



**HAL**  
open science

# Prothèse nerveuse artificielle à partir de fibroïne de soie pour la réparation et la régénération de nerfs périphériques

Tony Mickael Dinis

► **To cite this version:**

Tony Mickael Dinis. Prothèse nerveuse artificielle à partir de fibroïne de soie pour la réparation et la régénération de nerfs périphériques. Biomécanique [physics.med-ph]. Université de Technologie de Compiègne, 2014. Français. NNT : 2014COMP2152 . tel-01402546

**HAL Id: tel-01402546**

**<https://theses.hal.science/tel-01402546v1>**

Submitted on 24 Nov 2016

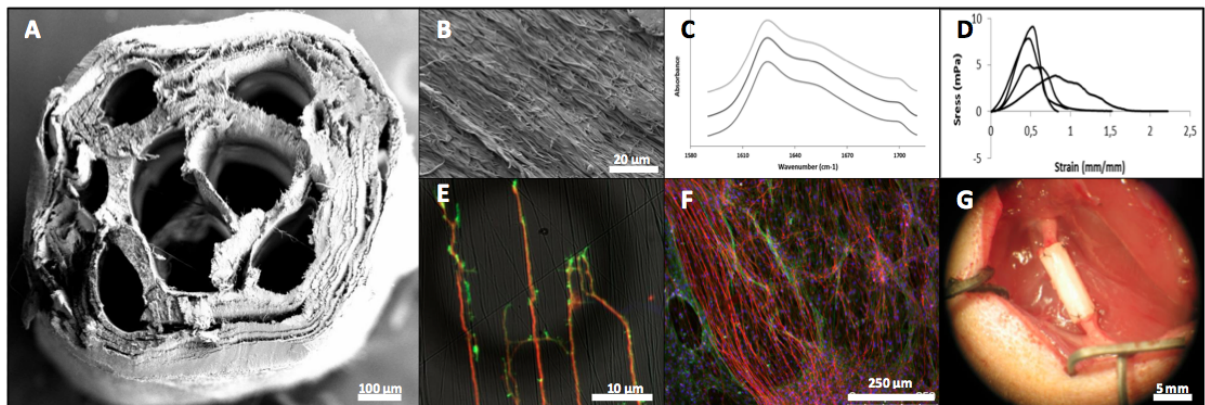
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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 **Tony Mickael DINIS**

*Prothèse nerveuse artificielle à partir de fibroïne de soie pour la réparation et la régénération de nerfs périphériques*

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



Soutenue le 17 octobre 2014  
**Spécialité** : Bio-ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux

D2152

# UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

ECOLE DOCTORALE Sciences pour l'Ingénieur

Laboratoire CNRS UMR 7338 : BioMécanique et BioIngénierie (BMBI)

Thèse

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE**

Discipline / Spécialité : Bio-ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux

présentée et soutenue par

**Tony Mickael DINIS**

le 17 octobre 2014

---

**Prothèse nerveuse artificielle à partir de fibroïne de soie pour la  
réparation et la régénération de nerfs périphériques**

---

## **JURY :**

### *Rapporteurs*

Pr. Thomas Claudepierre	Université de Lorraine
Dr. Philippe Lavalle	Université de Strasbourg

### *Examineurs*

Pr. Salima Bouvier	Université de Compiègne
Pr. Christophe Egles (Directeur de thèse)	Université de Compiègne
Pr. Frédéric Marin (Directeur de thèse)	Université de Compiègne
Pr. Danielle Seilhean	CHU Paris - La Pitié Salpêtrière

### *Membre invité*

Pr. David L. Kaplan	Tufts University (USA)
---------------------	------------------------

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directeurs de thèse, le Pr. Christophe Egles et le Pr. Frédéric Marin, pour m'avoir accepté au sein de leurs équipes respectives et m'avoir confié ce projet de thèse. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité et votre implication dans ma thèse. J'ai beaucoup apprécié notre relation basée sur l'écoute et la confiance, mes travaux scientifiques ont ainsi pu évoluer et se finaliser. Votre ouverture à l'international m'a donné la chance d'effectuer une partie de ma thèse aux Etats-Unis qui m'a permis de développer et faire avancer mes recherches. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de mon immense reconnaissance.

I also would like to thanks Pr. David Kaplan for hosting me in the Biomedical Engineering departement of Tufts University in the United States. Your advices and experience have led to the emergence of this project. Your leadership, your availability and constant encouragement helped me to express myself to the fullest and to achieve my goal: the design of the material on time. Thank you so much to cross the Atlantic Ocean in order to participate in this thesis committee.

Mes sincères remerciements aux membres du Jury, le Pr. Thomas Claudepierre et le Dr. Philippe Laval, qui ont accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs, ainsi que les Pr. Salima Bouvier et le Pr. Danielle Seilhan pour leur participation en tant qu'examineurs de cette thèse.

Un immense merci à Guillaume Vidal et Roberto Elia pour votre aide, votre soutien et votre extrême gentillesse qui m'ont accompagné tout au long de ma thèse. Sans votre participation active au cours de ce projet, les résultats n'auraient pas été aussi complets. Guillaume, je n'oublierai pas le nombre de gâteaux et biscuits que tu n'as jamais voulu partager, ni le jour où tu m'as mis le couteau sous la gorge pour assister au match des Celtics à Boston (grand sportif et supporter que je suis). Sur une ambiance caliente, trouve une onde latino super reconnaissante vis-à-vis de tout ce que tu auras pu m'apporter pendant ces deux ans passé à tes côtés.

A présent, je souhaite exprimer toute ma reconnaissance aux membres de l'équipe, en particulier Jean-Luc Duval, Pascale Vigneron, Vanessa Bleicher, Muriel Vayssade, Biao Lu, Kamelia Ghazi, Olfat Gsib et Laetitia Nowacki. Jean-Luc, l'homme qui sait tout, telle une encyclopédie ambulante. Les incultes de ce laboratoire ont bien la chance de vous avoir. Merci pour vos jeux de mots, humour et bonne humeur de chaque jour. Pascalou, on ne parle pas aux gens qu'on ne connaît pas!!! Grâce à toi je parle non pas 4 mais 5 langues (picard) couramment. Je souligne le savoir-faire technique que tu mets en œuvre au sein de ce laboratoire. Un C2B sans Mme Vigneron, c'est comme une France sans Fromage! Tu as aussi être là, en plus de tout tes conseils techniques, dans les moments de fou rires et les moments moins drôles, toujours LE bon conseil. Vanessa, merci pour ta bonne humeur, ta sympathie et ton humour. Après ces 3 ans passés au labo, je t'enverrai la facture de mon

ostéopathe pour tous les coups de pieds donnés pendant l'heure du midi. Muriel, la dame qui ne m'aimait pas, et à qui j'ai su percer la carapace. Merci pour tout tes conseils tout au long de cette thèse, nos moments de rires, les soirées « écolo » et ta franchise. Je remercie également Biao, Kamélia et Olfat que j'ai rencontré lors de ma dernière année pour le soutien qu'ils m'ont apporté pendant ma période de rédaction. Olfat, merci pour tes innombrables corrections, propositions de synonymes et pardon pour la musique... Enfin, je remercie « Barbie fait de la science » alias « copine », Laetitia sans qui je n'aurais pas tenu ces deux dernières années. Merci d'avoir passé d'innombrables week-end et soirées à peaufiner nos manuscrits respectifs, nos soirées, le restaurant portugais et plein d'autres événements. J'ai trouvé en toi une amie, confidente, collègue avec qui j'espère rester en contact pour l'avenir.

Je remercie aussi, Clint et Khalil pour leur aide sur les tests de locomotions, Gladys et Quentin pour les tests mécaniques et Didier pour son expertise et son aide concernant les expériences électrophysiologiques. Merci à mes stagiaires que j'ai encadré pendant ces trois ans, Guillaume, Cyprien, Sophie, Manon, Litong et Adrien. Je remercie tous les membres du BMBI, particulièrement Ulysse, Thibault, Benjamin, Victoria, Sarah et les autres... Tous comme je remercie mes collègues du département Biomedical Engineering (USA) : Amanda, Lee, Laura, Alberto, Valentina, Andrew, Jeanine, Rod, Joseph, Jimmy, Amy, Alex.

Je tiens à profiter de ces quelques lignes pour remercier mes « vieux » amis en commençant par ceux avec qui j'ai appris à lire Elodie, Landry, Dom et Abdalah, la Team BTS, Yannick, Tania, Alexandre, Nafissa et Fatou, « maman » alias Julie Follet et enfin les américains Betty et Mario. Merci pour votre amitié, même si nous avons de longues périodes sans se voir, on s'aime malgré tout. Vous me manquez beaucoup, j'ai hâte de vous retrouver après ces 3 ans d'absence.

Enfin je remercie mes parents, mes grands-parents (une pensée pour ceux qui sont partis trop tôt) et ma sœur pour leur soutien dans tous les projets que j'ai eu au cours de ma vie. Merci pour votre confiance de toujours et votre amour.

Je remercie

L'Université de Technologie de Compiègne et Tufts University



Le CNRS et le TERC



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ainsi que  
la Région Picardie



Qui m'ont soutenu financièrement pendant toute la durée de cette thèse.

# Table des matières

Résumé en français.....	12
Résumé en Anglais.....	13
Avant-Propos.....	14
Chapitre 1 Introduction générale .....	17
<b>I. Contexte Clinique .....</b>	<b>18</b>
<b>II. Anatomie fonctionnelle du système nerveux périphérique.....</b>	<b>19</b>
II. 1. Le système nerveux périphérique.....	19
II. 1. A. Le système nerveux périphérique somatique.....	19
II. 1. B. Le système nerveux périphérique autonome .....	20
II. 2. Les cellules du système nerveux .....	21
II. 2. A. Les neurones .....	22
II. 2. B. Les cônes de croissance nerveux.....	26
II. 2. C. Les cellules gliales.....	26
II. 3. Fonctionnement du système nerveux .....	29
II. 3. A. La propagation du potentiel d'action.....	29
II. 3. B. La Synapse .....	31
II. 3. C. La jonction neuromusculaire.....	33
II. 4. Anatomie fonctionnelle des nerfs périphériques .....	34
II. 4. A. Endonèvre (Endoneurium).....	35
II. 4. B. Périnèvre (Perineurium).....	35
II. 4. C. Epinèvre (Epineurium).....	36
II. 4. D. Vascularisation du nerf périphérique .....	36
II. 5. Environnement extracellulaire.....	36
II. 5. A. La matrice extracellulaire.....	36
II. 5. B. La synthèse des facteurs neurotrophiques .....	37
<b>III. Lésion de nerfs périphériques .....</b>	<b>39</b>
III. 1. Neuropathies périphériques .....	39
III. 1. A. Généralités .....	39
III. 1. B. Classification.....	40
III. 2. Neuropathies traumatiques .....	41
III. 2. A. Elongation .....	42
III. 2. B. Lacération .....	42

III. 2. C. Compression .....	42
III. 2. D. Déformation mécanique .....	43
III. 3. La dégénérescence Wallérienne .....	43
III. 4. Régénération naturelle .....	45
III. 5. Dénervation.....	46
<b>IV. Stratégies de réparation nerveuse .....</b>	<b>48</b>
IV. 1. Les sutures nerveuses.....	48
IV. 1. A. L'autogreffe et l'allogreffe .....	48
IV. 1. B. La suture épineurale .....	49
IV. 1. C. La suture périneurale .....	49
IV. 1. D. La suture latéro-terminale.....	49
IV. 2. Greffe de tissus autologues .....	50
IV. 2. A. Les vaisseaux sanguins.....	50
IV. 2. B. Les muscles.....	51
IV. 2. C. Les tendons .....	52
IV. 3. Thérapie par facteurs de croissance.....	53
IV. 3. A. Nerve Growth Factor .....	53
IV. 3. B. Bi-fonctionnalisation .....	54
IV. 3. C. Les neurotrophines NT-3.....	54
IV. 3. D. Les facteurs neurotrophiques.....	55
IV. 3. E. Autres facteurs de croissance non spécifiques.....	55
IV. 4. Thérapie à cellules souches .....	57
IV. 4. A. Les cellules souches neurales .....	57
IV. 4. B. Les cellules souches mésenchymateuses .....	57
IV. 4. C. Les cellules souches adipeuses .....	58
IV. 5. Les thérapies géniques .....	59
IV. 6. Implantation de conduits nerveux.....	60
IV. 6. A. Propriétés.....	61
IV. 6. B. Les matériaux synthétiques .....	61
IV. 6. C. Les matériaux naturels.....	62
IV. 6. D. Les conduits nerveux commercialisés .....	64
<b>V. La fibroïne de soie .....</b>	<b>65</b>
V. 1. Le biomatériau de soie.....	65
V. 1. A. Structure de la fibroïne .....	66
V. 1. B. Intérêt de la protéine de soie .....	67
V. 1. C. Propriétés physico-chimiques de la fibroïne .....	67
V. 2. Les différentes matrices de soie .....	69
V. 2. A. Films .....	69
V. 2. B. Hydrogels .....	69



V. 2. C. Eponges .....	70
V. 2. D. Sphères et capsules .....	70
V. 3. Les nanofibres de soie .....	70
V. 3. A. Extraction et purification de la fibroïne .....	71
V. 3. B. Procédés de fabrication des fibres de soie .....	71
V. 3. C. Electrospinning : fabrication de nanofibres .....	72
V. 4. Applications biomédicales des nanofibres de soie .....	74
V. 4. A. L'intérêt de la soie dans le génie tissulaire .....	74
V. 4. B. Ligament .....	75
V. 4. C. Peau .....	76
V. 4. D. Os .....	77
V. 4. E. Blood-contacting materials .....	78
V. 4. F. Libération de molécules d'intérêts médicamenteuses par les matériaux de soie .....	79
V. 5. Les nanofibres de soie utilisées pour la régénération nerveuse .....	80

## **Chapitre 2 Matériels et méthodes ..... 83**

### **I. Fabrication des nanofibres de soie ..... 84**

I. 1. Extraction de la fibroïne de soie .....	84
I. 2. Préparation des solutions de filage .....	85
I. 3. Electrospinning .....	86
I. 3. A. Nanofibres de soie alignées pour les cultures in vitro .....	86
I. 3. B. Nanofibres de soie pour les études in vivo .....	86
I. 4. Conception du nouveau conduit nerveux (3D) de soie bi-fonctionnalisée .....	87

### **II. Culture cellulaire et organotypique ..... 88**

II. 1. Extraction de cellules nerveuses à partir des DRGs .....	89
II. 2. Mise en culture .....	90
II. 2. A. Préparation des lamelles de verre .....	90
II. 2. B. Ensemencements .....	90
II. 3. Immunomarquages .....	90

### **III. Caractérisation physico-chimique du Biomatériau de soie fonctionnalisée ..... 91**

III. 1. Analyse des propriétés morphologiques des nanofibres .....	91
III. 1. A. Microscopie électronique à balayage (MEB) .....	91
III. 1. B. Mesure de la rugosité de surface des nanofibres .....	92
III. 2. Analyse chimique de la fonctionnalisation des nanofibres de soie .....	92
III. 2. A. Dosage d'ImmunoAdsorption par Enzyme Liée .....	92
III. 2. B. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) .....	93
III. 2. C. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) .....	94
III. 3. Comportement mécanique du conduit nerveux de soie .....	94

III. 3. A. Extraction du nerf sciatique du rat .....	94
III. 3. B. Test de traction .....	95
<b>IV. Evaluation <i>in vivo</i> des conduits nerveux de soie fonctionnalisés chez le rat .....</b>	<b>96</b>
IV. 1. Protocole chirurgical .....	96
IV. 1. A. Greffes des conduits nerveux de soie artificiels .....	96
IV. 1. B. Réveil et soins post-opératoires des animaux .....	97
IV. 2. Etude cinématique de la locomotion .....	98
IV. 3. Histologie .....	99
<b>V. Statistiques .....</b>	<b>99</b>
<b>Chapitre 3 Résultats .....</b>	<b>101</b>
<b>    Organotypic culture to assess cell adhesion, growth and alignment of different organs on silk fibroin .....</b>	<b>104</b>
Abstract .....	105
Introduction .....	106
Materials and methods .....	107
Results .....	110
Discussion and Conclusions .....	114
Acknowledgements .....	116
References .....	116
<b>    Method to form a fiber/growth factor dual-gradient along electrospun silk for nerve regeneration .....</b>	<b>120</b>
Abstract .....	121
Introduction .....	122
Materials and Methods .....	122
Result .....	128
Discussion .....	138
Conclusions .....	141
Acknowledgement .....	141
References .....	142
<b>    Complementary Effects of Two Growth Factors in Multifunctionalized Silk Nanofibers for Nerve Reconstruction .....</b>	<b>162</b>
Abstract .....	163
Introduction .....	164
Materials and methods .....	165

Results .....	170
Discussion.....	179
Conclusion.....	182
Acknowledgements.....	182
References .....	183
<b>3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration. ....</b>	<b>188</b>
Abstract.....	189
Introduction .....	190
Materials and methods.....	192
Results.....	196
Discussion.....	205
Conclusions .....	208
Acknowledgment .....	208
References .....	209
<b>Hindlimb kinematics over ground locomotion in rats following sciatic nerve injury .....</b>	<b>217</b>
Abstract.....	218
Introduction .....	219
Materials and methods.....	219
Results.....	224
Discussion.....	228
Conclusion.....	228
References .....	231
<b>Chapitre 4 Conclusion et perspectives .....</b>	<b>234</b>
<b>Chapitre 5 Références .....</b>	<b>239</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Diagramme des composantes du système nerveux et de leurs relations fonctionnelles.....	21
Figure 2 : Les cellules neurales.....	22
Figure 3 : Structure anatomique générale et observation au MEB (x5000) d'un neurone ...	23
Figure 4 : Représentation des classes de neurones fonctionnels (Lodish <i>et al.</i> , 2000).....	25
Figure 5 : Cellules gliales du système nerveux périphérique (Marieb, 2006).....	29
Figure 6 : Représentation schématique de la conduction saltatoire présente chez les axones myélinisés.....	30
Figure 7 : Les deux types de transmissions synaptiques.....	33
Figure 8 : Représentation schématique de la jonction neuromusculaire entre un motoneurone et un myocyte.....	34
Figure 9 : Représentation schématique de la structure du nerf périphérique.....	35
Figure 10 : Schéma de la voie de signalisation des neurotrophines suite à l'activation de leurs récepteurs.....	38
Figure 11 : Classification des lésions nerveuses périphériques de Seddon et Sunderland. ....	41
Figure 12 : Représentation schématique de la dégénérescence Wallérienne.....	44
Figure 13 : Composition et structure de la fibroïne de soie (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser) <sub>6</sub> .....	66
Figure 14 : Schéma du principe de l'électrospinning.....	73
Figure 15 Les TENGs : représentation schématique et croissance des explants.....	81
Figure 16 : Schéma de purification de la fibroïne sous forme de solution aqueuse à 7-8 %... 85	85
Figure 17 : Production des nanofibres de soie par électrospinning.....	87
Figure 18 : Fabrication 3D du conduit nerveux à base de nanofibres de soie alignées.....	88
Figure 19 : Observation des DRGs et des cellules nerveuses.....	89
Figure 20 : Représentation schématique de la technique ELISA sandwich utilisée.....	93
Figure 21 : Tests de traction effectués à l'aide de l'Electroforce 3230 Bose (A).....	95
Figure 22 : Implantation du conduit nerveux de soie au niveau du nerf sciatique chez le rat 97	97
Figure 23 : Représentation du système établi pour l'étude de la locomotion.....	98

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différentes sutures utilisées pour la réparation nerveuse chirurgicale.....	50
Tableau 2 : Les facteurs de croissance utilisés pour la réparation nerveuse.....	56
Tableau 3 : Matériaux synthétiques utilisés pour la fabrication de conduits nerveux.....	62
Tableau 4 : Matériaux naturels utilisés pour la fabrication de conduits nerveux .....	63
Tableau 5 : Les différents TENGs déjà approuvés et commercialisés.....	64
Tableau 6 : Propriétés mécaniques des fibres de soie et autres matériaux.....	69

## Liste des abréviations

AA	Acide Aminé
ADSc	Cellules Souches Adipeuses
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BMBI	BioMécanique et BioIngénierie
BMP-2	Protéines Morphogéniques osseuses 2
CNS	Système Nerveux Central
CNTF	Ciliary NeuroTrophic Factor
CSM	Cellules Souches Mésenchymateuses
DRG	Ganglion de la racine dorsale
FC	Facteur de croissance
FGF	Facteur de croissance des Fibroblastes
GDNF	Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HSV	Herpès Simplex Virus
IGF	Insulin-like Growth Factor
LPN	Lésion Périphérique Nerveuse
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MEC	Matrice Extra Cellulaire
N-CAM	Neural-Cellular Adhesion Molecules
NCS	Cellules Souches Neurales
NGF	Nerve Growth Factor
NT	Neurotrophin
PEG	PolyEthylene Glycol
PEO	PolyEthylene Oxyde
PNS	Système Nerveux Périphérique
SF	Fibroïne de Soie
TENG	Tissue Engineered Nerve Graft
TGF	Transformant Growth Factor
TrK	Tyrosine Kinase
UTC	Université de Technologie de Compiègne
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

## Résumé en français

La lésion de nerfs périphériques peut engendrer des déficits moteurs et/ou sensoriels permanents. En dépit des progrès techniques réalisés au cours de ces 25 dernières années, une récupération complète suite à ces lésions n'est pas encore possible aujourd'hui. L'autogreffe nerveuse, toujours considérée comme le standard clinique, est la seule technique capable d'offrir les meilleurs résultats en termes de récupération fonctionnelle. Cependant, la survenue de complications post-opératoires lors d'autogreffes d'un nerf et la quantité limitée de nerfs disponibles conduisent à mettre au point d'autres stratégies alternatives.

Dans ce contexte, la mise au point de biomatériaux pour substituts nerveux devient une nécessité clinique. Malgré les efforts de la recherche, ces prothèses ne permettent toujours pas une régénération du nerf à la hauteur de l'autogreffe. Le biomatériau utilisé doit notamment présenter des propriétés physiques et chimiques proches de celui du nerf natif. La soie, aux propriétés mécaniques uniques, représente une bonne alternative pour mettre au point ce type de prothèses. En effet, la protéine de soie déjà utilisée dans le domaine biomédical est biocompatible. Les modifications chimiques de cette protéine améliore et favorise l'adhérence et la croissance cellulaires par l'incorporation de facteurs de croissance ou d'autres molécules d'intérêt.

Ce travail de thèse propose de développer un nouveau type de biomatériau à base de soie fonctionnalisée par deux facteurs de croissance : le Nerve Growth Factor (NGF) et le Ciliary NeuroTrophic Factor (CNTF). Etant donné l'architecture complexe qui compose la structure nerveuse, une matrice supportant la repousse des tissus de façon orientée semble primordiale. Nous démontrons, dans un premier temps, le pouvoir de ces nanofibres alignées (produites par electrospinning) à orienter la régénération tissulaire de différents organes par culture d'explants. Les nanofibres de soie alignées, biocompatibles sont bio-activées par ajout de NGF spécifique de la régénération nerveuse. Cette matrice créée présente un gradient de concentration en NGF qui permet d'orienter la repousse axonale en stimulant la croissance axonale dans une seule direction. Afin d'optimiser la croissance de deux populations cellulaires, nous avons incorporé du CNTF pour produire des nanofibres bifonctionnalisées. Ces nanofibres bifonctionnalisées ont conduit à une longueur des neurites 3 fois plus grande à leurs contacts, stimulant la croissance des cellules gliales. Ainsi, nous avons produit des conduits nerveux à base de soie biofonctionnalisée pour implantation chez le rat. Les analyses physico-chimiques et les propriétés mécaniques démontrent le caractère biomimétique de nos tubes de guidage. Les premières études de la locomotion et l'observation de coupes du nerf sciatique de rat, suite à l'implantation de nos conduits donnent des résultats très prometteurs.

L'ensemble de ces travaux démontre l'efficacité de nos guides nerveux à base de soie et les présente comme une alternative prometteuse à l'autogreffe nerveuse pratiquée en clinique.

MOTS CLES : Soie, Electrospinning, Régénération nerveuse, Guide nerveux, Culture cellulaire et organotypique, Expérimentation Animale

## Résumé en Anglais

Peripheral nerve injury causes sensory and/or motor functions deficits. Despite technological advances over the past 25 years, a complete recovery from these injuries remains unsatisfactory today. The autograft still considered the "gold standard" in clinical practice. This is the only technique able to offer complete functional recovery. However, the occurrence of postoperative complications in autologous nerve and the limited amount of available nerves lead to develop alternatives strategy.

In this context, development of nerve graft substitutes becomes by far a clinical necessity. Despite research efforts, these artificial prostheses design based on biomaterial doesn't allow nerve regeneration as found in autograft nerve procedures. The biomaterial used must have the physical and chemical properties similar to that of the native nerve. Silk, well known for its unique mechanical properties, proposes a good alternative to develop these prostheses. Indeed, the silk protein is commonly used in the biomedical field and regenerative medicine. This protein biocompatibility may be improved through chemical modifications to promote adhesion and cell growth by the incorporation of growth factors or other molecules of interest.

Therefore, this thesis proposes to develop a new type of functionalized silk biomaterial based on two growth factors: Nerve Growth Factor (NGF) and Ciliary NeuroTrophic Factor (CNTF). Given the complex architecture that consists of nerve structure, a matrix which is able to support and manage the outgrowth of tissue becomes essential. We demonstrate the power of these aligned nanofibers (produced by electrospinning) to guide and manage tissue regeneration from different organ explants culture. Aligned silk nanofibers, were biocompatible and bio-activated by adding NGF involved for nerve regeneration. This matrix has been created with a concentration gradient of NGF to guide neuritis outgrowth in only one direction. The presence of this gradient demonstrated a better axonal growth in one direction versus the uniform concentration conditions. Nerve cells consist essentially of two cell populations which are neurons and Schwann cells. To optimize the culture and growth of these two populations, in addition to NGF, we incorporated CNTF to produce bifunctionalized nanofibers. These biofunctionalised nanofibers led to a length 3 times larger on contact with neurites. The glial cells growth, alignment and migration were stimulated by CNTF. Thus, we produced bi-functionalized nerve guidance conduits for rat implantation. The physico-chemical analyzes demonstrate the biomimetic of our guide tubes. Early studies of locomotion and observing histological sections of rat sciatic nerve, following the implementation of our conduits gave very promising results.

These studies demonstrate the relevance of our nervous guides' silk-based developed as an effective alternative to nerve autograft performed in the clinic.

**KEYWORDS:** Silk, Electrospinning, Nerve regeneration, nervous guide, Cell and organotypic culture, Animal Experimentation



## Avant-Propos

Le système nerveux est spécialisé dans la conduction, la transmission et le traitement des informations par le biais de signaux électriques rapides. Il se décompose en deux sous-systèmes formant un circuit fermé non découpé en organes séparés : l'association de l'encéphale et la moelle épinière composent le Système Nerveux Central (CNS) qui recueille, intègre et fournit une réponse aux modifications de l'organisme. En parfaite continuité avec le CNS, le Système Nerveux Périphérique (PNS) est constitué de ganglions et de nerfs périphériques qui, depuis la cavité crânienne et le canal rachidien, servent de lien vers tous les points de l'organisme. Le PNS assure l'acheminement des perceptions sensorielles vers le CNS et les ordres moteurs de celui-ci vers les effecteurs périphériques.

On parle de neuropathie périphérique lorsque le PNS est altéré, ce qui peut, selon le seuil de gravité, provoquer un bouleversement du quotidien de la personne touchée. En effet, ces neuropathies affectent la sensation, le mouvement, la transmission de la douleur, l'équilibre ou la fonction même des organes (Torpy et al., 2008). Dans le cas de patients ayant subi une lésion suite à un traumatisme ouvert ou fermé des nerfs périphériques. Les signes cliniques sont très variables. Par exemple, l'hypoesthésie (perte partielle de la sensibilité) et la parésie (perte partielle des capacités motrices localisées) témoignent le plus souvent d'une lésion nerveuse incomplète (Erminio et al., 1959; Gierthmühlen et al., 2012) alors qu'une anesthésie accompagnée de paralysie peuvent être retrouvées aussi bien pour une lésion complète ou incomplète. Ces lésions de nerfs périphériques sont assez fréquentes et peuvent se traduire par une atrophie du muscle strié squelettique induisant une longue et légère récupération fonctionnelle (Gu et al., 2011). Néanmoins, suite à cette lésion, le PNS est capable de se régénérer lentement mais sa régénération est rarement optimale (Fenrich and Gordon, 2004).

La reconstruction et la régénération du PNS dépend alors du guidage des axones depuis le point proximal de la lésion du nerf vers le moignon distal de l'organe cible avant l'atrophie. Une régénération spontanée peut se produire pour des lésions inférieures à quelques millimètres (Bryan et al., 2004), tandis que la réparation de lésions supérieures au centimètre reste un défi majeur pour les neuro-chirurgiens (Dellon and Mackinnon, 1988). Plusieurs avancées dans ce domaine s'appuyant sur le génie tissulaire ont tenté de proposer

différentes stratégies de régénération. Ces dernières s'appuient principalement sur l'ajout de facteurs neurotrophiques, de cellules souches et de cellules gliales au niveau du site lésé. Plus récemment, la thérapie génique et le développement de canaux de guidage des nerfs ont aussi été testés *in vitro* et *in vivo* visant à accroître la régénération du système nerveux périphérique. Malheureusement, aucune des stratégies précédemment citées n'a pu montrer une récupération fonctionnelle complète après lésion démontrant la nécessité de poursuivre un travail de recherche afin de proposer des alternatives à la hauteur de l'autogreffe.

Au sein du laboratoire de BioMécanique et BioIngénierie (BMBI) de l'Université de Technologie de Compiègne, il a été récemment développé un nouvel axe de recherche de médecine régénératrice autour du projet SILKNERVE. SILKNERVE se propose de mettre au point un nouveau type de matériau dit « bio-intelligent » composé de fibres de soie, capable à la fois de diriger le nerf pendant sa recroissance et de relarguer de façon contrôlée des facteurs de croissance, favorisant ainsi la repousse du nerf. Les fibres de soie, qui constituent un bio-polymère biodégradable et biocompatible, sont d'abord tissées dans un champ électrique selon la technique d'électrospinning afin de les aligner selon un axe prédéfini. En préliminaire de ce projet, le laboratoire BMBI, en collaboration avec l'Institut des Neurosciences cellulaires et intégratives de Strasbourg, l'université de Leipzig (Allemagne) et l'université de Tufts (États-Unis), était parvenu à montrer que la repousse axonale des cellules nerveuses de la rétine pouvait être stimulée et guidée en utilisant cette nanotechnologie (Wittmer et al., 2011). Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la continuité de cette approche, en proposant une prothèse artificielle nerveuse à base de soie fonctionnalisée pour de futures applications biomédicales, qui viendraient alors compléter les approches thérapeutiques.

Dans ce cadre, pour faciliter la compréhension des travaux menés au cours de cette thèse, une introduction générale est présentée. Elle porte dans un premier temps sur l'impact clinique engendré par ces lésions suivi de d'une introduction au tissu nerveux. Par la suite, les stratégies issues du génie tissulaire pour la réparation nerveuse sont développées en s'attardant sur les conduits nerveux. L'introduction se termine enfin par la présentation des protéines de soie déjà utilisées dans le milieu biomédical puis passe en revue les différents travaux menés entre la soie et la repousse d'axones.

A la suite de cette introduction générale, les principales méthodes et techniques utilisées durant ces travaux sont détaillées dans un troisième chapitre. Elles renseignent sur la conception des nanofibres de soies et le design du conduit nerveux élaboré, puis les méthodes physicochimiques et biologiques afin de caractériser et évaluer le biomimétisme et l'efficacité de ce biomatériau pour la régénération nerveuse.

Ensuite, les travaux originaux sont présentés sous la forme de cinq articles scientifiques en chapitre 4. L'article 1 intitulé « **Organotypic culture to assess cell adhesion, growth and alignment of different organs on silk fibroin** » présélectionne la morphologie, cytocompatibilité et circularité que proposent les nanofibres de soie alignées sur culture organotypique. Ces nanofibres sous forme d'un bi-gradient fonctionnalisé (fibres et facteur de croissance) ont été testées *in vitro* afin d'orienter la repousse axonale dans une seule direction. Les résultats font l'objet d'un deuxième article « **Method to form a fiber/growth factor dual-gradient along electrospun silk for nerve regeneration** ». Suite à ces premiers résultats, les nanofibres de soie ont été fonctionnalisées avec deux facteurs de croissance afin d'influer sur la survie et la croissance des neurones et des cellules gliales pour obtenir un biomatériau optimum pour la régénération de nerfs périphériques. Ces travaux et résultats figurent dans l'article 3 « **Complementary Effects of Two Growth Factors in Multifunctionalized Silk Nanofibers for Nerve Reconstruction** ». Après avoir observé et démontré l'impact de la fonctionnalisation des biomatériaux de soie *in vitro*, nous avons développé et caractérisé notre conduit nerveux pour vérifier son caractère biomimétique avant implantation chez l'animal « **3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration** ». Enfin, un dernier article « **Hindlimb kinematics during overground locomotion in rats following sciatic nerve injury** » présente les premiers résultats de la reprise fonctionnelle de la marche chez le rat suite à l'implantation de notre conduit nerveux au niveau du nerf sciatique.

Finalement une discussion générale suit et souligne la contribution originale des résultats pour la mise au point d'un nouveau biomatériau pour la régénération du PNS. Par la suite, des perspectives seront aussi proposées pour la continuité du projet.

# Chapitre 1 Introduction générale

---

## I. Contexte Clinique

La lésion périphérique nerveuse (LPN) est une forme courante de traumatisme et affecte plus de 300 000 patients en Europe chaque année (Ichihara et al., 2008). Aux Etats-Unis, 2,8% des patients victimes de traumatismes présentent ces types de blessures (Potucek et al., 2009) représentant 200 000 patients américains traités par chirurgie chaque année (Belkas et al., 2004).

Déjà dans l'antiquité, les LPNs sont décrites sur différents écrits. En effet, entre le XII<sup>e</sup> et VI<sup>e</sup> siècle avant Jésus-Christ, la lésion du plexus brachial suite à un traumatisme de l'épaule est décrite dans l'Illiade d'Homère et l'histoire de la guerre du Péloponnèse (Desouches et al., 2005; Terzis and Papakonstantinou, 2000). Au Moyen-Age (vers l'an 600 après Jésus-Christ), Paul d'Égine définit la suture nerveuse, mais ce n'est qu'après le siècle des lumières, au début du XIX<sup>e</sup>, qu'une réparation nerveuse par la technique de suture est finalement décrite (Desouches et al., 2005). Il faudra attendre la seconde guerre mondiale pour susciter un vif intérêt des scientifiques quant à la recherche de stratégies de réparation du système nerveux périphérique. Grâce aux avancées technologiques du XX<sup>e</sup> siècle, telles que la myélographie (Murphey and Kirklin, 1973; Murphey et al., 1947), la microscopie chirurgicale (Millesi, 1967), des progrès considérables ont été réalisés. De nos jours, le génie tissulaire utilise des matériaux biologiques ou synthétiques contenant différentes substances ou cellules pour la mise en place de greffons (Biazar et al., 2010b; Nectow et al., 2012). Les résultats obtenus sont certes de plus en plus satisfaisants mais la régénération de lésions nerveuses périphériques reste assez variable d'un individu à un autre.

Aujourd'hui, les LPNs sont essentiellement causées par les accidents de la voie publique, impliquant des véhicules motorisés, des motocyclettes et des piétons (64% des cas). De plus, 7% des dommages de nerfs périphériques sont induits par projectiles d'armes à feu (Noble et al., 1998). Ces lésions affectent essentiellement les nerfs des membres supérieurs découlant de fracture de l'humérus. Les lésions des nerfs au niveau des membres inférieurs sont moins courantes à l'exception de la lésion du nerf sciatique souvent associée aux fractures de la hanche et du bassin. Cependant d'autres événements peuvent en être la cause, comme la résection d'une tumeur, les effets secondaires iatrogènes, différents types

de chirurgie comprenant les interventions orthopédiques et la chirurgie esthétique du visage (Ichihara et al., 2008; Kretschmer et al., 2001). La lésion de nerfs périphériques graves suite à un traumatisme regroupe 5% de toutes les blessures ouvertes principalement causées par les sports ou les accidents de la circulation. En 2003, le rapport mondial des neuropathies périphériques prévoyait pour 2015 plus de 1,5 milliard de personnes souffrant de lésions nerveuses périphériques aux États-Unis, en Europe et au Japon. Ceci s'explique par les complications liées au diabète, au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), et aux traitements de chimiothérapies ou radiothérapies.

Suite à une LPN, on retrouve souvent des problèmes sensoriels aigus qui se caractérisent par la perte de la sensation et de la douleur. Sur le long terme, des problèmes chroniques peuvent se développer, notamment la désensibilisation de la zone lésée, hyperalgésie, connue comme une exagération de la douleur pour des stimuli donnés, ou l'allodynie, qui est décrite comme une douleur causée par des stimuli anodins (Richner et al., 2011). Elles engendrent aussi une faiblesse musculaire accompagnée de spasmes. Les cas les plus sévères peuvent présenter une paralysie.

## **II. Anatomie fonctionnelle du système nerveux périphérique**

### **II. 1. Le système nerveux périphérique**

Le PNS comprend les voies nerveuses situées en dehors du CNS afin d'établir une liaison physique entre la moelle épinière et les récepteurs sensoriels ou les effecteurs physiologiques se trouvant en périphérie de l'organisme. De ce fait, le PNS se subdivise en deux parties distinctes somatique et autonome (**Figure 1**).

#### **II. 1. A. Le système nerveux périphérique somatique**

Le PNS somatique se définit par une voie sensitive ou afférente et d'une voie motrice dite efférente. Il est sous le contrôle de la volonté. Les fibres somatiques sensibles et motrices innervent directement leurs cibles. Son rôle est d'acquérir et transmettre les informations données par l'environnement à partir des récepteurs sensoriels, retrouvés essentiellement à la surface du corps mais situés majoritairement au niveau des mains et

des pieds. Ces récepteurs sont des structures spécialisées dans la réception d'informations (Tortora and Grabowski, 2002). La sensibilité somatique se compose de quatre modalités :

- Le touché discriminatif : reconnaît la texture, taille et la forme des objets
- La proprioception : reconnaît un mouvement, la position du corps, le tonus
- La nociception : perçu sous forme de douleur ou démangeaison
- La sensation thermique : reconnaît la chaleur ou le froid

Ces modalités perçues par les récepteurs sont véhiculées par voie afférente jusqu'aux ganglions sensoriels. Ces ganglions sont localisés de façon adjacente à la moelle épinière ou au tronc cérébral appelés respectivement ganglions de la racine dorsale (DRG) ou ganglions des nerfs crâniens (Kandel and Schwartz, 2013). Les DRGs sont aussi le lieu où les fibres sensibles font synapse (Zaborszky et al., 2006).

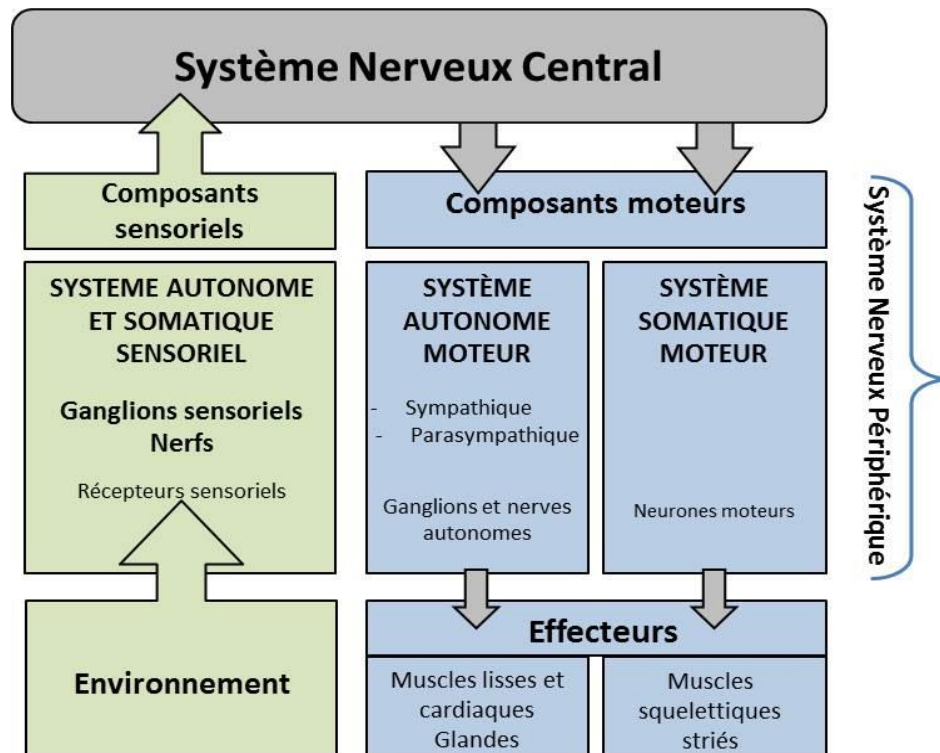
Le PNS somatique par voie motrice, aussi appelé « volontaire » permet à l'organisme de répondre aux sensations, précédemment évoquées, par le mouvement. L'influx nerveux généré par le CNS au niveau de la moelle épinière et du tronc cérébral est transmis *via* les neurones moteurs du PNS aux muscles squelettiques par jonctions neuromusculaires (Tortora and Grabowski, 2002).

### **II. 1. B. Le système nerveux périphérique autonome**

Le PNS autonome à l'inverse du PNS somatique est défini comme le système involontaire. Il possède ses propres récepteurs sensoriels autonomes. Cette partie contrôle principalement les fonctions des viscères *via* l'activité des muscles lisses et cardiaques, mais aussi l'activité des glandes et du tissu adipeux (Fitzgerald, 1996). Le PNS autonome, lui-même se subdivise en deux parties aux actions habituellement antagonistes : sympathique et parasympathique.

La partie sympathique prépare le corps à l'action. En effet, il se met en place lorsque notre organisme doit s'adapter à un changement de rythme. Certaines composantes sont alors stimulées et excitées comme le rythme cardiaque et la tension artérielle tout en inhibant la digestion pour rétablir l'homéostasie corporelle. Les fibres autonomes sympathiques forment des rameaux communicants blanc et gris à travers les synapses des ganglions de la chaîne sympathique.

A l'inverse, la partie parasympathique s'appuie sur un contrôle précis de l'activité corporelle en régulant les activités de repos et de digestion. Il stimule ainsi la digestion et diminue la fréquence cardiaque et la tension artérielle. Les fibres autonomes parasympathiques font synapses dans les ganglions dispersés dans la paroi des organes viscéraux (Blumenfeld, 2010).



**Figure 1 : Diagramme des composantes du système nerveux et de leurs relations fonctionnelles (Purves, 2005)**

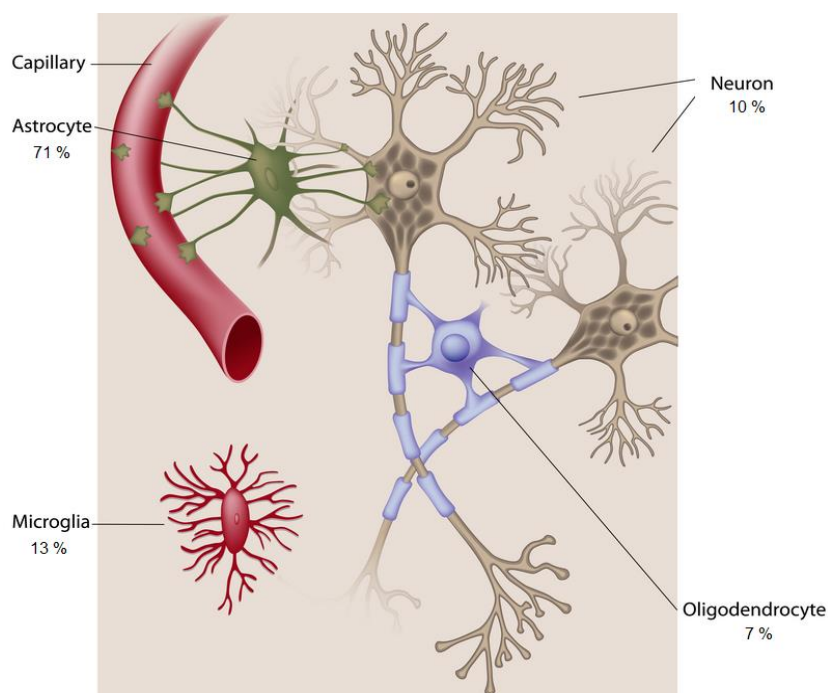
Afin que les deux parties du PNS puissent fonctionner en toute synergie et dans les meilleures conditions, ce système s'appuie sur la coopération de plusieurs cellules spécialisées dont les neurones et les cellules gliales.

## II. 2. Les cellules du système nerveux

Les fonctions du tissu nerveux, hautement hiérarchisé, sont assurées par un réseau dense de cellules en interrelation que sont les neurones, les différenciant des cellules de soutien appelées cellules gliales. Ces dernières, en plus de leur fonction de soutien, sembleraient jouer un rôle actif dans le contrôle et le traitement de l'information nerveuse



(Koizumi and Fujishita, 2007; Ou et al., 2014; Vesce et al., 2001). Ces cellules retrouvées en quantité considérable possèdent des identités morphologiques, moléculaires et des activités physiologiques bien plus diversifiées que dans tout autre type de tissu. La population cellulaire nerveuse contient les neurones ( $\approx 10\%$ ) et les cellules gliales ( $\approx 90\%$ ). L'espèce humaine contient approximativement 100 milliards de neurones et environ dix fois plus de cellules gliales (Azevedo et al., 2009; Herculano-Houzel, 2009). Dans la famille des cellules gliales, on retrouve les cellules microgliales ( $\approx 13\%$ ), puis les cellules macrogliales, contenant les Astrocytes ( $\approx 71\%$ ) et les Oligodendrocytes ( $\approx 7\%$ ). Les cellules gliales du PNS sont appelées cellules de Schwann.

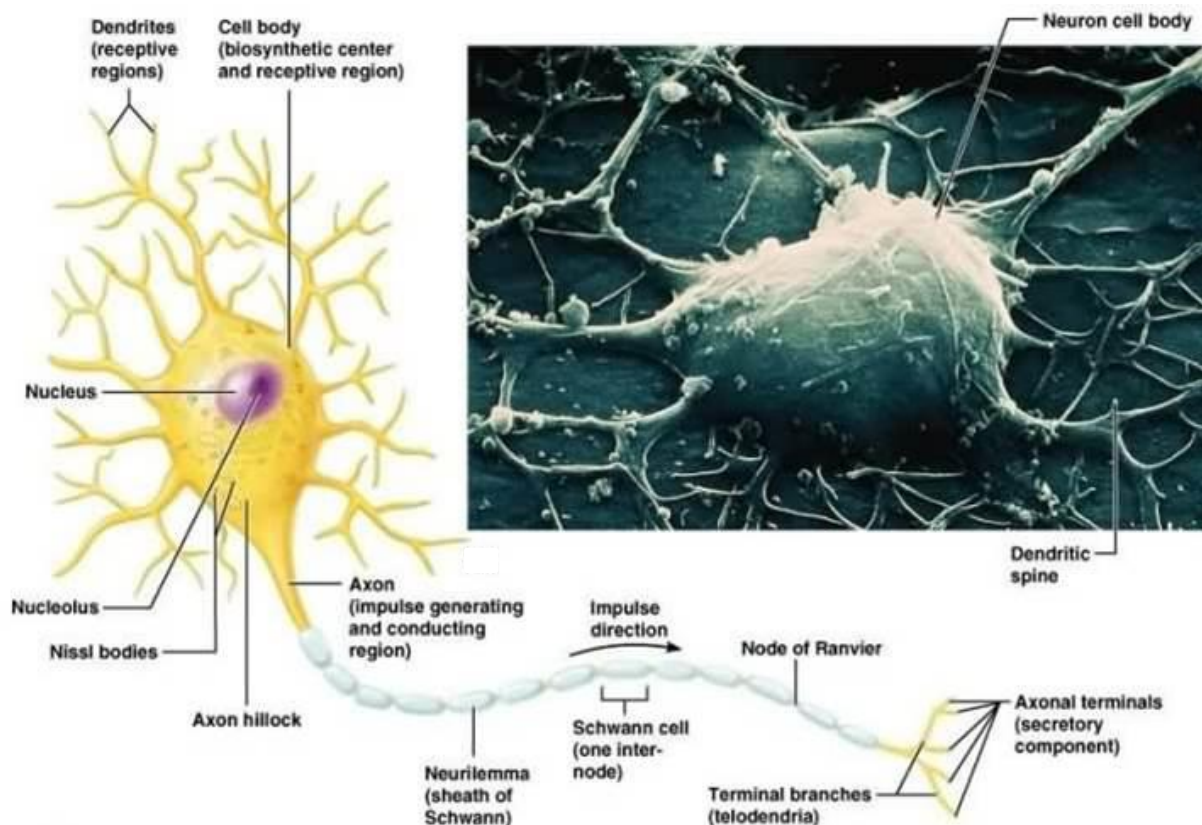


**Figure 2 : Les cellules neurales (Biosciences, n.d.; Verkhratsky and Butt, 2007)**

### II. 2. A. Les neurones

Les neurones qui sont des cellules hautement différenciées et spécialisées dans la communication intercellulaire, représentent l'unité fonctionnelle et structurale du système nerveux. Ils reçoivent, traitent, transmettent les informations codées sous forme de messages chimiques ou électriques. Le neurone est la seule cellule de l'organisme qui possède une longévité extrême. En effet, en raison de leur spécialisation poussée, le noyau de ces cellules est dépourvu de fuseau mitotique et ne peuvent donc se diviser. La taille d'un neurone varie de quelques microns à 2 mètres. En général, leur structure se décompose en quatre parties distinctes (**Figure 3**) :

- Terminaisons axonales : transmission des messages neuronaux vers la cellule
- Axone : structure conductrice pour la transmission des messages
- Corps cellulaire : intégration du message nerveux et centre de biosynthèse
- Dendrites : prolongements récepteurs des signaux périphériques



**Figure 3 : Structure anatomique générale et observation au MEB (x5000) d'un neurone (Marieb, 2006)**

La biosynthèse des constituants cellulaires s'effectue dans le noyau localisé dans le **corps cellulaire**, nommé aussi *péricaryon*. Le corps cellulaire est localisé dans le CNS ou dans les ganglions du PNS, protégé des agressions mécaniques par les vertèbres et la boîte crânienne. Le diamètre du corps cellulaire varie de 5 à 50  $\mu\text{m}$  (Kandel and Schwartz, 2013). Le cytoplasme du corps cellulaire contient les organites communs à toutes les cellules à l'exception des centrioles (nécessaire à la mitose). Néanmoins, certains organites tels que le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi sont plus importants que dans les autres cellules. Effectivement, l'activité métabolique intense due à la vitesse de transmission et d'intégration des messages nerveux, demande un développement plus important de ces structures. De plus, ces organites fournissent les matériaux nécessaires aux différents

prolongements responsables de la réception d'informations et à la régénérescence des axones du PNS lésés.

Les **dendrites**, habituellement multiples et souvent courtes sont définies comme les parties réceptives conduisant l'information au corps cellulaire. Ces prolongements se finissent en arborisation par de nombreuses ramifications appelées épines dendritiques et forment une synapse avec le neurone voisin. La plupart ne sont pas myélinisées mais leur cytoplasme contient de nombreux mitochondries et réticulums endoplasmiques.

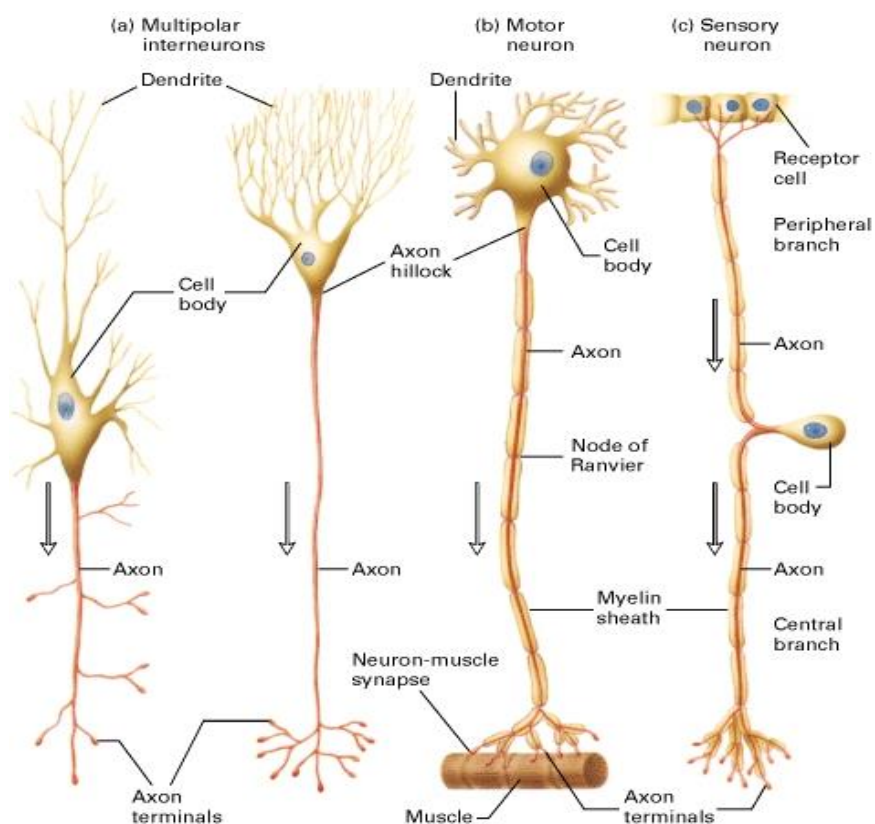
Le neurone contient un unique **axone** dont la longueur varie du micron au mètre. Son diamètre est compris entre 0,5  $\mu\text{m}$  et 20  $\mu\text{m}$ . Les organites trouvés dans l'axone comme les mitochondries, microtubules et neurofibrilles baignent dans l'axoplasme délimité par l'axolemme (membrane plasmique). Aucune protéine n'est synthétisée dans l'axone, c'est pourquoi il est dépourvu de réticulum endoplasmique. L'axone, de par sa taille, se compose d'un cytosquelette très développé en neurofilaments, filaments d'actines et microtubules afin de faciliter le transport axoplasmique pour l'apport suffisant en nutriments, protéines, matériaux biologiques de structure et oxygène. Effectivement, le transport s'effectue de façon rétrograde ou antérograde pour le recyclage des organelles ou alors des composantes de l'axolemme. Le transport des molécules avoisinent les 10 à 40 cm par jour (Twiss and Minnen, 2006). De plus, les axones peuvent être myélinisés par une gaine de myéline qui électriquement les isole et augmente la vitesse de propagation de l'influx nerveux. Cette gaine entoure l'axolemme qui est constitué d'un nombre important de canaux voltage dépendant qui permettent la propagation du potentiel d'action jusqu'à l'extrémité axonale. La partie distale de l'axone se ramifie en fin de prolongement pour former les télodendrons aussi appelés terminaisons axonales.

Les **terminaisons axonales** interviennent principalement dans la communication cellulaire. En effet, ces terminaisons sont composées de boutons terminaux contenant les vésicules synaptiques. Ces structures renferment les neurotransmetteurs qui influencent l'activité des autres cellules par leurs libérations.

Les neurones se différencient par leur structure ou fonction (**Figure 4**). Trois types de morphologies existent : les neurones multipolaires, bipolaires et unipolaires. Ils se différencient sur le nombre de prolongements cytoplasmiques. Le neurone multipolaire est

celui qui possède plus de 2 prolongements. Il fait le lien entre les neurones voisins. Par ailleurs, les organes sensoriels comme la rétine ou la muqueuse olfactive utilisent des cellules réceptives appelées les neurones bipolaires. Ces neurones possèdent un axone puis une dendrite. Finalement, le neurone unipolaire ne possède qu'un prolongement du fait que l'axone et la dendrite ont fusionné pendant le développement embryonnaire formant un T.

Enfin, les neurones peuvent être classés suivant leurs fonctions. Certains sont considérés comme des neurones sensoriels ou alors des neurones moteurs. Les neurones sensoriels forment la voie de signalisation afférente, l'information se propageant depuis les terminaisons nerveuses périphériques vers le CNS. A l'inverse, les nerfs moteurs constituent la voie efférente véhiculant l'information à partir du cerveau vers les muscles et les glandes de signalisation (Kandel and Schwartz, 2013). D'autres neurones, les inter-neurones servent de système de liaison entre les deux types de neurones cités ci-dessus. Ils représentent 99% des neurones du corps humain et sont essentiellement multipolaires. Les corps cellulaires des neurones sensoriels sont situés dans la racine dorsale, tandis que les corps cellulaires des nerfs moteurs périphériques sont situés dans la corne ventrale de la moelle épinière.



**Figure 4 : Représentation des classes de neurones fonctionnels (Lodish et al., 2000)**

### II. 2. B. *Les cônes de croissance nerveux*

La croissance des axones est assez bien documentée dans la littérature. A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, Santiago Ramon y Cajal soumet l'hypothèse que les axones sont dirigés grâce à une distribution gradée de biomolécules dérivées de leurs cibles (Cajal, 1991). Ce phénomène de guidage appelé chimiotropisme s'est avéré véridique pour l'orientation des prolongements nerveux. La terminaison axonale du neurone en croissance se définit par une structure élargie sous forme de pics ou d'épines, aujourd'hui connue sous le nom de cônes de croissance (Fuhs et al., 2013). Les extrémités de ces cônes sont des filopodes qui s'étendent et se rétractent sous l'influence de l'environnement. Ils se composent essentiellement de molécules du cytosquelette mais aussi de protéines membranaires spécialisées dans l'adhésion et l'exploration de l'environnement. En effet, ces structures possèdent des récepteurs spécifiques qui induisent une croissance significative lorsque les molécules de guidage s'y lient (Claudepierre et al., 2008). Lorsque le cône de croissance rencontre un environnement défavorable, il aura tendance à se rétracter à défaut de trouver un environnement plus permissif afin de s'orienter vers ce dernier. Quatre mécanismes guident les cônes de croissance : l'attraction médiée par le contact, la chimioattraction, la répulsion médiée par le contact et enfin la chimiorépulsion.

### II. 2. C. *Les cellules gliales*

Les cellules gliales sont retrouvées à la fois dans le CNS et le PNS. Ces cellules ont été découvertes vers 1850 par un groupe de scientifiques, Rudolf Virchow, Theodor Schwann et Robert Remak (Ndubaku and de Bellard, 2008). Elles sont indissociables des neurones pour la bonne transmission des messages nerveux. En plus de leur rôle de soutien, il a été récemment démontré que les cellules gliales interviennent dans la prolifération et la migration cellulaire, la survie neuronale, la croissance, le guidage axonal et la régénérescence du PNS (Kofuji et al., 2014). En effet, ces cellules sécrètent des facteurs de croissance ou neurotrophines pour la régulation de l'activité nerveuse (Haydon, 2001; Verkhratsky and Butt, 2007). Nous présenterons par la suite les 5 types de cellules gliales contenues dans le CNS (astrocytes, oligodendrocytes, microglies : **Figure 4**) et le PNS (cellules de Schwann et cellules satellites : **Figure 5**).

Les **astrocytes** sont les cellules gliales les plus abondantes au niveau du CNS. Les nombreux prolongements cytoplasmiques partant du corps cellulaire leurs confèrent une

forme en étoile. Ces cellules multifonctionnelles sont retrouvées près des synapses et des capillaires sanguins. Effectivement, les astrocytes font le lien entre les vaisseaux sanguins et les neurones formant ainsi une barrière hémato-spinale ou encéphalique pour l'apport de nutriments tels que le glucose et le lactate (Volterra and Meldolesi, 2005). D'autre part, elles contrôlent l'équilibre ionique près des synapses grâce à ces canaux ioniques ce qui leur permet aussi de communiquer entre elles à l'aide de flux calciques avec libération d'ATP. De plus, les astrocytes sélectionnent ou atténuent la transmission de l'influx nerveux en capturant des neurotransmetteurs de la fente synaptique (Araque et al., 1999). Finalement, elles interviennent dans la réponse immunitaire en présentant l'antigène aux cellules immunocompétentes (Dong and Benveniste, 2001) et prolifèrent au niveau des lésions pour la cicatrisation du tissu nerveux (Silver and Miller, 2004).

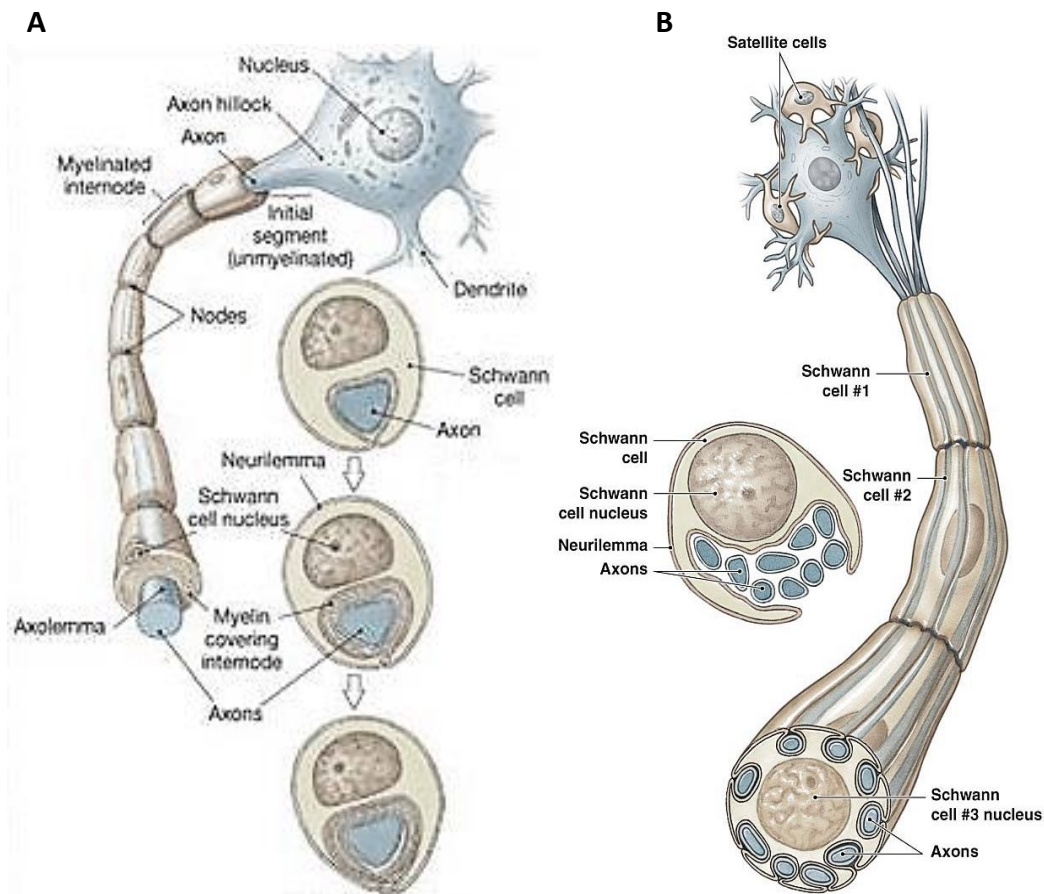
Les cellules myélinisantes du CNS sont appelées **oligodendrocytes**. Elles ont la capacité de former une gaine de myéline (revêtement radial grasseux) qui entoure l'axone grâce à leurs ramifications. L'oligodendrocyte peut ainsi myéliniser autant d'axones qu'il possède de prolongements (15 axones en moyenne). La myéline isole les canaux ioniques des axones afin d'accélérer la propagation du potentiel d'action par le phénomène de conduction saltatoire. Les régions « nues » de l'axone entre chaque gaine de myéline est nommé nœud de Ranvier. De plus, ce type de cellule intervient dans la communication cellulaire sécrétant divers types de facteurs de croissance permettant la survie ou l'activation de neurones voisins (Verkhatsky and Butt, 2007; Wilkins et al., 2003).

La barrière hématoencéphalique et spinale bloquent le passage d'un grand nombre des cellules de l'immunité. Le CNS contient ces propres cellules immunitaires appelées les **microglies**. De petite taille, ces cellules d'origine mésenchymateuse contrôlent et éliminent les débris ou microorganismes par phagocytose. Les microglies possèdent des récepteurs membranaires qui les activent suite à la liaison de neurotransmetteurs pour migrer et proliférer sur le site d'intérêt. Elles présentent les différents antigènes trouvés et sécrètent certaines molécules de l'inflammation comme les cytokines (Gehrmann et al., 1993). Récemment, les recherches scientifiques essaient de prouver qu'elles interviennent aussi dans l'activité neuronale, la mort cellulaire programmée, et dans la fente Synaptique (Gehrmann et al., 1993; Salter and Beggs, 2014)

Les cellules dites **satellites** sont agglutinées autour des corps cellulaires des neurones (**Figure 5**) présents au niveau des ganglions rachidiens et végétatifs. Elles correspondent aux analogues périphériques des astrocytes retrouvés dans le CNS. Ce type de cellules intervient dans le support structural et métabolique des neurones. Toutefois, en entourant le corps cellulaire de l'unité fonctionnelle du système nerveux, les cellules satellites protègent le neurone des tissus voisins.

Enfin, le système nerveux périphérique se compose essentiellement de **cellules de Schwann**. Leur principale fonction est la formation de myéline autour de l'axone des neurones, comme le font les oligodendrocytes dans le CNS. Néanmoins, tous les axones du PNS ne sont pas coulés à la gaine de myéline; c'est pourquoi on différencie les cellules de Schwann myélinisantes et amyélinisantes (**Figure 5**). Cette propriété repose sur le calibre de l'axone. Lorsque le diamètre de l'axone est important, la cellule de Schwann formera une gaine de myéline autour de celui-ci, alors que pour les petits diamètres, cette cellule isolera plusieurs axones de différents neurones par son cytoplasme (Kidd et al., 2013). A la différence des oligodendrocytes, les cellules de Schwann myélinisantes n'entourent qu'un seul segment de l'axone et se succèdent les unes aux autres afin de recouvrir toute l'étendue axonale. La myéline est composée de 70% de lipides et 30% de protéines, avec une forte concentration en cholestérol et en phospholipides, qui s'enroule autour de l'axone formant la gaine de myéline. Comme décrit précédemment, la gaine de myéline est dépourvue de canaux ioniques ce qui en fait un parfait isolant électrique. La génération d'une telle gaine isoélectrique accroît considérablement la vitesse de propagation du potentiel d'action par conduction saltatoire à travers les Nœuds de Ranvier. Ce type de conduction permet d'augmenter la vitesse de propagation jusqu'à un facteur 100 (Oguievetskaia et al., 2005).

Les cellules non myélinisantes enveloppent les fibres de Remak présentant les axones non myélinisés afin de les protéger mécaniquement et électriquement les uns des autres (**Figure 5**). Le nombre d'axones contenus dans le cytoplasme d'une de ces cellules de Schwann diffère selon la région de la fibre mais aussi de la fonction de cette dernière. En outre, les cellules de Schwann interviennent dans la synthèse de facteurs trophiques, régulation de l'environnement extracellulaire, maturation et régénérescence des nerfs (Hopkins and Bunge, 1991; Kidd et al., 2013; Oguievetskaia et al., 2005).



**Figure 5 : Cellules gliales du système nerveux périphérique (Marieb, 2006)**

(A) Les cellules de Schwann myélinisantes recouvrent un unique axone alors que (B) les amyélinisantes recouvrent plusieurs axones de plus faibles diamètres.

### II. 3. Fonctionnement du système nerveux

La transmission du message nerveux s'effectue par la propagation d'un signal électrique le long de l'axone et se transfère d'un neurone à un autre ou alors d'un neurone à une cellule cible *via* l'intermédiaire de synapses. Ces synapses peuvent être d'origine électrique ou chimique et sont parfois spécialisées selon le tissu concerné, comme le cas de la jonction neuromusculaire.

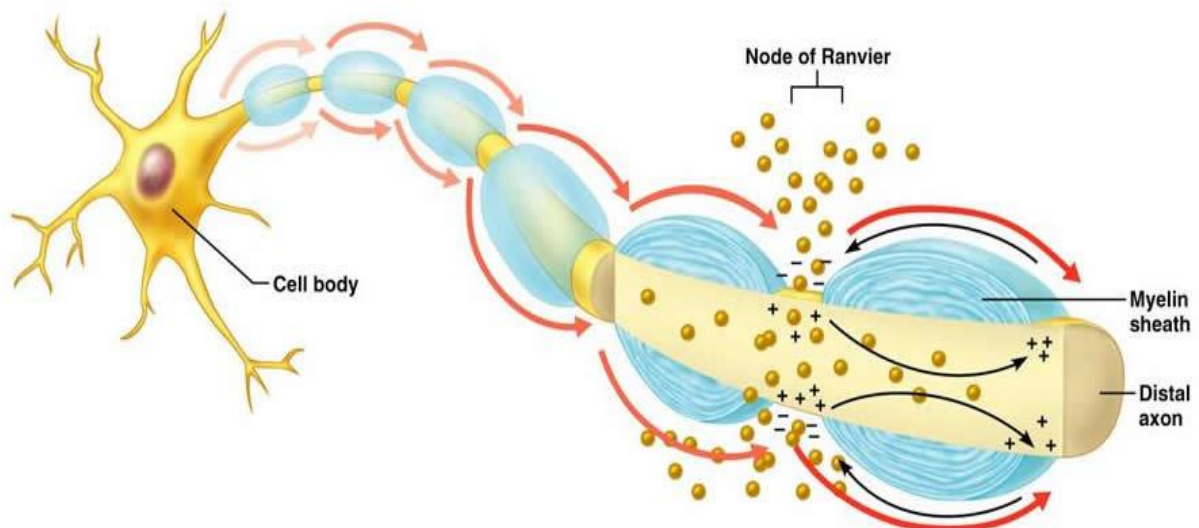
#### II. 3. A. La propagation du potentiel d'action

La communication neuronale se fait par la transmission d'influx nerveux électriques. Ce phénomène électrophysiologique fait suite à un stimulus externe. La membrane plasmique d'un neurone est définie par un potentiel de repos d'environ -70 mV (Marieb, 2006). Ce potentiel électrique résulte de la différence de charge entre le milieu



extracellulaire et intracellulaire. En effet, le côté extracellulaire est chargé positivement alors que le côté cytoplasmique, lui, est chargé négativement. Cette différence de charge est maintenue par des pompes membranaires et d'une perméabilité sélective de certains ions au niveau de la membrane plasmique. Lors d'un stimulus externe, une entrée massive d'ions positifs dans le cytoplasme se produit suite aux changements de conformation des canaux membranaires  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  voltage dépendant. Le changement des concentrations ioniques entre la bicouche lipidique dépolarise la membrane du neurone à + 30mV et engendre le potentiel d'action (Purves, 2005).

L'inversion du potentiel de membrane va alors permettre le changement de conformation des canaux voltage dépendant adjacents. Ce processus se poursuit de façon autonome le long de l'axone ce qui permet la propagation du potentiel d'action (**Figure 6**). Cette propagation ne se fait qu'à sens unique dû au besoin d'une période réfractaire pendant et après l'ouverture des canaux qui inhibent leurs réactivations immédiates. Dans le cas des axones myélinisés, seuls les canaux retrouvés au niveau des nœuds de Ranvier seront activés, les autres étant isolés par la gaine de myéline. La dépolarisation successive de ces nœuds (conduction saltatoire) augmente ainsi la vitesse de propagation à défaut des axones amyélinisés où cela est inexistant.



**Figure 6 : Représentation schématique de la conduction saltatoire présente chez les axones myélinisés. (Marieb, 2006)**

### II. 3. B. La Synapse

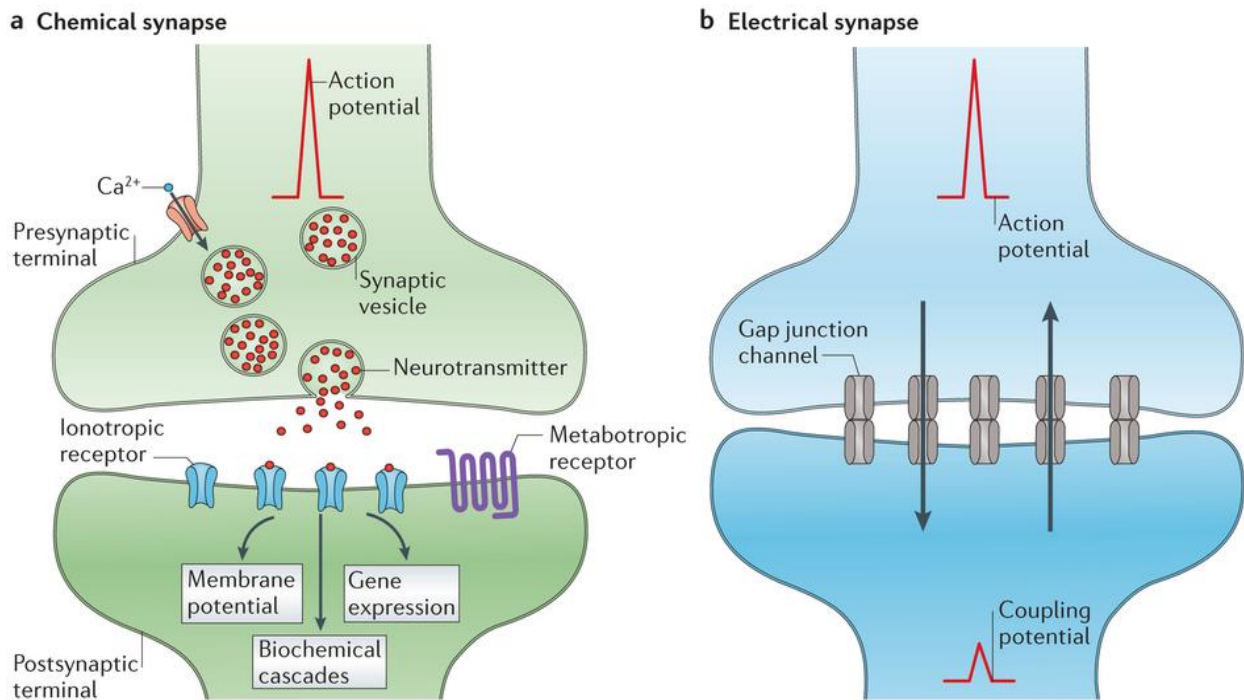
Des contacts physico-chimiques membranaires permettent la transmission d'influx nerveux à travers le réseau complexe neuronal et cellulaire. Trois configurations sont alors possibles. Une cellule réceptrice peut se lier à un neurone ou bien ce dernier effectue un contact avec un autre neurone ou une cellule effectrice. Cette zone de contact fut proposée par le physiologiste Charles Scott Sherrington en 1897 qui lui donna le nom de synapse (Sherrington, 1906). La synapse se fait de façon unidirectionnelle par l'intermédiaire de neurotransmetteurs. On distingue alors trois éléments synaptiques qui participent activement à la transmission des messages nerveux : l'élément présynaptique, la fente synaptique et enfin l'élément postsynaptique.

L'élément présynaptique qui le plus souvent représente la terminaison axonale du neurone, contient des mitochondries (pour l'apport suffisant en énergie), les filaments du cytosquelette (transport des éléments nécessaires à la transmission des informations) puis dans certains des cas, des vésicules synaptiques. Ces vésicules renferment plusieurs types de neurotransmetteurs que sont l'acétylcholine (Tansey, 2006), les catécholamines (Carlsson, 1993), la sérotonine (Twarog and Page, 1953; Whitaker-Azmitia, 1999), la purine (Khakh and Burnstock, 2009), l'Acide Gamma Amino-Butyrique connu sous le nom de GABA (Florey, 1991). La fente synaptique de moins de 30nm est l'espace compris entre la membrane de l'élément présynaptique et postsynaptique. Cette fente baigne dans le liquide interstitiel où s'effectuent les échanges physico-chimiques. L'élément postsynaptique est composé de multiples récepteurs et canaux à la surface de sa membrane pour la réception du message nerveux. L'élément postsynaptique peut être un neurone ou une cellule non neurale. Ces éléments sont retrouvés dans toutes les synapses qu'elles soient électriques ou chimiques (**Figure 7**).

Les synapses électriques sont minoritaires mais tout de même présentes dans l'organisme humain adulte. La transmission de l'information se fait par mouvements ioniques directs et passifs entre l'élément présynaptique et postsynaptique, par l'intermédiaire de canaux membranaires spécialisés, appelés les jonctions communicantes. Au niveau de ces jonctions, les canaux de chaque élément synaptique s'apparient l'un avec l'autre formant un unique pore. Les pores ainsi formés ont un diamètre plus important que les canaux voltage dépendant ce qui permet, en plus des ions, le passage de petites

molécules organiques telles que l'ATP, des métabolites cellulaires (Purves, 2005), directement du cytoplasme d'une cellule au cytoplasme de l'autre. L'arrivée de l'influx nerveux au niveau de l'élément présynaptique, sous forme de courant électrique, est générée par le potentiel d'action. La communication des synapses électriques est bidirectionnelle, les échanges ioniques se font dans les deux sens. L'intérêt de ces synapses est de permettre la synchronisation de l'activité neuronale (synchronisation électrique et couplage métabolique) et de transmettre une information à très haute vitesse de transmission d'un neurone à l'autre.

Le mode de transmission du message nerveux dans les synapses chimiques est indirect. Elles sont bien plus nombreuses que les synapses électriques et utilisent des messagers chimiques appelés neurotransmetteurs, stockés dans des vésicules synaptiques. La dépolarisation membranaire suite à l'arrivée du potentiel d'action, se propageant jusqu'à l'extrémité de l'axone, entraîne l'ouverture des canaux calciques au niveau de la fente synaptique pour favoriser l'entrée d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). L'augmentation soudaine de la concentration calcique à l'intérieur de l'élément présynaptique active la fusion des vésicules synaptiques avec la fente synaptique libérant par exocytose leurs contenus. Les neurotransmetteurs diffusent alors à travers la fente synaptique pour se fixer de manière réversible sur les canaux-récepteurs ou récepteurs couplés à des protéines G de l'élément postsynaptique. La liaison des neurotransmetteurs par leurs récepteurs spécifiques entraîne l'ouverture (parfois la fermeture) de canaux de la membrane postsynaptique. Les échanges ioniques ainsi générés modifient l'excitabilité de la membrane de la cellule cible : ils modifient le potentiel de membrane postsynaptique dans le sens d'un accroissement de l'excitabilité (potentiels postsynaptiques excitateurs) ou d'une diminution de l'excitabilité (potentiels postsynaptiques inhibiteurs) du neurone postsynaptique. Ce phénomène augmente ou diminue la probabilité que l'élément postsynaptique déclenche un potentiel d'action. Un même neurotransmetteur peut provoquer soit une excitation soit une inhibition au niveau postsynaptique selon la nature du canal ionique affecté à la liaison du neurotransmetteur. Ce même neurotransmetteur est soit éliminé ou inactivé par l'action d'enzymes présentes au sein de la fente synaptique ou alors réintégré et recyclé par l'élément présynaptique. Contrairement à la synapse électrique, les messages à travers la synapse chimique sont unidirectionnels.



**Figure 7 : Les deux types de transmissions synaptiques (Pereda, 2014)**

(a) La synapse chimique repose sur un mécanisme moléculaire présynaptique sophistiqué qui régule la libération de neurotransmetteurs. (b) La synapse électrique est médiée par des canaux intercellulaires dites jonctions communicantes qui relient l'intérieur de deux cellules adjacentes.

### II. 3. C. La jonction neuromusculaire

La jonction neuromusculaire est une synapse spécialisée qui relie la terminaison d'un neurone moteur à la fibre musculaire (**Figure 8**). Grâce à cette jonction, la contraction des fibres musculaires est possible. Comme pour les autres synapses, la jonction neuromusculaire est composée d'une terminaison nerveuse présynaptique du motoneurone (recouverte de cellules de Schwann), d'un espace synaptique et de la plaque motrice du myocyte. A la suite d'une stimulation glutamatergique, le potentiel d'action engendré se propage jusqu'à la terminaison axonale du neurone moteur. L'arrivée de ce potentiel d'action entraîne l'exocytose de l'acétylcholine contenue dans les vésicules présynaptiques dans la fente synaptique. L'acétylcholine se fixe par la suite sur les récepteurs cholinergiques nicotiniques situés au niveau de la plaque motrice du myocyte. Lorsque le ligand se fixe sur le récepteur, il y a alors une entrée massive d'ions  $Na^+$  dans le myocyte, qui, lorsqu'elle est suffisante, génère un potentiel d'action déclenchant la contraction musculaire.

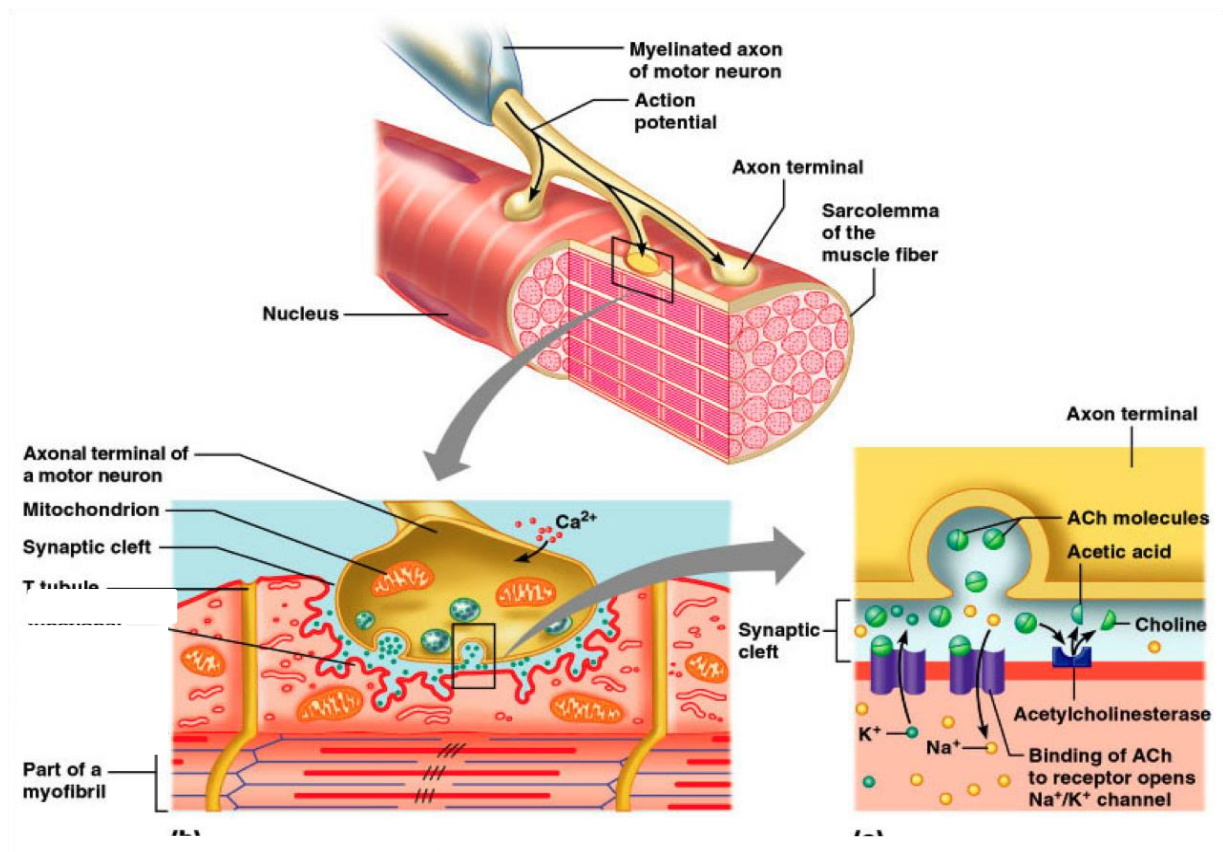
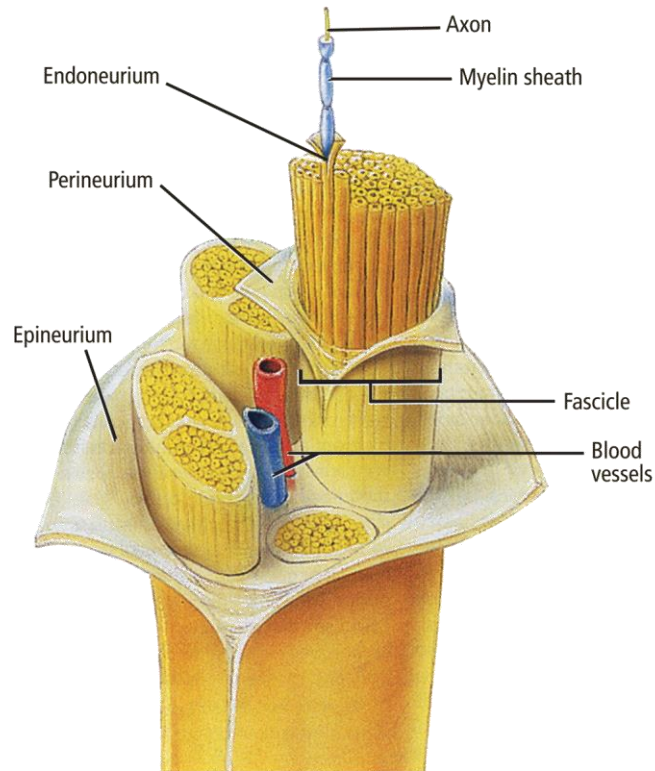


Figure 8: Représentation schématique de la jonction neuromusculaire entre un motoneurone et un myocyte (Marieb, 2006).

## II. 4. Anatomie fonctionnelle des nerfs périphériques

Les fibres nerveuses myélinisées ou amyélinisées du PNS sont regroupées dans les nerfs périphériques. Ils proviennent de la jonction d'une racine postérieure et d'une racine antérieure d'un même segment de la moelle épinière. Chez l'humain, le plus imposant des nerfs spinaux est le nerf sciatique qui s'étend du bassin jusqu'en haut du genou. Les nerfs périphériques peuvent se classer en fonction du type de message nerveux qu'ils véhiculent. Les nerfs sensitifs sont composés de fibres afférentes tandis que les nerfs moteurs contiennent les fibres efférentes. Cependant, la majorité des nerfs du PNS sont capables de transporter les deux types d'informations, on les qualifie donc de nerfs mixtes: 20 à 80% des nerfs périphériques sont composés de tissu conjonctif de soutien (**Figure 9**) : l'endonèvre, le périnèvre, et l'épinèvre (Peltonen et al., 2013).



**Figure 9 : Représentation schématique de la structure du nerf périphérique (Katona, 2010; Marieb, 2006)**

#### **II. 4. A. Endonèvre (Endoneurium)**

Les axones myélinisés ou non sont entourés par l'endonèvre. L'endonèvre est essentiellement synthétisé par les cellules de Schwann et intervient dans la myélinisation des axones. Il est composé de quelques cellules endoneurales, de fibroblastes et de fines microfibrilles de collagène orientées longitudinalement. L'endonèvre et les neurofibres s'associent en une structure nommée fascicule.

#### **II. 4. B. Périnèvre (Perineurium)**

Les fascicules du nerf sont circonscrits par le périnèvre. L'alternance de couches cellulaires périneurales polygonales et de sa matrice extracellulaire, composée de fibres de collagène, de fibronectines et de microfibrilles, lui confère une très grande résistance à l'étirement. De plus, les cellules périneurales sont reliées les unes aux autres par des jonctions intercellulaires serrées (Pummi et al., 2006). Il constitue ainsi la principale barrière de diffusion entre l'endonèvre et le tissu extra-fasciculaire (Shanthaveerappa and Bourne, 1962).

#### **II. 4. C. *Epinèvre (Epineurium)***

L'épinèvre renferme l'ensemble des fascicules nerveux sans vraiment remplir le rôle de barrière mais il contribue aux propriétés mécaniques de résistance du nerf (Peltonen et al., 2013). Ce tissu représente la structure limitante la plus externe du nerf. Afin de supporter les différents tissus cités précédemment, l'épinèvre s'appuie sur un maillage de fibroblastes, de fibrilles de collagène et quelques adipocytes.

#### **II. 4. D. *Vascularisation du nerf périphérique***

Un réseau vasculaire dense et performant irrigue le nerf périphérique à travers ces différents tissus afin d'apporter les sources d'énergies et d'oxygène aux cellules. Le réseau se décompose en deux systèmes longitudinaux, fonctionnellement indépendants : le système extrinsèque et intrinsèque (Reina et al., 2000). Le premier est qualifié de péri-fasciculaire et se compose essentiellement de vaisseaux reliés aux artères et veines extérieures par des branches nourricières. Ces vaisseaux sont souples et spiralés lui conférant ainsi une réserve de longueur au cas où le nerf viendrait à se déplacer. Le système intrinsèque quant à lui, correspond à l'irrigation intra-fasciculaire. Les vaisseaux nourriciers traversant le fascicule se divisent en capillaires ascendants et descendants et s'anastomosent. L'ensemble de ce réseau est en général orientés de façon longitudinale et parallèle à l'axe du nerf.

### **II. 5. Environnement extracellulaire**

L'ensemble des cellules nerveuses du nerf périphérique est enchâssé dans une matrice extracellulaire, qui en plus de générer une barrière physiologique et un soutien mécanique, régule les comportements cellulaires.

#### **II. 5. A. *La matrice extracellulaire***

La matrice extracellulaire est impliquée dans diverses fonctions du tissu nerveux dont une partie de ces éléments est générée par les cellules de Schwann. Deux majeures divisions composent la matrice du nerf périphérique par sa lame basale et sa matrice fibrillaire. Ces deux divisions interviennent dans l'organisation et la morphologie des tissus, la migration des cellules de Schwann et des axones ainsi que la prolifération des cellules de Schwann et la myélinisation axonale. La matrice extracellulaire influe directement sur le guidage des axones en croissance lorsque certaines molécules sont reconnues par les cônes de croissance des terminaisons nerveuses.

La lame basale contient essentiellement des laminines (Timpl et al., 1979) qui peuvent être sécrétées *in vitro* et *in vivo* par les cellules de Schwann (Cornbrooks et al., 1983). Cette glycoprotéine organise la lame basale et favorise l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire. En plus de pouvoir stimuler la croissance des neurites, il a été démontré que la laminine aurait un impact sur la polarisation axonale (Lein et al., 1992).

Une autre glycoprotéine présente dans la matrice est principalement rencontrée sous forme de fibrilles insolubles. Il s'agit de la fibronectine qui s'organise en réseau grâce à la formation de ponts disulfures. Elle contribue à l'élaboration de l'organisation matricielle et à l'attachement de divers types cellulaires.

Finalement, la matrice extracellulaire des nerfs périphériques est essentiellement composée de collagène. Il intervient dans le développement du système nerveux périphérique ainsi que dans le maintien des fonctions normales du nerf adulte. Le collagène favorise l'adhésion cellulaire et, par sa composition et sa morphologie confère à la matrice une certaine élasticité. Les cellules de Schwann et plus particulièrement les fibroblastes synthétisent une large gamme de collagène au niveau de la matrice nerveuse.

Néanmoins, l'habilité de ces protéines multifonctionnelles à stimuler les cônes de croissance varie selon le type de neurone et l'environnement. Par exemple, le collagène de type V peut inhiber la croissance des prolongements nerveux afin de favoriser la migration des cellules de Schwann pour une régénération (Chernousov et al., 2001).

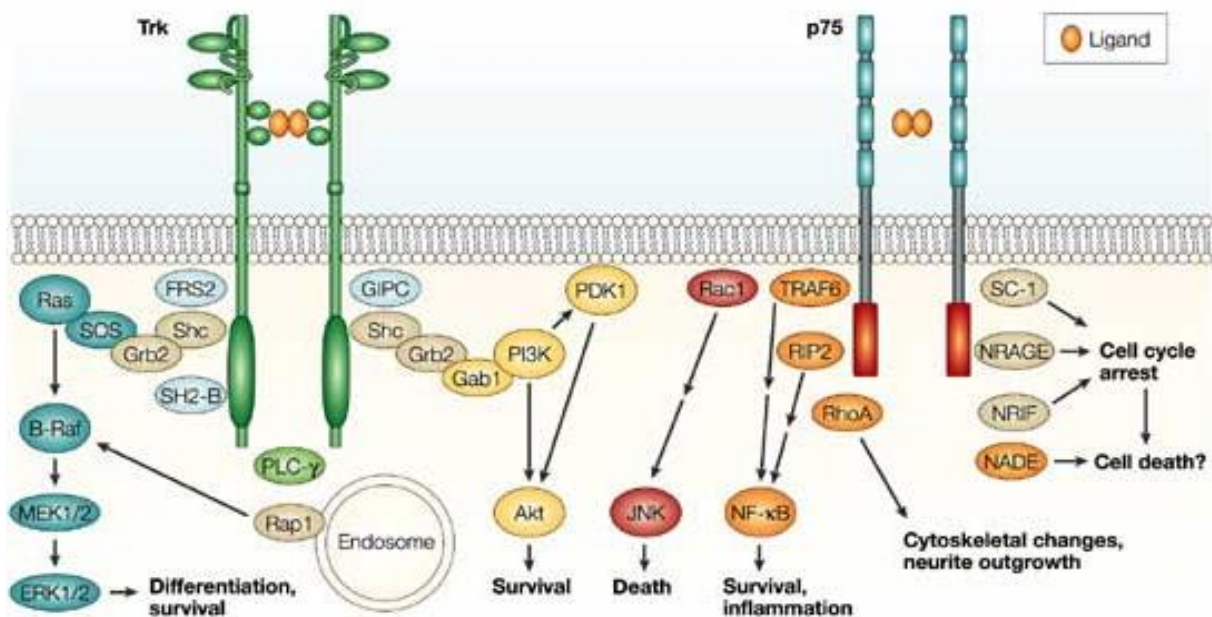
### **II. 5. B. La synthèse des facteurs neurotrophiques**

Le PNS s'appuie tout au long de son développement sur les facteurs neurotrophiques sécrétés par les cellules gliales et les précurseurs ou cellules de Schwann matures. En effet, en plus de synthétiser certains éléments de la matrice extracellulaire, elles génèrent une quantité importante de différents facteurs neurotrophiques qui jouent un rôle dans le développement, le maintien et la régénérescence du PNS. Ces facteurs peuvent se classer en trois familles : les neurotrophines, neurokines et les facteurs de croissance transformants.

Les neurotrophines sont à ce jour les plus étudiées et les plus connues favorisant la croissance des prolongements nerveux (Park and Poo, 2013). La première neurotrophine, le NGF, a été découverte au début des années 50 favorisant la survie et la croissance des



neurones sympathiques et sensoriels (Cohen et al., 1954). Quelques années plus tard, la découverte du Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), purifié à partir de cerveau de porc, propose les mêmes effets que le NGF sur les neurones (Barde et al., 1982). Depuis ces études, trois autres classes importantes de neurotrophines ont été identifiées : la neurotrophine-3 (NT-3), la neurotrophine-4/5 (NT-4/5) et la neurotrophine-6 (NT-6). Ce sont des polypeptides qui se fixent sur les récepteurs transmembranaires  $p75^{\text{NTR}}$  ou des récepteurs à tyrosine kinase de la famille des Trk (Chao, 2003; Reichardt, 2006). L'ensemble de ces facteurs joue un rôle dans la survie neuronale et le relargage de neurotransmetteurs. Cependant, une surexpression des récepteurs  $p75^{\text{NTR}}$  peut être néfaste pour les cellules nerveuses et activer la mort cellulaire programmée des neurones. Contrairement aux récepteurs Trk, qui, lorsqu'ils sont activés, induisent la différenciation neuronale et favorise la survie des neurones.



**Figure 10 : Schéma de la voie de signalisation des neurotrophines suite à l'activation de leurs récepteurs (Chao, 2003)**

Une deuxième famille nommée neurokines sont les cytokines du système nerveux. Elles agissent sur des récepteurs transmembranaires dont les domaines sont communs ou spécifiques. Ces deux dernières décennies, un bon nombre de recherches cliniques a porté sur l'utilisation du Ciliary NeuroTrophic Factor (CNTF) pour la neuroprotection (Monville and

Peschanski, 2001). L'activation du récepteur CNTFR $\alpha$  fait suite à la liaison de son ligand le CNTF et active la voie de signalisation intracellulaire (Monville and Peschanski, 2001; Schuster et al., 2003). L'action physiologique précise du CNTF n'est toujours pas connue, cependant il semble jouer le rôle de facteur de secours de diverses populations neuronales après un traumatisme ou une lésion.

Finalement la troisième famille de facteurs neurotrophiques sont les facteurs de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). L'utilisation de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 ont démontré un effet direct sur les neurones et leur élongation axonale, tout comme leur homologue le GDNF (facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales)(Krieglstein et al., 2002).

Les cellules de Schwann sécrètent un panel abondant de facteurs de croissance neurotrophiques qui permettent la mise en place et la régénération du système nerveux périphérique. Ces cellules sont donc indispensables au bon fonctionnement de ce même système.

### **III. Lésion de nerfs périphériques**

La lésion de nerfs périphériques entraîne souvent une atteinte des fonctions motrices et sensorielles du PNS. On parle alors de neuropathie périphérique responsable de dommages altérant essentiellement la conduction nerveuse.

#### **III. 1. Neuropathies périphériques**

En fonction du type de lésion, du site lésé, et de la profondeur de celui-ci sur les tissus nerveux, les séquelles occasionnées peuvent être plus ou moins handicapantes chez le patient (Campbell, 2008a).

##### **III. 1. A. Généralités**

Les neuropathies peuvent se définir par des atteintes nerveuses (tronculaires) ou des racines spinales (radiculaires) mais également symétriques ou asymétriques. En 1975, une classification des neuropathies a été établie par Thomas (Donaghy et al., 1987).

- Mononeuropathie : atteinte ciblée et focalisée d'un nerf périphérique
- Mononeuropathie multiple : atteinte focalisée touchant plusieurs nerfs périphériques

- Polyneuropathie : atteinte bilatérale et symétrique du PNS.

On distingue aussi les neuronopathies des axonopathies et des ganglionopathies. Les neuropathies affectent l'ensemble du neurone (corps cellulaire et l'axone) alors que les axonopathies affectent localement la partie axonale du neurone. On parle d'atteinte sensitive dans le cas de ganglionopathies, due à la localisation des neurones sensitifs au niveau des DRGs.

### III. 1. B. Classification

En 1943, Seddon définit un système d'évaluation des atteintes pathologiques élémentaires (Birch, 2011). Il distingue trois niveaux de degré d'atteinte des structures nerveuses :

- La **neurapraxie** désigne la sidération nerveuse sans lésion anatomique. Les enveloppes interstitielles et les axones ne sont pas touchés, cependant la conduction est localisée ou transitoire le long du nerf. Dans ces cas, on note souvent une paralysie motrice accompagné d'une fonction sensorielle ou autonome résiduelle. La récupération se fait assez rapidement dans les quelques jours ou semaines.

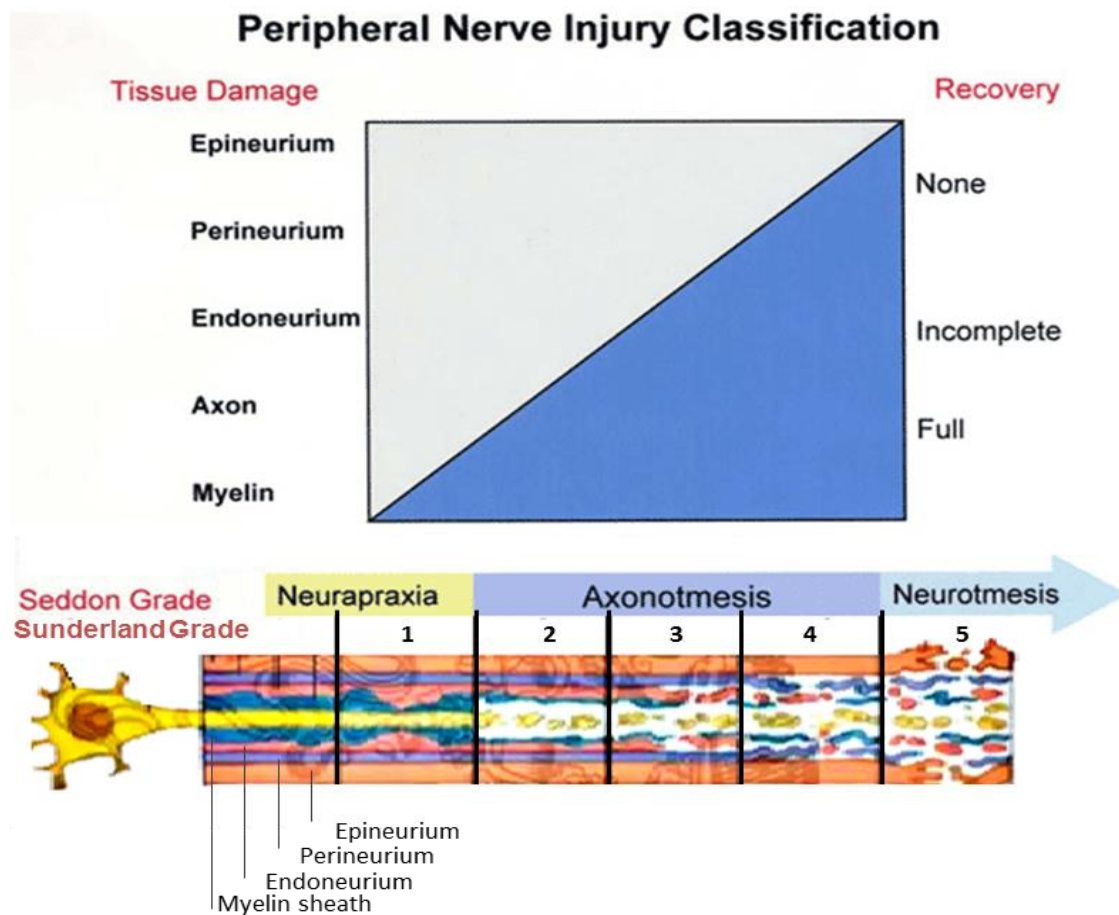
- L'**axonotmésis** indique la rupture des axones sans qu'il y ait interruption des enveloppes schwanniennes et dégradation du tissu endoneural. La perte de conduction est prolongée mais la récupération est le plus souvent complète après des semaines voire quelques mois.

- La **neurotmésis** désigne une interruption de toutes les structures du nerf par section ou rupture complète. Une intervention chirurgicale est la seule alternative capable d'offrir un maximum de probabilité pour la reprise de conduction dans le nerf. Cependant le recouvrement intégral reste peu probable.

Sunderland, 35 ans plus tard, viendra affiner la classification de Seddon en distinguant 5 degrés d'atteintes nerveuses (Birch, 2011).

- **Degré I** équivaut la neurapraxie.
- **Degré II** équivaut l'axonotmésis

- **Degré III** désigne une atteinte de l'axone et de l'enveloppe endoneurale. Cependant les enveloppes périneurales dont les fascicules et les enveloppes épineurales restent intactes.
- **Degré IV** désigne les mêmes ruptures que celles du degré III en plus du périnèvre à l'exception de l'épinèvre qui assure à lui seul la continuité du nerf.
- **Degré V** désigne la rupture totale du nerf ainsi que tous les tissus qui le composent.



**Figure 11 : Classification des lésions nerveuses périphériques de Seddon et Sunderland.**  
D'après l'American Association of Neurological Surgeons. *Neurosurg Focus* (2004)

### III. 2. Neuropathies traumatiques

Plus de la moitié des neuropathies traumatiques affectent les membres inférieurs (dont le nerf péronier) et sont essentiellement dues aux accidents de la voie publique. La lésion de nerfs périphériques est principalement causée par l'élongation, la lacération, la compression ou bien d'autres types de déformation mécanique.

### **III. 2. A. Elongation**

L'étirement important d'un nerf périphérique entraîne souvent une élongation nerveuse. L'élongation représente la neuropathie traumatique la plus fréquemment rencontrée. Les tissus conjonctifs qui composent le nerf présentent une certaine élasticité permettant ainsi l'étirement du nerf sans rupture de sa continuité (Burnett and Zager, 2004). Néanmoins, lorsque la tension est supérieure à sa capacité de résistance, il n'est pas rare de présenter une neurapraxie (Campbell, 2008a). La continuité du nerf n'est pas souvent touchée, excepté le cas d'une élongation importante qui requerra une réparation chirurgicale.

### **III. 2. B. Lacération**

En plus des accidents de la voie publique, les plaies à l'arme blanche provoquent des lacérations nerveuses qui représentent plus de 30% des blessures graves (Burnett and Zager, 2004). Dans la majorité des cas, la continuité du nerf ne tient qu'à quelques lambeaux de tissus pour ce type de lésion. Mais certains cas montrent une lésion complète du nerf périphérique. Les modèles de recherche ayant servi pour l'étude des détails de la dégénérescence nerveuse et la régénération nerveuse font suite à une lacération. Les extrémités nerveuses lésées sont suturées par intervention chirurgicale afin de recréer une continuité nerveuse.

### **III. 2. C. Compression**

La compression est un troisième type, de lésions nerveuses périphériques, fréquemment trouvée. Ces blessures sont dues à la compression du nerf radial ainsi que les neuropathies canalaire. Elles n'entraînent pas de rupture ou déchirure des tissus conjonctifs nerveux. La continuité nerveuse complète est maintenue mais présente une augmentation de la pression en un point précis du segment nerveux. Les symptômes observés vont de la perte de sensibilité temporaire d'une zone cutanée à la perte totale des deux fonctions motrices et sensorielles. La contrainte mécanique sur la membrane conductrice nerveuse semblerait altérer la propagation du potentiel d'action provoquant des symptômes aigus. La littérature souligne deux mécanismes responsables de ce phénomène qui sont la compression mécanique et l'ischémie. Effectivement, la compression d'un nerf, aiguë ou répétée et prolongée peut léser les vaisseaux endoneuraux, avec augmentation de leur perméabilité et constitution d'un œdème endoneural. Cet œdème modifiant l'équilibre

ionique de l'endonèvre et modifiant la micro-circulation fasciculaire entraîne une ischémie nerveuse par augmentation de la pression liquidienne endoneurale (Burnett and Zager, 2004; Mitsingou and Goma, 1993). Etrangement, les fibres myélinisées à gros diamètre semblent être plus sensibles aux effets ischémiques que les fibres amyéliniques qui sont plus à nu avec l'environnement extérieur.

### III. 2. D. *Déformation mécanique*

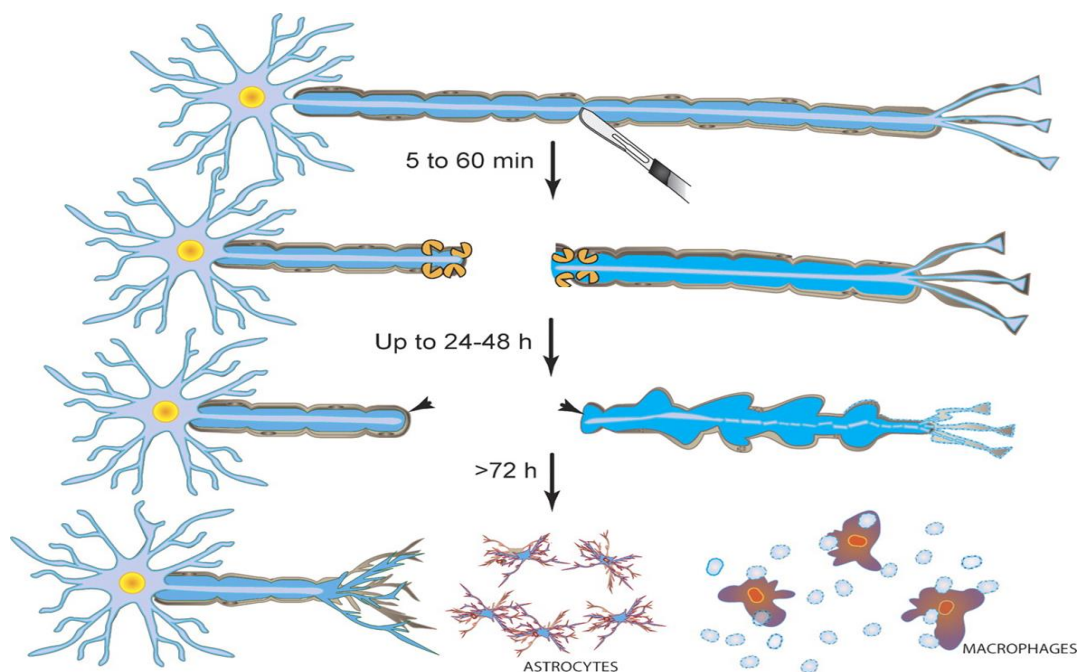
La déformation mécanique du conduit nerveux est suspectée d'être à l'origine des cas de lésions nerveuses les plus graves. La compression retrouvée dans le cas de paralysie de Park entraîne une perte de sensations pendant des semaines accompagnée d'une récupération souvent incomplète. Les expériences impliquant un brassard pneumatique pour mimer ce type de compression ont montré que les nerfs présentaient des modifications dégénératives en périphérie de la zone comprimée. Parallèlement, le centre du conduit où l'ischémie est la plus sévère ne présente pas autant de modifications (Ochoa et al., 1971). Les observations histologiques de la structure nerveuse ont montré que la myéline et les composants de l'axoplasme ont été entraînés vers la périphérie. La déformation mécanique est donc responsable du syndrome compressif lorsque le point de compression est situé en dehors de l'organisme (Ochoa et al., 1972).

### III. 3. **La dégénérescence Wallérienne**

La section ou l'écrasement d'une fibre nerveuse entraîne la dégénérescence de celle-ci. Dans le cas d'une axotomie, la partie distale de l'axone va dégénérer progressivement. Cette dégénérescence se définit par un ensemble de modifications physiologiques et métaboliques au sein de la partie proximale de l'axone et du corps cellulaire du neurone. Ce processus a été étudié pour la première fois par Augustus Volney Waller en 1850 (Waller, 1850a), et porte aujourd'hui son nom : la dégénérescence Wallérienne (Figure 12). Cette dernière est nécessaire pour que la régénération de la fibre nerveuse soit envisageable.

Lorsque le dommage physique est assez important pour léser l'axone, la gaine de myéline, qui nécessite un contact avec l'axone pour maintenir son intégrité, force les cellules de Schwann à se scinder et à rétracter leur gaine. La perte de contact avec l'axone va stimuler et activer les macrophages qui phagocytent les débris de myéline et de fibres en l'espace de 3 à 6 semaines. D'autre part, le manque de contact agit comme un signal

stimulant la prolifération des cellules de Schwann qui migrent vers le site lésé pour former le neuroma. Le neuroma est un pont tissulaire qui tente de rétablir la connexion entre les segments proximaux et distaux. En effet, les cellules de Schwann et fibroblastes s'associent en colonnes nommées bandes de Büngner ou tube de régénération (Büngner, 1890). Ces bandes ont un rôle attractant sur les neurites par la production de nombreux facteurs neurotrophiques. En effet, pendant le processus de dégénérescence, les cellules de Schwann surexpriment des récepteurs de classe II. Ces récepteurs lient les NGF libres au niveau de la matrice extracellulaire afin d'offrir un substrat avec support neurotrophique et un guide chimiotactique pour la repousse de l'axone. D'autres facteurs de croissance que le NGF sont aussi produits afin de favoriser la repousse axonale.



**Figure 12 : Représentation schématique de la dégénérescence Wallérienne (J. T. Wang et al., 2012)**

Dans le cas où le neurone peut survivre au traumatisme et que le site de lésion est assez éloigné du péricaryon, le besoin de renouvellement en matière cellulaire requiert une synthèse d'ARN et protéines plus importante. De ce fait, les organites localisés dans le corps cellulaire sont en suractivité et entraînent l'augmentation de son volume. Ce phénomène se définit par la chromatolyse. Ce cataclysme métabolique se traduit par une surexpression de certains gènes, une synthèse élevée des transcrits et d'un transport accru des protéines

d'intérêts en direction de la partie proximale pour la repousse axonale (Stoll and Müller, 1999).

Cette dégénérescence provoque plusieurs conséquences en amont et aval du neurone concerné. En effet, les changements morphologiques et métaboliques se produisant au niveau du corps cellulaire affectent les neurones présynaptiques en aval du neurone lésé. Les synapses sont rompues et remplacées par des prolongements gliaux (Balice-Gordon and Lichtman, 1994). D'autre part, la partie distale de l'axone n'étant plus liée à sa cible l'affecte. Lorsque la cible est complètement dénervée, elle s'atrophie.

### **III. 4. Régénération naturelle**

Dans l'heure suivant la lésion nerveuse, des bouleversements métaboliques ont lieu à l'intérieur des cellules nerveuses. Effectivement, sa priorité, la transmission de l'influx nerveux devient alors secondaire et laisse place à la fabrication d'éléments structurels nécessaires à leurs régénérations. C'est un processus biologique qui met en place un environnement permissif afin de restaurer l'architecture, le métabolisme et les fonctions du tissu endommagé (Stoll and Müller, 1999). Les régulations génomiques sont aussi bouleversées, notamment pour les gènes impliqués dans la synthèse de protéines retrouvées à la surface des cellules de Schwann et de l'axolemme (Martini, 1994).

La régénérescence commence par une phase de réorganisation neuronale visant à rétablir l'intégrité cellulaire, promouvoir et guider l'allongement des axones en direction de la cible et enfin instaurer une néosynaptogénèse. En amont de l'axotomie, la membrane plasmique va fusionner afin de refermer l'axone. Suite à cela, l'extrémité se structure de façon bourgeonnante ce qui forment les cônes de croissance (voir section II. 2. B. II. 2. B. ). Les filopodes qui composent ces cônes sont des structures à composante sensorielle mais également à composante motrice. Effectivement, la perception de signaux chimiques (molécules sécrétées ou présentes sur la surface des cellules de Schwann) permet un déplacement global entraînant l'élongation de l'axone auquel il est attaché. Les cellules gliales vont sécréter ou présenter différents facteurs neurotrophiques et molécules d'adhésion cellulaire, tels que le NGF, BDNF, IGF (Insulin-like Growth Factor) et la N-CAM (Neural-Cellular Adhesion Molecule) ou GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) respectivement, afin de guider les cônes de croissance. Ces cônes de croissance avancent ainsi de proche en



proche, dépendant des facteurs attractifs ou répulsifs présents au niveau des bandes de Büngner. En effet, lorsque la distance de séparation est courte les cônes entrent dans la brèche et suivent ces bandes jusqu'à atteindre la cible originelle (Fex Svennigsen and Dahlin, 2013). Parallèlement, les cellules gliales qui composent les bandes de Büngner se différencient de nouveau en cellules myélinisantes (lorsqu'elles sont de nouveau en contact avec un axone) sous l'influence des facteurs de transcription Oct-6 et Krox-20 (Bhatheja and Field, 2006). Les fibres nerveuses parviennent ainsi à ré-innover leur cible d'origine retrouvant une certaine fonctionnalité bien qu'il advienne parfois que certains cônes de croissance soient « mal guidés » et l'axone atteint une autre cible que l'originelle (Fawcett and Keynes, 1990; Hou et al., 2008). Toutefois, lorsque le nerf est uniquement écrasé, la régénération s'effectue de façon précise et ré-innove toujours sa cible de départ (Nguyen et al., 2002). L'étape finale de la régénération cellulaire se traduit par une néosynaptogénèse distale afin de substituer le conduit de remplacement créé par les cellules de Schwann, une remyélinisation des axones de gros diamètre et le rétablissement de la transmission de l'influx nerveux à sa cible.

Lors de la formation de bandes de Büngner, les cellules sécrètent aussi des molécules reconnues par les fibroblastes qui à leur tour prolifèrent et migrent vers le site lésé. Quand la brèche est large, le gradient neurotrophique est plus faible, ce qui modère ou limite la régénération. Dans ce cas, les fibroblastes interviennent pour former un tissu conjonctif cicatriciel (Beurden et al., 2006) empêchant la régénération nerveuse et ainsi le retour des fonctions de la cellule cible.

### **III. 5. Dénervation**

Le processus de régénération débute dès la dégénération Wallérienne, donc immédiatement après la lésion. Cependant, la distance de ces nerfs périphériques à travers notre organisme est grande et la partie distale de la lésion peut demeurer sans contact avec les axones pendant une période de temps assez longue. La forme, fonction et viabilité des muscles squelettiques sont dépendantes de leur innervation. Une dénervation prolongée d'au moins 4 semaines, suite à la section des fibres nerveuses, peut avoir de graves conséquences et affecter la régénération nerveuse chez le rat (Sulaiman and Gordon, 2000). Une perte d'innervation après quelques semaines entraîne une perte de masse musculaire à

hauteur de 70 à 85%, *via* la dégradation de protéines cellulaires non utilisées (Fu and Gordon, 1995).

Les cellules de Schwann matures peuvent malgré la perte de contact avec l'axone survivre un certain temps grâce à l'interaction entre la lame basale et les signaux autocrines (IGF, NT-3, BDNF). Ainsi, les axones qui parviennent à régénérer à travers le nerf chroniquement dénervé sont capables d'être myélinisés par les quelques cellules de Schwann survivantes et peuvent retrouver une activité fonctionnelle (Fenrich and Gordon, 2004). La régénération nerveuse devient donc difficile dans le cas d'une dénervation prolongée non pas par une diminution de la capacité des axones à régénérer mais bien par la diminution de la capacité des cellules de Schwann à supporter la régénération.

Une intervention doit être effectuée dans les plus brefs délais après lésion afin de diminuer les délais de réinnervation de la cible. Lorsque ce temps est inférieur à deux mois, les modifications induites au niveau des cellules des muscles squelettiques sont réversibles. Le nombre et la grosseur des fibres reste pratiquement inchangés même si le nerf perd quelques unités motrices (Finkelstein et al., 1993). A l'inverse, un muscle dénervé pendant plus de 6 mois mène à une apoptose croissante des myocytes entraînant une fibrose irréversible. Le muscle perd la majorité de ses repères au niveau des jonctions neuromusculaires (voir section II. 3. C. ) ce qui nuit grandement au retour de l'innervation. Les quantités de cellules responsables de régénérer les fibres musculaires se raréfient et laissent place à une invasion de tissus cicatriciels non contractiles qui ne pourront pas, à leur tour être remplacés (Dedkov et al., 2001).

Le meilleur support à la régénération nerveuse repose sur l'autogreffe d'un deuxième nerf qui indubitablement crée un autre traumatisme neural. Toutefois, d'autres alternatives de réparation issues du génie tissulaire s'avèrent très prometteuses dans le développement de conduits favorisant la régénération nerveuse.

## IV. Stratégies de réparation nerveuse

Toutes les stratégies de réparation n'ont qu'un seul et unique but, permettre aux fibres nerveuses de régénérer afin de permettre la transmission fonctionnelle de l'influx nerveux. Cette régénération passe par la jonction des fibres et leurs cibles respectives afin de rétablir un contact fonctionnel entraînant une récupération sensorimotrice. Plus le temps de dénervation est long, plus les probabilités de réparation nerveuse fonctionnelle sont faibles.

### IV. 1. Les sutures nerveuses

Suite à la lésion d'un nerf, les deux extrémités présentent de part et d'autre une rétraction des tissus. L'existence de rupture intra-tissulaire nerveuse ne peut être écartée lors de contusion simple du nerf. Cependant, en l'absence importante de rétraction tissulaire, les fascicules peuvent être suturés individuellement. Quand la rétraction est importante ou qu'il y a perte de substance, une greffe fasciculaire est alors nécessaire *via* une autogreffe ou allogreffe. La greffe nerveuse est nécessaire quand la distance traumatique est supérieure au centimètre, empêchant la suture directe entre les deux extrémités.

#### IV. 1. A. L'autogreffe et l'allogreffe

L'autogreffe consiste au prélèvement d'un nerf périphérique prélevé chez le patient lui-même. Les premiers essais cliniques datent de 1870 où Phillipeaux et Vulpian testent l'intérêt de greffer des bouts de nerfs optiques sur un même chien (Dellon and Dellon, 1993). L'inconvénient de recourir à une autogreffe est la création d'un deuxième traumatisme nerveux qui pourrait entraîner une perte de fonction au niveau du site donneur. De plus, des déficits supplémentaires pourraient éventuellement apparaître chez le patient dont la formation d'un névrome douloureux au site de prélèvement (Wu and Chiu, 1999). Dans certains cas, il est possible aussi que le calibre du greffon ne soit pas toujours approprié au calibre du nerf lésé (**Tableau 1**).

Grâce aux avancées de la recherche médicale, une alternative possible à l'autogreffe est l'allogreffe. Cette dernière consiste au prélèvement d'un nerf issu d'un autre patient. En effet, les recherches en immunologie ont mis au point d'incroyables méthodes et

traitements afin de limiter les risques de rejet du greffon. Ces méthodes réduisent le pouvoir immunogène du greffon par irradiation, congélation/décongélation successives du greffon (Marmor, 1964). De plus, les traitements immunosuppresseurs administrés en complément au receveur sont de plus en plus efficaces mais réduisent le système immunitaire de ce dernier, le rendant plus fragile.

#### **IV. 1. B. La suture épineurale**

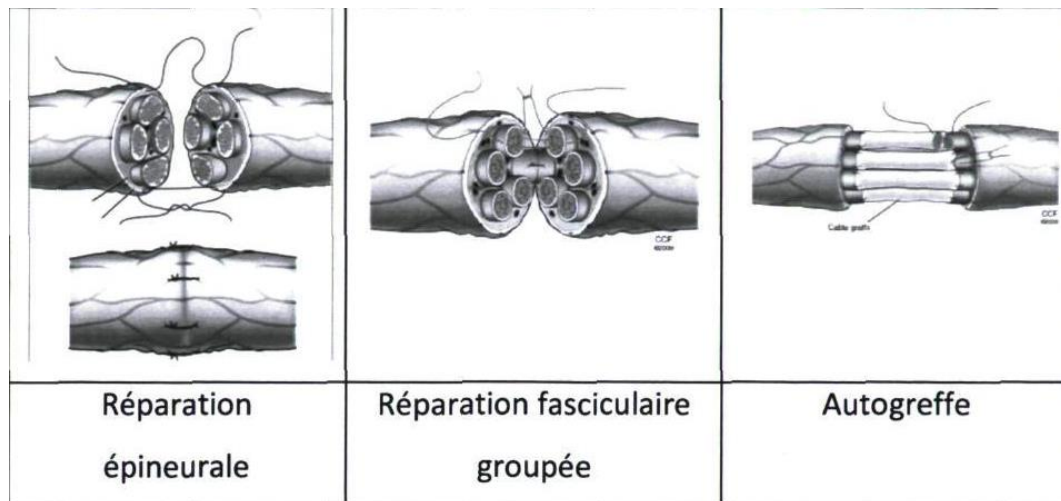
La réparation nerveuse par suture épineurale est la méthode traditionnelle utilisée (**Tableau 1**). Cette dernière s'applique lorsque le nerf contient peu de fascicules et de fibres nerveuses. La suture se fait uniquement entre les deux épinèbres des deux segments libres suite à la lésion dans le cas d'une anastomose. La majorité des patients ayant subi une suture épineurale ne formeront pas de névrome (Wu and Chiu, 1999). Dans les années 80, plusieurs articles comparent les résultats obtenus entre la réparation épineurale et fasciculaire qui ne présenteraient pas vraiment de différences apparentes (Bora, 1978; Levinthal et al., 1977).

#### **IV. 1. C. La suture périneurale**

Contrairement à la suture épineurale, la suture périneurale se fait pour les nerfs à gros diamètre présentant plusieurs fascicules (**Tableau 1**). Il faut cependant veiller à l'homologie des fascicules. En effet, le résultat de régénération et reconstruction sera optimisé si un fascicule sensitif est relié à un autre fascicule sensitif, tout comme un fascicule moteur à son homologue. La régénération d'un axone dans un tube endoneural de même nature est sans conséquence si ce dernier régénère dans un milieu qui lui est familier.

#### **IV. 1. D. La suture latéro-terminale**

Cette méthode de réparation a été utilisée en 1903 où l'extrémité distale du nerf endommagé est suturée à l'extrémité d'un nerf intact (Ballance et al., 1903). A partir des années 90, cette technique fut réintroduite chez le rat puis chez l'homme afin de montrer une repousse axonale à travers le segment distal du nerf endommagé à la jonction neuromusculaire (Lutz et al., 2000; Mennen et al., 2003; Viterbo et al., 1992). Les résultats électrophysiologiques et histologiques relatés dans ces différents articles démontrent le bourgeonnement des axones sensitifs et moteurs non lésés dans l'extrémité distale du nerf apposé.



**Tableau 1 : Les différentes sutures utilisées pour la réparation nerveuse chirurgicale. (Siemionow and Brzezicki, 2009)**

La régénération observée suite aux différentes techniques de sutures lors d'une autogreffe ou d'une allogreffe est variable. Plus le segment lésé est long, plus la distance à parcourir par le neurone pour ré-innover sa cible est importante. De plus, les facteurs physiologiques tels que le sexe, l'âge, le patrimoine génétique du patient auront un impact non négligeable sur la capacité régénérative d'un individu. De nos jours, l'autogreffe reste toujours le traitement de prédilection des sections nerveuses bien que la recherche tente de développer des alternatives afin de surpasser cette technique.

## IV. 2. Greffe de tissus autologues

Depuis quelques années, la médecine régénérative s'oriente vers la greffe de tissus décellularisés autologues afin de pallier les différents inconvénients engendrés par le prélèvement d'un nerf. Parmi les différents types de matériaux biologiques qui ont reçu le plus d'attention des chercheurs, on retrouve les conduits veineux, les muscles squelettiques et les tendons.

### IV. 2. A. Les vaisseaux sanguins

L'idée d'utiliser des conduits nerveux d'origine vasculaire n'est pas nouvelle et a été étudiée dès la fin du 19ème siècle. Les conduits artériels ont d'abord été utilisés par Bünger en 1891 (Konofaos and Ver Halen, 2013). Les quelques travaux sur l'exploration de la repousse nerveuse via la greffe de conduits artériels entre deux segments de nerfs périphériques séparés après lésions ont longtemps été considérés comme peu

encourageants par rapport à la greffe de conduits veineux. Récemment, une étude sur le rongeur comparant la greffe de trois conduits à base de matériaux biologiques (nerf, artère, derme) démontre le potentiel prometteur de l'utilisation d'artère comme conduit biologique (Liao et al., 2013). En effet, la régénération des axones myélinisés et le sauvetage de l'atrophie musculaire, suite à la greffe d'un conduit artériel, induit une réparation nerveuse du même niveau que celui de l'autogreffe nerveuse.

Les conduits veineux ont fait l'objet d'études expérimentales et cliniques plus importantes. La greffe d'un conduit veineux pour réparer un nerf lésé humain a été décrite pour la première fois en 1909 par Wrede (Konofaos and Ver Halen, 2013). En 1990, Chiu et Strauch, décrivent le cas de 15 patients ayant reçu la greffe d'un conduit veineux autologue pour le traitement de neuromes douloureux ou de blessures nerveuses segmentaires de 3cm (Chiu and Strauch, 1990). Cette étude montre la possible utilisation de conduits veineux pour des lésions inférieures à 3 cm comparables à la régénération nerveuse obtenue lors d'autogreffes. Plus tard, une étude clinique pour la réparation du nerf digital à l'aide de conduits veineux enrichis en fragment de nerf ont été utilisés (Tang et al., 1993). Le suivi de l'étude démontre que plus de 65% des patients présentent de bons résultats suite à l'intervention chirurgicale. Deux ans plus tard, il rapporte la même étude utilisant la même méthode sur 16 patients. Les résultats suggèrent que la greffe de conduit veineux avec l'interposition de tissus nerveux dans la lumière du conduit est une alternative fiable pour des distances de lésions comprises entre 2 et 4,5 cm (Tang et al., 1995). Récemment, il a été prouvé que le remplissage de la lumière du conduit veineux par du collagène de type I amplifie la régénération axonale (Choi et al., 2005). Néanmoins, pour les segments de plus de 4 cm, il est observé une constriction de la veine ainsi qu'une cicatrice empêchant la repousse nerveuse.

#### **IV. 2. B. Les muscles**

Les muscles squelettiques se composent d'une lame basale tubulaire similaire à celle des conduits nerveux. Cette lame basale est aussi orientée longitudinalement et contient des composants dans sa matrice extracellulaire, comme le collagène de type IV et de la laminine, qui dirigent et améliorent la régénération des fibres nerveuses (Edgar et al., 1984; Lein et al., 1992, 1991; Lundborg et al., 1994). Chez l'humain, le tissu musculaire est disponible en grande quantité ce qui lui confère un autre avantage. Les premières greffes de tissus

musculaires pour la réparation nerveuse datent des années 40 (Konofaos and Ver Halen, 2013). Les travaux décrivent la présence d'axones myélinisés et fonctionnels dans le greffon mais ne démontrent pas la réinnervation des organes cibles. Les études effectuées chez l'animal suggèrent une régénération nerveuse pour des segments inférieurs à 5 cm chez les grands modèles animaux et 2 cm chez le rat (Konofaos and Ver Halen, 2013). La greffe de conduits à base de tissus musculaire décellularisés sont décrites dans les deux études cliniques de Pereira *et al.* en 1991. La première concerne la greffe de nerfs périphériques chez 10 patients atteints de la lèpre (Pereira et al., 1991b). Suite à la chirurgie, 70% des patients présentent une meilleure perception et amélioration de la sensation du membre atteint. De plus, cette même équipe rapporte 24 cas de réparation du nerf digital par greffe de muscles décellularisés (Pereira et al., 1991a). Le suivi de 6 à 40 mois après leur procédure rapporte de meilleurs résultats par rapport aux patients ayant subi une autogreffe nerveuse. Ces résultats encourageants ne concernaient que de petites lésions.

Néanmoins, l'usage de muscles décellularisés présentent quelques inconvénients. Les fibres nerveuses peuvent croître hors du greffon créant ainsi un neurome en continuité (Meek et al., 2004).

#### IV. 2. C. Les tendons

La greffe de tendon sur le nerf sciatique a été effectuée sur le nerf sciatique du rat. Les tendons peuvent être utilisés comme conduit nerveux pour combler des distances d'un maximum de 1 cm. L'architecture du tendon et la matrice extracellulaire de la queue de rat, disposition longitudinale de faisceaux de collagène, constituent un greffon favorable à la régénération nerveuse (Brandt et al., 1999b). Effectivement, les axones s'alignent sur les fibres de collagène pour la repousse nerveuse. Afin de vérifier la validité du modèle, la greffe nerveuse à partir du tissu tendineux a été comparée à celle à partir de tissu musculaire. Les différents résultats fonctionnels et morphologiques trouvés ne présentent pas de différences significatives (Brandt et al., 1999a). Le tendon peut donc supporter la régénération nerveuse de manière similaire au muscle décellularisé.

D'autres greffons à partir de tendons supplémentés en cellules de Schwann ont été élaborés afin d'améliorer les résultats de régénération nerveuse (Nishiura et al., 2004). Ces essais montrent une accélération de la vitesse de régénération axonale. Cependant après 12

semaines, aucune différence n'était observable entre les greffons tendineux et ceux supplémentés en cellules de Schwann. Les auteurs concluent que le principal avantage de cette technique, est que le tendon représente un matériel biologique abondant avec une perte limitée de la fonction pour la greffe nerveuse.

Depuis ces 30 dernières années, de nouvelles stratégies issues du génie tissulaire sont actuellement étudiées pour assurer le succès de la réparation nerveuse. Elles reposent sur (1) l'addition de facteurs de croissance, (2) de cellules souches et la transplantation des cellules gliales, (3) la thérapie génique, et (4) la conception de conduits directionnels.

### **IV. 3. Thérapie par facteurs de croissance**

Il n'est plus à prouver que les facteurs neurotrophiques sont libérés de manière endogène par le tissu nerveux périphérique suite à une lésion de l'un des nerfs qui le constitue. De ce fait, un bon nombre de facteurs neurotrophiques sont utilisés pour améliorer la régénération de nerf périphérique par génie tissulaire. Parmi eux, on retrouve essentiellement le NGF, GDNF, BDNF, NT-3 et le NT-4/5 dans les dernières publications du domaine.

#### **IV. 3. A. Nerve Growth Factor**

Actuellement, le NGF est le facteur neurotrophique le plus étudié dans le traitement de lésions des nerfs périphériques (Aloe, 2011). En effet, le NGF est présent à de faibles concentrations dans les nerfs sains, mais après une lésion, la concentration en NGF augmente au niveau du site lésé (Saika et al., 1991; Sofroniew et al., 2001). Les cellules de Schwann synthétisent de plus en plus de récepteurs membranaires spécifiques au NGF afin de le présenter aux prolongements axonaux. Il joue un rôle important dans la survie des neurones sensoriels et dans le prolongement des axones. L'ingénierie tissulaire tente de développer différents biomatériaux fonctionnalisés au NGF. En effet, le NGF a été incorporé dans divers types de supports comme des conduits fibreux (C.-Y. Wang et al., 2012), membrane ou microsphères constituées de polymère (Savignat et al., 2008, 2007; Uebersax et al., 2007) ou encore sous forme de gel (Stukel et al., 2014). En associant le NGF à différents supports, le nombre de fibres nerveuses matures augmentent entraînant une récupération fonctionnelle plus importante que les groupes de contrôle. De plus, les vitesses de conduction nerveuse sont aussi améliorées. Effectivement, en présence de NGF les



diamètres des axones retrouvés dans les conduits fonctionnalisés sont plus gros que les conduits nerveux qui ne contiennent pas de NGF (Xu et al., 2011). L'addition de ce facteur de croissance influe sur la prolifération et la migration des cellules de Schwann, qui à leur tour facilitent la régénération axonale (Srinivas Madduri et al., 2010). La liaison de NGF à l'héparine, molécule de haut poids moléculaire, permet de réduire et contrôler sa libération dans le milieu extracellulaire (Wood et al., 2010). Un tel conduit a permis de combler une distance de 13 mm chez le nerf sciatique du rat produisant le même nombre de fibres nerveuses trouvées dans le groupe ayant subi une autogreffe. En revanche, le NGF a peu d'influence sur les neurones moteurs et la croissance de ces neurites (Braun et al., 1996).

#### **IV. 3. B. Bi-fonctionnalisation**

Certains laboratoires intègrent directement plusieurs facteurs de croissance aux systèmes développés afin de préserver et stimuler plusieurs sous-populations de la régénération nerveuse (Srinivas Madduri et al., 2010). En effet, les conduits à bases de collagène ont été fonctionnalisés par le NGF et le GDNF. Les résultats ont révélé une augmentation significative de la migration des cellules de Schwann dans l'extrémité proximale des conduits dans les deux premières semaines de régénération. Par ailleurs, le nombre d'axones et le nombre d'axones myélinisés étaient significativement plus nombreux dans les conduits fonctionnalisés à la fois au NGF et au GDNF. Cette approche est intéressante, à condition de veiller au rapport doses – cellules qui peut devenir toxique pour les cellules du système nerveux périphérique. Le GDNF est un facteur neurotrophique sécrété par les cellules de Schwann, qui est connu pour améliorer la survie des neurones moteurs et sensoriels, la croissance des neurites ainsi que la migration des cellules de Schwann (Airaksinen and Saarma, 2002). Le GDNF améliore également la vitesse de conduction des motoneurons qui suit la régénération (Munson and McMahon, 1997), tout comme celle des neurones sensoriels de petits diamètres (Bennett et al., 1998).

#### **IV. 3. C. Les neurotrophines NT-3**

Suite à une lésion nerveuse, une perfusion continue de NT-3 s'est avérée efficace dans la restauration de la vitesse de conduction des neurones moteurs et sensoriels de manière dose dépendante (Hopkins et al., 2013). L'administration exogène de NT-3 offre un effet trophique sur les fibres musculaires sensorielles, même en l'absence de l'organe cible (Helgren et al., 1997). L'administration exogène de NT-3 restaure la masse musculaire et

améliore la réinnervation des fibres musculaires (Oakley et al., 1997; Sterne et al., 1997b). L'ajout de NT-3 sur des matrices composées de fibronectine greffées dans le nerf sciatique du rat augmente la repousse axonale dès le jour 15. Par ailleurs, les rats présentant les greffons fonctionnalisés contiennent beaucoup plus d'axones myélinisés que les groupes témoins 8 mois après l'acte chirurgical (Sterne et al., 1997a).

#### **IV. 3. D. Les facteurs neurotrophiques**

Plusieurs autres facteurs neurotrophiques, bien que moins couramment utilisés dans les nerfs périphériques, ont également montré une efficacité dans l'amélioration de la régénération de nerfs périphériques. Ces facteurs comprennent le CNTF (Zhang et al., 2004), le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) (Hobson et al., 2000), le facteur inhibiteur de leucémie (LIF) (McKay Hart et al., 2003), et enfin le facteur de croissance à insuline de type insuline I (IGF-I) (Fansa et al., 2002). En général, ces protéines sont soit injectées directement dans la lumière des conduits nerveux, soit noyées au sein d'un conduit à base d'hydrogel qui guide le nerf à travers sa lumière. De plus, la combinaison de deux ou plusieurs facteurs de croissance peut offrir des avantages supplémentaires. Il est clair que la compréhension plus détaillée de la réponse à la dose de facteurs neurotrophiques et leurs combinaisons sur la régénération nerveuse est nécessaire pour des conceptions optimales d'échafaudage.

#### **IV. 3. E. Autres facteurs de croissance non spécifiques**

Toutes les études qui visent à la réparation des nerfs périphériques utilisent des facteurs neurotrophiques typiques. Cependant, certains facteurs de croissance qui n'avaient pas été identifiés dans la différenciation et la régénération des tissus nerveux peuvent se montrer pertinents. En effet, ces facteurs de croissance comprennent des protéines morphogénétiques osseuse 2 (BMP-2) (Wu et al., 2010). L'injection de BMP-2, dans une étude faite chez le rat, permet d'augmenter le nombre et le diamètre des axones par rapport au groupe témoin au bout de 4 semaines. De plus, l'ajout de facteur de croissance des fibroblastes (FGF) permet un retour des fonctions motrices plus rapidement et augmente le potentiel d'action musculaire après lésion du nerf sciatique chez le rat (Walter et al., 1993). Les FGFs sont une famille d'au moins 23 cytokines qui sont impliquées dans la croissance cellulaire et la régénération et sont naturellement sécrétées par le nerf endommagé après une blessure. A ce jour, les mécanismes induits par des facteurs de croissance qui ne sont

pas spécifiques à la régénération du tissu nerveux, tels que les BMP et FGF, n'ont pas largement étudiés.

Bien que les facteurs neurotrophiques aient été incorporés avec succès dans les différents systèmes proposés par l'ingénierie tissulaire pour protéger les neurones de la mort induite et favoriser la régénération, il subsiste toujours quelques inconvénients. Par exemple, la demi-vie de ces protéines est généralement de courte durée (de Boer et al., 2011) et les facteurs de croissance libérés dans le milieu ne sont pas aussi bioactifs (Esaki et al., 2011). La cinétique de libération varie en fonction du système et du facteur utilisé. Les doses doivent encore être optimisées. D'autres stratégies de réparation des nerfs périphériques, qui éliminent les préoccupations concernant l'instabilité du facteur de croissance ou la cinétique de libération de médicaments, comprennent la thérapie à cellules souches.

FC(s)	Méthodes	Nerf	Avantage(s)	Référence(s)
NGF	Nanofibres Microsphères Microgels	Nerf Sciatique du rat	Fibres nerveuses matures Meilleure conduction nerveuse Récupération fonctionnelle	(C.-Y. Wang et al., 2012) (Uebersax et al., 2007) (Stukel et al., 2014)
NGF GDNF	Tubes de collagène	Nerf Sciatique du rat	La régénération des tissus est plus rapide	(Srinivas Madduri et al., 2010)
NT-3	Perfusion Matrice de fibronectine	Nerf Sciatique du rat	Agit sur les neurones sensoriels et moteurs Réinnervation de la cible améliorée	(Hopkins et al., 2013) (Sterne et al., 1997a)
GDNF	Microsphères	Nerf Sciatique du rat	Force musculaire augmentée Meilleure colonisation des tissus	(Kokai et al., 2011)
CNTF	Conduits de silicone	Nerf Sciatique du rat	Diamètre et nombre d'axones augmentés Meilleure conduction nerveuse Potentiel musculaire augmenté	(Zhang et al., 2004)
BMP-2	Injection	Nerf facial du lapin	La densité et l'épaisseur des axones sont plus importantes	(Wu et al., 2010)
IGF-1	Conduits de lame basale musculaire	Nerf Sciatique du rat	Masse musculaire augmentée Régénération plus efficace dans le cas de greffes supplémentées en IGF-1	(Fansa et al., 2002)

**Tableau 2 : Les facteurs de croissance utilisés pour la réparation nerveuse(C.-Y. Wang et al., 2012)**

#### IV. 4. Thérapie à cellules souches

Les cellules souches sont considérées comme le facteur prédominant dans l'ingénierie tissulaire en raison de leur capacité à proliférer, se différencier en de nombreux types cellulaires, et enfin de conserver le potentiel de multi-lignée. Les principales sources de cellules souches utilisées pour la réparation des nerfs périphériques, y compris les cellules souches neurales (NSC), sont les cellules souches mésenchymateuses (CSM), et les cellules souches provenant du tissu adipeux (ADSc).

##### IV. 4. A. Les cellules souches neurales

Les cellules souches neurales ont été isolées en 1992 de l'embryon (Reynolds et al., 1992) et des tissus du système nerveux central adulte (Reynolds and Weiss, 1992). Après isolement, les NCS ont été identifiées comme cellules multipotentes. Ces cellules souches neurales ont été capables de se différencier en neurones *in vivo* et forment des synapses avec les muscles squelettiques cibles, entraînant une diminution de l'atrophie. Dans une étude rapportée, les cellules souches fœtales neuronales implantées dans les lésions de nerfs de rats étaient capables de former des synapses en régénérant le nerf tibial (S. Gu et al., 2010; S. H. Gu et al., 2010). Après 3 mois suivant la blessure, le potentiel d'action musculaire a été détecté uniquement dans le groupe des NSC transplantées. Sur le plan cellulaire, la différenciation de NSCs implantées en neurones a été vérifiée par le marquage à la  $\beta$ 3-tubuline (S. Gu et al., 2010).

##### IV. 4. B. Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches sécrètent des substances nécessaires à la matrice extracellulaire au niveau du site lésé, mais elles ont aussi la capacité de se différencier en cellules que l'on retrouve dans le tissu nerveux. Comme nous l'avons déjà exposé, les cellules de Schwann jouent un rôle primordial dans la régénération de nerfs périphériques (Zaminy et al., 2013). Elles sécrètent et présentent des facteurs neurotrophiques au niveau du site de la blessure, orientent la repousse d'axones vers le tronçon distal, et génèrent la myéline au sein des nerfs.

Malheureusement, il est aujourd'hui difficile de purifier une population composée uniquement de cellules de Schwann, de façon suffisante, dans les temps restreints que demande une transplantation (di Summa et al., 2010). Afin de pallier ce problème, certaines

études tentent de différencier des cellules souches en cellules de Schwann, puis de les transplanter dans le site de lésion. Effectivement, la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en cellules de Schwann avant un transplant dans le nerf sciatique du rat blessé est aujourd'hui possible (Ladak et al., 2011). Les cellules de Schwann différenciées proposent des régénérations d'axones moteurs comparables aux cellules de Schwann primaires (Ladak et al., 2011). De plus, le marquage des cellules souches mésenchymateuses différenciées en cellules de Schwann par les différents marqueurs spécifiques S100, GFAP, le récepteur du NGF (NGFR) était comparable aux cellules de Schwann natives.

#### **IV. 4. C. Les cellules souches adipeuses**

Finalement, les cellules indifférenciées retrouvées dans le tissu adipeux offrent un bon rendement de cellules souches. L'avantage de l'utilisation de ces cellules est qu'elles sont faciles à extraire *via* des techniques chirurgicales minimalement invasives et elles sont disponibles en quantités abondantes (Erba et al., 2010). Les cellules souches adipeuses (ADSc) peuvent se différencier en lignée neuronale composée d'astrocytes, d'oligodendrocytes, neurones et cellules de Schwann (Tobita et al., 2011). ADSc permettent d'accélérer la croissance des vaisseaux sanguins et des repousses nerveuses. Effectivement, ces cellules sécrètent des composants de la myéline, des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) et le facteur de croissance dérivé des hépatocytes (HGF). De plus, plusieurs facteurs neurotrophiques tels que le BDNF, le NGF, et le GDNF (Lopatina et al., 2011; Santiago et al., 2009) sont aussi sécrétés. Une étude compare la croissance nerveuse sur une blessure de 1 cm par le transplant d'un conduit enrichi en ADSc *versus* un conduit enrichi en facteurs de croissance (Erba et al., 2010). Au bout de 14 jours, la colonisation du conduit enrichi en ADSc est beaucoup plus riche en cellules de Schwann. D'autre part, la greffe d'ADSc permet une reprise fonctionnelle plus rapide par rapport au groupe témoin négatif indiquant une plus grande épaisseur et myélinisation des fibres nerveuses (Lopatina et al., 2011).

Malheureusement, les cellules souches ne permettent pas une réparation complète du nerf lésé. Ces cellules souches, une fois différenciées ne peuvent reproduire un modèle exact de tissu nerveux natif (Potter et al., 2011; Potter and DeMarse, 2001). De plus, l'extraction et la purification de ces cellules souches à partir de tissus hôtes sont difficiles.

Elles se composent souvent d'une population hétérogène de plus de 22 types cellulaires. Les futures études utilisant les cellules souches implantées doivent donc évaluer la survie et la régénération nerveuse sur le long terme.

#### IV. 5. Les thérapies géniques

En raison de la courte demi-vie de certains facteurs neurotrophiques et l'incapacité des systèmes de livraison de ces molécules auprès de leurs cibles, il est nécessaire de proposer des moyens efficaces et innovateurs pour la libération de molécules bioactives afin de traiter les lésions de tissus nerveux. L'administration de molécules par l'intermédiaire d'une thérapie génique est un procédé unique qui permet un contrôle continu de la libération des facteurs neurotrophiques à l'endroit cible du site lésé. La thérapie génique repose sur les modification de l'ADN de cellules cibles retrouvés sur le site de la lésion afin d'exprimer le gène thérapeutique (Li et al., 2008). Etant donné que la thérapie génique est capable de cibler spécifiquement le tissu nerveux, cette méthode permet de libérer des facteurs de croissance en fonction du rôle physiologique des neurotrophines *in vivo* au sein de la zone endommagée.

Dans le passé, la thérapie génique a d'abord été observée et étudiée dans le système nerveux central comme un nouveau procédé de libération de molécules à travers la barrière hémato-encéphalique. Toutefois, ce traitement a été transposé au système nerveux périphérique pour délivrer des facteurs de croissance en vue de sa réparation. Les gènes dirigés vers les lésions des nerfs périphériques comprennent ceux qui codent pour le NGF, le HGF, et BMP-7. Les principales méthodes de transfection pour la délivrance de gènes dans le système nerveux périphérique comprennent le virus de l'herpès simplex et l'adénovirus. Cependant, les virus additionnels tels que le lentivirus et le virus adéno-associé ont été utilisés en plus des méthodes telles que « l'électroporation ».

Le vecteur viral du virus de l'herpès simplex (HSV) est un vecteur qui a montré des aptitudes pour infecter le système nerveux tout en maintenant un stade de dormance relativement long (Esaki et al., 2011; Mason et al., 2011). Les résultats obtenus avec le HSV démontrent la capacité des vecteurs à régénérer les tissus nerveux périphériques. Par recombinaison, le gène codant pour le Hepatocyte Growth Factor (HGF) a été intégré au génome du HSV (Esaki et al., 2011). En infectant le HSV-HGF sur le site de lésion du nerf

facial de la souris, la récupération fonctionnelle d'une paralysie a été retrouvée dès le 7<sup>ème</sup> jour comparé au groupe de contrôle, le 14<sup>ème</sup> jour.

Une autre étude a utilisé le HSV pour la transfection de NGF dans des cellules humaines de rein embryonnaire (HEK-293). Les cellules HEK-293 sont des cellules qui présentent peu ou pas de réponse immunitaire en raison de leur caractère embryonnaire, ce qui facilite la transfection. Le NGF transfecté dans les cellules HEK-293 a ensuite été transplanté dans le nerf sciatique de rat suite à une blessure. L'augmentation du diamètre des fibres nerveuses et un indice de récupération fonctionnelle accrue ont été observés (Scholz *et al.*, 2010).

L'adénovirus est un autre vecteur commun, le deuxième vecteur historiquement identifié, pour la transfection de gènes. Dans une étude, le HGF a été injecté au sein d'un guide nerveux acellulaire implanté suite à une lésion du nerf sciatique de rat (Li *et al.*, 2008). Les résultats ont révélé une augmentation de la néovascularisation dès la 16<sup>ème</sup> semaine par rapport aux transplants de guides nerveux acellulaire seuls (Li *et al.*, 2008).

Les gènes codants pour des facteurs de croissance ont été transfectés dans les cellules du tissu nerveux, tels que les cellules de Schwann et les fibroblastes, qui sont ensuite transplantées au niveau du site de lésion (Mason *et al.*, 2011). La thérapie génique a également été examinée pour diminuer la concentration des molécules inhibitrices telles que neuroglycan 2 (NG2), qui favorisent la formation de tissu cicatriciel glial (Donnelly *et al.*, 2010).

#### **IV. 6. Implantation de conduits nerveux**

En plus des conduits d'origine biologique, les chercheurs se sont orientés vers les biomatériaux afin de créer des supports pour la régénération nerveuse. Les problèmes de compatibilités des donneurs sont ainsi écartés, et surtout l'implantation de biomatériaux évite de créer un second déficit chez le patient. Cependant le biomatériau sélectionné pour la fabrication de conduits nerveux (tissue engineered nerve graft = TENGs) doit respecter un certain nombre de critères comme sa biocompatibilité, sa porosité et sa flexibilité. Les conduits nerveux développés sont d'origine synthétique ou naturelle. Certains conduits sont

même déjà approuvés et commercialisés pour l'usage clinique. Cependant, aucun de ces conduits ne propose à ce jour une récupération fonctionnelle complète.

#### **IV. 6. A. Propriétés**

Le choix du matériau est essentiel pour le bon design du conduit nerveux. En plus de sa biodégradabilité et biocompatibilité, plusieurs paramètres entrent en jeu afin de rendre le conduit plus performant.

Le matériau doit être flexible, surtout lorsque le conduit est destiné au traitement de lésions extensives. En effet, certaines lésions peuvent se trouver sur différents plans, traverser une articulation, un ligament ou encore un tendon. Un conduit nerveux fait à partir d'un matériau spécifique peut réparer de petites lésions mais peut être complètement inefficace lors de l'implantation de lésions plus étendues (Chiono et al., 2009). De plus, le degré de flexibilité ne devra pas être trop important auquel cas, le matériau deviendra trop fragile et cela pourra entraîner des déchirures ou alors des torsions (de Ruitter et al., 2009).

La perméabilité suffisante des matériaux permet la diffusion de nutriments à l'intérieur du conduit et influe sur la production de matrice de fibrine dans les débuts de la régénération nerveuse (de Ruitter et al., 2009).

Idéalement, la conductivité est un élément à prendre en compte permettant de stimuler la régénération nerveuse. La repousse d'axones peut ainsi être accélérée grâce à une surface chargée. En ayant recours à un tel matériau, la croissance des axones peut être ainsi orientée le long de l'influx électrique. L'inconvénient de ce type de matériau est qu'il est non dégradable (Nectow et al., 2012)

#### **IV. 6. B. Les matériaux synthétiques**

Les matériaux synthétiques incluent l'acide polylactique (PLA), l'acide polylactoglycolique (PLGA), le poly-( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), des polyamidoamines (PAA), le polyéthylène glycol (PEG), et le silicone.

Les matériaux synthétiques utilisés dans l'ingénierie tissulaire pour les greffes nerveuses possèdent typiquement une intégrité mécanique, mais peuvent varier selon leur seuil de dégradabilité. Certains sont dits biodégradables et d'autres non-dégradables. Les TENGs synthétiques qui ne sont pas dégradables peuvent provoquer une réaction au corps



étranger, et ainsi former des cicatrices, ou encore développer certaines infections et réactions inflammatoires. Dans ce cas, une deuxième intervention chirurgicale pour enlever le TENG est nécessaire. En outre, si les matériaux synthétiques ne sont pas entièrement absorbables, ils présentent un risque d'inflammation chronique et une compression du nerf (Kakinoki et al, 1995; Lundborg et al, 1982; Madison et al, 1988; Madison et al, 1987; Navarro et al, 1996; Robinson et al, 1991). Le silicone est l'une des matières premières synthétiques qui a été utilisé comme matériau implantable. Malheureusement, il n'est pas capable de se dégrader au cours du temps. Il est considéré comme un matériau biologiquement inerte, et son extraction de l'organisme peut être nécessaire après la réparation. L'implantation de TENG à base de silicone dans le nerf médian du cubital afin de réparer une courte lésion (jusqu'à 1 cm) ne démontre aucune différence entre les greffons et la microchirurgie réparatrice (Braga-Silva, 1999; Lundborg et al., 2004). Cependant, les résultats ne sont pas aussi encourageants pour les plus grandes lésions nerveuses (Braga-Silva, 1999; Lundborg et al., 2004).

Matériau	Propriétés du matériau	Résultat(s)	Référence(s)
PAA Polyamidoamines	Biocompatible Biodégradable Elastique	La densité et la taille des axones sont améliorées Epaisseur de la myéline plus importante	(Magnaghi et al., 2011)
PCL Poly-(ε-caprolactone)	Résistant Perméable Hydrophile	Fibres nerveuses et myélinisation améliorées	(Maturana et al., 2013; Nikolaev et al., 2014)
PEG Polyéthylène glycol	Biocompatible Propriétés mécaniques modulables	Production de LDH +++ Inflammatoire	(Koob et al., 2008) (Stukel et al., 2014)
PLGA Acide polylactoglycolique	Rigide Inflammatoire	Gros diamètres axonaux Epaisseur de la Gaine de myéline	de Boer et al., 2011 Kehoe et al., 2012
PVC Polychlorure de vinyle	Très résistant	Meilleure myélinisation	(Penna et al., 2012)
Silicone	Biologiquement inerte Non dégradable	Accumulation des facteurs de croissance. Faible croissance et myélinisation	(Braga-Silva, 1999) (Lundborg et al., 2004)

**Tableau 3 : Matériaux synthétiques utilisés pour la fabrication de conduits nerveux**

#### IV. 6. C. Les matériaux naturels

Les matériaux naturels comprennent le chitosan, le collagène, la gélatine, la fibronectine, l'acide hyaluronique, la kératine et la fibroïne de soie.

Il ressort des différents travaux effectués que les matériaux naturels offrent une meilleure qualité de régénération que les matières synthétiques (Li, 2008). Toutefois, des matières naturelles ont tendance à avoir de faibles propriétés mécaniques. Plusieurs des matériaux naturels tels que l'alginate, le collagène, la fibrine, la fibronectine et la kératine ont été utilisés sous la forme de gels.

De nombreux journaux ont rapporté que l'utilisation de biomatériaux composites (mélange de matériau naturel et synthétique) pour la fabrication de TENGs permet d'exploiter plusieurs des propriétés du matériau idéal nécessaire. Quelques exemples incluent la fabrication de scaffolds à partir de collagène et de laminine réticulés (Cao *et al.*, 2011) ou encore de collagène / PCL électrofilés (Yu *et al.*, 2011), le chitosan et le PLA (Xie *et al.*, 2008). L'interface avec l'environnement extérieur est aussi très influant dans la régénération et l'intégration du matériau. Les greffes utilisant une enveloppe extérieure synthétique remplie d'un biomatériau naturel souple pour la couche interne pourraient permettre une meilleure migration à travers le conduit. (Goto *et al.*, 2010).

Matériau	Propriétés du matériau	Résultat(s)	Référence(s)
Chitosan	Faiblement dégradable Peu résistant Inflammatoire	Axones myélinisés Potentiel musculaire	(Ao et al., 2006; A. Wang et al., 2006; Zeng et al., 2014)
Collagène	Biocompatible Dégradable Fragile	Fonctionnalité nerveuse partiellement retrouvée	(Ding et al., 2011) (Phillips et al., 2005)
Fibrine	Facilement manipulable Angiogénique	Colonisation des tissus Croissance axonale	(Kalbermatten et al., 2009) (Scott et al., 2011)
Fibronectine	Peu résistant	Croissance des fibroblastes et cellules de Schwann	(Ahmed et al., 2003)
Gélatine	Plastique Peu résistant Economique	Axones amyéliniques Excroissance Prolifération de cellules de Schwann	(Liu, 2008) (Tonda-Turo et al., 2014)
Kératine	Biocompatible	La densité et la taille des axones sont améliorées. Meilleure conduction	(Apel et al., 2008; Hill et al., 2011)
Soie	Biodégradable Biocompatible Très résistant	Peu inflammatoire Largeur des connexions distales Colonisation de tissu nerveux	(Hopkins et al., 2013; S. Madduri et al., 2010; Wittmer et al., 2011)

**Tableau 4 : Matériaux naturels utilisés pour la fabrication de conduits nerveux**

#### IV. 6. D. Les conduits nerveux commercialisés

Les premiers conduits approuvés pour l'usage médical chez l'humain ont fait leur apparition dans le monde clinique il y a 15 ans. Le **Tableau 5** présente les sept principaux conduits utilisés en clinique. Ils ont été approuvés par la « Food and Drug Administration » (FDA) et/ou par le « Conformit Europe » (CE). Le neuroGen, Neurotube et le Neurolac ont été testés chez l'humain tandis que le NeuroMatrix, NeuroFlex, Salubridge et Nerve Protector n'ont pas fait l'objet d'études cliniques.

Il est aujourd'hui difficile de comparer les différents tubes déjà retrouvés sur le marché afin de savoir lequel est le plus performant. Une revue de la littérature faite par Meek et Coert recommande l'usage des TENGs à base de PGA, ou Neurotube (Meek and Coert 2008). Néanmoins, une étude faite chez le rat compare le Neurotube, le Neurolac et le NeuraGen à l'autogreffe pour le traitement d'une lésion de 1 centimètre du nerf sciatique. D'après les analyses histologiques et fonctionnelles, le Neurolac était similaire à l'autogreffe, alors que le Neurotube s'était écrasé et offrait une moins bonne reprise fonctionnelle. (Shin, Friedrich *et al.* 2009)

Le principal avantage que propose l'utilisation de conduits nerveux commerciaux est essentiellement d'éviter le prélèvement d'un nerf nécessaire à l'autogreffe. De plus, les résultats obtenus dans les études cliniques, particulièrement avec le NeuraGen et le Neurotube, sont satisfaisants et bien souvent comparables à l'autogreffe dans le traitement de lésions inférieures à trois centimètres pour les nerfs de faible diamètre.

Malheureusement, il semble que la structure unique de ces modèles défonctionnalisés ne soit pas suffisante pour assurer la régénération nerveuse dans des lésions plus extensives ou pour des nerfs de plus gros calibre. (Moore, Kasukurthi *et al.* 2009)

<b>Product Name</b>	<b>Material</b>	<b>Degradation</b>	<b>Year</b>
Neurotube®	PGA	3 months	1999
Neuragen®	Type 1 Collagen	2-3 years	2001
Neuroflex™	Type 1 Collagen	4-8 months	2001
NeuroMatrix™	Type 1 Collagen	4-8 months	2001
Neurolac®	PLCL	16 months	2005
Salubridge™	PVA	Non absorbable	2000
Nerve Protector™	PVA	Non absorbable	2010

**Tableau 5 : Les différents TENGs déjà approuvés et commercialisés**

## V. La fibroïne de soie

Les protéines de soie, comme la fibroïne, sont des protéines naturelles extraites des cocons du ver à soie, cocons qui sont cultivés et utilisés depuis plusieurs centaines d'années pour la fabrication du textile de soie. La production mondiale de ces cocons est de l'ordre de 400 000 tonnes par an, essentiellement destinée à l'industrie textile et, depuis quelques années, aux applications biomédicales. En effet, cette soie peut générer de nouvelles matières innovantes qui pourraient, à l'instar du collagène, être utilisée dans le milieu biomédical. Par ailleurs, elles fournissent des propriétés mécaniques intéressantes et présentent une absence totale de toxicité. Aussi, cette soie peut être facilement biofonctionnalisée par le biais de modifications chimiques qui permettent alors d'obtenir de nouvelles propriétés physico-chimiques. Couplées à une grande variété de structures possibles (gel, capsules, films et fibres), ces modulations de la chimie de la protéine élargissent encore les possibilités d'applications des biomatériaux à base de soie.

Le choix des caractéristiques physico-chimiques du biomatériau sera donc fonction de son application. Les nanofibres de protéines de soie permettent, elles, de créer de nouvelles matrices pour l'ingénierie tissulaire ou de nouveaux types de vecteurs pour la libération de médicaments-molécules actives.

### V. 1. Le biomatériau de soie

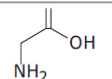
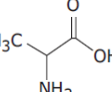
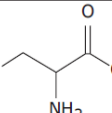
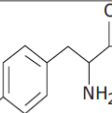
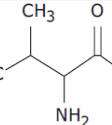
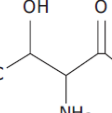
La soie est un biopolymère naturel biodégradable et biocompatible produit par deux arthropodes : l'araignée et la chenille. Elle se présente sous forme de cocons fabriqués par les vers à soie comme *Bombyx mori* et *Anthereae pernyi* ou de toiles des espèces *Nephila clavipes* et *Araneus diadematus*.

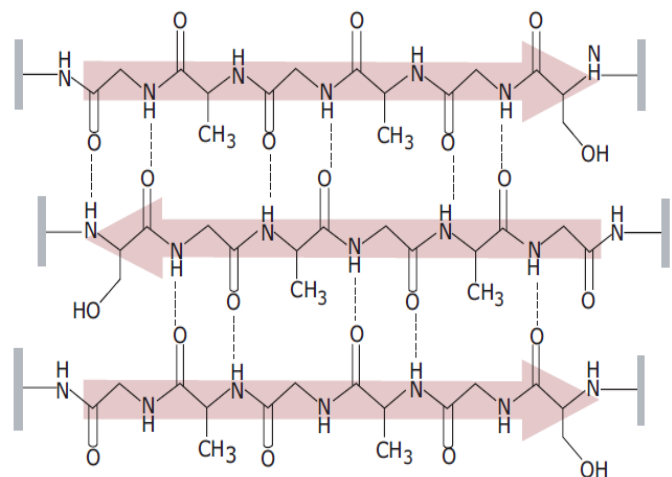
Les cocons de *Bombyx mori* sont composés d'un unique et même fil de soie pouvant aller jusqu'à un kilomètre. Ce fil est en majorité constitué par deux protéines, une hydrophobe : la fibroïne et l'autre hydrophile : la séricine (Lewin, 2006). À l'inverse des vers à soie, il est impossible d'obtenir un élevage d'araignées à l'échelle industrielle. Dans les années 1960, l'armée américaine en a fait l'expérience : en effet, lorsque ces individus sont extraits de leur milieu naturel, ils s'entredévorent.

### V. 1. A. Structure de la fibroïne

La fibroïne de soie est un ensemble de chaînes polypeptidiques organisées en feuillets  $\beta$  plissés antiparallèles. La structure primaire de cette protéine se définit par une succession du motif glycine – alanine – glycine – alanine – glycine – sérine (GAGAGS)<sub>n</sub> (**Figure 13**). Cette structure hautement cristalline contient essentiellement des liaisons hydrogène organisant les acides aminés (AA) sous forme d'hélices.

Les feuillets empilés interagissent entre eux par liaisons de van der Waals (Mita et al., 1994). Chaque acide aminé d'une chaîne interagit avec son homologue placé antiparallèlement sur l'autre chaîne (**Figure 13**). Par exemple, les résidus alanine ou sérine se lient avec les mêmes résidus de l'autre chaîne antiparallèle sur une distance interchaîne de 5,7 Å. L'arrangement entre les résidus glycine se fait sur une distance de 3,5 Å (Sashina et al., 2006). De ce fait, la fibroïne est flexible mais très peu extensible. Grâce à cette conformation, cette protéine est l'une des fibres naturelles les plus robustes et possède des propriétés mécaniques remarquables. La séricine est une macromolécule non filamenteuse, qui représente 25 à 30 % des protéines de la soie obtenues dans les cocons (Gulrajani, 1992). La séricine est essentiellement constituée de 1 186 acides aminés dont la sérine (33 %) et l'acide aspartique (17 %). Sa composition lui confère une bonne solubilité. Cette « glue » naturelle entoure la fibroïne par couches collantes successives afin de la protéger.

Acides aminés		Résidus	%
Glycine (G)		2 415	45,9
Alanine (A)		1 593	30,3
Sérine (S)		635	12,1
Tyrosine (Y)		277	5,3
Valine (V)		97	1,7
Thréonine (T)		47	0,9



**Figure 13 : Composition et structure de la fibroïne de soie (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)<sub>6</sub>**

### *V. 1. B. Intérêt de la protéine de soie*

La séricine possède de nombreux avantages tels que son pouvoir antioxydant et bactéricide. Elle résiste aux UV et permet notamment d'absorber l'humidité. Cependant, G.H. Altman a montré dans ses travaux de recherche que la séricine est immunogène (Altman et al., 2003; Panilaitis et al., 2003). À l'inverse, Wang et coll. démontrent qu'il y a une faible réponse immunitaire en présence de fibroïne (Wang et al., 2008). Selon ces résultats, la fibroïne est moins immunogène que certains biomatériaux déjà utilisés dans le domaine biomédical comme le collagène ou l'acide polylactique plus connu sous l'abréviation PLA. D'autre part, le risque de coagulation du sang est plus faible en présence de fibroïne de soie que de polystyrène qui lui aussi est utilisé dans certaines applications biomédicales (Santin et al., 1999). En plus de sa faible immunogénicité, la fibroïne est perméable au dioxygène et à l'eau, ce qui permet les échanges à travers ce nouveau matériau issu de la soie.

### *V. 1. C. Propriétés physico-chimiques de la fibroïne*

Plus de 75 % des acides aminés qui composent la fibroïne sont hydrophobes et non polaires. Le facteur électrostatique n'est pas décisif dans la formation de la structure secondaire mais joue un rôle important dans la dissolution de cette protéine. Ainsi, les fibres de soie peuvent être facilement dissoutes afin d'en extraire la fibroïne. De nombreuses méthodes existent et se font en présence de solutions aqueuses qui peuvent être acides (exemple : phosphorique, formique, chlorhydrique). Par ailleurs, la solubilité de cette protéine est meilleure en présence d'un soluté salin faiblement concentré (connu sous le nom de Salting-in, Debye-Hückel). Les protéines de soie se solubilisent avec le bromure de lithium (LiBr), le thiocyanate de lithium (LiSCN) (Bhat and Ahirrao, 1983). Afin d'accélérer le procédé, la dissolution se fait à des températures de l'ordre de 60 à 80 °C. Les solvants organiques peuvent eux aussi dissoudre les protéines de soie comme le hexafluoropropane-2-ol (HFIP) (Zhao et al., 2003).

Les variations de propriétés mécaniques entre les différentes protéines de soie sont dues à l'enchaînement de la séquence en acides aminés qui composent la protéine. On entend par propriétés mécaniques la force de traction, l'allongement à la rupture ou encore la ténacité (résistance à la propagation de fissure) du matériau (**tableau 6**). L'étude de la force appliquée sur un matériau permet de vérifier sa résistance et sa déformation. Les tests

sont effectués afin d'observer, analyser le comportement du biomatériau dans différents environnements. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, le biomatériau doit pouvoir résister et supporter les changements physico-chimiques lors d'une prolifération cellulaire. Par exemple, *in vitro*, les fibres obtenues de *B.mori* conservent la même contrainte à la rupture en traction plus de 21 jours (Altman et al., 2002). Ces tests mécaniques sont indispensables afin de vérifier la concordance et l'éligibilité du biomatériau utilisé. Du fait de l'échelle nanométrique des fibres, il est aujourd'hui difficile d'effectuer ces tests non pas sur une seule et unique fibre, mais sur un ensemble de fibres. Néanmoins, certaines techniques relevant de la microscopie à force atomique permettent d'obtenir une identification nanométrique des propriétés mécaniques de la fibre (Ko et al., 2003; Wang et al., 2004). La soie présente une résistance comparable à celle du nylon et plus importante que certains matériaux naturels utilisés dans la recherche biomédicale (**tableau 6**). Par ailleurs, ce matériau s'avère plus extensible que les autres. C'est pourquoi, la soie résiste bien plus à certaines déformations que le collagène ou le tissu osseux. Ces propriétés mécaniques très intéressantes encouragent les recherches sur la conception de nouveaux matériaux à partir de la soie.

La notion de biocompatibilité relève en grande partie de la façon dont le matériau interagira dans le milieu biologique où il est utilisé. L'implant doit minimiser les réactions anormales dans les tissus. C'est-à-dire que le lieu d'interaction tissu-matériau ne doit présenter ni signes d'irritations, ni provoquer (ou alors de manière faible) de réponse inflammatoire, allergique ou immunologique. De plus, il doit être strictement non carcinogène. La soie, qui est un matériau qui regroupe toutes ces exigences, est alors définie comme un biomatériau (Yang et al., 2007). En plus d'être biocompatible, la fibroïne de soie est un polymère naturel biodégradable. C'est-à-dire que la dégradation de ce polymère est médiée, au moins en partie, par un système biologique. La vitesse de dégradation du matériau sera fonction de sa structure répétitive, sa morphologie (cubique ou sphérique), son hydrophobicité, sa superficie et sa biofonctionnalisation (Karlsson and Albertsson, 1998). Une cinétique lente de dégradation est recherchée afin de stimuler l'infiltration cellulaire et favoriser la vascularisation (Wang et al., 2008; Yang et al., 2007). Après implantation *in vivo* d'une matrice de protéine de soie, des traces de fibroïne, issue de *B. mori*, ont été retrouvées un an plus tard (Wang et al., 2008). La fibroïne de soie est essentiellement

dégradée par des enzymes protéase au niveau du site actif, puis s’ensuit une hydrolyse de la liaison ester (Arai et al., 2004; Nair and Laurencin, 2007).

Matériaux	Force de traction $\sigma_{\max}$ /GPa	Allongement à la rupture $E_{\max}$	Ténacité (MJ/m <sup>-3</sup> )
<i>B. mori</i> - soie	0,6	0,18	70
<i>A. diadematus</i> - soie (toile)	1,1	0,27	160
<i>A. diadematus</i> - soie (liquide)	0,5	2,70	150
Collagène (tendon)	0,15	0,12	50
PLA	28-50	2-6	NF
Os	0,16	0,03	4
Nylon	0,95	0,18	80
Acier à haute limite élastique	1,5	0,008	6

**Tableau 6 : Propriétés mécaniques des fibres de soie et autres matériaux**

## V. 2. Les différentes matrices de soie

La préparation du matériau repose sur la régénération de la fibroïne en forçant ou favorisant son auto-assemblage à partir de solutions aqueuses ou non aqueuses. La solubilisation de la fibroïne endommage la structure secondaire cristalline mais conserve l’intégrité de sa structure primaire afin d’obtenir différentes morphologies du matériau.

### V. 2. A. Films

Les films sont généralement préparés par évaporation lente d’un solvant. Le solvant peut être d’origine aqueuse ou non, cela dépend de l’utilisation et de l’application auxquelles se destine le biomatériau de soie. Les films obtenus peuvent ensuite être traités par modifications chimiques ou structurelles (Hardy et al., 2008). Par exemple, les films permettent d’obtenir une plus grande affinité pour l’adhérence des cellules et la formation de tissus osseux lorsqu’ils sont fonctionnalisés avec la séquence peptidique RGD (Sofia et al., 2001).

### V. 2. B. Hydrogels

Les hydrogels de soie sont formés de réseaux de fibroïnes compactes disposés en trois dimensions dans une solution. Ils sont obtenus selon des procédés distincts :

– procédé thermique : à température élevée ;



– procédé chimique : ajout de cations divalents (comme le calcium) ou en se rapprochant du point isoélectrique de la fibroïne ( $pI = 4$ ).

Les hydrogels sont couramment utilisés dans le secteur cosmétique ou dans les traitements thérapeutiques par sa capacité à libérer des médicaments (Elia et al., 2013; Hardy et al., 2008).

#### **V. 2. C. Eponges**

Les matrices 3D sous forme d'éponges de fibroïne ont longtemps été étudiées pour le génie tissulaire au cours de ces dix dernières années. Les différents procédés de fabrication sont eux aussi très nombreux. Les méthodes les plus courantes sont la lyophilisation (Li et al., 2001), l'utilisation d'agents salins (Kim et al., 2005) ou bien de gaz (Nazarov et al., 2004) et enfin les chocs thermiques par successions de congélation et décongélation (Tamada, 2005). Selon la technique utilisée, les caractéristiques morphologiques telles que la taille des pores et la densité du matériau peuvent être contrôlées.

#### **V. 2. D. Sphères et capsules**

La morphologie de sphères ou de microcapsules est très recherchée dans de nombreux secteurs. Notamment afin d'emprisonner et de libérer des saveurs, principes actifs, teintures ou encore parfums. La fabrication de ces capsules se fait par autoassemblage contrôlé des feuilletts  $\beta$  de la protéine de soie. En effet, les molécules se trouvant entre les deux interfaces lors de l'émulsion ne sont pas à l'équilibre. Il est ainsi possible d'encapsuler de petites molécules dans une phase continue. Grâce à leur biocompatibilité, les capsules de soie représentent aujourd'hui une nouvelle classe de matériaux biomimétiques (K. D. Hermanson et al., 2007; Kevin D. Hermanson et al., 2007).

### **V. 3. Les nanofibres de soie**

Le processus d'extraction et de purification de la fibroïne de soie est aujourd'hui bien documenté et maîtrisé. En conséquence, la protéine de soie issue des cultures de *Bombyx mori* (Rockwood et al., 2011) est davantage utilisée dans les applications biomédicales que la soie naturelle d'araignée et les protéines obtenues par biotechnologie.

### V. 3. A. *Extraction et purification de la fibroïne*

La technique d'extraction la plus couramment utilisée est la dialyse (Rockwood et al., 2011). Les cocons de *Bombyx mori* sont bouillis pendant 30 minutes dans une solution saline de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 0,02 mol/L. Le réseau fibrique obtenu est par la suite rincé trois fois dans l'eau pour extraire une partie de la séricine. Cependant, afin d'extraire complètement cette protéine immunogène, les fibres de soie obtenues sont dissoutes dans une solution aqueuse de bromure de lithium (9,3 mol/L) à 60°C, puis dialysées pendant 72 heures. La concentration finale en fibroïne obtenue est de l'ordre de 7 à 8 % (Wang et al., 2004).

Les solutions de fibroïne de soie obtenues sont utilisées pour la fabrication de fibres de soie *via* différentes techniques de fabrication. En effet, les techniques comme le wet spinning ou bien qui font appelées à la microfluidique permettent d'obtenir des fibres de diamètre régulier. Cependant, seule la technique de nouvelle génération nommée electrospinning produit des fibres de faible diamètre de l'ordre de la centaine de nanomètre.

### V. 3. B. *Procédés de fabrication des fibres de soie*

Le spinning, ou filage, est un art textile antique dans lequel des fibres végétales, animales ou synthétiques sont torsadés ensemble pour former un fil. Le filage de polymère s'appuie sur le même principe et ne peut se faire qu'à partir d'une solution liquide. Les protéines de soie sont dissoutes en solution (aqueuse ou non). La concentration en protéines aura une influence directe sur le diamètre de la fibre obtenue, tout comme la technique de filage utilisée. En effet, les microfibrilles (de 2 à 100  $\mu\text{m}$ ) sont élaborées grâce aux techniques ci-après :

Wet spinning (1949, Howard). Cette technique est la plus ancienne. Elle est essentiellement utilisée dans la formation de fibres où les polymères sont dissous dans un solvant. Ils diffusent le long d'un filtre contenant une multitude de pores (spinneret). Le spinneret est immergé dans un composé chimique qui coagule et solidifie la fibre en sortie. La solution est donc extrudée directement dans le composé chimique qui l'a fait précipiter. C'est pourquoi ce procédé porte le nom de filage humide. Cette technique est surtout utilisée pour la production de viscose (soie artificielle), cellulose et quelques fibres synthétiques. Elle s'applique aussi à la production de fibre de soie (fibroïne). En effet, en

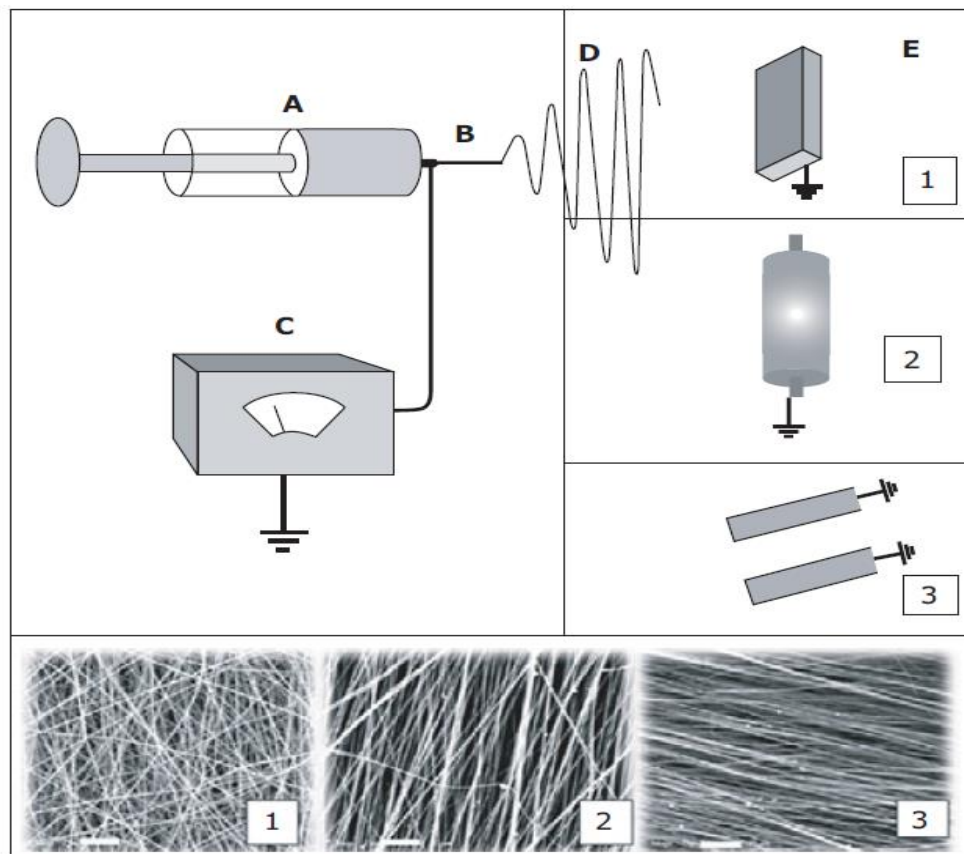
utilisant le méthanol et une solution de fibroïne à 20 %, le diamètre des fibres obtenues est de 10 à 60  $\mu\text{m}$  (Hardy et al., 2008).

Dispositifs microfluidiques. La fabrication des fibres est fonction du contrôle de l'écoulement et des phénomènes de transport au sein de ce dispositif. Le canal microfluidique peut permettre de générer un jet de solution en but de former une fibre qui sera gelée par la suite hors du canal. La mise en forme est fonction du diamètre des buses, de la façon dont le jet est récupéré en sortie du canal ainsi que la vitesse à laquelle le fluide se déplace. La fixation du diamètre des fibres peut aussi être obtenue par co-écoulement où le jet de polymère pénètre dans une couronne. Le matériau qui constituera la fibre est contenu dans le cœur de l'écoulement. La solidification de la fibre peut se faire de deux façons différentes. Elle est possible par exposition aux UV. Dans ce cas, la couronne externe ne doit pas être sensible aux UV. Mais encore, un agent permettant de solidifier le matériau contenu dans la couronne externe peut être utilisé. La solidification se fera lorsque les deux espèces entreront en contact. En réduisant le diamètre de la fibre, la surface d'échange avec l'environnement devient plus importante. C'est pourquoi, les fibres de diamètres nanométriques se révèlent très intéressantes pour l'attachement et l'adhésion cellulaire par exemple.

### **V. 3. C. Electrospinning : fabrication de nanofibres**

Cette méthode a été découverte en 1934 par Formhals, puis optimisée par différentes équipes au cours des dernières années (Kakade et al., 2007). L'electrospinning est une technique qui produit des nanofibres de polymères (50 à 1 000 nm de diamètre) et permet de les mettre en forme (Vepari and Kaplan, 2007). La solution riche en fibroïne est soumise à un fort champ électrique à la sortie d'un capillaire. Ce champ qui charge le jet liquide permet d'obtenir une fibre sous l'action de répulsions électrostatiques (**figure 14**). Grâce à cette technique, différentes propriétés peuvent être contrôlées. En effet, en modifiant les paramètres de filage (voltage, débit, volume) ou de la solution de fibroïne (viscosité et concentration), on peut obtenir différentes géométries de la matrice, diamètre de fibres, orientation et porosité. La fabrication de scaffold est donc plus ou moins contrôlée. Les caractéristiques de la structure (ou scaffold = échafaudage) peuvent donc être finement modulées.

L'intérêt de l'électrofilage est d'obtenir des scaffolds sous plusieurs conformations car les fibres peuvent être orientées selon le type de collecteur utilisé. Un simple collecteur permet de concevoir une membrane de fibres disposées de façon aléatoire. Néanmoins, un alignement de nanofibres est réalisable en utilisant différentes stratégies. L'une des plus simples méthodes est de coupler l'électrospinning à un cylindre relié à un moteur tournant ou alors utiliser deux collecteurs à charges différées. Même si l'alignement macroscopique est, de nos jours, obtenu avec grand succès, il est plus difficile d'obtenir un bon alignement à l'échelle nanométrique. L'orientation et la morphologie des nanofibres sont essentiellement observables en microscopie électronique tandis que les propriétés mécaniques sont analysées par microscopie à force atomique.



**Figure 14 : Schéma du principe de l'électrospinning**

*Sous l'action d'un puissant champ électrique (C), relié à une aiguille métallique (B), la solution riche en polymère (A) forme un jet d'un liquide chargé qui est alors étiré sous l'action des répulsions électrostatiques jusqu'à former une fibre désordonnée (D), si la cohésion moléculaire est suffisamment élevée. Le jet sèche rapidement, dans le cas d'une solution et se dépose sur un substrat conducteur (E). En fonction du collecteur, on obtient des fibres plus ou moins alignées (1, 2 et 3). Barre d'échelle : 20 µm*

Lorsque la concentration en fibroïne dans une solution aqueuse n'est pas assez élevée, la tension superficielle et la viscosité sont trop faibles pour obtenir une nanofibre en sortie d'aiguille. L'addition de 1,8 % de PEO (oxyde de polyéthylène) dans une solution de fibroïne modifie suffisamment ces paramètres pour permettre d'obtenir des nanofibres (Jin et al., 2002). Le traitement de ces nanofibres avec un mélange méthanol-eau entraîne un changement de la structure secondaire afin d'obtenir une structure cristalline. Les nanofibres constituées de fibroïne pure peuvent être obtenues à des concentrations en protéine supérieures à 20 %. Le diamètre des fibres est alors de 700 nm. D'autre part, il est possible d'élaborer des nanofibres à double couche en utilisant une solution de fibroïne et de PEO dans un solvant commun (M. Wang et al., 2006). Le processus d'électrospinning à deux solutions permet de produire un filament externe pur en fibroïne. Les fibres produites à partir de protéines de soie peuvent aussi être « électrofilées » dans des solvants non aqueux appropriés comme le HFIP. Les fibres ont alors des diamètres compris entre 2 et 2 000 nm. La formation de feuillets  $\beta$  est ensuite produite par une augmentation de la température (205-245°C) (Zarkoob et al., 2000).

#### **V. 4. Applications biomédicales des nanofibres de soie**

##### ***V. 4. A. L'intérêt de la soie dans le génie tissulaire***

De nombreux dérivés de fibroïne modifiée peuvent être utilisés comme revêtement de substrats de cultures cellulaires 2D, afin de voir dans quelle mesure la chimie de surface ou le greffage de molécules biologiques peut affecter l'adhésion, la croissance et la prolifération cellulaire.

La conjugaison de la fibroïne au PLA augmente l'hydrophilie, l'angle de contact passe de 69 à 52°, ce qui conduit à une augmentation de l'adhésion et de la prolifération d'ostéoblastes. Le PEG augmente lui aussi l'hydrophilie, avec des angles de contact de 33°.

L'incorporation de groupements « Azo » qui contiennent différents groupes augmentant ou diminuant l'hydrophilie de la fibroïne peut influencer la croissance et la prolifération de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC). Les hMSC prolifèrent davantage sur des dérivés de fibroïne hydrophile présentant un angle de contact compris entre 43 et 55°, bien qu'elles ne forment pas de monocouche confluyente sur ces substrats. A

*contrario*, les hSMC forment des monocouches confluentes sur des dérivés AzoSilk hydrophobes (présentant un angle de contact supérieur à 70°) (Murphy et al., 2008).

Une des applications majeures de la fibroïne de soie modifiée chimiquement est l'ingénierie tissulaire, domaine constamment à la recherche de nouvelles méthodes et de nouveaux matériaux afin de créer des tissus synthétiques qui puissent être implantés *in vivo* afin de stimuler la régénération de tissus lésés ou malades. Un exemple typique de tissu obtenu par ingénierie est constitué de cellules ayant poussées dans une structure 3D biodégradable. Le scaffold a été défini dans le but de reproduire les caractéristiques structurales, mécaniques et biomécaniques du tissu originel. La fibroïne est donc un matériau très prometteur pour l'ingénierie tissulaire, de par ses excellentes propriétés mécaniques, sa biocompatibilité et sa biodégradabilité. Les structures 3D à base de fibroïne ont été utilisées pour l'ingénierie du ligament, de la peau, des os ou des nerfs. Cependant, afin d'optimiser ces tissus issus de l'ingénierie, il est nécessaire de modifier la surface de la structure afin d'améliorer les interactions avec les cellules colonisant ces scaffolds.

De nombreuses équipes utilisant des matrices à base de fibroïne pour l'ingénierie tissulaire se sont intéressées aux effets d'un greffage covalent du peptide RGD en utilisant la méthode du couplage par carbodiimide. Le peptide RGD interagit avec les intégrines localisées à la surface de très nombreux types cellulaires et améliore l'adhésion des cellules aux surfaces présentant ce motif peptidique. De nombreuses études ont par ailleurs suggéré que l'attachement aux intégrines pouvait initier nombre d'événements de signalisation intracellulaires, pouvant par exemple influencer la différenciation des cellules. Ainsi, l'attachement de ces peptides à la surface de films de soie et des structures 3D conduit à une augmentation significative de l'adhésion et de la différenciation cellulaire au sein de tissus élaborés grâce à l'ingénierie de type ligamenteux, osseux et dentaire.

#### **V. 4. B. Ligament**

Des travaux ont été menés dans le but de mettre au point une matrice à base de fibres de soie qui présenterait les caractéristiques mécaniques et biologiques exigées pour la réalisation d'un ligament croisé antérieur (LCA). Le biomatériau idéal doit donc être biodégradable, favoriser le développement du tissu ligamentaire et surtout posséder une résistance mécanique élevée afin de supporter d'importantes forces de tension maximales

( $\approx 1\,700\text{ N}$ ) mais aussi de présenter des propriétés élastiques proches de celles d'un ligament originel ( $\approx 180\text{ N/mm}$ ). Dans ce but, une organisation en « câble électrique » à multifibres a été mise au point : l'organisation géométrique du matériau est définie en terme de nombre de tours à un niveau donné de l'organisation de la matrice : par exemple, la représentation numérique d'une matrice à six cordes peut se définir comme  $30(0) \times 6(2) \times 3(2) \times 6(0) \times 1$  ce qui correspond à trente fibres dans un faisceau, six faisceaux dans un fil, trois fils dans une corde et six cordes dans une matrice de ligament croisé antérieur, le nombre entre parenthèses indiquant le nombre de tours par centimètre à chaque niveau (Altman et al., 2002).

Ce type de matrice possède les caractéristiques mécaniques d'un ligament croisé antérieur humain et permet l'adhésion et la différenciation de cellules souches adultes vers une lignée ligamentaire, suggérant que des matrices de fibres de soie, correctement préparées, puissent constituer un biomatériau approprié pour le remplacement du LCA. Ces résultats ont encouragé des études menées in vivo dans lesquelles l'implantation d'un biomatériau de soie, d'une matrice de collagène et de cellules souches mésenchymateuses humaines a conduit à la régénération d'un LCA. Ce dernier présente la même composition de la matrice extracellulaire et des propriétés mécaniques proche du LCA origine, ouvrant la voie à des applications cliniques (Altman et al., 2002; Fan et al., 2009).

#### V. 4. C. Peau

Les fibres de soie ont également été utilisées comme biomatériau dans le contexte de blessures cutanées. Des fibres de soie obtenues par electrospinning ont été fonctionnalisées avec de l'EGF (epidermal growth factor) afin d'accélérer la réparation de plaies sur un modèle de peau en culture. Pour ce modèle, des cellules HDF (human dermal fibroblasts) sont mises en culture avec du collagène de type I durant 7 jours, puis des cellules NHK (normal human keratinocytes) sont ajoutées à la surface du gel de collagène. Une blessure de 4 mm est réalisée après 7 jours de culture de cet équivalent de peau. Le choix de l'EGF est dicté par son rôle dans le processus de guérison des plaies : stimuler la prolifération et la migration des kératinocytes. En raison notamment de sa courte période de demi-vie, il est nécessaire d'appliquer fréquemment de l'EGF afin de maintenir une concentration active suffisante durant le processus de fermeture de la plaie. Il est incorporé dès les premières étapes d'électrospinning et son relargage par le biomatériau de soie est mesuré par ELISA.

Si environ 18 % de l'EGF sont relargués dans les 10 premières heures, la cinétique de libération ralentit considérablement pour aboutir à 25 % de libération après 7 jours de culture. Cet effet de « burst » précoce est particulièrement intéressant car la ré-épithélialisation d'une plaie est un procédé démarrant très rapidement après la blessure, il permet donc une activation immédiate des kératinocytes au niveau des bords de la plaie. Sur ce type de matériel, cette cinétique de libération peut s'expliquer par le fait que l'EGF n'est pas localisé seulement au sein du réseau de fibres mais aussi à sa surface. Dans cette étude, il s'est avéré que l'utilisation de ce biomatériau fibroïne + EGF permet d'avoir un taux de fermeture des plaies de 100 % à 48 h, contre 25 % pour un biomatériau de fibroïne seule et 10 % en l'absence de biomatériau. L'action du matériau s'avère ainsi double : il offre une protection physique à la plaie et stimule sa réparation par libération directe d'EGF (Schneider et al., 2009).

#### V. 4. D. Os

La structure très riche en feuillets  $\beta$  confère une grande rigidité et solidité aux biomatériaux à base de soie, ce qui en fait un biopolymère très intéressant pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse. Afin d'améliorer la résistance à la compression de ces biomatériaux, une méthode d'hydrolyse de la soie a été développée afin d'obtenir des microfibrilles de fibroïne comme structures de renforcement au sein d'une matrice de fibroïne.

L'hydrolyse alcaline des protéines est une technique bien connue, l'originalité consiste ici à utiliser ce procédé pour générer des fibres de soie de longueur micrométrique à partir de la protéine de soie native, dans le but d'obtenir des structures de renforcement mécanique. La longueur des microfibrilles de soie est inversement proportionnelle au temps d'hydrolyse. Après 15 s, la longueur moyenne des fibres est de  $\approx 350 \mu\text{m}$ , elle chute à  $260 \mu\text{m}$  après 50 s et  $\approx 190 \mu\text{m}$  après 70 s. Réaction qui peut être accélérée en chauffant le mélange, ce qui permet d'obtenir toute une gamme de longueurs de fibres : petites ( $10\text{-}20 \mu\text{m}$ ), moyennes ( $100\text{-}200 \mu\text{m}$ ) et longues ( $400\text{-}500 \mu\text{m}$ ). Pour fabriquer les biomatériaux renforcés par des micro-fibrilles, une solution de soie contenant 25 % d'hexafluoroisopropanol (HFIP) (paragraphe 1.3.1) est mélangée avec les microfibrilles, avec un rapport 1:1 ou 1:3 (HFIP : micro-fibrilles). Plus les fibres sont longues et plus le matériau obtenu s'avère rugueux, tant



au niveau de la surface externe, que des parois des pores, le rapport 1:3 conduisant à davantage de rugosité que le rapport 1:1.

Une grande stabilité mécanique est nécessaire pour des implants destinés à l'ingénierie tissulaire osseuse et qui seront soumis à d'importantes forces de compression *in vivo*. Les tests de compression révèlent que les biomatériaux (dépourvus de cellules) préparés avec un rapport 1:3 présentent une résistance à la compression 4 à 5 fois plus élevée que ceux préparés avec un rapport 1:1 (entre 10 et 16 MPa contre 2 à 4 MPa respectivement) et 50 à 100 fois plus élevé que les témoins « Fibroïne-HFIP » (85 kPa). De plus, la résistance du matériau à la compression mécanique s'avère d'autant plus importante lorsque les microfibrilles sont longues (400-500  $\mu\text{m}$ ). Aussi, les cellules (cellules souches humaines mésenchymateuses) qui poussent à l'intérieur des biomatériaux renforcés par les microfibrilles prolifèrent et présentent, après 4 semaines de culture, une augmentation significative (d'un facteur 6 environ) de l'expression de certains marqueurs caractéristiques d'un développement osseux (ostéogénèse) : osteopontine (OP), bone sialoprotein (BSP) et forte activité de phosphatase alcaline (ALP  $\times 20$  environ) en comparaison des témoins sans microfibrilles (HFIP seul).

Enfin, la résistance des biomatériaux à la compression se trouve augmentée de 25 % environ lorsque ces cellules ont poussé à l'intérieur durant 4 semaines, ce qui suggère un rôle de la matrice extracellulaire dans l'amélioration de cette propriété mécanique (Mandal et al., 2012).

#### V. 4. E. *Blood-contacting materials*

Plusieurs approches ont été engagées pour modifier chimiquement la fibroïne afin d'améliorer sa compatibilité sanguine (hémocompatibilité). De nombreuses approches se sont orientées vers la reproduction de la structure de l'héparine, polysaccharide hautement sulfaté, couramment utilisé comme anticoagulant. Afin de mimer la structure de l'héparine, des stratégies visant à incorporer des groupements sulfates à la fibroïne ont été mises en place.

Des dérivés de fibroïne obtenus par réaction avec l'acide chlorosulfonique ainsi que des mélanges de soie sulfatée se sont révélés anticoagulants, suggérant que ce type de modifications chimiques de la soie puisse être utilisé pour des applications où ces matériaux

seront au contact du sang. De plus, une activité anti-HIV de dérivés sulfatés de la soie a été mise en évidence (GOTOH et al., 2000).

Une seconde approche pour améliorer la compatibilité sanguine de la fibroïne est basée sur le greffage du 2-méthacryloxyethyl phosphorylcholine (MPC) sur les structures à base de soie. L'attachement de MPC sur des polymères type cellulose permet de réduire l'adhésion des protéines et des cellules aux membranes utilisées pour la dialyse sanguine. De manière analogue, l'incorporation de MPC à la soie permet de réduire significativement l'adhésion des plaquettes, ce qui pourrait permettre de diminuer les réponses inflammatoires à ces matériaux *in vivo* (Furuzono et al., 2000).

#### **V. 4. F. Libération de molécules d'intérêts médiée par les matériaux de soie**

Des recherches ont également été entreprises afin d'utiliser la fibroïne pour la libération de molécules, en particulier pour sa biocompatibilité et sa dégradation lente *in vivo*. Du fait de cette dégradation lente, le mécanisme primaire de relargage à partir des matrices de soie est la diffusion. Cependant, la vitesse de libération sera très dépendante des modifications de la soie, d'une part, et des propriétés chimiques des molécules à délivrer, d'autre part. Les petites molécules et les protéines peuvent être encapsulées au sein de fils et microsphères de fibroïne de manière spécifique et relarguées par diffusion. Les molécules d'intérêts peuvent aussi être liées de manière covalente à la soie pour limiter leur diffusion à partir de la fibroïne ou afin d'augmenter leur stabilité.

Les vecteurs de libération de médicaments à base de fibroïne peuvent être synthétisés à l'aide de techniques très variées. Leur choix va dépendre du mode d'application, de la cinétique de libération désirée mais aussi de la stabilité de la molécule active-médicament. La fabrication du vecteur peut faire intervenir une exposition de la soie à la chaleur, à des forces de cisaillements, des pH extrêmes, des solvants organiques, la congélation et/ou le séchage. Tous ces facteurs peuvent avoir un impact sur la fibroïne, notamment sur le taux de feuillets  $\beta$ . Ces modifications ainsi que l'influence du protocole de fabrication du vecteur sur sa porosité et sa surface d'échange peuvent influencer la cinétique de libération du médicament. Par exemple, lorsqu'il s'agit d'incorporer des facteurs de croissance, les solvants organiques et des températures élevées doivent être proscrits afin de conserver l'activité biologique de la molécule.

La manière la plus commune et directe d'incorporer des médicaments dans des systèmes de vecteur à base de soie est de les solubiliser ou mélanger directement à la solution de fibroïne avant la suite du procédé (Gobin et al., 2006). De tels protocoles ont été testés pour l'incorporation de médicaments au sein d'hydrogels, de films, de scaffolds et de microparticules de fibroïne. Le principal inconvénient de cette technique est de s'assurer qu'il n'y a aucune altération de l'intégrité ni de l'activité biologique de la molécule d'intérêt au cours du procédé. Sinon, le médicament peut être incorporé après la fabrication du vecteur, par adsorption ou couplage covalent sur le vecteur préalablement préparé. Une autre option consiste à incorporer des nano ou microparticules contenant déjà le médicament soit au cours du procédé de fabrication soit au sein du vecteur présynthétisé.

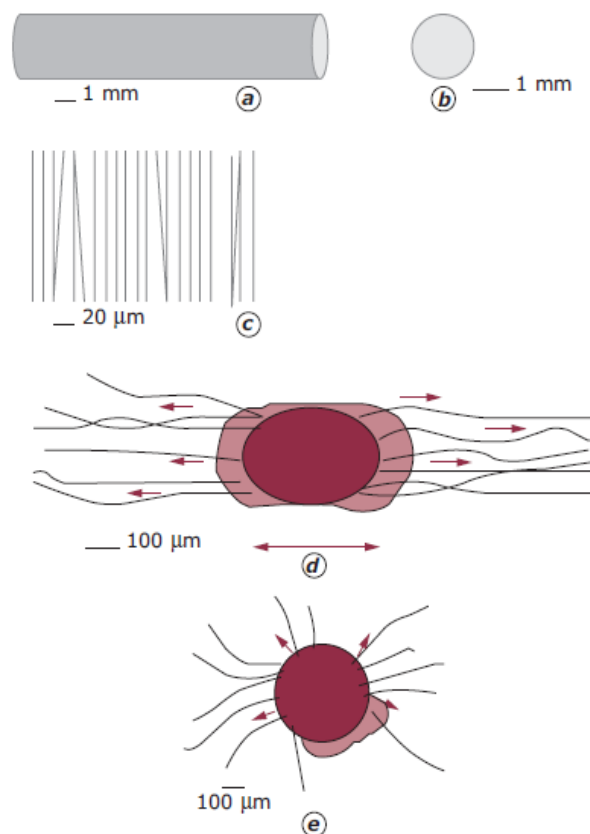
Une cinétique judicieuse de libération de molécules actives est souvent une condition nécessaire au déclenchement de signaux physiologiques souhaités ou à l'action thérapeutique d'un médicament dans le cas d'une pathologie. Cette cinétique peut être modulée par de nombreux paramètres tels que la nature des modifications chimiques de la fibroïne, l'incorporation des médicaments dans des microparticules présentant des cinétiques de dégradation variables ou la bioconjugaison (Wenk et al., 2011).

#### **v. 5. Les nanofibres de soie utilisées pour la régénération nerveuse**

Bien que la greffe de nerf autologue soit possible suite à une lésion nerveuse, la morbidité au site donneur et la disponibilité limitée ont encouragé le développement de méthodes alternatives. Aujourd'hui, les « guides nerveux » issus de l'ingénierie tissulaire représentent l'alternative la plus prometteuse.

Grâce aux nombreuses possibilités de mise en forme et de modifications chimiques, la fibroïne de soie a suscité l'intérêt dans cette perspective. Un TENG (tissue engineered nerve graft) doit fournir un support physique de croissance et un microenvironnement favorable à l'élongation des axones. La stratégie consiste donc à intégrer des facteurs de croissance neurotrophiques ou des cellules stimulant la croissance au sein de structures orientant la croissance des axones : fibres ou microcanaux (Wittmer et al., 2011). Les performances biologiques de ces TENG peuvent être évaluées par des cultures d'explants de moelle épinière ou de ganglions spinaux d'embryon de poulet, des cellules gliales ou des cellules des ganglions de la rétine.

Comme expliqué précédemment, des nanofibres de soie alignées, d'un diamètre d'environ 500 nm sont obtenues par électrospinning. Cela génère le biomatériau 2D qui est enroulé, collé et recouvert d'acide polylactique-co-glycolique (PLGA) pour prévenir une éventuelle libération non contrôlée des facteurs neurotrophiques. Le tube ainsi obtenu est finalement séché. Le TENG est représenté (**Figure 15**). La présence de facteurs neurotrophiques stimule fortement la croissance axonale des ganglions spinaux. Les nanofibres de soie alignées constituent le support mécanique guidant la croissance des neurones, parallèle à l'alignement des fibres (**Figure 15**). Au sein de nanofibres non orientées, l'élongation des axones et la migration des cellules de Schwann se trouvent diminuées et sans organisation précise (**Figure 15**).



**Figure 15 Les TENGs : représentation schématique et croissance des explants**

*Conduit nerveux fonctionnalisé avec des facteurs de croissance. Vue de côté a) et section transversale b), fibres de soie alignées sur la face interne du tube c). Croissance et migration d'axones sensitifs à partir d'explants de ganglions spinaux cultivés durant 24 h sur des fibres de soie fonctionnalisées avec des facteurs de croissance et alignées d) ou orientées de manière aléatoire e). La longue flèche indique l'orientation des fibres de soie au sein du conduit nerveux.*

Le TENG nanostructuré détermine donc la direction et le degré de croissance des axones des neurones sensitifs des ganglions spinaux. Des résultats similaires peuvent être obtenus avec des neurones moteurs d'explants de moelle épinière, ce qui suggère une compatibilité de ce TENG pour les neurones sensitifs mais également pour les neurones moteurs. Ces résultats encourageants confirment que les TENG à base de fibroïne pourraient être utilisés pour favoriser la régénération de nerfs périphériques (S. Madduri et al., 2010; Yang et al., 2007).

De nombreuses avancées pour la réparation de lésions nerveuses périphériques ont vu le jour ces 50 dernières années. Les diverses stratégies discutées le long de cette revue bibliographique ne proposent toujours pas la meilleure alternative pour le remplacement de l'autogreffe nerveuse. Néanmoins, le fonctionnement du système nerveux périphérique ainsi que sa réparation sont de mieux en mieux appréhendés. Le biomatériau optimum, utilisé pour la réparation de nerfs périphériques, doit répondre à plusieurs spécifications biologiques, chimiques, mécaniques et physiques.

En effet, le biomatériau biocompatible permet la stimulation de l'ensemble de la population cellulaire nerveuse (notamment les cellules gliales et les neurones). De plus, ce biomatériau doit être facilement fonctionnalisable par différentes molécules chimiques et/ou biologiques tout en présentant des propriétés mécaniques et structurelles proche d'un nerf préiphérique physiologique.

Ces travaux de thèse s'appuient donc sur ces quatres paramètres afin de concevoir et développer une prothèse artificielle nerveuse pour la réparation et la régénération de nerfs périphériques.

## **Chapitre 2 Matériels et méthodes**

---

La méthodologie générale de ce projet de thèse a été exécutée dans le but de réparer une lésion nerveuse chez le rat, à l'aide d'un biomatériau élaboré sous la forme de conduits nerveux de nouvelle génération. Cette partie décrit l'ensemble des techniques et méthodes utilisées lors de mes travaux de recherche. Le détail de la fabrication du conduit nerveux de soie sous forme de nanofibres est présenté dans un premier temps. Une fois le matériau créé, la méthode *in vitro* utilisée pour évaluer l'effet biologique des fibres sur les neurones est décrite. Enfin, les nanofibres de soie ont été caractérisées par différentes techniques d'analyses physico-chimiques avant implantation *in vivo* des conduits nerveux chez le rat.

## I. Fabrication des nanofibres de soie

### I. 1. Extraction de la fibroïne de soie

Les nanofibres sont fabriquées à partir de la fibroïne de soie (SF) extraite des cocons du ver à soie (*bombyx mori*). La fibroïne issue des vers à soie est d'avantage utilisée dans les applications biomédicales que la soie naturelle d'araignées, ou que les protéines obtenues par biotechnologies, en raison de la facilité de culture des chenilles et de la grande quantité de soie qui peut être récoltée. Il existe plusieurs méthodes d'extraction de la fibroïne, néanmoins la technique utilisée est la dialyse telle qu'effectuée au laboratoire du BioMedical Engineering de Tufts University (Medford - USA).

Les cocons de Bombyx Mori (Tajima Shoji Co., Yojoama, Japon) ont été coupés en petits morceaux et bouillis pendant 30 minutes dans une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 0,02 mol/L. Le réseau fibrique obtenu est par la suite rincé trois fois dans l'eau déminéralisée puis laissé sécher à température ambiante pendant 48 heures. Les fibres de soie obtenues sont dissoutes dans une solution aqueuse de bromure de lithium (LiBr) d'une concentration de 9,3 mol/L à 60°C pendant 4 heures (**Figure 16**).

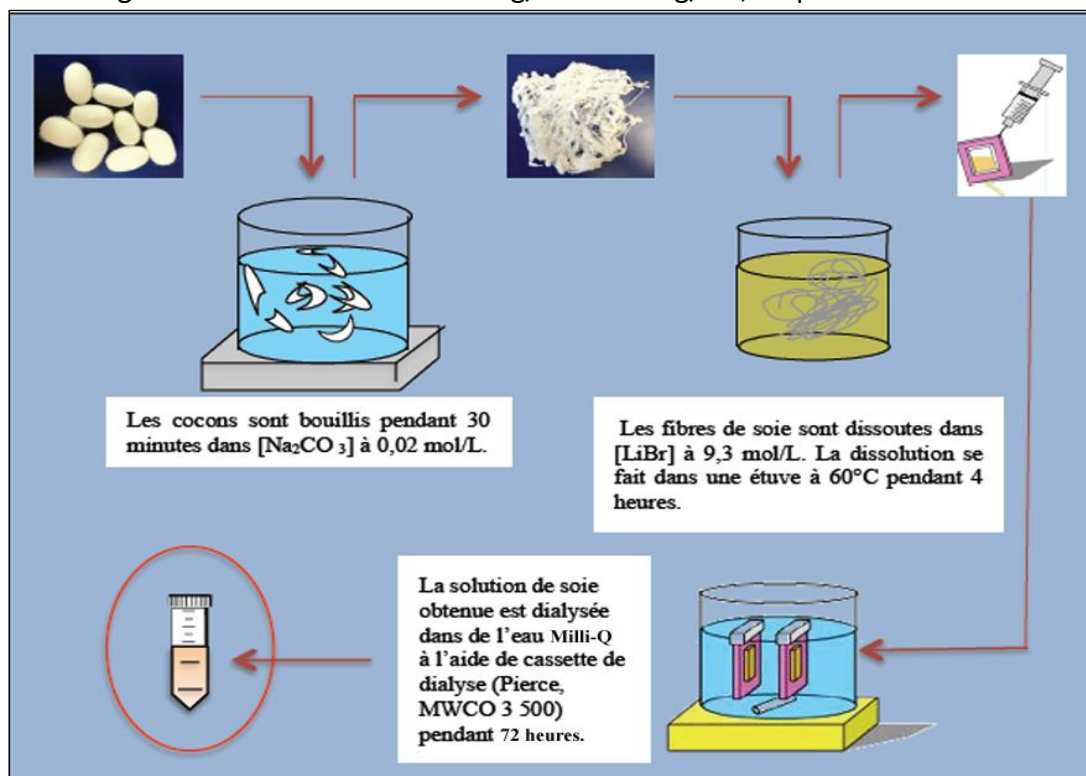
La solution de soie obtenue est dialysée pendant 72 heures dans de l'eau à l'aide de cassette de dialyse (membrane MWCO 3500) afin d'extraire complètement la sérécine (protéine immunogène). La concentration finale en fibroïne obtenue, calculée par pesée de

la matière solide restant après le séchage à 60°C d'un mL de soie pendant 24 heures, est de l'ordre de 7 à 8% (Dinis, Tony Mickael et al., 2013; Rockwood et al., 2011).

## I. 2. Préparation des solutions de filage.

Lorsque la concentration en fibroïne dans une solution aqueuse n'est pas assez élevée, la tension superficielle et la viscosité sont trop faibles pour créer une nanofibre. L'addition de 1,8 % d'oxyde de polyéthylène (PEO) dans une solution de fibroïne modifie suffisamment ces paramètres pour permettre d'obtenir des nanofibres (Jin et al., 2002). En effet, les solutions de fibroïne de soie ont été mélangées avec du PEO à 5% (MM = 900 kDa) dans un rapport de 4:1 volume (SF/PEO) pour obtenir une solution finale contenant 9% de SF.

Pour fonctionnaliser les solutions de SF, le NGF et/ou le CNTF, tous deux reconstitués dans du PBS contenant 0,1% de solution d'albumine de sérum bovin ont été ajoutés à la solution de filage à la concentration de 100 ng/mL et 10 ng/mL, respectivement.



**Figure 16 : Schéma de purification de la fibroïne sous forme de solution aqueuse à 7-8 %**

*La fibroïne de soie est dissoute par différents traitements chimiques et thermiques. La solution obtenue est par la suite dialysée afin d'extraire la séricine de la solution de soie. La concentration finale de fibroïne est de 8% après purification.*



### 1. 3. Electrospinning

L'électrofilage est une technique qui permet d'obtenir des nanofibres à partir de solutions aqueuses contenant des polymères. En réduisant le diamètre des fibres, la surface d'échange avec l'environnement devient plus importante (Altman et al., 2003). C'est pourquoi, les fibres de diamètres nanométriques se révèlent très intéressantes pour l'attachement et l'adhésion cellulaire par exemple. L'électrofilage de la fibroïne de soie a aussi été effectué aux USA selon des procédures déjà décrites (Zhang et al., 2009).

Une solution de fibroïne de soie (fonctionnalisée ou non) est livrée par une seringue en acier inoxydable 16G à un débit constant de 5 ou 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  avec un pousse seringue (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). L'aiguille de la seringue est chargée à 12 kV avec une alimentation haute tension (High Voltage recherche Gamma ES-30P, Ormond Beach, FL, USA) et est montée au centre d'une plaque d'aluminium de 10 cm de diamètre. La distance entre l'aiguille et le collecteur de masse est réglée à 15 cm.

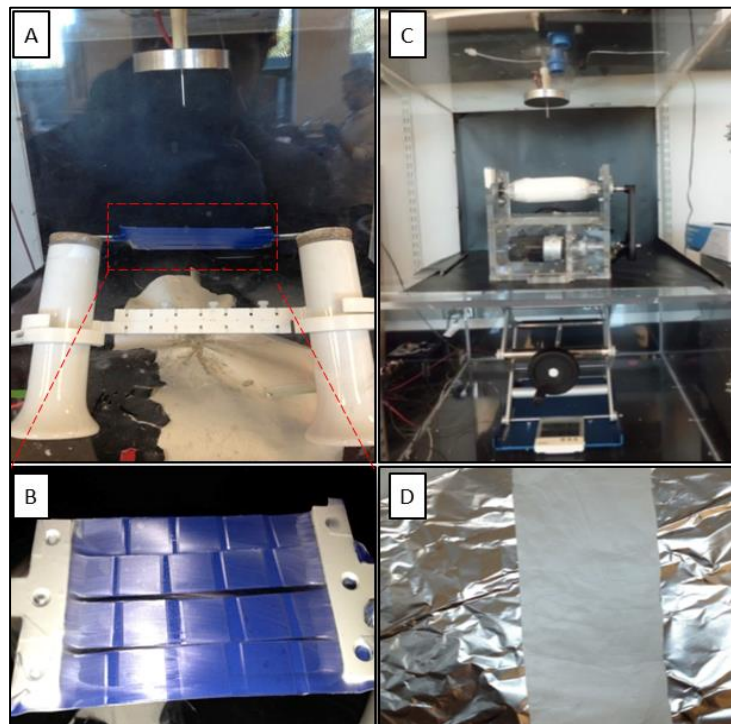
#### 1. 3. A. *Nanofibres de soie alignées pour les cultures in vitro*

Pour aligner les nanofibres de SF fonctionnalisées, 2 plaques d'acier indépendantes en zinc d'une largeur de 8 cm x 0,3 cm d'épaisseur ont été utilisées comme collecteur de masse. Les plaques ont été montées sur un plot en céramique de 25 cm de hauteur fixé sur des jambes en PVC réglables configurées à un espacement de 10 cm entre les plaques (Jose et al., 2012). Les plaques sont liées par du ruban isolant (3M, St. Paul, MN) afin d'y déposer les lamelles de verre pour recueillir les nanofibres de soie alignées à 16 cm en-dessous de la goutte (**Figure 17A**). L'alignement des fibres est contrôlé par un système de dépôt oscillant consistant à passer une masse électrique d'une plaque à l'autre. Chaque collecteur est connecté à une sortie électrique indépendante d'un interrupteur (McMaster-Carr, Inc., Atlanta, GA, USA) qui alterne les charges tout au long du processus à 0.33Hz. Le temps de dépôt des fibres entre les collecteurs était de 3 min. Vingt lames de verre recouvertes de nanofibres sont ainsi produites toutes les 3 min (**Figure 17B**)

#### 1. 3. B. *Nanofibres de soie pour les études in vivo*

Dans le but de fabriquer des conduits nerveux de soie, des feuilles de nanofibres de soie alignées (2D) ont été produites à l'aide d'un cylindre en aluminium. Ce collecteur est défini par un diamètre de 6 cm et une hauteur de 15 cm. La vitesse de rotation trouvée pour

un parfait alignement est de 3800 tours par minute correspondant à une vitesse de rotation de 10 m/s. Le cylindre couvert d'une feuille d'aluminium a été placé 15 cm en-dessous de la gouttelette (**Figure 17C**). L'alignement des fibres est contrôlé par la vitesse de rotation maintenue de façon continue jusqu'à ce que le processus d'électrofilage soit achevé. Les nanofibres de soie ont été déposées sur la feuille d'aluminium pendant 90 min, représentant un volume de 1 mL (**Figure 17D**).



**Figure 17 : Production des nanofibres de soie par électrospinning**

(A) Les nanofibres de soie pour culture *in vitro* sont produites à l'aide d'un système de dépôt oscillant et (B) recueillies sur lamelles de verre. Dans le but des créer des conduits nerveux à partir de nanofibres de soie, (C) la solution de soie a été électrofilée et déposée sur un cylindre, puis (D) les fibres ont été recueillies sur une feuille de papier aluminium.

#### I. 4. Conception du nouveau conduit nerveux (3D) de soie bi-fonctionnalisée

Les feuilles contenant les nanofibres de soie fonctionnalisées et alignées ont été ôtées du papier aluminium. Pour créer un conduit à multicanaux, la feuille de nanofibres de soie a été enroulée autour de tiges de téflon d'un diamètre de 0,3mm. Cinquante tiges ont été incorporées dans la feuille de soie, un à un par enroulements successifs. Une fois que toutes les tiges ont été recouvertes par le matériau, le reste de la feuille de soie a été utilisée

pour couvrir complètement la nouvelle structure créée, définie par un cylindre géométrique tridimensionnel (**Figure 18**). Cette structure présente un diamètre moyen de 5 mm et une longueur de 5 cm. Tous les tubes ont été traités par vapeur d'eau sous vide pour rendre le matériau plus hydrophobe pendant une nuit et rigidifier la structure (Hu et al., 2011). Les tubes ont été immergés dans une solution stérile de PBS pendant 5 min afin de retirer les tiges de téflon. Tous les tubes ont été standardisés à une longueur de 1 cm et un diamètre d'environ 1 mm, proche de celui du nerf sciatique du rat.



**Figure 18 : Fabrication 3D du conduit nerveux à base de nanofibres de soie alignées**

*Les tiges de Téflon ( $\varnothing = 0,3 \text{ mm}$ ) ont été utilisées pour rouler la feuille de soie à  $360^\circ$ . Ce processus a été répété pour 50 tiges. Le reste de la feuille de soie est enroulée autour de la structure formée. Tous les tubes fabriqués ont été normalisés à une longueur de 1 cm et un diamètre d'environ 1 mm. Barres d'échelle: 1 cm*

Afin de vérifier la non cytotoxicité et la bioactivité, nous avons effectué des cultures cellulaires et organotypiques sur les différents matériaux de soie fonctionnalisés produits.

## II. Culture cellulaire et organotypique

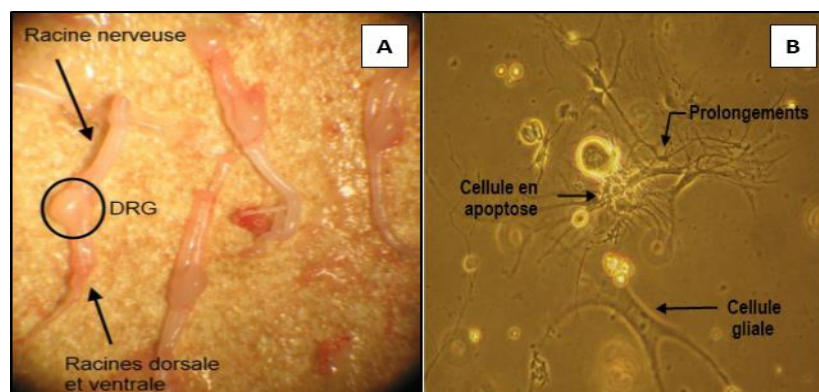
Les lamelles de verre recouvertes des nanofibres alignées ont été mises en contact avec des neurones sensoriels ou alors avec des ganglions de la racine dorsale. Différents aspects ont été étudiés comme la morphologie et l'adhérence des neurones et cellules de Schwann, l'orientation de la croissance des axones, puis la stimulation nerveuse par les facteurs de croissance incorporés dans la soie sur les cellules.

## II. 1. Extraction de cellules nerveuses à partir des DRGs

Les DRGs renferment un nombre important de neurones sensoriels et de cellules gliales du système nerveux périphérique. Les DRGs ont été isolés à partir de jeunes rats mâles de l'espèce Sprague Dawley, âgés de 2 à 3 mois en utilisant un protocole adapté d'une procédure déjà publiée (Malin et al., 2007). Toutes les procédures ont été effectuées en conformité avec la directive 2010/63/UE européenne et le Comité d'éthique de l'Université de Technologie de Compiègne, France. Les rats ont été euthanasiés au pentobarbital (1mL pour 100g) afin de récupérer la colonne vertébrale sous hotte à flux laminaire. Les DRGs situés dans les loges du canal spinal ont été extraits à l'aide d'une loupe binoculaire et sont conservés dans du HBSS (Gibco) en boîte de Pétri sur glace pendant la durée de l'extraction (**Figure 19A**).

Les DRG ont été incubés dans 2,5% de collagénase (Sigma) pendant 15 min à 37°C puis centrifugés pendant 1 min à 500 g. Le culot a été incubé 15 min dans 0,5% de trypsine (Sigma) et dans 1mg/mL de DNase I (Sigma) à 37°C puis centrifugé 1 min à 1000 g. Le culot est par la suite resuspendu dans 10 mL de milieu F-12 préchauffé à 37°C puis de nouveau centrifugé à 1000g pendant 1 min. Finalement, 2mL de milieu F-12 sont ajoutés au culot, qui est mécaniquement dissocié, par dix passages dans une pipette Pasteur polie au feu. Le rendement moyen de cellules obtenues pour un rat était de 100 000 cellules (**Figure 19B**) avec une viabilité cellulaire estimée à 90% par test au bleu trypan sur cellule de Malassez.

Pour les cultures organotypiques, les DRGs ont été extraits à partir d'embryons de rat au stade E15 de gestation.



**Figure 19 : Observation des DRGs et des cellules nerveuses**

*Observation (A) des DRGs à la loupe binoculaire et (B) de cellules nerveuses au microscope optique à contraste de phase.*

## II. 2. Mise en culture

### II. 2. A. Préparation des lamelles de verre

Avant utilisation, les lamelles de verre (22x22mm) sont déposées dans des plaques 6 puits (Tissue Culture Polystyrene, Falcon). Dans un premier temps, les lamelles sont traitées à l'éthanol 70° pendant 5 min afin de les stériliser puis rincées au PBS (Phosphate Buffer Saline). L'étape de stérilisation se réalise à deux reprises. Les lamelles sont ensuite recouvertes de 2 mL de poly-lysine pendant 30 min à température ambiante, puis de 2mL de laminine pendant 2 Heures à 37°C (Malin et al., 2007). La surface des fibres devient ainsi plus hydrophile par l'adsorption de protéines d'adhésion.

### II. 2. B. Ensemencements

Les cellules sont ensemencées à raison de 7 500 cellules sur toute la surface de la lamelle de verre. Pour la culture organotypique, 6 DRGs extraits d'embryons de rat au stade E15 sont déposés par lamelle sur les nanofibres de soie fonctionnalisées à l'aide d'une P20.

Le milieu d'incubation des cellules utilisé est le milieu F-12 (Gibco) contenant du L-glutamine enrichi en 10% de sérum de cheval (Gibco), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. L'ensemble est introduit dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les 1 mL de milieu ont été changés toutes les 48 heures.

## II. 3. Immunomarquages

Pour observer et étudier la survie et la croissance des différentes populations cellulaires sur les nanofibres de soie fonctionnalisées, des marquages par immunofluorescence directe et indirecte ont été réalisés sur les lamelles de verre.

Les cellules et les DRG ont été fixés à différents temps post-ensemencements dans une solution de paraformaldéhyde à 4% en PBS pendant 15 min et 45 min, respectivement, à température ambiante puis rincés trois fois avec du PBS. Les échantillons ont été perméabilisés dans du Triton X-100 à 0,5% dans du PBS pendant 5 minutes à température ambiante puis rincés deux fois avec du PBS avant incubation 1 h à température ambiante dans 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) dans du PBS.

Pour le marquage des neurones, les cellules sont incubées dans l'anticorps primaire de lapin anti-βIII tubuline (Sigma-Aldrich, France) dilué (1:150) dans du PBS/BSA 0,1% à température ambiante pendant 1h30. Les cellules ont été lavées deux fois avec 0,1% de BSA

dans du PBS. L'anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Cy3 anti-IgG de lapin (Jackson ImmunoResearch) dilué (1 :100) a par la suite été ajouté et incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 1h30. Pour visualiser les noyaux et différencier les cellules gliales, 40,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI; 1 µg/mL, Sigma) et de la phalloïdine-X5-505 (0,16 nmol/mL, Fluoroprobes - France) ont été ajoutés et incubés à température ambiante dans l'obscurité pendant 1h30. Les échantillons ont ensuite été rincés avec du PBS puis montés dans du Mowiol.

Les échantillons immunomarqués ont été observés en utilisant un microscope Leica DMI 6000 ou un microscope confocal LSM 710 (Zeiss) dont les images ont été analysées avec le logiciel «Zen 2011 » de Zeiss. Les images ont également été analysées en utilisant le logiciel Matlab de MathWorks. Dans chaque image, le nombre de cellules a été déterminé en utilisant le signal de coloration DAPI. Ensuite, chaque neurite a été isolé en utilisant la coloration de la tubuline et sa longueur a été mesurée à l'aide des fonctions proposées par le logiciel. Les résultats ont été interprétés en déterminant le nombre moyen de neurites par cellule et la longueur moyenne des neurites.

### **III. Caractérisation physico-chimique du Biomatériau de soie fonctionnalisée**

Le matériau à base de nanofibres de soie a été caractérisé par différentes techniques physico-chimiques afin d'obtenir des informations sur la morphologie des fibres, les propriétés structurelles et chimiques du polymère de fibroïne fonctionnalisée ou non. D'autre part, une évaluation du biomimétisme des conduits nerveux de soie a aussi été réalisée. En effet, la morphologie du conduit par observations microscopiques et ses propriétés mécaniques ont été comparées à celles du nerf sciatique du rat.

#### **III. 1. Analyse des propriétés morphologiques des nanofibres**

##### **III. 1. A. Microscopie électronique à balayage (MEB)**

Les échantillons de nanofibres de soie fonctionnalisées ont été revêtus d'or/palladium par pulvérisations cathodique (SC7620 Sputter coater, Quorum, UK) et ensuite insérés dans le champ d'émission du MEB (Supra 55, Zeiss, NY) soumis à un gain de 5

kV. Pour les échantillons sur lamelles de verre, les images obtenues au MEB permettent de définir le diamètre moyen des nanofibres ainsi que l'angle moyen de déviation entre les fibres. Le traitement des images MEB sur Matlab et ImageJ permettent d'extrapoler les deux paramètres précédemment mentionnés. Le diamètre des fibres est obtenu grâce à un programme spécialement conçu sur Matlab tandis que l'évaluation de l'alignement se fait sur ImageJ. Le diamètre et l'angle de déviation ont été mesurés sur plus de 400 fibres.

La MEB a aussi été utilisée pour analyser la morphologie des nouveaux conduits nerveux 3D de soie fonctionnalisée. Les tubes de soie ont été sectionnés en fines coupes transversales (1-2mm) à l'aide d'un scalpel. Ces coupes ont permis de déterminer le nombre et le diamètre des canaux présents dans le tube. Le tube a aussi été sectionné en tranches longitudinales pour définir l'alignement et le diamètre des fibres présentes dans le conduit nerveux.

### **III. 1. B. *Mesure de la rugosité de surface des nanofibres***

Afin de vérifier la surface d'échange entre les nanofibres de soie et les cellules nerveuses, des mesures de rugosité ont été faites sur le matériau. Elles sont réalisées à l'aide d'un microscope interférométrique ZygoTM NewView200 qui utilise la Fréquence d'Analyse de Domaine (FDA) pour générer des images 3D quantitatives de surfaces (de Groot and Deck, 1994). L'interféromètre utilise un filtre de lumière blanche sur la base d'une longueur d'onde centrale de 600 nm. Les modèles d'interférence ont été enregistrés par une caméra CCD. Chaque mesure contient 320 x 240 points de données.

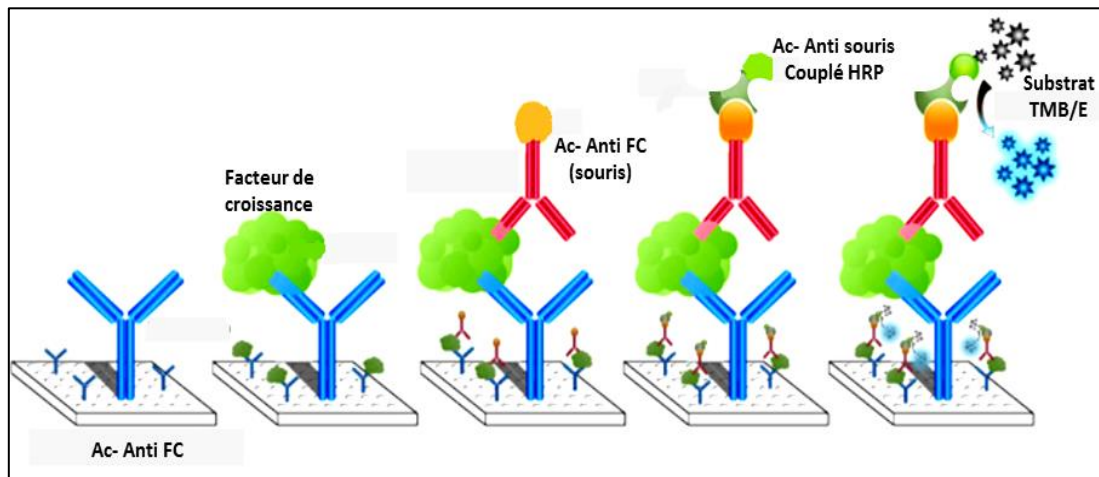
### **III. 2. Analyse chimique de la fonctionnalisation des nanofibres de soie**

La présence de facteurs de croissance au sein de notre matrice de soie fonctionnalisée est démontrée par une méthode immunologique standard, le test ELISA. La non influence des facteurs de croissance sur les propriétés structurales et cristallisantes du polymère naturel de fibroïne est vérifiée par deux techniques d'analyses chimiques.

#### **III. 2. A. *Dosage d'ImmunoAdsorption par Enzyme Liée***

La présence et l'éventuelle diffusion vers le milieu extérieur, des Facteurs de Croissance (FC) contenus dans les nanofibres de soie ont été quantifiées par la réalisation d'un Enzyme Linked ImmunoabSorbent Assay en sandwich (ELISA) (**Figure 20**). Les dosages de NGF et CNTF sont réalisés avec le ChemiKine NGF Sandwich ELISA Kit n° CYT304

(Millipore, France) et Raybio® Rat CNTF ELISA (TEBU-BIO, France), respectivement, selon les instructions du fabricant. Pour quantifier la concentration des facteurs de croissance initialement incorporés aux nanofibres, les lamelles de verres ou les tubes ont été dissous dans 10 µl ou 1mL, respectivement, de 9,3 Mol/L de LiBr pendant 30 minutes à température ambiante. Puis, les échantillons sont de nouveaux dialysés dans 1 litre d'eau déminéralisée pendant 6 heures. La diffusion des FC et leurs stabilités au cours du temps ont été quantifiées sur 7 jours (CNTF) ou 10 jours (NGF) à 37°C.



**Figure 20 : Représentation schématique de la technique ELISA sandwich utilisée**

### III. 2. B. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les analyses FTIR ont été effectuées afin d'observer l'organisation de la structure secondaire de la fibroïne de soie électrofilée, fonctionnalisée, ou non. L'analyse des nanofibres est réalisée à l'aide d'un spectromètre Jasco FT/IR-6200 (Easton, MD), équipé d'une réflexion horizontale atténuée multiple (cristallin de ZnSe, Pike Tech., Madison, WI). Chaque mesure contient 64 scans avec une résolution nominale de 4 cm<sup>-1</sup> (nombre d'onde de 600 à 4000 cm<sup>-1</sup>) qui, couplée à une fonction Genzel-Happapodization donne la transformée de Fourier. Les structures secondaires des différents échantillons de fibroïne ont été identifiées à partir de spectres d'absorption grâce aux positions des pics de la région amide I (1595-1705 cm<sup>-1</sup>). La déconvolution de Fourier permet d'obtenir les différentes structures secondaires propres d'une protéine. L'ajustement des courbes a été réalisé par le logiciel Jasco Spectra-Manager Software (Jasco, Easton MD), comme décrit dans la littérature (Hu et al., 2011).



### III. 2. C. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La cristallisation de la fibroïne de soie fonctionnalisée ou non a été observée par DSC. La cristallisation d'un polymère est fonction de différents paramètres mécaniques tels que la dureté, l'élasticité et la résistance. En observant les différentes phases de cristallisation du biomatériau fonctionnalisé ou non, nous pourrions obtenir des informations sur les propriétés du polymère fonctionnalisé.

2 mg de conduit nerveux à base de nanofibres de soie ont été encapsulés dans des bacs en aluminium et chauffés dans un DSC (TA Instruments, New Castle, DE) avec un débit d'azote gazeux pour purger de 50mL/min. Le DSC est équipé d'un système de refroidissement réfrigéré. L'instrument a été étalonné avec de l'indium pour l'écoulement de la chaleur et de la température. L'aluminium et le saphir ont été utilisés comme étalon pour vérifier la capacité thermique. Les mesures de DSC ont été effectuées à une vitesse de 10°C/min.

### III. 3. Comportement mécanique du conduit nerveux de soie

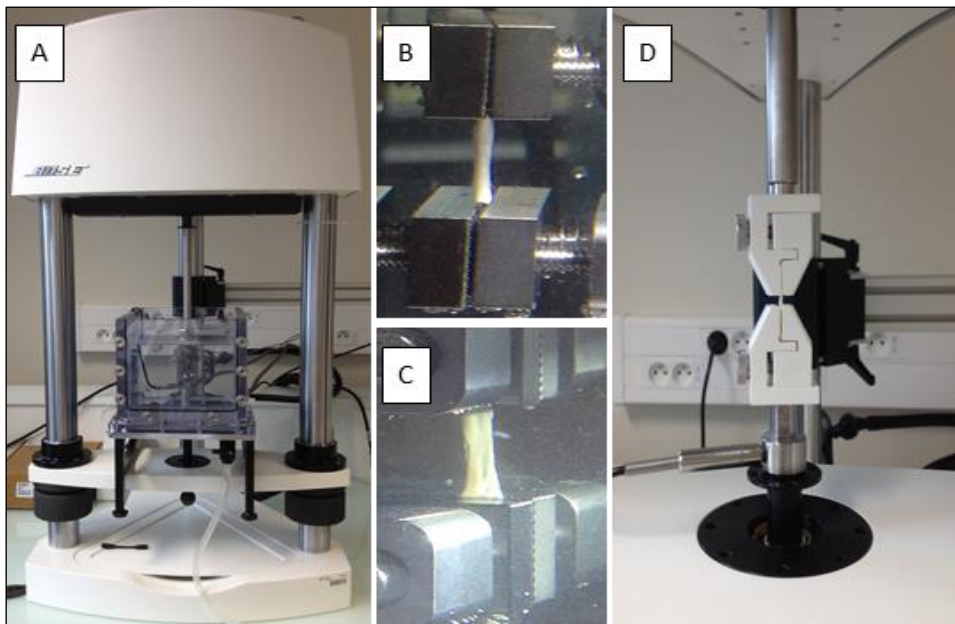
Des tests de tractions ont été menés dans le but de vérifier le caractère biomimétique des nouveaux conduits de soie fonctionnalisés. Ces tests ont été réalisés sur les conduits et comparés avec ceux du nerf sciatique du rat (lieu d'implantation du biomatériau pour les tests *in vivo*).

#### III. 3. A. Extraction du nerf sciatique du rat

Les nerfs sciatiques de rats mâles de l'espèce Sprague-Dawley (SD) du laboratoire Janvier Labs France ont été utilisés comme modèle. Quatre rats SD (8 nerfs) ont été utilisés. Toutes les procédures ont été effectuées en conformité avec la directive 2010/63/UE européenne. Les rats, hébergés dans l'animalerie de l'Université de Technologie de Compiègne (UTC), ont été introduits dans un environnement 12 heures de lumière - 12 heures nuit. Le poids moyen des rats SD à 12 semaines était de 356 g. Les animaux ont été euthanasiés avec un surdosage de pentobarbital de sodium (1mL pour 100g). Après l'euthanasie, les nerfs sciatiques droit et gauche ont été prélevés entre la rotule et le point d'échancrure sciatique puis stockés dans du Ringer lactate sur de la glace.

### III. 3. B. Test de traction

Huit conduits nerveux de soie ont été hydratés par immersion dans du Ringer lactate pendant 48h à température ambiante. Huit autres conduits ont été analysés secs. Pour les nerfs sciatiques de rats fraîchement disséqués, les tests de traction ont été réalisés le jour même. Les propriétés mécaniques telles que le module de Young, la charge maximale, la tension et l'élongation du nerf sciatique du rat ont ainsi été comparées à nos implants de soie secs ou humides. Les essais ont été réalisés à l'aide du dispositif ElectroForce 3230 (Bose Corporation, ElectroForce Systems Group, Minnesota, États-Unis) à température ambiante pour les conduits secs. Néanmoins, les essais réalisés sur les conduits nerveux de soie humides et les nerfs sciatiques de rat ont été réalisés dans un récipient contenant 5 litres de Ringer lactate à température constante de 37°C (**Figure 21**). La distance initiale entre les mors pour chaque échantillon a été normalisée à 3 mm avec un taux d'allongement de 0,06mm/s, ce qui correspond à une déformation de 0,02% (comme effectuée lors de précédentes études (Ma et al., 2011; Topp and Boyd, 2012)). La courbe de contrainte déformation et les différents paramètres mécaniques ont été déterminés par le logiciel WinTest (Bose Corporation, ElectroForce Systems Group, Minnesota, États-Unis).



**Figure 21 : Tests de traction effectués à l'aide de l'Electroforce 3230 Bose (A)**

*Les tests de traction se font en immersion dans le lactate ringer pour (B) le conduit nerveux de soie et (C) le nerf sciatique de rat. (D) Un autre échantillonnage de conduits nerveux de soie sont effectués à l'air ambiant.*

## **IV. Evaluation *in vivo* des conduits nerveux de soie fonctionnalisés chez le rat**

L'évaluation de la régénération nerveuse chez le rat, suite à l'implantation du conduit nerveux de soie fonctionnalisée au niveau du nerf sciatique, s'est faite par enregistrement cinématique. Dans un second temps, l'implant a été prélevé pour l'évaluation histologique des fibres nerveuses et/ou de leur degré de remyélinisation par la présence de cellules de Schwann et de gaines de myéline autour des axones.

### **IV. 1. Protocole chirurgical**

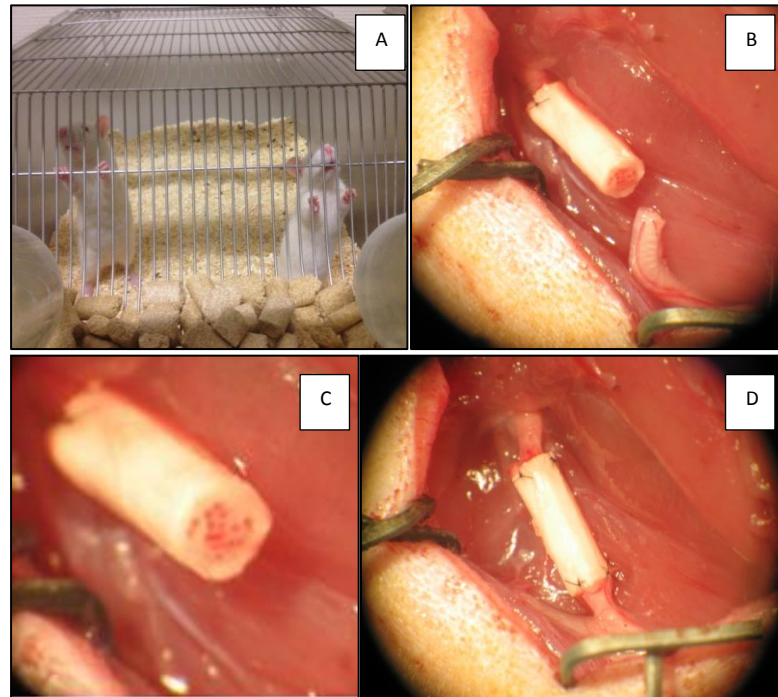
Dix rats Sprague-Dawley mâles (Harlan, France) pesant environ 200-250 g ont été utilisés pour cette étude. Ils ont été divisés en deux groupes, l'un comme contrôle puis l'autre greffé par notre implant fonctionnalisé. Tous les animaux ont été hébergés dans des cages en plastique sur sciure de bois dans une salle à température, ventilation et humidité contrôlées. Un cycle artificiel de lumière/nuit de 12h a aussi été créé. Les animaux ont été nourris et approvisionnés en eau de façon *ad libitum*. Tous les animaux ont été pesés avant chaque expérimentation. Durant nos expérimentations, aucun signe clinique de douleur ou de sensation déplaisante supérieur à celle de la piqure d'une aiguille n'ont été observé chez l'ensemble des rongeurs. Toutes les procédures ont été effectuées avec l'approbation des autorités vétérinaires de France conformément à la directive du Conseil des Communautés européennes du 22 Septembre 2010:63 / UE.

#### **IV. 1. A. Greffes des conduits nerveux de soie artificiels**

L'anesthésie et les procédures chirurgicales ont été effectuées par un chercheur titulaire du certificat d'autorisation d'expérimentation animale de niveau I (agréé par le ministère de l'Agriculture et de la Pêche sous la direction de la santé et de la protection animales) et d'un neurochirurgien.

Les tubes de soie fonctionnalisés par le NGF et CNTF sont immergés pendant la nuit à 4°C dans du PBS stérile, puis suturés (10-0 suture FG 2850; Ethicon, Somerville, NJ) à un nerf sciatique de rat pesant 150/200g. Les animaux (10, 200-250g) ont été profondément anesthésiés avec une combinaison de kétamine (60 mg/kg) et de xylazine (6 mg/kg). La chirurgie a été effectuée sur la jambe droite du rat, dans des conditions aseptiques.

L'intervention chirurgicale a été réalisée à l'aide d'un microscope opératoire (STEMI SV8, Zeiss). Une lésion de 5 mm du nerf sciatique a été créée par ablation chirurgicale du tissu nerveux avec des micro-ciseaux après application locale de lidocaïne (2mg/mL). Les conduits sont interposés dans la lésion de 5 mm (**Figure 22**). Les extrémités distales et proximales du nerf ont été ensuite suturées au conduit par des micro-sutures 10-0 de nylon tandis que la peau a été suturée avec des sutures absorbables 4-0 en nylon (Ethicon).



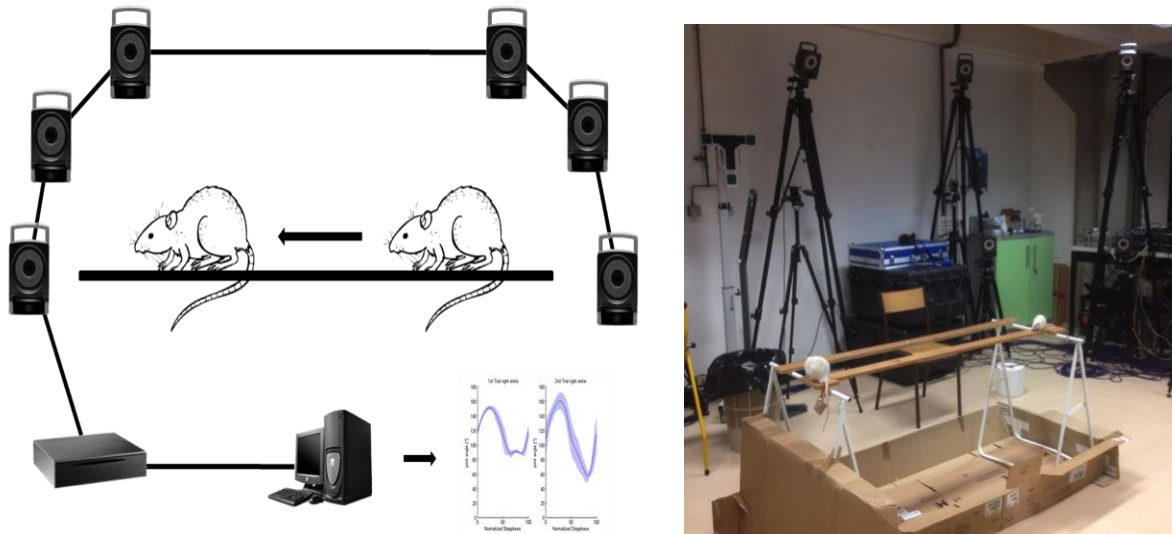
**Figure 22 : Implantation du conduit nerveux de soie au niveau du nerf sciatique chez le rat**  
*Le greffon est implanté chez (A) le rat SD au niveau du (B) nerf sciatique. La partie proximale est d'abord suturée puis (C) la partie distale est suturée dans un second temps (D).*

#### **IV. 1. B. Réveil et soins post-opératoires des animaux**

Suite à la greffe du biomatériau, les points de suture du rat sont désinfectés à la Bétadine puis 1mL de sérum physiologique est injecté à la base du cou afin de compenser une éventuelle déshydratation due à la chirurgie. L'animal est logé dans la salle d'isolement de l'animalerie de l'UTC et placé dans une cage avec sciure contenant de la nourriture et de l'eau. Les soins post-opératoires incluent l'injection intrapéritonéale de xylazine (10 mg/kg) une fois par jour pendant 3 jours. Les rats sont, par la suite, pesés tous les jours la première semaine après la chirurgie, puis à raison d'une fois par semaine.

## IV. 2. Etude cinématique de la locomotion

Les animaux ont été formés et entraînés à raison d'une fois par semaine à marcher



sur une piste en bois (150cm x 10 cm x 1 cm) à vitesse de marche habituelle (**Figure 23**). Les séances d'entraînements sont de dix minutes par renforcement positif à l'aide de Corn Flakes (2 Corn Flakes donnés à la main chaque jour) pour améliorer les performances. Nous avons minimisé le stress en réduisant les niveaux de bruit et la manipulation des rats pour obtenir une locomotion dans les meilleures conditions possibles.

### Figure 23 : Représentation du système établi pour l'étude de la locomotion

(A) Setup du système Vicon utilisé pour l'étude de la locomotion (B) Photographie du montage établi pour l'analyse de la marche du rat.

L'enregistrement des paramètres cinématiques a été effectué à deux reprises, à 3 et 6 mois après l'implantation du greffon. Le système de capture de mouvement Nexus VICON (T160), contenant dix-sept caméras, a été utilisé pour enregistrer la locomotion chez le rat un taux de 100 Hz (Vicon mouvement systèmes Inc., Oxford, Royaume-Uni) (**Figure 23**). Les poils ont été coupés autour des membres postérieurs, afin d'améliorer le placement des marqueurs pour l'analyse. Le même opérateur effectue tous les placements de marqueurs pour éviter les erreurs de variabilité. Les rats ont été équipés de dix marqueurs réfléchissant les infrarouges (3M Scotchlite, Minnesota, USA) selon les repères anatomiques suivants: crête iliaque, le grand trochanter (hanche), le genou, la malléole externe (cheville) et la cinquième articulation métatarsophalangienne (MTP). Les données obtenues ont été filtrées

à 20 Hz en utilisant un filtre de Butterworth d'ordre 2. De par la position 3D des marqueurs dans l'espace, l'évolution des angles articulaires ont été obtenus grâce au logiciel Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA). Par ailleurs, la longueur de foulée et le dédouanement ont aussi été pris en compte pour les paramètres de la marche. La longueur du pas est définie comme la distance entre les marqueurs du cinquième métatarsien (tête de la patte arrière) sur deux étapes consécutives. Le dégagement de foulée a été définie comme étant la hauteur maximale de la tête métatarsienne (cinquième marqueur de la patte arrière) au cours de chaque étape et normalisé par rapport à la hauteur du corps.

Les habitudes de marche consécutives ont été divisées en différentes étapes et les données d'origine ont été normalisées à 101 points de données par étape, quelle que soit sa durée.

### **IV. 3. Histologie**

Après la période de 6 mois post-implantation, le nerf sciatique est prélevé avec son greffon ainsi que les tissus mous environnants. Le tissu prélevé est d'abord nettoyé des tissus parasites puis lavé dans du PBS. Le tissu est ensuite fixé dans du liquide de Bouin et stocké à 4°C. Les échantillons sont déshydratés par immersions successives dans des bains d'alcool de concentration croissante (i.e., 70%, 90%, 95% et 100%). Après un bain de toluène, les échantillons sont placés dans des moules et noyés dans de la paraffine. Après imprégnation de la paraffine dans l'échantillon, des sections de 5 µm d'épaisseur sont ensuite effectuées à l'aide d'un microtome (Lemardeley, Paris, France) et collectées sur des lames histologiques.

Finalement, les lames sont successivement immergées dans une solution d'hématoxyline (structures acides : ADN et ARN), d'eau distillée, d'éosine (structures basiques : protéines du cytoplasme) et de safran (collagène). Les coupes sont finalement déshydratées puis montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage (Eukitt) puis observées au microscope (Leica Microsystems, Germany).

## **V. Statistiques**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Les données ont été comparées en utilisant une ANOVA, suivie par un Tukey-Kramer, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis en fonction des paramètres et échantillons comparés à l'aide du logiciel InStat (Software Inc., GraphPad, San Diego, CA).

Par exemple, la longueur des neurites par cellule a été comparée par ANOVA Kruskal-Wallis). Une valeur P inférieure à 0,05 était considérée comme significative. Le nombre moyen de neurites par cellule ainsi que le ratio cellules gliales/neurones ont été analysés pour chaque condition sur au moins 90 cellules. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Mann-Whitney non apparié avec test bilatéral. Les propriétés mécaniques de chaque groupe ont été comparées en utilisant ANOVA non paramétrique (Kruskal-Wallis test et post-test hoc Tukey). Une valeur P inférieure à 0,05 était considérée comme significative.

## Chapitre 3 Résultats

---



Les résultats sont présentés sous forme de cinq articles scientifiques. La création de nanofibres alignées de soie est décrite dans le premier article. Il vérifie l'influence de ces nanofibres permettant d'orienter la culture des cellules de différents types d'explants. Les nanofibres ont par la suite été fonctionnalisées par un facteur de croissance, le NGF (article 2) puis bi-fonctionnalisées par 2 facteurs de croissance, le NGF et CNTF (article 3). L'effet de cette fonctionnalisation a été évalué pour la régénération nerveuse. Enfin, le design et l'analyse physico-chimique des conduits nerveux sont présentés dans l'article 4 pour implantation chez le rat. L'évaluation de la reprise fonctionnelle de la marche chez le rat a été vérifiée après implantation de notre conduit à base de soie au niveau du nerf sciatique (article 5).

**Article 1 :** Organotypic culture to assess cell adhesion, growth and alignment of different organs on silk fibroin, published in *J Tissue Eng Regen Med* 2014.

**Article 2:** Method to form a fiber/growth factor dual-gradient along electrospun silk for nerve regeneration, published in *ACS Appl. Mater. Interfaces*.

**Article 3:** Complementary Effects of Two Growth Factors in Multifunctionalized Silk Nanofibers for Nerve Reconstruction, accepted by *PlosOne*.

**Article 4:** 3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration, accepted by *J Mech Behav Biomed Mater*.

**Article 5:** Hindlimb kinematics during overground locomotion in rats following sciatic nerve injury submitted to *Behav. Brain Res*.

Après avoir préparé les solutions pures en fibroïne de soie, les paramètres optimums pour le filage des nanofibres ont été identifiés. Ces paramètres se définissent par la concentration de la solution en SF et du système à électrospinning dont le voltage alimenté par le générateur, le design et la distance du ou des collecteurs. Les nanofibres de soie ont tout d'abord été déposées sur lamelles de verre. Ces dernières sont alignées les unes par rapport aux autres afin de promouvoir une croissance cellulaire orientée.

Les lamelles de verre obtenues sont recouvertes de nanofibres de SF alignées. L'objectif de ce premier article consiste à évaluer la cytotoxicité du scaffold créé par culture d'explants. De plus, la croissance et l'adhérence cellulaire sont des paramètres pertinents pour la validation d'un biomatériau implantable. De ce fait, la culture d'explants sur nos lamelles de verres recouvertes de nanofibres a été comparée à celle sur lamelles Thermo Scientific™ Nunc™ Thermanox™. Les lamelles Nunc™ Thermanox™ sont des lamelles pourvues d'une surface hydrophile dotée d'un film de polyester qui permet une meilleure adhérence cellulaire. Elles sont couramment utilisées pour la culture des tissus.

La méthode utilisée pour comparer les deux matériaux est la culture organotypique. La culture organotypique est une méthode rapide, économique et relativement simple qui permet d'évaluer différents paramètres. Ces paramètres permettent une présélection de la morphologie et cytocompatibilité pour sélectionner de nouveaux biomatériaux pour des applications biomédicales. Plusieurs explants de différents organes d'embryons de poulet sont déposés sur les deux types de lamelles. Ces cultures permettent ainsi d'évaluer la réponse des cellules en fonction du biomatériau utilisé par l'appréciation de trois paramètres : L'adhérence, la croissance et la circularité. L'adhérence des cellules sur les différents matériaux est déterminée grâce au taux de décollement des cellules en fonction du temps. Ce taux de décollement est fonction de la force d'adhésion. La croissance des cellules est représentée par la couche cellulaire qui entoure l'explant mesuré en mm<sup>2</sup>. Enfin, le dernier paramètre est fonction des nanofibres alignées de soie qui est la circularité. La circularité est un paramètre propre à un biomatériau qui permet d'induire une directivité spécifique à cette couche cellulaire autour de l'explant.

Dans la présente étude, nous avons comparé la morphologie et la croissance de différentes cultures organotypiques sur soie alignée et sur lamelle de Thermanox pour évaluer rapidement le biomatériau à base de soie.

## ARTICLE I

### **Organotypic culture to assess cell adhesion, growth and alignment of different organs on silk fibroin**

Jean-Luc Duval<sup>1</sup>, Tony M Dinis<sup>1,2</sup>, Guillaume Vidal<sup>1</sup>, Pascale Vigneron<sup>1</sup>, David L Kaplan<sup>2</sup> and  
Christophe Egles<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), UMR CNRS 7338, Université de Technologie de Compiègne, Rue Roger Couttolenc, CS 60319 - 60203 Compiègne Cedex, France*

<sup>2</sup> *Biomedical engineering, Science & Technology Center, 4 Colby Street, Tufts University, Medford, MA 02155, USA*

<sup>3</sup> *Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Tufts University, School of Dental Medicine, 1 Kneeland St, Boston, MA 02111, USA*

**Short title: Silk Fibroin biocompatibility assessment using organotypic culture**

Corresponding author:

Christophe EGLES

UMR CNRS 7338, Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), Université de Technologie de Compiègne, France

Email [\*\*christophe.Egles@utc.fr\*\*](mailto:christophe.Egles@utc.fr)

Phone : + 33 3 44 23 44 22

## **Abstract**

Glass sheets covered with aligned electrospun silk fibroin (*Bombyx mori*) were compared to tissue-culture treated Thermanox® coverslips using an organotypic culture method. Different chick embryo organ behaviors were analyzed in term of circularity, cell growth and cell adhesion after being cultivated in contact with these two materials. The circularity (cell layer shape corresponding to the trend of the biomaterials to induce a specific directionality) depends on the organ used when in contact with silk fibroin. This biomaterial induced higher cell adhesion (kidney) or lower cell adhesion (spine) compared to Thermanox®. Cell growth represented by the cell layer area (mm<sup>2</sup>) was also drastically reduced (gonad) or increased (blood vessel) on the silk fibroin. Organotypic culture is a rapid, cost effective and relatively simple method to evaluate different parameters, allowing prescreening of morphology and cytocompatibility to select the appropriate application for new biomaterials.

**Keywords:** silk fibroin; electrospinning; organotypic culture; biocompatibility; cell adhesion; cell morphology

## Introduction

Organotypic culture promoted by Wolff and Haffen (Wolff and Haffen 1952) has been widely used to assess the biocompatibility of various biomaterials (Sigot-Luizard et al., 1986; Duval et al. 1988; Duval et al. 1992, Duval et al., 2006; Demangel et al., 2012; Brunot-Gohin et al., 2013). This method allows rapid estimates of primary cell layer parameters such as adhesion, growth, proliferation and morphology, therefore helping to select biomaterials as a function of their capacities in enhancing these features. These systems are also used to evaluate the behavior of different organs in silicone micro-channel co-cultures (Leclerc et al., 2007; Leclerc et al., 2009). As an example, an intraocular implant requires different cell behavior than vascular or dental prostheses. Since the late eighties, grooved materials have been known to influence cell alignment (von Recum and van Kooten 1995, Vernon et al., 2005, Lamers et al., 2012). Among the variety of materials tested, silk fibroin is increasingly being recognized as a promising biomaterial because of its qualities (natural origin, biocompatibility, biodegradability) for tissue engineering. There are three source materials for silks for these applications: the domestic silkworm (*Bombyx mori*) (Minoura et al., 1995, Soffer et al., 2008), spiders (Gellynck et al., 2008), and ants and bees (Siri and Maensiri 2010; Wittmer et al., 2011). The ease of processing, biocompatibility, remarkable mechanical properties and tailorable degradability of silk fibroin has been explored for the fabrication of various materials such as films, porous matrices, hydrogels, nonwoven mats, among others, and the material has been investigated for use in various tissue engineering applications, including bone, tendon, ligament, cartilage, skin, liver, trachea, nerve, cornea, eardrum, tooth, bladder, or kidney (Soffer et al., 2008; Kim et al., 2009; Murphy and Kaplan 2009; Subramanian et al. 2010; Kasoju and Bora 2012; Kasoju and Bora 2013; Liu et al., 2012; Vidal et al., 2013a).

Silk materials can also be functionalized using bioactive molecules by different techniques. Functionalized biomaterials with bioactive molecules promote cell attachment, growth and differentiation in order to regulate tissue formation, regeneration or remodeling. For example, growth factors and cytokines can be covalently linked to silk, such as RGD peptide, for bone formation (Sofia et al., 2001), non-covalent interactions with Nerve Growth Factors (NGF) for nerve regeneration (Uebersax et al., 2007) or epidermal growth factor (EGF) for accelerating wound healing (Schneider et al., 2009). Silk has also been used

as a functionalized biomaterial to enhance the cell adhesion on titanium (Vidal et al., 2013b). The electrospinning of silk fibers allows the preparation of aligned fibers (Wittmer et al., 2011), providing guidance for directionality of contact cell growth.

Among the different histological families, we chose organs as a function of migration capacity or not (Sigot-Luizard MF and Sigot M., 1977), and their application's interest as small caliber vascular prosthesis, artificial liver, cornea etc..

The aim of the present study was to study silk biomaterial as a growth substrate for various embryonic organs to compare cell morphology, adhesion, growth and alignment, to maintain the in vivo complexity of these tissues.

## **Materials and methods**

### **1.1. Materials**

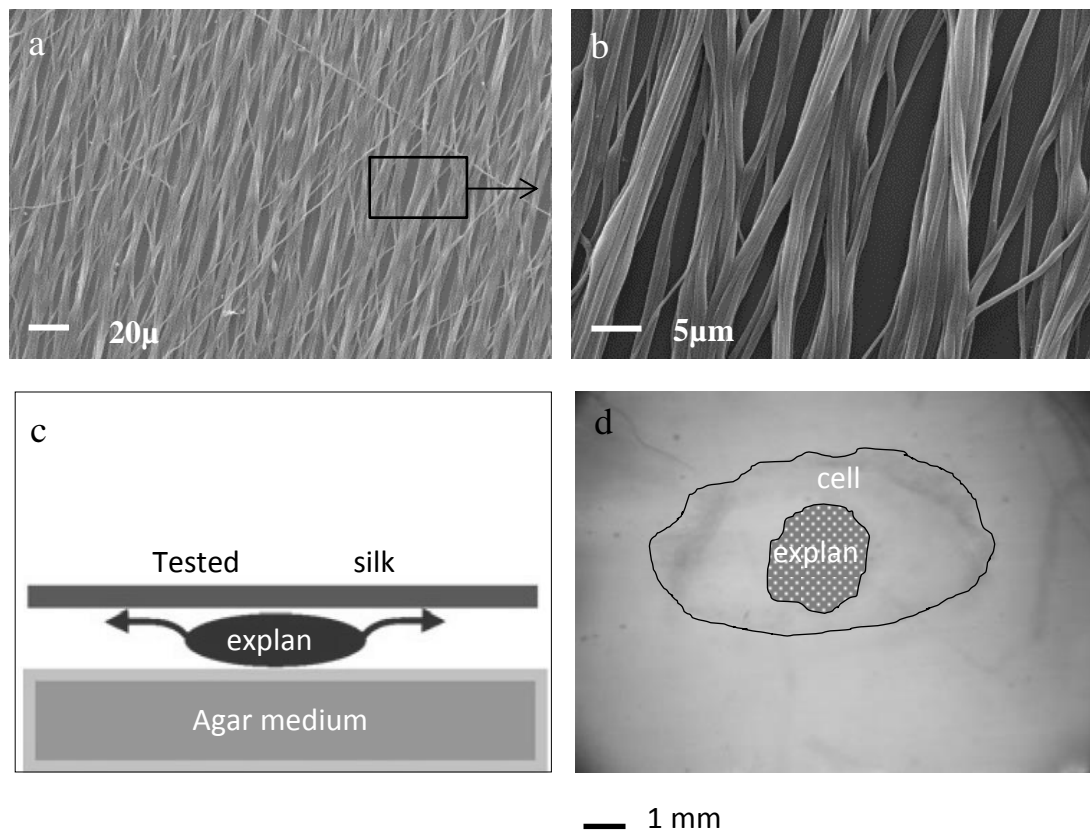
Glass sheets covered with silk fibroin: silk fibroin proteins are extracted from *B. mori* cocoons to obtain 8% Silk Fibroin (w/v) solution by dialysis in salt solution, then electrospun at 12kV to generate aligned nanofibers (alignment : 98% Ra = 0.005 $\mu$ m). Before spinning, the silk fibroin aqueous solutions were blended with 5% polyethylene oxide (w/v) in the volume ratio 1:4 to improve fiber spinning, increasing the viscosity of the solution. An oscillating collector was used to align the silk nanofibers using a mandrel (rotating speed: 9.5 m/s). This material was compared for cell responses to tissue cell culture plastic (Thermanox<sup>®</sup>, Nunc<sup>®</sup> batch # 628934).

### **1.2. Methods**

#### **1.2.1. Organotypic culture**

Organotypic culture method (Figure 1) was used to examine cell responses to the silk fibers. Culture dishes were pretreated with nutrient medium consisting of 50% Bactoagar 1% (Difco<sup>®</sup>, Fisher, France) in Gey's solution, 38.5% DMEM (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 10% Fœtal Calf Serum (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 1% L-glutamine (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and 0.15% penicillin/streptomycin solution (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Organs were isolated from 14-day-old White Leghorn's chicken eggs and placed in sterile PBS. The tissues were cut into 1 mm<sup>2</sup> pieces and

placed onto the bottom of 70 cm<sup>2</sup> Pétri dishes (Dominique Dutscher, Brumath, France). Twelve tissue fragments were placed in each Pétri dish and a 1 cm<sup>2</sup> piece of electrospun silk material was deposited on each of these fragments. The chick embryo organs were: kidney, liver, intestine, gonad, cornea, brain, gizzard, spine, lung and blood vessel.



**Figure 1: Description of the organotypic culture method**

(a) silk fibroin fibers observed by SEM (1000X) (b) silk fibroin fibers observed by SEM (5000X)  
(c) organotypic culture technique showing the test material on the explant growing on agar medium (d) cell layer area observed using light microscope (X20)

### 1.2.2. Cytocompatibility

The cultures were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 7 days after which the materials were removed and stained with neutral red. Next, the total surface area covered by tissue was measured using a stereomicroscope equipped with camera and ImageJ software (Abramoff et al., 2004). This area corresponded to the total surface of the cell layer minus the initial explant surface. Additionally, the cells were detached from the materials using

0.025% trypsin-EDTA (Gibco®, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in Isoton®II electrolyte solution (Beckman Coulter, Villepinte, France).

The rate of cell detachment was determined by counting the detached cells with a Multisizer® (Beckman Coulter, Villepinte, France) after 5, 10, 20, 30 and 60 min. The rate of detachment as a function of time was used as a measure of adhesion strength, and we defined an arbitrary index.

### **1.2.3. Circularity measurement**

After 7 days of culture and before removing cells from the materials, the circularity of the cell layers was measured using ImageJ software on images collected from the stereomicroscope. The images were then opened with ImageJ software and were thresholded. The cell layers were highlighted on the image and the circularity value recorded. Circularity of “0” indicated an elongated polygon, whereas “1” was a perfect circle (Figure 5).

### **1.2.4. Scanning electron microscopy analysis**

Two pieces of each organ on each material were rinsed in PBS, fixed in 3% glutaraldehyde in Rembaum buffer (pH 7.4) (Rajaraman et al., 1974) for 1 h, dehydrated in a series of graded alcohols, critical-point dried from CO<sub>2</sub> (Polaron® Instrument Inc., Nottingham, UK), sputter-coated with gold (Polaron®) and examined in an environmental scanning electron microscope (XL 30-ESEM® FEG, Philips, Eindhoven, The Netherlands).

### **1.2.5. Statistical analysis**

All data are represented as means ± standard error. The data were compared using a one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test (GraphPad InStat® 3.01), thereby comparing silk fibroin and control samples Thermanox®. Probabilities of  $P < 0.001$  were considered to be statistically significant.



## Results

The results are summarized in Table 1. Three main parameters were used to distinguish cell behavior cultivated on the material: (a) cell layer shape (circularity), (b) cell growth (mm<sup>2</sup>) which is the surface of the migration area from the initial explant after culture on the material and (c) cell adhesion (arbitrary units) which is assessed as the kinetics of cell detachment over time.

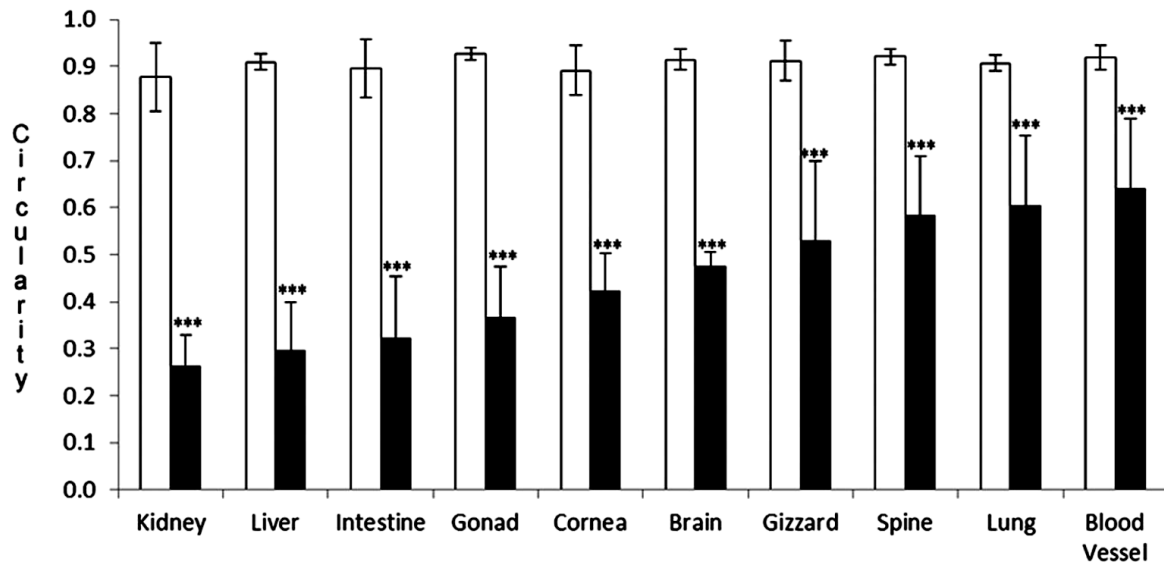
(a)	Cell growth on Thermanox (mm <sup>2</sup> )	Cell growth on silk fibroin (mm <sup>2</sup> )
Brain	10.6 ± 2.48	9.66 ± 3.95
Liver	14.12 ± 5.8	15.68 ± 6.17
Kidney	25.07 ± 10.53	15.81 ± 3.06
Intestine	7.43 ± 1.93	17.02 ± 5.76
Cornea	9.05 ± 4.53	19.28 ± 8.31
Lung	27.69 ± 5.06	19.31 ± 5.15
Gonad	80.75 ± 13.14	20.0 ± 10.5
Gizzard	27.58 ± 8.45	25.63 ± 7.12
Blood vessel	19.99 ± 5.23	27.21 ± 4.65
Spine	23.77 ± 5.81	27.52 ± 7.68
(b)	Cell adhesion on Thermanox (arb. units)	Cell adhesion on silk fibroin (arb. units)
Spine	0.244 ± 0.012	0.2048 ± 0.02
Brain	0.208 ± 0.012	0.2545 ± 0.019
Intestine	0.276 ± 0.018	0.2639 ± 0.012
Blood vessel	0.2771 ± 0.01	0.3195 ± 0.01
Cornea	0.223 ± 0.015	0.3235 ± 0.018
Gizzard	0.233 ± 0.010	0.3239 ± 0.012
Liver	0.2074 ± 0.01	0.3264 ± 0.015
Lung	0.2745 ± 0.01	0.333 ± 0.01
Gonad	0.2001 ± 0.01	0.3542 ± 0.018
Kidney	0.2365 ± 0.01	0.4025 ± 0.008
(c)	Circularity on Thermanox	Circularity on silk fibroin
Kidney	0.877 ± 0.073	0.264 ± 0.066
Liver	0.909 ± 0.017	0.298 ± 0.1
Intestine	0.895 ± 0.062	0.322 ± 0.131
Gonad	0.927 ± 0.012	0.366 ± 0.108
Cornea	0.891 ± 0.053	0.424 ± 0.078
Brain	0.915 ± 0.023	0.476 ± 0.03
Gizzard	0.912 ± 0.043	0.529 ± 0.169
Spine	0.921 ± 0.017	0.585 ± 0.125
Lung	0.907 ± 0.017	0.604 ± 0.15
Blood vessel	0.919 ± 0.026	0.641 ± 0.148

**Table 1: Summary of the results obtained with the different types of tissue**

*(a) cell growth; (b) cell adhesion; (c) circularity. The results are presented with the ascending values on the silk experiments*

Figure 2 shows the influence of the alignment of the fibers by measuring the differences between the circularity of the cell layers cultured on the Thermanox® compared to those cultured on silk fibroin. The circularities of the cell layers on the Thermanox® are estimated at around 0.9 and no significant differences were observed regardless of the organ. Nevertheless, the shapes of the different cell layers cultured on the silk fibroin shows

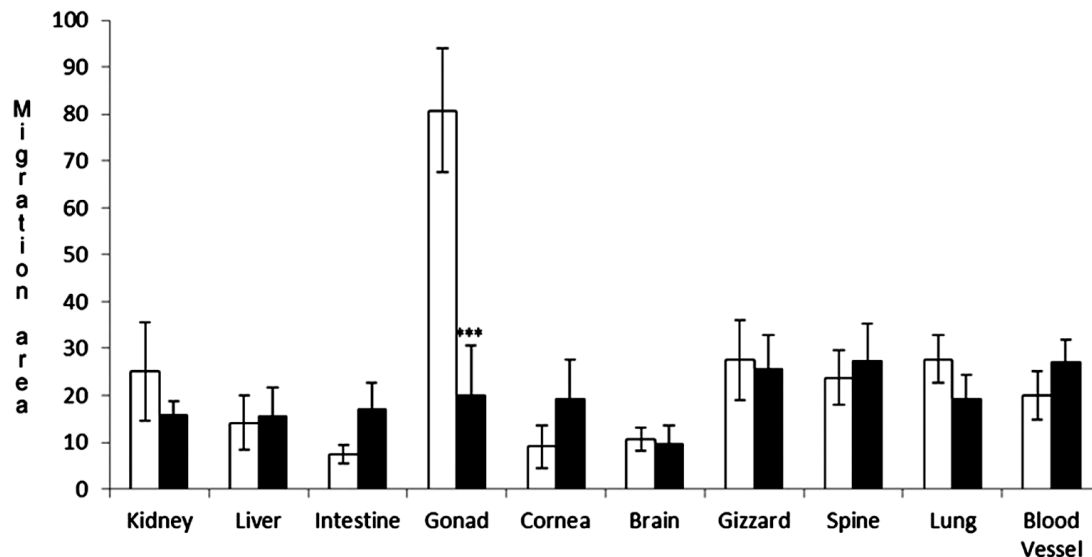
values increasing from 0.264 (kidney) to 0.641 (blood vessel). These last results are significantly ( $P < 0.001$ ) different when compared to Thermanox®.



**Figure 2: Circularity of the cell layers grown on Thermanox® (white) and Silk Fibroin (black)**  
*The results are the mean  $\pm$  SD of 10 measurements ( $n = 10$ ) \*\*\* $P < 0.001$  significantly different of Thermanox®*

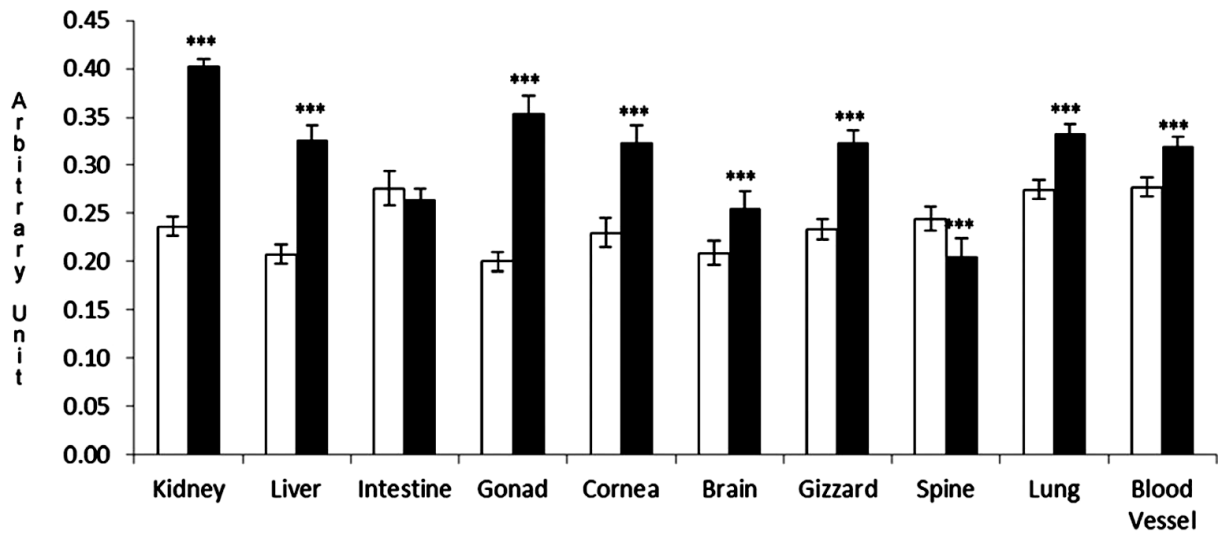
Before trypsinization of the cell layers, areas were assessed with ImageJ (Figure 3). The cell layer areas of the different organs were correlated with the ability of the cells to migrate on the biomaterial. No significant differences between the cell layer areas were found except the gonad (known for its cell migration potentiality (Sigot-Luizard et Sigot 1977) which presents a significant difference in its migration behavior between Thermanox® and the silk fibroin. The aligned silk fibroin did not significantly modify the migration behavior of the chick embryo organs in our culture conditions.

After cell dissociation and counting, the cell adhesion parameter was estimated using an arbitrary index inversely proportional to the cell detachment kinetics (ratio of cells detached by enzymatic treatment as a function of time). Interestingly, Figure 4 shows significant results for cell adhesion between organs and between materials. Silk fibroin significantly enhanced cell adhesion compared to Thermanox® for all organs. The most important difference between cell adhesion provided by silk fibroin compared to Thermanox® was observed for the kidney and gonad. This correlated with migration decreasing (Figure 3) on these two organs. Comparatively, the intestine presented no significant difference for cell adhesion between silk fibroin and Thermanox®.

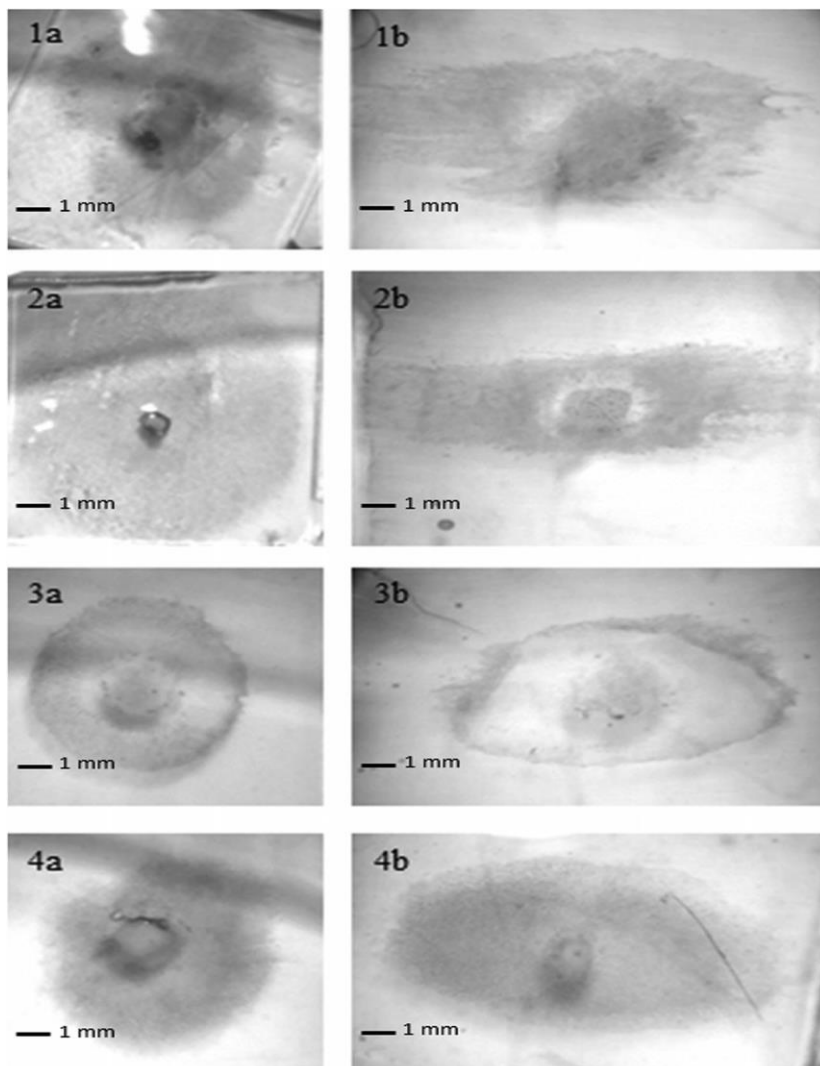


**Figure 3: Cell growth of the organs on Thermanox® (white) and silk fibroin (black) (mm<sup>2</sup>)**  
*The results are the mean ± SD of 10 measurements (n = 10) \*\*\*P < 0.001 significantly different of Thermanox®*

The morphological differences in the cell behavior observed for the chick embryo organs in term of circularity, light and scanning electron microscopy are shown in Figures 5 and 6. Figure 5 demonstrates the modifications on the four selected examples (kidney, gonad, lung, blood vessel) of cell layer shapes on silk fibroin compared to Thermanox®. These results correlate with the circularity measurements previously described. Scanning electron microscopy images (Figure 6), shows the kidney cells (1a-b) with larger cell shapes on the silk fibers compared to Thermanox® which correlates with the higher adhesion provided by the silk fibroin. The shape of gonad cells (2a-2b) was different when grown on the Thermanox® compared to the aligned silk fibers, showing a large square region in the first case but elongated in the direction of the fibers on the second. This behavior is due to the adhesion of these cells on the silk fibers associated with decreased migration. This result is comparable to lung cells (3a-3b) which showed greater cell adhesion on the silk fibers. The vascular cells (4a-4b) were not influenced by the silk fibers compared to Thermanox® providing a good compromise between migration and adhesion, a compromise which is important for small vessel reconstruction and reendothelialization (Sgarioto et al., 2012, Almelkar et al., 2013).



**Figure 4: Cell adhesion assessment of the organs on Thermanox® (white) and Silk Fibroin (black)(arbitrary unit). The results are the mean  $\pm$  SD of 10 measurements ( $n = 10$ ) \*\*\* $P < 0.001$  significantly different of Thermanox®**



**Figure 5: Light microscopy photos (20x) of the cell layer shapes of 4 different organs (1) Kidney (2) Gonad (3) Lung (4) Blood vessel, cultured on (a) Thermanox® and (b) silk fibroin**

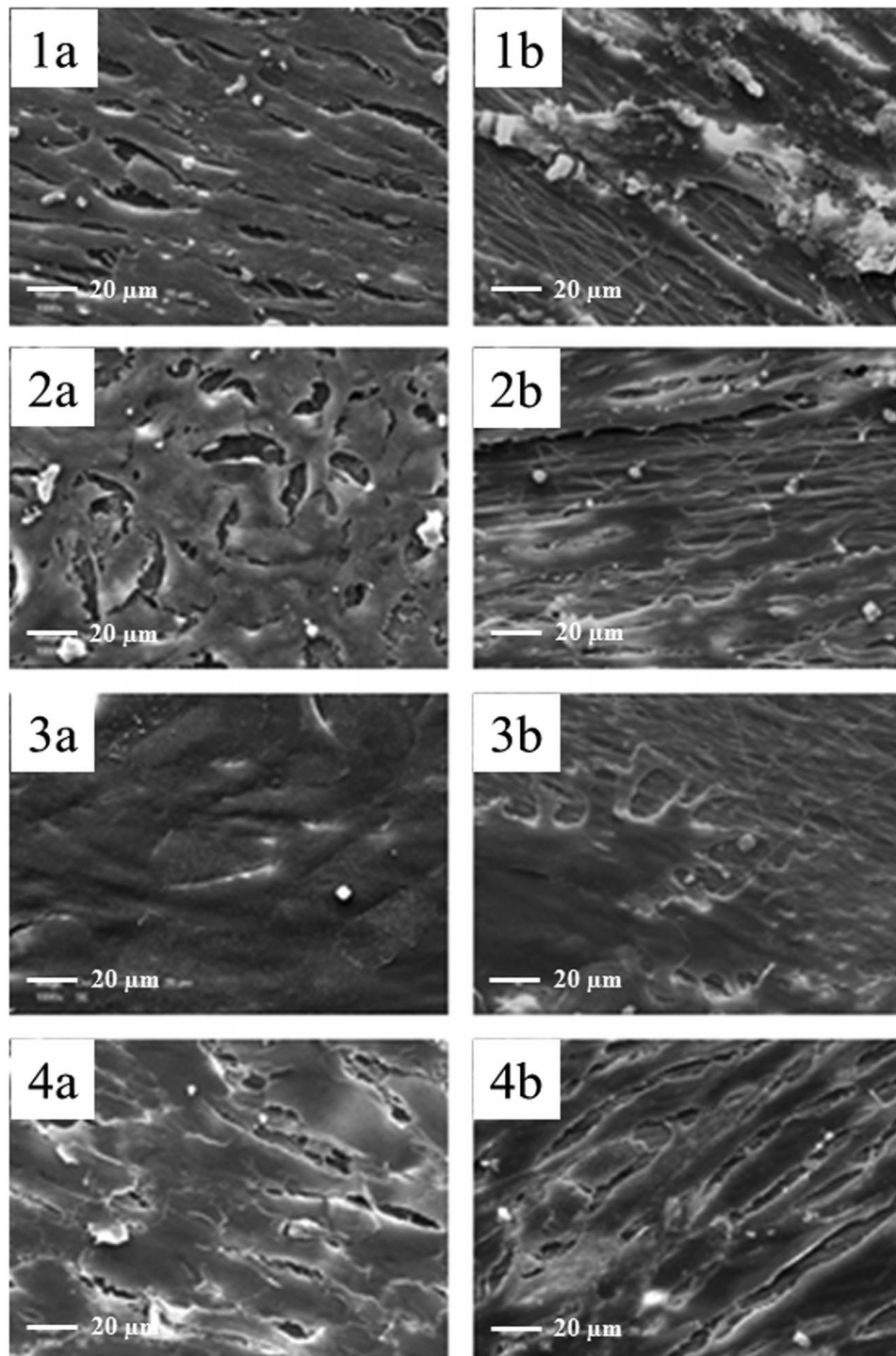
## Discussion and Conclusions

The organotypic culture technique is a pre-clinical step which allows the rapid assessment of the behavior of different organs in contact with biomaterials. This technique does not have high costs such as dissociated cell culture and provides an advantage in evaluating a lot of different organs at the same time while the cell culture technique needs specific and expensive strains. In our technique we cultivated vertebral cartilage of chick embryos and the results showed growth increasing and a lower circularity on the silk fibers, compared to Thermanox® as confirmed recently by the literature (Bhattacharjee et al., 2012). Indeed, chondrocytes were isolated from human nasal cartilage to test oriented lamellar silk fibrous scaffolds. In the article, in vitro culture of human nasal chondrocytes on these aligned, concentric lamellar silk scaffolds allowed the engineering of a tissue in which cells were aligned along silk fibers with deposition of an oriented cartilaginous matrix, resembling the organization of native Annulus fibrosus. It was concluded that silk fibroin scaffolds with fiber orientation in lamellar forms represent a suitable substrate for tissue engineering of the Annulus fibrosus of the intervertebral disc.

Our results on chick embryo gizzard (muscle cells), and vascular tissue (endothelial cells) showed increased cell adhesion on silk fibers compared to Thermanox®. As shown by Soffer et al., human endothelial cells and smooth muscle cells were successfully cultured on electrospun silk, demonstrating the potential utility of these scaffolds for vascular grafts due to the combination of impressive mechanical properties and biological compatibility (Soffer et al., 2008). Liver shows increasing cell adhesion on silk fibroin compared to Thermanox®. Silk fibers have been studied in the presence of liver cells (Cirillo et al., 2004; Kasoju and Bora 2012, Kasoju and Bora 2013). These results suggest that silk fibers are a suitable substratum for liver cell attachment and culture, and a potential alternative to collagen as a biomimetic coating.

In conclusion, we evaluated more than 10 different organs from various embryonic origins and cell types. Our results for specific tissues (bone, liver) confirm prior cell culture in vitro studies. Because the organotypic culture method is a rapid technique using several organs from chick embryos at the same time and at different steps of incubation it allows the researcher to assess quickly the initial biocompatibility of various biomaterials. This assessment can be tailored made to the targeted application based on cell morphology, cell

orientation, cell growth and cell adhesion. Our results confirm that whatever the organ used, silk fibers are a suitable biomaterial for tissue engineering. Moreover, the ease and the low cost of this technique suggest this would be a good prescreening test to select a biomaterial for a special application.



**Figure 6: SEM Microphotos (1000x) of cell shapes of 4 different organs**

*(1) Kidney (2) Gonad (3) Lung (4) Blood vessel, cultured on (a) Thermanox<sup>®</sup> and (b) Silk fibroin.*

## Acknowledgements

The authors are very thankful to the Région Picardie for financial support through their SilkNerve grant. We also wish to thank Frédéric Nadaud for his technical help with the SEM pictures.

## References

- Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. 2004, Image processing with ImageJ, *Biophotonics Int*, **11**(7): 36-42
- Almelkar SI, Kadam SS, Diwate S, Chaukar A, Bhonde RR, Patwardhan AM. 2013, Re-endothelialization of biological tissue-engineered conduits and scaffold for its potential use in bioprosthesis, *OA Tissue Engineering*, **1**(1): 1
- Bhattacharjee M, Miot S, Gorecka A, Singha K, Loparic M, Dickinson S, Das A, Bhavesh NS, Ray AR, Martin I, Ghosh S. 2012, Oriented lamellar silk fibrous scaffolds to drive cartilage matrix orientation: Towards annulus fibrosus tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, **8**: 3313-3325
- Brunot-Gohin C, Duval JL, Azogui EE, Jannetta R, Pezron I, Egles C. 2013, Soft tissue adhesion of polished versus glazed lithium disilicate ceramic for dental applications, *Dental Materials*, **29**(9): 205-212
- Cirillo B, Morra M, Catapano G. 2004, Adhesion and function of rat liver cells adherent to Silk Fibroin/collagen blend films, *Int J Artif Organs*, **27**(1): 60-68
- Demangel C, Auzène D, Duval JL, Vigneron P, Nagel MD, Puipe JC. 2012, Cytocompatibility of titanium metal injection molding with various anodic oxidation post-treatments, *Mat Sci and Engin C*, **32**(7): 1919-1925
- Duval JL, Letort M, and Sigot-Luizard MF. 1988, Comparative assessment of cell/substratum static adhesion using an in vitro organ culture method and computerized analysis system, *Biomaterials*, **9**: 155-161
- Duval JL, Warocquier-Clérout R, and Sigot-Luizard MF. 1992, Comparative assessment of the cytotoxicity of various substrates in organ culture and cell culture: a scanning electron microscopy study, *Cells & Materials*, **2**(3): 179-192
- Duval JL, Gillissen M, Billy D, and Nagel MD. 2006, Use of the Organotypic Culture Method to investigate drug-loaded CSF Shunt, *J of Contr Rel*, **116**(2): e50-53
- Gellynck K, Verdonk PC, Van Nimmen E, Almquist Kf, Gheysens T, Schoukens G, Van Langenhove L, Kiekens P, Mertens J, Verbruggen G. 2008, Silkworm and spider silk scaffolds for chondrocyte support, *J Mater Sci Mater Med*, **19**(11): 3399-3409

- Kasoju N, Bora U. 2012, Silk Fibroin in tissue engineering, *Adv Healthcare Mater*, **1**(4): 393-412
- Kasoju N, Bora U. 2013, Silk Fibroin based biomimetic artificial extracellular matrix for hepatic tissue engineering applications, *Biomed Mater*, **8**(4): 049501
- Kim KH, Kim MH, Lim YH, Park SR, Choi BH, Park HC, Yoon SH, Min BH, and Park H. 2009, A Comparative Biocompatibility Study of Chondrocyte-derived ECM and Silk Fibroin Scaffolds In Vitro and in Rat Acute Traumatic Brain Injury, *Tissue Engin and Regen Med*, **6**(14): 1420-1428
- Lamers E, Te Riet J, Domanski M, Luttge R, Figdor CG, Gardeniers JG, Walboomers XF, Jansen JA. 2012, Dynamic cell adhesion and migration on nanoscale grooved substrates, *Eur Cell Mater*, **13**(23): 182-193
- Leclerc E, Baudoin R, Corlu A, Griscom L, Duval JL, and Legallais C. 2007, Selective Control of liver and kidney cells migration during organotypic co-cultures inside fibronectin coated rectangular silicone microchannels, *Biomaterials*, **28**(10): 1820-1829
- Leclerc E, Duval JL, Pezron I, Nadaud F. 2009, Behaviors of liver and kidney chick embryos on plasma treated PDMS microchannels, *Mat Sci and Engin C*, **29**: 861-868
- Liu J, Lawrence BD, Liu A, Schwab IR, Oliveira LA, Rosenblatt MI. 2012, Silk Fibroin as a biomaterial substrate for corneal epithelial cell sheet generation, *Invest Opht & Vis Sci*, **26**;53(7): 4130-4138
- Min BM, Lee G, Kim SH, Nam YS, Lee TS, Park WH. 2004, Electrospinning of Silk Fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro, *Biomaterials*, **25**(7-8): 1289-1297
- Minoura N, Aiba S, Higuchi M, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y. 1995, Attachment and growth of fibroblast cells on Silk Fibroin, *Biochem Biophys Res Commun*, **17**;208(2): 511-516
- Murphy AR, Kaplan DL. 2009, Biomedical applications of chemically-modified Silk Fibroin, *J Mater Chem*, **23**;19(36): 6443-6450
- Rajaraman R, Rounds DE, Yen SP, Rembaum A. 1974, A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro, *Exp Cell Res*, **88**(2): 327-339
- Schneider A, Wang XY, Kaplan DL, Garlick JA, Egles C. 2009, Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing, *Acta Biomaterialia*, **5**(7): 2570-2578
- Sgarioto M, Vigneron P, Patterson J, Malherbe F, Nagel MD, Egles C. 2012, Collagen together with Fibronectin Provides a Better Support for Endothelialization, *C.R Acad. Sc. Paris*, **335**(8): 520-528



Sigot-Luizard MF, Lanfranchi M, Duval JL, Benslimane S, Sigot M, Guidoin RG and King MW. 1986, The cytocompatibility of compound polyester-protein surfaces using an *in vitro* technique, *In vitro cell & dev biology*, **22**(5): 234-240

Sigot-Luizard MF et Sigot M. 1977, Etude *in vitro* de l'affinité cellulaire de différents supports protéiques susceptibles d'être utilisés comme prothèses vasculaires, *C.R. Acad. Sc. Paris*, **284** : 1839-1842

Siri S, Maensiri S. 2010, Alternative biomaterials: Natural, non-woven, fibroin-based silk nanofibers of weaver ants (*Oecophylla smaragdina*). *Int J of Biol Macromol*, **46**: 529–534

Soffer L, Wang X, Zhang X, Kluge J, Dorfmann L, Kaplan DL and Leisk G. 2008, Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts, *J Biomat Sc, Polymer Edition*, **19**(5): 653-664

Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G and Kaplan DL. 2001, Functionalized silk-based biomaterials for bone formation, *J Biomed Mater Res*, **54**: 139–148

Subramanian B, Rudym D, Cannizzaro C and Kaplan DL. 2010, Tissue-Engineered Three-Dimensional In Vitro Models for Normal and Diseased Kidney, *Tissue Eng: Part A*, **16**(9)

Uebersax L, Mattotti M, Papaloizos M, Gander B and Meinel L. 2007, Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF), *Biomaterials*, **28** (30): 4449–4460

Vernon RB, Gooden MD, Lara SL, Wight TN. 2005, Microgrooved fibrillar collagen membranes as scaffolds for cell support and alignment, *Biomaterials*, **26**(16): 3131-3140

Vidal Ga, Blanchi T, Mieszawska A, Calabrese R, Rossi C, Vigneron P, Duval JL, Kaplan DL, Egles C. 2013, Enhanced Cellular Adhesion on Titanium with Silk Functionalized with titanium binding peptide and RGD, *Acta Biomaterialia*, **9**: 1935-1943

Vidal G, Dinis T, Egles C. 2013b, Biomatériaux à base de nanofibres de soie pour des applications biomédicales, *Techniques de l'Ingénieur*, **RE218**: 1-16

von Recum AF, van Kooten TG. 1995, The influence of micro-topography on cellular response and the implications for silicone implants, *J Biomater Sci Polym Ed*, **7**(2): 181-198

Wittmer CR, Hu X, Gauthier PC, Weisman S, Kaplan DL, Sutherland TD. 2011, Production, structure and *in vitro* degradation of electrospun honeybee silk nanofibers, *Acta Biomaterialia*, **7**(10): 3789-3795

Wittmer CR, Claudepierre T, Reber M, Wiedemann P, Garlick JA, Kaplan D, 2012, Multifunctionalized electrospun silk fibers promote axon regeneration in central nervous system, *Adv Funct Mater*, **21**(22): 4202

Wolff E et Haffen K. 1952, Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*, *Tex Rep Biol Med*, **10**: 463-472

# Transition

---

Dans ce premier article, nous mettons en évidence l'interaction entre les cellules et les nanofibres de soie. Effectivement, la culture de plus de 10 organes issus d'embryons de poulet sur nos nanofibres de soie démontre le caractère biocompatible de notre matériau. Cette méthode économique et facile d'utilisation nous permet d'affirmer l'intérêt que suggèrent nos nanofibres de soie alignées sur différents types de tissu cellulaire. En effet, la croissance cellulaire et l'adhésion cellulaire confirment que notre biomatériau est adéquat pour les applications biomédicales, notamment dans la culture de plusieurs tissus tels que le tissu nerveux.

De plus, la disposition parallèle des nanofibres entre elles permettent d'orienter la culture des explants le long des nanofibres. Vue la structure hiérarchisée et orientée du tissu nerveux, ce paramètre représente une approche prometteuse pour l'orientation des populations cellulaires nerveuses. En effet, l'alignement des cellules de Schwann autour des axones permet la propagation du potentiel et le maintien de la structure nerveuse.

Plusieurs études ont déjà souligné l'intérêt de mettre en point de tels types de scaffolds afin d'orienter la croissance nerveuse. Cependant, l'unique biomatériau sélectionné quelle que soit sa morphologie ne peut proposer une régénération du tissu nerveux complète et ordonnée. Les cônes de croissance qui se forment dans les fibres nerveuses du nerf périphérique après lésions sont à la recherche de facteurs neurotrophiques pouvant guider la régénération du tissu nerveux.

Ce deuxième article décrit la mise au point et l'effet sur la croissance axonale d'un gradient de NGF sur nanofibres de soie alignées. La molécule NGF incorporée au sein des nanofibres reste bioactive sans qu'il y ait relargage dans le milieu extérieur. En fonctionnalisant le biomatériau de soie par concentration croissante de NGF le long de la nanofibre, les cônes de croissance sont attirés ainsi par chimiotactisme dans un seul sens trouvant une unique voie de repousse nerveuse. Nous comparons les morphologies neuronales ainsi que la croissance axonale sur un gradient de NGF composé de nanofibres de soie alignées *versus* des nanofibres de soie de concentration NGF constante.

## ARTICLE II

### **Method to form a fiber/growth factor dual-gradient along electrospun silk for nerve regeneration**

Tony M Dinis<sup>1,2,\*</sup>, Roberto Elia<sup>2</sup>, Guillaume Vidal<sup>1</sup>, Adrien Auffret<sup>1</sup>, David L Kaplan<sup>2</sup> and  
Christophe Egles<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), UMR CNRS 7338, Université de Technologie de Compiègne, Rue Roger Couttolenc, CS 60319 - 60203 Compiègne Cedex, France*

<sup>2</sup> *Biomedical engineering, Science & Technology Center, 4 Colby Street, Tufts University, Medford, MA 02155, USA*

<sup>3</sup> *Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Tufts University, School of Dental Medicine, 1 Kneeland St, Boston, MA 02111, USA*

Corresponding author:

Tony DINIS

UMR CNRS 7338, Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), Université de Technologie de Compiègne, France

Email [\*\*tony.dinis@utc.fr\*\*](mailto:tony.dinis@utc.fr)

Phone : + 33 3 44 23 40 47

## Abstract

Concentration gradients of guidance molecules influence cell behavior and growth in biological tissues and are therefore of interest for the design of biomedical scaffolds for regenerative medicine. We developed an electrospinning method to generate a dual-gradient of bioactive molecules and fiber density along electrospun nanofibers without any post spinning treatment. Functionalization with fluorescent molecules demonstrated the efficiency of the method to generate a discontinuous concentration gradient along the aligned fibers. As a proof of concept for tissue engineering, the silk nanofibers were functionalized with increasing concentrations of nerve growth factor (NGF) and the biological activity was assessed and quantified with rat dorsal root ganglion (DRG) neurons cultures. Protein assays showed the absence of passive release of NGF from the functionalized fibers. The results demonstrated that the NGF concentration gradient led to an oriented and increased growth of DRG neurons ( $417.6 \pm 55.7 \mu\text{m}$ ) compared to a single uniform NGF concentration ( $264.5 \pm 37.6 \mu\text{m}$ ). The easy-to-use electrospinning technique combined with the multiple molecules that can be used for fiber functionalization makes this technique versatile for a broad range of applications from biosensors to regenerative medicine.

**KEYWORDS:** Nerve growth factor, Concentration Gradient, Tissue Engineering, Electrospinning, Silk, Regenerative Medicine

## Introduction

Severe peripheral nerve damage affects 200,000 patients in the United States and 300,000 in Europe each year.(Ichihara et al., 2008) Unlike in the Central Nervous System, axonal regeneration and recovery is possible after peripheral nerve injury.(Horner and Gage, 2000) Spontaneous nerve regeneration can occur for short nerve gaps, while repairing large nerve gaps (>10 mm) remains a major challenge for surgeons.(Dellon and Mackinnon, 1988) Indeed, peripheral nerve regeneration is based on a highly organized and complex biological system composed of multiple cells, growth factors and extracellular matrix molecules (ECM). To date, the most effective way to repair large gaps remains autologous nerve grafting. Even if this technique is considered the clinical standard for peripheral nerve gap repair, there are many limitations due mainly to limited donor site availability, morbidity and surgical complications due to the need for two or more operative procedures.(Liao et al., 2012) For very short gaps (<5 mm), biological tissues such as arteries, veins or muscle can also be used, however these allografts have shown varying success.(Biazar et al., 2010b) In recent years, advances have been made in the development of new biomaterials as nerve guidance conduits composed of synthetic, natural or composite polymers systems.(Hsu et al., 2013; T. Liu et al., 2012; Masaeli et al., 2013) These nerve guidance conduits should facilitate directional axonal growth from the regenerating nerve, protect the regenerating nerve from fibrous tissue barriers and allow diffusion of growth factors and nutrient exchange. Despite the fact that the FDA has approved some nerve guidance systems; the clinical reality is that these biomaterials have been far from effective for nerve repair after injury or trauma.(Kehoe et al., 2012a)

Scaffolds prepared via electrospinning allow aligned fibrous matrix formation with good porosity and mechanical properties using native and/or synthetic polymers with nanoscale structures similar to native extracellular matrices. Recently, silk electrospun fibers have been applied in the investigation of tissue engineering for biomedical applications.(Zhang et al., 2008)(Zhang et al., 2009) Silk fibroin is a natural protein, well known for its robust mechanical properties and excellent biocompatibility.(Altman et al., 2003) The degradation rate of silk biomaterials can be tailored from months to years after implantation in vivo, based on processing procedures employed during materials formation.(Meinel et al., 2005)

Moreover, electrospun silk fibers can also be post-modified via chemical treatments yielding improved cell proliferation, cell adherence, and growth.(Cohen-Karni et al., 2012) Bioactive molecules, such as adhesion or growth factors added to the spinning solution remain active and available in the electrospun fibers.(Sofroniew et al., 2001) Many different types of bioactive molecules have been incorporated into silk scaffolds of electrospun nanofibers, including growth factors, biomimetic peptides and metals.(Li et al., 2006; Sahoo et al., 2010; Schneider et al., 2009) Growth factors are endogenous proteins capable of binding to cell receptors and directing cellular activities.(Varkey et al., 2004) Nerve Growth Factor (NGF) is a neurotrophic factor known for promoting the survival and differentiation of developing neurons (sensory and sympathetic neurons) in the peripheral nervous system. NGF delivery enhanced neuronal outgrowth and also can be used as a chemo-attractant axon guidance cue.(Campenot, 1977)(Tessier-Lavigne and Goodman, 1996)

Gradients of chemicals and/or biological molecules on the surface of scaffolds influence cell alignment of fibroblasts, neurons and bone marrow stem cells.(Kang et al., 2004; Samavedi et al., 2012; Shi et al., 2010; Tang et al., 2013) The guidance of growth cones, which are the functional unit for axonal growth, can be mediated by several growth factors. In fact through the growth cones, axons sense guidance cues offered by the concentration gradient, allowing for regeneration.(Mai et al., 2009) This signaling is dependent on gradients of concentration.(Thompson et al., 2011) Some studies have observed the behavior of extending or regenerating axons in response to gradients of growth factors within hydrogels and microfluidic chambers.(Leslie-Barbick et al., 2011)(Kothapalli et al., 2011) Hydrogels are one of the most utilized scaffolds for tissue repair; however they do not preserve the alignment of the axonal growth cones. Conversely, while microfluidic systems preserve alignment, the pressure differences created by the devices cause a biological stress, which can reduce cell survival.(Kothapalli et al., 2011)

In the present study, we describe the development of a functional NGF gradient on aligned silk fibers and characterize the electrospun mat using physicochemical techniques as well as neuronal cultures. To our knowledge, this work is the first study to demonstrate the production of an aligned electrospun functionalized scaffold that exhibits coordinated NGF and fiber density gradients along the longitudinal axis of the fibers, without any post-spinning chemical modification. To stimulate unidirectional axonal outgrowth is the main

challenge for peripheral nerve regenerative reconstruction. The effects of this new nanofibrous gradient on the orientation and rate of neuron growth were examined on primary sensory neurons from rats DRGs. The production of this “dual gradient” (growth factor and fibers) into aligned silk nanofibers focused the axonal guidance cue in only one direction and stimulated axonal outgrowth.

## **Materials and Methods**

### **1. Materials**

Silkworm cocoons from *Bombyx mori* were purchased from Tajima Shoji Co. (Yojohama, Japan). All Chemicals products were purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Slide-a-Lyzer dialysis cassettes were purchased from Pierce, Inc. (Rockford, IL, USA). All media cell products were purchased from Gibco, life technologies SAS (France). NGF was purchased from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)

### **2. Silk fibroin solution preparation**

Silk fibroin was extracted from *B. mori* silkworm cocoons and solutions were prepared following previously published procedures.(Rockwood et al., 2011) Briefly, cocoons were cut into small pieces (~5g) and immersed into boiling for 30 minutes in 2 L of an aqueous solution of 0.02 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The degummed fibers were rinsed for 20 min, three times with cold deionized (DI) water, then allowed to dry for 48 h at room temperature. Dried silk fibroin fibers were solubilized in 9,3 M LiBr solution (1g of dried fibers : 4 mL of LiBr solution) at 60°C for 4 h. Silk solutions were dialyzed against DI water using Slide-a-Lyzer dialysis cassettes (membrane MWCO 3,500) for 72h to remove salts. Silk fibroin solution was centrifuged twice to remove insoluble particulates. The final concentration of aqueous silk fibroin solution was 6–7 wt%, which was calculated by weighing the remaining solid after drying. Solution was then concentrated by dialyzing against 15% (w/v) PEG (6 000 g/mol) for 4 h to produce ≈10 wt% silk fibroin. Silk solutions were stored at 4°C.

### **3. Preparation of spinning fluorescent or functionalized solution**

Silk fibroin concentrated at 10 wt% solutions were mixed with 5 wt% polyethylene oxide (PEO, Mw= 900,000) in a 4:1 (v/v) silk/PEO ratio to produce an 8% wt% silk fibroin solution in order to improve the solution viscosity before spinning<sup>31</sup>. To generate fluorescently labeled electrospun fibers, Rhodamine-B (Merck Chemicals – Germany) (0,1 g) was added to the silk solution to produce a 100% solution and diluted to 10% and 1%. The three different concentration solutions of silk/rhodamine-B at 100%, 10%, 1% were electrospun successively to demonstrate the presence of the gradient. 70kDa fluorescein isothiocyanate-dextran (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA) at 10% was added into the silk solution prior spinning. To functionalize the spinning solution, NGF reconstituted in PBS containing 0.1% bovine serum albumin solution, was added to the silk solution at 500, 50 and 5 ng/mL.

#### **4. Aligned silk electrospun scaffolds**

Spinning solution was delivered through a 16G stainless-steel capillary, at a flow rate of 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  using a Sage syringe pump (Thermo Scientific, Waltham, MA). The capillary was maintained at a voltage of 12 kV using a high voltage power supply (Gamma High Voltage Research ES-30P, Ormond Beach, FL, USA) and was mounted at the center of a 10 cm-diameter aluminum plate. To fabricate axial fiber alignment, two electrically independent, 8 cm width x 0.3 cm thick, flat, zinc-plated steel plates served as collectors. The plates were mounted on 25 cm high ceramic stands fastened to adjustable PVC legs that allowed angle and spacing adjustments. The plates were positioned 16 cm below the droplet and 10 cm from each other in different trials covered by electrical tape (3M, St. Paul, MN) in order to support glass cover slips. Electrospun silk-fibroin fibers were collected on the glass cover slips for 3 min. total deposition time. Fiber alignment was controlled by connecting each collector to a separate electrically independent output of a switch. During electrospinning, first one collector was provided with electrical ground for a half period, normally 1.5s, while the second collector was disconnected. Then for the next half period, the ground was switched to the second collector while the first collector was disconnected. After a full period, it was switched back to the first collector. This oscillation of ground was maintained continuously until the electrospinning process was completed. Fibers deposited



between the collectors. The cover-glasses coated with silk fibers were then stored in dry atmosphere until needed.

## **5. Scaffold characterization**

To demonstrate the discontinuous gradient, fluorochrome fibers along the y-axis without chemical modification post spinning fibers were imaged on a Zeiss Axiovert 40 CFL (Thornwood, NY) microscope equipped with three filter (470/500, 350/460, 560/630 Exc/Emi) and QCapture (Surrey, BC) image capture software. Pixel intensity of the fluorescence images was measured with 'Scion Imaging' software (NIH). Electrospun NGF-silk gradients on glass cover slips were sputter-coated with gold/palladium and then evaluated using a field-emission Scanning Electron Microscope (SEM, Supra 55, Zeiss, NY) at 5kV. To determine fiber diameters and alignment all SEM images were analyzed by ImageJ and Matlab software packages.

Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) analysis of the gradient electrospun mats was performed with a Jasco FT/IR-6200 spectrometer (Easton, MD), equipped with a multiple reflection, horizontal Miracle attenuated total reflectance (ATR) attachment (ZnSe crystal, from Pike Tech., Madison, WI). Each measurement incorporated 64 scans with nominal resolution of 4 cm<sup>-1</sup> (wavenumber from 600 to 4000 cm<sup>-1</sup>) that were Fourier transformed using a Genzel-Happapodization. To identify secondary structures in the protein samples from the absorption spectra, peak positions of the amide I region (1595-1705 cm<sup>-1</sup>) absorption from Fourier self-deconvolution were analyzed. Curve fitting was performed using Jasco Spectra-Manager Analysis Software (Jasco, Easton MD), as previously described.(Zhang et al., 2008),(Jin et al., 2005),(Hu et al., 2011)

## **6. In vitro NGF release and bioavailability**

NGF gradient electrospun nanofibers on glass cover slips (n=3) were incubated in 2 mL of PBS containing 0.1 % BSA with 0,02% Tween20 at 37°C and 150µL of the solution was

collected after 1, 6, 24, 72 and 168 hours and stored at -80°C. To estimate recovery percentage of NGF on fibers, cover slips gradient fibers were dissolved in 10 µL of 9.3M LiBr for 30 minutes at room temperature and dialyzed again 1 L of deionized (DI) water for 6 hours. NGF concentration was quantified with the ChemiKine™ Growth Factor Sandwich ELISA Kit (Millipore, France) according to the manufacturer's instructions.

## **7. Cell cultures**

DRG cells were isolated from male Sprague Dawley rats (1-2 months old) using a modified protocol adapted from a previously published procedure (Malin et al., 2007) for rats. All procedures were performed in accordance with the European Directive 2010/63/EU. DRGS were extracted from rat spinal cord and incubated in 2.5% collagenase (Sigma) for 15 min at 37°C. Then, DRGs were centrifuged at 500g for 1min, the supernatant was removed and the pellet was resuspended and incubated in trypsin (Sigma) 0.5% and DNase I (Sigma) at 1 mg/mL-1 for 15 min at 37°C. After another centrifugation, 500g for 1 min, the DRGs were washed with F-12 medium and dissociated with a fire-polished Pasteur pipette. The mean yield of cells obtained per rat was 100,000 with 90% viability. Glass slides were coated with poly-lysine/laminin before seeding, as described in Malin et al. (Malin et al., 2007) Moreover glass slides were treated in water 24 hours before culture in order to extract PEO from electrospun silk fibroin fibers mat (Jin et al., 2004). Culture, medium consisted of 37°C pre-warmed F-12 medium, 10% horse serum and 100 U/mL-1 and was changed every 3 days.

## **8. Immunostaining**

Cells were fixed after 72h post-seeding in a polyoxymethylene (paraformaldehyde) solution at 4% in PBS for 15 min, at room temperature and rinsed three times with PBS. Membrane permeabilization was performed with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature and rinsed twice with PBS. Samples were incubated overnight at 4°C in 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS solution to minimize non-specific staining. Primary antibodies against  $\beta$ III tubulin (Sigma-Aldrich, France) were diluted (1:150) in PBS/BSA 0.1% (w/v) and incubated at room temperature in the dark for 1 h. Samples were

washed twice with 0.1% BSA in PBS. Cy3-conjugated secondary antibody (cy3 goat anti-rabbit IgG, Jackson Immunoresearch), 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Sigma) and Phalloidin-X5-505 (0.16  $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Fluoroprobes, France) were added and incubated at room temperature in the dark for 1 h. The samples were then rinsed three times with PBS, mounted in Mowiol and observed using a LEICA DMI 6000 microscope.

## **9. Morphometric Analysis**

Images were analyzed using ImageJ software. Low signal was filtered out using a threshold based on intensity (the silk fibers and background noise present lower pixel intensities than the cell bodies and neurites). In each image, the number of cells was determined using the signal from DAPI staining. Then each neurite was isolated using the tubulin staining and its length was measured using a macro created on ImageJ. Multipoints were drawn along the length of the primary and longest axon, in order to follow the curves and determine the length. The coordinates were then used to calculate distances between two points. In a final step, all distances were added to obtain the axon length. More than 100 axons were measured per concentration.

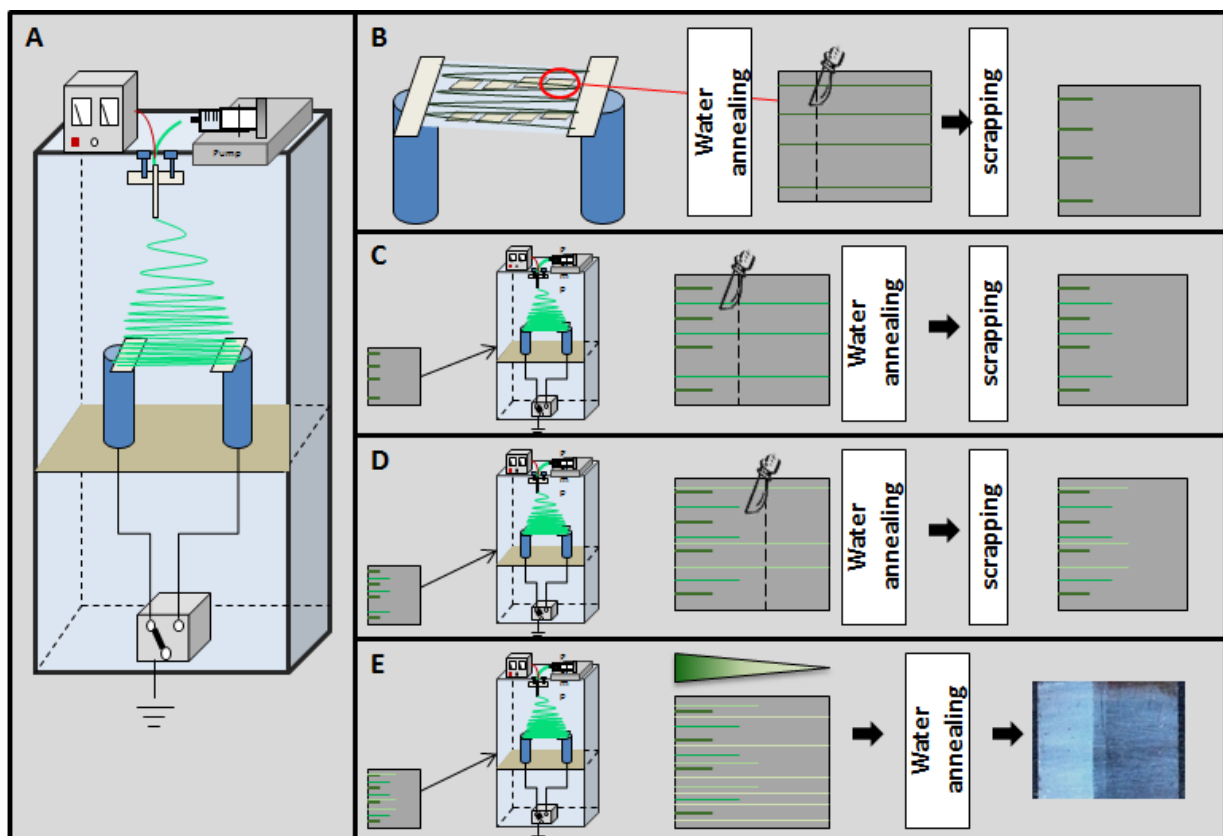
## **10. Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed using InStat software. Values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  SD). Neurite length and neurite per cell were compared using one way analysis of variance (ANOVA). A p-value less than 0.05 was considered to be significant.

## **Result**

### **1. Fabrication of gradient nanofibrous scaffolds**

Silk fibroin solution at 8% wt was prepared for spinning. Protein was added to the spinning solution to get one stock standard solution taken to be 100%. Stock solution was diluted to obtain solutions at 10% and 1%. Electrical tape was connected between two pieces of conductive substrates, which allowed the alignment of fibers using oscillation of the ground (**Figure 1A**). The stock standard solution (100%) was first electrospun onto glass cover slips. After spinning, samples were annealed and electrospun fibers were located on the first 4 mm on one side of the cover slip were retained, while, the rest of the fibers were cut and discarded (Figure 1B). The same process was repeated twice more on the same glass cover with diluted concentrations of protein solution at 10 and 1% successively. Seven millimeters from the top side of the cover slip were kept for the 10% solution and then 10 mm of fibers for the 1% concentration solution. Finally, the glass slides were electrospun with silk solution to cover the 22 mm of the cover slips with silk nanofibers (**Figure 1C, D, E**).



**Figure 1: Schematic of NGF-Silk gradient aligned nanofibers via electrospun fabrication.**

(A) Silk aligned nanofibers were collected via to an oscillating ground deposition system, consisting of two zinc-plated steel plates bridged with non-conductive electrical tape which hold the glass cover slips to be spun. Four spinning solutions with NGF at different

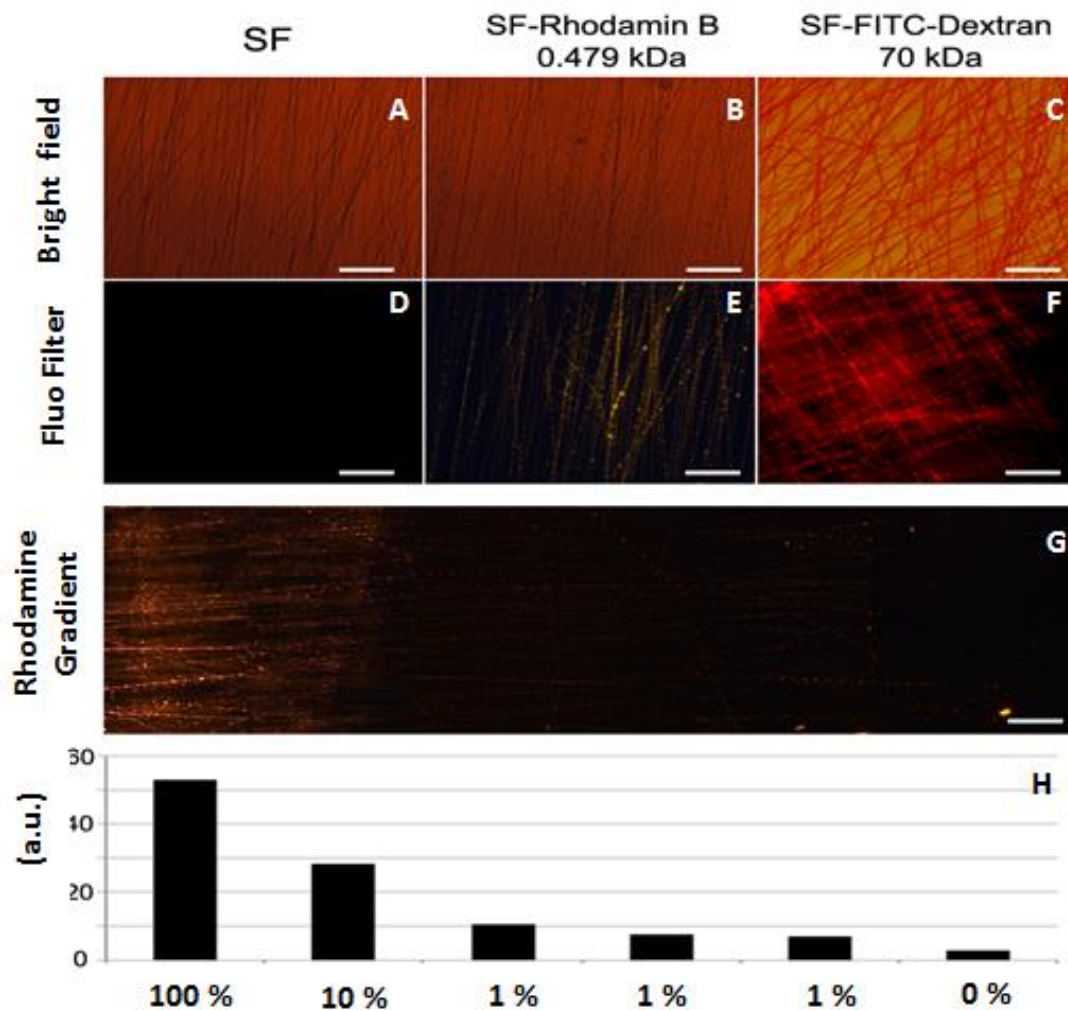
*concentrations were used to form the aligned electrospun fibers with and NGF gradients. (B) High concentration of NGF-Silk solution was spun on the glass cover slips for 3 min and all but 4 mm of fibers were cut away. (C) Glass cover slips from B were spun with medium concentration of NGF-Silk solution, and all but 7 mm of fibers were left on the glass slide. (D) Glass cover slips from C were spun with the lower concentration of NGF-Silk solution, and all but 10 mm of the fibers were left on the slides. (E) Silk solution was spun for 10 min on the top of D cover slips. After each deposition the fibers were annealed for 30 min, with the final deposition receiving overnight annealing, all to induce beta sheet crystallization of the silk to prevent aqueous solubility.*

Using this method, a discontinuous gradient of two parameters (i) protein concentration and (ii) density of silk fibers was produced along the aligned nanofibers. One side of the slides presents highly functionalized fibers whereas the opposite side only consisted of silk nanofibers without a functional component. By producing nanofibers by four successive electrospinning processes, the density of silk aligned nanofibers increased along the slide. At the end of the process, slides presented a “dual-gradient” characterized by increasing concentrations of protein and the density of aligned silk nanofibers.

## **2. Gradient assessment by fluorescence**

Fluorochromes, rhodamine (479Da) and dextran FITC (70kDa) were added to the silk solution before spinning. Electrospun fibers were first observed in bright field (**Figure 2 A, B, C**) and then under fluorescence. As expected, no fluorescence was detected in the absence of the fluorochrome (**Figure 2D**) while a fluorescence signal was observed on the surface of fibers after spinning fluorochrome solutions (**Figure 2 E, F**). Using molecules with a higher molecular weight such as dextran FITC, fluorescence intensity was detected in the mat, demonstrating that molecules with an average molecular weight can also be incorporated inside the silk fibers. A gradient consisting of aligned fibers functionalized with rhodamine along the y-axis were observed using this approach (**Figure 2G**). Fluorescence intensities were analyzed on the slide part which fibers retained consist on the standard solution (100%), and then fibers from diluted solutions (10%, 1%) and 0%. Four different intensity

values characterized the different steepness of the gradient formed. The results were 53.1 for the higher, 28.4 medium and 10.5 low concentration. As a control, when no rhodamine was added, only a weak autofluorescence of the fibers was detected with a value of 2.84.

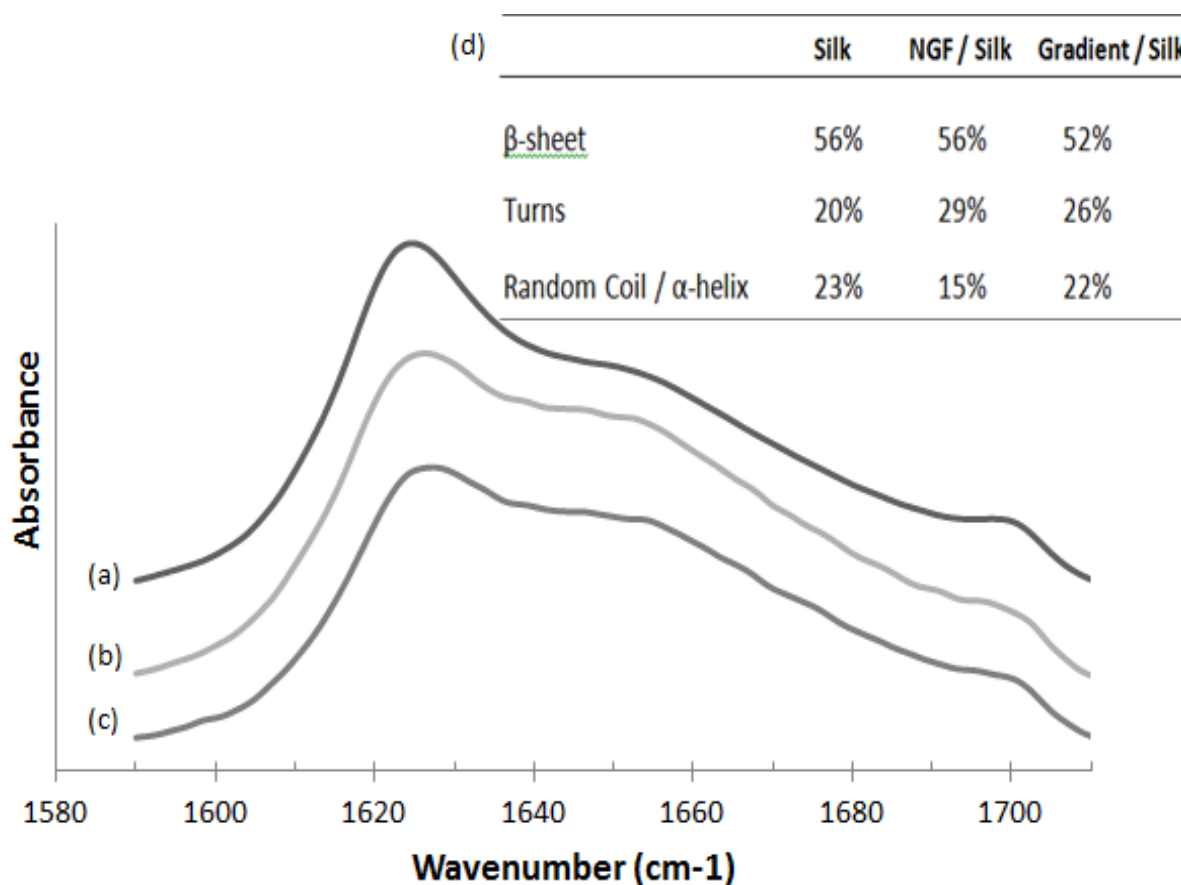


**Figure 2: Fluorescence imaging to show the efficiency of the gradient.**

*Unmodified aligned silk fibroin (A), aligned silk-rhodamine-B (B) or random silk-FITC-Dextran (C) functionalized fibroin were observed by fluorescent microscopy in bright field and via fluorescent filter (D), (E), (F) respectively. Rhodamine fluorescence of aligned fibers (G) on a 22 mm glass slide coupling different rhodamine concentrations (100%, 10%, 1% and 0). (H) Fluorescence intensities measured along the rhodamine gradient from the aligned slide fibers in G. Scale bars: 20  $\mu$ m*

### 3. Characterization of NGF nanofibrous gradient scaffolds

To determine the secondary structure of electrospun fibers and the potential influence of the incorporated molecules, FTIR was used and structure was correlated to absorption peaks for silk. Peak assignments were as described in literature (Jin et al., 2005), (Zhu et al., n.d.) with absorption bands in the frequency range of 1610~1625 cm<sup>-1</sup> representing  $\beta$ -sheet structure; 1650 cm<sup>-1</sup>, 1640 cm<sup>-1</sup>, and 1630 cm<sup>-1</sup> for coiled-coil fingerprints, and peaks above 1660 cm<sup>-1</sup> ascribed to  $\beta$ -turns (Figure 3). There was no significant difference in the secondary structure between the treatment conditions for the mats, as electrospun fibers displayed 52-56% beta sheet content, 20-30% turn structures and 15-23% random coil/alpha helix structures (Figure 3D). Thus, the additives did not alter

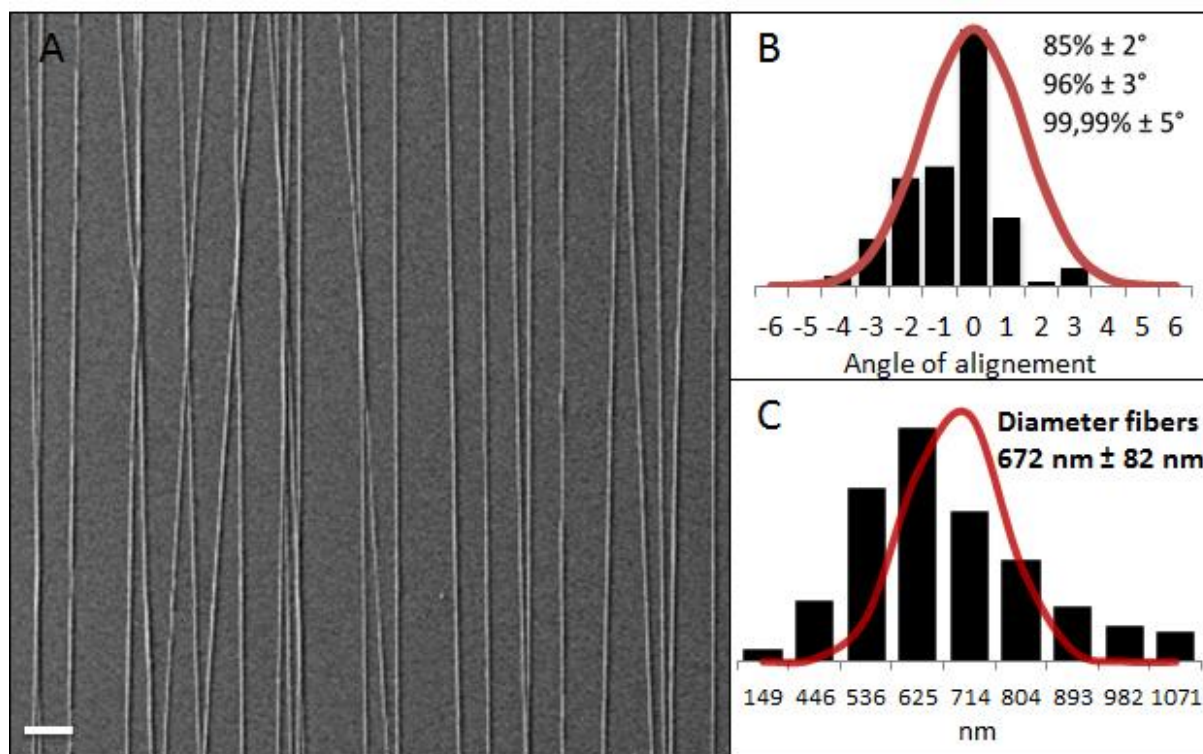


secondary structure of the silk figures.

**Figure 3: FTIR spectra of electrospun materials prepared by water annealing.**

(a) Silk fibroin electrospun; (b) Silk fibroin functionalized with NGF electrospun; (c) NGF-silk gradient electrospun. (d) Table of the secondary structure of the silk fibroin. All samples were treated by water-annealing overnight.

Electrospinning allowed silk fibers to be obtained with an average diameter of  $672 \pm 82$  nm. The oscillating ground system controlled fiber orientation with 99,99% at an angle of deviation less than  $5^\circ$  and 85% less than  $2^\circ$ . This electrospinning approach provided regular fiber diameter with good alignment (**Figure 4**). No changes in average diameter or in alignment were observed between the silk fibers, the functionalized silk fibers or the gradient silk systems. The fiber density along the gradient was also measured for the four different areas; Area 0 (without NGF):  $144.1 \pm 21.1$  fibers/mm<sup>2</sup>; Area 5 pg/mL:  $378.3 \pm 43.6$  fibers/mm<sup>2</sup>; Area 50 pg/mL:  $572.5 \pm 46.2$  fibers/mm<sup>2</sup>; Area 500 pg/mL:  $832.5 \pm 75.7$  fibers/mm<sup>2</sup>. Moreover, the surface roughness of the silk fibers was about 1 nm<sup>36</sup> with no significant difference along the fibers and between functionalized and non-functionalized fibers.



**Figure 4: Characterization of the gradient of aligned electrospun fibers.**

(A) SEM image of aligned gradient NGF-silk nanofibers on glass slides; (B) Distribution of fiber alignment from glass slides, with 85% of fibers present at an angle of deviation less than  $2^\circ$ .



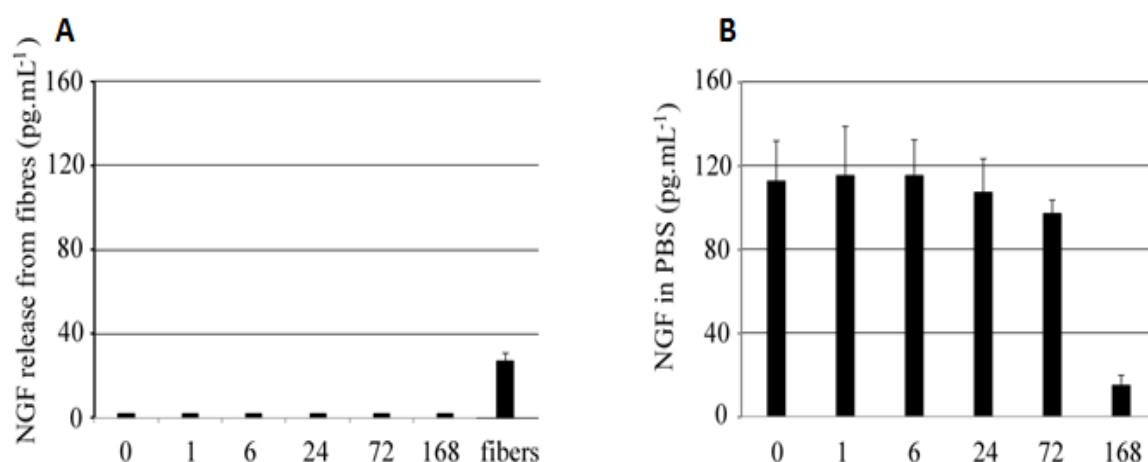
(C) Distribution of fiber diameter from glass slides. Bars represent measured data, and the associated curves are the best fit Gaussian form. Alignment and mean diameter of electrospun fibers were determined as described in material and methods. Scale bars: 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4. NGF functionalization and release from electrospun fibers

NGF release from the electrospun silk fibers was not detected over 5 days (**Figure 5A**). Suggesting that the growth factors were strongly adsorbed to the nanofibers. To confirm this supposition, the functionalized fibers were dissolved in lithium bromide and after 5 days of soaking in PBS residual NGF was determined by ELISA (**Figure 5A**). A total of 27.5 pg/mL of NGF was detected from this dissolution process, to confirm that the NGF was still present in the fibers.

The stability of NFG was observed in a PBS – Tween20 containing 120 pg/mL of NGF during 5 days. The initial concentration was stable for the first 3 days and after 5 days 12.5% of the NGF was detected by ELISA in the solution (**Figure 5B**). These results suggest a protein degradation happening only after the initial 3 days that could not explain why NGF remained undetectable in our release experiments (**Figure 5A**).

These results show that the NGF was stably entrapped into the electrospun silk fibers and protected from degradation over 5 days, thus the silk fibers can be functionalized as an NGF sink to control neuronal outgrowth at the surface over extended time frames.



**Figure 5: NGF release from electrospun functionalized silk.**

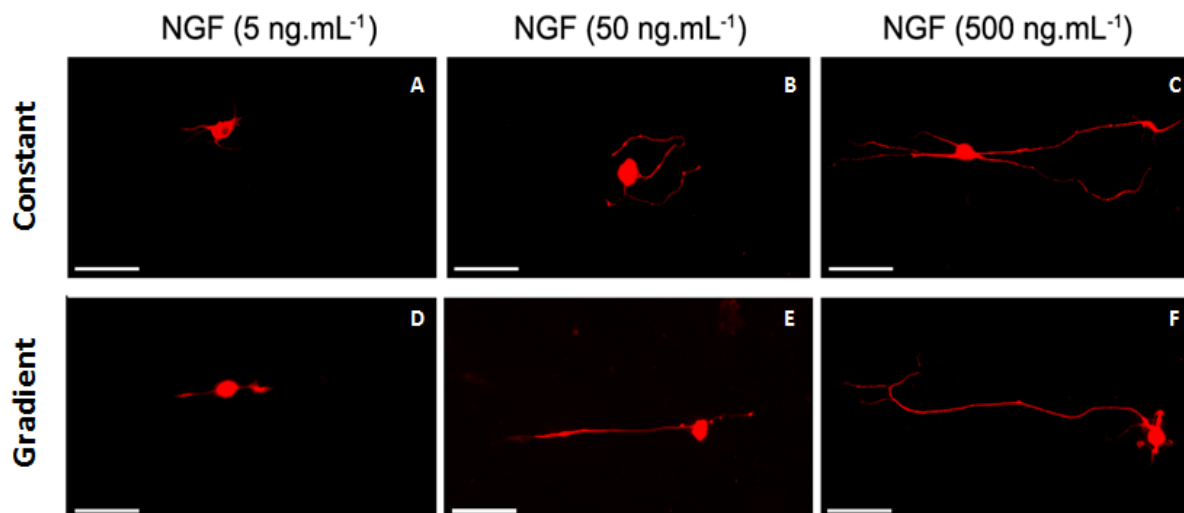
*(A) No NGF was detected from the silk electrospun after 5 days in PBS with 0.02% Tween20, whereas 27,5 pg.mL<sup>-1</sup> of NGF was detected in the electrospun mat dissolved by LiBr after 5 days. (B) Degradation of NGF was observed in PBS with 0.02% Tween20. After 3 days, more than 80% of NGF could be detected unlike 15% after 5 days.*

## **5. Neuron growth rate and orientation on constant and gradient concentrations of NGF-functionalized fibers.**

We have shown previously that functionalized aligned silk nanofibers allowed adhesion and guided neurons for peripheral nerve regeneration.(**Wittmer et al., 2011**) In the case of a peripheral nerve trauma, axonal outgrowth is essential for completely recovery; Therefore a gradient of growth factors could improve alignment of axonal outgrowth, stimulate this outgrowth and also manage directionality. Primary sensory neuron cells were used to study gradient impact on nerve guidance. After 48 hours of culture, the effect of silk loaded with NGF at constant concentrations (5, 50 and 500 ng/mL, respectively) was compared to silk fibers with the concentration gradient of NGF (5, 50, 500 ng/mL). For the constant concentration of NGF, lower concentrations of NGF showed that axons were not well aligned and axonal length was minimal (**Figure 6A, B**). In contrast, for high concentrations of NGF neurons displayed long neurite extensions and were aligned in the two directions provided by the fibers (**Figure 6C**).

In the gradient conditions, the axons aligned even at the low concentrations, unlike the uniform concentrations conditions (**Figure 6D, E**). High concentrations of NGF, 500 ng/mL, allowed better axonal outgrowth than single concentrations, and this outgrowth was orientated in one direction (**Figure 6F**).

Moreover, the neurons cultured with a single concentration of NGF presented many neurite extensions while neurons cultured in the gradient conditions displayed only two neurites per cell (one smaller than the other). At high concentrations of NGF, neurite extensions in the gradient conditions were longer than those found using uniform concentrations and these features promoted axonal outgrowth in the same direction as the gradient concentration.



**Figure 6: Neuron morphology on NGF silk electrospun and NGF gradient silk electrospun fibers.**

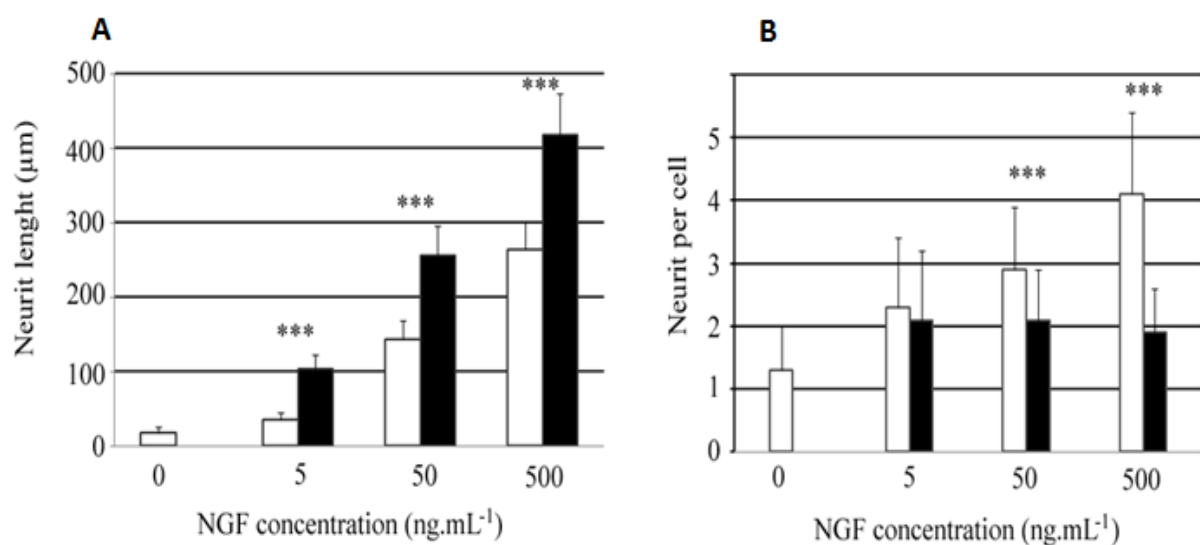
*Neurons from DRGs were seeded on NGF-functionalized electrospun fibers at constant 5, 50 and 500 ng/mL-1 (A, B and C, respectively), or NGF-functionalized gradient electrospun at same concentration 5, 50 and 500 ng/mL-1 (D, E and F, respectively). Fluorescence images were acquired after 2 days of culture and neurons were stained with antiβIII tubulin antibody. For details see Material and methods. Scale bars: 50 μm*

## **6. Quantitative assessment of the axonal outgrowth in constant versus gradient conditions of NGF concentration.**

To evaluate axonal outgrowth depending on the gradient, two parameters were assessed to identify biological effects of the functionalized dual gradient silk, the average length of the longest neurite and the number of neurites per cell. The longest neurite from the primary dendrite of the DRG neurons were measured on the silk fibers, silk fibers functionalized with the single concentration of NGF or the NGF gradients (Figure 7A). For the electrospun silk fibers without NGF used as control, few surviving cells were able to extend neurites, with an average length of  $17.7 \pm 8.4 \mu\text{m}$ , suggesting that silk fibers supported nerve growth. Loading NGF (at different concentrations) with silk fibers led to a significant increase in neurite length between the single and gradient conditions. At 5 ng/mL, the

average of the longest neurite extension measured was  $34.9 \pm 10.7 \mu\text{m}$  in the mats with uniform concentration compared to  $103.3 \pm 19.7 \mu\text{m}$  in the gradient conditions; a 3-fold increase depending on the conditions. At 50 ng/mL, the difference between uniform and gradient conditions decreased to 1,8-fold but was still statistically significant. The average neurite length was  $143.0 \pm 25,3 \mu\text{m}$  in the single concentration conditions compared to  $255.9 \pm 40.4 \mu\text{m}$  in the gradient conditions. Finally, at 500 ng/mL, the single concentration showed an average neurite length at  $264.5 \pm 37.6 \mu\text{m}$  whereas on the gradients,  $417.6 \pm 55.7 \mu\text{m}$  was measured, a 1.6-fold difference.

For the number of neurites per cell, the silk fibers showed an average of 1 extension, increasing to 2, 3 and 4 when the constant concentration of NGF was increased (5, 50, 500 ng/mL, respectively) (Figure 7B). Interestingly, for all gradient concentration conditions, the same value of neurite extensions per cell was found to be 2, with the standard deviation decreased when the steepness of the gradient was increased.



**Figure 7: NGF gradient bioactivity comparing NGF constant concentration on neuron cells from DRGs.**

(A) Average neurite length after 2 days of culture on control fibroin nanofibers, 5, 50, 500 ng/mL of NGF in constant conditions (white) against 5, 50 and 500 ng/mL of NGF in gradient conditions (black). (B) Average number of neurites per cell, after 2 days of culture on control fibroin nanofibers, constant (white) and gradient concentration (black) of NGF; For neurites length, at least 100 neurons have been analyzed per condition measuring the longest neurite extension from neurons. (\*\*\*,  $p < 0,001$ )

These results show that gradients of NGF in the fibers significantly improved neurite extensions when compared to constant concentrations of the same growth factor. The results also suggest that the number of neurites per cell was stable at 2 in the gradient conditions and the neuron cell morphology became more homogeneous by increasing the steepness of the gradient.

## **Discussion**

Incorporating bioactive molecules to form gradients is an important element in the design of bioactive scaffolds for tissue engineering.(Jacob L. Roam et al., 2010) Several strategies have already been developed to mimic the design of functionalized biomaterial scaffolds using chemical techniques in hydrogel microstructures,(Richardson et al., 2006) multi-channels,(Lee et al., 2014) film conduits,(Tang et al., 2013) microspheres,(Jacob L Roam et al., 2010) and nanofibrous structures.(Zhang et al., 2008) The present work describes the production of a dual-graduated electrospun fiber biomaterial scaffold without any post spinning treatment requirements. This facile technique allows a dual outcome, a concentration gradient of bioactive molecule and density fibers into a nanofibrous scaffold along the y-axis of nanofibers.

### **1. Fibers Diameter and Alignment**

Using aligned electrospun fibrous scaffolds provide cues for cell culture and also mimics the structure and function of the extracellular matrix.(Simpson et al., 1994) Some specific cells, such as peripheral nerves used as a model in this work, require a complex and precise architecture,(Biazar et al., 2010a) and axons, glia and perineurium are aligned parallel to each other. Nerve regeneration is based on the recapitulation of this precise nerve tissue structure. Electrospinning provides nanofiber alignment and regular diameters that can be controlled.(Jose et al., 2012)(Grey et al., 2013). Qu et al.(Qu et al., 2013) showed that electrospun silk nanofiber scaffolds supported the growth, development and migration of cultured neural cells. In order to provide the growing axons with the proper surface, we

have adapted the electrospinning technique in order to fit biological requirements. An increase in cell-spreading was observed on small diameters, 400 nm and 800 nm, but not on larger diameters, 1200 nm, silk fiber scaffolds.(Qu et al., 2013) The present process used to form aligned nanofibers conferred an average diameter to the electrospun nanofibers of 672 nm, suitable for neuron adherence and growth. This was confirmed by the dissociated DRG cells growth assays in which the fibers alone promoted slight neurite extensions. Electrospun aligned fibers provided topographical cues to direct and enhance neurite outgrowth when compared to random fibers.(Corey et al., 2007) In the literature, the unidirectional contours of aligned fibers provided physical guidance to the cells,(Lee et al., 2013) facilitating axon path finding and accelerating nerve tissue regeneration.(Liu et al., 2010)

## **2. Gradient production**

Fiber alignment manages cell orientation. Creating a gradient along these aligned fibers increased the direction of cell motility.(Sundararaghavan et al., 2013) Bioactive molecules were added to the electrospinning solution to form the gradient. Fluorochromes with small molecular weight (479Da) and larger (70kDa) were successfully incorporated directly on the spinning solution. Both of the fluorochromes were found in the electrospun fibers suggesting that a range of proteins can be added to the spinning solution. A large family of growth factors and guidance cues(Vadivel et al., 2013) or ECM proteins(Valmikinathan et al., 2009) could be added to the spinning solution and used to develop other types of gradients. With this technique, two different molecules can be added to the solution at increasing and/or decreasing concentrations in order to control complex biological interactions. It is also possible to change molecules at each step of the electrospinning process, thus not forming a gradient but alternating areas between molecules in a scaffold for regional biofunctionalization.

## **3. NGF Functionalization**

NGF interactions with silk fibers relies mainly on ionic interactions.(Uebersax et al., 2007) No changes to silk secondary structure occurred as expected. Based on previous experience with growth factor incorporation and release from electrospun silk scaffolds(Li et

al., 2006)(Hu et al., 2011) we did not expect NGF incorporation to affect overall beta sheet content, as confirmed by the FTIR data after water annealing to promote beta sheet content in the present work. Moreover, at neutral pH, silk fibroin is negatively charged ( $pI = 4.3$ ) and NGF ( $pI = 9.3$ ) is positively charged.(Uebersax et al., 2007) The molecular weight of NGF (27 kDa) may also impede diffusion. These biophysical factors of charge and size can explain the lack of release observed in the experiments by ELISA. Interestingly, fiber-entrapped NGF was protected from degradation while preserving biological activity, as evidenced by the primary neuron growth.

#### **4. Neurite extension**

Neural cells are often cultured with neurobasal and constant concentration of nerve specific growth factors as brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, neurotrophin-3, NGF to promote axonal outgrowth.(Sandrock and Matthew, 1987)(Kamei et al., 2007) To date, gradients of NGF in 3D micropatterned neural cultures have been performed to influence the formation of synapses.(Kunze et al., 2011) Nerve cell migration is dependent on the chemical, mechanical and electrical properties of the substrates. The present work showed that neurite outgrowth was improved on NGF concentration gradients than with a constant concentration of NGF. Moreover, by using four different steepness gradients of the NGF, neurite extension was  $125 \mu\text{m}/\text{day}$  compared to  $79 \mu\text{m}/\text{day}$  in the constant concentration. These results demonstrate that biological activity was increased by the gradients. The gradient technique is suitable to stimulate peripheral nerve regeneration compared to constant concentrations. Many efforts have been pursued for the design of complicated architectures and scaffold structures to guide nerve regeneration. The introduction of these directional cues has the potential to improve the outcome for peripheral nerve repair. NGF gradients can also act as not only chemical directional cues but also a driving force for neurite outgrowth.(Tang et al., 2013)

This technique can be generally extended into different scaffolds to immobilize more than one bioactive molecule for other types of tissues as well. For example, the possibility of coupling two bioactive molecules in the scaffold gradients could be a strategy to generate new scaffolds for tendon grafts. The largest challenge in tendon grafts is the difficulty of

merging two interconnected tissue types such as muscle–tendon or tendon–bone junctions.(Samavedi et al., 2012)(Ladd et al., 2011)(Xie et al., 2010) This is important for both cell orientation and for the reliable mechanical properties necessary for controlled muscle, tendon, or ligament functions. Such mechanical characteristics may be achieved by modulating silk nanofiber density.

## **Conclusions**

A dual-gradient aligned electrospun nanofiber system was developed and characterized, made from silk loaded with NGF. To our knowledge, this is the first demonstration of a double gradient with bioactive molecules and silk nanofibers without any requirements for post spinning treatments. Loading NGF in silk fibers showed that the secondary structures of the silk-fibers were not altered. This new aligned electrospun nanofiber-based material displayed a discontinuous concentration of NGF, which was not released from silk electrospun fibers. The impact of the concentration gradient was highlighted by the increase in neuron growth rate compared to the constant NGF-concentration functionalization. This gradient configuration also induced unidirectional growth of neurons, which may be of interest for applications such as nerve reconstruction. This versatile electrospinning-gradient method may be used to develop others kinds of electrospun matrices for broader applications in tissue engineering and regenerative medicine.

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

## **Acknowledgement**

This work was supported by a grant of the region Picardie through the Silknerve project, the Tissue Engineering Resource Center (TERC, P41 EB002520) from Tufts University. We also thank Raphael Turcotte for his help on SEM analysis and for contributing to morphologic measurements of fibers. Tony M Dinis received a fellowship from the French Ministry of Science and Technology.



## References

- Ahmed, Z., Underwood, S., Brown, R.A., 2003. Nerve guide material made from fibronectin: assessment of in vitro properties. *Tissue Eng.* 9, 219–231. doi:10.1089/107632703764664693
- Airaksinen, M.S., Saarna, M., 2002. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 383–394. doi:10.1038/nrn812
- Aloe, L., 2011. Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first nerve cell growth factor. *Arch. Ital. Biol.* 149, 175–181. doi:10.4449/aib.v149i2.1377
- Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D.L., 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24, 401–416.
- Altman, G.H., Horan, R.L., Lu, H.H., Moreau, J., Martin, I., Richmond, J.C., Kaplan, D.L., 2002. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* 23, 4131–4141. doi:10.1016/S0142-9612(02)00156-4
- Ao, Q., Wang, A., Cao, W., Zhang, L., Kong, L., He, Q., Gong, Y., Zhang, X., 2006. Manufacture of multimicrotubule chitosan nerve conduits with novel molds and characterization in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A* 77, 11–18. doi:10.1002/jbm.a.30593
- Apel, P.J., Garrett, J.P., Sierpinski, P., Ma, J., Atala, A., Smith, T.L., Koman, L.A., Van Dyke, M.E., 2008. Peripheral nerve regeneration using a keratin-based scaffold: long-term functional and histological outcomes in a mouse model. *J. Hand Surg.* 33, 1541–1547. doi:10.1016/j.jhssa.2008.05.034
- Arai, T., Freddi, G., Innocenti, R., Tsukada, M., 2004. Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films. *J. Appl. Polym. Sci.* 91, 2383–2390. doi:10.1002/app.13393
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215. doi:10.1016/S0166-2236(98)01349-6
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., Herculano-Houzel, S., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541. doi:10.1002/cne.21974
- Ballice-Gordon, R.J., Lichtman, J.W., 1994. Long-term synapse loss induced by focal blockade of postsynaptic receptors. *Nature* 372, 519–524. doi:10.1038/372519a0
- Ballance, C.A., Ballance, H.A., Stewart, P., 1903. REMARKS on the OPERATIVE TREATMENT of CHRONIC FACIAL PALSY of PERIPHERAL ORIGIN. *Br. Med. J.* 1, 1009–1013.
- Barde, Y.A., Edgar, D., Thoenen, H., 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1, 549–553.
- Belkas, J.S., Shoichet, M.S., Midha, R., 2004. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol. Res.* 26, 151–160. doi:10.1179/016164104225013798
- Bennett, D.L., Michael, G.J., Ramachandran, N., Munson, J.B., Averill, S., Yan, Q., McMahon, S.B., Priestley, J.V., 1998. A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 3059–3072.
- Beurden, H.E., Snoek, P.A.M., Hoff, J.W., Torensma, R., Maltha, J.C., Kuijpers-Jagtman, A.M., 2006. In vitro migration and adhesion of fibroblasts from different phases of palatal wound healing. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 14, 66–71. doi:10.1111/j.1743-6109.2005.00090.x

- Bhat, N.V., Ahirrao, S.M., 1983. Investigation of the structure of silk film regenerated with lithium thiocyanate solution. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 21, 1273–1280. doi:10.1002/pol.1983.170210504
- Bhatheja, K., Field, J., 2006. Schwann cells: Origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1995–1999. doi:10.1016/j.biocel.2006.05.007
- Biazar, E., Khorasani, M., Montazeri, N., Pourshamsian, K., Daliri, M., T, M.R., B, M.J., Khoshzaban, A., K, S.H., Jafarpour, M., Roviemiab, Z., 2010a. Types of neural guides and using nanotechnology for peripheral nerve reconstruction. *Int. J. Nanomedicine* 5, 839–852. doi:10.2147/IJN.S11883
- Biazar, E., Khorasani, M.T., Zaeifi, D., 2010b. Nanotechnology for peripheral nerve regeneration. *Int. J. Nano Dimens.* 1, 1–23.
- Biosciences, M., n.d. Overview of microglial cells in the CNS [WWW Document]. *Overv. Microglial Cells*. URL <http://www.mdbiosciences.com/blog/bid/76291/Overview-of-microglial-cells-in-the-CNS> (accessed 7.24.14).
- Birch, R., 2011. *Surgical Disorders of the Peripheral Nerves*. Springer Science & Business Media.
- Blumenfeld, H., 2010. *Neuroanatomy Through Clinical Cases*. Sinauer Associates.
- Bora, F.W., 1978. A comparison of epineurial, perineurial and epiperineurial methods of nerve suture. *Clin. Orthop.* 91–94.
- Bouët, V., Borel, L., Harlay, F., Gahéry, Y., Lacour, M., 2004. Kinematics of treadmill locomotion in rats conceived, born, and reared in a hypergravity field (2 g). Adaptation to 1 g. *Behav. Brain Res.* 150, 207–216. doi:10.1016/S0166-4328(03)00258-4
- Braga-Silva, J., 1999. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 24, 703–706. doi:10.1054/jhsb.1999.0276
- Brandt, J., Dahlin, L.B., Kanje, M., Lundborg, G., 1999a. Spatiotemporal progress of nerve regeneration in a tendon autograft used for bridging a peripheral nerve defect. *Exp. Neurol.* 160, 386–393. doi:10.1006/exnr.1999.7210
- Brandt, J., Dahlin, L.B., Lundborg, G., 1999b. Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 24, 284–290. doi:10.1054/jhsb.1999.0074
- Braun, S., Croizat, B., Lagrange, M.C., Warter, J.M., Poindron, P., 1996. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord--human muscle cocultures. *J. Neurol. Sci.* 136, 17–23.
- Bryan, D.J., Tang, J.B., Doherty, S.A., Hile, D.D., Trantolo, D.J., Wise, D.L., Summerhayes, I.C., 2004. Enhanced peripheral nerve regeneration through a poled bioresorbable poly(lactic-co-glycolic acid) guidance channel. *J. Neural Eng.* 1, 91–98. doi:10.1088/1741-2560/1/2/004
- Büngner, O. v., 1890. Ueber die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen...
- Burnett, M.G., Zager, E.L., 2004. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg. Focus* 16, 1–7. doi:10.3171/foc.2004.16.5.2
- Cajal, S.R. y, 1991. *Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Oxford University Press.

- Campbell, W.W., 2008a. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 119, 1951–1965. doi:10.1016/j.clinph.2008.03.018
- Campbell, W.W., 2008b. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin. Neurophysiol.* 119, 1951–1965. doi:10.1016/j.clinph.2008.03.018
- Campenot, R.B., 1977. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 4516–4519.
- Canu, M.-H., Garnier, C., Lepoutre, F.-X., Falempin, M., 2005. A 3D analysis of hindlimb motion during treadmill locomotion in rats after a 14-day episode of simulated microgravity. *Behav. Brain Res.* 157, 309–321. doi:10.1016/j.bbr.2004.07.009
- Carlsson, A., 1993. Thirty years of dopamine research. *Adv. Neurol.* 60, 1–10.
- Chao, M.V., 2003. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 299–309. doi:10.1038/nrn1078
- Chernousov, M.A., Stahl, R.C., Carey, D.J., 2001. Schwann cell type V collagen inhibits axonal outgrowth and promotes Schwann cell migration via distinct adhesive activities of the collagen and noncollagen domains. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 6125–6135.
- Chiono, V., Vozzi, G., Vozzi, F., Salvadori, C., Dini, F., Carlucci, F., Arispici, M., Burchielli, S., Di Scipio, F., Geuna, S., Fornaro, M., Tos, P., Nicolino, S., Audisio, C., Perroteau, I., Chiaravalloti, A., Domenici, C., Giusti, P., Ciardelli, G., 2009. Melt-extruded guides for peripheral nerve regeneration. Part I: poly(epsilon-caprolactone). *Biomed. Microdevices* 11, 1037–1050. doi:10.1007/s10544-009-9321-9
- Chiu, D.T., Strauch, B., 1990. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plast. Reconstr. Surg.* 86, 928–934.
- Choi, B.-H., Zhu, S.-J., Kim, S.-H., Kim, B.-Y., Huh, J.-H., Lee, S.-H., Jung, J.-H., 2005. Nerve repair using a vein graft filled with collagen gel. *J. Reconstr. Microsurg.* 21, 267–272. doi:10.1055/s-2005-871754
- Claudepierre, T., Koncina, E., Pfrieder, F. w., Bagnard, D., Aunis, D., Reber, M., 2008. Implication of neuropilin 2/semaphorin 3F in retinocollicular map formation. *Dev. Dyn.* 237, 3394–3403. doi:10.1002/dvdy.21759
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., Hamburger, V., 1954. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 40, 1014–1018.
- Cohen-Karni, T., Jeong, K.J., Tsui, J.H., Reznor, G., Mustata, M., Wanunu, M., Graham, A., Marks, C., Bell, D.C., Langer, R., Kohane, D.S., 2012. Nanocomposite gold-silk nanofibers. *Nano Lett.* 12, 5403–5406. doi:10.1021/nl302810c
- Corey, J.M., Lin, D.Y., Mycek, K.B., Chen, Q., Samuel, S., Feldman, E.L., Martin, D.C., 2007. Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth. *J. Biomed. Mater. Res. A* 83, 636–645. doi:10.1002/jbm.a.31285
- Cornbrooks, C.J., Carey, D.J., McDonald, J.A., Timpl, R., Bunge, R.P., 1983. In vivo and in vitro observations on laminin production by Schwann cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 3850–3854.
- De Boer, R., Knight, A.M., Borntraeger, A., Hébert-Blouin, M.-N., Spinner, R.J., Malessy, M.J.A., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J., 2011. Rat sciatic nerve repair with a poly-lactic-co-glycolic acid scaffold and nerve growth factor releasing microspheres. *Microsurgery* 31, 293–302. doi:10.1002/micr.20869
- De Groot, P.J., Deck, L.L., 1994. Surface profiling by frequency-domain analysis of white light interferograms. pp. 101–104. doi:10.1117/12.194308

- De Ruyter, G.C.W., Malessy, M.J.A., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J., Spinner, R.J., 2009. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg. Focus* 26, E5. doi:10.3171/FOC.2009.26.2.E5
- Dedkov, E.I., Kostrominova, T.Y., Borisov, A.B., Carlson, B.M., 2001. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. *Anat. Rec.* 263, 139–154.
- Dellon, A.L., Mackinnon, S.E., 1988. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast. Reconstr. Surg.* 82, 849–856.
- Dellon, E.S., Dellon, A.L., 1993. The first nerve graft, Vulpian, and the nineteenth century neural regeneration controversy. *J. Hand Surg.* 18, 369–372. doi:10.1016/0363-5023(93)90378-G
- Desouches, C., Alluin, O., Mutaftschiev, N., Dousset, E., Magalon, G., Boucraut, J., Feron, F., Decherchi, P., 2005. La réparation nerveuse périphérique : 30 siècles de recherche. *Rev. Neurol. (Paris)* 161, 1045–1059. doi:10.1016/S0035-3787(05)85172-0
- Di Summa, P.G., Kingham, P.J., Raffoul, W., Wiberg, M., Terenghi, G., Kalbermatten, D.F., 2010. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg. JPRAS* 63, 1544–1552. doi:10.1016/j.bjps.2009.09.012
- Ding, T., Lu, W.W., Zheng, Y., Li, Z. yang, Pan, H. bo, Luo, Z., 2011. Rapid repair of rat sciatic nerve injury using a nanosilver-embedded collagen scaffold coated with laminin and fibronectin. *Regen. Med.* 6, 437–447. doi:10.2217/rme.11.39
- Dinis, Tony Mickael, Vidal, Guillaume, Egles, Christophe, 2013. Biomatériaux à base de nanofibres de soie pour des applications biomédicales. *Tech. Ing., Techniques de l'Ingénieur Nanotechnologies et biotechnologies pour la santé.*
- Donaghy, M., Hakin, R.N., Bamford, J.M., Garner, A., Kirkby, G.R., Noble, B.A., Tazir-Melboucy, M., King, R.H.M., Thomas, P.K., 1987. Hereditary Sensory Neuropathy with Neurotrophic Keratitis Description of an Autosomal Recessive Disorder with a Selective Reduction of Small Myelinated Nerve Fibres and a Discussion of the Classification of the Hereditary Sensory Neuropathies. *Brain* 110, 563–583. doi:10.1093/brain/110.3.563
- Dong, Y., Benveniste, E.N., 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180–190. doi:10.1002/glia.1107
- Donnelly, E.M., Strappe, P.M., McGinley, L.M., Madigan, N.N., Geurts, E., Rooney, G.E., Windebank, A.J., Fraher, J., Dockery, P., O'Brien, T., McMahon, S.S., 2010. Lentiviral vector-mediated knockdown of the NG2 [corrected] proteoglycan or expression of neurotrophin-3 promotes neurite outgrowth in a cell culture model of the glial scar. *J. Gene Med.* 12, 863–872. doi:10.1002/jgm.1509
- Edgar, D., Timpl, R., Thoenen, H., 1984. The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J.* 3, 1463–1468.
- Elia, R., Newhide, D.R., Pedevillano, P.D., Reiss, G.R., Firpo, M.A., Hsu, E.W., Kaplan, D.L., Prestwich, G.D., Peattie, R.A., 2013. Silk–hyaluronan-based composite hydrogels: A novel, securable vehicle for drug delivery. *J. Biomater. Appl.* 27, 749–762. doi:10.1177/0885328211424516
- Elliott, J.L., Snider, W.D., 1996. Motor neuron growth factors. *Neurology* 47, 47S–53S. doi:10.1212/WNL.47.4\_Suppl\_2.47S
- Erba, P., Mantovani, C., Kalbermatten, D.F., Pierer, G., Terenghi, G., Kingham, P.J., 2010. Regeneration potential and survival of transplanted undifferentiated adipose tissue-

- derived stem cells in peripheral nerve conduits. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg. JPRAS* 63, e811–817. doi:10.1016/j.bjps.2010.08.013
- Erminio, F., Buchthal, F., Rosenfalck, P., 1959. Motor unit territory and muscle fiber concentration in paresis due to peripheral nerve injury and anterior horn cell involvement. *Neurology* 9, 657–657. doi:10.1212/WNL.9.10.657
- Esaki, S., Kitoh, J., Katsumi, S., Goshima, F., Kimura, H., Safwat, M., Yamano, K., Watanabe, N., Nonoguchi, N., Nakamura, T., Coffin, R.S., Miyatake, S.-I., Nishiyama, Y., Murakami, S., 2011. Hepatocyte growth factor incorporated into herpes simplex virus vector accelerates facial nerve regeneration after crush injury. *Gene Ther.* 18, 1063–1069. doi:10.1038/gt.2011.57
- Fan, H., Liu, H., Toh, S.L., Goh, J.C.H., 2009. Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model. *Biomaterials* 30, 4967–4977. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.048
- Fansa, H., Schneider, W., Wolf, G., Keilhoff, G., 2002. Influence of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on nerve autografts and tissue-engineered nerve grafts. *Muscle Nerve* 26, 87–93. doi:10.1002/mus.10165
- Fawcett, J.W., Keynes, R.J., 1990. Peripheral Nerve Regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 13, 43–60. doi:10.1146/annurev.ne.13.030190.000355
- Fenrich, K., Gordon, T., 2004. Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* 31, 142–156.
- Fex Svenningsen, A., Dahlin, L.B., 2013. Repair of the Peripheral Nerve--Remyelination that Works. *Brain Sci.* 3, 1182–1197. doi:10.3390/brainsci3031182
- Filipe, V.M., Pereira, J.E., Costa, L.M., Maurício, A.C., Couto, P.A., Melo-Pinto, P., Varejão, A.S.P., 2006. Effect of skin movement on the analysis of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats. *J. Neurosci. Methods* 153, 55–61. doi:10.1016/j.jneumeth.2005.10.006
- Fine, E.G., Decosterd, I., Papaloizos, M., Zurn, A.D., Aebischer, P., 2002. GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur. J. Neurosci.* 15, 589–601. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.01892.x
- Finkelstein, D.I., Dooley, P.C., Luff, A.R., 1993. Recovery of muscle after different periods of denervation and treatments. *Muscle Nerve* 16, 769–777. doi:10.1002/mus.880160712
- Fitzgerald, M.J.T., 1996. *Neuroanatomy, basic and clinical.* W.B. Saunders.
- Florey, E., 1991. GABA: history and perspectives. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69, 1049–1056. doi:10.1139/y91-156
- Fu, S.Y., Gordon, T., 1995. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 3886–3895.
- Fuhs, T., Reuter, L., Vonderhaid, I., Claudepierre, T., Käs, J.A., 2013. Inherently slow and weak forward forces of neuronal growth cones measured by a drift-stabilized atomic force microscope. *Cytoskelet. Hoboken NJ* 70, 44–53. doi:10.1002/cm.21080
- Furuzono, T., Ishihara, K., Nakabayashi, N., Tamada, Y., 2000. Chemical modification of silk fibroin with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. II. Graft-polymerization onto fabric through 2-methacryloyloxyethyl isocyanate and interaction between fabric and platelets. *Biomaterials* 21, 327–333. doi:10.1016/S0142-9612(99)00177-5

- Garnier, C., Falempin, M., Canu, M.-H., 2008. A 3D analysis of fore- and hindlimb motion during locomotion: comparison of overground and ladder walking in rats. *Behav. Brain Res.* 186, 57–65. doi:10.1016/j.bbr.2007.07.023
- Gehrmann, J., Banati, R.B., Kreutzberg, G.W., 1993. Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *J. Neuroimmunol.* 48, 189–198.
- Gierthmühlen, J., Maier, C., Baron, R., Tölle, T., Treede, R.-D., Birbaumer, N., Hüge, V., Koroschetz, J., Krumova, E.K., Lauchart, M., Maihöfner, C., Richter, H., Westermann, A., 2012. Sensory signs in complex regional pain syndrome and peripheral nerve injury. *PAIN* 153, 765–774. doi:10.1016/j.pain.2011.11.009
- Gobin, A.S., Rhea, R., Newman, R.A., Mathur, A.B., 2006. Silk-fibroin-coated liposomes for long-term and targeted drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* 1, 81–87.
- GOTOH, K., IZUMI, H., KANAMOTO, T., TAMADA, Y., NAKASHIMA, H., 2000. Sulfated Fibroin, a Novel Sulfated Peptide Derived from Silk, Inhibits Human Immunodeficiency Virus Replication in Vitro. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1664–1670. doi:10.1271/bbb.64.1664
- Grey, C.P., Newton, S.T., Bowlin, G.L., Haas, T.W., Simpson, D.G., 2013. Gradient fiber electrospinning of layered scaffolds using controlled transitions in fiber diameter. *Biomaterials* 34, 4993–5006. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.033
- Gu, S., Shen, Y., Xu, W., Xu, L., Li, X., Zhou, G., Gu, Y., Xu, J., 2010. Application of fetal neural stem cells transplantation in delaying denervated muscle atrophy in rats with peripheral nerve injury. *Microsurgery* 30, 266–274. doi:10.1002/micr.20722
- Gu, S.H., Xu, W.D., Xu, L., Li, X.K., Ochiya, T., Wang, Y., Li, J.F., Gu, Y.D., Xu, J.G., 2010. Regenerated host axons form synapses with neurons derived from neural stem cells transplanted into peripheral nerves. *J. Int. Med. Res.* 38, 1721–1729.
- Gu, X., Ding, F., Yang, Y., Liu, J., 2011. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog. Neurobiol.* 93, 204–230. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.11.002
- Gulrajani, M.L., 1992. Degumming of silk. *Rev. Prog. Color. Relat. Top.* 22, 79–89. doi:10.1111/j.1478-4408.1992.tb00091.x
- Hardy, J.G., Römer, L.M., Scheibel, T.R., 2008. Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer* 49, 4309–4327. doi:10.1016/j.polymer.2008.08.006
- Haydon, P.G., 2001. Glia: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185–193. doi:10.1038/35058528
- Helgren, M.E., Cliffer, K.D., Torrento, K., Cavnor, C., Curtis, R., DiStefano, P.S., Wiegand, S.J., Lindsay, R.M., 1997. Neurotrophin-3 administration attenuates deficits of pyridoxine-induced large-fiber sensory neuropathy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 372–382.
- Herculano-Houzel, S., 2009. The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain. *Front. Hum. Neurosci.* 3. doi:10.3389/neuro.09.031.2009
- Hermanson, K.D., Harasim, M.B., Scheibel, T., Bausch, A.R., 2007. Permeability of silk microcapsules made by the interfacial adsorption of protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9, 6442. doi:10.1039/b709808a
- Hermanson, K.D., Huemmerich, D., Scheibel, T., Bausch, A.R., 2007. Engineered Microcapsules Fabricated from Reconstituted Spider Silk. *Adv. Mater.* 19, 1810–1815. doi:10.1002/adma.200602709

- Hill, P.S., Apel, P.J., Barnwell, J., Smith, T., Koman, L.A., Atala, A., Van Dyke, M., 2011. Repair of peripheral nerve defects in rabbits using keratin hydrogel scaffolds. *Tissue Eng. Part A* 17, 1499–1505. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0184
- Hobson, M.I., Green, C.J., Terenghi, G., 2000. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J. Anat.* 197 Pt 4, 591–605.
- Hopkins, A.M., De Laporte, L., Tortelli, F., Spedden, E., Staii, C., Atherton, T.J., Hubbell, J.A., Kaplan, D.L., 2013. Silk Hydrogels as Soft Substrates for Neural Tissue Engineering. *Adv. Funct. Mater.* 23, 5140–5149. doi:10.1002/adfm.201300435
- Hopkins, J.M., Bunge, R.P., 1991. Regeneration of axons from adult rat retinal ganglion cells on cultured Schwann cells is not dependent on basal lamina. *Glia* 4, 46–55. doi:10.1002/glia.440040106
- Horner, P.J., Gage, F.H., 2000. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407, 963–970. doi:10.1038/35039559
- Hou, S.T., Jiang, S.X., Smith, R.A., 2008. Permissive and Repulsive Cues and Signalling Pathways of Axonal Outgrowth and Regeneration, in: Kwang W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 125–181.
- Hsu, S.-H., Chan, S.-H., Weng, C.-T., Yang, S.-H., Jiang, C.-F., 2013. Long-Term Regeneration and Functional Recovery of a 15 mm Critical Nerve Gap Bridged by Tremella fuciformis Polysaccharide-Immobilized Polylactide Conduits. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 959261. doi:10.1155/2013/959261
- Hu, X., Shmelev, K., Sun, L., Gil, E.-S., Park, S.-H., Cebe, P., Kaplan, D.L., 2011. Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing. *Biomacromolecules* 12, 1686–1696. doi:10.1021/bm200062a
- Ichihara, S., Inada, Y., Nakamura, T., 2008. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. *Injury* 39 Suppl 4, 29–39. doi:10.1016/j.injury.2008.08.029
- Jin, H.-J., Chen, J., Karageorgiou, V., Altman, G.H., Kaplan, D.L., 2004. Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials* 25, 1039–1047. doi:10.1016/S0142-9612(03)00609-4
- Jin, H.-J., Fridrikh, S.V., Rutledge, G.C., Kaplan, D.L., 2002. Electrospinning Bombyx mori Silk with Poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules* 3, 1233–1239. doi:10.1021/bm025581u
- Jin, H.-J., Park, J., Karageorgiou, V., Kim, U.-J., Valluzzi, R., Cebe, P., Kaplan, D.L., 2005. Water-Stable Silk Films with Reduced  $\beta$ -Sheet Content. *Adv. Funct. Mater.* 15, 1241–1247. doi:10.1002/adfm.200400405
- Jose, R.R., Elia, R., Firpo, M.A., Kaplan, D.L., Peattie, R.A., 2012. Seamless, axially aligned, fiber tubes, meshes, microbundles and gradient biomaterial constructs. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23, 2679–2695. doi:10.1007/s10856-012-4739-7
- Kakade, M.V., Givens, S., Gardner, K., Lee, K.H., Chase, D.B., Rabolt, J.F., 2007. Electric Field Induced Orientation of Polymer Chains in Macroscopically Aligned Electrospun Polymer Nanofibers. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2777–2782. doi:10.1021/ja065043f
- Kalbermatten, D.F., Pettersson, J., Kingham, P.J., Pierer, G., Wiberg, M., Terenghi, G., 2009. New fibrin conduit for peripheral nerve repair. *J. Reconstr. Microsurg.* 25, 27–33. doi:10.1055/s-0028-1090619
- Kamei, N., Tanaka, N., Oishi, Y., Hamasaki, T., Nakanishi, K., Sakai, N., Ochi, M., 2007. BDNF, NT-3, and NGF released from transplanted neural progenitor cells promote

- corticospinal axon growth in organotypic cocultures. *Spine* 32, 1272–1278. doi:10.1097/BRS.0b013e318059afab
- Kandel, E., Schwartz, J., 2013. *Principles of Neural Science, Fifth Edition*. McGraw Hill Professional.
- Kang, C.E., Gemeinhart, E.J., Gemeinhart, R.A., 2004. Cellular alignment by grafted adhesion peptide surface density gradients. *J. Biomed. Mater. Res. A* 71, 403–411. doi:10.1002/jbm.a.30137
- Karlsson, S., Albertsson, A., 1998. Biodegradable polymers and environmental interaction. *Polym. Eng. Sci.* 38, 1251–1253. doi:10.1002/pen.10294
- Katona, P.G., 2010. Biomedical engineering in heart-brain medicine: A review. *Cleve. Clin. J. Med.* 77, S46–S50. doi:10.3949/ccjm.77.s3.08
- Kehoe, S., Zhang, X.F., Boyd, D., 2012a. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury* 43, 553–572. doi:10.1016/j.injury.2010.12.030
- Kehoe, S., Zhang, X.F., Lewis, L., O’Shea, H., Boyd, D., 2012b. Characterization of PLGA based composite nerve guidance conduits: effect of F127 content on modulus over time in simulated physiological conditions. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 14, 180–185. doi:10.1016/j.jmbbm.2012.06.003
- Khakh, B.S., Burnstock, G., 2009. THE DOUBLE LIFE OF ATP. *Sci. Am.* 301, 84–92.
- Kidd, G.J., Ohno, N., Trapp, B.D., 2013. Biology of Schwann cells. *Handb. Clin. Neurol.* 115, 55–79. doi:10.1016/B978-0-444-52902-2.00005-9
- Kim, U.-J., Park, J., Joo Kim, H., Wada, M., Kaplan, D.L., 2005. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* 26, 2775–2785. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.044
- Kloos, A.D., Fisher, L.C., Detloff, M.R., Hassenzehl, D.L., Basso, D.M., 2005. Stepwise motor and all-or-none sensory recovery is associated with nonlinear sparing after incremental spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* 191, 251–265. doi:10.1016/j.expneurol.2004.09.016
- Ko, F., Gogotsi, Y., Ali, A., Naguib, N., Ye, H., Yang, G. I., Li, C., Willis, P., 2003. Electrospinning of Continuous Carbon Nanotube-Filled Nanofiber Yarns. *Adv. Mater.* 15, 1161–1165. doi:10.1002/adma.200304955
- Kofuji, T., Fujiwara, T., Sanada, M., Mishima, T., Akagawa, K., 2014. HPC-1/syntaxin 1A and syntaxin 1B play distinct roles in neuronal survival. *J. Neurochem.* doi:10.1111/jnc.12722
- Koizumi, S., Fujishita, K., 2007. [Gliotransmitter ATP-mediated cell-to-cell communication]. *Brain Nerve Shinkei Kenkyū No Shinpo* 59, 707–715.
- Kokai, L.E., Bourbeau, D., Weber, D., McAtee, J., Marra, K.G., 2011. Sustained Growth Factor Delivery Promotes Axonal Regeneration in Long Gap Peripheral Nerve Repair. *Tissue Eng. Part A* 17, 1263–1275. doi:10.1089/ten.tea.2010.0507
- Konofaos, P., Ver Halen, J., 2013. Nerve Repair by Means of Tubulization: Past, Present, Future. *J. Reconstr. Microsurg.* 29, 149–164. doi:10.1055/s-0032-1333316
- Koob, A.O., Colby, J.M., Borgens, R.B., 2008. Behavioral recovery from traumatic brain injury after membrane reconstruction using polyethylene glycol. *J. Biol. Eng.* 2, 9. doi:10.1186/1754-1611-2-9
- Kothapalli, C.R., van Veen, E., de Valence, S., Chung, S., Zervantonakis, I.K., Gertler, F.B., Kamm, R.D., 2011. A high-throughput microfluidic assay to study neurite response to growth factor gradients. *Lab. Chip* 11, 497–507. doi:10.1039/c0lc00240b



- Kretschmer, T., Antoniadis, G., Braun, V., Rath, S.A., Richter, H.P., 2001. Evaluation of iatrogenic lesions in 722 surgically treated cases of peripheral nerve trauma. *J. Neurosurg.* 94, 905–912. doi:10.3171/jns.2001.94.6.0905
- Kriegelstein, K., Strelau, J., Schober, A., Sullivan, A., Unsicker, K., 2002. TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J. Physiol. Paris* 96, 25–30.
- Kunkel-Bagden, E., Dai, H.N., Bregman, B.S., 1993. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* 119, 153–164. doi:10.1006/exnr.1993.1017
- Kunze, A., Valero, A., Zosso, D., Renaud, P., 2011. Synergistic NGF/B27 gradients position synapses heterogeneously in 3D micropatterned neural cultures. *PLoS One* 6, e26187. doi:10.1371/journal.pone.0026187
- Kutilek, P., Viteckova, S., Svoboda, Z., Smrcka, P., 2013. Kinematic quantification of gait asymmetry in patients with peroneal nerve palsy based on bilateral cyclograms. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 13, 244–250.
- Ladak, A., Olson, J., Tredget, E.E., Gordon, T., 2011. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp. Neurol.* 228, 242–252. doi:10.1016/j.expneurol.2011.01.013
- Ladd, M.R., Lee, S.J., Stitzel, J.D., Atala, A., Yoo, J.J., 2011. Co-electrospun dual scaffolding system with potential for muscle-tendon junction tissue engineering. *Biomaterials* 32, 1549–1559. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.10.038
- Latash, M.L., Scholz, J.P., Schöner, G., 2002. Motor control strategies revealed in the structure of motor variability. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 30, 26–31.
- Lee, J.-H., Lee, Y.J., Cho, H.-J., Shin, H., 2013. Guidance of In Vitro Migration of Human Mesenchymal Stem Cells and In Vivo Guided Bone Regeneration Using Aligned Electrospun Fibers. *Tissue Eng. Part A* Epub ahead of print. doi:10.1089/ten.tea.2013.0282
- Lee, K.H., Lee, K.H., Lee, J., Choi, H., Lee, D., Park, Y., Lee, S.-H., 2014. Integration of microfluidic chip with biomimetic hydrogel for 3D controlling and monitoring of cell alignment and migration. *J. Biomed. Mater. Res. A* 102, 1164–1172. doi:10.1002/jbm.a.34772
- Lein, P.J., Banker, G.A., Higgins, D., 1992. Laminin selectively enhances axonal growth and accelerates the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *Dev. Brain Res.* 69, 191–197. doi:10.1016/0165-3806(92)90159-T
- Lein, P.J., Higgins, D., Turner, D.C., Flier, L.A., Terranova, V.P., 1991. The NC1 domain of type IV collagen promotes axonal growth in sympathetic neurons through interaction with the alpha 1 beta 1 integrin. *J. Cell Biol.* 113, 417–428.
- Leslie-Barbick, J.E., Shen, C., Chen, C., West, J.L., 2011. Micron-scale spatially patterned, covalently immobilized vascular endothelial growth factor on hydrogels accelerates endothelial tubulogenesis and increases cellular angiogenic responses. *Tissue Eng. Part A* 17, 221–229. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0202
- Levinthal, R., Brown, W.J., Rand, R.W., 1977. Comparison of fascicular, interfascicular and epineural suture techniques in the repair of simple nerve lacerations. *J. Neurosurg.* 47, 744–750. doi:10.3171/jns.1977.47.5.0744
- Lewin, M., 2006. *Handbook of Fiber Chemistry*, Third Edition. CRC Press.
- Li, C., Vepari, C., Jin, H.-J., Kim, H.J., Kaplan, D.L., 2006. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3115–3124. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.022

- Li, M., Lu, S., Wu, Z., Yan, H., Mo, J., Wang, L., 2001. Study on porous silk fibroin materials. I. Fine structure of freeze dried silk fibroin. *J. Appl. Polym. Sci.* 79, 2185–2191. doi:10.1002/1097-4628(20010321)79:12<2185::AID-APP1026>3.0.CO;2-3
- Li, Z., Peng, J., Wang, G., Yang, Q., Yu, H., Guo, Q., Wang, A., Zhao, B., Lu, S., 2008. Effects of local release of hepatocyte growth factor on peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts. *Exp. Neurol.* 214, 47–54. doi:10.1016/j.expneurol.2008.07.007
- Liao, C.-D., Zhang, F., Guo, R.-M., Zhong, X.-M., Zhu, J., Wen, X.-H., Shen, J., 2012. Peripheral nerve repair: monitoring by using gadofluorine M-enhanced MR imaging with chitosan nerve conduits with cultured mesenchymal stem cells in rat model of neurotmesis. *Radiology* 262, 161–171. doi:10.1148/radiol.11110911
- Liao, I.-C., Wan, H., Qi, S., Cui, C., Patel, P., Sun, W., Xu, H., 2013. Preclinical evaluations of acellular biological conduits for peripheral nerve regeneration. *J. Tissue Eng.* 4, 2041731413481036. doi:10.1177/2041731413481036
- Liu, B.-S., 2008. Fabrication and evaluation of a biodegradable proanthocyanidin-crosslinked gelatin conduit in peripheral nerve repair. *J. Biomed. Mater. Res. A* 87, 1092–1102. doi:10.1002/jbm.a.31916
- Liu, T., Houle, J.D., Xu, J., Chan, B.P., Chew, S.Y., 2012. Nanofibrous collagen nerve conduits for spinal cord repair. *Tissue Eng. Part A* 18, 1057–1066. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0430
- Liu, W., Thomopoulos, S., Xia, Y., 2012. Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Adv. Healthc. Mater.* 1, 10–25. doi:10.1002/adhm.201100021
- Liu, X., Chen, J., Gilmore, K.J., Higgins, M.J., Liu, Y., Wallace, G.G., 2010. Guidance of neurite outgrowth on aligned electrospun polypyrrole/poly(styrene-beta-isobutylene-beta-styrene) fiber platforms. *J. Biomed. Mater. Res. A* 94, 1004–1011. doi:10.1002/jbm.a.32675
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000. Overview of Neuron Structure and Function [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21535/> (accessed 7.27.14).
- Lopatina, T., Kalinina, N., Karagyaour, M., Stambolsky, D., Rubina, K., Revischin, A., Pavlova, G., Parfyonova, Y., Tkachuk, V., 2011. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One* 6, e17899. doi:10.1371/journal.pone.0017899
- Lundborg, G., Dahlin, L., Danielsen, N., Zhao, Q., 1994. Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration. *J. Reconstr. Microsurg.* 10, 345–354. doi:10.1055/s-2007-1006604
- Lundborg, G., Rosén, B., Dahlin, L., Holmberg, J., Rosén, I., 2004. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 29, 100–107. doi:10.1016/j.jhsb.2003.09.018
- Lutz, B.S., Chuang, D.C., Hsu, J.C., Ma, S.F., Wei, F.C., 2000. Selection of donor nerves--an important factor in end-to-side neurotaphy. *Br. J. Plast. Surg.* 53, 149–154. doi:10.1054/bjps.1999.3252
- Ma, X.-L., Sun, X.-L., Yang, Z., Li, X.-L., Ma, J.-X., Zhang, Y., Yuan, Z.-Z., 2011. Biomechanical properties of peripheral nerve after acellular treatment. *Chin. Med. J. (Engl.)* 124, 3925–3929.

- Madduri, S., di Summa, P., Papaloizos, M., Kalbermatten, D., Gander, B., 2010. Effect of controlled co-delivery of synergistic neurotrophic factors on early nerve regeneration in rats. *Biomaterials* 31, 8402–8409. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.052
- Madduri, S., Papaloizos, M., Gander, B., 2010. Trophically and topographically functionalized silk fibroin nerve conduits for guided peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 31, 2323–2334. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.073
- Magnaghi, V., Conte, V., Procacci, P., Pivato, G., Cortese, P., Cavalli, E., Pajardi, G., Ranucci, E., Fenili, F., Manfredi, A., Ferruti, P., 2011. Biological performance of a novel biodegradable polyamidoamine hydrogel as guide for peripheral nerve regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A* 98A, 19–30. doi:10.1002/jbm.a.33091
- Mai, J., Fok, L., Gao, H., Zhang, X., Poo, M.-M., 2009. Axon initiation and growth cone turning on bound protein gradients. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 7450–7458. doi:10.1523/JNEUROSCI.1121-09.2009
- Malin, S.A., Davis, B.M., Molliver, D.C., 2007. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat. Protoc.* 2, 152–160. doi:10.1038/nprot.2006.461
- Mandal, B.B., Grinberg, A., Gil, E.S., Panilaitis, B., Kaplan, D.L., 2012. High-strength silk protein scaffolds for bone repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 7699–7704. doi:10.1073/pnas.1119474109
- Marieb, E.N., 2006. *Human Anatomy & Physiology*. Benjamin Cummings ; Pearson.
- Marmor, L., 1964. The repair of peripheral nerves by irradiated homografts. *Clin. Orthop.* 34, 161–169.
- Martini, R., 1994. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J. Neurocytol.* 23, 1–28.
- Masaeli, E., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Sadri, S., Hilderink, J., van Apeldoorn, A., van Blitterswijk, C.A., Moroni, L., 2013. Fabrication, characterization and cellular compatibility of poly(hydroxy alcanoate) composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *PloS One* 8, e57157. doi:10.1371/journal.pone.0057157
- Mason, M.R.J., Tannemaat, M.R., Malessy, M.J.A., Verhaagen, J., 2011. Gene therapy for the peripheral nervous system: a strategy to repair the injured nerve? *Curr. Gene Ther.* 11, 75–89.
- Maturana, L.G., Pierucci, A., Simões, G.F., Vidigal, M., Duek, E.A.R., Vidal, B.C., Oliveira, A.L.R., 2013. Enhanced peripheral nerve regeneration by the combination of a polycaprolactone tubular prosthesis and a scaffold of collagen with supramolecular organization. *Brain Behav.* 3, 417–430. doi:10.1002/brb3.145
- McKay Hart, A., Wiberg, M., Terenghi, G., 2003. Exogenous leukaemia inhibitory factor enhances nerve regeneration after late secondary repair using a bioartificial nerve conduit. *Br. J. Plast. Surg.* 56, 444–450.
- Meek, M.F., Varejão, A.S.P., Geuna, S., 2004. Use of skeletal muscle tissue in peripheral nerve repair: review of the literature. *Tissue Eng.* 10, 1027–1036. doi:10.1089/ten.2004.10.1027
- Meinel, L., Hofmann, S., Karageorgiou, V., Kirker-Head, C., McCool, J., Gronowicz, G., Zichner, L., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., 2005. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* 26, 147–155. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.047

- Mennen, U., van der Westhuizen, M.J., Eggers, I.M., 2003. Re-innervation of M. biceps by end-to-side nerve suture. *Hand Surg. Int. J. Devoted Hand Up. Limb Surg. Relat. Res. J. Asia-Pac. Fed. Soc. Surg. Hand* 8, 25–31.
- Millesi, H., 1967. [Nerve transplantation for reconstruction of peripheral nerves injured by the use of the microsurgical technic]. *Minerva Chir.* 22, 950–951.
- Mita, K., Ichimura, S., James, T.C., 1994. Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. *J. Mol. Evol.* 38, 583–592. doi:10.1007/BF00175878
- Mitsingou, J., Goma, P., 1993. Le crush-syndrome au cours de l'écrasement du membre supérieur (A propos d'un cas observé à la clinique chirurgicale des Armées de Pointe-Noire - CONGO). *Médecine Afr. Noire* 12.
- Monville, C., Peschanski, M., 2001. Le CNTF, une cytokine gliale au secours des neurones. *MS Médecine Sci.* 17, 568–576.
- Munson, J.B., McMahan, S.B., 1997. Effects of GDNF on axotomized sensory and motor neurons in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1126–1129.
- Murphey, F., Hartung, W., Kirklin, J.W., 1947. Myelographic demonstration of avulsing injury of the brachial plexus. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther.* 58, 102–105.
- Murphey, F., Kirklin, J., 1973. Chapter 3. Myelographic demonstration of avulsing injuries of the nerve roots of the brachial plexus--a method of determining the point of injury and the possibility of repair. *Clin. Neurosurg.* 20, 18–28.
- Murphy, A.R., John, P.S., Kaplan, D.L., 2008. Modification of silk fibroin using diazonium coupling chemistry and the effects on hMSC proliferation and differentiation. *Biomaterials* 29, 2829–2838. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.03.039
- Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci., Polymers in Biomedical Applications* 32, 762–798. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017
- Nazarov, R., Jin, H.-J., Kaplan, D.L., 2004. Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin. *Biomacromolecules* 5, 718–726. doi:10.1021/bm034327e
- Ndubaku, U., de Bellard, M.E., 2008. Glial cells: Old cells with new twists. *Acta Histochem.* 110, 182–195. doi:10.1016/j.acthis.2007.10.003
- Nectow, A.R., Marra, K.G., Kaplan, D.L., 2012. Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits. *Tissue Eng. Part B Rev.* 18, 40–50. doi:10.1089/ten.TEB.2011.0240
- Nguyen, Q.T., Sanes, J.R., Lichtman, J.W., 2002. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat. Neurosci.* 5, 861–867. doi:10.1038/nn905
- Nikolaev, S.I., Gallyamov, A.R., Mamin, G.V., Chelyshev, Y.A., 2014. Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Nerve Conduit and Local Delivery of vegf and fgf2 Genes Stimulate Neuroregeneration. *Bull. Exp. Biol. Med.* 157, 155–158. doi:10.1007/s10517-014-2513-1
- Nishiura, Y., Brandt, J., Nilsson, A., Kanje, M., Dahlin, L.B., 2004. Addition of cultured Schwann cells to tendon autografts and freeze-thawed muscle grafts improves peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 10, 157–164. doi:10.1089/107632704322791808
- Noble, J., Munro, C., Prasad, V.S., Midha, R., 1998. Analysis of Upper and Lower Extremity Peripheral Nerve Injur... : *Journal of Trauma and Acute Care Surgery. J. Trauma-Inj. Infect. Crit. Care* 116–122.

- Oakley, R.A., Lefcort, F.B., Clary, D.O., Reichardt, L.F., Prevette, D., Oppenheim, R.W., Frank, E., 1997. Neurotrophin-3 promotes the differentiation of muscle spindle afferents in the absence of peripheral targets. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 4262–4274.
- Ochoa, J., Danta, G., Fowler, T.J., Gilliatt, R.W., 1971. Nature of the Nerve Lesion caused by a Pneumatic Tourniquet. *Nature* 233, 265–266. doi:10.1038/233265a0
- Ochoa, J., Fowler, T.J., Gilliatt, R.W., 1972. Anatomical changes in peripheral nerves compressed by a pneumatic tourniquet. *J. Anat.* 113, 433–455.
- Oguievetskaia, K., Cifuentes-Diaz, C., Girault, J.-A., Goutebroze, L., 2005. [Cellular contacts in myelinated fibers of the peripheral nervous system]. *Médecine Sci. MS* 21, 162–169. doi:10.1051/medsci/2005212162
- Ou, J., He, Y., Xiao, X., Yu, T.-M., Chen, C., Gao, Z., Ho, M.S., 2014. Glial cells in neuronal development: recent advances and insights from *Drosophila melanogaster*. *Neurosci. Bull.* doi:10.1007/s12264-014-1448-2
- Panilaitis, B., Altman, G.H., Chen, J., Jin, H.-J., Karageorgiou, V., Kaplan, D.L., 2003. Macrophage responses to silk. *Biomaterials* 24, 3079–3085. doi:10.1016/S0142-9612(03)00158-3
- Park, H., Poo, M., 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23. doi:10.1038/nrn3379
- Parker, A.J., Clarke, K.A., 1990. Gait topography in rat locomotion. *Physiol. Behav.* 48, 41–47.
- Peltonen, S., Alanne, M., Peltonen, J., 2013. Barriers of the peripheral nerve. *Tissue Barriers* 1. doi:10.4161/tisb.24956
- Penna, V., Wewetzer, K., Munder, B., Stark, G.B., Lang, E.M., 2012. The long-term functional recovery of repair of sciatic nerve transection with biogenic conduits. *Microsurgery* 32, 377–382. doi:10.1002/micr.21974
- Pereda, A.E., 2014. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 250–263. doi:10.1038/nrn3708
- Pereira, J.E., Cabrita, A.M., Filipe, V.M., Bulas-Cruz, J., Couto, P.A., Melo-Pinto, P., Costa, L.M., Geuna, S., Maurício, A.C., Varejão, A.S.P., 2006. A comparison analysis of hindlimb kinematics during overground and treadmill locomotion in rats. *Behav. Brain Res.* 172, 212–218. doi:10.1016/j.bbr.2006.04.027
- Pereira, J.H., Bowden, R.E., Gattuso, J.M., Norris, R.W., 1991a. Comparison of results of repair of digital nerves by denatured muscle grafts and end-to-end sutures. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 16, 519–523.
- Pereira, J.H., Palande, D.D., Subramanian, A., Narayanakumar, T.S., Curtis, J., Turk, J.L., 1991b. Denatured autologous muscle graft in leprosy. *Lancet* 338, 1239–1240.
- Phillips, J.B., Bunting, S.C.J., Hall, S.M., Brown, R.A., 2005. Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit. *Tissue Eng.* 11, 1611–1617. doi:10.1089/ten.2005.11.1611
- Potter, G.B., Rowitch, D.H., Petryniak, M.A., 2011. Myelin restoration: progress and prospects for human cell replacement therapies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 59, 179–193. doi:10.1007/s00005-011-0120-7
- Potter, S.M., DeMarse, T.B., 2001. A new approach to neural cell culture for long-term studies. *J. Neurosci. Methods* 110, 17–24.
- Potucek, R.K., Kemp, S.W.P., Syed, N.I., Midha, R., 2009. Peripheral Nerve Injury, Repair, and Regeneration, in: Santin, M. (Ed.), *Strategies in Regenerative Medicine*. Springer New York, pp. 1–20.

- Pummi, K.P., Aho, H.J., Laato, M.K., Peltonen, J.T.K., Peltonen, S.A., 2006. Tight junction proteins and perineurial cells in neurofibromas. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 54, 53–61. doi:10.1369/jhc.5A6671.2005
- Purves, D., 2005. *Neurosciences: De Boeck Supérieur.*
- Qu, J., Wang, D., Wang, H., Dong, Y., Zhang, F., Zuo, B., Zhang, H., 2013. Electrospun silk fibroin nanofibers in different diameters support neurite outgrowth and promote astrocyte migration. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101, 2667–2678. doi:10.1002/jbm.a.34551
- Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1545–1564. doi:10.1098/rstb.2006.1894
- Reina, M.A., López, A., Villanueva, M.C., de Andrés, J.A., León, G.I., 2000. [Morphology of peripheral nerves, their sheaths, and their vascularization]. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.* 47, 464–475.
- Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., Weiss, S., 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 4565–4574.
- Reynolds, B.A., Weiss, S., 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Richardson, S.M., Curran, J.M., Chen, R., Vaughan-Thomas, A., Hunt, J.A., Freemont, A.J., Hoyland, J.A., 2006. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-l-lactic acid (PLLA) scaffolds. *Biomaterials* 27, 4069–4078. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.03.017
- Richner, M., Bjerrum, O.J., Nykjaer, A., Vaegter, C.B., 2011. The Spared Nerve Injury (SNI) Model of Induced Mechanical Allodynia in Mice. *J. Vis. Exp. JoVE.* doi:10.3791/3092
- Roam, J.L., Xu, H., Nguyen, P.K., Elbert, D.L., 2010. The formation of protein concentration gradients mediated by density differences of poly(ethylene glycol) microspheres. *Biomaterials* 31, 8642–8650. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.085
- Roam, J.L., Xu, H., Nguyen, P.K., Elbert, D.L., 2010. The formation of protein concentration gradients mediated by density differences of poly(ethylene glycol) microspheres. *Biomaterials* 31, 8642–8650. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.085
- Rockwood, D.N., Preda, R.C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M.L., Kaplan, D.L., 2011. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat. Protoc.* 6, 1612–1631. doi:10.1038/nprot.2011.379
- Sahoo, S., Ang, L.T., Goh, J.C.-H., Toh, S.-L., 2010. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 93A, 1539–1550. doi:10.1002/jbm.a.32645
- Saika, T., Senba, E., Noguchi, K., Sato, M., Yoshida, S., Kubo, T., Matsunaga, T., Tohyama, M., 1991. Effects of nerve crush and transection on mRNA levels for nerve growth factor receptor in the rat facial motoneurons. *Mol. Brain Res.* 9, 157–160. doi:10.1016/0169-328X(91)90142-K
- Salter, M.W., Beggs, S., 2014. Sublime Microglia: Expanding Roles for the Guardians of the CNS. *Cell* 158, 15–24. doi:10.1016/j.cell.2014.06.008
- Samavedi, S., Guelcher, S.A., Goldstein, A.S., Whittington, A.R., 2012. Response of bone marrow stromal cells to graded co-electrospun scaffolds and its implications for engineering the ligament-bone interface. *Biomaterials* 33, 7727–7735. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.008

- Sandrock, A.W., Jr, Matthew, W.D., 1987. Substrate-bound nerve growth factor promotes neurite growth in peripheral nerve. *Brain Res.* 425, 360–363.
- Santiago, L.Y., Clavijo-Alvarez, J., Brayfield, C., Rubin, J.P., Marra, K.G., 2009. Delivery of adipose-derived precursor cells for peripheral nerve repair. *Cell Transplant.* 18, 145–158.
- Santin, M., Motta, A., Freddi, G., Cannas, M., 1999. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J. Biomed. Mater. Res.* 46, 382–389. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19990905)46:3<382::AID-JBM11>3.0.CO;2-R
- Sashina, E.S., Bochek, A.M., Novoselov, N.P., Kirichenko, D.A., 2006. Structure and solubility of natural silk fibroin. *Russ. J. Appl. Chem.* 79, 869–876. doi:10.1134/S1070427206060012
- Savignat, M., De-Doncker, L., Vodouhe, C., Garza, J.M., Lavalley, P., Libersa, P., 2007. Rat nerve regeneration with the use of a polymeric membrane loaded with NGF. *J. Dent. Res.* 86, 1051–1056.
- Savignat, M., Vodouhe, C., Ackermann, A., Haikel, Y., Lavalley, P., Libersa, P., 2008. Evaluation of early nerve regeneration using a polymeric membrane functionalized with nerve growth factor (NGF) after a crush lesion of the rat mental nerve. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 66, 711–717. doi:10.1016/j.joms.2007.06.654
- Schneider, A., Wang, X.Y., Kaplan, D.L., Garlick, J.A., Egles, C., 2009. Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta Biomater.* 5, 2570–2578. doi:10.1016/j.actbio.2008.12.013
- Schuster, B., Kovaleva, M., Sun, Y., Regenhard, P., Matthews, V., Grötzinger, J., Rose-John, S., Kallen, K.-J., 2003. Signaling of Human Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Revisited THE INTERLEUKIN-6 RECEPTOR CAN SERVE AS AN  $\alpha$ -RECEPTOR FOR CNTF. *J. Biol. Chem.* 278, 9528–9535. doi:10.1074/jbc.M210044200
- Scott, J.B., Afshari, M., Kotek, R., Saul, J.M., 2011. The promotion of axon extension in vitro using polymer-templated fibrin scaffolds. *Biomaterials* 32, 4830–4839. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.037
- Shanthaveerappa, T.R., Bourne, G.H., 1962. The “perineural epithelium”, a metabolically active, continuous, protoplasmic cell barrier surrounding peripheral nerve fasciculi. *J. Anat.* 96, 527–537.
- Sherrington, C., 1906. *The Integrative Action of the Nervous System.* Cambridge University Press.
- Shi, J., Wang, L., Zhang, F., Li, H., Lei, L., Liu, L., Chen, Y., 2010. Incorporating protein gradient into electrospun nanofibers as scaffolds for tissue engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2, 1025–1030. doi:10.1021/am9007962
- Siemionow, M., Brzezicki, G., 2009. Chapter 8 Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair, in: Stefano Geuna; Pierluigi Tos and Bruno Battiston (Ed.), *International Review of Neurobiology.* Academic Press, pp. 141–172.
- Silver, J., Miller, J.H., 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 146–156. doi:10.1038/nrn1326
- Simpson, D.G., Terracio, L., Terracio, M., Price, R.L., Turner, D.C., Borg, T.K., 1994. Modulation of cardiac myocyte phenotype in vitro by the composition and orientation of the extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.* 161, 89–105. doi:10.1002/jcp.1041610112

- Sofia, S., McCarthy, M.B., Gronowicz, G., Kaplan, D.L., 2001. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J. Biomed. Mater. Res.* 54, 139–148.
- Sofroniew, M.V., Howe, C.L., Mobley, W.C., 2001. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1217–1281. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1217
- Sterne, G.D., Brown, R.A., Green, C.J., Terenghi, G., 1997a. Neurotrophin-3 delivered locally via fibronectin mats enhances peripheral nerve regeneration. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1388–1396.
- Sterne, G.D., Coulton, G.R., Brown, R.A., Green, C.J., Terenghi, G., 1997b. Neurotrophin-3-enhanced nerve regeneration selectively improves recovery of muscle fibers expressing myosin heavy chains 2b. *J. Cell Biol.* 139, 709–715.
- Stoll, G., Jander, S., Myers, R.R., 2002. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* 7, 13–27.
- Stoll, G., Müller, H.W., 1999. Nerve Injury, Axonal Degeneration and Neural Regeneration: Basic Insights. *Brain Pathol.* 9, 313–325. doi:10.1111/j.1750-3639.1999.tb00229.x
- Stukel, J., Thompson, S., Simon, L., Willits, R., 2014. Polyethylene glycol microgels to deliver bioactive nerve growth factor. *J. Biomed. Mater. Res. A.* doi:10.1002/jbm.a.35209
- Sulaiman, O.A., Gordon, T., 2000. Effects of short- and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. *Glia* 32, 234–246.
- Sundararaghavan, H.G., Saunders, R.L., Hammer, D.A., Burdick, J.A., 2013. Fiber alignment directs cell motility over chemotactic gradients. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 1249–1254. doi:10.1002/bit.24788
- Tamada, Y., 2005. New Process to Form a Silk Fibroin Porous 3-D Structure. *Biomacromolecules* 6, 3100–3106. doi:10.1021/bm050431f
- Tang, J.B., Gu, Y.Q., Song, Y.S., 1993. Repair of digital nerve defect with autogenous vein graft during flexor tendon surgery in zone 2. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 18, 449–453.
- Tang, J.B., Shi, D., Zhou, H., 1995. Vein conduits for repair of nerves with a prolonged gap or in unfavourable conditions: an analysis of three failed cases. *Microsurgery* 16, 133–137.
- Tang, S., Zhu, J., Xu, Y., Xiang, A.P., Jiang, M.H., Quan, D., 2013. The effects of gradients of nerve growth factor immobilized PCLA scaffolds on neurite outgrowth in vitro and peripheral nerve regeneration in rats. *Biomaterials* 34, 7086–7096. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.05.080
- Tansey, E.M., 2006. Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C. R. Biol.* 329, 419–425. doi:10.1016/j.crv.2006.03.012
- Terzis, J.K., Papakonstantinou, K.C., 2000. The surgical treatment of brachial plexus injuries in adults. *Plast. Reconstr. Surg.* 106, 1097–1122; quiz 1123–1124.
- Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123–1133.
- Thompson, A.W., Pujic, Z., Richards, L.J., Goodhill, G.J., 2011. Cyclic nucleotide-dependent switching of mammalian axon guidance depends on gradient steepness. *Mol. Cell. Neurosci.* 47, 45–52. doi:10.1016/j.mcn.2011.02.012
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., Martin, G.R., 1979. Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 9933–9937.
- Tobita, M., Orbay, H., Mizuno, H., 2011. Adipose-derived Stem Cells: Current Findings and Future Perspectives. *Discov. Med.* 11, 160–170.



- Tonda-Turo, C., Gnavi, S., Ruini, F., Gambarotta, G., Gioffredi, E., Chiono, V., Perroteau, I., Ciardelli, G., 2014. Development and characterization of novel agar and gelatin injectable hydrogel as filler for peripheral nerve guidance channels. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* doi:10.1002/term.1902
- Topp, K.S., Boyd, B.S., 2012. Peripheral nerve: from the microscopic functional unit of the axon to the biomechanically loaded macroscopic structure. *J. Hand Ther. Off. J. Am. Soc. Hand Ther.* 25, 142–151; quiz 152. doi:10.1016/j.jht.2011.09.002
- Torpy, J.M., Kincaid, J.L., Glass, R.M., 2008. JAMA patient page. Peripheral neuropathy. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 299, 1096. doi:10.1001/jama.299.9.1096
- Tortora, G.J., Grabowski, S.R., 2002. *Principles of Anatomy and Physiology.* Wiley.
- Twarog, B.M., Page, I.H., 1953. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.* 175, 157–161.
- Twiss, J.L., Minnen, J.V., 2006. New Insights into Neuronal Regeneration: The Role of Axonal Protein Synthesis in Pathfinding and Axonal Extension. *J. Neurotrauma* 23, 295–308. doi:10.1089/neu.2006.23.295
- Uebersax, L., Mattotti, M., Papaloizos, M., Merkle, H.P., Gander, B., Meinel, L., 2007. Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF). *Biomaterials* 28, 4449–4460. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.034
- Vadivel, A., Alphonse, R.S., Collins, J.J.P., van Haaften, T., O'Reilly, M., Eaton, F., Thébaud, B., 2013. The axonal guidance cue semaphorin 3C contributes to alveolar growth and repair. *PloS One* 8, e67225. doi:10.1371/journal.pone.0067225
- Valmikinathan, C.M., Wang, J., Smiriglio, S., Golwala, N.G., Yu, X., 2009. Magnetically induced protein gradients on electrospun nanofibers. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 12, 656–663.
- Varkey, M., Gittens, S.A., Uludag, H., 2004. Growth factor delivery for bone tissue repair: an update. *Expert Opin. Drug Deliv.* 1, 19–36. doi:10.1517/17425247.1.1.19
- Vepari, C., Kaplan, D.L., 2007. Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci., Polymers in Biomedical Applications* 32, 991–1007. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013
- Verkhatsky, A., Butt, A.M., 2007. *Glial Neurobiology.* John Wiley & Sons.
- Vesce, S., Bezzi, P., Volterra, A., 2001. Synaptic transmission with the glia. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 16, 178–184.
- Vidal, G., Bianchi, T., Mieszawska, A.J., Calabrese, R., Rossi, C., Vigneron, P., Duval, J.-L., Kaplan, D.L., Egles, C., 2013. Enhanced cellular adhesion on titanium by silk functionalized with titanium binding and RGD peptides. *Acta Biomater.* 9, 4935–4943. doi:10.1016/j.actbio.2012.09.003
- Viterbo, F., Trindade, J.C., Hoshino, K., Mazzoni Neto, A., 1992. Latero-terminal neuroorrhaphy without removal of the epineural sheath. Experimental study in rats. *Rev. Paul. Med.* 110, 267–275.
- Volterra, A., Meldolesi, J., 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626–640. doi:10.1038/nrn1722
- Waller, A., 1850a. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 140, 423–429. doi:10.1098/rstl.1850.0021
- Waller, A., 1850b. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the

- Structure of Their Primitive Fibres. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 140, 423–429. doi:10.1098/rstl.1850.0021
- Walter, M.A., Kurouglu, R., Caulfield, J.B., Vasconez, L.O., Thompson, J.A., 1993. Enhanced peripheral nerve regeneration by acidic fibroblast growth factor. *Lymphokine Cytokine Res.* 12, 135–141.
- Wang, A., Ao, Q., Cao, W., Yu, M., He, Q., Kong, L., Zhang, L., Gong, Y., Zhang, X., 2006. Porous chitosan tubular scaffolds with knitted outer wall and controllable inner structure for nerve tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* 79, 36–46. doi:10.1002/jbm.a.30683
- Wang, C.-Y., Liu, J.-J., Fan, C.-Y., Mo, X.-M., Ruan, H.-J., Li, F.-F., 2012. The effect of aligned core-shell nanofibres delivering NGF on the promotion of sciatic nerve regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 23, 167–184. doi:10.1163/092050610X545805
- Wang, J.T., Medress, Z.A., Barres, B.A., 2012. Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J. Cell Biol.* 196, 7–18. doi:10.1083/jcb.201108111
- Wang, M., Jin, H.-J., Kaplan, D.L., Rutledge, G.C., 2004. Mechanical Properties of Electrospun Silk Fibers. *Macromolecules* 37, 6856–6864. doi:10.1021/ma048988v
- Wang, M., Yu, J.H., Kaplan, D.L., Rutledge, G.C., 2006. Production of Submicron Diameter Silk Fibers under Benign Processing Conditions by Two-Fluid Electrospinning. *Macromolecules* 39, 1102–1107. doi:10.1021/ma0517749
- Wang, Y., Rudym, D.D., Walsh, A., Abrahamsen, L., Kim, H.-J., Kim, H.S., Kirker-Head, C., Kaplan, D.L., 2008. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials* 29, 3415–3428. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.05.002
- Wenk, E., Merkle, H.P., Meinel, L., 2011. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. *J. Controlled Release* 150, 128–141. doi:10.1016/j.jconrel.2010.11.007
- Whitaker-Azmitia, P.M., 1999. The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 21, 2S–8S. doi:10.1016/S0893-133X(99)00031-7
- Wilkins, A., Majed, H., Layfield, R., Compston, A., Chandran, S., 2003. Oligodendrocytes Promote Neuronal Survival and Axonal Length by Distinct Intracellular Mechanisms: A Novel Role for Oligodendrocyte-Derived Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *J. Neurosci.* 23, 4967–4974.
- Wittmer, C.R., Claudepierre, T., Reber, M., Wiedemann, P., Garlick, J.A., Kaplan, D., Egles, C., 2011. Multifunctionalized electrospun silk fibers promote axon regeneration in central nervous system. *Adv. Funct. Mater.* 21, 4202. doi:10.1002/adfm.201190103
- Wood, M.D., Hunter, D., Mackinnon, S.E., Sakiyama-Elbert, S.E., 2010. Heparin-binding-affinity-based delivery systems releasing nerve growth factor enhance sciatic nerve regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 21, 771–787. doi:10.1163/156856209X445285
- Wu, G., Ju, L., Jin, T., Chen, L., Shao, L., Wang, Y., Liu, B., 2010. Local delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 increases axonal regeneration and the expression of tau protein after facial nerve injury. *J. Int. Med. Res.* 38, 1682–1688.
- Wu, J., Chiu, D.T., 1999. Painful neuromas: a review of treatment modalities. *Ann. Plast. Surg.* 43, 661–667.
- Xie, J., Li, X., Lipner, J., Manning, C.N., Schwartz, A.G., Thomopoulos, S., Xia, Y., 2010. “Aligned-to-random” nanofiber scaffolds for mimicking the structure of the tendon-to-bone insertion site. *Nanoscale* 2, 923–926. doi:10.1039/c0nr00192a

- Xu, H., Yan, Y., Li, S., 2011. PDLLA/chondroitin sulfate/chitosan/NGF conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 32, 4506–4516. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.023
- Yang, Y., Chen, X., Ding, F., Zhang, P., Liu, J., Gu, X., 2007. Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Biomaterials* 28, 1643–1652. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.12.004
- Zaborszky, L., Wouterlood, F.G., Lanciego, J.L., 2006. *Neuroanatomical Tract-Tracing: Molecules, Neurons, and Systems*. Springer Science & Business Media.
- Zaminy, A., Shokrgozar, M.A., Sadeghi, Y., Norouzi, M., Heidari, M.H., Piryaee, A., 2013. Transplantation of schwann cells differentiated from adipose stem cells improves functional recovery in rat spinal cord injury. *Arch. Iran. Med.* 16, 533–541. doi:10.13169/AIM.0011
- Zarkoob, S., Reneker, D.H., Ertley, D., Eby, R.K., Hudson, S.D., 2000. Hexafluoroisopropanol, electrospinning, no acid treatment. US6110590 A.
- Zeng, W., Rong, M., Hu, X., Xiao, W., Qi, F., Huang, J., Luo, Z., 2014. Incorporation of chitosan microspheres into collagen-chitosan scaffolds for the controlled release of nerve growth factor. *PloS One* 9, e101300. doi:10.1371/journal.pone.0101300
- Zhang, J., Lineaweaver, W.C., Oswald, T., Chen, Z., Chen, Z., Zhang, F., 2004. Ciliary neurotrophic factor for acceleration of peripheral nerve regeneration: an experimental study. *J. Reconstr. Microsurg.* 20, 323–327. doi:10.1055/s-2004-824891
- Zhang, X., Baughman, C.B., Kaplan, D.L., 2008. In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth. *Biomaterials* 29, 2217–2227. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.022
- Zhang, X., Reagan, M.R., Kaplan, D.L., 2009. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 988–1006. doi:10.1016/j.addr.2009.07.005
- Zhao, C., Yao, J., Masuda, H., Kishore, R., Asakura, T., 2003. Structural characterization and artificial fiber formation of Bombyx mori silk fibroin in hexafluoro-iso-propanol solvent system. *Biopolymers* 69, 253–259. doi:10.1002/bip.10350
- Zhu, M., Wang, K., Mei, J., Li, C., Zhang, J., Zheng, W., An, D., Xiao, N., Zhao, Q., Kong, D., Wang, L., n.d. Fabrication of highly interconnected porous silk fibroin scaffolds for potential use as vascular grafts. *Acta Biomater.* doi:10.1016/j.actbio.2014.01.022

# Transition

---

Dans cet article, nous montrons l'intérêt d'établir un gradient de concentration sur ces nanofibres fonctionnalisées afin d'orienter la croissance cellulaire nerveuse dans une unique direction. La méthode développée ici génère un double gradient de NGF et de fibres de SF sans aucun traitement post filage. Les Tests ELISA effectués sur les lamelles de verre recouvertes de nanofibres font preuve de la fonctionnalisation et de la stabilité de la molécule NGF incorporée dans le matériau. La fonctionnalisation des nanofibres de soie par le NGF augmente la survie et la croissance axonale des neurones. De plus, les différentes quantifications montrent que le gradient de concentration de NGF conduit à une meilleure orientation et croissance des neurones issus de DRG ( $417,6 \pm 55,7 \mu\text{m}$ ) par rapport à une concentration constante de NGF ( $264,5 \pm 37,6 \mu\text{m}$ ). Cette configuration induit la croissance des neurones de façon unidirectionnelle, ce qui permet une meilleure reconstruction des nerfs périphériques pour de futures applications.

Bien que cette nouvelle approche propose des résultats probants, nous nous sommes uniquement intéressés à la croissance des axones. Dans notre état de l'art, nous avons vu et longtemps insisté sur le rôle essentiel que jouent les cellules de Schwann dans la régénération et la réparation nerveuse. Afin de pouvoir influencer sur plusieurs populations cellulaires issues du tissu nerveux, nous avons décidé de concevoir des nanofibres bifonctionnalisées par deux facteurs de croissance. Ces deux facteurs de croissance sont le NGF et le CNTF, qui à ce jour, n'ont pas encore été étudié de manière globale.

Les travaux décrits dans ce troisième article présentent la conception de nanofibres de soie bifonctionnalisées et alignées sur lamelles de verre. La bioactivité et la synergie de ces deux facteurs de croissance couplés à nos nanofibres de soie ont été analysées puis étudiées suite aux cultures de cellules présentes dans les DRGs. Enfin, les résultats obtenus permettent de sélectionner les meilleures nanofibres fonctionnalisées pour concevoir le premier conduit nerveux à base de soie pour une future implantation chez l'animal.

## ARTICLE III

### **Complementary Effects of Two Growth Factors in Multifunctionalized Silk Nanofibers for Nerve Reconstruction**

Tony M Dinis<sup>1,2</sup>, Guillaume Vidal<sup>1</sup>, Rodrigo R Jose<sup>2</sup>, Pascale Vigneron<sup>1</sup>, Damien Bresson<sup>1</sup>, Vincent Fitzpatrick<sup>1</sup>, Frédéric Marin<sup>1</sup>, David L Kaplan<sup>2</sup> and Christophe Egles<sup>1,3\*</sup>.

<sup>1</sup> *Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), UMR CNRS 7338, Université de Technologie de Compiègne, Rue Roger Couttolenc, CS 60319 - 60203 Compiègne Cedex, France*

<sup>2</sup> *Biomedical engineering, Science & Technology Center, 4 Colby Street, Tufts University, Medford, MA 02155, USA*

<sup>3</sup> *Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Tufts University, School of Dental Medicine, 1 Kneeland St, Boston, MA 02111, USA*

**Short Title: Multifunctionalized silk for nerve regeneration**

\*Corresponding author:

Christophe EGLES

UMR CNRS 7338, Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), Université de Technologie de Compiègne, France

Email [\*\*christophe.Egles@utc.fr\*\*](mailto:christophe.Egles@utc.fr)

Phone : + 33 3 44 23 44 22

G. Vidal and T.M. Dinis contributed equally to this work

## Abstract

With the aim of forming bioactive guides for peripheral nerve regeneration, silk fibroin was electrospun to obtain aligned nanofibers. These fibers were functionalized by incorporating Nerve Growth Factor (NGF) and Ciliary NeuroTrophic Factor (CNTF) during electrospinning. PC12 cells grown on the fibers confirmed the bioavailability and bioactivity of the NGF, which was not significantly released from the fibers. Primary neurons from rat dorsal root ganglia (DRGs) were grown on the nanofibers and anchored to the fibers and grew in a directional fashion based on the fiber orientation, and as confirmed by growth cone morphology. These biofunctionalized nanofibers led to a 3-fold increase in neurite length at their contact, which was likely due to the NGF. Glial cell growth, alignment and migration were stimulated by the CNTF in the functionalized nanofibers. Organotypic culture of rat foetal DRGs confirmed the complementary effect of both growth factors in multifunctionalized nanofibers, which allowed glial cell migration, alignment and parallel axonal growth in structures resembling the 'bands of Bungner' found *in situ*. Graftable multi-channel conduits based on biofunctionalized aligned silk nanofibers were developed as an organized 3D scaffold. Our bioactive silk tubes thus represent new options for biological and biocompatible nerve guidance conduit.

**Keywords:** silk, bioactivity, nerve regeneration, multi-channels tube

## Introduction

When a peripheral nerve is sectioned, the axonal segment distal to the lesion site undergoes Wallerian degeneration [1, 2], while the proximal segment is able to regenerate axonal sprouts that can eventually re-establish motor and sensory nerve function. However, the repair of peripheral nerve lesions, especially after the loss of a full segment of the nerve, remains a challenge in reconstructive surgery [3]. Clinical strategies to treat peripheral nerve injuries include the use of a primary suture in an end-to-end manner, the use of a biological nerve guide such as arteries, veins or muscles for small gaps and the use of nerve autografts for larger gaps [4]. However, autologous nerve transplantation remains inadequate for large and complex lesions of peripheral nerves because of the limited availability of material suitable for grafting and donor site morbidity [5].

Recent years have witnessed the development of increasingly sophisticated bioengineered nerve graft substitutes composed of synthetic or natural polymer-based nerve guides. These biodegradable nerve guides have been prepared with or without nerve growth factors or with pre-seeded Schwann cells [6, 7]. The ability of the scaffold to support axonal growth and also to stimulate and direct this response is pivotal in promoting efficient nerve tissue repair [8, 9].

Silk is a well known material used in the textile industry for centuries and by physicians as sutures for decades. Silk is a natural macromolecular protein polymer which is synthesized by the epithelial cells of specialized glands, secreted into the lumen and finally spun into fibers by several Lepidopteran larvae [10]. The sericin-free silk fibroin fiber exhibited excellent biocompatibility both in vitro and in vivo [11]. Over the last few years, silk fibroins (SF) have been increasingly studied for biomedical applications due to their favorable biocompatibility and controllable degradation rates, which can be tuned for hours to years based on the mode of processing. SFs also demonstrated remarkable mechanical properties and the ability to be shaped into different material formats [12].

One of the major remaining challenges in regenerative neurobiology is to design suitable biomimetic nerve guides. In order to achieve the desired functionality of the nerve to be replaced, the guide needs to be carefully engineered to elicit specific responses from

local cells and tissues [13]. Many techniques have been developed for fabricating fibrous scaffolds for use as tissue substitutes. Electrospinning has emerged a useful technique due to the ability to generate fibers similar to the scale of fibrous structures of native extracellular matrices (ECM) [14]. In addition, electrospinning is a relatively simple, robust and versatile technique capable of generating fibers with diameters in the nanometric range [15]. Bioactive molecules incorporated into the fibers upon spinning can be available to stimulate the proliferation and differentiation of seeded cells during in vitro culture, thereby encouraging tissue regeneration after implantation in vivo. Many different types of bioactive molecules have been incorporated into scaffolds of electrospun nanofibers, including adhesive molecules/biomimetic peptides and growth factors [16, 17]. Among multiples growth factors found in the body, neurotrophic factors (NTFs) play a crucial role in regulating the development and function of different sets of neurons of the mammalian nervous system [18]. Nerve Growth Factor (NGF), for example promoted neuronal survival and regeneration both in vitro and in vivo [19]. Another neurotrophic factor, the ciliary neurotrophic factor (CNTF) produced by astrocytes, is abundantly present in peripheral nerves, is localized mainly in the cytoplasm of myelinating Schwann cells and its synthesis is decreased during Wallerian degeneration [20, 21]. It has also been shown that CNTF is a neuroprotective agent and improved the remyelination of regenerated nerves [22, 23].

In the present study we aimed at developing new multifunctionalized silk-based material to support and promote peripheral nervous system (PNS) nerve regeneration. To emulate the preclinical development of this material, the material system was evaluated using: (i) a neurotrophic sensitive cell line, (ii) rat dorsal root ganglia primary neuronal cultures and (iii) an organotypic culture of the entire rat dorsal root ganglia. This multiscale strategy supported the demonstration of the full capacities of this new silk-based nanomaterial system, leading to the synthesis of a biological, biodegradable and bioactive 3D nerve guide for surgical implantation.

## **Materials and methods**

### **1 Materials**

Cocoons of the silkworm *Bombyx mori* were supplied by Tajima Shoji Co. (Yojohama,



Japan). All Chemicals were supplied by Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Slide-a-Lyzer dialysis cassettes were purchased from Pierce, Inc. (Rockford, IL, USA). All products for cell culture are from Gibco, Life Technologies SAS, France. Growth factors, NGF and CNTF were supplied by R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA).

## **2 Preparation of Silk fibroin solution**

Silk solutions were prepared following our previous published procedures [24]. Briefly, *B. mori* silkworm cocoons were cut into small pieces and boiled for 30 minutes in an aqueous solution of 0.02 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, rinsed for 20 min three times with cold deionized (DI) water, and then allowed to dry for 48 h at room temperature. Dried silk fibroin was dissolved in 9.3 M LiBr solution at 60° C for 4 h. Silk solutions were dialyzed against DI water using Slide-a-Lyzer dialysis cassettes (membrane MWCO 3500) for 72h to remove salts. The final concentration of aqueous silk fibroin solution was 6–7 wt%, which was calculated by weighing the remaining solid after drying. Solution was then concentrated by dialyzing against 15% (w/v) polyethylene glycol (PEG) for 5 h to produce ~10 wt%. Silk solutions were stored at 4°C.

## **3 Preparation of spinning functionalized solution**

Silk fibroin solutions were mixed with 5 wt% polyethylene oxide (PEO, Mw= 900 000) in a 4:1 ratio to produce a 9% silk/PEO solution. To functionalize the spinning solution, NGF, CNTF or both growth factors, reconstituted in PBS containing 0.1% bovine serum albumin solution, were added to the spinning solution at a concentration of 1 µg.mL<sup>-1</sup> and 0.1µg.mL<sup>-1</sup>, respectively.

## **4 Electrospinning**

Electrospinning was performed according to procedures described previously [17]. Briefly, silk fibroin solution (functionalized or not) was delivered through a 16G stainless-steel capillary at a constant flow rate of 0.015 mL.min<sup>-1</sup> with a syringe pump (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The syringe needle was set at 12 kV voltage with a high

voltage power supply (Gamma High Voltage Research ES-30P, Ormond Beach, FL, USA) and mounted at the center of a 10 cm diameter aluminium plate. The distance between the needle and the ground collector was set to 15 cm. Aligned silk fibers on glass cover slips were produced using an oscillating ground deposition system (ODS) consisting in switching an electrical ground back and forth between two flat, zinc-plated steel plates which were used as collectors. The mechanical switch (McMaster-Carr, Inc., Atlanta, GA, USA) alternates the location of ground between two independent collectors and was maintained continuously during the electrospinning process at 0.33 Hz [25]. Glass Cover slips were deposited on the tape to collect the electrospun silk fibroin. For 3D scaffold design, the electrospinning duration was 90 min and the collector consisted in a rotating mandrel (rotation speed:  $10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ). All electrospun fibroin were treated by water vapor annealing for 8h to obtain water insoluble silk mats [26].

## **5 Nanofibers diameter and alignment**

More than 200 Fibers were measured using an image processing software (ImageJ, MATLAB). Fiber diameters were measured from SEM images of the aligned scaffold. Straight lines were drawn along the length of the image and at each intersection of lines and electrospun fibers, the software calculate the diameter and the angle of each fiber were calculated using ImageJ, to define nanofibers alignment.

## **6 Roughness measurements**

The Zygo™ NewView 200 is a scanning white-light interferometry that uses Frequency Domain Analysis (FDA) to generate quantitative 3D images of surfaces [27]; measurements use a white light filter based on a center wavelength of 600 nm, with a bandwidth of 125 nm. The interference patterns were recorded by a CCD camera; each measurement contains 320 x 240 data points.

## **2.7 ELISA**

In order to prevent any release of loosely bound factors NGF and CNTF-functionalized electrospun nanofibers (n=3) were incubated in 2 mL of sterile PBS containing 0.1 % BSA at

37°C without any pre-treatment (like ethanol sterilization) and 150µL were harvested after 1, 2, 8, 48 and 120 hours and stored at -80°C. NGF and CNTF release assays were performed with the ChemiKine™ Nerve Growth Factor Sandwich ELISA Kit (Millipore, France) and Raybio® Rat CNTF ELISA kit (TEBU-BIO, France) respectively, according to the manufacturer's instructions.

## **8 PC12 cell culture**

The PC12 cell line was a generous gift from Dr Frédérique René (Faculté de médecine, Strasbourg, France). All products are from Gibco, except rat  $\beta$ -NGF from R&D systems, France. Cells were routinely cultured in RPMI 1640 medium complemented with 10% horse serum, 5% de-complemented foetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U.mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin and subcultured once a week at 25,000 cells/cm<sup>2</sup> after trypsinisation, with medium changes every 2-3 days. For differentiation assays, cells were seeded at 10,000 cells/cm<sup>2</sup> in differentiation medium composed of RPMI 1640 complemented with 1% horse serum, 2mM L-glutamine, 100 U.mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin. The medium was renewed every 2-3 days. Cells were incubated for 7 to 11 days at 37°C in an atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. For positive controls, 50 ng.mL<sup>-1</sup> of rat  $\beta$ -NGF was added in differentiation medium.

## **9 DRGs extraction and cells culture**

DRG cells were obtained from young male Sprague Dawley rats (1-3 months old). All procedures were carried out in compliance with Université de Technologie Compiègne Ethical Committee, France. DRGs were extracted under hood and incubated in 2.5% collagenase (Sigma) for 15 min at 37°C and pellet by centrifugation (1 min 500g). They were incubated 15 min in trypsin (Sigma) 0.5 % and DNase I (Sigma) at 1 mg.mL<sup>-1</sup> at 37°C and pellet by centrifugation (1 min 500g). After a wash with F-12 medium, DRGs were dissociated by ten passages in a fire-polished Pasteur pipette. The mean yield of cells obtained per rat was 100,000 with 90% viability and cells were seeded at 7 500 cells per glass slide (12 mm square). For organotypic culture, DRGs were extracted from E15 rat embryos. Finally, glass slides were coated with poly-lysine/laminin before seeding, as described in Malin et al. [28]. For cells and organotypic culture, medium consisted in 37°C pre-warm F-12 medium (Gibco),

10% horse serum (Gibco) and 100 U.mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin. Medium was changed every 3 days.

## **10 Scanning electron microscopy**

Samples were rinsed in PBS, fixed in 3% glutaraldehyde in Rembaum buffer (pH 7.4) [29] for 1 h, dehydrated in a series of graded alcohols, critical-point dried from CO<sub>2</sub> (Polaron Instrument Inc., Nottingham UK), sputter-coated with gold (Polaron) and examined in a Philips ESEM-FEG XL30 environmental scanning electron microscope (ESEM).

## **11 Immunofluorescence imaging**

Cells and DRGs were fixed at different times post-seeding in 4% paraformaldehyde solution in PBS for 15 min and 45 min respectively, at room temperature and rinsed three times with PBS. Samples were permeabilized in 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature and rinsed twice with PBS before 1 h incubation at room temperature in 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Rabbit primary antibody rabbit directed against  $\beta$ III tubulin (Sigma-Aldrich, France) was diluted (1:150) in PBS/BSA 0.1% (w/v) and incubated at room temperature for 1 h. The cells were washed two times with 0.1% BSA in PBS. Cy3-conjugated secondary antibody (cy3 goat anti-rabbit IgG, Jackson Immunoresearch), 40,6-diamidino-2- phenylindole (DAPI; 1 µg.mL<sup>-1</sup>, Sigma) and Phalloidin-X5- 505 (0.16 nmol ml<sup>-1</sup>, Fluoroprobes, France) were added and incubated at room temperature in the dark for 1 h. The samples were then rinsed with PBS, mounted in Mowiol and observed using a LEICA DMI 6000 microscope or a LSM 710 scanning confocal microscope which images were analyzed with 'Zen 2011' software.

## **12 Morphometric and statistical analysis**

Images were analyzed using Mathworks' Matlab software. Low signal was filtered out using a threshold based on intensity (the silk fibers and background noise present lower pixel intensities than the cell bodies and neurites). In each image, the number of cells was determined using the signal from DAPI staining. Then each neurite was isolated using the tubulin staining and its length was measured using the 'bwmorph' and 'regionprops'

functions of the Matlab Image Processing Toolbox. This step was carried out by skeletonization of the neurite, and if necessary manual cropping of superfluous branches. Artifacts and signal from cellular debris were eliminated from analysis using the 'bwareaopen' function of the Matlab Image Processing Toolbox. The results were interpreted by determining the average number of neurites per cell and average neurite length.

For the average number of neurites per cell, average neurites length and glia/neurons ratio data  $\pm$  SEM from 3 independent experiments were analyzed for each condition and at least 90 cells have been analyzed per condition. Statistical analyses were performed with 'InStat' software, using the Mann-Whitney unpaired with two-tailed P test.

### **13 3D silk tube**

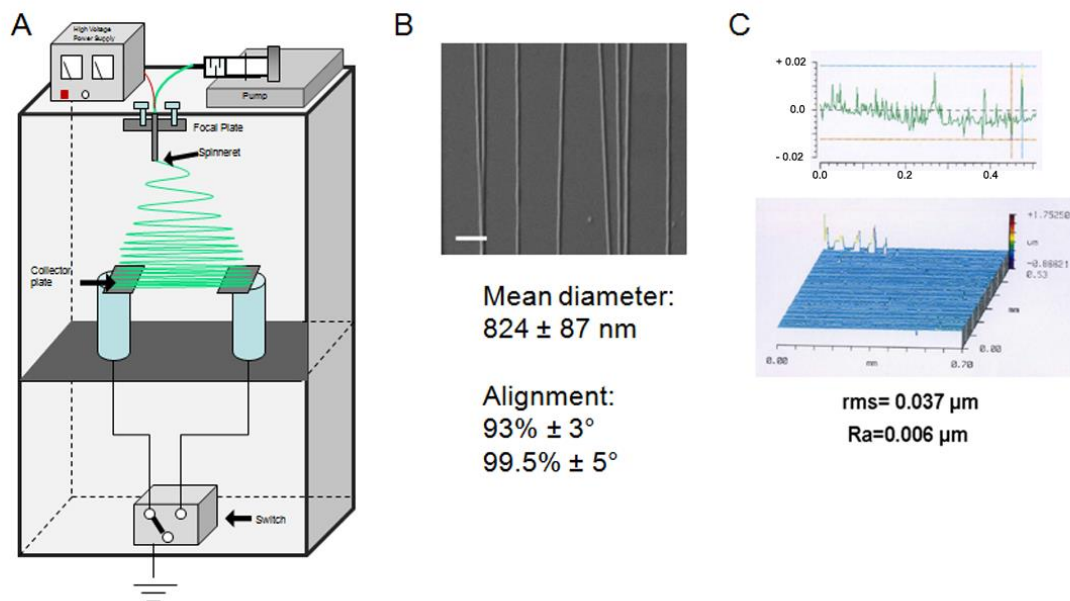
After 90 min. of electrospinning, electrospun fibers were removed from the mandrel and rolled up at 360° about 40 times using Teflon sticks (0.3 mm diameter) in order to get a final tube of about 1.5 mm diameter (close to the one of a rat sciatic nerve). Teflon sticks were removed after the water vapor annealing process. The obtained silk tube was wetted overnight at 4°C in sterile PBS and then sutured (10-0 suture FG 2850; Ethicon, Somerville, NJ) to a sciatic nerve of a Sprague-Dawley male rat (2 months old).

## **Results**

### **1 Electrospinning setup and nanofiber alignment**

The collector consisted of two pieces of conductive substrates which were separated by electrical tape with glass slides collecting nanofibers (Figure 1A). One of the key features with this technique is that it is convenient to transfer well-aligned fibers onto other solid substrates for further utility, such as glass slides for cell and organotypic culture. The electrospinning settings lead to uniaxially aligned nanofibers with an average diameter of  $854 \pm 87$  nm (Figure 1B and C). Also, 99, 5% of the fibers present an angle of deviation less than 5°. The duration of the electrospinning process was adjusted to obtain a low roughness of nanofibers on glass slide with a root mean square (RMS) value of 0.036  $\mu$ m and Ra of

0.007 $\mu\text{m}$  (Figure 1C).

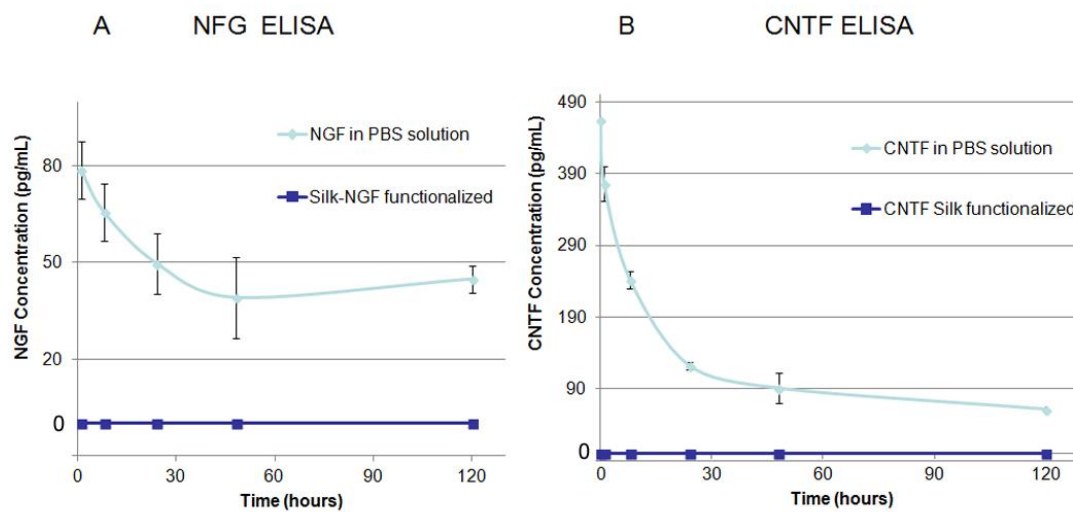


**Figure 1: Fabrication and characterization of biofunctionalized and aligned silk nanofibers:**

*A) Fibroin solution was mixed (or not) with NGF and CNTF and electrospun as described in material and methods. B) SEM image of aligned silk nanofibers on glass slides; Alignment and mean diameter of electrospun fibers, measured as described in material and methods; Scale bar:  $5 \mu\text{m}$ . C) Oblique plot and surface profile of fibroin nanofibers electrospun on a glass slide.*

## 2 Nanofiber functionalization and bioactivity

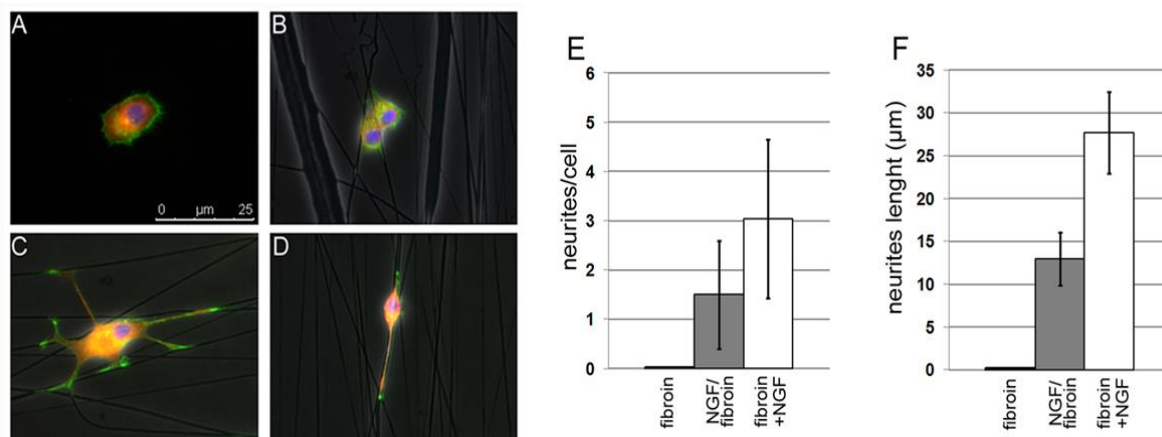
The release of NGF and CNTF from fibroin nanofibers after electrospinning was monitored by ELISA at different time points after sample incubation in PBS. For each batch of neurotrophic factors, one group contained soluble NGF or CNTF as a positive control. The detected amount from these controls decreased rapidly for NGF (37% after 24h and 50.1% after 48h) and even faster for CNTF (74% after 24h and 80.5% after 48h), suggesting rapid degradation of these neurotrophic factors. NGF and CNTF release was not detected from the nanofibers over 4 days, suggesting that both growth factors were trapped, strongly adsorbed to the nanofibers or released below the detection level of the ELISA kit (Figure 2 A and B).



**Figure 2: Growth factors release from electrospun functionalized silk and stability**

*A) No NGF was detected from the silk electrospun after 5 days in PBS. B) As NGF, no CNTF was detected from the electrospun. Degradation of growth factors was observed in PBS with 0.1% BSA. After 5 days, more than 50% of NGF could be detected unlike 10% for CNTF.*

To assess the bioactivity of the immobilized NGF, PC12 cells were grown on the functionalized nanofibers. PC12 is a cell line derived from a pheochromocytoma of the rat adrenal medulla. PC12 cells stop dividing and terminally differentiate when they are treated with NGF [30]. This response makes PC12 cells a useful system for neuronal differentiation as well as a good ‘biological sensor’ of NGF availability in fibroin nanofibers [31]. When cultivated on glass slides without NGF, the cells are round and showed an undifferentiated morphology with no cytoplasmic extensions (Figure 3A). The culture of PC12 cells on electrospun silk nanofibers (no growth factors) did not result in any change in morphology (Figure 3B), whereas neurite-like extensions were evident on the cells grown on silk nanofibers with NGF in culture medium (50 ng.mL<sup>-1</sup>, Figure 3C). These cells had a mean of 3 neurites per cell with an average length of 27.7 μm, with the longest neurite about 40 μm long (Figure 3E and F), confirming the differentiation of PC12 cells induced by NGF. These neurite-like structures extended without any particular direction and seemed to adhere to the nanofibers.



**Figure 3: PC12 differentiation induced by NGF-functionalized nanofibers.**

PC12 cells grown for 8 days on: glass slide a), fibroin nanofibers b), fibroin nanofibers with NGF (50 ng. mL<sup>-1</sup>) in culture medium c) and NGF-functionalized fibroin nanofibers d); scale bar: 25 μm. Number of neurites per cell e) and neurites length f). White bars: NGF in solution, grey bars: NGF-functionalized fibroin and black bars: fibroin. Quantification was performed as described in material and methods.

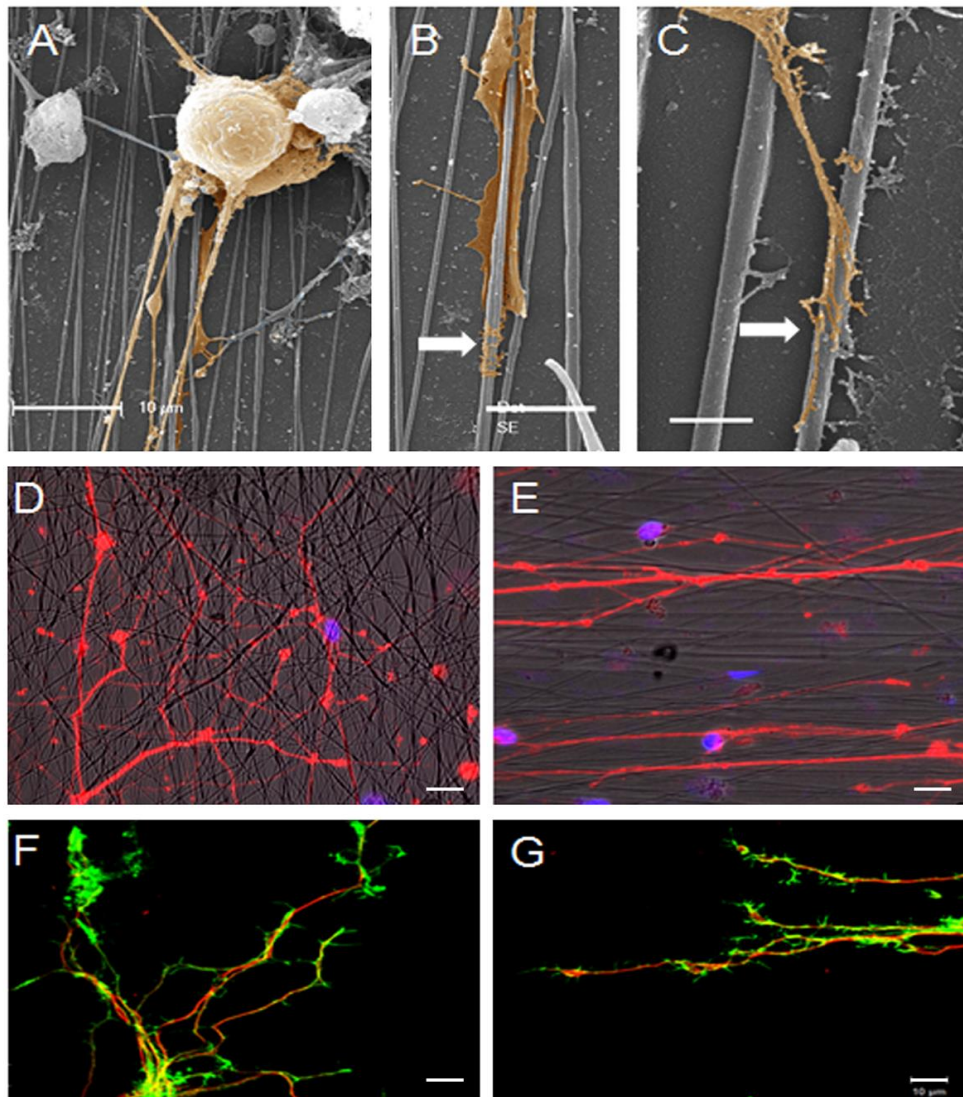
When cultured on NGF-functionalized fibroin nanofibers without any NGF in the culture medium, the cells presented neurite-like structures confined to the NGF-functionalized fibers (Figure 3D). These cells had an average of 1.5 neurites per cell with a mean length of 10 μm, and the longest one measuring ~13 μm. These results confirmed the biofunctionalization of silk nanofibers with NGF, its availability and bioactivity for growing cells. As a similar ‘biological sensor’ is not available for CNTF, we assumed and later confirmed with neuronal cultures, that this factor was similar to NGF in not being released but biologically active and available in/on the silk fibroin fibers.

### 3 Dorsal root ganglion (DRG) cells cultured on fibroin nanofibers

With the perspective of guiding peripheral nerve regeneration, the ability of the silk fibers to allow adhesion and guide the growth of primary sensory neurons from rat DRG was assessed. Cells grown for 5 days on the nanofibers displayed good adherence and neuronal morphology (round cell body and sprouting neurites, Figure 4A) with some cells wrapping themselves up around nanofibers (arrow, Figure 4B) and also establishing tight contact with nanofibers (arrow, Figure 4C). When cultured on unoriented nanofibers, neurons grew



randomly with neurites extending in all directions (Figure 4D) in contrast to neurons seeded on the aligned nanofibers which grew in the same orientation as the fibers (Figure 4E). This was highlighted by the neuron growth cone morphology and orientation on aligned fibers (Figure 4G) in contrast to those extending on randomly-oriented nanofibers (Figure 4F). Fibroin nanofibers thus supported good alignment for primary sensory neurons and orientation of neuron growth.

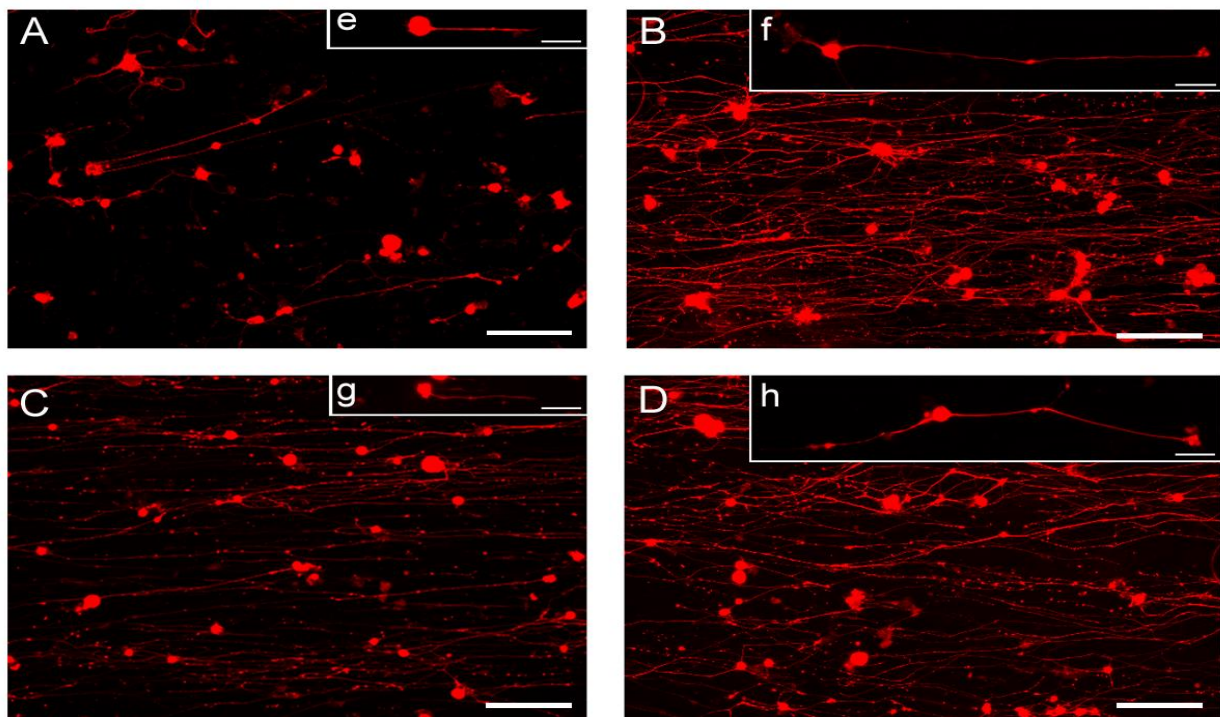


**Figure 4: DRG neurons adhesion and growth on electrospun fibroin nanofibers**

*SEM observation of DRG cells adhering on nanofibers (A) and establishing tight contact (B and C). BIII tubulin staining of neurons growing on random (D) and aligned (E) nanofibers. BIII tubulin (red) and actin (green) of neuron growth cones on random (F) and aligned (G) nanofibers. Image acquisition performed after 5 days of culture. Scale bars: A 10μm, B 5μm, C 2μm, D, E, F and G 10μm.*

#### 4 DRG cells culture on functionalized fibroin nanofibers

Promoting DRG cell growth using fibroin nanofibers functionalized with growth factors was then assessed. After 3 and 5 days of culture, the effect of fibroin fibers functionalized with NGF, CNTF and both of these factors were compared to non-functionalized control fibers (Figure 5). Five days after seeding on control fibers, neurons displayed short neurite outgrowth when compared to NGF- and NGF/CNTF-multifunctionalized fibers. In these functionalized systems an important neural tubulin staining was observed, confirming the neuron growth (Figure 5 A, B and D). Figure 5 e, f, g and h show a typical neuron grown for 3 days on control fibers, NFG-functionalized, CNTF-functionalized and NGF/CNTF-multifunctionalized fibers, respectively.



**Figure 5: Bioactivity of functionalized electrospun fibroin nanofibers on DRG neurons growth**

*DRGs cells were seeded on either unfunctionalized (A and e), NGF-functionalized (B and f), CNTF (C and g) or NGF and CNTF-functionalized nanofibers (D and h) and neurons were stained with anti  $\beta$ III tubulin antibody. Fluorescence images were acquired after 5 days of culture (A, B, C and D). Higher magnification of individual growing neurons (e, f, g and h) were acquired 3 days after seeding, to prevent overlapping of neurons currently observed after a longer time in culture. For details see material and methods. Scale bars: A, B, C, D: 100 $\mu$ m; e, f, g, h: 20  $\mu$ m.*

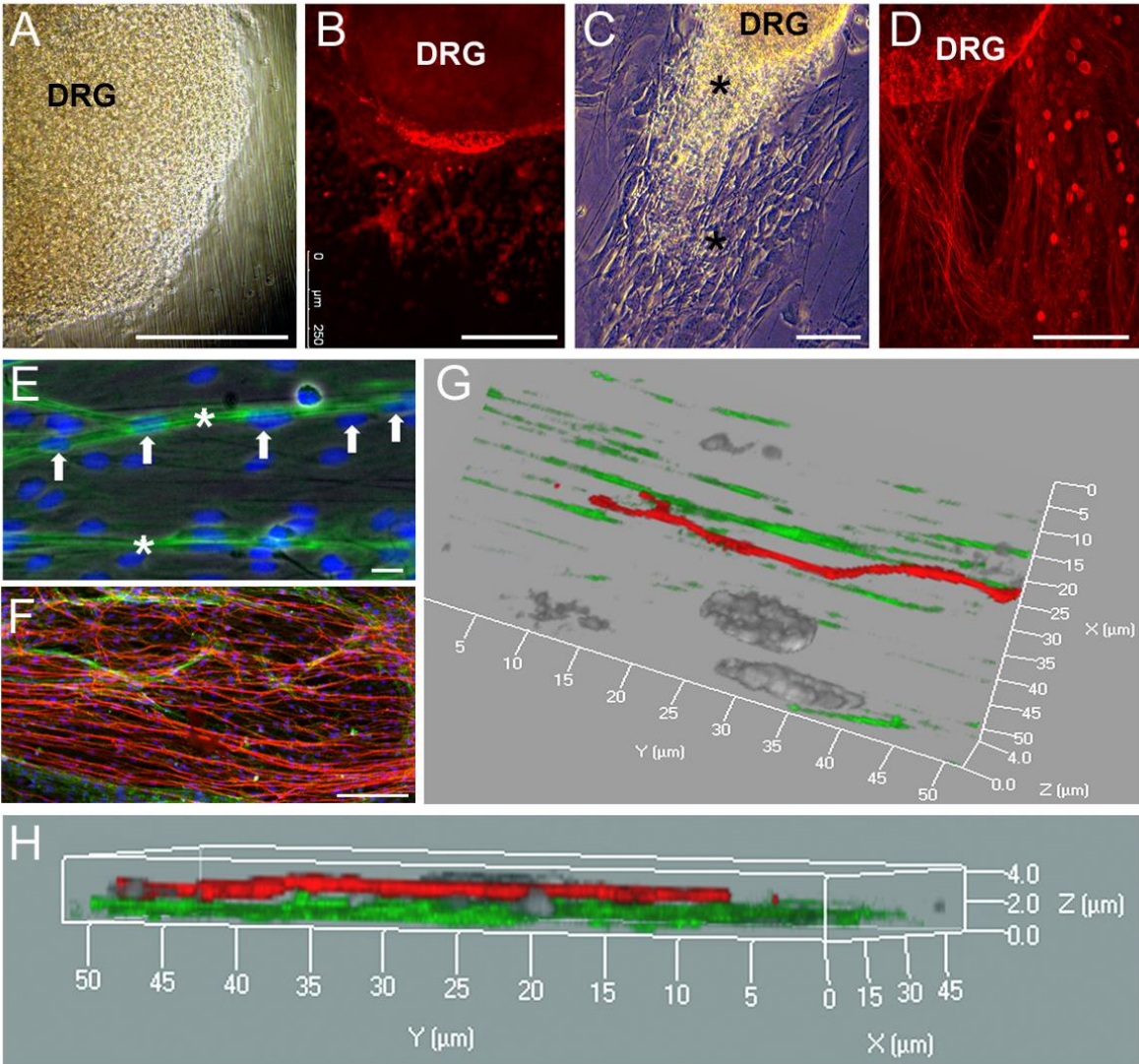
In order to quantify the biological effects of the functionalized silk fibers, two morphological parameters were assessed: the average length of neurites and the mean number of neurites per cell. A third parameter was the glial cells/neurons ratio (Table 1). After 3 days of culture, neurons grown on control fibers had a mean of 1 neurite with an average length of 60  $\mu\text{m}$  and the glial cells/neurons ratio observed was 1.22. NGF-functionalized fibers stimulated neurite outgrowth with more than a 3x increase in the mean neurite length compared to the unfunctionalized nanofibers (192.5  $\mu\text{m}$  and 60.1  $\mu\text{m}$ , respectively). Neither the mean number of neurites per neuron nor the glial cells/neuron ratios with NGF-functionalized nanofibers were statistically different from the fibroin controls.

With the CNTF-functionalized nanofibers a significant increase in glial cell /neuron ratio was observed compared to the control fibers and NGF-functionalized fibers (3.02, 1.42 and 1.22, respectively). There was also no significant stimulation of neurite outgrowth or sprouting. Cells grown on the multifunctionalized NGF/CNTF-fibers displayed greater neurite length and increased glial cell/neurons ratio compared to the fibroin nanofibers alone (124  $\mu\text{m}$  and 3.2, respectively).

## **5 Organotypic dorsal root ganglia culture on multifunctionalized fibroin nanofibers**

Dorsal root ganglia contain both neurons and non neuronal cells so the expectation was that DRG organotypic cultures would mimic the in vivo impact of the neurotrophic factor-functionalized nanofibers, including Schwann cell migration and axonal growth. DRGs were seeded on either unfunctionalized or multifunctionalized (NGF and CNTF) fibroin nanofibers in order to combine the neuron and glial cells stimulating effect of NGF and CNTF, respectively. Bright field observations of the ganglia showed a lack of cell growth and/or migration with the control fibers (Figure 6A), whereas cells grew and migrated outside the ganglion, along the fiber orientation on the multifunctionalized nanofibers over 12 days (Figure 6C, stars). After 3 weeks of culture, weak neurite outgrowth was achieved without growth factors (Figure 6B), in contrast to the multifunctionalized fibers where strong neural tubulin staining was found, supporting the significant neurite sprouting from the DRGs (Figure 6D). As mentioned above, dorsal root ganglia contain both neural and non neuronal cells, including Schwann/glia cells. Higher magnifications of actin-stained glial cells showed

nuclei aligned along the multifunctionalized nanofibers, attesting glial cell migration (arrows and stars, Figure 6E).

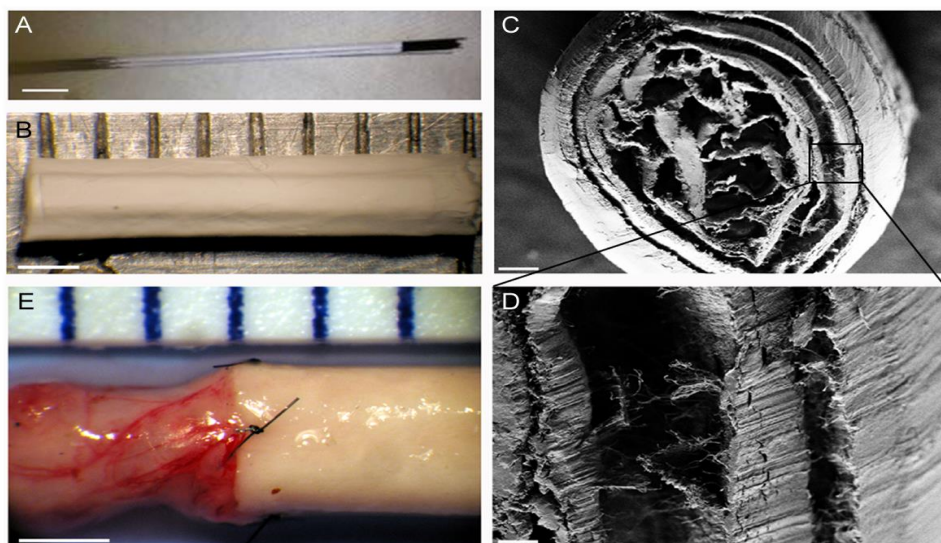


**Figure 6: Bioactivity of multifunctionalized nanofibers in organotypic DRG culture** Fetal DRG were seeded on unfunctionalized (A, B) or multifunctionalized (C-H) nanofibers. Images were acquired after 12 days (A, C) and 4 weeks (B, D-H) of culture. Fluorescence (B, D, E, F) and scanning laser confocal microscopy (G, H) images were obtained as described in material and methods. DRG neural tubulin was stained with anti-BIII tubulin (red), glial cells actin was stained with phalloidin (green) and nuclei with DAPI (blue). Scale bars: A, B, C, D: 250 μm; E: 10 μm and G: 50 μm.

The concomitant observation of both neural tubulin and glial actin staining emphasize the importance of ‘axons rays’ with surrounding actin fibers (Figure 6F). Laser scanning confocal microscopy images highlight the fine organization of glial cells and neurons growing from the DRGs. After one month in culture the nanofibers supported aligned glial cell migration based on the actin staining and the axonal extensions moving forward above the Schwann cells bundles (Figures 6G and H).

## 6 Development of a 3D multifunctionalized nanofibers-based tube

With the aim of producing a 3D scaffold suitable for surgical implantation in mammals, a multifunctionalized nanofibers-based tube was realized. To get close to the structure of an acellular peripheral nerve, the 2D nanofibers scaffold was rolled up using small sticks (Figure 7A) conferring tubular structure to the scaffold (Figure 7B). After removing the sticks, cross section and SEM observations depicted numerous small channels inside the tube, which also displayed well-aligned nanofibers (Figures 7 C and D). Figure 7E shows the suture of a nanofibers-based tube to a rat sciatic nerve for future in vivo studies.



**Figure 7: Development of a multifunctionalized nanofibers-based tube for in vivo implantation:**

*Fibroin scaffold is collected at the end of the electrospinning process and rolled up on teflon sticks (A), higher magnification of the designed fibroin tube (B), SEM observation of a cross section of the fibroin tube (C), higher magnification highlighting the alignment of nanofibers inside the tube (D) and nanofibers-based tube sutured to a rat sciatic nerve (E). Scale bar: 1 cm A), 1 mm B and E), 200 $\mu$ m C) and 30 $\mu$ m D). For details see material and methods.*

## **Discussion**

The restoration of nerve pathways is a prerequisite for successful regeneration in the PNS in which glial cells play a key role during axonal regeneration [32]. Following lesion-induced Wallerian degeneration, Schwann cells start to proliferate, forming longitudinal cell strands which provide indispensable pathways for guided axonal regrowth, named bands of Bungner [33].

### **Fiber alignment and cell growth**

Aligned fibrous scaffolds are useful in replicating the supportive guidance of some molecules and help the proper rearrangement of the required cellular environment. For a specific tissue type such as peripheral nerves where axons, glia and perineurium are aligned parallel to each other, the recapitulation of this precise nerve tissue structure is the main challenge while supporting regeneration. Besides mimicking the biomechanical supporting effect of the ECM, the alignment of electrospun nanofibers in a scaffold can also guide the migration of glial cells and extension of neuronal processes.

Brunetti et al [34] showed that neurons sense nanoscale roughness and that nanorough surfaces ( $R_a > 35$  nm) lead to the loss of polarity and to a cytoskeleton which is not functionally organized. Thus the roughness of electrospun nanofibers ( $R_a = 6$  nm) in our experiments is well suited for neuron adherence and growth. This is confirmed by the dissociated DRG cells growth assays in which the fibroin fibers alone promoted slight neurite extensions even in minimal medium (Figure 4). It has been recently observed that silk fibers are suitable substrates to also support CNS neuron growth, probably due to the mechanical properties acting as guidance cues to promote neurite elongation even in absence of selective growth factors [17].

### **Biofunctionalization**

There are currently at least four methods for incorporating bioactive molecules into electrospun scaffolds: physical adsorption, covalent attachment, electrospinning with a co-axial spinneret and addition of bioactive molecules to the electrospinning solution. Covalent binding can be problematic for large molecules (MW of NGF is 27 kDa and CNTF is 23 kDa)

and in order to control the final concentration of growth factors, we selected the addition of bioactive molecules to the electrospinning solution, in which growth factors are attached to the scaffold mainly through electrostatic interactions. We expected a burst release of around 20% of the factors, as is often reported from electrospun fibers [36-37] but we did not detect any release in our experiments. For the NGF electrospun fibers, ionic interactions could explain the lack of release as silk is negatively charged (pI 4.3) and NGF (pI 9.3) is positively charged [38]. Also, the molecular weight of commercially available NGF (27 kDa) and CNTF (23 kDa) may impede diffusion and also lead to immobilization of these proteins. These phenomena likely impacted the lack of release of NGF and CNTF from fibroin electrospun fibers. Xu et al. have shown that bovine serum albumin (BSA) or myoglobin release was influenced by the increase in hydrophilicity of electrospun fibrous poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) scaffolds [39].

Moreover, ELISA results showing a lack of NGF release are in accordance with the PC12 bioassays on the NGF-functionalized fibers, displaying NGF-stimulated neurite extension which is dependent on contact between nanofibers and the PC12 cells. We hypothesize that tight contacts between neurons and nanofibers observed with SEM reflect potential areas allowing growth factor uptake by neurons. Therefore, multifunctionalization of electrospun silk fibers represents an advantage compared to the local application of growth factors as it protected the factors from rapid degradation and prevented uncontrolled release.

### **Bioactivity and complementary effect of growth factors**

This set of experiments allowed the determination of individual roles of the two growth factors as well as their synergy/complementary ? in terms of neural responses.

Soluble NGF plays a significant role in establishing the architecture of the peripheral nervous system during development, as well as in regeneration following axon injury, but it was only reported twice that immobilized NGF may also be bioavailable and bioactive [31, 40]. In our setup, the NGF 'on demand' availability is key for adequate neuron growth from the perspective of nerve regeneration, as it is known that the dose and duration of NGF administration can determine the extent of recovery and response following peripheral

nerve injury [41].

The observation in the present study that glial cell migration and stimulation with CNTF-containing nanofibers is of particular interest since Schwann cells produce a large repertoire of biochemical factors known to support axon regeneration [42]. Despite survival-promoting effects, the role of CNTF in normal adult neuronal trophic support remains unresolved and it has been speculated that CNTF may act as an 'injury factor', being released by glial cells in response to an injury [43]. Accordingly, following nerve injury CNTF protein expression is more highly correlated with the reinnervation activity of Schwann cells than the S100 protein and CNTF knockout mice have impaired ability to recover from a sciatic nerve crush injury [44,45]. Moreover, it has recently been shown that CNTF acts as a chemo attractant and participates in the recruitment of endogenous progenitors during myelin repair in the central nervous system of rodents [46]. The putative role of CNTF in peripheral nerve regeneration has been emphasized by the study of Xu et al. in which CNTF was delivered by focal injection in a gap-silicone chamber following sciatic nerve sectioning. The results suggested that CNTF promoted axon regeneration through Schwann cell migration and monocyte infiltration [41].

Numerous studies have shown that Schwann cells play an important part in biomaterial-guided peripheral nerve regeneration, albeit always seeded inside scaffolds [48-52].

It has also been shown that Schwann cells can migrate along longitudinal channels in a scaffold, but they were seeded before the whole DRGs were [53]. Keilhoff et al. also demonstrated that implanted SC adhered, survived in a collagen type I/III nerve conduit and were formed nerve-guiding columns of Büngner [54].

It is thus clear that both viable Schwann cells and structural parameters are prerequisites for successful axonal regrowth and nerve regeneration, but contrary to previously cited cell-based strategies, the present multifunctionalized nanofibers avoided the need for pre-seeding cells, which should be an advantage for surgical applications?.

Furthermore, the growth rate of regenerating axons in vivo [55] and the slow and tunable degradation rate of silk-based scaffolds [56] make our nanofibers-based tube



specifically relevant for peripheral nerve guided- regeneration [57].

The design of this multifunctionalized nanofibers-based tube presenting multichannels provides a biomimetic organization similar to the perineurium and epineurium of peripheral nerves. This structure is easily handled by surgeon and can be sutured to the nerve. Altogether our material should create a favorable microenvironment combining a physical scaffold together with specific regenerative biochemical cues allowing peripheral nerve reconstruction.

## **Conclusion**

There are many obstacles that prevent successful nerve regeneration after injury in the peripheral nerve environment. One problematic area that needs to be further explored is how to appropriately combine the effects of multiple trophic factors in a complementary manner using biofunctionalized electrospun materials. The present results demonstrate the possibility to simulate neurite outgrowth with a system that combines growth support, directionality, guided glial cell migration and neurotrophic stimulation with a multifunctional biomaterial. Further studies will focus on the evaluation of these new materials in an in vivo model of sciatic nerve regeneration.

## **Acknowledgements**

The authors thank the Picardie Region for its financial support, the Tissue Engineering Resource Center (TERC) from Tufts University, the NIH (EB002520) and the NIH P41 Center. We also thank Frederic Nadaud for his help on SEM analysis and Raphael Turcotte for contributing to morphologic measurements of fibers. Tony M Dinis received a fellowship from the French Ministry of Science and Technology.

## References

- [1] Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 1850;140:423-429.
- [2] Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst* 2002;7:13–27.
- [3] Biazar E, Khorasani MT, Montazeri N, Pourshamsian K, Daliri M, Rezaei M, et al. Types of neural guides and using nanotechnology for peripheral nerve reconstruction. *Int J Nanomedicine* 2010;5:839-852.
- [4] Midha R. Emerging techniques for nerve repair: nerve transfers and nerve guidance tubes. *Clin Neurosurg* 2006;53:185-90.
- [5] Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiol* 2008;119:1951–1965.
- [6] Nectow AR, Marra KG, Kaplan DL. Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits. *Tissue Eng Part B Rev* 2012;18:40-45.
- [7] Krick K, Tammia M, Martin R, Höke A, Mao HQ. Signaling cue presentation and cell delivery to promote nerve regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 2011;22:741-746.
- [8] Neal RA, Tholpady SS, Foley PL, Swami N, Ogle RC, Botchwey EA. Alignment and composition of laminin-polycaprolactone nanofiber blends enhance peripheral nerve regeneration. *J Biomed Mater Res Part A* 2012;100A:406-423.
- [9] Wang CY, Liu JJ, Fan CY, Mo XM, Ruan HJ, Li FF. v The effect of aligned core-shell nanofibres delivering NGF on the promotion of sciatic nerve regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed.*2012 ;212:167-184.
- [10] Robson. R.M. Silk composition, structure and properties. In : Lewin M, Pearce E., editors. *Fiber Chemistry Handbook of Science and Technology*. Marcel Dekker, New York, 1985.
- [11] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2003;24:401-416.
- [12] Yang Y, Zhao Y, Gu Y, Yan X, Liu J, Ding F, et al. *Polymer Degradation and Stability*. 2009;2213–2220.
- [13] Pérez RA, Won JE, Knowles JC, Kim HW. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:471-496.
- [14] Liu W, Thomopoulos S, Xia Y. Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Adv Healthc Mater* 2012;1:10–25.
- [15] Ashammakhi N, Nderu A, Nikkola L, Wimpenny I, Yang Y. Advancing tissue engineering by

using electrospun nanofibers. *Regen Med* 2008;3:547-574.

[16] Vidal G, Blanchi T, Mieszawska AJ, Calabrese R, Rossi C, Vigneron P, et al. Enhanced cellular adhesion on titanium by silk functionalized with titanium binding and RGD peptides. *Acta Biomater* 2013;9:4935-4943.

[17] Wittmer CR, Claudepierre T, Reber M, Wiedemann P, Garlick JA, Kaplan D, Egles C. Multifunctionalized electrospun silk fibers promote axon regeneration in central nervous system. *Adv Funct Mater* 2011;21:4202-4213.

[18] Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996;19:289-317.

[19] Thoenen H, Barde YA, Edgar D. The role of nerve growth factor (NGF) and related factors for the survival of peripheral neurons. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1981;28:263-273.

[20] Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, Helgren M, Morrissey D, McClain J, et al. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron* 1992;9:295-305.

[21] Rende M, Muir D, Ruoslahti E, Hagg T, Varon S, Manthorpe M. Immunolocalization of ciliary neuronotrophic factor in adult rat sciatic nerve. *Glia* 1992;5:25-32.

[22] Kang SS, Keasey MP, Cai J, Hagg T. Loss of neuron-astroglial interaction rapidly induces protective CNTF expression after stroke in mice. *J Neurosci* 2012;32:9277-9787.

[23] Lang EM, Schlegel N, Reiners K, Hofmann GO, Sendtner M, Asan E. Single-dose application of CNTF and BDNF improves remyelination of regenerating nerve fibers after C7 ventral root avulsion and replantation. *J Neurotrauma* 2008;25:384-400.

[24] Jin HJ<sup>1</sup>, Fridrikh SV, Rutledge GC, Kaplan DL. Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*. 2002 Nov-Dec;3(6):1233-9

[25] Jose RR, Elia R, Firpo MA, Kaplan DL, Peattie RA. Seamless, axially aligned, fiber tubes, meshes, microbundles and gradient biomaterial constructs. *J Mater Sci Mater Med*. 201; 23:2679-95

[26] Hu X, Shmelev K, Sun L, Gil ES, Park SH, Cebe P, Kaplan DL. Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing. *Biomacromolecules*. 2011 May 9;12(5):1686-96.

[27] De Groot, P. and Deck, L. Proc. SPIE 2248, Optical measurements and sensors for the process industries. 1994, pp. 101-104.

[28] Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc* 2007;2:152-160 .

[29] Rajaraman R, Rounds DE, Yen SP. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp Cell Res* 1974;88:327-339

[30] Teng K K, Greene L A. In: Celis J E, editor. *Cell biology: a laboratory handbook*. San Diego, Calif: Academic Press; 1994. pp. 218-224.

- [31] Lee JY, Bashur CA, Milroy CA, Forciniti L, Goldstein AS, Schmidt CE. Nerve growth factor-immobilized electrically conducting fibrous scaffolds for potential use in neural engineering applications. *IEEE Trans Nanobioscience* 2012;11:15-21.
- [32] Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 1998;18:397-405.
- [33] Bungner OV. Über die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen. *Beitr Pathol Anat* 1891;10:321–87.
- [34] Brunetti V, Maiorano G, Rizzello L, Sorce B, Sabella S, Cingolani R, et al. Neurons sense nanoscale roughness with nanometer sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:6264-6469
- [35] Chew SY, Mi RF, Hoke A, Leong KW. Aligned Protein-Polymer Composite Fibers Enhance Nerve Regeneration: A Potential Tissue-Engineering Platform. *Adv Funct Mater* 2007;17:1288–1296.
- [36] Schneider A, Wang XY, Kaplan DL, Garlick JA, Egles C. Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta Biomater* 2009;5:2570-2578.
- [37] Sahoo S, Ang LT, Goh JC, Toh SL. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A* 2010;93:1539-1550.
- [38] Uebersax L, Mattotti M, Papaloizos M, Merkle HP, Gander B, Meinel L. Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF). *Biomaterials* 2007;28:4449-4460.
- [39] Xu W, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Controllable dual protein delivery through electrospun fibrous scaffolds with different hydrophilicities. *Biomed Mater* 2013;8:014104.
- [40] Sandrock AW Jr, Matthew WD. Substrate-bound nerve growth factor promotes neurite growth in peripheral nerve. *Brain Res* 1987;425:360-363.
- [41] Kemp SW, Webb AA, Dhaliwal S, Syed S, Walsh SK, Midha R. Dose and duration of nerve growth factor (NGF) administration determine the extent of behavioral recovery following peripheral nerve injury in the rat. *Exp Neurol* 2011;229:460-70.
- [42] Pfister LA, Papaloizos M, Merkle HP, Gander B. Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. *J Peripher Nerv Syst* 2007;12:65-82.
- [43] Adler R. Ciliary neurotrophic factor as an injury factor. *Curr Opin Neurobiol* 1993;3:785-789.
- [44] Hiruma S, Shimizu T, Huruta T, Satou T, Hu J, Tanji K, et al. Ciliary neurotrophic factor immunoreactivity in rat intramuscular nerve during reinnervation through a silicone tube after severing of the rat sciatic nerve. *Exp Mol Pathol* 1997;64:23-30.
- [45] Yao M, Moir MS, Wang MZ, To MP, Terris DJ. Peripheral nerve regeneration in CNTF knockout mice. *Laryngoscope* 1999;109:1263-1268.
- [46] Vernerey J, Macchi M, Magalon K, Cayre M, Durbec P. Ciliary neurotrophic factor controls progenitor migration during remyelination in the adult rodent brain. *J Neurosci* 2013;33:3240-3250.
- [47] Xu JJ, Chen EY, Lu CL, He C. Recombinant ciliary neurotrophic factor promotes nerve

regeneration and induces gene expression in silicon tube-bridged transected sciatic nerves in adult rats. *J Clin Neurosci* 2009;16:812-817.

[48] Guenard V, Kleitman N, Morrissey TK, Bunge RP, Aebischer P. Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 1992;12:3310-3320.

[49] Kim DH, Connolly SE, Kline DG, Voorhies RM, Smith A, Powell M, et al. Labeled Schwann cell transplants versus sural nerve grafts in nerve repair. *J Neurosurg* 1994;80:254-260.

[50] Levi AD, Sonntag VK, Dickman C, Mather J, Li RH, Cordoba SC, et al. The role of cultured Schwann cell grafts in the repair of gaps within the peripheral nervous system of primates. *Exp Neurol* 1997;143:25-36.

[51] Jesuraj NJ, Santosa KB, Macewan MR, Moore AM, Kasukurthi R, Ray WZ, et al. Schwann cells seeded in acellular nerve grafts improve functional recovery. *Muscle Nerve* 2013.

[52] Berrocal YA, Almeida VW, Gupta R, Levi AD. Transplantation of Schwann cells in a collagen tube for the repair of large, segmental peripheral nerve defects in rats. *J Neurosurg* 2013;119:720-732.

[53] Bozkurt A, Deumens R, Beckmann C, Olde Damink L, Schügner F, Heschel I, et al. In vitro cell alignment obtained with a Schwann cell enriched microstructured nerve guide with longitudinal guidance channels. *Biomaterials* 2009;30:169-179.

[54] Keilhoff G, Stang F, Wolf G, Fansa H. Bio-compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction. *Biomaterials* 2003;24:2779-2787.

[55] Al-Majed AA, Neumann CM, Brushart TM, Gordon TJ *Neurosci*. 2000 Apr 1;20(7):2602-8. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration.

[56] Wang Y<sup>1</sup>, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim HJ, Kim HS, Kirker-Head C, Kaplan DL. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials* 2008. (24-25):3415-28.

[57] Tang X<sup>1</sup>, Xue C, Wang Y, Ding F, Yang Y, Gu X. Bridging peripheral nerve defects with a tissue engineered nerve graft composed of an in vitro cultured nerve equivalent and a silk fibroin-based scaffold *Biomaterials*. 2012 May;33(15):3860-7.

# Transition

---

La fibroïne de soie a été fonctionnalisée par le CNTF et le NGF puis électrofilées pour obtenir des nanofibres alignées sur lamelles de verre. Cet article confirme la bioactivité des facteurs de croissance intégrés au nanofibres par l'utilisation de cellules PC12 directement cultivées sur les fibres. Les neurones primaires de DRGs de rat qui ont été cultivés sur les nanofibres sont orientés sur la base du design du matériau. La présence de NGF multiplie la croissance axonale par 3 tandis que la croissance des cellules gliales et leurs migrations sont stimulées par le CNTF. Les cultures organotypiques de DRG de rats fœtaux ont confirmé l'effet complémentaire des deux facteurs de croissance des nanofibres bifonctionnalisées, ce qui a permis la migration des cellules gliales, l'alignement et la croissance des cellules du tissu nerveux.

Il existe de nombreux obstacles qui empêchent la réussite de la régénération nerveuse après une blessure dans l'environnement d'un nerf périphérique. Cependant en couplant certains de ces facteurs neurotrophiques, comme vu dans le précédent article, les chances de réussite sont augmentées. Dans le but de former des guides bioactifs pour cette régénération nerveuse, nous proposons d'établir un conduit polycanalisé basé sur la bifonctionnalisation par le NGF et le CNTF des nanofibres de soie alignées. La conception de ces tubes de soie bioactifs, qui pourraient représenter une nouvelle option biologique pour la réparation nerveuse orientée, est décrite dans ce quatrième article. D'autre part, les caractérisations multi-échelles (nanométrique, micrométrique et macrométrique) de ces mêmes conduits sont détaillées dans ce papier.

Cette caractérisation physico-chimique est nécessaire avant l'implantation de ces nouveaux conduits nerveux pour son évaluation dans un modèle *in vivo* comme le rat.

## ARTICLE IV

### **3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration.**

Tony M Dinis<sup>1,2,\*</sup>, Roberto Elia<sup>2</sup>, Quentin Dermigny<sup>1</sup>, Guillaume Vidal<sup>1</sup>, Cyrpien Denoeud<sup>1</sup>,  
David L Kaplan<sup>2</sup>, Christophe Egles<sup>1,3</sup> and Frédéric Marin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), UMR CNRS 7338, Université de Technologie de Compiègne, Rue Roger Couttolenc, CS 60319 - 60203 Compiègne Cedex, France*

<sup>2</sup> *Biomedical engineering, Science & Technology Center, 4 Colby Street, Tufts University, Medford, MA 02155, USA*

<sup>3</sup> *Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Tufts University, School of Dental Medicine, 1 Kneeland St, Boston, MA 02111, USA*

\*Corresponding author:

Frédéric Marin

UMR CNRS 7338, Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), Université de Technologie de Compiègne, France

Email [\*\*frederic.marin@utc.fr\*\*](mailto:frederic.marin@utc.fr)

Phone : + 33 3 44 23 43 67

## Abstract

Despite technological advances over the past 25 years, a complete recovery from peripheral nerve injuries remains unsatisfactory today. The autograft is still considered the "gold standard" in clinical practice; however, postoperative complications and limited amount of available nerves lead to develop alternatives strategy. Therefore, the development of biomimetic nerve graft substitutes presenting the proper biomechanical features becomes a clinical necessity. In this study, multichanneled silk electrospun conduits bi-functionalized with Nerve Growth Factor (NGF) and Ciliary NeuroTropic Factor (CNTF) were fabricated for peripheral nerve regeneration. These bioactive guides consisting on longitudinally oriented channels and aligned nanofibers were designed in order to mimic the fascicular architecture and fibrous extracellular matrix found in native nerve. The simple way to manufacture these conduits provides tailoring of channel number and diameter size to create perineurium-like structures. Functionalization of the silk fibroin nanofiber did not affect its secondary structure and chemical property. Protein assays showed the absence of growth factors passive release from the functionalized fibers. Additionally, our biomimetic multichanneled functionalized nerve guides displayed a mechanical behavior comparable to the rat sciatic nerve with an ultimate peak stress of  $4.0 \pm 0.6$  MPa and a corresponding elongation at failure of  $156.8 \pm 46.7\%$ . Taken together, our results demonstrate for the first time our ability to design and characterize a bi-functionalized nerve conduit consisting on electrospun nanofibers with multichannel oriented and nanofibers aligned for peripheral regeneration. Our bioactive silk tubes thus represent a new and promising technique towards the creation of a biocompatible nerve guidance conduit.

**Keywords:** Silk, Electrospinning, Bioengineering, Biomechanics, Nerve regeneration



## Introduction

The peripheral nervous system (PNS) transmits information from the central nervous system (brain and spinal cord) to every other part of the body thanks to motor and sensory neurons (Yan et al., 2009). Injury of the PNS such as a trauma can cause distal atrophy of target muscles or loss of sensation (Li et al., 2013). These peripheral injuries affect 2,8% of trauma US patients annually. Peripheral nerve damage impacts 200,000 patients in the United States and 300,000 in Europe each year (Belkas et al., 2004; Ichihara et al., 2008). After peripheral nerve injury, axonal regeneration and recovery are possible (Horner and Gage, 2000). Spontaneous nerve regeneration can occur for nerve gaps smaller than a few millimeters (Bryan et al., 2004), while repairing large gaps (>10 mm) remains a major challenge for surgeons (Dellon and Mackinnon, 1988). Indeed peripheral nerve regeneration is based on a highly organized and complex biological system composed of multiple cells, growth factors and extracellular matrix molecules (ECM).

To date, the most effective way to repair large nerve gaps remains autologous nerve grafting. Even if this technique is considered the clinical standard to repair peripheral nerve gaps, there are many limitations, most notably limited donor site availability, morbidity and surgical complications due to the need for two or more operative procedures (Johnson et al., 2013; Liao et al., 2012). For short gaps (<5 mm), biological tissues as arteries, veins or muscle can also be used but these allografts have shown varying success (Biazar et al., 2010). In recent years, advances have been made to develop new biomaterials as nerve guidance conduits composed of synthetic, natural or composite polymers systems (Hsu et al., 2013; Liu et al., 2012; Masaeli et al., 2013). Despite the fact that the FDA has approved some nerve guidance systems consisting on a variety of different biomaterials such as type I collagen, polyglycolic acid (PGA), poly-DL-lactide-co-caprolactone PLCL) and polyvinyl alcohol (PVA); the clinical reality is that these biomaterials have not been highly effective for nerve repair after injury or trauma (Kehoe et al., 2012).

Many nerve conduit designs were initially based upon the entubulation model of a porous foam rod or hollow tube (Hadlock et al., 2000; Wang et al., 2006). Unfortunately, using a single hollow guide is not optimal to mimic the proper native spatial arrangement of the ECM and cells within the conduit (Ao et al., 2006). These guidance nerve conduits should

facilitate directional axonal growth from the regenerating nerve, protect the regenerating nerve from fibrous tissue barriers and to allow diffusion of growth factors and nutrient exchange. Nerve regeneration can be improved by increasing the surface area for cell growth into the nerve conduit. In addition to architectural design, optimal nerve regeneration from conduits should match the mechanical and physical properties of the native nerve. Considerations for the mechanical design include tensile strength, suturability, physical fit, degradation profile and swelling (Nectow et al., 2012). Surface chemistry is also required to generate conduits that have a high degree of similarity to native tissue. Incorporating growth factors into or onto the biomaterial selected for such designs assures cellular adhesion, viability and promotes neurite outgrowth (Liu et al., 2010; Sahoo et al., 2010a).

Many techniques have been developed to design fibrous scaffolds in order to be used as a tissue substitute. Scaffolds prepared via electrospinning allow aligned fibrous matrix formation with good porosity and mechanical properties using native and/or synthetic polymers with nanoscale structures similar to native ECM. Electrospinning is a fiber spinning technique to produce nanofibers and microfibers under a high-voltage electrostatic field (Inoguchi et al., 2006). Recently, silk electrospun fibers have been applied in the investigation of tissue engineering for biomedical applications (Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2009). Silk fibroin is a natural protein with good biocompatibility and robust mechanical properties (Altman et al., 2003). The degradation rate of silk biomaterials can also be tailored from months to years after implantation in vivo, based on processing procedures employed during materials formation (Meinel et al., 2005).

Electrospun silk fibers can be post-modified via chemical treatments yielding improved cell proliferation, cell adherence, and growth (Cohen-Karni et al., 2012). Bioactive molecules, such as adhesion or growth factors, can also be added into the spinning solution and remain active and available in the electrospun fibers (Sofroniew et al., 2001). Many different types of bioactive molecules have been incorporated into silk scaffolds of electrospun nanofibers, including growth factors, biomimetic peptides and metals (Li et al., 2006; Sahoo et al., 2010). Growth factors are endogenous proteins capable of binding to cell receptors and directing cellular activities to stimulate the proliferation and differentiation of seeded cells (Varkey et al., 2004). Among multiple growth factors found in the body,

neurotrophic factors such as Nerve Growth Factor (NGF) are well known for promoting the survival and differentiation of developing neurons (sensory and sympathetic neurons) in the peripheral nervous system. NGF delivery enhanced neuronal outgrowth and also can be used as a chemo-attractant axon guidance cue (Campenot, 1977; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Another neurotrophic factor produced by astrocytes, Ciliary NeuroTrophic Factor (CNTF), is abundant in peripheral nerves. CNTF is localized mainly in the cytoplasm of myelinating Schwann cells (Friedman et al., 1992) and its synthesis is decreased during Wallerian degeneration (Rende et al., 1992). It has also been shown that CNTF is a neuroprotective agent and improved the remyelination of regenerated nerves (Kang et al., 2012).

The aim of this article was to design and the manufacture nerve guidance conduits based on bifunctionalized 3D silk designs and to determine the morphology, growth factors release and mechanical properties.

## **Materials and methods**

A new bifunctionalized 3D nerve conduits composed of NGF/CNTF electrospun silk nanofibers were prepared that were:(I) architecturally biomimetic to support and promote PNS nerve regeneration, consisted of (II) a multichanneled tube that was covered both inside and outside (III) by aligned electrospun nanofibers, were fabricated from (IV) biocompatible and biodegradable silk biomaterial and presented (V) compliant mechanical properties to match native nerves. The following paragraphs detail the full process.

### **1.Design and manufacture of the bi-functionalized 3D nerve silk conduits**

#### **1.1. Silk fibroin solution preparation**

Silk fibroin was extracted from *B. mori* silkworm cocoons (Tajima Shoji Co., Yojohama, Japan). Solutions were prepared according the following procedure (Rockwood et al., 2011). Cocoons were cut into small pieces (~5g) and immersed into boiling for 30 minutes in 2 L of an aqueous solution of 0.02 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The degummed fibers were rinsed for 20 min, three times with cold deionized (DI) water, and then allowed to dry for 48 hours at room temperature. Dried silk fibroin fibers were solubilized in 9,3M LiBr solution (1g of dried fibers : 4 mL of LiBr solution) at 60°C for 4 hours. Silk solutions were dialyzed against DI water using

Slide-a-Lyzer dialysis cassettes (membrane MWCO 3,500) (Pierce, Inc., Rockford, IL, USA) for 72 hours to remove salts. Silk fibroin solution was centrifuged twice to remove insoluble particulates. The final concentration of aqueous silk fibroin solution was 8 wt%, which was calculated by weighing the remaining solid after drying. The solution was then concentrated by dialyzing against 15% (w/v) PEG for 4 h to produce  $\approx$ 10 wt% silk fibroin. Silk solutions were stored at 4°C.

#### 1.2. Preparation of spinning functionalized solution

Silk fibroin solutions were mixed with 5 wt% polyethylene oxide (PEO,  $M_w = 900,000$ ) in a 4:1 ratio to produce a 9% silk/PEO solution. To functionalize the spinning solution, NGF and CNTF (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) were reconstituted in PBS containing 0.1% bovine serum albumin solution. NGF was added to the silk solution at 100 ng/mL with or without CNTF at 10 ng/mL.

#### 1.3. Electrospinning

Spinning solution was delivered through a 16G stainless-steel capillary, at a flow rate of 10  $\mu\text{L}/\text{min}^{-1}$  using a Sage syringe pump (Thermo Scientific, Waltham, MA). The capillary was maintained at a voltage of 12 kV using a high voltage power supply (Gamma High Voltage Research ES-30P, Ormond Beach, FL, USA) and was mounted at the center of a 10 cm-diameter aluminum plate. To fabricate axial fiber alignment, the collector consisted in a 6 cm-diameter rotating mandrel at 3800 rpm (rotation speed: 10 m/s). The mandrel was positioned 15 cm below the droplet and covered by silver foil. Electrospun silk-fibroin fibers were collected onto the silver foil. The deposition time was 90 min representing a volume of 1 mL. Fiber alignment was controlled by the rotation speed maintained continuously until the electrospinning process was completed.

#### 1.4. Fabrication of the multichanneled silk nerve conduit

After 90 min ( $\approx$  1 mL) of electrospinning, the silver foil was removed from the silk fibers and the electrospun silk mats were stored in dry atmosphere until used. Electrospun fibers mats were rolled up 360° about 50 times using Teflon sticks (0.3 mm diameter) in order to generate a final tube of about 1.0 mm inner diameter (close to a rat sciatic nerve). Teflon sticks were removed after water vapor annealing (ref Hu et al., 2011) using sterile PBS and then dried. All of the tubes were cut to a length of 1 cm and a diameter around

1mm.

## **2. NGF and CNTF release and stability**

NGF and CNTF-functionalized silk nerve conduits were spun with 1mL of spinning solution at 100 ng/mL and 10 ng/mL (NGF, respectively CNTF). Tubes were incubated in 2 mL of sterile PBS containing 0.1 % BSA with 0.02% Tween20 at 37°C. Then 200 µL of the solution was collected after 1, 6, 24, 72, 168 (CNTF) and 240 hours (NGF) and stored at -80°C. The stability of the two growth factors was assessed during 1 week for CNTF and 10 days for NGF preparing a NGF solution at 500 pg/mL and CNTF solution at 1 ng/mL in sterile PBS containing 0.1 % BSA with 0.02% Tween20 at 37°C. NGF and CNTF release and stability assays were performed with the ChemiKine™ Nerve Growth Factor Sandwich ELISA Kit (Millipore, France) and Raybio® Rat CNTF ELISA kit (TEBU-BIO, France), respectively, according to the manufacturer's instructions.

## **3. Compliance analysis of the morphology and mechanical properties of the new 3D nerve conduit.**

### **3.1. Morphology and structural analysis**

#### **3.1.1. Scanning electron microscopy**

To analyze the morphology of the new bi-functionalized 3D silk nerve conduits, scanning electron microscopy (SEM) was performed. The electrospun silk functionalized tubes were prepared by cutting thin (1-2mm) transverse slices of nerve guides with a scalpel and longitudinal slices inside the tubes. SEM samples were sputter-coated with gold/palladium and then evaluated using a field-emission Scanning Electron Microscope (SEM, Supra 55, Zeiss, NY) at 5kV. To determine channel and fiber diameters and alignment, all SEM images were analyzed by ImageJ and Matlab software packages.

#### **3.1.2. Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR)**

FTIR analysis was used to observe the secondary structure of electrospun silk fibers and functionalized electrospun fibers. Analysis of the silk nerve conduits was performed with

a Jasco FT/IR-6200 spectrometer (Easton, MD), equipped with a multiple reflection, horizontal Miracle attenuated total reflectance (ATR) attachment (ZnSe crystal, from Pike Tech., Madison, WI). Each measurement incorporated 64 scans with nominal resolution of 4 cm<sup>-1</sup> (wavenumber from 600 to 4000 cm<sup>-1</sup>) that were Fourier transformed using a Genzel-Happapodization (ref, details). To identify secondary structures in the protein samples from the absorption spectra, peak positions of the amide I region (1595-1705 cm<sup>-1</sup>) absorption from Fourier self-deconvolution were analyzed. Curve fitting was performed using Jasco Spectra-Manager Analysis Software (Jasco, Easton MD), as previously described (Hu et al., 2011).

### 3.1.3. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

To analyze functionalized polymer properties, DSC was performed. Two mg of silk nerve guide sample was encapsulated in aluminum pans and heated in a TA Instruments (New Castle, DE) Q100 differential scanning calorimeter (DSC) with purged dry nitrogen gas flow (50mL/min) and equipped with a refrigerated cooling system. The instrument was calibrated with indium for heat flow and temperature. Aluminum and sapphire reference standards were used for calibration of the heat capacity. Standard mode DSC measurements were performed at a heating rate of 10°C/min.

## 3.2. Mechanical Behaviour

### 3.2.1. Sample preparation

In order to compare mechanical properties of the sciatic nerve versus our silk nerve implants, Sprague-Dawley (SD) male rats from Janvier Labs, France, were used as a model. All procedures were performed in accordance with the European Directive 2010/63/EU. The rats were housed in the animal unit with 12 hours light - 12 hours dark environment. The average weight of the SD rats aged 12 weeks was 356 g. The animals were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital. After euthanasia, right and left sciatic nerves between the patella and sciatic notch of each rat were removed and then stored in lactate ringer's. Wet silk nerve samples were immersed in lactate ringer's during 48 hours at room temperature and no preparation was performed for dry silk nerve samples before tensile testing.

### 3.2.2. Mechanical Properties

Four SD rats (8 nerves) were used to perform tensile tests in order to compare the mechanical properties as per young modulus, maximum load, strain and stress versus silk implants dry or wet. Uniaxial tensile tests were performed by Electroforce 3230 device (Bose Corporation, ElectroForce Systems Group, Minnesota, USA). Tensile tests were performed at room temperature for dry silk nerve conduits whereas rat sciatic nerve and wet silk nerve conduits were performed in a vessel containing 5 liters of lactate ringer's. Submerged samples were tested at constant 37°C temperature, chosen to resemble native rat temperature. The initial gage length for each sample was normalized at 3 mm and an elongation rate of 0.06mm.s<sup>-1</sup> was applied corresponding to a strain of 0.02% as in previous studies (Ma et al., 2011; Topp and Boyd, 2012). Tensile stress-strain curve, ultimate stress, and elastic modulus were determined by the WinTest software (Bose Corporation, ElectroForce Systems Group, Minnesota, USA) dedicated for this device.

## 4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using InStat software (Software Inc., GraphPad, San Diego, CA). Values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  SD). Mechanical properties from each group were compared using nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis Test and Tukey post hoc test). A p-value less than 0.05 was considered to be significant.

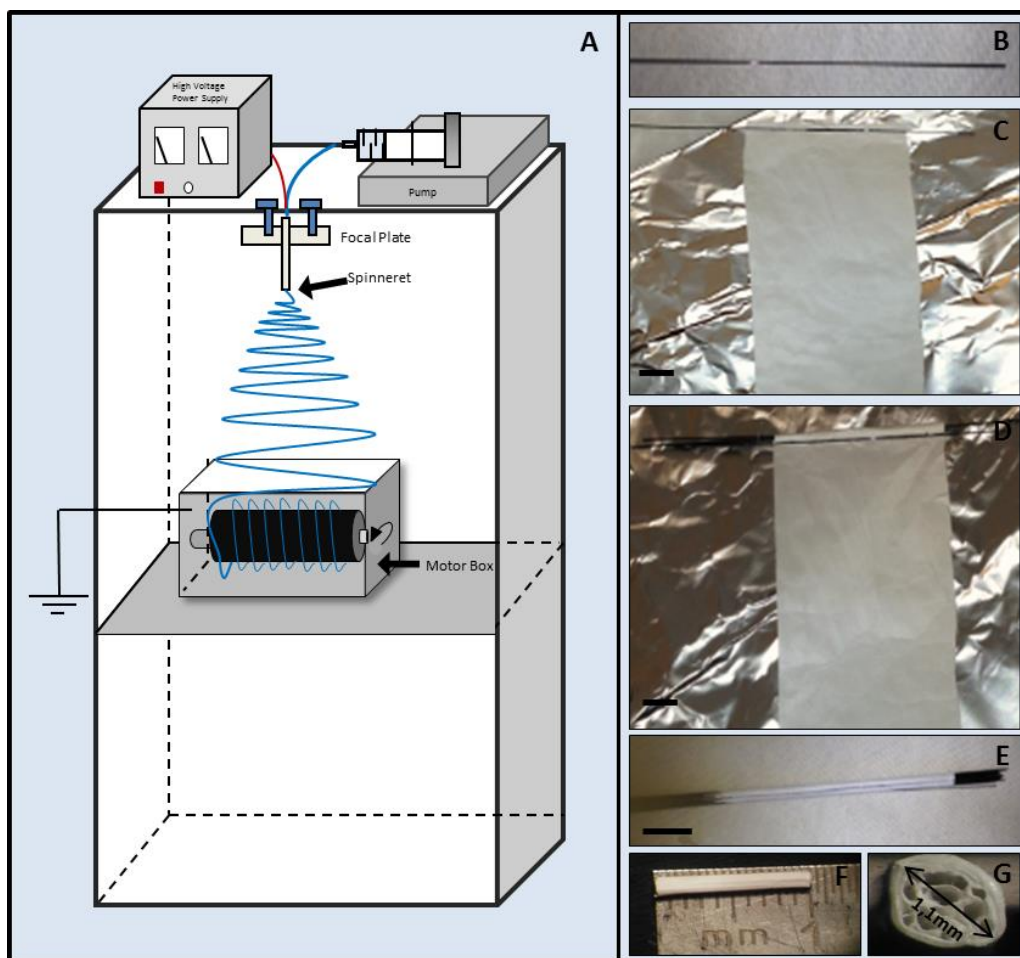
## Results

### 1. Fabrication of the silk nerve conduit guidance

The electrospinning setup and fabrication process for the 3D silk nerve conduits are illustrated in Figure 1. Silk fibroin solution was diluted to 8% (w/v) for spinning and NGF and CNTF were added to the spinning solution at 100ng/mL and 10ng/mL, respectively. To align the nanofibers, an aluminum mandrel rotating at 9.5 m/s was used into the electrospinning setup (Figure 1A). To form multichannels in the electrospun silk fibers, 0.3mm diameter Teflon rods were used (Figure 1B) and 50 sticks were incorporated and rolled up 360°C around the silk scaffold one by one (Figure 1C, D). Once all of the rods were integrated to the

mat, the rest of the silk electrospun fibers were used to completely cover the new structure based on a three-dimensional geometric cylinder. This structure had an average inner diameter of 5 mm and a length of 50 mm (Figure 1E). All tubes formed were treated by water vapor annealing to generate water insoluble silk mats (Hu et al., 2011) overnight and the cylinders were immersed in sterile PBS solution for 5 min in order to remove the Teflon sticks.

Silk guides and bifunctionalized conduits were standardized to 1mm diameter and 1cm length (Figure 1F, G). Of the 160 nerve conduits produced the average length was  $1.03 \pm 0.1$  cm and diameter  $1.2 \pm 0.2$  mm. Their average dry weight was  $7.9 \pm 2.3$  mg.



**Figure 1: Fabrication of 3D Silk nerve conduit guidance by electrospinning**

*Silk aligned nanofibers are collected thanks to an aluminum mandrel rotating at 9,5 m.s-1 (A) to create a 2D silk aligned nanofibers sheet. Teflon sticks ( $\varnothing=0,3$ mm) were used (B) to roll up the silk sheet at 360°(C). This process was repeated for 50 sticks (D). The rest of the silk sheet is rolled up around the structure created (E). All of the tubes fabricated were standardized to a length of 1cm (F) and a diameter around 1mm (G). Scale bars: 1cm*

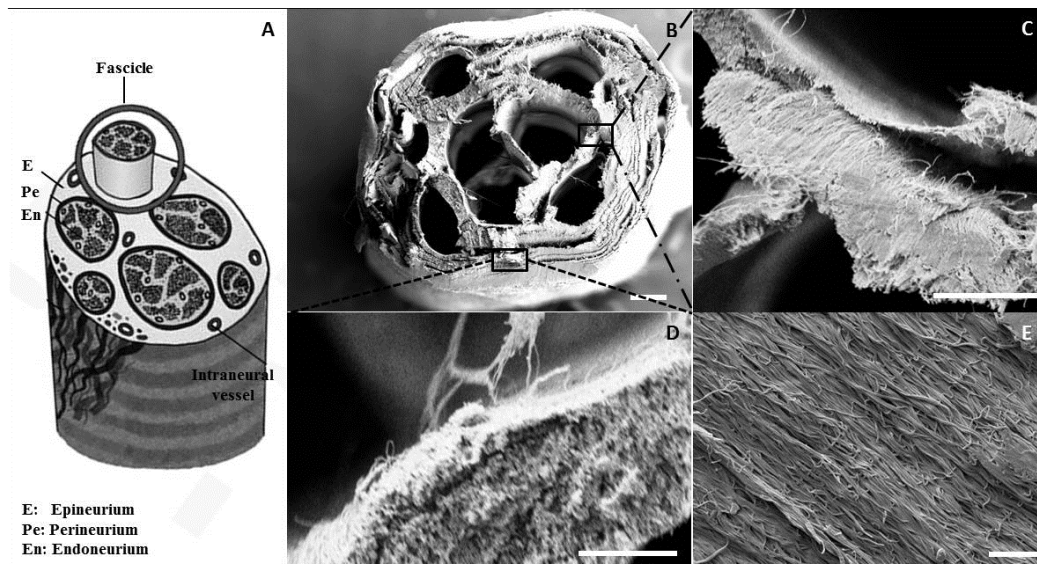


## 2. Characterization of morphology

Nerve tissue has a complex architecture where the individual nerve fibers are organized by connective tissue that consists of three distinct components, endoneurium, perineurium, and epineurium (Pavelka and Roth, 2010). The perineurium delineates different fascicles that look like channels and protects the endoneurium and axons (Figure 2A).

Representative SEM images of the overall architecture of the silk nerve conduits fabricated are shown in Figure 2 and show an array of parallel microchannels localized at the center of the tube, enveloped by several layers of silk electrospun fibers. Multi-channel guides fabricated are shown in Figure 2B with approximately 12 channels of different sizes. Eight tubes were used to measure channel diameters localized at the center of the structure and was found to be  $183.75 \pm 55.9 \mu\text{m}$ . Lumen areas were also measured with ImageJ software to estimate the material surface area in each section. Lumen area represents 25% of the total tube area, with the remaining 75% composed of the functionalized silk mats. Figure 2C demonstrates the structure of the electrospun fibers around the microchannels. Nanofiber orientation is well aligned and structured to create an open network of paths for nutrient transport into and out of the channel. Electrospun layers are observed on Figure 2D which fix the guides into a circular shape consisting of a well-organized network of aligned nanofibers.

Transverse sections of nerve guides were also observed by SEM to characterize fiber diameter and alignment (Figure 2E) and an average diameter of  $792 \pm 97 \text{ nm}$  was found. The rotating speed applied on the mandrel controlled fiber orientation with 85% of the fibers at an angle of deviation less than  $5^\circ$ . This electrospinning approach provided regular fiber diameter with good alignment. No changes in average diameter or alignment were observed between the silk fiber group and the functionalized (with growth factor) silk fiber group.



**Figure 2: Biomimetic comparison of the silk nerve guidance conduit fabricated**

*Schematic drawing of a peripheral nerve (A). SEM images of microchannels (B: scale bar 200  $\mu\text{m}$ ) and nanofibers in the nerve guides (C: scale bar 100  $\mu\text{m}$  and D: scale bar 50  $\mu\text{m}$ ). Transverse-section of nerve guide with aligned nanofibers (E: scale bar 10 $\mu\text{m}$ ).*

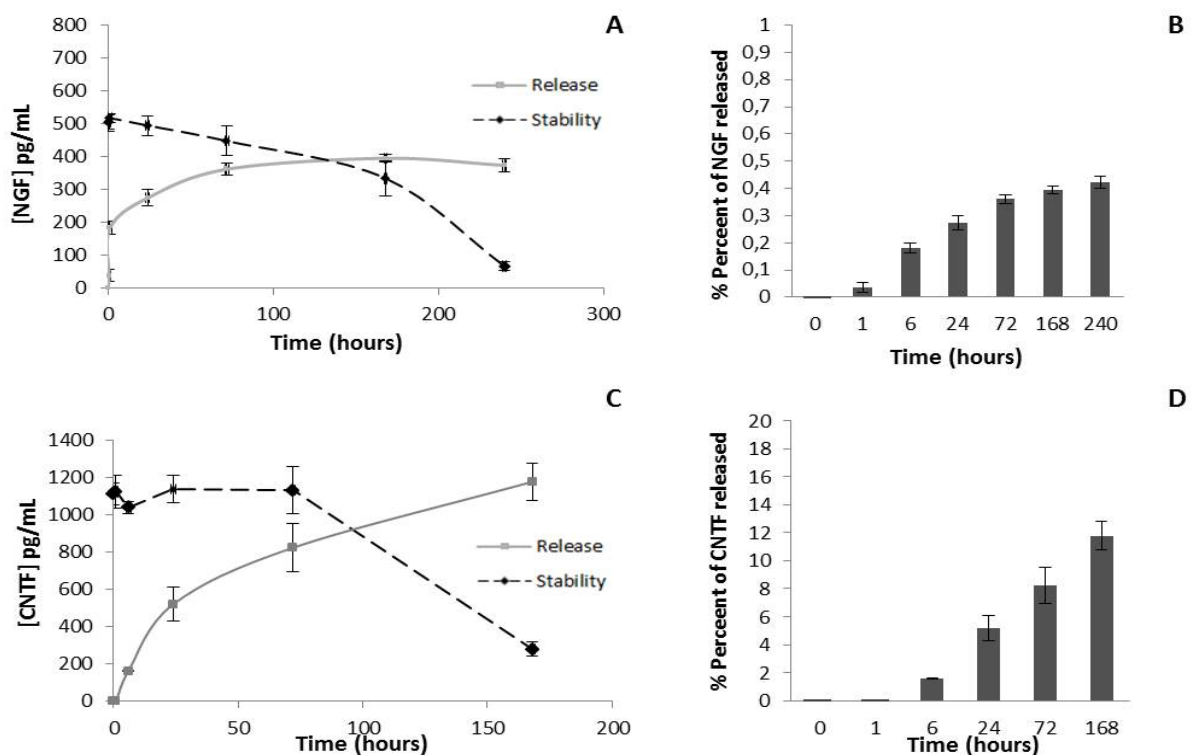
### 3. Growth factor stability and release from electrospun fibers

The growth factor stability and NGF, CNTF release from the nerve conduits were observed in a PBS – Tween20 solution and determined by ELISA. NGF stability and release were observed over 10 days whereas CNTF over 7 days at 37°C (Figure 3).

The 500 pg/mL of NGF was also prepared to observe the degradation rate. The growth factor was stable for the first 3 days and after 7 days 67% of the NGF was detected in the solution, suggesting slow degradation during the first week. At 10 days, less than 15% of the NGF was detected suggesting rapid degradation after one week. NGF release from the electrospun silk nerve conduits was detected after the first hour, and then the slope of the curve converged to 0 for a maximal release at 400pg/mL over one week. After one week, slope of the curve was negative, showing that the release stopped and degradation of the released growth factors was likely occurring (Figure 3A). Given that each silk nerve conduit contained 100ng/mL of NGF, less than 1% of NGF was released from the bi-functionalized silk tubes (Figure 3B) over these times frames. Therefore, more than 99% of NGF was not released from the conduit over 10 days.

Degradation rate of CNTF was observed using a 1ng/mL solution. CNTF was stable

over the first 3 days, following by rapid degradation from day 3 to day 7. CNTF release studies showed that 25% of the initial loaded CNTF concentration was detected after one week and release from the conduits was not complete at 7days. After a period of rapid CNTF release during the first 24hours, the release of the growth factor had zero-order release kinetics thereafter. The slope of the curve was stable during these 6 days. These results suggest controlled CNTF release from the silk tubes over 7 days (Figure 3C). The total CNTF released from the bi-functionalized nerve conduits was less than 12% after one week (Figure 3C) suggesting that the 88% remaining in the conduit is still active.



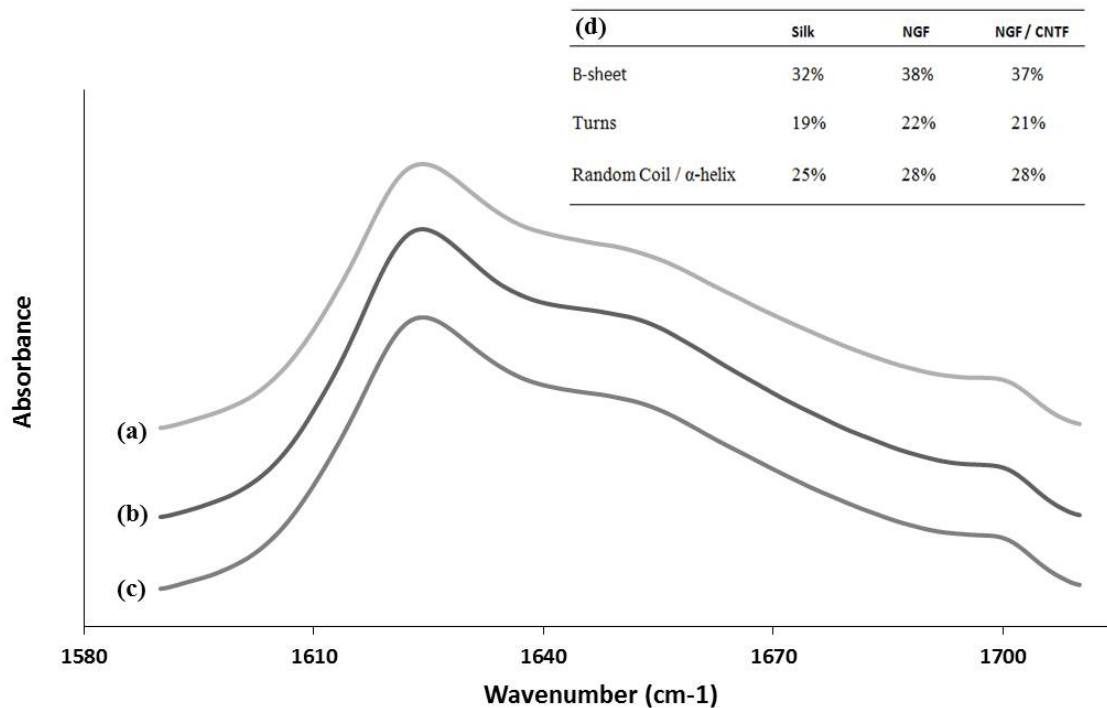
**Figure 3: Growth factors release from electrospun functionalized silk tubes and stability.**

(A) Stability: Degradation of 500 pg.mL<sup>-1</sup> of NGF was observed in PBS with 0.02% Tween20 during 10 days. After one week, more than 65% of NGF could be detected. Release from NGF silk tubes was very low and happened in the day. Then the slope of the curve was decreasing, showing release stopped and growth factors released started to be degraded. (B) Less than 1% of NGF were released from NGF silk tubes.

(C) Stability: Degradation of 1 ng.mL<sup>-1</sup> of CNTF was observed in PBS with 0.02% Tween20 during 7 days. 25% of CNTF were still detected after one week. Release from CNTF silk tubes was not complete during one week. (D) Less than 15% of CNTF were released from CNTF silk tubes

#### 4. FTIR / DSC

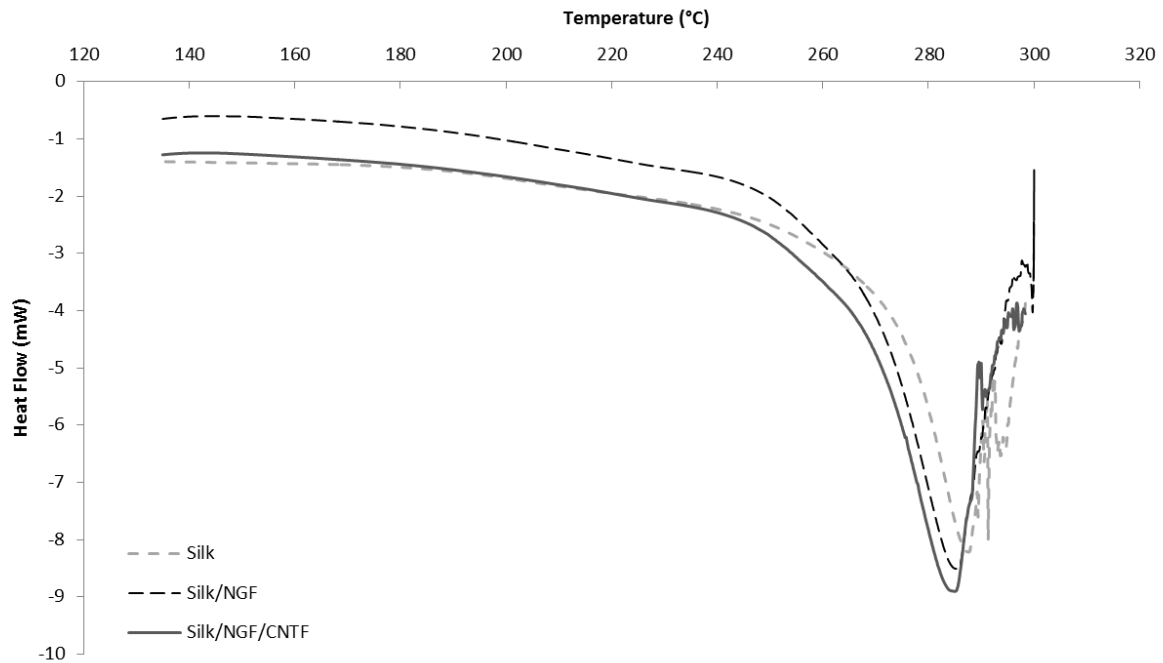
FTIR was used to determine if the incorporation of growth factors affected the secondary structure of the silk mats. From Figure 4 for all silk tubes there were peaks centered at 1625 cm<sup>-1</sup> corresponding to beta-sheet, characteristic of annealed silk (Hu et al., 2011). As the insert shows there was no significant increase in beta-sheet content between any of the treatments.



**Figure 4: FTIR spectra of silk nerve guidance conduit electrospun materials prepared by water annealing.**

*(a) Silk fibroin electrospun; (b) Silk fibroin functionalized with NGF electrospun; (c) Silk fibroin functionalized with NGF and CNTF electrospun. (d) Table of the secondary structure of the nerve conduit. All samples were treated by water-annealing overnight.*

The DSC studies revealed that the silk tubes all displayed a similar thermal degradation pattern regardless of growth factor addition. We notice from the three representative DSC curves in Figure 5 that there was a small endothermic peak around 175°C, followed by a change in heat flow ~190°C above the glass transition temperature of uncrystallized silk (178°C) (Hu et al., 2007). Above this temperature all of the silk samples degraded rapidly, indicating no additional secondary structure crystallization.



**Figure 5: DSC heating curves of silk nerve conduit, silk functionalized and silk bifunctionalized tubes after water annealing treatment and fully hydration.**

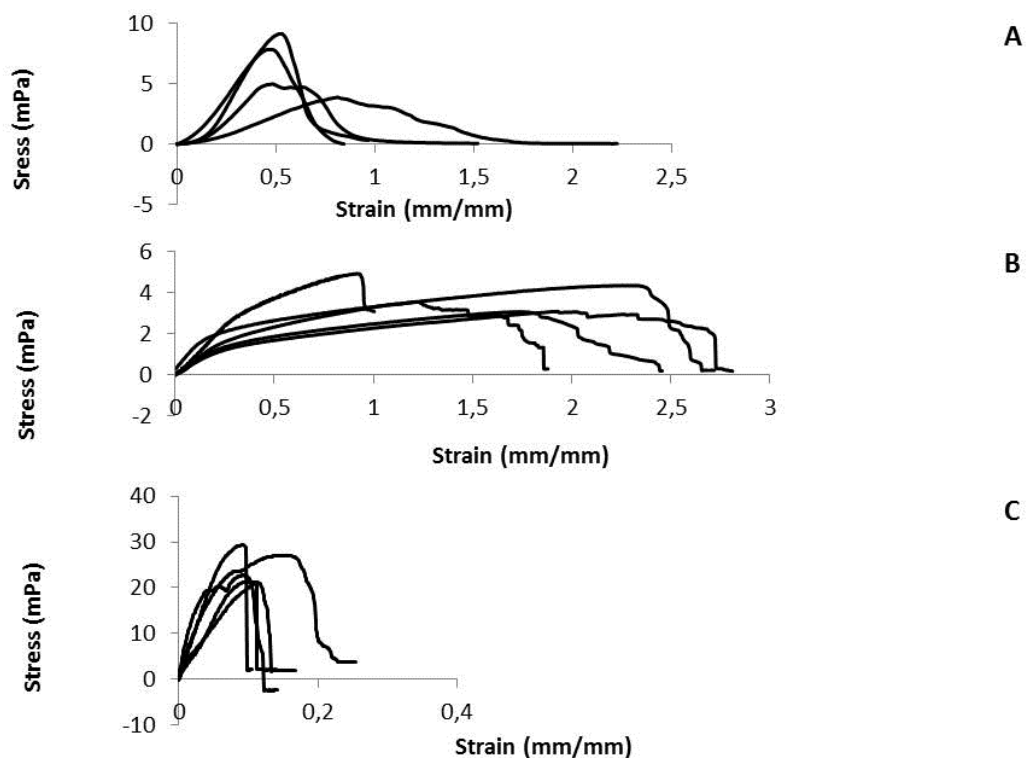
## 5. Mechanical behavior and properties

Representative stress-strain curves of three groups (rat sciatic nerve, wet silk conduit and dry silk conduit) at same strain rate of 0.02 are shown in Figure 6. Mechanical behavior was compared to rat sciatic nerves, which presented three regions (Figure 6A). The first one is a toe region (typical in most soft tissues) with a low stiffness until 20 % strain, followed by a linear high stiffness region until 50 % strain for 75% of the samples. Then, the stress rapidly decreased after the peak for two thirds of the samples tested. The other third of the samples tested presented a larger failure region and then the stress decreased.

The mechanical behavior of the hydrated conduits also showed the same three regions as the majority of the rat sciatic nerves (Figure 6B). Curves increased until the peak value, with an initial region up to 25 % strain with a higher stiffness compared to regions after this value. For a majority of samples failure regions were after 100 % strain. After the peak value, stress decreased intermittently corresponding to successive structural ruptures in the silk construct.

Dry silk nerve conduits exhibited small deformations and were linearly elastic (Figure

6C). Dry silk allowed a linear high stiffness region until 10 %, followed by the permanent plastic deformation until the peak value.



**Figure 6: Stress = f(strain)**

*Comparison of the mechanical behavior of rat sciatic nerve (A), wet (B) and dry (C) silk nerve conduit when subjected to a stretch rate of 0.06 mm/s.*

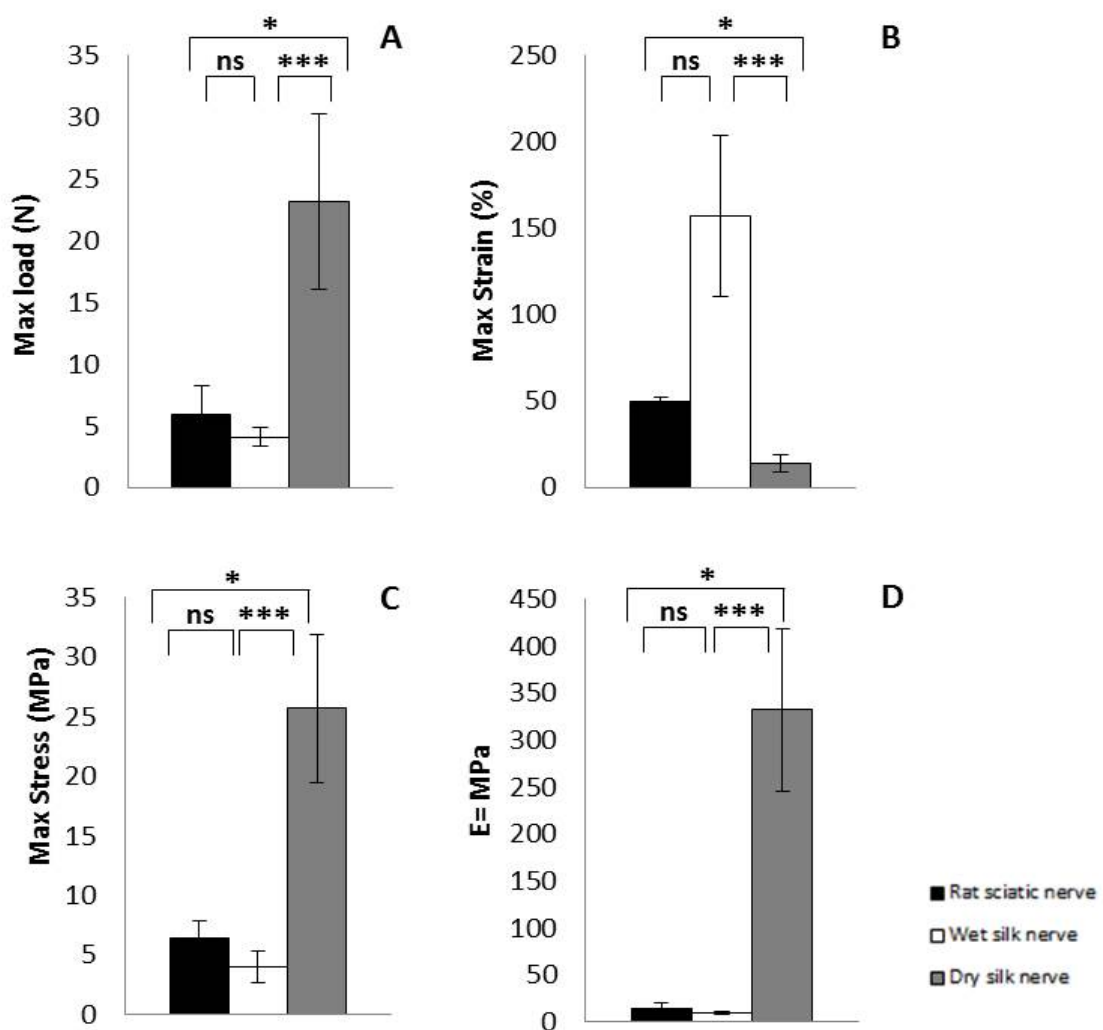
Consequently, ultimate stress and failure strain were defined as the values at the peak point of the stress-strain curve. The linear region identified after the toe region was used for the determination of Young's modulus (E).

The mechanical properties from tensile tests are summarized in Figure 7, including force at failure (Max load), failure strain (Max Strain), ultimate stress (Max Stress) and Young's modulus (E).

The force failure of the wet silk conduits was  $4.13 \pm 0.80$  N, not significantly different than the rat sciatic nerves ( $5.94 \pm 2.42$  N). The dry silk conduits had force at failure of  $23.2 \pm 7.1$  N which was significantly higher than rat sciatic nerves ( $p < 0.05$ ) and wet silk conduits ( $p < 0.001$ ) (Figure 7A). The ultimate strain on wet silk nerve conduits ( $156.8 \pm 46.7\%$ ) was not significantly higher than rat sciatic nerves ( $49.2 \pm 2.4\%$ ;  $p > 0.05$ ) while significantly higher than the dry silk conduits ( $14 \pm 5\%$ ;  $p < 0.001$ ). The results showed that wet silk conduits could

be stretched to more than 100% of original size before failure (Figure 7B).

Maximum stress obtained for wet silk conduits with  $4.0 \pm 0.6$  MPa was not significantly different than rat sciatic nerves at  $6.1 \pm 1.5$  MPa, while dry silk conduits ( $25.7 \pm 6.2$  MPa) were significantly higher than the wet conduit ( $p < 0.001$ ) and rat sciatic nerves ( $p < 0.05$ ) (Figure 7C). The elastic modulus of rat sciatic nerves ( $13.79 \pm 5.48$  MPa) was not significantly higher than wet silk conduits ( $8.47 \pm 1.33$  MPa) while dry silk conduits ( $331.60 \pm 86.4$  MPa) were significantly higher than both the wet conduits and rat sciatic nerves ( $p < 0.05$ ) (Figure 7D).



### Figure 7: Mechanical properties

Mean  $\pm$  standard deviation values of maximum load (A), maximum strain (B), maximum stress (C) and EE (D) observed on rat sciatic nerve (black), wet silk nerve conduit (white) and dry silk nerve conduit (grey). Standard deviations are shown as error bars. Significant differences (ns: no significance, \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ )

No differences were found between rat sciatic nerves and the hydrated or wet silk conduits for all properties measured, including force applied before failure, stretch, plastic deformation and elasticity.

## **Discussion**

Over the past 30 years no repair strategy has offered the same advantages than the current clinical gold standard for peripheral nerve repair (Geuna et al., 2014; Hadlock et al., 2000). However, the last few years have witnessed significant development of increasingly sophisticated bioengineered nerve graft substitutes composed of synthetic or natural polymer-based nerve guides (Geuna et al., 2014; Lundborg, 2000).

Single channel nerve guides were first fabricated for potential autologous nerve graft replacements (Evans et al., 1991; de Ruyter et al., 2009). However, a single hollow tube may lead to inappropriate targeted reinnervation by the dispersion of regenerating axons across the graft (Brushart et al., 1995; Panseri et al., 2008). Many methods including injection molding (Zeng et al., 2014), freeze drying (Ao et al., 2006; Bozkurt et al., 2007), and electrodeposition (George et al., 2009) have been developed to fabricate multichanneled nerve guides. Moreover, replicating nerve tissues requires an array of parallel and longitudinally oriented microchannels (Stang et al., 2005). In this study, using the electrospinning technique in conjunction with successive Teflon rod molding, a series of multichannel silk conduits with tailored mechanical and chemical properties consisting were fabricated consisting of oriented microchannels composed of aligned functionalized electrospun silk fibers.

Microchannel fabrication of the silk conduits used 10 cm Teflon rods (diameter: 0.3mm) followed by rolling the functionalized electrospun silk fibers around these rods allows longitudinal aligned microchannels within the guide. Rods were uniform in size but because of the removal under PBS, channel sizes (diameters ranging from 50 to 300 $\mu$ m) were not uniform as expected. Nevertheless, a high channel density was attained, which may be particularly useful in comparison to other techniques such as mold casting methods



(Tran et al., 2014; Yao et al., 2010). Reducing or increasing rod diameter can influence the size of each channel for better control of structure. SEM images in Figure 2 showed larger primary channels and secondary micro-channels at the center and periphery of the conduits. The channels were maintained by several aligned functionalized electrospun silk layers to exhibit sufficient interaction to prevent delamination.

Electrospun silk nanofiber scaffolds supported the growth, development and migration of cultured neural cells, with an increase in cell-spreading on small diameters, 400 nm and 800 nm, but not on larger diameters, 1200 nm (Qu et al., 2013). The present silk conduits consisted of aligned nanofibers with an average diameter of 792 nm, suitable for neuron adherence and growth. Electrospun aligned fibers provided topographical cues to direct and enhance neurite outgrowth when compared to random fibers (Corey et al., 2007). In the literature, the unidirectional contours of aligned fibers provided physical guidance to the cells (Lee et al., 2013), facilitating axon path finding and accelerating nerve tissue regeneration (Dinis et al., 2013 ; Liu et al., 2010).

In contrast to existing electrospun nerve guides (Jeffries and Wang, 2012; Mauck et al., 2009; Yucel et al., 2010), our biomimetic design presents a complex three dimensional construct with open channels to guide neurons and Schwann cells between the both aligned microchannels and functionalized fibrous substrate.

Electrospun silk fibers were previously identified as candidate compositions for nerve regeneration based on in vitro studies (Dinis et al., 2013; Wittmer et al., 2011; ). Silk biocompatibility and biodegradability are well documented. ( Duval et al., 2014; Kim et al., 2012; Yang et al., 2007 Zhao et al., 2013; ). Bioactive molecules can be incorporated into electrospun silk fibers by many methods such as physical adsorption, covalent attachment, co-axial spinneret electrospinning via addition of bioactive molecules into the spinning solution before spinning. NGF and CNTF were added to the spinning solution in order to control the final concentration. Growth factors, in this case, interact with the scaffold mainly through electrostatic interactions (Uebersax et al., 2007).. As reported on the literature, we expect a 20% burst release of the factors from electrospun fibers (Sahoo et al., 2010b; Schneider et al., 2009). Interestingly, only 12% of CNTF and 1% of NGF were released from the conduits. At neutral pH, silk fibroin is negatively charged (pI = 4.3) and CNTF (pI = 5) and

NGF (pI = 9.3) are positively charged. The molecular weight of NGF (27 kDa) and CNTF (23kDa) may also impede diffusion. These biophysical factors of charge and size can explain the low release observed in the experiments over one week by ELISA.

The FITR results revealed that there were no differences in secondary structure between functionalized and non-functionalized silk nerve conduits. This can be explained by the fact that all tubes were subject to water vapor annealing in order to make them water insoluble via the induction of crystallization in silk materials (Hu et al, 2011). Thus any changes induced by growth factor addition would be masked by the water vapor annealing process. DSC also confirmed that the protein structure of the three samples was similar. All treatments showed slow degradation above the glass transition temperature of silk followed by rapid degradation above 210oC. Other studies have demonstrated the same behavior for annealed silk suggesting that the beta-sheet regions account for the observed degradation above the 178oC glass transition temperature of non-crystalline silk (Hu et al 2007). No changes on crystallinity demonstrated that functionalized silk exhibited the same polymers properties as the nonfunctionalized silk. Based on previous experience with growth factor incorporation and release from electrospun silk scaffolds (Hu et al., 2011; Li et al., 2006) we did not expect NGF and CNTF incorporation to affect overall beta sheet content, as confirmed by the data. Moreover,

The mechanical properties of these silk conduits were compared to rat sciatic nerves and which are strong and elastic (Bora Jr. et al., 1980; Kwan et al., 1992; Restaino et al., 2014). The native nerve tensile tests showed similar stress-strain behavior and mechanical properties to the rat nerves in previous studies ( Ma et al., 2011; Topp and Boyd, 2006), where the epineurium and perineurium were suggested as responsible for the tensile strength. The mechanical properties of the silk conduits were comparable to the rat sciatic nerves as no significant differences were found between the hydrated silk conduits and rat nerves for all biomechanical parameters except for strain. Although, no differences were found for this parameter between the two groups our silk conduits, the values were higher (more stretchable) than native nerves. This characteristic gives these nerve graft substitutes an advantage in terms of handling and suturing during implant surgery. Hydrated and dry silk conduits have shown different mechanical properties due to beta sheet structure (Hu et al., 2011; Jin et al., 2005).

## **Conclusions**

A method to design nerve conduits for guidance cues consisting of aligned functionalized silk electrospun fibers is described, and the systems can also contain a high density of aligned and longitudinally oriented microchannels mimicking fascicles for peripheral nerve regeneration. The design provides tailored architecture and strength. The conduits were successfully functionalized to provide sustained release of nerve-related growth factors without affecting the silk polymer properties. The nerve graft mechanical behavior were comparable to those of rat sciatic nerves.

## **Acknowledgment**

This work was supported by a grant of the region Picardie through the Silknerve project and the Tissue Engineering Resource Center (TERC, P41 EB002520) from Tufts University. We also thank Sophie Lejay for her collaboration to perform tensile tests. Tony M. Dinis received a fellowship from the French Ministry of Science and Technology.

## References

- Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D.L., 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24, 401–416.
- Ao, Q., Wang, A., Cao, W., Zhang, L., Kong, L., He, Q., Gong, Y., Zhang, X., 2006. Manufacture of multimicrotubule chitosan nerve conduits with novel molds and characterization in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A* 77, 11–18. doi:10.1002/jbm.a.30593
- Belkas, J.S., Shoichet, M.S., Midha, R., 2004. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol. Res.* 26, 151–160. doi:10.1179/016164104225013798
- Biazar, E., Khorasani, M.T., Zaeifi, D., 2010. Nanotechnology for peripheral nerve regeneration. *Int. J. Nano Dimens.* 1, 1–23.
- Bora Jr., F.W., Richardson, S., Black, J., 1980. The biomechanical responses to tension in a peripheral nerve. *J. Hand Surg.* 5, 21–25. doi:10.1016/S0363-5023(80)80037-2
- Bozkurt, A., Brook, G.A., Moellers, S., Lassner, F., Sellhaus, B., Weis, J., Woeltje, M., Tank, J., Beckmann, C., Fuchs, P., Damink, L.O., Schügner, F., Heschel, I., Pallua, N., 2007. In vitro assessment of axonal growth using dorsal root ganglia explants in a novel three-dimensional collagen matrix. *Tissue Eng.* 13, 2971–2979. doi:10.1089/ten.2007.0116
- Brushart, T.M., Mathur, V., Sood, R., Koschorke, G.M., 1995. Joseph H. Boyes Award. Dispersion of regenerating axons across enclosed neural gaps. *J. Hand Surg.* 20, 557–564.
- Bryan, D.J., Tang, J.B., Doherty, S.A., Hile, D.D., Trantolo, D.J., Wise, D.L., Summerhayes, I.C., 2004. Enhanced peripheral nerve regeneration through a poled bioresorbable poly(lactic-co-glycolic acid) guidance channel. *J. Neural Eng.* 1, 91–98. doi:10.1088/1741-2560/1/2/004
- Campenot, R.B., 1977. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 4516–4519.
- Cohen-Karni, T., Jeong, K.J., Tsui, J.H., Reznor, G., Mustata, M., Wanunu, M., Graham, A., Marks, C., Bell, D.C., Langer, R., Kohane, D.S., 2012. Nanocomposite gold-silk nanofibers. *Nano Lett.* 12, 5403–5406. doi:10.1021/nl302810c
- Corey, J.M., Lin, D.Y., Mycek, K.B., Chen, Q., Samuel, S., Feldman, E.L., Martin, D.C., 2007. Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth. *J. Biomed. Mater. Res. A* 83, 636–645. doi:10.1002/jbm.a.31285
- De Ruitter, G.C.W., Malessy, M.J.A., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J., Spinner, R.J., 2009. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg. Focus* 26, E5. doi:10.3171/FOC.2009.26.2.E5

Dellon, A.L., Mackinnon, S.E., 1988. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast. Reconstr. Surg.* 82, 849–856.

Dinis, T., Vidal, G., Marin, F., Kaplan, D., Eglès, C., 2013. Silk nerve: bioactive implant for peripheral nerve regeneration. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* 16, 253–254. doi:10.1080/10255842.2013.815958

Duval, J.-L., Dinis, T., Vidal, G., Vigneron, P., Kaplan, D.L., Egles, C., 2014. Organotypic culture to assess cell adhesion, growth and alignment of different organs on silk fibroin. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* n/a–n/a. doi:10.1002/term.1916

Evans, P.J., Bain, J.R., Mackinnon, S.E., Makino, A.P., Hunter, D.A., 1991. Selective reinnervation: a comparison of recovery following microsuture and conduit nerve repair. *Brain Res.* 559, 315–321.

Friedman, B., Scherer, S.S., Rudge, J.S., Helgren, M., Morrissey, D., McClain, J., Wang, D.Y., Wiegand, S.J., Furth, M.E., Lindsay, R.M., 1992. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron* 9, 295–305.

George, P.M., Saigal, R., Lawlor, M.W., Moore, M.J., LaVan, D.A., Marini, R.P., Selig, M., Makhni, M., Burdick, J.A., Langer, R., Kohane, D.S., 2009. Three-dimensional conductive constructs for nerve regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A* 91, 519–527. doi:10.1002/jbm.a.32226

Geuna, S., Tos, P., Titolo, P., Ciclamini, D., Beningo, T., Battiston, B., 2014. Update on nerve repair by biological tubulization. *J. Brachial Plex. Peripher. Nerve Inj.* 9, 3. doi:10.1186/1749-7221-9-3

Hadlock, T., Sundback, C., Hunter, D., Cheney, M., Vacanti, J.P., 2000. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 6, 119–127. doi:10.1089/107632700320748

Horner, P.J., Gage, F.H., 2000. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407, 963–970. doi:10.1038/35039559

Hsu, S.-H., Chan, S.-H., Weng, C.-T., Yang, S.-H., Jiang, C.-F., 2013. Long-Term Regeneration and Functional Recovery of a 15 mm Critical Nerve Gap Bridged by Tremella fuciformis Polysaccharide-Immobilized Polylactide Conduits. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 959261. doi:10.1155/2013/959261

Hu, X., Kaplan, D., Cebe, P., 2007. Effect of water on the thermal properties of silk fibroin. *Thermochim. Acta*, 9th Laehnwithzseminar 2006 Special Issue 9th Laehnwithzseminar on Calorimetry 461, 137–144. doi:10.1016/j.tca.2006.12.011

- Hu, X., Shmelev, K., Sun, L., Gil, E.-S., Park, S.-H., Cebe, P., Kaplan, D.L., 2011. Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing. *Biomacromolecules* 12, 1686–1696. doi:10.1021/bm200062a
- Ichihara, S., Inada, Y., Nakamura, T., 2008. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. *Injury* 39 Suppl 4, 29–39. doi:10.1016/j.injury.2008.08.029
- Inoguchi, H., Kwon, I.K., Inoue, E., Takamizawa, K., Maehara, Y., Matsuda, T., 2006. Mechanical responses of a compliant electrospun poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) small-diameter vascular graft. *Biomaterials* 27, 1470–1478. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.08.029
- Jeffries, E.M., Wang, Y., 2012. Biomimetic micropatterned multi-channel nerve guides by templated electrospinning. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1571–1582. doi:10.1002/bit.24412
- Jin, H.-J., Park, J., Karageorgiou, V., Kim, U.-J., Valluzzi, R., Cebe, P., Kaplan, D.L., 2005. Water-Stable Silk Films with Reduced  $\beta$ -Sheet Content. *Adv. Funct. Mater.* 15, 1241–1247. doi:10.1002/adfm.200400405
- Johnson, A.P.P.J., Wood, M.D., Moore, A.M., Mackinnon, S.E., 2013. Tissue engineered constructs for peripheral nerve surgery. *Eur. Surg.* 45, 122–135. doi:10.1007/s10353-013-0205-0
- Kang, S.S., Keasey, M.P., Cai, J., Hagg, T., 2012. Loss of neuron-astroglial interaction rapidly induces protective CNTF expression after stroke in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 9277–9287. doi:10.1523/JNEUROSCI.1746-12.2012
- Kehoe, S., Zhang, X.F., Boyd, D., 2012. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury* 43, 553–572. doi:10.1016/j.injury.2010.12.030
- Kim, J.H., Park, C.H., Lee, O.-J., Lee, J.-M., Kim, J.W., Park, Y.H., Ki, C.S., 2012. Preparation and in vivo degradation of controlled biodegradability of electrospun silk fibroin nanofiber mats. *J. Biomed. Mater. Res. A* 100, 3287–3295. doi:10.1002/jbm.a.34274
- Kwan, M.K., Wall, E.J., Massie, J., Garfin, S.R., 1992. Strain, stress and stretch of peripheral nerve. Rabbit experiments in vitro and in vivo. *Acta Orthop. Scand.* 63, 267–272.
- Lee, J.-H., Lee, Y.J., Cho, H.-J., Shin, H., 2013. Guidance of In Vitro Migration of Human Mesenchymal Stem Cells and In Vivo Guided Bone Regeneration Using Aligned Electrospun Fibers. *Tissue Eng. Part A.* doi:10.1089/ten.tea.2013.0282
- Li, C., Vepari, C., Jin, H.-J., Kim, H.J., Kaplan, D.L., 2006. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3115–3124. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.022

- Li, R., Hettinger, P.C., Machol, J.A., Liu, X., Stephenson, J.B., Pawela, C.P., Yan, J.-G., Matloub, H.S., Hyde, J.S., 2013. Cortical plasticity induced by different degrees of peripheral nerve injuries: a rat functional magnetic resonance imaging study under 9.4 Tesla. *J. Brachial Plex. Peripher. Nerve Inj.* 8, 4. doi:10.1186/1749-7221-8-4
- Liao, C.-D., Zhang, F., Guo, R.-M., Zhong, X.-M., Zhu, J., Wen, X.-H., Shen, J., 2012. Peripheral nerve repair: monitoring by using gadofluorine M-enhanced MR imaging with chitosan nerve conduits with cultured mesenchymal stem cells in rat model of neurotmesis. *Radiology* 262, 161–171. doi:10.1148/radiol.11110911
- Liu, T., Houle, J.D., Xu, J., Chan, B.P., Chew, S.Y., 2012. Nanofibrous collagen nerve conduits for spinal cord repair. *Tissue Eng. Part A* 18, 1057–1066. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0430
- Liu, X., Chen, J., Gilmore, K.J., Higgins, M.J., Liu, Y., Wallace, G.G., 2010. Guidance of neurite outgrowth on aligned electrospun polypyrrole/poly(styrene-beta-isobutylene-beta-styrene) fiber platforms. *J. Biomed. Mater. Res. A* 94, 1004–1011. doi:10.1002/jbm.a.32675
- Lundborg, G., 2000. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J. Hand Surg.* 25, 391–414. doi:10.1053/jhsu.2000.4165
- Ma, X.-L., Sun, X.-L., Yang, Z., Li, X.-L., Ma, J.-X., Zhang, Y., Yuan, Z.-Z., 2011. Biomechanical properties of peripheral nerve after acellular treatment. *Chin. Med. J. (Engl.)* 124, 3925–3929.
- Masaeli, E., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Sadri, S., Hilderink, J., van Apeldoorn, A., van Blitterswijk, C.A., Moroni, L., 2013. Fabrication, characterization and cellular compatibility of poly(hydroxy alcanoate) composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *PLoS One* 8, e57157. doi:10.1371/journal.pone.0057157
- Mauck, R.L., Baker, B.M., Nerurkar, N.L., Burdick, J.A., Li, W.-J., Tuan, R.S., Elliott, D.M., 2009. Engineering on the straight and narrow: the mechanics of nanofibrous assemblies for fiber-reinforced tissue regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15, 171–193. doi:10.1089/ten.TEB.2008.0652
- Meinel, L., Hofmann, S., Karageorgiou, V., Kirker-Head, C., McCool, J., Gronowicz, G., Zichner, L., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., 2005. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* 26, 147–155. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.047
- Nectow, A.R., Marra, K.G., Kaplan, D.L., 2012. Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits. *Tissue Eng. Part B Rev.* 18, 40–50. doi:10.1089/ten.TEB.2011.0240

- Panseri, S., Cunha, C., Lowery, J., Del Carro, U., Taraballi, F., Amadio, S., Vescovi, A., Gelain, F., 2008. Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. *BMC Biotechnol.* 8, 39. doi:10.1186/1472-6750-8-39
- Pavelka, o U.P.D. med M., Roth, P.D. med D. sc D. h c J., 2010. Peripheral Nerve: Connective Tissue Components, in: *Functional Ultrastructure*. Springer Vienna, pp. 324–325.
- Qu, J., Wang, D., Wang, H., Dong, Y., Zhang, F., Zuo, B., Zhang, H., 2013. Electrospun silk fibroin nanofibers in different diameters support neurite outgrowth and promote astrocyte migration. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101, 2667–2678. doi:10.1002/jbm.a.34551
- Rende, M., Muir, D., Ruoslahti, E., Hagg, T., Varon, S., Manthorpe, M., 1992. Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor in adult rat sciatic nerve. *Glia* 5, 25–32. doi:10.1002/glia.440050105
- Restaino, S.M., Abliz, E., Wachrathit, K., Krauthamer, V., Shah, S.B., 2014. Biomechanical and functional variation in rat sciatic nerve following cuff electrode implantation. *J. Neuroengineering Rehabil.* 11, 73. doi:10.1186/1743-0003-11-73
- Rockwood, D.N., Preda, R.C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M.L., Kaplan, D.L., 2011. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat. Protoc.* 6, 1612–1631. doi:10.1038/nprot.2011.379
- Sahoo, S., Ang, L.T., Goh, J.C.-H., Toh, S.-L., 2010a. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 93A, 1539–1550. doi:10.1002/jbm.a.32645
- Sahoo, S., Ang, L.T., Goh, J.C.-H., Toh, S.-L., 2010b. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 93, 1539–1550. doi:10.1002/jbm.a.32645
- Schneider, A., Wang, X.Y., Kaplan, D.L., Garlick, J.A., Egles, C., 2009. Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta Biomater.* 5, 2570–2578. doi:10.1016/j.actbio.2008.12.013
- Sofroniew, M.V., Howe, C.L., Mobley, W.C., 2001. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1217–1281. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1217
- Stang, F., Fansa, H., Wolf, G., Reppin, M., Keilhoff, G., 2005. Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 26, 3083–3091. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.060
- Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123–1133.



Topp, K.S., Boyd, B.S., 2006. Structure and Biomechanics of Peripheral Nerves: Nerve Responses to Physical Stresses and Implications for Physical Therapist Practice. *Phys. Ther.* 86, 92–109.

Topp, K.S., Boyd, B.S., 2012. Peripheral nerve: from the microscopic functional unit of the axon to the biomechanically loaded macroscopic structure. *J. Hand Ther. Off. J. Am. Soc. Hand Ther.* 25, 142–151; quiz 152. doi:10.1016/j.jht.2011.09.002

Tran, R.T., Choy, W.M., Cao, H., Qattan, I., Chiao, J.-C., Ip, W.Y., Yeung, K.W.K., Yang, J., 2014. Fabrication and characterization of biomimetic multichanneled crosslinked-urethane-doped polyester tissue engineered nerve guides. *J. Biomed. Mater. Res. A* 102, 2793–2804. doi:10.1002/jbm.a.34952

Uebersax, L., Mattotti, M., Papaloizos, M., Merkle, H.P., Gander, B., Meinel, L., 2007. Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF). *Biomaterials* 28, 4449–4460. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.034

Varkey, M., Gittens, S.A., Uludag, H., 2004. Growth factor delivery for bone tissue repair: an update. *Expert Opin. Drug Deliv.* 1, 19–36. doi:10.1517/17425247.1.1.19

Wang, A., Ao, Q., Cao, W., Yu, M., He, Q., Kong, L., Zhang, L., Gong, Y., Zhang, X., 2006. Porous chitosan tubular scaffolds with knitted outer wall and controllable inner structure for nerve tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* 79, 36–46. doi:10.1002/jbm.a.30683

Wittmer, C.R., Claudepierre, T., Reber, M., Wiedemann, P., Garlick, J.A., Kaplan, D., Egles, C., 2011. Multifunctionalized electrospun silk fibers promote axon regeneration in central nervous system. *Adv. Funct. Mater.* 21, 4202. doi:10.1002/adfm.201190103

Yan, H., Zhang, F., Chen, M.B., Lineaweaver, W.C., 2009. Chapter 10: Conduit luminal additives for peripheral nerve repair. *Int. Rev. Neurobiol.* 87, 199–225. doi:10.1016/S0074-7742(09)87010-4

Yang, Y., Chen, X., Ding, F., Zhang, P., Liu, J., Gu, X., 2007. Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Biomaterials* 28, 1643–1652. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.12.004

Yao, L., Billiar, K.L., Windebank, A.J., Pandit, A., 2010. Multichanneled collagen conduits for peripheral nerve regeneration: design, fabrication, and characterization. *Tissue Eng. Part C Methods* 16, 1585–1596. doi:10.1089/ten.TEC.2010.0152

Yucel, D., Kose, G.T., Hasirci, V., 2010. Tissue engineered, guided nerve tube consisting of aligned neural stem cells and astrocytes. *Biomacromolecules* 11, 3584–3591. doi:10.1021/bm1010323

Zeng, C.-G., Xiong, Y., Xie, G., Dong, P., Quan, D., 2014. Fabrication and evaluation of PLLA multichannel conduits with Nanofibrous microstructure for the differentiation of NSCs in vitro. *Tissue Eng. Part A* 20, 1038–1048. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0277

Zhang, X., Baughman, C.B., Kaplan, D.L., 2008. In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth. *Biomaterials* 29, 2217–2227. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.022

Zhang, X., Reagan, M.R., Kaplan, D.L., 2009. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 988–1006. doi:10.1016/j.addr.2009.07.005

Zhao, Y., Zhao, W., Yu, S., Guo, Y., Gu, X., Yang, Y., 2013. Biocompatibility evaluation of electrospun silk fibroin nanofibrous mats with primarily cultured rat hippocampal neurons. *Biomed. Mater. Eng.* 23, 545–554. doi:10.3233/BME-130775

# Transition

---

Dans ce quatrième article, nous décrivons un nouveau biomatériau sous forme de conduit nerveux à base de nanofibres de soie alignées et bifonctionnalisées afin de permettre la fabrication de substituts biomimétiques pour la réparation et la régénération nerveuse. Les conduits nerveux à base de nanofibres de soie bi-fonctionnalisées de NGF et CNTF se composent de plusieurs canaux longitudinalement orientés. Cette caractéristique architecturale imite la structure fasciculaire et la matrice extracellulaire fibreuse qui se trouvent dans un nerf natif. Nos résultats démontrent pour la première fois, la possibilité de concevoir et caractériser un conduit nerveux bifonctionnalisé, constitué uniquement de nanofibres électrofilées formant des canaux orientés et alignés le long du conduit. Par ailleurs, la fonctionnalisation de la nanofibres de fibroïne de soie n'a pas d'incidence sur sa structure secondaire et sur sa cristallisation. La soie fonctionnalisée conserve ces propriétés chimiques et mécaniques. Les tests ELISA effectués sur les conduits montrent l'absence de la libération des facteurs de croissance. Finalement, le conduit biomimétique développé affiche un comportement mécanique comparable à celui du nerf sciatique de rat. Nos tubes de soie bioactifs représentent donc une nouvelle et prometteuse approche pour la régénération nerveuse périphérique.

Un conduit nerveux artificiel pertinent pour la régénération nerveuse doit permettre la régénération du tissu nerveux et cette régénération doit être fonctionnelle. La fonctionnalité de la régénération nerveuse se définit par la propagation du potentiel d'action à travers l'implant et la réinnervation des organes cibles.

Pour vérifier et valider l'efficacité de nos conduits nerveux développés, ces derniers ont été implantés au niveau du nerf sciatique du rat Sprague Dawley. Le dernier article de mon travail de thèse repose sur la reprise fonctionnelle de la marche du rat suite à l'implantation des conduits nerveux bifonctionnalisés. La reprise fonctionnelle de la marche est observée et analysée par une étude de la locomotion. Enfin, une étude histologique des tissus nerveux est réalisée pour observer la colonisation des cellules à l'intérieur des implants.

## ARTICLE V

### **Hindlimb kinematics during over ground locomotion in rats following sciatic nerve injury**

Clint Hansen<sup>1,\*</sup>, Tony M Dinis<sup>1,2</sup>, Guillaume Vidal<sup>1</sup>, Khalil Ben-Mansour<sup>1</sup>, PierreDevos<sup>1</sup>,  
Damien Bresson<sup>1</sup>, Christophe Egles<sup>1,3</sup> and FrédéricMarin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), UMR CNRS 7338, Université de Technologie de Compiègne, Rue Roger Couttolenc, CS 60319 - 60203 Compiègne Cedex, France*

<sup>2</sup> *Biomedical engineering, Science & Technology Center, 4 Colby Street, Tufts University, Medford, MA 02155, USA*

<sup>3</sup> *Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Tufts University, School of Dental Medicine, 1 Kneeland St, Boston, MA 02111, USA*

\*Corresponding author:

Clint Hansen

UMR CNRS 7338, Laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (BMBI), Université de Technologie de Compiègne, France

Email [\*\*clint.hansen@utc.fr\*\*](mailto:clint.hansen@utc.fr)

Phone : + 33 3 44 23 43 67

## Abstract

A complete recovery from peripheral nerve injuries remains unsatisfactory until today. One possibility to promote peripheral nerve regeneration is the grafting of new biomaterials as conduit nerve guidance. We investigated if an artificial silk-based nerve graft helps to recover the nerve itself and also helps to regain motor functionality. Specifically, we examined whether nerve liaison (NL) and a loss of motor functionality influence the kinematic walking patterns of rats and if over a six-month healing period the motor functionality returns. Rats were operated, and the sciatic nerve was substituted by an artificial silk guide. After a recovery period of three and six months, the rats' kinematics were analyzed during an over ground walking task to evaluate the nerve recovery progress. The purpose of this study is to test two hypotheses: 1) nerve growth due to liaison can be improved using artificial nerve guides; 2) the nerve recovery will have an impact on the walking patterns of the rat during the recovery period. Our global results showed a histological nerve recovery and statistically significant differences between the operated and the non-operated side, but no differences in the walking patterns of the rats during the recovery period. The physical nerve recovery did not influence the locomotion parameters of the rats; however, compared to the control group, significant differences were uncovered. Together, the results showed that over the rehabilitation time, the nerve recovers but has not yielded in changes in the walking patterns of the operated rats.

**Keywords:** nerve liaison, artificial nerve guides, kinematics, rats, biomechanics

## Introduction

Locomotion and posture are based on muscular actions that are controlled by the nervous system (Canu et al., 2005). As soon as the peripheral nervous system (PNS) is damaged, the control of the movement is affected and injuries, e.g. nerve liaison (NL), result in a loss of motor functionality (Bareyre et al., 2009; Nakamura et al., 1996). Sciatic nerve injuries may cause long term health problems with restricted activity and life-long disabilities (Campbell, 2008).

However, the repair of peripheral nerve lesions, especially after the loss of a full segment of the nerve, remains a challenge in reconstructive surgery (Biazar et al., 2010a, 2010b). Indeed, when a peripheral nerve is sectioned, the axonal segment distal to the lesion site undergoes Wallerian degeneration (Stoll et al., 2002; Waller, 1850), while the proximal segment is able to regenerate axonal sprouts that can eventually re-establish motor and sensory nerve function. Improvements in nerve injury treatments have been reported, and the treatments range from drug-induced therapies to biological tissue engineering (Rajaram et al., 2012). One of the major challenges in regenerative neurobiology is to design suitable biomimetic nerve guides, and multiple techniques have been developed to design fibrous scaffolds as tissue substitutes (Marquardt and Sakiyama-Elbert, 2013).

In recent years, we have witnessed the development of increasingly sophisticated bioengineered nerve graft substitutes composed of synthetic or natural polymer-based nerve guides. Silk is a well known material used by physicians as sutures for decades (Biazar et al., 2010a). The sericin-free silk fibroin fiber exhibits excellent biocompatibility both in vitro and in vivo (Campbell, 2008). Electrospinning has emerged as a useful technique due to the ability to generate fibers similar to the scale of fibrous structures of native extracellular matrices (ECM) (Lewin, 2006). Silk fibroin electrospun nanofibers have shown good biocompatibility and circularity to enhance peripheral nerve regeneration (T. M. Dinis et al., 2014; Duval et al., 2014). Different types of bioactive molecules, such as growth factors and adhesive molecules, have been incorporated into scaffolds of electrospun nanofibers to promote peripheral nerve regeneration (Altman et al., 2003). Using the electrospinning technique, we developed biofunctional silk nanofibers with Nerve Growth Factor (NGF) and Ciliary Neuro Trophic Factor (CNTF) to stimulate nerve outgrowth by artificial nerve grafting

(T. M. Dinis et al., 2014). In the case of artificial nerve replacements, the variety of surrogates is wide and the histological results are not consistent. A variety of treatments has been proposed over the last decade; however, the efficiency of the treatment is usually shown by histological experiments and not motor functionality tests.

Studying the locomotion as a motor functionality is common and well-documented in human and animal research areas to objectively quantify locomotion parameters. Locomotion is generally analyzed using temporal-spatial parameters and joint angles to evaluate pathological gait. Gait patterns are analyzed by normalizing and averaging data from a number of isolated and independent strides (Pereira et al., 2006). In rat models, both over ground (Kloos et al., 2005; Kunkel-Bagden et al., 1993) and treadmill walking (Bouët et al., 2004) were studied to analyze hindlimb joint kinematics and temporal and spatial measurements (Pereira et al., 2006).

We developed a new multifunctional silk-based material to support and promote PNS nerve regeneration in a rat model which has already satisfied in vitro biocompatibility test. The aim of this study is to focus now on the demonstration of the nerve tissue in-vivo regeneration after a nerve injury on an animal model by motor functionality tests based on the analysis of gait patterns and histological observations. We hypothesize differences in the control of posture and locomotion according to control group and healing time.

## **Materials and methods**

### **1. Experimental animals**

Fourteen 2 month-old Sprague Dawley male rats (Harlan, Compiègne, France) weighing approximately 200g-250g were used in this study. All animals were kept in ventilated, humidity and temperature-controlled rooms with a 12/12-hours light/dark cycle. They were housed on sawdust and received food pellets and water ad lib. All procedures were performed with the approval of the Veterinary Authorities of France in accordance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010:63/UE. The specimens were divided into two groups, one control group (six specimens) and one group with a NGF/CNTF-functionalized silk implant as nerve prosthesis (eight specimens).

## 2. Electrospinning and design of the 3D silk tube

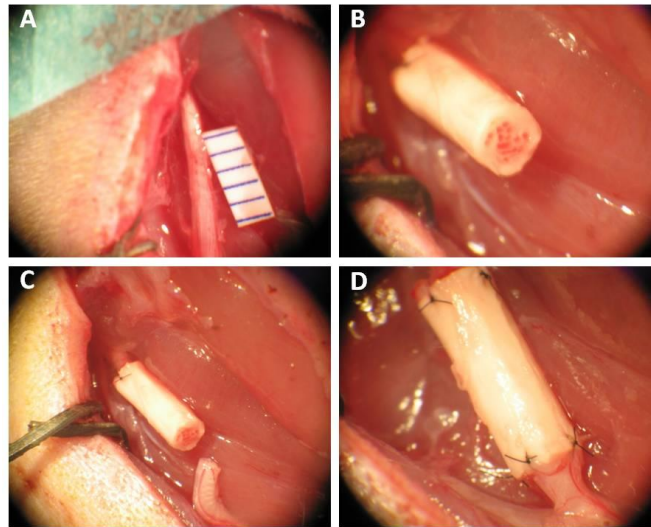
The full design procedure of NGF/CNTF-functionalized silk implant, including electrospinning, was recently presented by (T. Dinis et al., 2014b) (for detailed information see (T. Dinis et al., 2014b)). Briefly, silk fibroin solution (functionalized) was delivered through a 16G stainless-steel capillary at a constant flow rate of 15  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  with a syringe pump (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The syringe needle was set at 12 kV voltage with a high voltage power supply (Gamma High Voltage Research ES-30P, Ormond Beach, FL, USA) and mounted at the center of a 10 cm diameter aluminium plate. The distance between the needle and the ground collector was set to 15 cm. Fibroin functionalized silk was spun during 90 min on a rotating mandrel (rotation speed: 9.5m.s<sup>-1</sup>). After 90 min of electrospinning, the electrospun fibers were removed from the mandrel and rolled up at 360° about 50 times using Teflon sticks (0.3 mm diameter) in order to get a final tube of about 3 mm diameter. All of the electrospun fibroin with sticks were treated by water vapor annealing overnight to obtain a water insoluble silk conduit (Liu et al., 2012). Teflon sticks were removed after the water vapor annealing process using sterile PBS solution. All tubes were standardized at a length of 1 cm with 1.1 mm average diameter in accordance with the size of a rat sciatic nerve (T. Dinis et al., 2014a).

## 3. Animals and surgical procedure

As nerve injury, a sciatic nerve injury model is performed. The specific surgical procedure is completed as described as follows: The NGF/CNTF-functionalized silk implant was wetted overnight at 4°C in sterile PBS. The animals were deeply anesthetized with a combination of ketamine (60 mg/kg) and xylazin (6 mg/kg). Surgery was performed on the rat's right leg under aseptic condition and with the aid of an operating microscope (Stemi SV8, Zeiss). A 5 mm defect in the sciatic nerve created by surgical removal of the nerve tissue with micro scissors after local application of lidocain (2mg/mL) was repaired with the nerve conduits (**Figure 1-A**). The NGF/CNTF-functionalized silk implant was interposed into the 5 mm nerve defects. The distal and proximal nerve ends were then anchored to the conduit by 10–0 nylon micro sutures (Ethicon, Cincinnati, Ohio, USA) (**Figure 1-D**). The skin was sutured with absorbable 4-0 nylon sutures (Ethicon, Cincinnati, Ohio, USA). Postoperative care included intra peritoneal injection of xylazin (10mg/kg) once a day for up to three days.



Animals were weighed daily for the first seven days post surgery and then weighed weekly to document the postoperative recovery.



**Figure 1: *In vivo* implantation of the NGF/CNTF functionalized silk implant for sciatic nerve Reconstruction.**

*A 5 mm sciatic nerve section is removed on the right leg of the rat (A), the fibroin tube is first sutured to the proximal end of the nerve (B), the scaffold is carefully placed in front of the distal extremity of the sectioned sciatic nerve (C) and then sutured without turning the nerve (D). For details see material and methods*

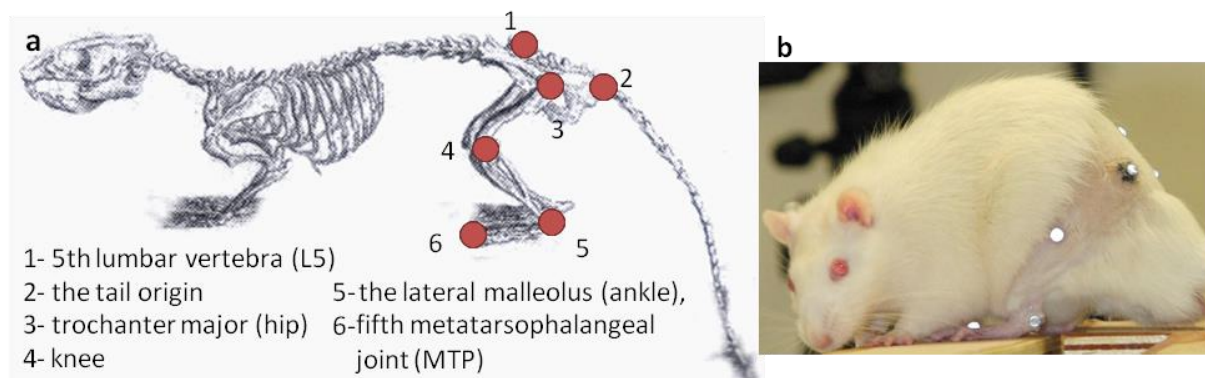
#### **4. Training procedure**

To evaluate the nerve regeneration of the animal a motion analysis was performed after a recovery period of three and six months postoperatively. Two weeks prior to the data collection, each animal was trained weekly to walk consistently on a wooden runway (150cm×10cm×1cm) at its usual walking speed. Ten minute-long training sessions were given once a week with nutrition used as positive reinforcement to improve performance. This training procedure was achieved on the control and the implant group.

#### **5. Kinematic recording**

For the motion capture session, a seventeen camera motion capture system (T160, Vicon motion systems Inc., Oxford, UK) was used to record the locomotion of the rat at a

rate of 100 Hz. Hair was clipped around the hindlimbs to improve the marker placement for analysis. The same operator performed all marker placements to avoid inter-tester variability. Rats were equipped with ten hemispheric markers ( $\varnothing=3\text{mm}$ ) covered by adhesive infrared-reflective paper (3M Scotchlite, Minnesota, USA) according to the following anatomic landmarks: 5th lumbar vertebra, the tail origin, the trochanter major, (hip), the knee, the lateral malleolus of the ankle and fifth metatarsophalangeal joint (MTP) (**Figure 2**). The global reference frame was chosen such that the x axis pointed in the anterior direction, the y axis in the upward direction, and the z axis laterally to the right. The 3D positions of these markers were recorded when the animal walked on the wooden runway.



**Figure 2: Position of the markers to evaluate the motor functionality.**

*(a) Skeletal anatomical landmarks rat, (b) picture of a rat with ten hemispheric markers*

As post processing, the stride length, foot clearance (König et al., 2014), flexion extension angles of the hip, knee and ankle (Canu et al., 2005); and cyclograms (Kutilek et al., 2013; Pereira et al., 2006) were computed with Matlab's routine (MathWorks, Inc., Natick, MA). The stride length was defined as the distance between the fifth metatarsal head markers of the hindlimb in two consecutive steps. Stride clearance was defined as the maximal height of the fifth metatarsal head marker of the hindlimb during each step and normalized to body height. Based on the joint angles, the range of motion was calculated for each joint as the maximum value between the flexed and the extended position during the walking trials. Cyclograms were generated to inspect the interjoint coordination (Pereira et al., 2006). The cyclogram perimeters were calculated as the sum of the length of two successive connecting points of the cyclogram.

## **6. General histological evaluation**

Once the motion capture sessions were achieved (six months after grafting), histology was performed to observe the nerve regeneration inside the implants. The implants were dissected from the animals, including the surrounding soft tissue, and fixed in 10% buffered formalin solution for two days. Each dissected implant was embedded in a paraffin block and sectioned into 5  $\mu\text{m}$ -thick slices with a microtome (Lemardeley, Paris, France). Then, the sections from the middle of the implant were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and visualized with a microscope (Leica Microsystems, Jena, Germany). This was done for six samples per implant in an attempt to understand what cellular events may be occurring within and around the tubes *in vivo*.

## **7. Statistical analysis**

For statistical analysis, a univariate measures analysis of variance (ANOVA) and student t-tests were used to compare the differences in the temporal/spatial and kinematic parameters (Mean $\pm$ standard deviation (S.D.) values for all of the measured variables are reported) with the STATISTICA software package (StatSoft, Inc. Maisons-Alfort, France). This analysis was followed by a  $p < 0.05$  level of statistical significance and by Tukey HSD post hoc comparisons (Moore and McCabe, 2006).

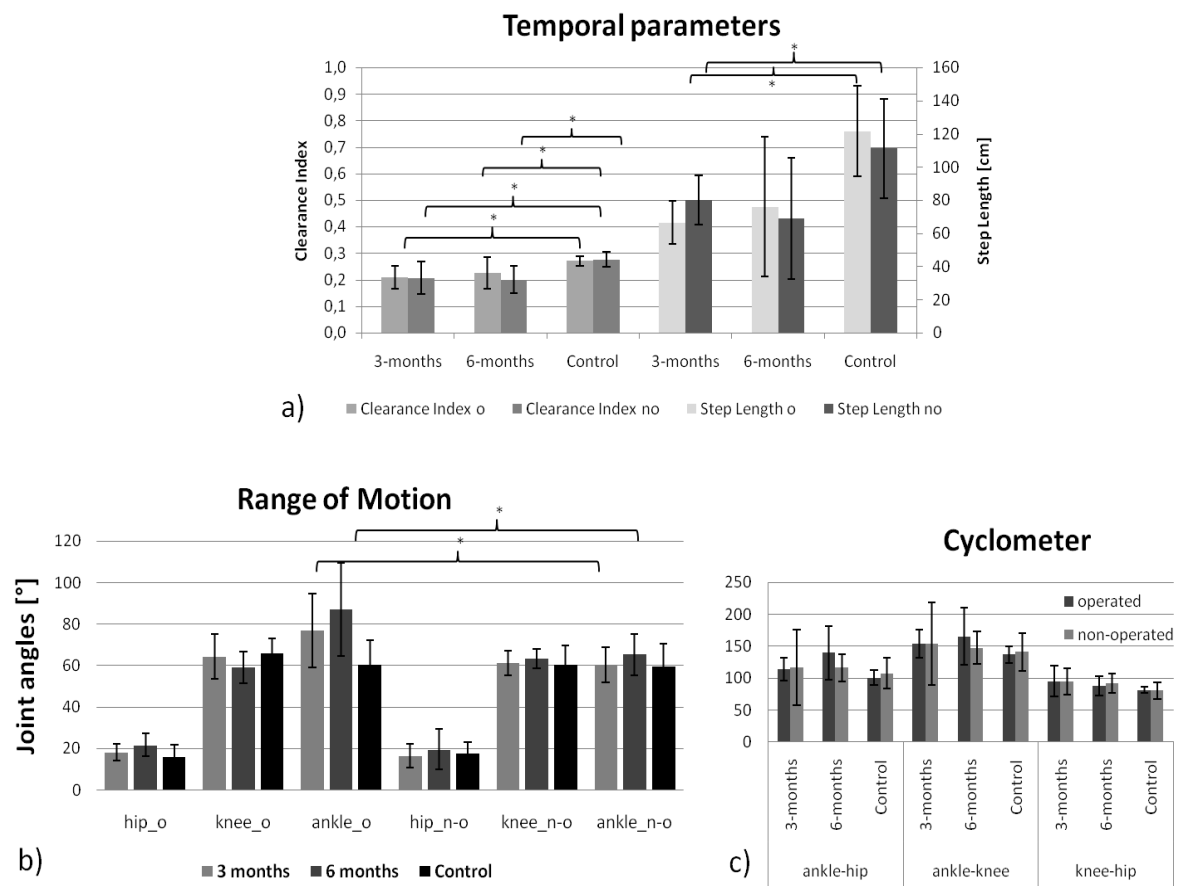
## **Results**

### **1. Global**

All operated rats were able to perform the motion capture sessions, and the kinematics of hind limbs during the walking task were recorded at three months and six months after surgery. Even though the operated group had a slightly asymmetrical walking pattern, the animals demonstrated well-coordinated and reproducible walking sequences during the experiment without any sign of discomfort or motor impairments.

### **2. Step length& Clearance**

Differences between the operated and non-operated side were uncovered for the step length and clearance ( $p < 0.05$ ), except during the six months session for the clearance ( $t = 2.2$ ;  $p > 0.05$ ). The average step length of the walking trials did not differ during the two experimental sessions ( $p > 0.05$ ), but there were significant differences between both sessions and the control group ( $p < 0.05$ ) were uncovered (**Figure 3a**).



**Figure 3: (a) Temporal parameters; (b) Range of motion; (c) Cyclometer**

### 3. Range of Motion

For the range of motion parameters (**Figure 3b**), an ANOVA combining three groups (3 months group vs. 6 months group vs. Control group) on two sides (operated vs. non-operated) for the three joints (Hip vs. Knee vs. Ankle) was achieved. The average range of motion values of the walking trials did not differ during the two experimental sessions, nor did they differ from the control group ( $F(2,14) = 2.87$ ,  $p > 0.05$ ). Differences were found

between the operated and non-operated side ( $F(1,7) = 16.09, p < 0.05$ ), as well as among the range of motion of the angles itself ( $F(2,14) = 176.31, p < 0.05$ ). Post hoc comparisons only unveiled statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) for the ankle joints between the operated and the non-operated side (see **Figure 3**).

An ANOVA combining three groups (S1 vs S2 vs C) \* two sides (operated vs non-operated) and three joints (Hip vs Knee vs Ankle) was then applied on the range of motion data.

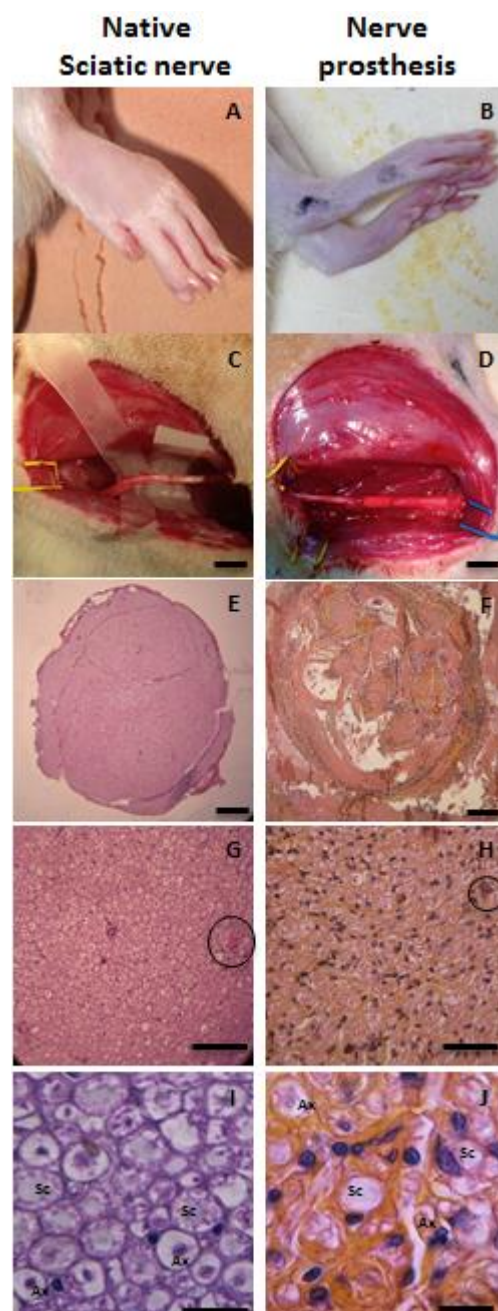
#### **4. Inter-joint coordination**

For the inter-joint coordination parameter (cyclogram), an ANOVA combining three groups (three months group vs. six months group vs. control) on the two sides (operated vs. non-operated) and three cyclograms (hip-knee vs. hip-ankle vs. knee-ankle) was then applied on the perimeter of the cyclograms. The averaged cyclogram perimeter of the walking trials neither differed among the three month and six month groups and the control group ( $F(1,7) = 0.09, p > 0.05$ ), nor between the operated and non-operated side ( $F(2,14) = 0.87, p > 0.05$ ). However, a significant effect was found between the cyclograms ( $F(2,14) = 72.13, p < 0.05$ ), but no difference was found between the groups ( $F(2,14) = 0.87, p > 0.05$ ). No differences were uncovered when comparing the operated and the non-operated sides ( $p > 0.05$ ) (see **Figure 3c**).

#### **5. Histological assessment**

As histological assessment, qualitative observations were achieved. Regeneration from silk based conduit grafts was confirmed by histological analysis after six months (Figure 4). The morphology of the rat paw was also compared with the control group. Paws with the nerve implant were identical, presenting only slightly less separated toes (**Figure 4A,B**). After six months, the nerves regenerated through the native nerve or silk conduit were dissected for histological assessment (**Figure 4C,D**). Silk nerve grafts were well innervated and covered by a very thin membrane. A thin membrane of fibrous tissue grew and covered the implanted artificial nerve grafts. After histological preparation, we could notice the organization of nerve tissue into the nerve or the graft nerve. The nerve was successfully connected and bridged (**Figure 4E, F**). Native nerves present at least three separated

fascicular-like regions, whereas our grafts showed even more fascicular-like regions. By increasing the resolution of these pores, we saw that a collagen membrane colonizing the silk fibroin material showed the presence of fibroblasts cells which are also found in native nerves (**Figure 4G, H**). Nerve cells were also observed and identified by H&E staining thanks to their morphologies (**Figure 4I, J**). Schwann cells and axons surrounded by myelin are present inside our grafts, thus demonstrating a regeneration of our silk conduit grafts by the neural tissue. These histological observations demonstrated the axonal growth and nerve tissue advancement through the entire conduit.



**Figure 4: Histological analysis (H&E) of sciatic nerve and silk conduits following implantation into adult male rats after 6 months.**

*Evaluation of native sciatic nerve (left) and nerve silk graft (right). (A,B) rat paw pictures, (C,D: scale bar 1cm) sciatic nerve pictures, (E,F: scale bar 150 $\mu$ m) sciatic nerve observation by optic microscopy, (G,H: scale bar 30 $\mu$ m) pores from sciatic nerve showing blood vessels, (I,J scale bar 5 $\mu$ m) cell population: schwann cells (**Sc**) and axons surrounded by myelin (**Ax**).*

## **Discussion**

### **1. General**

The aim of the present work was to demonstrate in-vivo nerve regeneration by NGF/CNTF-functionalized silk implant not only from a structural point of view with histological observation, but also from a functional point of view with a locomotion motion analysis. In addition, with two postoperative sessions at three months and six months, we also expected to analyze the healing process. Our results contrast themselves. First, the locomotion motion analysis showed that the group with implants never achieved walking patterns similar to those of the control group. Moreover, there were not significant differences between sessions at three months and six months postoperative, which demonstrated a stationary state in the healing process which could be interpreted as poor nerve tissue regeneration. On the contrary, histological observations showed the presence of nerve cells, which demonstrates that our silk artificial substitutes graft enhance nerve tissue regeneration.

Regarding the influence of the healing time, our experimental outcomes do not demonstrate a significant change in kinematic parameters or differences in the angular variability of the joints during the walking experiments for the group with implants. Even though this result seems negative, it does not explain the lack of motor functionality in the operated limb of the rats. With human experimentation, three-dimensional kinematic gait is used as performance indicator of a deficit or a rehabilitation process of the neuromusculoskeletal system (Rezgui et al., 2013b) and used as clinical tools to diagnosis. However, it was also demonstrated that healthy subjects could voluntarily modify the gait pattern to mimic pathological posture, thereby altering kinematical parameters (Rezgui et

al., 2013a). In this study, we performed an investigation with rats, and it is well known that motion capture on an animal with neuromuscular deficit is difficult (Johnson et al., 2012). Global motor control strategies are known to have large individual differences (Latash et al., 2002); rats may heal differently, and, therefore, various sensori-motor strategies can exist among rats (Garnier et al., 2008). In our case, we also clearly observed compensation strategy with unconventional walking patterns. Another explanation of the insignificant difference between the three month and six month sessions could be the growth. The growth of the rat and the lack of physical activity result in an increase of body weight and an increased fat tissue percentage (Filipe et al., 2006). Consequently, these physical modifications modified the motor strategies (Garnier et al., 2008) and also increased the soft tissue artifacts (Filipe et al., 2006). This could account for the slight kinematic modifications due to the healing process. Nevertheless, the evaluation of rat locomotion performance by a 3D motion analysis system has been proven to provide maximal precision and accuracy of joint angles (Karakostas and Granholm, 2014), and our results on the control group are in accordance with the literature (Garnier et al., 2008; Perrot et al., 2011). Our study only suggests that the regenerative nerve did not reach the control group from a functional point of view.

On the contrary, the histological observations are very positive from a cellular point of view. Six months after the implantation, the silk nerve conduit was stable; this is an important factor for axon regeneration and growth. The nerve bundles surrounded by the myelin sheath are immersed in a matrix composed of capillaries and connective tissue. Furthermore, Schwann cells were observed around the axons forming dark spots. These cells wrap around the axon and were found in all parts of the peripheral nervous system. These findings were confirmed by the presence of H&E staining. The entire nerve graft was completely colonized by extensions of neurons and glial cells. These observations are expected because Fibroin silk was already identified as a promising biomaterial to design nerve prosthesis due to its biocompatibility, ability to hold sutures, interesting mechanical properties and ability to biodegrade into naturally metabolized products. In addition, some studies reported that functionalized biomaterials with growth factors enhance neurite extension due to migration and growth of Schwann cells on the biomaterials (Ahmed et al., 2003; Bryan et al., 2004; Fine et al., 2002). However, our observations at six months showed



an initiation of nerve recovery inside the NGF/CNTF-functionalized silk implant. NGF is well known to stimulate sensory neurons, but its action against motor neuron is unknown (Elliott and Snider, 1996). That could be explanation as to why the tissue regenerated without complete functional recovery.

## **Conclusion**

The present study is original because it coordinated functional and structural investigations on nerve regeneration by locomotion motion capture and histological observations. It requires interdisciplinary skills and offers cross-analysis. The histology results were promising, whereas the motion analysis results were contradictory. This highlights the complex relationship between the nerve regeneration process and motor functional recovery. Future studies will focus on how to tune the function of the silk implant to target motor neuron, as well as how the rehabilitation will influence motor functionality.

## **Acknowledgment**

This work was supported by a grant of the region Picardie through the Silknerve project and the Tissue Engineering Resource Center (TERC, P41 EB002520) from Tufts University. Tony M. Dinis received a fellowship from the French Ministry of Science and Technology.

## References

- Ahmed, Z., Underwood, S., Brown, R.A., 2003. Nerve guide material made from fibronectin: assessment of in vitro properties. *Tissue Eng.* 9, 219–231. doi:10.1089/107632703764664693
- Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D.L., 2003. Silk-based biomaterials 401–416.
- Bareyre, F.M., Kerschensteiner, M., Raineteau, O., Mettenleiter, T.C., Weinmann, O., Schwab, M.E., 2009. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat. Neurosci.* 7, 269–277.
- Biazar, E., Khorasani, M., Montazeri, N., Pourshamsian, K., Daliri, M., T, M.R., B, M.J., Khoshzaban, A., K, S.H., Jafarpour, M., Roviemiab, Z., 2010a. Types of neural guides and using nanotechnology for peripheral nerve reconstruction 839–852.
- Biazar, E., Khorasani, M.T., Zaeifi, D., 2010b. Nanotechnology for peripheral nerve regeneration 1–23.
- Bouët, V., Borel, L., Harlay, F., Gahéry, Y., Lacour, M., 2004. Kinematics of treadmill locomotion in rats conceived, born, and reared in a hypergravity field (2 g). Adaptation to 1 g 207–216.
- Bryan, D.J., Tang, J.B., Doherty, S.A., Hile, D.D., Trantolo, D.J., Wise, D.L., Summerhayes, I.C., 2004. Enhanced peripheral nerve regeneration through a poled bioresorbable poly(lactic-co-glycolic acid) guidance channel. *J. Neural Eng.* 1, 91–98. doi:10.1088/1741-2560/1/2/004
- Campbell, W.W., 2008. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin. Neurophysiol.* 119, 1951–1965. doi:10.1016/j.clinph.2008.03.018
- Canu, M.-H., Garnier, C., Lepoutre, F.-X., Falempin, M., 2005. A 3D analysis of hindlimb motion during treadmill locomotion in rats after a 14-day episode of simulated microgravity. *Behav Brain Res* 309–321.
- Dinis, T., Elia, R., Dermingy, Q., Vidal, G., Denoëud, C., Kaplan, D., Marin, F., 2014a. 3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration. *JMBBM* accepted.
- Dinis, T., Vidal, G., José, R., Fitzpatrick, C., Marin, F., 2014b. Complementary Effects of Two Growth Factors in Multifunctionalized Silk Nanofibers for Nerve Reconstruction. *PlosOne* accepted.
- Dinis, T.M., Elia, R., Vidal, G., Auffret, A., Kaplan, D.L., Egles, C., 2014. Method to form a fiber/growth factor dual-gradient along electrospun silk for nerve regeneration.

- Duval, J.-L., Dinis, T., Vidal, G., Vigneron, P., Kaplan, D.L., Egles, C., 2014. Organotypic culture to assess cell adhesion, growth and alignment of different organs on silk fibroin n/a–n/a.
- Elliott, J.L., Snider, W.D., 1996. Motor neuron growth factors. *Neurology* 47, 47S–53S. doi:10.1212/WNL.47.4\_Suppl\_2.47S
- Filipe, V.M., Pereira, J.E., Costa, L.M., Maurício, A.C., Couto, P.A., Melo-Pinto, P., Varejão, A.S.P., 2006. Effect of skin movement on the analysis of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats 55–61.
- Fine, E.G., Decosterd, I., Papaloizos, M., Zurn, A.D., Aebischer, P., 2002. GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur. J. Neurosci.* 15, 589–601. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.01892.x
- Garnier, C., Falempin, M., Canu, M.-H., 2008. A 3D analysis of fore- and hindlimb motion during locomotion: comparison of overground and ladder walking in rats 57–65.
- Johnson, W.L., Jindrich, D.L., Roy, R.R., Edgerton, V.R., 2012. Quantitative metrics of spinal cord injury recovery in the rat using motion capture, electromyography and ground reaction force measurement. *J. Neurosci. Methods* 206, 65–72.
- Karakostas, T., Granholm, A.-C., 2014. Motion capture and associated novel measurement devices for movement function in humans and animal models. *J. Neurosci. Methods* 1–2.
- Kloos, A.D., Fisher, L.C., Detloff, M.R., Hassenzahl, D.L., Basso, D.M., 2005. Stepwise motor and all-or-none sensory recovery is associated with nonlinear sparing after incremental spinal cord injury in rats 251–265.
- König, N., Singh, N.B., von Beckerath, J., Janke, L., Taylor, W.R., 2014. Is gait variability reliable? An assessment of spatio-temporal parameters of gait variability during continuous overground walking. *Gait Posture* 615–617.
- Kunkel-Bagden, E., Dai, H.N., Bregman, B.S., 1993. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats 153–164.
- Kutilek, P., Viteckova, S., Svoboda, Z., Smrcka, P., 2013. Kinematic quantification of gait asymmetry in patients with peroneal nerve palsy based on bilateral cyclograms 244–250.
- Latash, M.L., Scholz, J.P., Schönner, G., 2002. Motor control strategies revealed in the structure of motor variability 26–31.
- Lewin, M., 2006. *Handbook of Fiber Chemistry*, Third Edition. CRC Press.
- Liu, W., Thomopoulos, S., Xia, Y., 2012. Electrospun nanofibers for regenerative medicine 10–25.
- Marquardt, L.M., Sakiyama-Elbert, S.E., 2013. Engineering peripheral nerve repair 887–892.

- Moore, D.S., McCabe, G., 2006. Introduction to the Practice of Statistics. W. H. Freeman and Company.
- Nakamura, M., Fujimura, Y., Yato, Y., Watanbe, M., 1996. Muscle reorganization following incomplete cervical spinal cord injury in rats. *Spinal Cord* 34, 752–756.
- Pereira, J.E., Cabrita, A.M., Filipe, V.M., Bulas-Cruz, J., Couto, P.A., Melo-Pinto, P., Costa, L.M., Geuna, S., Maurício, A.C., Varejão, A.S.P., 2006. A comparison analysis of hindlimb kinematics during overground and treadmill locomotion in rats 212–218.
- Perrot, O., Laroche, D., Pozzo, T., Marie, C., 2011. Kinematics of obstacle clearance in the rat 241–249.
- Rajaram, A., Chen, X.-B., Schreyer, D.J., 2012. Strategic design and recent fabrication techniques for bioengineered tissue scaffolds to improve peripheral nerve regeneration 454–467.
- Rezgui, T., Megrot, F., Fradet, L., Marin, F., 2013a. On the imitation of CP gait patterns by healthy subjects. *Gait Posture* 38, 576–81.
- Rezgui, T., Megrot, F., Marin, F., 2013b. Musculoskeletal modelling of cerebral palsy children: sensitivity analysis of musculoskeletal model parameter's values for gait analysis. *Comput Methods Biomech Biomed Engin S1*, 155–157.
- Stoll, G., Jander, S., Myers, R.R., 2002. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation 13–27.
- Waller, A., 1850. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres 423–429.

## **Chapitre 4 Conclusion et perspectives**

---

Au sein d'une lésion du système nerveux périphérique, les cellules s'organisent et prolifèrent afin de produire les facteurs de croissance indispensables à la survie des neurones. Lorsque la distance entre les deux extrémités lésées est trop importante, la repousse axonale est limitée voire inexistante. Dans ce cas, la greffe d'un nerf autologue améliore la reconstruction et la régénération nerveuse. Cette technique présentant de nombreux désavantages, le génie tissulaire propose de nouvelles stratégies qui pourraient dans un futur proche les remplacer. L'une de ces stratégies tissulaires repose sur l'élaboration de substituts nerveux artificiels. Nous avons ainsi mis au point un tout nouveau guide artificiel favorisant la repousse et la régénération de nerfs périphériques. Ces travaux apportent une contribution notable au développement de modèles biomimétiques nerveux de soie. La création de ces conduits se définit par quatre critères clés :

- (1) La fabrication de nanofibres de soie biocompatibles permettant l'orientation des cellules qui composent le tissu nerveux.
- (2) La fonctionnalisation de ces nanofibres par différentes molécules bioactives stimulant une régénération nerveuse.
- (3) Le développement et la caractérisation physico-chimique de conduits nerveux tridimensionnelle.
- (4) L'évaluation *in vivo* du conduit nerveux implanté chez le rat.

La première partie de ce travail de thèse a permis de produire des nanofibres de soie et de démontrer le caractère biocompatible de la protéine pour des applications en régénération tissulaire. Les différents explants utilisés dans les cultures organotypiques n'ont montré aucun signe de cytotoxicité au contact des nanofibres. Cependant, les 10 organes utilisés lors de cette étude montrent une différence notable quant à l'adhésion cellulaire et la circularité des tissus sur les nanofibres. Les résultats obtenus prouvent que la soie sous forme de nanofibres alignées est un biomatériau biocompatible, approprié à la régénération du tissu nerveux. De nombreux tissus de l'organisme se définissent par une structure tissulaire orientée et alignée, telles que les muscles squelettiques, les tendons et les ligaments. C'est pourquoi, ces « scaffolds » de soie alignés s'avèrent très intéressants pour ces types de tissus.

Les propriétés mécaniques de la protéine de soie sont remarquables. De fait, la caractérisation et la structure de la fibroïne sont bien documentées dans la littérature. Les connaissances acquises sur cette protéine permettent de modifier sa surface afin d'améliorer son interaction avec les cellules. La fonctionnalisation spécifique et adaptée de ce matériau, par différentes molécules biologiques et chimiques, permet d'augmenter l'affinité et la stimulation d'une réponse cellulaire propre à chaque tissu.

Dans la deuxième partie de ce travail, les études *in vitro* témoignent des effets biologiques suite à cette fonctionnalisation. Lors d'une régénération nerveuse, le PNS s'appuie sur des repères structurels et chimiques de la matrice extracellulaire pour guider la repousse axonale et nerveuse. L'alignement des fibres sert de support à la repousse nerveuse, la fonctionnalisation fixe et guide les cellules nerveuses. Ces nanofibres sont fonctionnalisées par le NGF qui assure la survie et la croissance des neurones. Les cultures effectuées sur un « bigradient » de fibres et de NGF démontrent l'influence du chimiotactisme sur les neurones. Effectivement, la repousse axonale est uniquement observée dans le sens du gradient et s'accompagne de neurites beaucoup plus longs que lorsque le NGF est utilisé en concentration fixe. Cette méthode de fabrication innovante peut être utilisée afin de développer d'autres types de matrices électrofilées pour des applications plus larges dans l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative. La soie étant capable de se fonctionnaliser avec différents types de molécules, les gradients formés peuvent donc induire une stimulation et/ou une inhibition (si un facteur inhibiteur est ajouté au scaffold) d'un type cellulaire spécifique. Ainsi, plus d'une molécule peut être ajoutée à la solution de fibroïne de soie avant filage pour en développer une matrice : l'ajout de molécules inhibitrices de la migration des fibroblastes peut, par exemple, limiter la cicatrisation des tissus dans le cas d'une régénération.

De plus, en ajoutant plusieurs facteurs de croissance, on peut favoriser la régénération du tissu nerveux. Nous connaissons un large panel de facteurs de croissance qui incitent la repousse nerveuse, cependant la combinaison et le dosage adapté de ces facteurs neurotrophiques deviennent un élément clé pour permettre une régénération optimale. Dans cette idée, nous avons mis en évidence les effets complémentaires de deux facteurs de croissance neurotrophiques, le NGF et le CNTF. Nos résultats démontrent l'effet synergique de ces facteurs sur la croissance des neurones, la directionnalité des cellules, la

migration des cellules gliales et la stimulation neurotrophique guidée grâce au biomatériau de soie multifonctionnel.

Ces résultats *in vitro* ont permis de sélectionner les meilleures nanofibres pour développer et caractériser les futurs conduits nerveux bioartificiels, et les fibres bifonctionnalisées ont été utilisées pour la conception de prothèses nerveuses en 3D. De nombreux conduits ont déjà été développés, néanmoins, aucune méthode n'a permis la conception d'un conduit biomimétique qui respecte l'architecture 3D d'un nerf. Lors de cette troisième partie, nous avons mis au point un protocole de fabrication respectant la structure anatomique du tissu nerveux périphérique. Ce conduit, uniquement constitué de nanofibres de soie alignées, se compose de plusieurs canaux orientés et parallèles. La caractérisation de cette prothèse montre une libération prolongée des facteurs de croissance sans affecter les propriétés du polymère de soie. Le comportement mécanique du greffon est comparable à celui du nerf sciatique de rat, permettant l'utilisation de tels conduits pour les études *in vivo*.

Avant toute utilisation clinique chez l'homme, ces conduits font l'objet d'études approfondies sur les animaux. Le nerf sciatique du rat a été choisi comme modèle d'étude ici, car il est relativement accessible, facilement maniable et déjà utilisé dans des études *in vivo*. Cette dernière partie de l'étude met en évidence la régénération nerveuse *in vivo* à deux niveaux : fonctionnelle et tissulaire. Suite à la greffe d'un conduit artificiel de soie bifonctionnalisée, des tests de locomotion ont été effectués afin de vérifier une reprise fonctionnelle de la marche du rat. Les paramètres spatio-temporels, la coordination inter-joint et les paramètres cinématiques ont évolué vers une remise en état après 6 mois. De plus, les coupes histologiques observées témoignent de la colonisation des cellules qui composent le tissu nerveux dans l'implant sans signe d'inflammation. Cependant, la fonctionnalisation de nos greffons ne permet pas d'obtenir un recouvrement fonctionnel complet. En effet, le NGF permet la survie et la croissance des neurones mais son influence sur les neurones moteurs est assez limitée. La fonctionnalisation idéale du biomatériau est donc primordiale pour une régénération complète, c'est-à-dire tissulaire et fonctionnelle en agissant sur toutes les fibres nerveuses.



L'ensemble des résultats obtenus pendant ces trois ans de thèse sont très encourageants et nous incitent à améliorer la fonctionnalisation du guide de repousse par d'autres molécules. Les études *in vivo* restent préliminaires et nécessitent d'autres tests issus de la neurobiologie, tels que les tests électrophysiologiques afin de rendre compte de la fonctionnalité du guide nerveux. Toutefois, le support et le design innovant du conduit développé proposent un biomimétisme très semblable à l'architecture du tissu nerveux. Une fois optimisée, cette prothèse nerveuse artificielle sera un bon candidat pour le rétablissement total des fonctions motrices et sensitives à la suite d'un traumatisme nerveux périphérique.

## Chapitre 5 Références

---

- Ahmed, Z., Underwood, S., Brown, R.A., 2003. Nerve guide material made from fibronectin: assessment of in vitro properties. *Tissue Eng.* 9, 219–231. doi:10.1089/107632703764664693
- Airaksinen, M.S., Saarna, M., 2002. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 383–394. doi:10.1038/nrn812
- Aloe, L., 2011. Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first nerve cell growth factor. *Arch. Ital. Biol.* 149, 175–181. doi:10.4449/aib.v149i2.1377
- Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D.L., 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24, 401–416.
- Altman, G.H., Horan, R.L., Lu, H.H., Moreau, J., Martin, I., Richmond, J.C., Kaplan, D.L., 2002. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* 23, 4131–4141. doi:10.1016/S0142-9612(02)00156-4
- Ao, Q., Wang, A., Cao, W., Zhang, L., Kong, L., He, Q., Gong, Y., Zhang, X., 2006. Manufacture of multimicrotubule chitosan nerve conduits with novel molds and characterization in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A* 77, 11–18. doi:10.1002/jbm.a.30593
- Apel, P.J., Garrett, J.P., Sierpinski, P., Ma, J., Atala, A., Smith, T.L., Koman, L.A., Van Dyke, M.E., 2008. Peripheral nerve regeneration using a keratin-based scaffold: long-term functional and histological outcomes in a mouse model. *J. Hand Surg.* 33, 1541–1547. doi:10.1016/j.jhsa.2008.05.034
- Arai, T., Freddi, G., Innocenti, R., Tsukada, M., 2004. Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films. *J. Appl. Polym. Sci.* 91, 2383–2390. doi:10.1002/app.13393
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215. doi:10.1016/S0166-2236(98)01349-6
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., Herculano-Houzel, S., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541. doi:10.1002/cne.21974
- Balice-Gordon, R.J., Lichtman, J.W., 1994. Long-term synapse loss induced by focal blockade of postsynaptic receptors. *Nature* 372, 519–524. doi:10.1038/372519a0
- Ballance, C.A., Ballance, H.A., Stewart, P., 1903. REMARKS on the OPERATIVE TREATMENT of CHRONIC FACIAL PALSY of PERIPHERAL ORIGIN. *Br. Med. J.* 1, 1009–1013.
- Barde, Y.A., Edgar, D., Thoenen, H., 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1, 549–553.
- Belkas, J.S., Shoichet, M.S., Midha, R., 2004. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol. Res.* 26, 151–160. doi:10.1179/016164104225013798
- Bennett, D.L., Michael, G.J., Ramachandran, N., Munson, J.B., Averill, S., Yan, Q., McMahon, S.B., Priestley, J.V., 1998. A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 3059–3072.
- Beurden, H.E., Snoek, P.A.M., Hoff, J.W., Torensma, R., Maltha, J.C., Kuijpers-Jagtman, A.M., 2006. In vitro migration and adhesion of fibroblasts from different phases of palatal wound healing. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 14, 66–71. doi:10.1111/j.1743-6109.2005.00090.x
- Bhat, N.V., Ahirrao, S.M., 1983. Investigation of the structure of silk film regenerated with lithium thiocyanate solution. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 21, 1273–1280. doi:10.1002/pol.1983.170210504

- Bhatheja, K., Field, J., 2006. Schwann cells: Origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1995–1999. doi:10.1016/j.biocel.2006.05.007
- Biazar, E., Khorasani, M., Montazeri, N., Pourshamsian, K., Daliri, M., T, M.R., B, M.J., Khoshzaban, A., K, S.H., Jafarpour, M., Roviemiab, Z., 2010a. Types of neural guides and using nanotechnology for peripheral nerve reconstruction. *Int. J. Nanomedicine* 5, 839–852. doi:10.2147/IJN.S11883
- Biazar, E., Khorasani, M.T., Zaeifi, D., 2010b. Nanotechnology for peripheral nerve regeneration. *Int. J. Nano Dimens.* 1, 1–23.
- Biosciences, M., n.d. Overview of microglial cells in the CNS [WWW Document]. *Overv. Microglial Cells*. URL <http://www.mdbiosciences.com/blog/bid/76291/Overview-of-microglial-cells-in-the-CNS> (accessed 7.24.14).
- Birch, R., 2011. *Surgical Disorders of the Peripheral Nerves*. Springer Science & Business Media.
- Blumenfeld, H., 2010. *Neuroanatomy Through Clinical Cases*. Sinauer Associates.
- Bora, F.W., 1978. A comparison of epineurial, perineurial and epiperineurial methods of nerve suture. *Clin. Orthop.* 91–94.
- Bouët, V., Borel, L., Harlay, F., Gahéry, Y., Lacour, M., 2004. Kinematics of treadmill locomotion in rats conceived, born, and reared in a hypergravity field (2 g). Adaptation to 1 g. *Behav. Brain Res.* 150, 207–216. doi:10.1016/S0166-4328(03)00258-4
- Braga-Silva, J., 1999. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 24, 703–706. doi:10.1054/jhsb.1999.0276
- Brandt, J., Dahlin, L.B., Kanje, M., Lundborg, G., 1999a. Spatiotemporal progress of nerve regeneration in a tendon autograft used for bridging a peripheral nerve defect. *Exp. Neurol.* 160, 386–393. doi:10.1006/exnr.1999.7210
- Brandt, J., Dahlin, L.B., Lundborg, G., 1999b. Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 24, 284–290. doi:10.1054/jhsb.1999.0074
- Braun, S., Croizat, B., Lagrange, M.C., Warter, J.M., Poindron, P., 1996. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord--human muscle cocultures. *J. Neurol. Sci.* 136, 17–23.
- Bryan, D.J., Tang, J.B., Doherty, S.A., Hile, D.D., Trantolo, D.J., Wise, D.L., Summerhayes, I.C., 2004. Enhanced peripheral nerve regeneration through a poled bioresorbable poly(lactic-co-glycolic acid) guidance channel. *J. Neural Eng.* 1, 91–98. doi:10.1088/1741-2560/1/2/004
- Büngner, O. v., 1890. *Ueber die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen...*
- Burnett, M.G., Zager, E.L., 2004. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg. Focus* 16, 1–7. doi:10.3171/foc.2004.16.5.2
- Cajal, S.R. y, 1991. *Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Oxford University Press.
- Campbell, W.W., 2008a. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 119, 1951–1965. doi:10.1016/j.clinph.2008.03.018

- Campbell, W.W., 2008b. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin. Neurophysiol.* 119, 1951–1965. doi:10.1016/j.clinph.2008.03.018
- Campenot, R.B., 1977. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 4516–4519.
- Canu, M.-H., Garnier, C., Lepoutre, F.-X., Falempin, M., 2005. A 3D analysis of hindlimb motion during treadmill locomotion in rats after a 14-day episode of simulated microgravity. *Behav. Brain Res.* 157, 309–321. doi:10.1016/j.bbr.2004.07.009
- Carlsson, A., 1993. Thirty years of dopamine research. *Adv. Neurol.* 60, 1–10.
- Chao, M.V., 2003. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 299–309. doi:10.1038/nrn1078
- Chernousov, M.A., Stahl, R.C., Carey, D.J., 2001. Schwann cell type V collagen inhibits axonal outgrowth and promotes Schwann cell migration via distinct adhesive activities of the collagen and noncollagen domains. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 6125–6135.
- Chiono, V., Vozzi, G., Vozzi, F., Salvadori, C., Dini, F., Carlucci, F., Arispici, M., Burchielli, S., Di Scipio, F., Geuna, S., Fornaro, M., Tos, P., Nicolino, S., Audisio, C., Perroteau, I., Chiaravalloti, A., Domenici, C., Giusti, P., Ciardelli, G., 2009. Melt-extruded guides for peripheral nerve regeneration. Part I: poly(epsilon-caprolactone). *Biomed. Microdevices* 11, 1037–1050. doi:10.1007/s10544-009-9321-9
- Chiu, D.T., Strauch, B., 1990. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plast. Reconstr. Surg.* 86, 928–934.
- Choi, B.-H., Zhu, S.-J., Kim, S.-H., Kim, B.-Y., Huh, J.-H., Lee, S.-H., Jung, J.-H., 2005. Nerve repair using a vein graft filled with collagen gel. *J. Reconstr. Microsurg.* 21, 267–272. doi:10.1055/s-2005-871754
- Claudepierre, T., Koncina, E., Pfrieder, F. w., Bagnard, D., Aunis, D., Reber, M., 2008. Implication of neuropilin 2/semaphorin 3F in retinocollicular map formation. *Dev. Dyn.* 237, 3394–3403. doi:10.1002/dvdy.21759
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., Hamburger, V., 1954. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 40, 1014–1018.
- Cohen-Karni, T., Jeong, K.J., Tsui, J.H., Reznor, G., Mustata, M., Wanunu, M., Graham, A., Marks, C., Bell, D.C., Langer, R., Kohane, D.S., 2012. Nanocomposite gold-silk nanofibers. *Nano Lett.* 12, 5403–5406. doi:10.1021/nl302810c
- Corey, J.M., Lin, D.Y., Mycek, K.B., Chen, Q., Samuel, S., Feldman, E.L., Martin, D.C., 2007. Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth. *J. Biomed. Mater. Res. A* 83, 636–645. doi:10.1002/jbm.a.31285
- Cornbrooks, C.J., Carey, D.J., McDonald, J.A., Timpl, R., Bunge, R.P., 1983. In vivo and in vitro observations on laminin production by Schwann cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 3850–3854.
- De Boer, R., Knight, A.M., Borntraeger, A., Hébert-Blouin, M.-N., Spinner, R.J., Malessy, M.J.A., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J., 2011. Rat sciatic nerve repair with a poly-lactic-co-glycolic acid scaffold and nerve growth factor releasing microspheres. *Microsurgery* 31, 293–302. doi:10.1002/micr.20869
- De Groot, P.J., Deck, L.L., 1994. Surface profiling by frequency-domain analysis of white light interferograms. pp. 101–104. doi:10.1117/12.194308
- De Ruitter, G.C.W., Malessy, M.J.A., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J., Spinner, R.J., 2009. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg. Focus* 26, E5. doi:10.3171/FOC.2009.26.2.E5

- Dedkov, E.I., Kostrominova, T.Y., Borisov, A.B., Carlson, B.M., 2001. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. *Anat. Rec.* 263, 139–154.
- Dellon, A.L., Mackinnon, S.E., 1988. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast. Reconstr. Surg.* 82, 849–856.
- Dellon, E.S., Dellon, A.L., 1993. The first nerve graft, Vulpian, and the nineteenth century neural regeneration controversy. *J. Hand Surg.* 18, 369–372. doi:10.1016/0363-5023(93)90378-G
- Desouches, C., Alluin, O., Mutaftschiev, N., Dousset, E., Magalon, G., Boucraut, J., Feron, F., Decherchi, P., 2005. La réparation nerveuse périphérique : 30 siècles de recherche. *Rev. Neurol. (Paris)* 161, 1045–1059. doi:10.1016/S0035-3787(05)85172-0
- Di Summa, P.G., Kingham, P.J., Raffoul, W., Wiberg, M., Terenghi, G., Kalbermatten, D.F., 2010. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg. JPRAS* 63, 1544–1552. doi:10.1016/j.bjps.2009.09.012
- Ding, T., Lu, W.W., Zheng, Y., Li, Z. yang, Pan, H. bo, Luo, Z., 2011. Rapid repair of rat sciatic nerve injury using a nanosilver-embedded collagen scaffold coated with laminin and fibronectin. *Regen. Med.* 6, 437–447. doi:10.2217/rme.11.39
- Dinis, Tony Mickael, Vidal, Guillaume, Egles, Christophe, 2013. Biomatériaux à base de nanofibres de soie pour des applications biomédicales. *Tech. Ing., Techniques de l'Ingénieur Nanotechnologies et biotechnologies pour la santé.*
- Donaghy, M., Hakin, R.N., Bamford, J.M., Garner, A., Kirkby, G.R., Noble, B.A., Tazir-Melboucy, M., King, R.H.M., Thomas, P.K., 1987. Hereditary Sensory Neuropathy with Neurotrophic Keratitis Description of an Autosomal Recessive Disorder with a Selective Reduction of Small Myelinated Nerve Fibres and a Discussion of the Classification of the Hereditary Sensory Neuropathies. *Brain* 110, 563–583. doi:10.1093/brain/110.3.563
- Dong, Y., Benveniste, E.N., 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180–190. doi:10.1002/glia.1107
- Donnelly, E.M., Strappe, P.M., McGinley, L.M., Madigan, N.N., Geurts, E., Rooney, G.E., Windebank, A.J., Fraher, J., Dockery, P., O'Brien, T., McMahon, S.S., 2010. Lentiviral vector-mediated knockdown of the NG2 [corrected] proteoglycan or expression of neurotrophin-3 promotes neurite outgrowth in a cell culture model of the glial scar. *J. Gene Med.* 12, 863–872. doi:10.1002/jgm.1509
- Edgar, D., Timpl, R., Thoenen, H., 1984. The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J.* 3, 1463–1468.
- Elia, R., Newhide, D.R., Pedevillano, P.D., Reiss, G.R., Firpo, M.A., Hsu, E.W., Kaplan, D.L., Prestwich, G.D., Peattie, R.A., 2013. Silk-hyaluronan-based composite hydrogels: A novel, securable vehicle for drug delivery. *J. Biomater. Appl.* 27, 749–762. doi:10.1177/0885328211424516
- Elliott, J.L., Snider, W.D., 1996. Motor neuron growth factors. *Neurology* 47, 47S–53S. doi:10.1212/WNL.47.4\_Suppl\_2.47S
- Erba, P., Mantovani, C., Kalbermatten, D.F., Pierer, G., Terenghi, G., Kingham, P.J., 2010. Regeneration potential and survival of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in peripheral nerve conduits. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg. JPRAS* 63, e811–817. doi:10.1016/j.bjps.2010.08.013

- Erminio, F., Buchthal, F., Rosenfalck, P., 1959. Motor unit territory and muscle fiber concentration in paresis due to peripheral nerve injury and anterior horn cell involvement. *Neurology* 9, 657–657. doi:10.1212/WNL.9.10.657
- Esaki, S., Kitoh, J., Katsumi, S., Goshima, F., Kimura, H., Safwat, M., Yamano, K., Watanabe, N., Nonoguchi, N., Nakamura, T., Coffin, R.S., Miyatake, S.-I., Nishiyama, Y., Murakami, S., 2011. Hepatocyte growth factor incorporated into herpes simplex virus vector accelerates facial nerve regeneration after crush injury. *Gene Ther.* 18, 1063–1069. doi:10.1038/gt.2011.57
- Fan, H., Liu, H., Toh, S.L., Goh, J.C.H., 2009. Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model. *Biomaterials* 30, 4967–4977. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.048
- Fansa, H., Schneider, W., Wolf, G., Keilhoff, G., 2002. Influence of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on nerve autografts and tissue-engineered nerve grafts. *Muscle Nerve* 26, 87–93. doi:10.1002/mus.10165
- Fawcett, J.W., Keynes, R.J., 1990. Peripheral Nerve Regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 13, 43–60. doi:10.1146/annurev.ne.13.030190.000355
- Fenrich, K., Gordon, T., 2004. Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* 31, 142–156.
- Fex Svenningsen, A., Dahlin, L.B., 2013. Repair of the Peripheral Nerve--Remyelination that Works. *Brain Sci.* 3, 1182–1197. doi:10.3390/brainsci3031182
- Filipe, V.M., Pereira, J.E., Costa, L.M., Maurício, A.C., Couto, P.A., Melo-Pinto, P., Varejão, A.S.P., 2006. Effect of skin movement on the analysis of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats. *J. Neurosci. Methods* 153, 55–61. doi:10.1016/j.jneumeth.2005.10.006
- Fine, E.G., Decosterd, I., Papaliozios, M., Zurn, A.D., Aebischer, P., 2002. GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur. J. Neurosci.* 15, 589–601. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.01892.x
- Finkelstein, D.I., Dooley, P.C., Luff, A.R., 1993. Recovery of muscle after different periods of denervation and treatments. *Muscle Nerve* 16, 769–777. doi:10.1002/mus.880160712
- Fitzgerald, M.J.T., 1996. *Neuroanatomy, basic and clinical.* W.B. Saunders.
- Florey, E., 1991. GABA: history and perspectives. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69, 1049–1056. doi:10.1139/y91-156
- Fu, S.Y., Gordon, T., 1995. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 3886–3895.
- Fuhs, T., Reuter, L., Vonderhaid, I., Claudepierre, T., Käs, J.A., 2013. Inherently slow and weak forward forces of neuronal growth cones measured by a drift-stabilized atomic force microscope. *Cytoskelet. Hoboken NJ* 70, 44–53. doi:10.1002/cm.21080
- Furuzono, T., Ishihara, K., Nakabayashi, N., Tamada, Y., 2000. Chemical modification of silk fibroin with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. II. Graft-polymerization onto fabric through 2-methacryloyloxyethyl isocyanate and interaction between fabric and platelets. *Biomaterials* 21, 327–333. doi:10.1016/S0142-9612(99)00177-5
- Garnier, C., Falempin, M., Canu, M.-H., 2008. A 3D analysis of fore- and hindlimb motion during locomotion: comparison of overground and ladder walking in rats. *Behav. Brain Res.* 186, 57–65. doi:10.1016/j.bbr.2007.07.023

- Gehrmann, J., Banati, R.B., Kreutzberg, G.W., 1993. Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *J. Neuroimmunol.* 48, 189–198.
- Gierthmühlen, J., Maier, C., Baron, R., Tölle, T., Treede, R.-D., Birbaumer, N., Hüge, V., Koroschetz, J., Krumova, E.K., Lauchart, M., Maihöfner, C., Richter, H., Westermann, A., 2012. Sensory signs in complex regional pain syndrome and peripheral nerve injury. *PAIN* 153, 765–774. doi:10.1016/j.pain.2011.11.009
- Gobin, A.S., Rhea, R., Newman, R.A., Mathur, A.B., 2006. Silk-fibroin-coated liposomes for long-term and targeted drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* 1, 81–87.
- GOTOH, K., IZUMI, H., KANAMOTO, T., TAMADA, Y., NAKASHIMA, H., 2000. Sulfated Fibroin, a Novel Sulfated Peptide Derived from Silk, Inhibits Human Immunodeficiency Virus Replication in Vitro. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1664–1670. doi:10.1271/bbb.64.1664
- Grey, C.P., Newton, S.T., Bowlin, G.L., Haas, T.W., Simpson, D.G., 2013. Gradient fiber electrospinning of layered scaffolds using controlled transitions in fiber diameter. *Biomaterials* 34, 4993–5006. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.033
- Gu, S., Shen, Y., Xu, W., Xu, L., Li, X., Zhou, G., Gu, Y., Xu, J., 2010. Application of fetal neural stem cells transplantation in delaying denervated muscle atrophy in rats with peripheral nerve injury. *Microsurgery* 30, 266–274. doi:10.1002/micr.20722
- Gu, S.H., Xu, W.D., Xu, L., Li, X.K., Ochiya, T., Wang, Y., Li, J.F., Gu, Y.D., Xu, J.G., 2010. Regenerated host axons form synapses with neurons derived from neural stem cells transplanted into peripheral nerves. *J. Int. Med. Res.* 38, 1721–1729.
- Gu, X., Ding, F., Yang, Y., Liu, J., 2011. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog. Neurobiol.* 93, 204–230. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.11.002
- Gulrajani, M.L., 1992. Degumming of silk. *Rev. Prog. Color. Relat. Top.* 22, 79–89. doi:10.1111/j.1478-4408.1992.tb00091.x
- Hardy, J.G., Römer, L.M., Scheibel, T.R., 2008. Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer* 49, 4309–4327. doi:10.1016/j.polymer.2008.08.006
- Haydon, P.G., 2001. Glia: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185–193. doi:10.1038/35058528
- Helgren, M.E., Cliffer, K.D., Torrento, K., Cavnor, C., Curtis, R., DiStefano, P.S., Wiegand, S.J., Lindsay, R.M., 1997. Neurotrophin-3 administration attenuates deficits of pyridoxine-induced large-fiber sensory neuropathy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 372–382.
- Herculano-Houzel, S., 2009. The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain. *Front. Hum. Neurosci.* 3. doi:10.3389/neuro.09.031.2009
- Hermanson, K.D., Harasim, M.B., Scheibel, T., Bausch, A.R., 2007. Permeability of silk microcapsules made by the interfacial adsorption of protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9, 6442. doi:10.1039/b709808a
- Hermanson, K.D., Huemmerich, D., Scheibel, T., Bausch, A.R., 2007. Engineered Microcapsules Fabricated from Reconstituted Spider Silk. *Adv. Mater.* 19, 1810–1815. doi:10.1002/adma.200602709
- Hill, P.S., Apel, P.J., Barnwell, J., Smith, T., Koman, L.A., Atala, A., Van Dyke, M., 2011. Repair of peripheral nerve defects in rabbits using keratin hydrogel scaffolds. *Tissue Eng. Part A* 17, 1499–1505. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0184



- Hobson, M.I., Green, C.J., Terenghi, G., 2000. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J. Anat.* 197 Pt 4, 591–605.
- Hopkins, A.M., De Laporte, L., Tortelli, F., Spedden, E., Staii, C., Atherton, T.J., Hubbell, J.A., Kaplan, D.L., 2013. Silk Hydrogels as Soft Substrates for Neural Tissue Engineering. *Adv. Funct. Mater.* 23, 5140–5149. doi:10.1002/adfm.201300435
- Hopkins, J.M., Bunge, R.P., 1991. Regeneration of axons from adult rat retinal ganglion cells on cultured Schwann cells is not dependent on basal lamina. *Glia* 4, 46–55. doi:10.1002/glia.440040106
- Horner, P.J., Gage, F.H., 2000. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407, 963–970. doi:10.1038/35039559
- Hou, S.T., Jiang, S.X., Smith, R.A., 2008. Permissive and Repulsive Cues and Signalling Pathways of Axonal Outgrowth and Regeneration, in: Kwang W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 125–181.
- Hsu, S.-H., Chan, S.-H., Weng, C.-T., Yang, S.-H., Jiang, C.-F., 2013. Long-Term Regeneration and Functional Recovery of a 15 mm Critical Nerve Gap Bridged by Tremella fuciformis Polysaccharide-Immobilized Polylactide Conduits. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 959261. doi:10.1155/2013/959261
- Hu, X., Shmelev, K., Sun, L., Gil, E.-S., Park, S.-H., Cebe, P., Kaplan, D.L., 2011. Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing. *Biomacromolecules* 12, 1686–1696. doi:10.1021/bm200062a
- Ichihara, S., Inada, Y., Nakamura, T., 2008. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. *Injury* 39 Suppl 4, 29–39. doi:10.1016/j.injury.2008.08.029
- Jin, H.-J., Chen, J., Karageorgiou, V., Altman, G.H., Kaplan, D.L., 2004. Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials* 25, 1039–1047. doi:10.1016/S0142-9612(03)00609-4
- Jin, H.-J., Fridrikh, S.V., Rutledge, G.C., Kaplan, D.L., 2002. Electrospinning Bombyx mori Silk with Poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules* 3, 1233–1239. doi:10.1021/bm025581u
- Jin, H.-J., Park, J., Karageorgiou, V., Kim, U.-J., Valluzzi, R., Cebe, P., Kaplan, D.L., 2005. Water-Stable Silk Films with Reduced  $\beta$ -Sheet Content. *Adv. Funct. Mater.* 15, 1241–1247. doi:10.1002/adfm.200400405
- Jose, R.R., Elia, R., Firpo, M.A., Kaplan, D.L., Peattie, R.A., 2012. Seamless, axially aligned, fiber tubes, meshes, microbundles and gradient biomaterial constructs. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23, 2679–2695. doi:10.1007/s10856-012-4739-7
- Kakade, M.V., Givens, S., Gardner, K., Lee, K.H., Chase, D.B., Rabolt, J.F., 2007. Electric Field Induced Orientation of Polymer Chains in Macroscopically Aligned Electrospun Polymer Nanofibers. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2777–2782. doi:10.1021/ja065043f
- Kalbermatten, D.F., Pettersson, J., Kingham, P.J., Pierer, G., Wiberg, M., Terenghi, G., 2009. New fibrin conduit for peripheral nerve repair. *J. Reconstr. Microsurg.* 25, 27–33. doi:10.1055/s-0028-1090619
- Kamei, N., Tanaka, N., Oishi, Y., Hamasaki, T., Nakanishi, K., Sakai, N., Ochi, M., 2007. BDNF, NT-3, and NGF released from transplanted neural progenitor cells promote corticospinal axon growth in organotypic cocultures. *Spine* 32, 1272–1278. doi:10.1097/BRS.0b013e318059afab
- Kandel, E., Schwartz, J., 2013. *Principles of Neural Science*, Fifth Edition. McGraw Hill Professional.

- Kang, C.E., Gemeinhart, E.J., Gemeinhart, R.A., 2004. Cellular alignment by grafted adhesion peptide surface density gradients. *J. Biomed. Mater. Res. A* 71, 403–411. doi:10.1002/jbm.a.30137
- Karlsson, S., Albertsson, A., 1998. Biodegradable polymers and environmental interaction. *Polym. Eng. Sci.* 38, 1251–1253. doi:10.1002/pen.10294
- Katona, P.G., 2010. Biomedical engineering in heart-brain medicine: A review. *Cleve. Clin. J. Med.* 77, S46–S50. doi:10.3949/ccjm.77.s3.08
- Kehoe, S., Zhang, X.F., Boyd, D., 2012a. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury* 43, 553–572. doi:10.1016/j.injury.2010.12.030
- Kehoe, S., Zhang, X.F., Lewis, L., O’Shea, H., Boyd, D., 2012b. Characterization of PLGA based composite nerve guidance conduits: effect of F127 content on modulus over time in simulated physiological conditions. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 14, 180–185. doi:10.1016/j.jmbbm.2012.06.003
- Khakh, B.S., Burnstock, G., 2009. THE DOUBLE LIFE OF ATP. *Sci. Am.* 301, 84–92.
- Kidd, G.J., Ohno, N., Trapp, B.D., 2013. Biology of Schwann cells. *Handb. Clin. Neurol.* 115, 55–79. doi:10.1016/B978-0-444-52902-2.00005-9
- Kim, U.-J., Park, J., Joo Kim, H., Wada, M., Kaplan, D.L., 2005. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* 26, 2775–2785. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.044
- Kloos, A.D., Fisher, L.C., Detloff, M.R., Hassenzahl, D.L., Basso, D.M., 2005. Stepwise motor and all-or-none sensory recovery is associated with nonlinear sparing after incremental spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* 191, 251–265. doi:10.1016/j.expneurol.2004.09.016
- Ko, F., Gogotsi, Y., Ali, A., Naguib, N., Ye, H., Yang, G. I., Li, C., Willis, P., 2003. Electrospinning of Continuous Carbon Nanotube-Filled Nanofiber Yarns. *Adv. Mater.* 15, 1161–1165. doi:10.1002/adma.200304955
- Kofuji, T., Fujiwara, T., Sanada, M., Mishima, T., Akagawa, K., 2014. HPC-1/syntaxin 1A and syntaxin 1B play distinct roles in neuronal survival. *J. Neurochem.* doi:10.1111/jnc.12722
- Koizumi, S., Fujishita, K., 2007. [Gliotransmitter ATP-mediated cell-to-cell communication]. *Brain Nerve Shinkei Kenkyū No Shinpo* 59, 707–715.
- Kokai, L.E., Bourbeau, D., Weber, D., McAtee, J., Marra, K.G., 2011. Sustained Growth Factor Delivery Promotes Axonal Regeneration in Long Gap Peripheral Nerve Repair. *Tissue Eng. Part A* 17, 1263–1275. doi:10.1089/ten.tea.2010.0507
- Konofaos, P., Ver Halen, J., 2013. Nerve Repair by Means of Tubulization: Past, Present, Future. *J. Reconstr. Microsurg.* 29, 149–164. doi:10.1055/s-0032-1333316
- Koob, A.O., Colby, J.M., Borgens, R.B., 2008. Behavioral recovery from traumatic brain injury after membrane reconstruction using polyethylene glycol. *J. Biol. Eng.* 2, 9. doi:10.1186/1754-1611-2-9
- Kothapalli, C.R., van Veen, E., de Valence, S., Chung, S., Zervantonakis, I.K., Gertler, F.B., Kamm, R.D., 2011. A high-throughput microfluidic assay to study neurite response to growth factor gradients. *Lab. Chip* 11, 497–507. doi:10.1039/c0lc00240b
- Kretschmer, T., Antoniadis, G., Braun, V., Rath, S.A., Richter, H.P., 2001. Evaluation of iatrogenic lesions in 722 surgically treated cases of peripheral nerve trauma. *J. Neurosurg.* 94, 905–912. doi:10.3171/jns.2001.94.6.0905

- Krieglstein, K., Strelau, J., Schober, A., Sullivan, A., Unsicker, K., 2002. TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J. Physiol. Paris* 96, 25–30.
- Kunkel-Bagden, E., Dai, H.N., Bregman, B.S., 1993. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* 119, 153–164. doi:10.1006/exnr.1993.1017
- Kunze, A., Valero, A., Zosso, D., Renaud, P., 2011. Synergistic NGF/B27 gradients position synapses heterogeneously in 3D micropatterned neural cultures. *PLoS One* 6, e26187. doi:10.1371/journal.pone.0026187
- Kutilek, P., Viteckova, S., Svoboda, Z., Smrcka, P., 2013. Kinematic quantification of gait asymmetry in patients with peroneal nerve palsy based on bilateral cyclograms. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 13, 244–250.
- Ladak, A., Olson, J., Tredget, E.E., Gordon, T., 2011. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp. Neurol.* 228, 242–252. doi:10.1016/j.expneurol.2011.01.013
- Ladd, M.R., Lee, S.J., Stitzel, J.D., Atala, A., Yoo, J.J., 2011. Co-electrospun dual scaffolding system with potential for muscle-tendon junction tissue engineering. *Biomaterials* 32, 1549–1559. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.10.038
- Latash, M.L., Scholz, J.P., Schönner, G., 2002. Motor control strategies revealed in the structure of motor variability. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 30, 26–31.
- Lee, J.-H., Lee, Y.J., Cho, H.-J., Shin, H., 2013. Guidance of In Vitro Migration of Human Mesenchymal Stem Cells and In Vivo Guided Bone Regeneration Using Aligned Electrospun Fibers. *Tissue Eng. Part A* Epub ahead of print. doi:10.1089/ten.tea.2013.0282
- Lee, K.H., Lee, K.H., Lee, J., Choi, H., Lee, D., Park, Y., Lee, S.-H., 2014. Integration of microfluidic chip with biomimetic hydrogel for 3D controlling and monitoring of cell alignment and migration. *J. Biomed. Mater. Res. A* 102, 1164–1172. doi:10.1002/jbm.a.34772
- Lein, P.J., Banker, G.A., Higgins, D., 1992. Laminin selectively enhances axonal growth and accelerates the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *Dev. Brain Res.* 69, 191–197. doi:10.1016/0165-3806(92)90159-T
- Lein, P.J., Higgins, D., Turner, D.C., Flier, L.A., Terranova, V.P., 1991. The NC1 domain of type IV collagen promotes axonal growth in sympathetic neurons through interaction with the alpha 1 beta 1 integrin. *J. Cell Biol.* 113, 417–428.
- Leslie-Barbick, J.E., Shen, C., Chen, C., West, J.L., 2011. Micron-scale spatially patterned, covalently immobilized vascular endothelial growth factor on hydrogels accelerates endothelial tubulogenesis and increases cellular angiogenic responses. *Tissue Eng. Part A* 17, 221–229. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0202
- Levinthal, R., Brown, W.J., Rand, R.W., 1977. Comparison of fascicular, interfascicular and epineural suture techniques in the repair of simple nerve lacerations. *J. Neurosurg.* 47, 744–750. doi:10.3171/jns.1977.47.5.0744
- Lewin, M., 2006. *Handbook of Fiber Chemistry*, Third Edition. CRC Press.
- Li, C., Vepari, C., Jin, H.-J., Kim, H.J., Kaplan, D.L., 2006. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3115–3124. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.022
- Li, M., Lu, S., Wu, Z., Yan, H., Mo, J., Wang, L., 2001. Study on porous silk fibroin materials. I. Fine structure of freeze dried silk fibroin. *J. Appl. Polym. Sci.* 79, 2185–2191. doi:10.1002/1097-4628(20010321)79:12<2185::AID-APP1026>3.0.CO;2-3

- Li, Z., Peng, J., Wang, G., Yang, Q., Yu, H., Guo, Q., Wang, A., Zhao, B., Lu, S., 2008. Effects of local release of hepatocyte growth factor on peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts. *Exp. Neurol.* 214, 47–54. doi:10.1016/j.expneurol.2008.07.007
- Liao, C.-D., Zhang, F., Guo, R.-M., Zhong, X.-M., Zhu, J., Wen, X.-H., Shen, J., 2012. Peripheral nerve repair: monitoring by using gadofluorine M-enhanced MR imaging with chitosan nerve conduits with cultured mesenchymal stem cells in rat model of neurotmesis. *Radiology* 262, 161–171. doi:10.1148/radiol.11110911
- Liao, I.-C., Wan, H., Qi, S., Cui, C., Patel, P., Sun, W., Xu, H., 2013. Preclinical evaluations of acellular biological conduits for peripheral nerve regeneration. *J. Tissue Eng.* 4, 2041731413481036. doi:10.1177/2041731413481036
- Liu, B.-S., 2008. Fabrication and evaluation of a biodegradable proanthocyanidin-crosslinked gelatin conduit in peripheral nerve repair. *J. Biomed. Mater. Res. A* 87, 1092–1102. doi:10.1002/jbm.a.31916
- Liu, T., Houle, J.D., Xu, J., Chan, B.P., Chew, S.Y., 2012. Nanofibrous collagen nerve conduits for spinal cord repair. *Tissue Eng. Part A* 18, 1057–1066. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0430
- Liu, W., Thomopoulos, S., Xia, Y., 2012. Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Adv. Healthc. Mater.* 1, 10–25. doi:10.1002/adhm.201100021
- Liu, X., Chen, J., Gilmore, K.J., Higgins, M.J., Liu, Y., Wallace, G.G., 2010. Guidance of neurite outgrowth on aligned electrospun polypyrrole/poly(styrene-beta-isobutylene-beta-styrene) fiber platforms. *J. Biomed. Mater. Res. A* 94, 1004–1011. doi:10.1002/jbm.a.32675
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000. Overview of Neuron Structure and Function [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21535/> (accessed 7.27.14).
- Lopatina, T., Kalinina, N., Karagyaur, M., Stambolsky, D., Rubina, K., Revischin, A., Pavlova, G., Parfyonova, Y., Tkachuk, V., 2011. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PloS One* 6, e17899. doi:10.1371/journal.pone.0017899
- Lundborg, G., Dahlin, L., Danielsen, N., Zhao, Q., 1994. Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration. *J. Reconstr. Microsurg.* 10, 345–354. doi:10.1055/s-2007-1006604
- Lundborg, G., Rosén, B., Dahlin, L., Holmberg, J., Rosén, I., 2004. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 29, 100–107. doi:10.1016/j.jhsb.2003.09.018
- Lutz, B.S., Chuang, D.C., Hsu, J.C., Ma, S.F., Wei, F.C., 2000. Selection of donor nerves--an important factor in end-to-side neurotomy. *Br. J. Plast. Surg.* 53, 149–154. doi:10.1054/bjps.1999.3252
- Ma, X.-L., Sun, X.-L., Yang, Z., Li, X.-L., Ma, J.-X., Zhang, Y., Yuan, Z.-Z., 2011. Biomechanical properties of peripheral nerve after acellular treatment. *Chin. Med. J. (Engl.)* 124, 3925–3929.
- Madduri, S., di Summa, P., Papaloizos, M., Kalbermatten, D., Gander, B., 2010. Effect of controlled co-delivery of synergistic neurotrophic factors on early nerve regeneration in rats. *Biomaterials* 31, 8402–8409. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.052

- Madduri, S., Papaloizos, M., Gander, B., 2010. Trophically and topographically functionalized silk fibroin nerve conduits for guided peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 31, 2323–2334. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.073
- Magnaghi, V., Conte, V., Procacci, P., Pivato, G., Cortese, P., Cavalli, E., Pajardi, G., Ranucci, E., Fenili, F., Manfredi, A., Ferruti, P., 2011. Biological performance of a novel biodegradable polyamidoamine hydrogel as guide for peripheral nerve regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A* 98A, 19–30. doi:10.1002/jbm.a.33091
- Mai, J., Fok, L., Gao, H., Zhang, X., Poo, M.-M., 2009. Axon initiation and growth cone turning on bound protein gradients. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 7450–7458. doi:10.1523/JNEUROSCI.1121-09.2009
- Malin, S.A., Davis, B.M., Molliver, D.C., 2007. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat. Protoc.* 2, 152–160. doi:10.1038/nprot.2006.461
- Mandal, B.B., Grinberg, A., Gil, E.S., Panilaitis, B., Kaplan, D.L., 2012. High-strength silk protein scaffolds for bone repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 7699–7704. doi:10.1073/pnas.1119474109
- Marieb, E.N., 2006. *Human Anatomy & Physiology*. Benjamin Cummings ; Pearson.
- Marmor, L., 1964. The repair of peripheral nerves by irradiated homografts. *Clin. Orthop.* 34, 161–169.
- Martini, R., 1994. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J. Neurocytol.* 23, 1–28.
- Masaeli, E., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Sadri, S., Hilderink, J., van Apeldoorn, A., van Blitterswijk, C.A., Moroni, L., 2013. Fabrication, characterization and cellular compatibility of poly(hydroxy alcanoate) composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *PloS One* 8, e57157. doi:10.1371/journal.pone.0057157
- Mason, M.R.J., Tannemaat, M.R., Malessy, M.J.A., Verhaagen, J., 2011. Gene therapy for the peripheral nervous system: a strategy to repair the injured nerve? *Curr. Gene Ther.* 11, 75–89.
- Maturana, L.G., Pierucci, A., Simões, G.F., Vidigal, M., Duek, E.A.R., Vidal, B.C., Oliveira, A.L.R., 2013. Enhanced peripheral nerve regeneration by the combination of a polycaprolactone tubular prosthesis and a scaffold of collagen with supramolecular organization. *Brain Behav.* 3, 417–430. doi:10.1002/brb3.145
- McKay Hart, A., Wiberg, M., Terenghi, G., 2003. Exogenous leukaemia inhibitory factor enhances nerve regeneration after late secondary repair using a bioartificial nerve conduit. *Br. J. Plast. Surg.* 56, 444–450.
- Meek, M.F., Varejão, A.S.P., Geuna, S., 2004. Use of skeletal muscle tissue in peripheral nerve repair: review of the literature. *Tissue Eng.* 10, 1027–1036. doi:10.1089/ten.2004.10.1027
- Meinel, L., Hofmann, S., Karageorgiou, V., Kirker-Head, C., McCool, J., Gronowicz, G., Zichner, L., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., 2005. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* 26, 147–155. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.047
- Mennen, U., van der Westhuizen, M.J., Eggers, I.M., 2003. Re-innervation of M. biceps by end-to-side nerve suture. *Hand Surg. Int. J. Devoted Hand Up. Limb Surg. Relat. Res. J. Asia-Pac. Fed. Soc. Surg. Hand* 8, 25–31.

- Millesi, H., 1967. [Nerve transplantation for reconstruction of peripheral nerves injured by the use of the microsurgical technic]. *Minerva Chir.* 22, 950–951.
- Mita, K., Ichimura, S., James, T.C., 1994. Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. *J. Mol. Evol.* 38, 583–592. doi:10.1007/BF00175878
- Mitsingou, J., Goma, P., 1993. Le crush-syndrome au cours de l'écrasement du membre supérieur (A propos d'un cas observé à la clinique chirurgicale des Armées de Pointe-Noire - CONGO). *Médecine Afr. Noire* 12.
- Monville, C., Peschanski, M., 2001. Le CNTF, une cytokine gliale au secours des neurones. *MS Médecine Sci.* 17, 568–576.
- Munson, J.B., McMahon, S.B., 1997. Effects of GDNF on axotomized sensory and motor neurons in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1126–1129.
- Murphey, F., Hartung, W., Kirklin, J.W., 1947. Myelographic demonstration of avulsing injury of the brachial plexus. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther.* 58, 102–105.
- Murphey, F., Kirklin, J., 1973. Chapter 3. Myelographic demonstration of avulsing injuries of the nerve roots of the brachial plexus--a method of determining the point of injury and the possibility of repair. *Clin. Neurosurg.* 20, 18–28.
- Murphy, A.R., John, P.S., Kaplan, D.L., 2008. Modification of silk fibroin using diazonium coupling chemistry and the effects on hMSC proliferation and differentiation. *Biomaterials* 29, 2829–2838. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.03.039
- Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci., Polymers in Biomedical Applications* 32, 762–798. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017
- Nazarov, R., Jin, H.-J., Kaplan, D.L., 2004. Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin. *Biomacromolecules* 5, 718–726. doi:10.1021/bm034327e
- Ndubaku, U., de Bellard, M.E., 2008. Glial cells: Old cells with new twists. *Acta Histochem.* 110, 182–195. doi:10.1016/j.acthis.2007.10.003
- Nectow, A.R., Marra, K.G., Kaplan, D.L., 2012. Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits. *Tissue Eng. Part B Rev.* 18, 40–50. doi:10.1089/ten.TEB.2011.0240
- Nguyen, Q.T., Sanes, J.R., Lichtman, J.W., 2002. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat. Neurosci.* 5, 861–867. doi:10.1038/nn905
- Nikolaev, S.I., Gallyamov, A.R., Mamin, G.V., Chelyshev, Y.A., 2014. Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Nerve Conduit and Local Delivery of vegf and fgf2 Genes Stimulate Neuroregeneration. *Bull. Exp. Biol. Med.* 157, 155–158. doi:10.1007/s10517-014-2513-1
- Nishiura, Y., Brandt, J., Nilsson, A., Kanje, M., Dahlin, L.B., 2004. Addition of cultured Schwann cells to tendon autografts and freeze-thawed muscle grafts improves peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 10, 157–164. doi:10.1089/107632704322791808
- Noble, J., Munro, C., Prasad, V.S., Midha, R., 1998. Analysis of Upper and Lower Extremity Peripheral Nerve Injur... : *Journal of Trauma and Acute Care Surgery. J. Trauma-Inj. Infect. Crit. Care* 116–122.
- Oakley, R.A., Lefcort, F.B., Clary, D.O., Reichardt, L.F., Prevet, D., Oppenheim, R.W., Frank, E., 1997. Neurotrophin-3 promotes the differentiation of muscle spindle afferents in the absence of peripheral targets. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 4262–4274.
- Ochoa, J., Danta, G., Fowler, T.J., Gilliatt, R.W., 1971. Nature of the Nerve Lesion caused by a Pneumatic Tourniquet. *Nature* 233, 265–266. doi:10.1038/233265a0

- Ochoa, J., Fowler, T.J., Gilliatt, R.W., 1972. Anatomical changes in peripheral nerves compressed by a pneumatic tourniquet. *J. Anat.* 113, 433–455.
- Oguievetskaia, K., Cifuentes-Diaz, C., Girault, J.-A., Goutebroze, L., 2005. [Cellular contacts in myelinated fibers of the peripheral nervous system]. *Médecine Sci.* MS 21, 162–169. doi:10.1051/medsci/2005212162
- Ou, J., He, Y., Xiao, X., Yu, T.-M., Chen, C., Gao, Z., Ho, M.S., 2014. Glial cells in neuronal development: recent advances and insights from *Drosophila melanogaster*. *Neurosci. Bull.* doi:10.1007/s12264-014-1448-2
- Panilaitis, B., Altman, G.H., Chen, J., Jin, H.-J., Karageorgiou, V., Kaplan, D.L., 2003. Macrophage responses to silk. *Biomaterials* 24, 3079–3085. doi:10.1016/S0142-9612(03)00158-3
- Park, H., Poo, M., 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23. doi:10.1038/nrn3379
- Parker, A.J., Clarke, K.A., 1990. Gait topography in rat locomotion. *Physiol. Behav.* 48, 41–47.
- Peltonen, S., Alanne, M., Peltonen, J., 2013. Barriers of the peripheral nerve. *Tissue Barriers* 1. doi:10.4161/tisb.24956
- Penna, V., Wewetzer, K., Munder, B., Stark, G.B., Lang, E.M., 2012. The long-term functional recovery of repair of sciatic nerve transection with biogenic conduits. *Microsurgery* 32, 377–382. doi:10.1002/micr.21974
- Pereda, A.E., 2014. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 250–263. doi:10.1038/nrn3708
- Pereira, J.E., Cabrita, A.M., Filipe, V.M., Bulas-Cruz, J., Couto, P.A., Melo-Pinto, P., Costa, L.M., Geuna, S., Maurício, A.C., Varejão, A.S.P., 2006. A comparison analysis of hindlimb kinematics during overground and treadmill locomotion in rats. *Behav. Brain Res.* 172, 212–218. doi:10.1016/j.bbr.2006.04.027
- Pereira, J.H., Bowden, R.E., Gattuso, J.M., Norris, R.W., 1991a. Comparison of results of repair of digital nerves by denatured muscle grafts and end-to-end sutures. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 16, 519–523.
- Pereira, J.H., Palande, D.D., Subramanian, A., Narayanakumar, T.S., Curtis, J., Turk, J.L., 1991b. Denatured autologous muscle graft in leprosy. *Lancet* 338, 1239–1240.
- Phillips, J.B., Bunting, S.C.J., Hall, S.M., Brown, R.A., 2005. Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit. *Tissue Eng.* 11, 1611–1617. doi:10.1089/ten.2005.11.1611
- Potter, G.B., Rowitch, D.H., Petryniak, M.A., 2011. Myelin restoration: progress and prospects for human cell replacement therapies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 59, 179–193. doi:10.1007/s00005-011-0120-7
- Potter, S.M., DeMarse, T.B., 2001. A new approach to neural cell culture for long-term studies. *J. Neurosci. Methods* 110, 17–24.
- Potucek, R.K., Kemp, S.W.P., Syed, N.I., Midha, R., 2009. Peripheral Nerve Injury, Repair, and Regeneration, in: Santin, M. (Ed.), *Strategies in Regenerative Medicine*. Springer New York, pp. 1–20.
- Pummi, K.P., Aho, H.J., Laato, M.K., Peltonen, J.T.K., Peltonen, S.A., 2006. Tight junction proteins and perineurial cells in neurofibromas. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 54, 53–61. doi:10.1369/jhc.5A6671.2005
- Purves, D., 2005. *Neurosciences: De Boeck Supérieur*.
- Qu, J., Wang, D., Wang, H., Dong, Y., Zhang, F., Zuo, B., Zhang, H., 2013. Electrospun silk fibroin nanofibers in different diameters support neurite outgrowth and promote

- astrocyte migration. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101, 2667–2678. doi:10.1002/jbm.a.34551
- Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1545–1564. doi:10.1098/rstb.2006.1894
- Reina, M.A., López, A., Villanueva, M.C., de Andrés, J.A., León, G.I., 2000. [Morphology of peripheral nerves, their sheaths, and their vascularization]. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.* 47, 464–475.
- Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., Weiss, S., 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 4565–4574.
- Reynolds, B.A., Weiss, S., 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Richardson, S.M., Curran, J.M., Chen, R., Vaughan-Thomas, A., Hunt, J.A., Freemont, A.J., Hoyland, J.A., 2006. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds. *Biomaterials* 27, 4069–4078. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.03.017
- Richner, M., Bjerrum, O.J., Nykjaer, A., Vaegter, C.B., 2011. The Spared Nerve Injury (SNI) Model of Induced Mechanical Allodynia in Mice. *J. Vis. Exp. JoVE.* doi:10.3791/3092
- Roam, J.L., Xu, H., Nguyen, P.K., Elbert, D.L., 2010. The formation of protein concentration gradients mediated by density differences of poly(ethylene glycol) microspheres. *Biomaterials* 31, 8642–8650. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.085
- Roam, J.L., Xu, H., Nguyen, P.K., Elbert, D.L., 2010. The formation of protein concentration gradients mediated by density differences of poly(ethylene glycol) microspheres. *Biomaterials* 31, 8642–8650. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.085
- Rockwood, D.N., Preda, R.C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M.L., Kaplan, D.L., 2011. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat. Protoc.* 6, 1612–1631. doi:10.1038/nprot.2011.379
- Sahoo, S., Ang, L.T., Goh, J.C.-H., Toh, S.-L., 2010. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 93A, 1539–1550. doi:10.1002/jbm.a.32645
- Saika, T., Senba, E., Noguchi, K., Sato, M., Yoshida, S., Kubo, T., Matsunaga, T., Tohyama, M., 1991. Effects of nerve crush and transection on mRNA levels for nerve growth factor receptor in the rat facial motoneurons. *Mol. Brain Res.* 9, 157–160. doi:10.1016/0169-328X(91)90142-K
- Salter, M.W., Beggs, S., 2014. Sublime Microglia: Expanding Roles for the Guardians of the CNS. *Cell* 158, 15–24. doi:10.1016/j.cell.2014.06.008
- Samavedi, S., Guelcher, S.A., Goldstein, A.S., Whittington, A.R., 2012. Response of bone marrow stromal cells to graded co-electrospun scaffolds and its implications for engineering the ligament-bone interface. *Biomaterials* 33, 7727–7735. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.008
- Sandrock, A.W., Jr, Matthew, W.D., 1987. Substrate-bound nerve growth factor promotes neurite growth in peripheral nerve. *Brain Res.* 425, 360–363.
- Santiago, L.Y., Clavijo-Alvarez, J., Brayfield, C., Rubin, J.P., Marra, K.G., 2009. Delivery of adipose-derived precursor cells for peripheral nerve repair. *Cell Transplant.* 18, 145–158.



- Santin, M., Motta, A., Freddi, G., Cannas, M., 1999. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J. Biomed. Mater. Res.* 46, 382–389. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19990905)46:3<382::AID-JBM11>3.0.CO;2-R
- Sashina, E.S., Bochek, A.M., Novoselov, N.P., Kirichenko, D.A., 2006. Structure and solubility of natural silk fibroin. *Russ. J. Appl. Chem.* 79, 869–876. doi:10.1134/S1070427206060012
- Savignat, M., De-Doncker, L., Vodouhe, C., Garza, J.M., Lavallo, P., Libersa, P., 2007. Rat nerve regeneration with the use of a polymeric membrane loaded with NGF. *J. Dent. Res.* 86, 1051–1056.
- Savignat, M., Vodouhe, C., Ackermann, A., Haikel, Y., Lavallo, P., Libersa, P., 2008. Evaluation of early nerve regeneration using a polymeric membrane functionalized with nerve growth factor (NGF) after a crush lesion of the rat mental nerve. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 66, 711–717. doi:10.1016/j.joms.2007.06.654
- Schneider, A., Wang, X.Y., Kaplan, D.L., Garlick, J.A., Egles, C., 2009. Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta Biomater.* 5, 2570–2578. doi:10.1016/j.actbio.2008.12.013
- Schuster, B., Kovaleva, M., Sun, Y., Regenhard, P., Matthews, V., Grötzinger, J., Rose-John, S., Kallen, K.-J., 2003. Signaling of Human Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Revisited THE INTERLEUKIN-6 RECEPTOR CAN SERVE AS AN  $\alpha$ -RECEPTOR FOR CNTF. *J. Biol. Chem.* 278, 9528–9535. doi:10.1074/jbc.M210044200
- Scott, J.B., Afshari, M., Kotek, R., Saul, J.M., 2011. The promotion of axon extension in vitro using polymer-templated fibrin scaffolds. *Biomaterials* 32, 4830–4839. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.037
- Shanthaveerappa, T.R., Bourne, G.H., 1962. The “perineural epithelium”, a metabolically active, continuous, protoplasmic cell barrier surrounding peripheral nerve fasciculi. *J. Anat.* 96, 527–537.
- Sherrington, C., 1906. *The Integrative Action of the Nervous System*. Cambridge University Press.
- Shi, J., Wang, L., Zhang, F., Li, H., Lei, L., Liu, L., Chen, Y., 2010. Incorporating protein gradient into electrospun nanofibers as scaffolds for tissue engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2, 1025–1030. doi:10.1021/am9007962
- Siemionow, M., Brzezicki, G., 2009. Chapter 8 Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair, in: Stefano Geuna; Pierluigi Tos and Bruno Battiston (Ed.), *International Review of Neurobiology*. Academic Press, pp. 141–172.
- Silver, J., Miller, J.H., 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 146–156. doi:10.1038/nrn1326
- Simpson, D.G., Terracio, L., Terracio, M., Price, R.L., Turner, D.C., Borg, T.K., 1994. Modulation of cardiac myocyte phenotype in vitro by the composition and orientation of the extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.* 161, 89–105. doi:10.1002/jcp.1041610112
- Sofia, S., McCarthy, M.B., Gronowicz, G., Kaplan, D.L., 2001. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J. Biomed. Mater. Res.* 54, 139–148.
- Sofroniew, M.V., Howe, C.L., Mobley, W.C., 2001. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1217–1281. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1217

- Sterne, G.D., Brown, R.A., Green, C.J., Terenghi, G., 1997a. Neurotrophin-3 delivered locally via fibronectin mats enhances peripheral nerve regeneration. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1388–1396.
- Sterne, G.D., Coulton, G.R., Brown, R.A., Green, C.J., Terenghi, G., 1997b. Neurotrophin-3-enhanced nerve regeneration selectively improves recovery of muscle fibers expressing myosin heavy chains 2b. *J. Cell Biol.* 139, 709–715.
- Stoll, G., Jander, S., Myers, R.R., 2002. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* 7, 13–27.
- Stoll, G., Müller, H.W., 1999. Nerve Injury, Axonal Degeneration and Neural Regeneration: Basic Insights. *Brain Pathol.* 9, 313–325. doi:10.1111/j.1750-3639.1999.tb00229.x
- Stukel, J., Thompson, S., Simon, L., Willits, R., 2014. Polyethylene glycol microgels to deliver bioactive nerve growth factor. *J. Biomed. Mater. Res. A.* doi:10.1002/jbm.a.35209
- Sulaiman, O.A., Gordon, T., 2000. Effects of short- and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. *Glia* 32, 234–246.
- Sundararaghavan, H.G., Saunders, R.L., Hammer, D.A., Burdick, J.A., 2013. Fiber alignment directs cell motility over chemotactic gradients. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 1249–1254. doi:10.1002/bit.24788
- Tamada, Y., 2005. New Process to Form a Silk Fibroin Porous 3-D Structure. *Biomacromolecules* 6, 3100–3106. doi:10.1021/bm050431f
- Tang, J.B., Gu, Y.Q., Song, Y.S., 1993. Repair of digital nerve defect with autogenous vein graft during flexor tendon surgery in zone 2. *J. Hand Surg. Edinb. Scotl.* 18, 449–453.
- Tang, J.B., Shi, D., Zhou, H., 1995. Vein conduits for repair of nerves with a prolonged gap or in unfavourable conditions: an analysis of three failed cases. *Microsurgery* 16, 133–137.
- Tang, S., Zhu, J., Xu, Y., Xiang, A.P., Jiang, M.H., Quan, D., 2013. The effects of gradients of nerve growth factor immobilized PCLA scaffolds on neurite outgrowth in vitro and peripheral nerve regeneration in rats. *Biomaterials* 34, 7086–7096. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.05.080
- Tansey, E.M., 2006. Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C. R. Biol.* 329, 419–425. doi:10.1016/j.crv.2006.03.012
- Terzis, J.K., Papakonstantinou, K.C., 2000. The surgical treatment of brachial plexus injuries in adults. *Plast. Reconstr. Surg.* 106, 1097–1122; quiz 1123–1124.
- Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123–1133.
- Thompson, A.W., Pujic, Z., Richards, L.J., Goodhill, G.J., 2011. Cyclic nucleotide-dependent switching of mammalian axon guidance depends on gradient steepness. *Mol. Cell. Neurosci.* 47, 45–52. doi:10.1016/j.mcn.2011.02.012
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., Martin, G.R., 1979. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 9933–9937.
- Tobita, M., Orbay, H., Mizuno, H., 2011. Adipose-derived Stem Cells: Current Findings and Future Perspectives. *Discov. Med.* 11, 160–170.
- Tonda-Turo, C., Gnavi, S., Ruini, F., Gambarotta, G., Gioffredi, E., Chiono, V., Perroteau, I., Ciardelli, G., 2014. Development and characterization of novel agar and gelatin injectable hydrogel as filler for peripheral nerve guidance channels. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* doi:10.1002/term.1902

- Topp, K.S., Boyd, B.S., 2012. Peripheral nerve: from the microscopic functional unit of the axon to the biomechanically loaded macroscopic structure. *J. Hand Ther. Off. J. Am. Soc. Hand Ther.* 25, 142–151; quiz 152. doi:10.1016/j.jht.2011.09.002
- Torpy, J.M., Kincaid, J.L., Glass, R.M., 2008. JAMA patient page. Peripheral neuropathy. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 299, 1096. doi:10.1001/jama.299.9.1096
- Tortora, G.J., Grabowski, S.R., 2002. *Principles of Anatomy and Physiology*. Wiley.
- Twarog, B.M., Page, I.H., 1953. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.* 175, 157–161.
- Twiss, J.L., Minnen, J.V., 2006. New Insights into Neuronal Regeneration: The Role of Axonal Protein Synthesis in Pathfinding and Axonal Extension. *J. Neurotrauma* 23, 295–308. doi:10.1089/neu.2006.23.295
- Uebersax, L., Mattotti, M., Papaloizos, M., Merkle, H.P., Gander, B., Meinel, L., 2007. Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF). *Biomaterials* 28, 4449–4460. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.034
- Vadivel, A., Alphonse, R.S., Collins, J.J.P., van Haaften, T., O'Reilly, M., Eaton, F., Thébaud, B., 2013. The axonal guidance cue semaphorin 3C contributes to alveolar growth and repair. *PLoS One* 8, e67225. doi:10.1371/journal.pone.0067225
- Valmikinathan, C.M., Wang, J., Smiriglio, S., Golwala, N.G., Yu, X., 2009. Magnetically induced protein gradients on electrospun nanofibers. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 12, 656–663.
- Varkey, M., Gittens, S.A., Uludag, H., 2004. Growth factor delivery for bone tissue repair: an update. *Expert Opin. Drug Deliv.* 1, 19–36. doi:10.1517/17425247.1.1.19
- Vepari, C., Kaplan, D.L., 2007. Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci., Polymers in Biomedical Applications* 32, 991–1007. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013
- Verkhratsky, A., Butt, A.M., 2007. *Glial Neurobiology*. John Wiley & Sons.
- Vesce, S., Bezzi, P., Volterra, A., 2001. Synaptic transmission with the glia. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 16, 178–184.
- Vidal, G., Blanchi, T., Mieszawska, A.J., Calabrese, R., Rossi, C., Vigneron, P., Duval, J.-L., Kaplan, D.L., Egles, C., 2013. Enhanced cellular adhesion on titanium by silk functionalized with titanium binding and RGD peptides. *Acta Biomater.* 9, 4935–4943. doi:10.1016/j.actbio.2012.09.003
- Viterbo, F., Trindade, J.C., Hoshino, K., Mazzoni Neto, A., 1992. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineural sheath. Experimental study in rats. *Rev. Paul. Med.* 110, 267–275.
- Volterra, A., Meldolesi, J., 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626–640. doi:10.1038/nrn1722
- Waller, A., 1850a. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 140, 423–429. doi:10.1098/rstl.1850.0021
- Waller, A., 1850b. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 140, 423–429. doi:10.1098/rstl.1850.0021
- Walter, M.A., Kurouglu, R., Caulfield, J.B., Vasconez, L.O., Thompson, J.A., 1993. Enhanced peripheral nerve regeneration by acidic fibroblast growth factor. *Lymphokine Cytokine Res.* 12, 135–141.

- Wang, A., Ao, Q., Cao, W., Yu, M., He, Q., Kong, L., Zhang, L., Gong, Y., Zhang, X., 2006. Porous chitosan tubular scaffolds with knitted outer wall and controllable inner structure for nerve tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* 79, 36–46. doi:10.1002/jbm.a.30683
- Wang, C.-Y., Liu, J.-J., Fan, C.-Y., Mo, X.-M., Ruan, H.-J., Li, F.-F., 2012. The effect of aligned core-shell nanofibres delivering NGF on the promotion of sciatic nerve regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 23, 167–184. doi:10.1163/092050610X545805
- Wang, J.T., Medress, Z.A., Barres, B.A., 2012. Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J. Cell Biol.* 196, 7–18. doi:10.1083/jcb.201108111
- Wang, M., Jin, H.-J., Kaplan, D.L., Rutledge, G.C., 2004. Mechanical Properties of Electrospun Silk Fibers. *Macromolecules* 37, 6856–6864. doi:10.1021/ma048988v
- Wang, M., Yu, J.H., Kaplan, D.L., Rutledge, G.C., 2006. Production of Submicron Diameter Silk Fibers under Benign Processing Conditions by Two-Fluid Electrospinning. *Macromolecules* 39, 1102–1107. doi:10.1021/ma0517749
- Wang, Y., Rudym, D.D., Walsh, A., Abrahamsen, L., Kim, H.-J., Kim, H.S., Kirker-Head, C., Kaplan, D.L., 2008. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials* 29, 3415–3428. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.05.002
- Wenk, E., Merkle, H.P., Meinel, L., 2011. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. *J. Controlled Release* 150, 128–141. doi:10.1016/j.jconrel.2010.11.007
- Whitaker-Azmitia, P.M., 1999. The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 21, 2S–8S. doi:10.1016/S0893-133X(99)00031-7
- Wilkins, A., Majed, H., Layfield, R., Compston, A., Chandran, S., 2003. Oligodendrocytes Promote Neuronal Survival and Axonal Length by Distinct Intracellular Mechanisms: A Novel Role for Oligodendrocyte-Derived Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *J. Neurosci.* 23, 4967–4974.
- Wittmer, C.R., Claudepierre, T., Reber, M., Wiedemann, P., Garlick, J.A., Kaplan, D., Egles, C., 2011. Multifunctionalized electrospun silk fibers promote axon regeneration in central nervous system. *Adv. Funct. Mater.* 21, 4202. doi:10.1002/adfm.201190103
- Wood, M.D., Hunter, D., Mackinnon, S.E., Sakiyama-Elbert, S.E., 2010. Heparin-binding-affinity-based delivery systems releasing nerve growth factor enhance sciatic nerve regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 21, 771–787. doi:10.1163/156856209X445285
- Wu, G., Ju, L., Jin, T., Chen, L., Shao, L., Wang, Y., Liu, B., 2010. Local delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 increases axonal regeneration and the expression of tau protein after facial nerve injury. *J. Int. Med. Res.* 38, 1682–1688.
- Wu, J., Chiu, D.T., 1999. Painful neuromas: a review of treatment modalities. *Ann. Plast. Surg.* 43, 661–667.
- Xie, J., Li, X., Lipner, J., Manning, C.N., Schwartz, A.G., Thomopoulos, S., Xia, Y., 2010. “Aligned-to-random” nanofiber scaffolds for mimicking the structure of the tendon-to-bone insertion site. *Nanoscale* 2, 923–926. doi:10.1039/c0nr00192a
- Xu, H., Yan, Y., Li, S., 2011. PDLLA/chondroitin sulfate/chitosan/NGF conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 32, 4506–4516. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.023
- Yang, Y., Chen, X., Ding, F., Zhang, P., Liu, J., Gu, X., 2007. Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Biomaterials* 28, 1643–1652. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.12.004

- Zaborszky, L., Wouterlood, F.G., Lanciego, J.L., 2006. *Neuroanatomical Tract-Tracing: Molecules, Neurons, and Systems*. Springer Science & Business Media.
- Zaminy, A., Shokrgozar, M.A., Sadeghi, Y., Norouzi, M., Heidari, M.H., Piryaee, A., 2013. Transplantation of schwann cells differentiated from adipose stem cells improves functional recovery in rat spinal cord injury. *Arch. Iran. Med.* 16, 533–541. doi:013169/AIM.0011
- Zarkoob, S., Reneker, D.H., Ertley, D., Eby, R.K., Hudson, S.D., 2000. Hexafluoroisopropanol, electrospinning, no acid treatment. US6110590 A.
- Zeng, W., Rong, M., Hu, X., Xiao, W., Qi, F., Huang, J., Luo, Z., 2014. Incorporation of chitosan microspheres into collagen-chitosan scaffolds for the controlled release of nerve growth factor. *PloS One* 9, e101300. doi:10.1371/journal.pone.0101300
- Zhang, J., Lineaweaver, W.C., Oswald, T., Chen, Z., Chen, Z., Zhang, F., 2004. Ciliary neurotrophic factor for acceleration of peripheral nerve regeneration: an experimental study. *J. Reconstr. Microsurg.* 20, 323–327. doi:10.1055/s-2004-824891
- Zhang, X., Baughman, C.B., Kaplan, D.L., 2008. In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth. *Biomaterials* 29, 2217–2227. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.022
- Zhang, X., Reagan, M.R., Kaplan, D.L., 2009. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 988–1006. doi:10.1016/j.addr.2009.07.005
- Zhao, C., Yao, J., Masuda, H., Kishore, R., Asakura, T., 2003. Structural characterization and artificial fiber formation of Bombyx mori silk fibroin in hexafluoro-iso-propanol solvent system. *Biopolymers* 69, 253–259. doi:10.1002/bip.10350
- Zhu, M., Wang, K., Mei, J., Li, C., Zhang, J., Zheng, W., An, D., Xiao, N., Zhao, Q., Kong, D., Wang, L., n.d. Fabrication of highly interconnected porous silk fibroin scaffolds for potential use as vascular grafts. *Acta Biomater.* doi:10.1016/j.actbio.2014.01.022