voie : os ou tendon.

### 3) Script SCILAB d'analyse du signal mécanique par transformée de Fourier

#### Code du script

```
//Tracé des courbes de traction obtenues avec le Bose Biodynamic et calcul du déphasage entre signal d'entrée (déformation appliquée) et de sortie (contraintes mesurées)
```

```
//remise à zéro
```

```
clear  
for i = 1:13  
    close(figure(i));  
end
```

```
//sélection du fichier dans un explorateur
```

```
PathFileName=uigetfile(['*'], 'C:\Users\ ', "Choisissez le fichier.", %f)
```

```
//Choix de la langue pour les titres des axes (à changer ici)
```

```
langue = 1; //1 = français, 2 = anglais
```

```
if langue==2 then  
    textex = "Temps (s)";  
    texteydef = "Déformation (%)";  
    texteyC = "Contraintes (Pa)";  
    textexf = "Fréquence (Hz)";  
    titleamp1 = "Amplitude (signal imposé)";  
    titleamp2 = "Amplitude (signal mesuré)";  
    titledef = 'Déformation en fonction du temps';  
    titleC = 'Contraintes engendrées en fonction du temps';  
else
```

```
    textex = "Time (s)";  
    texteydef = "Strain (%)";  
    texteyC = "Stress (Pa)";  
    textexf = "Frequency (Hz)";  
    titleamp1 = "Amplitude (applied signal)";  
    titleamp2 = "Amplitude (measured signal)";  
    titledef = 'Strain VS Time';  
    titleC = 'Stress VS Time';  
end
```

```
//On enregistre les valeurs dans une matrice
```

```
Fichier = csvRead(PathFileName(1));  
L0=x\_mdialog('Longueur initiale de ' + Nom(k), "Longueur initiale en cm :", '2') //On demande la longueur initiale  
L0 = strtod(L0) //en cm  
L0 = L0*10 //en mm
```

```
//On demande l'épaisseur
```

```
epaisseur=x\_mdialog("Épaisseur échantillon", "Épaisseur initiale en µm :", '200') //On demande la longueur initiale  
epaisseur = strtod(epaisseur);
```

```
//Affichage sur les 72h non stop
```

```
Taille = size(Fichier);  
//On stocke les données temporelles  
Temps = zeros(Taille(1),1);  
for i = 1:Taille(1)
```

```

    Temps(i, 1) = Fichier(i,2);
end

//On calcule le déplacement
Deplacement = zeros(Taille(1),1);
for i = 1:Taille(1)
    Deplacement(i, 1) = (Fichier(i,4))
end

//On calcule la déformation
Deformation = zeros(Taille(1),1);
for i = 1:Taille(1)
    Deformation(i, 1) = ((Deplacement(i,1))/L0)*100;
end

//On stocke la force engendrée
Force = zeros(Taille(1),1);
Force(:,1) = Fichier(:,5);

//On calcule les contraintes
contraintes = zeros(Taille(1),1);
for i = 1:Taille(1)
    contraintes(i, 1) = Force(i,1)/((epaisseur*10^-6)*(L0*10^-3));
end

//On trace la courbe de la déformation en fonction du temps
figure(13)
subplot(2,1,1)
plot2d(Temps, Deformation);
title(titledef, "fontsize", 6);
xlabel(textex, "fontsize", 4);
ylabel(texteydef, "fontsize", 4);

//On trace la courbe des contraintes en fonction du temps
subplot(2,1,2)
plot2d(Temps, contraintes);
title(titleC, "fontsize", 6);
xlabel(textex, "fontsize", 4);
ylabel(texteyC, "fontsize", 4);

//Affichage de chaque cycle de traction
//decoupage du fichier
//cette section peut être améliorée pour l'adapter automatiquement aux données d'échantillonnage
sinus = zeros(8192, 6, 12);
for i = 1:12
    for j = 1:8192
        for ii = 1:6
            sinus(j,ii,i) = Fichier((j+18432*(i-1)),ii);
        end
    end
end

end
end

Taille = size(sinus);

//On parcourt les fichiers
for k = 1:12

    //On stocke les données temporelles
    Temps = zeros(Taille(1),1);

```

```

for i = 1:Taille(1)
    Temps(i, 1) = sinus(i,2,k);
end

//On calcule le déplacement
Deplacement = zeros(Taille(1),1);
for i = 1:Taille(1)
    Deplacement(i, 1) = (sinus(i,4,k))
end

//On calcule la déformation
Deformation = zeros(Taille(1),1);
for i = 1:Taille(1)
    Deformation(i, 1) = ((Deplacement(i,1))/L0)*100;
end

//On stocke la force engendrée
Force = zeros(Taille(1),1);
Force(:,1) = sinus(:,5,k);

//On calcule les contraintes
contraintes = zeros(Taille(1),1);
for i = 1:Taille(1)
    contraintes(i, 1) = Force(i,1)/((epaisseur*10^-6)*(L0*10^-3));
end

//On trace la courbe de la déformation en fonction du temps
figure(k, "Position", [0,0,1500,800])
subplot(2,3,1)
plot2d(Temps, Deformation);
title(titledef, "fontsize", 6);
xlabel(textex, "fontsize", 4);
ylabel(texteydef, "fontsize", 4);

//On trace la courbe des contraintes en fonction du temps
subplot(2,3,4)
plot2d(Temps, contraintes);
title(titleC, "fontsize", 6);
xlabel(textex, "fontsize", 4);
ylabel(texteyC, "fontsize", 4);

//Transformations de Fourier
fftD = fft(Deformation);
fftC = fft(contraintes);
fftD = fftshift(fftD); //on recentre
fftC = fftshift(fftC);
fftD = fftD(Taille(1)/2+1:Taille(1)); //on ne garde que les fréquences positives
fftC = fftC(Taille(1)/2+1:Taille(1));
ampD = abs(fftD); //calcul de l'amplitude
ampC = abs(fftC);
ampD = ampD./8192*2; //conversion: division par le nombre de points pour que les valeurs en ordonnées soit dans l'unité du signal de départ, puis multiplication par 2 car on ne visualise que les fréquences positives
ampC = ampC./8192;
phaseD = atan(imag(fftD),real(fftD)); //calcul de la phase
phaseC = atan(imag(fftC),real(fftC));

//Calcul du déphasage
fftDephasage = fftD./fftC;

```

```

phase = atan(imag(fftDephasage),real(fftDephasage));

//Préparation de l'axe des fréquences
deltaF = 1/(Temps(Taille(1))-Temps(1)); //Fréquence correspondant au temps de mesure total
axeF = [0:(Taille(1)/2)-1]*deltaF;

//On trace les composantes
subplot(2,3,2)
plot(axeF, ampD)
xlabel(textxf, "fontsize", 4);
ylabel("%", "fontsize", 4);
title(titleamp1, "fontsize", 6)
subplot(2,3,3)
plot(axeF, phaseD)
title('Phase', "fontsize", 6)
subplot(2,3,5)
plot(axeF, ampC)
title(titleamp2, "fontsize", 6)
xlabel(textxf, "fontsize", 4);
ylabel("Pa", "fontsize", 4);
subplot(2,3,6)
plot(axeF, phaseC)
title('Phase', "fontsize", 6)

//on vérifie que les fréquences des deux signaux sont similaires
ampD2 = ampD(abs(size(ampD,1)*0.1):size(ampD,1)); //on tronque près de 0 pour éviter le pic dû à la
composante continue
ampC2 = ampC(abs(size(ampC,1)*0.1):size(ampC,1));
axeF2 = axeF(abs(size(ampD,1)*0.1):size(ampD,1)); //on stocke les fréquences correspondantes
indiceD = find(ampD2>=max(ampD2)); //on cherche l'indice du pic
indiceC = find(ampC2>=max(ampC2));
disp('Frequence de déplacement imposée : '+ string(axeF2(indiceD)) + ' Hz. ');
disp('Frequence de contraintes mesurée : '+ string(axeF2(indiceC)) + ' Hz. ');

//on alerte en cas de fréquences différentes
if abs(axeF2(indiceD)-axeF2(indiceC))>deltaF then
    figure(12+k, "figure_size", [600, 300]);
    h = uicontrol("Style", 'text', "String", "ALERTE ! Les fréquences sont différentes.", "BackgroundColor",
[1,0,0], "FontSize", 24, "Position", [0,0,500,300]);
end

//On recherche et affiche la valeur du déphasage à la fréquence imposée
disp('Déphasage de ' + string(phase(indiceD+abs(size(ampD,1)*0.1-1))) + ' radians. ');

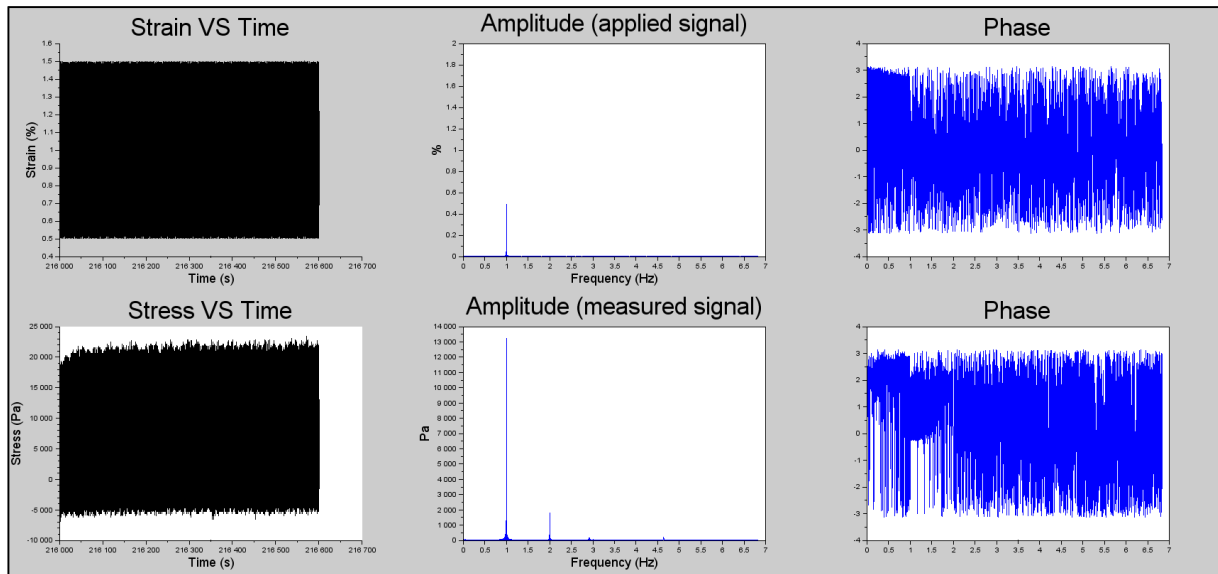
end

```

## Résultats

On trouvera ci-dessous un exemple de résultats renvoyés pour un cycle de 600 tractions (10 minutes), échantillon de PCL, chambre à sec. La Figure 85 présente les courbes complètes et la Figure 86 se concentre sur la partie centrale présentant l'amplitude de la transformée de Fourier et les différents pics en fréquence. On retrouve pour le signal appliqué

le pic à 1Hz correspondant aux déformations d'amplitude 0.5%. On a alors dans le cas des contraintes mesurées une composante principale à 1Hz d'amplitude 13000 Pa. On remarque également des pics parasites (bruits autour de la machine) à environ 2,9 et 4,63Hz. Le programme a également renseigné sur un déphasage de -0.1026220 radians entre déformation et contraintes. Tous ces résultats sont donnés à titre indicatif pour valider la faisabilité des mesures et de l'analyse.



**Figure 85 : Exemple de résultats renvoyés par le script SCILAB d'analyse du signal mécanique (déformation appliquée et contraintes engendrées).**

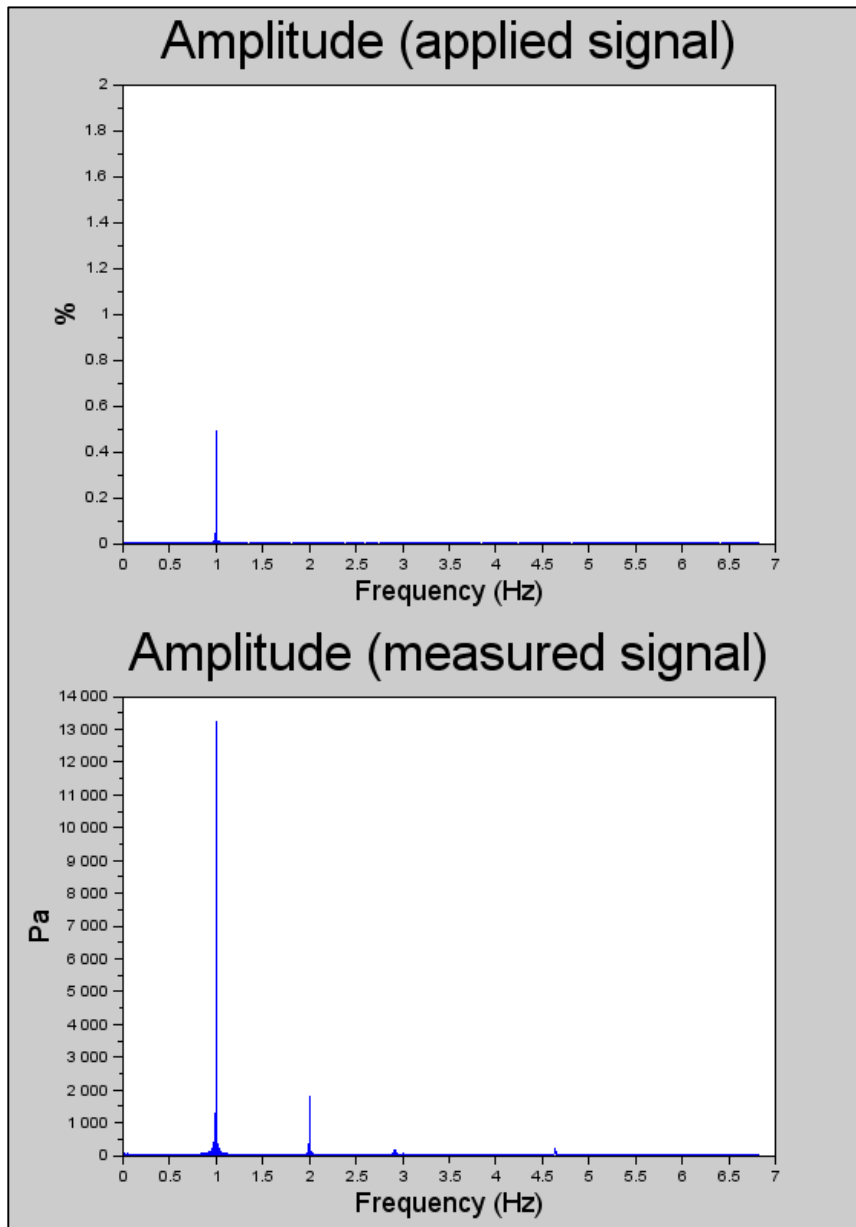


Figure 86 : Exemple de résultats renvoyés par le script SCILAB d'analyse du signal mécanique, zoom sur l'amplitude de la transformée de Fourier.



## Références internes au manuscrit

1. Site web de l'Union des Blessés de la Face et de la Tête et de la Fondation des « Gueules Cassées ». at <[http://www.gueules-cassees.asso.fr/srub\\_5-Les-Gueules-Cassees.html](http://www.gueules-cassees.asso.fr/srub_5-Les-Gueules-Cassees.html)>
2. Comité consultatif national d'éthique pour les Sciences de la Vie et de la Santé. Avis 82 : L'allotransplantation de tissu composite au niveau de la face (Grefe totale ou partielle d'un visage). (2004).
3. David Le Breton. Visage, identité, greffe : approche anthropologique. in *Visages greffés et visages numérisés : comment penser la singularité ? (Conférence)* (2015).
4. Rapport financier et RSE de la Française des Jeux. (2013).
5. Institut Faire Face. at <<http://www.institute-facing-faces.eu/>>
6. Patrick, C. W., Mikos, A. G. and McIntire, L. V. *Frontiers in Tissue Engineering*. (Elsevier Science, 1998).
7. Devauchelle, B. and Testelin, S. Identité et greffe de visage. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale* **112**, 3276328 , 2011.
8. Leibovici, M. Visage et défiguration. in *Visages greffés et visages numérisés : comment penser la singularité ? (Conférence)* (2015).
9. Rodan, G. A. Therapeutic Approaches to Bone Diseases. *Science* (80-. ). **289**, 15086 1514 , 2000.
10. Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R. and Petite, H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 72684 , 2005.
11. Liu, Y., Lim, J. and Teoh, S.-H. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnol. Adv.* **31**, 6886705 , 2013.
12. Arcos, D. et al. The relevance of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis. *Acta Biomater.* **10**, 17936805 , 2014.

13. D'Este, M. and Eglin, D. Hydrogels in calcium phosphate moldable and injectable bone substitutes: Sticky excipients or advanced 3-D carriers? *Acta Biomater.* **9**, 54216-30, 2013.
14. Haute Autorité de Santé. Substituts osseux. Révision de catégories homogènes de dispositifs médicaux. (2013).
15. Gómez-Barrena, E., Solá, C. A. and Bunu, C. P. Regulatory authorities and orthopaedic clinical trials on expanded mesenchymal stem cells. *Int. Orthop.* **38**, 180369, 2014.
16. Gamblin, A. L. et al. Osteoblastic and osteoclastic differentiation of human mesenchymal stem cells and monocytes in a miniaturized three-dimensional culture with mineral granules. *Acta Biomater.* **10**, 5139647, 2014.
17. Devauchelle, B. and Crémales, S. Singularité et défiguration. in *Visages greffés et visages numérisés : comment penser la singularité ? (Conférence)* (2015).
18. Mullender, M. et al. Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue. *Med. Biol. Eng. Comput.* **42**, 14621, 2004.
19. Kneser, U., Schaefer, D. J., Polykandriotis, E. and Horch, R. E. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J. Cell. Mol. Med.*, 2006.
20. Gkioni, K. et al. Mineralization of Hydrogels for Bone Regeneration. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **16**, 577685, 2010.
21. Snell, G. D. The Terminology of Tissue Transplantation. *Transplantation* **2**, 6556657, 1964.
22. Pape, H. C., Evans, A. and Kobbe, P. Autologous bone graft: properties and techniques. *J. Orthop. Trauma* **24 Suppl 1**, S366S40, 2010.
23. Mendelson, B. C., Jacobson, S. R., Lavoipierre, A. M. and Huggins, R. J. The fate of porous hydroxyapatite granules used in facial skeletal augmentation. *Aesthetic Plast. Surg.* **34**, 455661, 2010.

24. Arrington, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., Bucknell, A. L. and Davino, N. A. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 30069 , 1996.
25. Yang, S. and Chua, C. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Eng.* **7**, 6796689 , 2001.
26. Koch, J. C. The laws of bone architecture. *Am. J. Anat.* **21**, 1776298 , 1917.
27. Glucksmann, A. Studies on Bone mechanics in vitro: II. The role of tension and pressure in chondrogenesis. *Anat Rec* **73**, 39655 , 1939.
28. Daculsi, G. L'os artificiel. , 2003. at <<http://www.adf.asso.fr/fr/presse/communiqués-de-presse/dossiers-de-presse/file/100-los-artificiel>>
29. Petite, H. et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat. Am.* 9596963 , 2000.
30. Murugan, R. and Ramakrishna, S. in *Nanotechnologies for Life Sciences, Vol. 9 Tissue, Cell and Organ Engineering* 2166256 (2006). doi:10.1002/9783527610419.ntls0099
31. Williams, D. F. *The Williams Dictionary of Biomaterials.* (Liverpool University Press, 1999).
32. Williams, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* **30**, 589765909 , 2009.
33. Burg, K. J., Porter, S. and Kellam, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* **21**, 2347659 , 2000.
34. Rubin, J. P. and Yaremchuk, M. J. Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery: a comprehensive review of the literature. *Plast. Reconstr. Surg.* **100**, 1336653 , 1997.
35. Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 294162953 , 2008.

36. Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J. and Boccaccini, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3413631 , 2006.
37. Albrektsson, T. and Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 966101 , 2001.
38. Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **21**, 2529643 , 2000.
39. Sassard, W. R. et al. Augmenting local bone with Grafton demineralized bone matrix for posterolateral lumbar spine fusion: avoiding second site autologous bone harvest. *Orthopedics* **23**, 105961064; discussion 106461065 , 2000.
40. Devauchelle, B., Testelin, S., Dakpe, S., Lengelé, B. and Dubernard, J. M. La greffe de visage, archétype de l'innovation microchirurgicale. *Ann. Chir. Plast. Esthet.* **55**, 4526 460 , 2010.
41. Dao, T. T., Dakpe, S., Pouletaut, P., Devauchelle, B. and Ho Ba Tho, M. C. Facial Mimics Simulation using MRI and Finite Element Analysis. *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **2013**, 458568 , 2013.
42. Grayson, W. L. et al. Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 32996304 , 2010.
43. Brennan, M., Davaine, J.-M. and Layrolle, P. Pre-vascularization of bone tissue-engineered constructs. *Stem Cell Res. Ther.* **4**, 96 , 2013.
44. Melchiorri, A. J., Nguyen, B. B. and Fisher, J. P. Mesenchymal Stem Cells : Roles and Relationships in Vascularization. *Tissue Eng.* **20**, 2186228 , 2014.
45. He, X. et al. BMP2 genetically engineered MSCs and EPCs promote vascularized bone regeneration in rat critical-sized calvarial bone defects. *PLoS One* **8**, e60473 , 2013.
46. Goldstein, A. S., Juarez, T. M., Helmke, C. D., Gustin, M. C. and Mikos, A. G. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* **22**, 127961288 , 2001.

47. Leszczynska, J., Zyzynska-granica, B., Koziak, K., Ruminski, S. and Lewandowska-szumiel, M. Contribution of Endothelial Cells to Human Bone-Derived Cells Expansion in Coculture. *Tissue Eng. Part A* **19**, , 2013.
48. Payne, K. F. B., Balasundaram, I., Deb, S., Di Silvio, L. and Fan, K. F. M. Tissue engineering technology and its possible applications in oral and maxillofacial surgery. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **52**, 7615 , 2014.
49. Brennan, M. a et al. Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 114 , 2014.
50. Nair, L. S., Bhattacharyya, S. and Laurencin, C. T. in *Nanotechnologies for the Life Sciences* 1616 (2006). doi:10.1002/9783527610419.ntls0095
51. Li, W., Shanti, R. M. and Tuan, R. S. Electrospinning Technology for Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering. *Nanotechnologies Life Sci.* **9**, 1356187 , 2006.
52. Carpentier, B., Layrolle, P. and Legallais, C. Bioreactors for bone tissue engineering. *Int. J. Artif. Organs* **34**, 2596270 , 2011.
53. Szpalski, C., Wetterau, M., Barr, J. and Warren, S. M. Bone tissue engineering: current strategies and techniques - part I: Scaffolds. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **18**, 246657 , 2012.
54. Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3 Suppl 3**, 1316139 , 2008.
55. Silver, F. and Christiansen, D. in *Biomaterials Science and Biocompatibility* (1999). doi:10.1007/978-1-4612-0557-9
56. Rho, J. Y., Ashman, R. B. and Turner, C. H. Young's modulus of trabecular and cortical bone material: Ultrasonic and microtensile measurements. *J. Biomech.* **26**, 1116119 , 1993.
57. Roveri, N. and Palazzo, B. in *Nanotechnologies for the Life Sciences Volume 9* (ed. Kumar, C. S. S. R.) 2836307 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007). doi:10.1002/9783527610419

58. Bielby, R., Jones, E. and McGonagle, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury* **38 Suppl 1**, S26632 , 2007.
59. Ducy, P. The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science* (80-. ). **289**, 150161504 , 2000.
60. Klein-Nulend, J., Bacabac, R. G. and Mullender, M. G. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol. Biol.* **53**, 5766580 , 2005.
61. Burger, E. H. and Klein-Nulend, J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J.* **13 Suppl**, S1016S112 , 1999.
62. Zaidi, M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.* **13**, 7916801 , 2007.
63. Teitelbaum, S. L. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* (80-. ). **289**, 150461508 , 2000.
64. Ehrlich, P. and Lanyon, L. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos. Int.* 6886700 , 2002. doi:10.1007/s001980200095
65. Hughes, F. J., Turner, W., Belibasakis, G. and Martuscelli, G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol.* 2000 **41**, 48672 , 2006.
66. St pie , E. Acceleration of new biomarkers development and discovery in synergistic diagnostics of coronary artery disease. *Coron. Angiogr. - Adv. Noninvasive Imaging Approach Eval. Coron. Artery Dis.* , 2011.
67. Wolff, J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen.* , 1892.
68. Duncan, R. L. and Turner, C. H. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif. Tissue Int.* **57**, 3446358 , 1995.
69. Vico, L. and Alexandre, C. Microgravity and bone adaptation at the tissue level. *J. Bone Miner. Res.* **7 Suppl 2**, S4456S447 , 1992.
70. Frost, H. M. Bone mass and the mechanostat a proposal. *Anat. Rec.* **219**, 169 , 1987.

71. Turner, C. H., Robling, a. G., Duncan, R. L. and Burr, D. B. Do bone cells behave like a neuronal network? *Calcif. Tissue Int.* **70**, 4356442 , 2002.
72. Lian, J. B. and Stein, G. S. Concepts of Osteoblast Growth and Differentiation : Basis for Modulation of Bone Cell Development and Tissue Formation. *Oral Biol. Med.* , 1992. doi:10.1177/10454411920030030501
73. Aubin, J. E., Liu, F., Malaval, L. and Gupta, A. K. Osteoblast and Chondroblast Differentiation. **17**, , 1995.
74. Ziros, P. G., Basdra, E. K. and Papavassiliou, A. G. Runx2: of bone and stretch. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 165961663 , 2008.
75. Aubin, J. E., Turksen, K. and Heersche, J. N. M. in *Cellular and Molecular Biology of Bone* (Elsevier Science, 1993).
76. Samavedi, S., Whittington, A. R. and Goldstein, A. S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* **9**, 8037645 , 2013.
77. Ferrand, A. et al. Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol. Biosci.* **14**, 45655 , 2014.
78. Willerth, S. M., Sakiyama-elbert, S. E., Engineering, B. and Louis, S. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. *StemBook* 16 18 , 2008. doi:10.3824/stembook.1.1.1
79. Mastrogiacomo, M. et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* **27**, 323067 , 2006.
80. Arinzeh, T. L., Tran, T., Mcalary, J. and Daculsi, G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials* **26**, 363168 , 2005.

81. Unger, R. E. et al. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* **28**, 3965-676 , 2007.
82. Xu, H. H. K., Zhao, L., Detamore, M. S., Takagi, S. and Chow, L. C. Umbilical cord stem cell seeding on fast-resorbable calcium phosphate bone cement. *Tissue Eng. Part A* **16**, 2743-653 , 2010.
83. Kim, H.-W., Li, L.-H., Koh, Y.-H., Knowles, J. C. and Kim, H.-E. Sol-Gel Preparation and Properties of Fluoride-Substituted Hydroxyapatite Powders. *J. Am. Ceram. Soc.* **87**, 1939-1944 , 2005.
84. Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W. and Bizios, R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* **21**, 1803-610 , 2000.
85. Zhang, L. and Webster, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* **4**, 66-80 , 2009.
86. Fu, H., Rahaman, M. N., Brown, R. F. and Day, D. E. Evaluation of bone regeneration in implants composed of hollow HA microspheres loaded with transforming growth factor  $\beta$  1 in a rat calvarial defect model. *Acta Biomater.* **9**, 5718-627 , 2013.
87. Fricain, J. C. et al. A nano-hydroxyapatite--pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials* **34**, 2947-659 , 2013.
88. Venugopal, J. R., Low, S., Choon, A. T., Kumar, A. B. and Ramakrishna, S. Nanobioengineered electrospun composite nanofibers and osteoblasts for bone regeneration. *Artif. Organs* **32**, 388-697 , 2008.
89. Zhang, M. and Kataoka, K. Nano-structured composites based on calcium phosphate for cellular delivery of therapeutic and diagnostic agents. *Nano Today* **4**, 508-6517 , 2009.
90. Jose, M. V., Thomas, V., Johnson, K. T., Dean, D. R. and Nyairo, E. Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **5**, 305-615 , 2009.



91. Cheung, H.-Y., Lau, K.-T., Lu, T.-P. and Hui, D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Compos. Part B Eng.* **38**, 2916300 , 2007.
92. Meinel, L. et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann. Biomed. Eng.* **32**, 112622 , 2004.
93. Szentivanyi, A. L., Zernetsch, H., Menzel, H. and Glasmacher, B. A review of developments in electrospinning technology: new opportunities for the design of artificial tissue structures. *Int. J. Artif. Organs* **34**, 986697 , 2011.
94. Liu, H. et al. The promotion of bone regeneration by nanofibrous hydroxyapatite/chitosan scaffolds by effects on integrin-BMP/Smad signaling pathway in BMSCs. *Biomaterials* **34**, 4404617 , 2013.
95. Shin, H., Jo, S. and Mikos, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 435364364 , 2003.
96. Grey, C. P., Newton, S. T., Bowlin, G. L., Haas, T. W. and Simpson, D. G. Gradient fiber electrospinning of layered scaffolds using controlled transitions in fiber diameter. *Biomaterials* **34**, 499365006 , 2013.
97. Nedjari, S., Schlatter, G. and Hébraud, A. Thick electrospun honeycomb scaffolds with controlled pore size. *Mater. Lett.* **142**, 1806183 , 2015.
98. Srouji, S., Kizhner, T., Suss-Tobi, E., Livne, E. and Zussman, E. 3-D Nanofibrous electrospun multilayered construct is an alternative ECM mimicking scaffold. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 1249655 , 2008.
99. Pereira, I. H. L. et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on mineralized electrospun co-axial poly(ε-caprolactone) (PCL)/gelatin nanofibers. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **25**, 113761148 , 2014.
100. Subramony, S. D. et al. The guidance of stem cell differentiation by substrate alignment and mechanical stimulation. *Biomaterials* **34**, 1942653 , 2013.

101. Depan, D., Girase, B., Shah, J. S. and Misra, R. D. K. Structure-process-property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds. *Acta Biomater.* **7**, 3432645 , 2011.
102. Lee, B.-H., Li, B. and Guelcher, S. A. Gel microstructure regulates proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells encapsulated in alginate beads. *Acta Biomater.* **8**, 16936702 , 2012.
103. Holzapfel, B. M. et al. Biomaterials Tissue engineered humanized bone supports human hematopoiesis in vivo. *Biomaterials* **61**, 1036114 , 2015.
104. Kong, Z. et al. Dynamic compression promotes proliferation and neovascular networks of endothelial progenitor cells in demineralized bone matrix scaffold seed. *J. Appl. Physiol.* **113**, 6196626 , 2012.
105. Butscher, A., Bohner, M., Hofmann, S., Gauckler, L. and Müller, R. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. *Acta Biomater.* **7**, 907620 , 2011.
106. Norotte, C., Marga, F. S., Niklason, L. E. and Forgacs, G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* **30**, 591067 , 2009.
107. Marolt, D. et al. Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. *Biomaterials* **27**, 6138649 , 2006.
108. Correia, C. et al. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. *Acta Biomater.* **8**, 2483692 , 2012.
109. Depprich, R., Handschel, J., Wiesmann, H. P., Jäsche-Meyer, J. and Meyer, U. Use of bioreactors in maxillofacial tissue engineering. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **46**, 3496 354 , 2008.
110. Yeatts, A. B. and Fisher, J. P. Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* **48**, 171681 , 2011.

111. Rauh, J., Milan, F., Günther, K.-P. and Stiehler, M. Bioreactor systems for bone tissue engineering. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **17**, 263680 , 2011.
112. Brown, T. D. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *J. Biomech.* **33**, 3614 , 2000.
113. Nikukar, H. et al. Osteogenesis of mesenchymal stem cells by nanoscale mechanotransduction. *ACS Nano* **7**, 2758667 , 2013.
114. Nakayama, Y., Ishibashi-Ueda, H. and Takamizawa, K. In vivo tissue-engineered small-caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (biotube). in *Cell Transplantation* **13**, 4396449 (2004).
115. Khademhosseini, A. *Micro and Nanoengineering of the Cell Microenvironment: Technologies and Applications.* (Artech House, Incorporated, 2008).
116. Hing, K. A. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2**, 1846199 , 2005.
117. Jarcho, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 259678 , 1981.
118. Akao, M., Aoki, H. and Kato, K. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications. *J. Mater. Sci.* **16**, 8096812 , 1981.
119. Gauthier, O., Bouler, J. M., Aguado, E., Pilet, P. and Daculsi, G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* **19**, 13369 , 1998.
120. Bignon, A. et al. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **14**, 1089697 , 2003.
121. Krebsbach, P. H., Kuznetsov, S. A. and Satomura, K. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* **63**, 1059669 , 1997.

122. Buckley, C. T. and O'Kelly, K. U. Fabrication and characterization of a porous multidomain hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering investigations. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **93**, 4596467 , 2010.
123. Mankani, M. H., Kuznetsov, S. A., Fowler, B., Kingman, A. and Robey, P. G. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 966107 , 2001.
124. Jiang, X. Q. et al. Maxillary sinus floor elevation using a tissue-engineered bone complex with  $\beta$ -TCP and BMP-2 gene-modified bMSCs in rabbits. *Clin. Oral Implants Res.* **20**, 133361340 , 2009.
125. Cordonnier, T. et al. 3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **21**, 98167 , 2010.
126. Cordonnier, T. et al. Consistent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with bone morphogenetic protein 4 and low serum. *Tissue Eng. Part C. Methods* **17**, 2496259 , 2011.
127. Cordonnier, T. et al. Osteoblastic differentiation and potent osteogenicity of three-dimensional hBMSC-BCP particle constructs. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **8**, 364676 , 2014.
128. Fellah, B. H., Gauthier, O., Weiss, P., Chappard, D. and Layrolle, P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* **29**, 117761188 , 2008.
129. Li, D. and Xia, Y. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Adv. Mater.* **16**, 115161170 , 2004.
130. Bognitzki, M. et al. Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Adv. Mater.* **13**, 70672 , 2001.
131. Katti, D. S., Robinson, K. W., Ko, F. K. and Laurencin, C. T. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **70**, 286696 , 2004.

132. Cooley, J. F. Apparatus for electrically dispersing fluids. , 1902.
133. Shenoy, S. L., Bates, W. D., Frisch, H. L. and Wnek, G. E. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymerópolymer interaction limit. *Polymer (Guildf)*. **46**, 3372ó3384 , 2005.
134. Saw, S. H., Wang, K., Yong, T. and Ramakrishna, S. Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering. *Nanotechnologies for the Life Sciences* **9**, 66ó134 , 2006.
135. FW, P. I. I. and Dimetex. Etude des perspectives de développement des technologies textiles en ingénierie cellulaire et tissulaire. (2008).
136. Smith, L. A., Beck, J. A. and Ma, P. X. in *Nanotechnologies for Life Sciences, Vol. 9 Tissue, Cell and Organ Engineering* 188ó215 (2006). doi:10.1002/9783527610419.ntls0098
137. Huang, C., Chen, M., Young, T., Jeng, J. and Chen, Y. Interactive Effects of Mechanical Stretching and Extracellular Matrix Proteins on Initiating Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J. Cell. Biochem.* **1273**, 1263ó1273 , 2009.
138. Jang, J. H., Castano, O. and Kim, H. W. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 1065ó1083 , 2009.
139. Li, W.-J., Laurencin, C. T., Caterson, E. J., Tuan, R. S. and Ko, F. K. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 613ó21 , 2002.
140. Lee, J.-H., Lee, Y. J., Cho, H.-J. and Shin, H. Guidance of In Vitro Migration of Human Mesenchymal Stem Cells and In Vivo Guided Bone Regeneration Using Aligned Electrospun Fibers. *Tissue Eng. Part A* **20**, , 2013.
141. Prodanov, L. et al. The interaction between nanoscale surface features and mechanical loading and its effect on osteoblast-like cells behavior. *Biomaterials* **31**, 7758ó7765 , 2010.

142. Huang, Z.-M., Zhang, Y. ., Ramakrishna, S. and Lim, C. . Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer (Guildf)*. **45**, 536165368 , 2004.
143. Carlisle, C. R. et al. The mechanical properties of individual, electrospun fibrinogen fibers. *Biomaterials* **30**, 1205613 , 2009.
144. Croisier, F. et al. Mechanical testing of electrospun PCL fibers. *Acta Biomater.* **8**, 2186 24 , 2012.
145. Chuangchote, S. and Supaphol, P. Fabrication of Aligned Poly(vinyl alcohol) Naonfibers by Electrospinning. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6**, 349963502 , 2006.
146. Kenawy, E. R. et al. Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials* **24**, 907613 , 2003.
147. Venugopal, J. and Ramakrishna, S. Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **125**, 147658 , 2005.
148. Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M. and Ramakrishna, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **63**, 222362253 , 2003.
149. Lee, J. H., Rim, N. G., Jung, H. S. and Shin, H. Control of osteogenic differentiation and mineralization of human mesenchymal stem cells on composite nanofibers containing poly[lactic-co-(glycolic acid)] and hydroxyapatite. *Macromol. Biosci.* **10**, 173682 , 2010.
150. Puppi, D. et al. Optimized electro- and wet-spinning techniques for the production of polymeric fibrous scaffolds loaded with bisphosphonate and hydroxyapatite. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **5**, 253663 , 2011.
151. Song, W. et al. Electrospun polyvinyl alcohol-collagen-hydroxyapatite nanofibers: a biomimetic extracellular matrix for osteoblastic cells. *Nanotechnology* **23**, 115101 , 2012.

152. Zhang, H. and Chen, Z. Fabrication and Characterization of Electrospun PLGA/MWNTs/ Hydroxyapatite Biocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J. Bioact. Compat. Polym.* **25**, 2416259 , 2010.
153. Fujihara, K., Kotaki, M. and Ramakrishna, S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials* **26**, 4139647 , 2005.
154. Li, C., Vepari, C., Jin, H.-J., Kim, H. J. and Kaplan, D. L. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3115624 , 2006.
155. Shin, M., Yoshimoto, H. and Vacanti, J. P. In vivo bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffold. *Tissue Eng.* **10**, 33641 , 2004.
156. Yoshimoto, H., Shin, Y. M., Terai, H. and Vacanti, J. P. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 207762082 , 2003.
157. Bonani, W., Maniglio, D., Motta, A., Tan, W. and Migliaresi, C. Biohybrid nanofiber constructs with anisotropic biomechanical properties. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **96**, 276686 , 2011.
158. Wittmer, C. R., Hébraud, A., Nedjari, S. and Schlatter, G. Well-organized 3D nanofibrous composite constructs using cooperative effects between electrospinning and electrospaying. *Polymer (Guildf).* **55**, 578165787 , 2014.
159. Nedjari, S. et al. Electrospun Honeycomb as Nests for Controlled Osteoblast Spatial Organization. *Macromol. Biosci.* **14**, 158061589 , 2014.
160. Son, S.-R., Linh, N.-T. B., Yang, H.-M. and Lee, B.-T. In vitro and in vivo evaluation of electrospun PCL/PMMA fibrous scaffolds for bone regeneration. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **14**, 015009 , 2013.

161. Yang, W., Yang, F., Wang, Y., Both, S. K. and Jansen, J. a. In vivo bone generation via the endochondral pathway on three-dimensional electrospun fibers. *Acta Biomater.* **9**, 450564512 , 2013.
162. Kronenberg, H. Adult mesenchymal stem cells. *StemBook* 1612 , 2009. doi:10.3824/stembook.1.38.1
163. Aubin, J. E. Bone stem cells. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **30-31**, 73682 , 1998.
164. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. and Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739649 , 2007.
165. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V, Kurolesova, A. I. and Frolova, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 2306247 , 1968.
166. Stem Cell Basics. *US National Institutes of Health* , 2009. at <<http://stemcells.nih.gov/info/basics/Pages/Default.aspx>>
167. Ding, D.-C., Shyu, W.-C. and Lin, S.-Z. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* **20**, 5614 , 2011.
168. Pittenger, M. F., Mbalaviele, G., Black, M., Mosca, J. D. and Marshak, D. R. in *Human Cell Culture* 1896207 doi:10.1007/0-306-46870-0\_9
169. Javazon, E. H., Beggs, K. J. and Flake, A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp. Hematol.* **32**, 414625 , 2004.
170. Pittenger, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 14367 , 1999.
171. Caplan, A. I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. *J. Cell. Physiol.* 3416347 , 2007. doi:10.1002/JCP



172. Szpalski, C., Barbaro, M., Sagebin, F. and Warren, S. M. Bone tissue engineering: current strategies and techniques--part II: Cell types. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **18**, 2586-69, 2012.
173. Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M. and Caplan, a I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* **13**, 8168, 1992.
174. Caplan, a I. and Bruder, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol. Med.* **7**, 259664, 2001.
175. Wang, X. et al. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int. Orthop.*, 2013. doi:10.1007/s00264-013-2059-2
176. Charoenpanich, A. et al. Cyclic Tensile Strain Enhances Osteogenesis and Angiogenesis in Mesenchymal Stem Cells from Osteoporotic Donors. *Tissue Eng. Part A* **20**, , 2013.
177. Reznikoff, C. A., Brankow, D. W. and Heidelberger, C. Establishment and Characterization of a Cloned Line of C3H Mouse Embryo Cells Sensitive to Postconfluence Inhibition of Division. *Cancer Res.* **33**, 323163239, 1973.
178. McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K. and Chen, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* **6**, 483695, 2004.
179. Kagami, H. et al. The Use of Bone Marrow Stromal Cells (Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells) for Alveolar Bone Tissue Engineering: Basic Science to Clinical Translation. *Tissue Eng.* **20**, 2296232, 2014.
180. Bidarra, S. J. et al. Phenotypic and proliferative modulation of human mesenchymal stem cells via crosstalk with endothelial cells. *Stem Cell Res.* **7**, 186697, 2011.
181. Thébaud, N. B. et al. Whatever their differentiation status, human progenitor derived - or mature - endothelial cells induce osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6**, e516e60, 2012.

182. McFadden, T. M. et al. The delayed addition of human mesenchymal stem cells to pre-formed endothelial cell networks results in functional vascularization of a collagen-glycosaminoglycan scaffold in vivo. *Acta Biomater.* **9**, 9303616 , 2013.
183. Correia, C. et al. In vitro model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis. *PLoS One* **6**, e28352 , 2011.
184. Bruder, S. P., Jaiswal, N. and Haynesworth, S. E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.* **64**, 278694 , 1997.
185. Peter, S. J., Liang, C. R., Kim, D. J., Widmer, M. S. and Mikos, a G. Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate, and L-ascorbic acid. *J. Cell. Biochem.* **71**, 55662 , 1998.
186. Holtorf, H. L., Jansen, J. a and Mikos, A. G. Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stroma cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone. *J. Biomed. Mater. Res. A* **72**, 326634 , 2005.
187. Woo, E. J. Adverse events after recombinant human BMP2 in nonspinal orthopaedic procedures. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **471**, 1707611 , 2013.
188. Martino, M. M., Briquez, P. S., Maruyama, K. and Hubbell, J. A. Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* , 2015. doi:10.1016/j.addr.2015.04.007
189. Butler, D. L., Goldstein, S. A. and Guilak, F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J. Biomech. Eng.* **122**, 57065 , 2000.
190. Kasper, F. K., Liao, J., Kretlow, J. D., Vassilios, I. and Mikos, A. G. Flow perfusion culture of mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *StemBook* 1618 , 2008. doi:10.3824/stembook.1.18.1
191. Tanaka, S. M. et al. Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *J. Biomech.* **36**, 73680 , 2003.

192. Bigerelle, M., Giljean, S. and Anselme, K. Existence of a typical threshold in the response of human mesenchymal stem cells to a peak and valley topography. *Acta Biomater.* **7**, 3302611 , 2011.
193. Itälä, A. I., Ylänen, H. O., Ekholm, C., Karlsson, K. H. and Aro, H. T. Pore diameter of more than 100  $\mu\text{m}$  is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.* **58**, 679683 , 2001.
194. Baker, B. M., Shah, R. P., Huang, A. H. and Mauck, R. L. Dynamic tensile loading improves the functional properties of mesenchymal stem cell-laden nanofiber-based fibrocartilage. *Tissue Eng. Part A* **17**, 144561455 , 2011.
195. Carpentier, B. Development, characterization and optimization of a bioreactor-based system dedicated to the production of bone graft substitutes [thesis]. Biomechanics and Bioengineering Laboratory, University of Technology of Compiègne. , 2009.
196. Wang, D. et al. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 8936903 , 1999.
197. Rajaraman, R., Rounds, D. E., Yen, S. P. S. and Rembaum, A. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp. Cell Res.* **88**, 3276339 , 1974.
198. Ghasemi-Mobarakeh, L., Semnani, D. and Morshed, M. A Novel Method for Porosity Measurement of Various Surface Layers of Nanofibers Mat Using Image Analysis for Tissue Engineering Applications. , 2007. doi:10.1002/app
199. Baudequin, T., Bedoui, F., Dufresne, M., Paullier, P. and Legallais, C. Towards the development and characterisation of an easy handling sheet-like biohybrid bone substitute. *Tissue Eng. Part A* **21**, 189561905 , 2015.
200. Gardel, L. S., Correia-Gomes, C., Serra, A., Gomes, M. E. and Reis, R. L. A novel bidirectional continuous perfusion bioreactor for the culture of large-sized bone tissue-engineered constructs. *J Biomed Mater Res Part B* **101**, 137761386 , 2013.

201. Riehl, B. D., Park, J.-H., Kwon, I. K. and Lim, J. Y. Mechanical stretching for tissue engineering: two-dimensional and three-dimensional constructs. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **18**, 2886300 , 2012.
202. Santos, M. I., Unger, R. E., Sousa, R. A., Reis, R. L. and Kirkpatrick, C. J. Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone/starch scaffold and the in vitro development of vascularization. *Biomaterials* **30**, 440764415 , 2009.
203. Keun Kwon, I., Kidoaki, S. and Matsuda, T. Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: Structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* **26**, 392963939 , 2005.
204. Lee, J. et al. The effect of gelatin incorporation into electrospun poly(l-lactide-co-ε-caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility. *Biomaterials* **29**, 187261879 , 2008.
205. Wanasekara, N., Chen, M., Chalivendra, V. and Bhowmick, S. in *Experimental Mechanics* **2**, 1576162 (2011).
206. Chatterji, P. R. Gelatin with Hydrophilic / Hydrophobic Grafts and Glutaraldehyde Crosslinks. **37**, 220362212 , 1989.
207. Veis, A. *The macromolecular chemistry of gelatin.* (Academic Press, 1964).
208. Bedoui, F. et al. Anomalous increase in modulus upon hydration in random copolymers with hydrophobic segments and hydrophilic blocks. *Soft Matter* **8**, 2230 , 2012.
209. Asran, A. S., Razghandi, K., Aggarwal, N., H., M. G. and Groth, T. Nanofibers from Blends of Polyvinyl Alcohol and Polyhydroxy butyrate as a potential scaffold material.pdf. *Biomacromolecules* **11**, 341363421 , 2010.
210. Chen, H. et al. Electrospun chitosan-graft-poly (ε-caprolactone)/poly (ε-caprolactone) nanofibrous scaffolds for retinal tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 4536461 , 2011.

211. Vaquette, C. et al. Zeta-potential and morphology of electrospun nano- and microfibers from biopolymers and their blends used as scaffolds in tissue engineering. *Mendeleev Commun.* **18**, 38641 , 2008.
212. Croisier, F. et al. Charged poly(D,L-lactide) nanofibers: Towards customized surface properties. *Macromol. Symp.* **309-310**, 20627 , 2011.
213. Robledo, R. F., Rajan, L., Li, X. and Lufkin, T. The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev.* **16**, 108961101 , 2002.
214. Samee, N. et al. Increased bone resorption and osteopenia in Dlx5 heterozygous mice. *J. Cell. Biochem.* **107**, 8656872 , 2009.
215. Sajan, S. a., Rubenstein, J. L. R., Warchol, M. E. and Lovett, M. Identification of direct downstream targets of Dlx5 during early inner ear development. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 126261273 , 2011.
216. Zhang, J. et al. Phenotypic Analysis of Dlx5 Overexpression in Post-natal Bone. *J. Dent. Res.* **87**, 45650 , 2008.
217. Bashur, C. a, Shaffer, R. D., Dahlgren, L. a, Guelcher, S. a and Goldstein, A. S. Effect of fiber diameter and alignment of electrospun polyurethane meshes on mesenchymal progenitor cells. *Tissue Eng. Part A* **15**, 243562445 , 2009.
218. Shukunami, C., Takimoto, A., Oro, M. and Hiraki, Y. Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev. Biol.* **298**, 2346 247 , 2006.
219. Schweitzer, R. et al. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* **128**, 385563866 , 2001.
220. Mendias, C. L., Gumucio, J. P., Bakhurin, K. I., Lynch, E. B. and Brooks, S. V. Physiological loading of tendons induces scleraxis expression in epitenon fibroblasts. *J. Orthop. Res.* **30**, 6066612 , 2012.

221. Havis, E. et al. Transcriptomic analysis of mouse limb tendon cells during development. *Development* **141**, 368363696 , 2014.
222. Liu, W. et al. Generation of Electrospun Nanofibers with Controllable Degrees of Crimping Through a Simple, Plasticizer-Based Treatment. *Adv. Mater.* n/a/n/a , 2015. doi:10.1002/adma.201500329
223. Cooper, J. A. et al. Biomimetic tissue-engineered anterior cruciate ligament replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 304963054 , 2007.
224. Song, Z. et al. A comparative study of preventing postoperative tendon adhesion using electrospun polyester membranes with different degradation kinetics. *Sci. China Chem.* **58**, 115961168 , 2015.
225. Lu, H. H. et al. Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: In vitro optimization studies. *Biomaterials* **26**, 480564816 , 2005.
226. Shang, S., Yang, F., Cheng, X., Frank Walboomers, X. and Jansen, J. a. The effect of electrospun fibre alignment on the behaviour of rat periodontal ligament cells. *Eur. Cells Mater.* **19**, 1806192 , 2010.
227. Nam, J., Johnson, J., Lannutti, J. J. and Agarwal, S. Modulation of embryonic mesenchymal progenitor cell differentiation via control over pure mechanical modulus in electrospun nanofibers. *Acta Biomater.* **7**, 151661524 , 2011.
228. Jones, D. B., Nolte, H., Scholubbers, J. G., Turner, E. and Veltel, D. Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* **12**, 1016110 , 1991.
229. Langer, R. and Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **260**, 92066 , 1993.
230. Wolter, J. R. and Meyer, R. F. Sessile macrophages forming clear endothelium-like membrane on inside of successful keratoprosthesis. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **82**, 1876202 , 1984.

231. Matsuda, T., Akutsu, T., Kira, K. and Matsumoto, H. Development of hybrid compliant graft: rapid preparative method for reconstruction of a vascular wall. *ASAIO Trans.* **35**, 5536555
232. Nerem, R. M. Cellular engineering. *Ann. Biomed. Eng.* **19**, 5296545 , 1991.
233. Nerem, R. M. Tissue engineering in the USA. *Med. Biol. Eng. Comput.* **30**, CE86E12 , 1992.
234. Carpentier, B., Gautier, a and Legallais, C. Artificial and bioartificial liver devices: present and future. *Gut* **58**, 169061702 , 2009.
235. Figaro, S. et al. SUPPLIVER: Bioartificial supply for liver failure. *IRBM* **36**, 1016109 , 2015.
236. Cell and Tissue culture for medical research. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000).
237. Alves da Silva, M. L. et al. Cartilage tissue engineering using electrospun PCL nanofiber meshes and MSCs. *Biomacromolecules* **11**, 3228636 , 2010.
238. Struwer, J. et al. Influence of cyclical mechanical loading on osteogenic markers in an osteoblast-fibroblast co-culture in vitro: Tendon-to-bone interface in anterior cruciate ligament reconstruction. *Int. Orthop.* **38**, 108361089 , 2014.
239. Dinis, T., Vidal, G., Marin, F., Kaplan, D. and Eglès, C. Silk nerve: bioactive implant for peripheral nerve regeneration. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* **16 Suppl 1**, 25364 , 2013.
240. Pereira, U. et al. Development of an in vitro coculture of primary sensitive pig neurons and keratinocytes for the study of cutaneous neurogenic inflammation. *Exp. Dermatol.* **19**, 9316935 , 2010.
241. Site internet de l'American Type Culture Collection (ATCC). at <[http://www.atcc.org/About/About\\_ATCC/Who\\_We\\_Are.aspx](http://www.atcc.org/About/About_ATCC/Who_We_Are.aspx)>

242. Yan, X.-Z. et al. Effects of Continuous Passaging on Mineralization of MC3T3-E1 Cells with Improved Osteogenic Culture Protocol. *Tissue Eng. Part C. Methods* **20**, 1986204 , 2014.
243. Bricks, T. et al. Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines. *Toxicol. Vitro.* **28**, 8856895 , 2014.
244. Kasuya, J., Sudo, R., Mitaka, T., Ikeda, M. and Tanishita, K. Hepatic stellate cell-mediated three-dimensional hepatocyte and endothelial cell triculture model. *Tissue Eng. Part A* **17**, 3616370 , 2011.
245. Cooper, G. *The Cell: A Molecular Approach* (2nd edition). (2000).
246. Ming, L.-G., Zhou, J., Cheng, G.-Z., Ma, H.-P. and Chen, K.-M. Osthol, a Coumarin Isolated from Common Cnidium Fruit, Enhances the Differentiation and Maturation of Osteoblasts in vitro. *Pharmacology* **88**, 33643 , 2011.
247. Gao, L. N. et al. The effect of the coumarin-like derivative osthole on the osteogenic properties of human periodontal ligament and jaw bone marrow mesenchymal stem cell sheets. *Biomaterials* **34**, 993769951 , 2013.
248. McCormick, A. M. et al. Micropatterned Coumarin Polyester Thin Films Direct Neurite Orientation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 19655619667 , 2014.
249. Ishihara, M., Yokote, Y. and Sakagami, H. Quantitative structure-cytotoxicity relationship analysis of coumarin and its derivatives by semiempirical molecular orbital method. *Anticancer Res.* **26**, 288362886 , 2006.



“Science and everyday life cannot and should not be separated.”

*Rosalind Franklin*