



HAL
open science

Optimisation de dispositifs médicaux thérapeutiques implantables pour l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse

Quentin Wagner

► **To cite this version:**

Quentin Wagner. Optimisation de dispositifs médicaux thérapeutiques implantables pour l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ114 . tel-01709945

HAL Id: tel-01709945

<https://theses.hal.science/tel-01709945v1>

Submitted on 15 Feb 2018

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.

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 1109 « Nanomédecine Régénérative Ostéoarticulaire et Dentaire »

THÈSE

Quentin WAGNER

Soutenue publiquement le 15 décembre 2017

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Ingénierie tissulaire/ Médicament de thérapie
innovante

**Optimisation de dispositifs médicaux thérapeutiques
implantables pour l'ingénierie tissulaire osseuse et
cartilagineuse**

Directeur de Thèse **Mme Nadia Benkirane-Jessel**
Directeur de recherche, UMR Inserm 1109, Strasbourg

Rapporteurs Externes **M. Guy Ladam**
Professeur, Université de Rouen
M. Xiong Wang
Professeur, Université de Lorraine, Nancy

Examinatrice Interne **Mme Florence Toti**
Professeur, Université de Strasbourg

Invitée

Encadrante de Thèse **Mme Laetitia Keller**
Maître de conférence, UMR Inserm 1109, Strasbourg

L'ignorance mène à la peur, la peur mène à la haine et la haine
conduit à la violence. Voilà l'équation

Averroès

Remerciements

Les travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'unité de recherche Inserm 1109 « Nanomédecine Régénérative Ostéoarticulaire et Dentaire ». Je remercie le Dr Nadia Benkirane-Jessel d'avoir permis ces travaux, et pour sa sympathie et la confiance qu'elle a témoigné à mon égard durant ces trois années. Merci pour l'aide bénéfique et l'encadrement dont j'ai pu bénéficier pour réaliser ces travaux.

Je tenais à remercier chaleureusement le Dr Laetitia Keller pour son encadrement de tous les instants, sa sympathie, son attention et la motivation qu'elle a su m'insuffler pour mener à bien nos différents projets. Je n'aurais pu souhaiter meilleur encadrement pour avancer dans mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier les Professeurs Guy Ladam, Xiong Wang et Florence Toti d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse et de juger ce travail en qualité de rapporteur. Je vous remercie pour votre présence, dès la présentation de mes travaux de thèse à mi-parcours et votre témoignage de confiance.

Je tenais également à remercier le Dr Laetitia Keller et le Dr Jean-Serge Remy d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse en qualité de membre invité. Laetitia, j'espère pouvoir te rendre toute l'énergie que tu as fournie pour que je puisse m'épanouir dans mes travaux. Jean-Serge, merci une deuxième fois d'accepter d'intégrer un jury de thèse me concernant, j'ai commencé à découvrir la recherche en laboratoire à tes côtés, je tenais à ce que tu sois présent pour juger de mes travaux de thèse.

Je vous remercie de prêter attention à ces travaux.

Je remercie également Valérie Demais pour son expertise et ses conseils qui m'ont aidé à mener à bien mes travaux de recherche.

Je tenais également à remercier les membres du laboratoire que j'ai pu côtoyer et auprès desquels j'ai pu m'épanouir durant mes travaux de thèse :

Merci Ysia pour ta vive sympathie, ta bonne humeur, ton sérieux et ton aide

Merci Arielle de m'avoir initié à l'électrospinning et pour ton aide

Merci Sabine pour ta joie de vivre à toute épreuve, ta motivation, et ta disponibilité

Merci Hervé pour ton expertise en histologie et ta patience

Merci Pascale pour ton aide et tes remarques pertinentes

Merci Fabien pour l'initiation à la micro-CT et ton aide pour mener à bien ce projet

Merci Olivier pour les parties de fous rire et le sérieux que tu sais quelque fois démontrer

Merci René pour les échanges footballistiques et ta bonne humeur

Merci Florence, François et Mr Lesot pour votre présence et votre sympathie

Merci David d'avoir embelli les journées devant l'ordinateur par tes cordes vocales et tes tentatives à rester sérieux malgré la présence de Max

Merci Max pour la joie de vivre dont tu fais preuve, véritable motivation au labo

Merci Marion de m'avoir supporté, je te souhaite le meilleur

Merci Damien d'avoir rejoint l'équipe et notre projet, à bientôt, sur le terrain ou ailleurs

Merci Fafa de supporter nos excès sans sourciller et pour le lexique en pakistanais que tu as tenté de nous transmettre ainsi que ta bonne humeur

Je remercie ma famille d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de faire de (très) longues études. Et oui, 10 ans d'études, un long voyage pour lequel vous avez été présents à mes côtés.

Merci Papa et Maman pour votre présence et votre soutien, je vous suis infiniment reconnaissant pour tout ce que vous avez fait pour moi. La tâche n'aurait pas été aussi facile sans votre foi et votre confiance, ainsi que vos encouragements constants. Merci également à vos moitiés, Isabelle et Marjorie, d'avoir également été présentes durant ces années.

Merci à Anthony, mon grand frère, d'avoir été l'ainé et de me montrer les choses à faire et à ne pas faire. Félicitations pour ton nouveau rôle de père que tu prendras, je le sais, à bras le corps avec Laura, pour notre petit Eden qui a déjà tout d'un grand.

Merci Titi de toujours me faire rire dès que je te vois. Je suis content que tout soit rentré dans l'ordre pour toi, tu le mérites et accroche toi comme tu le fais, crois en toi comme je crois en toi, et tout ira bien avec ta petite Elisa!

Merci Aurélie pour ton soutien pendant ces années, en me faisant également souvent rire, en m'acceptant chez toi ces derniers temps et en me taguant n'importe où sur facebook. Je te souhaite tout le bonheur du monde avec Guillaume pour ta belle voie, toute tracée.

Merci beaucoup à mes beaux-frères et ma belle-sœur, Sébastien, Auriane et Ludovic. Sébastien, je suis content de la complicité que nous avons réussi à établir, je suis fier de t'avoir comme beau-frère. Je suis heureux de voir ton évolution, qui s'inscrit depuis longtemps maintenant avec Fiona, vous formez un couple solide qui va de l'avant et qui nous a offert il y a peu de temps la magnifique petite Louise, un bien bel exemple à suivre.

Enfin, je tenais à remercier des plus chaleureusement possible toutes les personnes que j'ai pu côtoyer, certains depuis l'école primaire et les autres qui se sont ajoutés au fur et à mesure de ma vie. La liste serait trop longue à établir entre les copains de l'école, du collège/lycée, de la faculté, de l'amicale de pharmacie, de faluche, des vacances en Espagne ou des #vraiscopains, mais j'ai pour vous tous une pensée spéciale et je vous dois beaucoup. Merci à vous.

Sommaire

Liste des abréviations.....	10
Liste des figures.....	14
Liste des tableaux.....	16
INTRODUCTION GENERALE.....	17
I. L'INGENIERIE TISSULAIRE POUR LES PATHOLOGIES OSSEUSES ET CARTILAGINEUSES.....	21
1. Introduction à l'ingénierie tissulaire	22
1.1. Le tissu osseux.....	22
1.1.1. Définition.....	22
1.1.2. Les cellules du compartiment osseux	24
1.1.3. La matrice osseuse	25
1.1.4. Formation et développement de l'os	27
1.1.4.1 Ossification endochondrale	27
1.1.4.2 Ossification intramembraneuse.....	29
1.1.5. Le processus de remodelage osseux	30
1.1.5.1 Phase d'activation.....	30
1.1.5.2 Phase de résorption.....	31
1.1.5.3 Phase d'inversion.....	31
1.1.5.4 Phase de formation.....	31
1.1.5.5 Phase de quiescence.....	32
1.2. Le tissu cartilagineux	33
1.2.1. Définition	33
1.2.2. Les chondrocytes, cellules du compartiment cartilagineux	35
1.2.3. La matrice cartilagineuse	36
1.2.4. Formation et développement du tissu cartilagineux : la chondrogenèse	39
1.2.4.1 Prolifération et condensation des cellules souches mésenchymateuses.....	39
1.2.4.2 Différenciation des cellules souches en chondroblastes.....	39
1.2.4.3 Maturation des chondroblastes en chondrocytes.....	40
1.2.4.4 Hypertrophie chondrocytaire et différenciation terminale.....	40
1.2.4.5 Ossification endochondrale.....	40
1.2.5. Le remodelage cartilagineux	41
1.3. L'ingénierie tissulaire	43

1.3.1.	Définition	43
1.3.2.	Principe de l'ingénierie tissulaire : le triangle d'or	44
1.3.2.1	Les prérequis pour le dispositif médical implantable.....	45
1.3.2.2	Les cellules dans l'ingénierie tissulaire.....	46
1.3.2.3	Les molécules biologiques dans l'ingénierie tissulaire.....	48
1.3.3.	Les différentes générations de dispositifs médicaux apportées par l'ingénierie tissulaire	48
1.4.	Cadre réglementaire concernant les médicaments de thérapies innovantes	52
1.4.1.	Règlement européen sur les thérapies innovantes	52
1.4.2.	Les différents types de produits	53
1.4.3.	Mise en application des médicaments de thérapie innovante	54
1.4.3.1	Les différents types de médicaments de thérapie innovante.....	54
1.4.3.2	Mise sur le marché d'un médicament de thérapie innovante.....	55
1.4.3.3	Fabrication d'un médicament de thérapie innovante.....	56
2.	Stratégies pour la nanomédecine régénérative osseuse et cartilagineuse	57
2.1.	Les pathologies osseuses et cartilagineuses	57
2.1.1.	Les pathologies chroniques	57
2.1.2.	Les pathologies aiguës	59
2.2.	Les solutions thérapeutiques actuelles dans la régénération osseuse et ostéoarticulaire.	62
2.2.1.	Mesures non médicamenteuses	62
2.2.2.	Traitements pharmacologiques	63
2.2.3.	Traitements chirurgicaux	64
2.3.	L'ingénierie tissulaire dans la médecine régénérative osseuse et cartilagineuse	67
2.3.1.	Les biomatériaux pour la régénération cartilagineuse	67
2.3.1.1	Les polymères naturels.....	68
2.3.1.2	Les polymères synthétiques.....	70
2.3.1.3	Les produits commerciaux disponibles.....	72
2.3.2.	Les biomatériaux pour la régénération osseuse	75
2.3.2.1	Exemples de biomatériaux commerciaux en clinique.....	76
2.3.2.2	Méthodes d'obtention des biomatériaux.....	78
2.3.3.	Les facteurs de croissance cellulaires utilisés en médecine régénérative osseuse et ostéoarticulaire.....	81
2.3.3.1	Les facteurs de croissance pour la régénération cartilagineuse.....	81
2.3.3.2	Les facteurs de croissance pour la régénération osseuse.....	83
2.3.3.3	Méthodes de fonctionnalisation de biomatériaux.....	83

2.3.4.	Les sources cellulaires utilisées pour la médecine régénérative osseuse et ostéoarticulaire	86
2.3.4.1	Les chondrocytes	86
2.3.4.2	Les ostéoblastes	87
2.3.4.3	Les sources de cellules souches	88
3.	Stratégies pour le comblement de lésions osseuses étendues	93
3.1.	Pathologies osseuses	93
3.1.1.	Maladies parodontales	94
3.1.2.	Les principales tumeurs maxillo-mandibulaires	96
3.1.2.1	Les kystes	96
3.1.2.2	Les tumeurs	96
3.2.	Solutions thérapeutiques actuelles utilisées pour les lésions osseuses étendues	97
3.2.1.	Mesures non médicamenteuses et traitements pharmacologiques	97
3.2.2.	Traitements chirurgicaux en orthopédie	98
3.2.3.	Traitements chirurgicaux de la sphère maxillo-faciale	103
3.3.	L'ingénierie tissulaire dans le traitement de lésions osseuses étendues	106
3.3.1.	Les biomatériaux utilisés dans le traitement de lésions osseuses étendues	106
3.3.1.1	Les produits naturels	108
3.3.1.2	Les produits synthétiques	108
3.3.1.3	Les produits commerciaux disponibles	112
3.3.2.	Les facteurs de croissance cellulaires utilisés dans le traitement de lésions osseuses étendues	113
3.3.3.	Les sources cellulaires utilisées dans le traitement de lésions osseuses étendues	114
II.	OBJECTIFS DE LA THESE	118
III.	MATERIELS ET METHODES	121
1.	Elaboration et fonctionnalisation de dispositifs médicaux	122
1.1.	Les différents biomatériaux utilisés pour l'ingénierie tissulaire	122
1.1.1.	Fabrication de membrane synthétique « home-made » par électrospinning	122
1.1.2.	Fabrication d'un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique	123
1.1.3.	Membrane à base de chitosane nanocomposite dopée de nanoparticules de silice	124
1.2.	Stratégie de fonctionnalisation des biomatériaux	124
1.2.1.	Solutions utilisées	124
1.2.2.	Fonctionnalisation des dispositifs médicaux : technologie nanoréservoirs	126

1.3.	Caractérisation de la fonctionnalisation des dispositifs médicaux.....	126
2.	Analyse <i>in vitro</i> des dispositifs médicaux.....	127
2.1.	Culture cellulaire	217
2.1.1.	Milieux de culture et types cellulaires	127
2.1.2.	Sous-culture ou passage.....	129
2.1.3.	Formation de microtissus.....	130
2.2.	Monitoring de l'évolution de l'activité métabolique cellulaire.....	131
2.3.	Analyse qualitative de l'expression protéique	132
2.4.	Mesure de l'expression génique par rétrotranscription- réaction en chaîne par polymérase quantitative	134
2.5.	Observation des échantillons par analyse histologique.....	135
3.	Caractérisation <i>in vivo</i> des dispositifs médicaux	138
3.1.	Les différents dispositifs médicaux testés	138
3.2.	Expérimentation animale.....	138
3.2.1.	Implantation en calvaria	139
3.2.2.	Implantation en sous-cutanée	140
3.2.3.	Injection pré-explantatoire de calcéine.....	141
3.2.4.	Explantation des dispositifs médicaux après expérimentation animale	141
3.3.	Observation de la production matricielle	142
3.3.1.	Coloration histologique	142
3.3.2.	Coloration immunohistochimique de l'ostéocalcine	143
3.4.	Observation de la minéralisation des dispositifs médicaux	144
3.4.1.	MEB-Spectroscopie à rayon X	144
3.4.2.	Microtomographie assistée par ordinateur (micro-CT)	145
3.5.	Observation de la synthèse de glycosaminoglycanes dans les dispositifs médicaux	145
3.6.	Analyse du recrutement vasculaire des dispositifs médicaux.....	146

IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....148

Chapitre 1: Propriété ostéogénique d'un biomatériau nanocomposite à base de chitosane dopé par des nanoparticules de silice.....149

1.	Contexte et objectif.....	150
2.	Résultats et discussion.....	151
3.	Conclusions	153

Chapitre 2 : Propriété ostéogénique d'un biomatériau nanofibreux synthétique associé à des sphéroïdes de cellules mésenchymateuses humaines.....	154
1. Contexte et objectif.....	155
2. Résultats et discussion.....	155
3. Conclusions	157
Chapitre 3 : Implants collagéniques hybrides enrichis de microtissus à des fins de régénération de l'unité os-cartilage.....	158
1. Contexte et objectif.....	159
2. Résultats et discussion.....	160
3. Conclusions	162
Chapitre 4 : Implants synthétiques hybrides enrichis de microtissus à des fins de médecine régénérative ostéochondrale.....	163
1. Contexte et objectif.....	164
2. Résultats et discussion.....	164
3. Conclusions	167
Chapitre 5 : Dispositif médical implantable innovant pour améliorer la vascularisation des implants osseux	168
1. Contexte et objectif.....	169
2. Résultats et discussion.....	171
3. Conclusions	174
V. Conclusions et perspectives.....	175
VI. Annexes.....	182
Annexe 1.....	183
Annexe 2.....	184
Annexe 3.....	185
VII. REFERENCES.....	186

Liste des abréviations

ACI	Implantation de chondrocytes autologues (Autologous Chondrocytes Implantation)
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AMIC	Chondrogenèse autologue induite par matrice (Autologous Matrix induced Chondrogenesis)
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Ang-1	Angiopoïétine-1
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BMP	Protéine de morphogénèse osseuse (Bone Morphogenetic Protein)
BPF	Bonnes pratiques de fabrication
BSA	Albumine de sérum bovin (Bovin Serum Albumin)
BspII	Sialoprotéine osseuse 2 (Bone Sialoprotein 2)
CaCl ₂	Dichlorure de calcium
CAT	Comité des thérapies avancées (Committee of Advanced Therapies)
Ca/P	rapport calcium/phosphate
CE	Conformité européenne
CHMP	Comité des médicaments à usage humain (Committee for medicinal products for human use)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CS-NC	Membrane nanocomposite à base de chitosane dopée en nanoparticules de silice
CSEs	Cellules souches embryonnaires
CSMs	Cellules souches mésenchymateuses
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole

DBM	Matrice osseuse déminéralisée (Demineralized Bone Matrix)
DCM	Dichlorométhane
DM	Dispositif médical
DMF	Diméthylformamide
DO	Densité optique
DMO	Densité minérale osseuse
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EMA	Agence européenne du médicament (European Medicines Agency)
EPC	Progéniteurs endothéliaux (Endothelial Progenitor Cells)
ESPS	Enquête santé et protection sociale
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes (Fibroblast Growth Factor)
GAGs	Glycosaminoglycanes
HA	Acide hyaluronique
HAp	Hydroxyapatite
hCh	Chondrocytes humains
Hep	Héparine
Hh	Hedgehog
HMDS	Hexamethyldisylazane
hOb	Ostéoblastes humains
HUD	Dispositifs à usage humanitaire (Humanitarian Use Device)
HUVECs	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
IGF	Facteur de croissance analogue à l'insuline (Insuline-like Growth Factor)
IL-1	Interleukine-1

iPS	Cellules pluripotentes induites (induced Pluripotent Stem cells)
LbL	Films multicouches de polyélectrolytes (layer-by-layer)
Leem	Les entreprises du médicament
LIF	Facteur inhibiteur de leucémie (Leukemia Inhibitory Factor)
M-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (Macrophage Colony-Stimulating Factor)
MACI	Implantation de chondrocytes assistée d'une matrice (Matrix-Assisted Chondrocytes Implantation)
MEB	Microscope électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MEM	Minimum Essential Medium
MET	Microscope électronique à transmission
MMP	Métalloprotéase de la matrice (Matrix MetalloProteinase)
MTI	Médicament de thérapie innovante
MTI-PP	Médicament de thérapie innovante préparé ponctuellement
N-CAM	Molécule d'adhésion cellulaire neuronale (Neural Cell Adhesion Molecule)
NaCl	Chlorure de sodium
NH ₄ OH	Hydroxyde d'ammonium
NO	Monoxyde d'azote
NPs	Nanoparticules
ODF	Facteur de différenciation ostéoclastique (Osteoclastic Differentiation Factor)
OPG	Ostéoprotégérine
PBS	Tampon phosphate salin
PCL	Poly(ε-caprolactone)
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Poly(éthylène glycol)
PGE2	Prostaglandine E2
PFA	Paraformaldéhyde

PGA	Polymère d'acide glycolique
PLGA	Copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique
PLLA	Polymère d'acide (L)-lactique
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PU	Polyuréthane
PVA	Polymère d'alcool vinylique
rhBMP-2 ou -7	Protéine de morphogénèse osseuse- 2 ou -7 recombinante humaine (recombinant human Bone Morphogenetic Protein)
RIA	Forage-irrigation-aspiration (Reamer- Irrigator- Aspirator)
RTqPCR	Transcription inversée- Réaction quantitative en chaîne de polymérase (Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction)
SERM	Modulateur spécifique du récepteur à l'oestradiol (Specific Estradiol Receptor Modulator)
TCP	Phosphate tricalcique (TriCalcium Phosphate)
TEOS	Tetraethoxysilane
TGF- β	Facteur de croissance transformant β
TIMPs	Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (Tissue Inhibitory Metalloproteinases)
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α (Tumor Necrosis Factor α)
TPE/PMEs	Très petites entreprises/ Petites et moyennes entreprises
RANK	Récepteur activateur du ligand du facteur nucléaire κ B (Receptor Activator of Nuclear factor- κ B)
SVF	Sérum de veau fœtal
UV	Ultraviolet
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor)
VEGFR	Récepteur au VEGF

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique de l'os compact et de l'os spongieux	23
Figure 2: Les différentes étapes de l'ossification endochondrale.....	28
Figure 3: Les différentes étapes de l'ossification intramembraneuse	29
Figure 4: Les différentes étapes du remodelage osseux.....	33
Figure 5: Représentation schématique du cartilage hyalin articulaire.....	35
Figure 6 : La matrice extracellulaire cartilagineuse	37
Figure 7: Représentation schématique du développement cartilagineux et osseux avec les différents signaux synthétisés.....	40
Figure 8: Le triangle d'or dans l'ingénierie.....	44
Figure 9: Les solutions proposées par l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse.....	51
Figure 10: Représentation schématique du processus de cicatrisation osseuse spontanée.....	60
Figure 11: Représentation schématique des techniques de réparation du cartilage utilisant l'ingénierie tissulaire.....	72
Figure 12: Structure en bicouche de la membrane collagénique Bio-Gide® observée au microscope électronique à balayage	76
Figure 13: Représentation schématique de la technique d'électrospinning	79
Figure 14 : Matérialisation des différentes zones traversées par le polymère électrospinné....	79
Figure 15: Représentation de la technique de (LbL) par une alternance d'immersions de polyanions et de polycations et visualisation de la formation de nanoréservoirs thérapeutiques.....	85
Figure 16: Représentation schématique de la couronne dentaire et du parodonte	94
Figure 17: Installation progressive de la parodontite associée à une perte osseuse.....	95
Figure 18: Représentation schématique de l'ostéogénèse par distraction en 4 étapes.....	99
Figure 19: Dispositif d'Ilizarov traitant une fracture du tibia et de la fibula sur la jambe droite	100

Figure 20: Consolidation osseuse d'une fracture ouverte par la technique de Masquelet.....	101
Figure 21: Greffe de la crête alvéolaire.....	104
Figure 22: Sinus maxillaire s'étendant autour des molaires de la mâchoire supérieure	104
Figure 23: Procédure d'élévation du plancher du sinus.....	105
Figure 24: Position murale des CSMs dans la moelle osseuse durant le développement osseux après invasion de la cavité par les vaisseaux sanguins.....	115
Figure 25: Stratégies de vascularisation d'un substitut osseux pour l'ingénierie tissulaire osseuse	116
Figure 26: Principe de la formation de microtissus par la technique de la goutte suspendue	130

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des différentes classes d'os.....	22
Tableau 2: Les différents types cellulaires du tissu osseux	25
Tableau 3: Propriétés générales des polymères utilisés en clinique pour la cicatrisation des lésions cartilagineuses	71
Tableau 4: Aperçu des dispositifs médicaux implantables pour la régénération de lésions cartilagineuses sur le marché, leurs composition, la procédure utilisée et les résultats cliniques obtenus	74
Tableau 5: Avantages et inconvénients des différentes greffes osseuses	106
Tableau 6: Caractéristiques des biomatériaux pour les stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse	107
Tableau 7: Exemple de dispositifs médicaux implantables pour le comblement osseux ayant obtenu l'approbation de la FDA	112
Tableau 8: Caractéristiques techniques pour l'électrospinning de biomatériaux à base de PCL	123
Tableau 9: Récapitulatif des espèces utilisées pour fonctionnaliser les dispositifs médicaux	125
Tableau 10: Liste des différents anticorps primaires utilisés	133
Tableau 11: Liste des différents anticorps secondaires utilisés	133
Tableau 12: Liste des amorces utilisées durant la RT-PCR quantitative	134
Tableau 13: Différents dispositifs médicaux testés en expérimentation animale.....	138
Tableau 14: Récapitulatif des techniques utilisées durant le travail de thèse	147

Introduction générale

Les statistiques mondiales sans cesse grandissantes concernant les désordres osseux et cartilagineux et leurs maladies associées, en particulier pour les populations âgées et souffrant d'obésité aussi bien que pour les populations ayant peu d'activité physique, ont suscité des inquiétudes alarmantes. Les études suggèrent que l'incidence de ces désordres va plus que doubler d'ici 5 ans au niveau mondial. Malgré le fait que le corps possède des propriétés intrinsèques d'auto-renouvellement, le degré de réparation varie parmi les différents tissus et peut aussi être altéré par la sévérité du traumatisme ou de la pathologie. Les approches classiques pour traiter des défauts osseux et cartilagineux, visant la réparation ou la régénération de ces tissus, sont les greffes (autogreffes ou allogreffes). Jusqu'ici, les autogreffes ont été considérées comme la référence en raison de leurs caractéristiques incluant l'histocompatibilité, l'absence de réaction immunologique et leurs potentiels fonctionnels. Cependant, les autogreffes sont onéreuses et augmentent le risque opératoire pour le patient (causant des saignements, inflammations, infections et/ou une douleur chronique dans certains cas). De plus, de nombreux rapports ont souligné des blessures au niveau du site donneur et une morbidité associée à cette procédure.

Ainsi, ces contraintes ont motivé le développement de thérapies permettant de régénérer les tissus et de réduire le recours à la greffe. L'ingénierie tissulaire est un domaine de la médecine relativement récent qui met à profit et combine des cellules, des biomatériaux compatibles et des facteurs biochimiques pour créer des structures semblables aux tissus. Le plus fréquemment, la finalité de l'ingénierie tissulaire est l'implantation de ces constructions pour réparer une blessure ou remplacer la fonction d'un organe déficient.

Le point clé de l'ingénierie tissulaire est le développement de biomatériaux pouvant favoriser des processus régénératifs en supportant de manière efficace les populations cellulaires et les agents thérapeutiques, en même temps qu'ils assurent une structuration conférant aux tissus les propriétés mécaniques adéquates. En effet, différentes générations de biomatériaux ont permis durant des décennies d'augmenter la complexité des constructions et le degré de sophistication des dispositifs implantables en ce sens. Ces avancées ont permis une augmentation notable de la qualité des constructions issues de l'ingénierie tissulaire. La recherche travaillant sur l'élaboration de biomatériaux pour la régénération tissulaire tend à imiter le plus possible la structure de la matrice extracellulaire du tissu physiologique d'intérêt. Les caractéristiques du biomatériau sont cruciales : sa provenance (matériau naturel ou synthétique), ses propriétés physico-chimiques, la topologie de sa surface ainsi que sa biocompatibilité avec le tissu hôte et sa biodégradabilité sont des éléments à prendre en

compte durant l'élaboration de chaque construction. De plus, des stratégies visant à conférer à ces biomatériaux des propriétés supplémentaires peuvent être apportées par le biais de molécules thérapeutiques pour une efficacité thérapeutique renforcée. Enfin, la considération sur les différentes sources cellulaires pour rendre ces implants, aussi bien actifs que vivants, a véritablement permis aux dispositifs implantables d'atteindre le potentiel thérapeutique maximal pour l'ingénierie tissulaire.

Notre projet de recherche s'est inscrit dans une réflexion visant à optimiser des biomatériaux, soit par l'ajout de molécules thérapeutiques, soit par des stratégies portant sur l'ensemencement de cellules d'intérêt, pour augmenter le potentiel thérapeutique d'implants créés pour l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse.

Concernant la régénération osseuse, nos études ont porté sur une membrane semi-synthétique de chitosane nanocomposite, dopée par des nanoparticules de silice en présence de cellules mésenchymateuses adultes (ostéoblastes) pour permettre le processus régénératif (**chapitre 1**). Puis, dans ce même cadre, la réflexion a porté sur la stratégie d'ensemencement cellulaire sur un support synthétique nanofibreux imitant la matrice extracellulaire osseuse. Cette étude a évalué l'ensemencement d'ostéoblastes cultivés sous forme de microtissus (MTs) comparé aux cellules en monocouche sur ce support matriciel (**chapitre 2**).

Concernant la régénération de l'unité os-cartilage, nos études ont visé à la création d'un implant bicompartimenté permettant à la fois la régénération du compartiment cartilagineux, mais aussi du socle sous-chondral sous-jacent. Une première étude a porté sur un implant bicompartimenté (un support matriciel collagénique nanostructuré de Bio-Gide® visant la régénération de l'os sous-chondral et un hydrogel pour la régénération cartilagineuse) et incorporant des MTs de cellules souches mésenchymateuses humaines adultes dérivées de la moelle osseuse. Ces MTs ont été disposés à l'interface des deux compartiments ainsi que dans l'hydrogel (**chapitre 3**). Une seconde étude a permis l'élaboration d'un dispositif implantable synthétique, la membrane collagénique étant remplacée par une membrane nanostructurée produite par la méthode d'électrospinning. Ce support nanostructuré a été rendu actif par la technologie nanoréservoirs permettant l'incorporation de facteurs de croissance ostéogénique au niveau des nanofibres et vivant grâce à l'ajout de microtissus hybrides composés d'un mélange de cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées de la moelle osseuse et de chondrocytes humains adultes au sein du même hydrogel que dans l'étude précédente (**chapitre 4**).

Enfin, notre réflexion s'est portée sur des stratégies permettant une accélération de la vascularisation pour des biomatériaux implantables en se basant sur un substitut osseux déjà utilisé en clinique. Nous avons étudié le recrutement vasculaire à l'intérieur de l'implant en combinant le facteur de croissance pro-angiogénique VEGF (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, de l'anglais Vascular Endothelial Growth Factor) et un ensemencement séquentiel de deux types cellulaires : cellules ostéoblastiques puis cellules endothéliales (HUVECs, cellules endothéliales de la veine ombilicale, de l'anglais Human Umbilical Vein Endothelial Cells) (**chapitre 5**).

I. L'ingénierie tissulaire pour les pathologies osseuses et cartilagineuses

1. Introduction à l'ingénierie tissulaire

1.1. Le tissu osseux

1.1.1. Définition

Le tissu osseux est un tissu conjonctif dur et dense, mais aussi vascularisé et innervé formant la majorité du squelette adulte, structure de support corporel. La structuration de ce tissu et sa composition permettent d'accomplir plusieurs fonctions clés : une **fonction de soutien mécanique**, permettant de se tenir debout et de se mouvoir, les os servant de points d'ancrage pour les muscles squelettiques ; une **fonction de protection** des organes internes en les recouvrant ou en les entourant. C'est le cas des côtes formant la cage thoracique et protégeant les poumons et le cœur, les os de la colonne vertébrale protégeant la moelle épinière ou les os du crâne protégeant le cerveau ; une **fonction de stockage** pour les minéraux tels que le calcium et le phosphate, participant grandement à l'homéostasie phosphocalcique, mais aussi d'énergie sous forme de triglycérides ; enfin une **fonction hématopoïétique**, intégrant la synthèse des cellules sanguines telles que les globules rouges, les globules blancs ou encore les plaquettes.

Les 206 os qui composent le squelette adulte sont divisés en cinq catégories, selon leur forme et leurs fonctions. Il y a les os longs, les os courts, les os plats, les os irréguliers et les os sésamoïdes. Un tableau permettra de classer ces différentes catégories d'os :

Classification	Caractéristiques	Fonctions	Exemples
Long	Cylindrique, Plus long que large	Levier	Fémur, tibia, fibula, humérus, radius, ...
Court	Forme cubique	Apporte de la stabilité, permettant les mouvements	Carpes, tarses
Plat	Fin et courbé	Point d'attachement pour les muscles, protecteur pour les organes	Sternum, côtes, omoplates, os crâniens
Irréguliers	Forme complexe	Protège les organes internes	Vertèbres, os de la face
Sésamoïde	Petit et rond, enchâssé dans les tendons	Protège les tendons des forces compressives	Patella

Tableau 1: Classification des différentes classes d'os

L'os long est l'exemple le plus représentatif pour visualiser les différentes parties d'un os. Un os long est composé de deux parties: une diaphyse, centrale, surmontée d'épiphyes. La

diaphyse est l'axe cylindrique situé entre l'extrémité distale et proximale de l'os. La partie creuse de la diaphyse est appelée **cavité médullaire**, remplie de moelle jaune. La partie externe de la diaphyse est composée d'**os compact** (ou **os cortical**). La section la plus répandue à chaque extrémité osseuse est appelée épiphyse, remplie d'**os spongieux** (ou **os trabéculaire**). La région intermédiaire entre diaphyse et épiphyse est appelée la métaphyse. Cette région étroite comprend le **plateau épiphysaire**, couche de cartilage hyalin dans un os en croissance.

L'**os compact** est la fraction la plus dense et la plus dure des deux types du tissu osseux. Il est retrouvé sous le périoste, dans la diaphyse des os longs, où il assure support et protection. Cet os compact est constitué d'unités microscopiques appelées **ostéons**, ou système Haversien (diamètre allant de 100 microns à 1 millimètre, longueur maximale d'un centimètre). Chaque ostéon est composé d'anneaux concentriques appelés lamelles de matrice calcifiée. Au centre des ostéons se situe le canal central (ou **canal de Havers**) qui contient les vaisseaux sanguins, vaisseaux lymphatiques, et les nerfs. Ces vaisseaux se branchent à angle droit avec les canaux perforants (ou **canaux de Wolkman**) pour s'étendre vers le périoste et l'endoste (**Figure 1**).

L'**os spongieux** à l'instar de l'os compact contient des lamelles, mais non concentriques, sous forme de réseaux en treillis appelés **trabécules**. Les espaces offerts par les trabéculations diffèrent par rapport aux espaces de l'os compact pour permettre d'accueillir de la moelle rouge, siège de l'hématopoïèse (**Figure 1**).

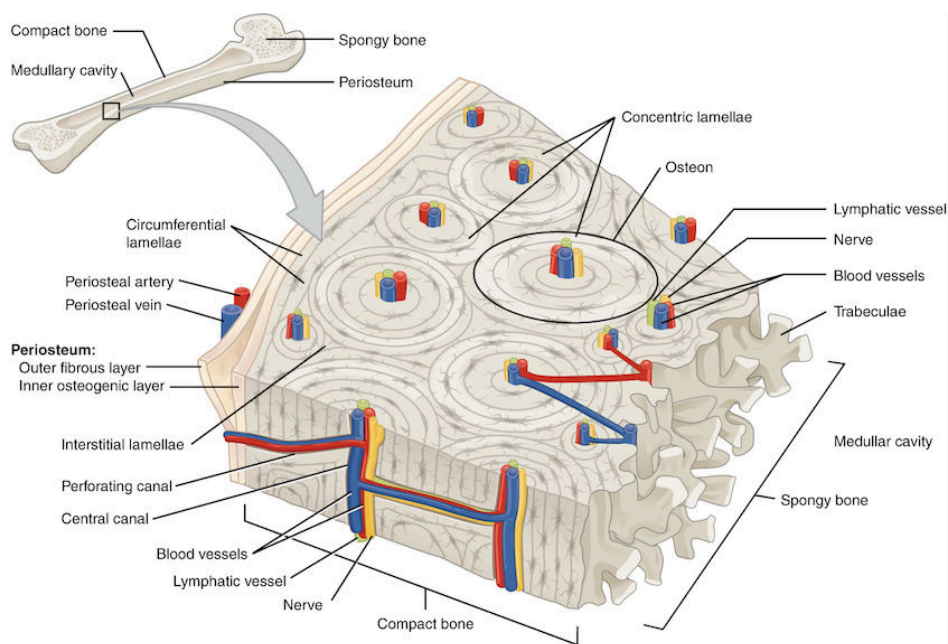


Figure 1: Représentation schématique de l'os compact et de l'os spongieux (source : pediaa.com)

1.1.2. Les cellules du compartiment osseux

Le tissu osseux contient un petit nombre de cellules enracinées dans la matrice osseuse par rapport au volume tissulaire. Néanmoins, les différentes cellules constituant ce tissu sont cruciales pour promouvoir les différentes fonctions de l'os. Il y a quatre types cellulaires dans le tissu osseux : les ostéoblastes, les ostéocytes, les ostéoclastes et les cellules ostéogéniques.

Les **ostéoblastes** sont les cellules responsables de la formation de tissu osseux, retrouvés dans les portions osseuses en croissance, incluant le périoste et l'endoste. Ces cellules sont incapables de se diviser et réalisent la synthèse et la sécrétion de matrice organique non minéralisée sous forme d'**ostéoïde**. La phosphatase alcaline est très présente chez ces cellules, au niveau de leurs membranes cellulaires. A mesure que la matrice entourant les ostéoblastes se calcifie, ces cellules s'enclavent dans celle-ci, modifient leurs structures et se différencient pour aboutir à des **ostéocytes** terminaux. Les ostéocytes sont les cellules primaires de l'os mature, la plus commune des cellules osseuses.

Chaque **ostéocyte** est localisé dans un espace appelé lacune (ou **ostéoplaste**), entouré de tissu osseux. Comme pour les ostéoblastes, les ostéocytes sont dépourvus d'activité mitotique. Ces cellules peuvent communiquer entre elles et recevoir les apports nutritifs grâce à de longs processus cytoplasmiques, qui s'étendent à travers des canalicules, canaux dans la matrice osseuse. Les ostéocytes maintiennent la concentration minérale de la matrice grâce aux sécrétions enzymatiques.

Si les ostéoblastes et les ostéocytes proviennent à l'origine de **cellules ostéogéniques**. Ces cellules souches sont indifférenciées et possèdent une forte activité mitotique. Ce sont les seules cellules du tissu osseux à pouvoir se diviser. Les cellules ostéogéniques immatures sont retrouvées en profondeur du périoste ainsi que dans la moelle. Elles se différencient pour donner des ostéoblastes.

La nature dynamique de l'os sous-entend que du nouveau tissu est constamment formé, alors que le tissu âgé, lésé, ou inutile est dissout pour réparation ou relargage de calcium. La cellule responsable de la résorption, à l'opposé de la formation du tissu osseux est appelée **ostéoclaste**. Ces cellules sont polynucléées (10 à 20 noyaux) et sont localisées à la surface de l'os. Elles sont originaires de monocytes et de macrophages. Les ostéoclastes démantèlent la matrice osseuse minéralisée par l'intermédiaire d'enzymes protéolytiques en formant la lacune de Howship. La balance continue entre la synthèse osseuse réalisée par les ostéoblastes

et la résorption osseuse offerte par les ostéoclastes est responsable du remodelage de l'os. Le tableau suivant récapitule les différents types de cellules, leurs fonctions et leurs localisations :

Type cellulaire	Fonctions	Localisations
Cellules ostéogéniques	Se développe pour donner des ostéoblastes	Couches profondes du périoste et moelle
Ostéoblastes	Ostéoformation	Fraction croissante osseuse, incluant le périoste et l'endoste
Ostéocytes	Maintien la concentration minérale de la matrice	Emprisonné dans la matrice
Ostéoclastes	Ostéorésorption	Surface osseuse au niveau de sites âgés, lésés, ou non désirés

Tableau 2: Les différents types cellulaires du tissu osseux

1.1.3. La matrice osseuse

Le tissu osseux est un **tissu conjonctif**. Ceci signifie qu'il est composé de cellules et d'une matrice extracellulaire. La singularité de ce tissu vis à vis des tissus conjonctifs des différents organes du corps humain provient du fait qu'il comporte une **fraction inorganique**, sous forme de cristaux minéraux.

Le tissu osseux est composé d'une matrice double : une matrice organique (entre 20 et 40%) et une matrice minérale (entre 50 et 70%), d'eau pour 5 à 10% mais également de lipides pour une concentration inférieure à 3%. Cette composition singulière confère à l'os sa **force** et sa **rigidité** inhérente à la fonction de soutien mécanique et de protection, mais également de la flexibilité et de l'élasticité par la matrice organique et l'eau.

➤ **Matrice organique**

La fraction organique de la matrice extracellulaire du tissu osseux est composée majoritairement de **collagène de type I** (85 à 90%), avec des traces de **collagène de type III et V**. Le collagène de type I existe sous forme de fibres, créées à partir d'assemblage d'unités de **tropocollagène**, lui même dérivé du **procollagène**, organisées séquentiellement en **fibrilles**, conférant un aspect caractéristique de cette macromolécule, **striée** à l'observation au microscope électronique, grâce à l'alternance de phases sombres et claires. Le tropocollagène provient de l'assemblage de **3 chaînes de collagène alpha** (2 chaînes alpha 1 et une chaîne alpha 2) sous forme d'hélice droite. Les fibrilles de collagène présentent un diamètre oscillant entre 40 et 160 nm, et les fibres associées de cet assemblage ont un diamètre de 800 nm

environ. Ces fibres sont agencées pour former un maillage à l'intérieur de la matrice extracellulaire, favorisant aussi bien à l'adhésion cellulaire que le développement de tissu osseux, par fixation de la fraction minérale sous forme de cristaux d'hydroxyapatite.

Pour la **fraction non collagénique**, 25% des protéines non-collagéniques sont des dérivés exogènes, incluant l'**α2-HS-glycoprotéine** impliquée dans le développement de l'os, permettant par leurs propriétés acides de lier les cristaux et l'**albumine du sérum**. Le reste des protéines non collagéniques est composé de facteurs de croissance, tels que le **facteur de croissance transformant β (TGF- β)** et les **protéines de morphogénèse osseuse (BMP)** en exemple. On pourra également retrouver des glycoprotéines ayant un rôle structural. La glycoprotéine majoritairement présente dans l'os est la phosphatase alcaline.

D'autres **protéines non collagéniques** ont un rôle majeur dans la synthèse ou le remodelage osseux. La **sialoprotéine osseuse (BspII)** par exemple permet aux ostéoblastes une adhérence à la matrice osseuse, l'**ostéocalcine** est une protéine pouvant se lier aux cristaux d'hydroxyapatite et activer ces mêmes cellules, alors que l'**ostéopontine** permet l'adhérence à la matrice des ostéoclastes. Enfin l'**ostéonectine** est la protéine non collagénique la plus présente, représentant environ 2% de la fraction protéique retrouvée dans l'os en croissance, servant de lien entre les cristaux minéraux en se liant à la fraction collagénique.

➤ **Matrice minérale**

L'espèce majoritairement représentative de la fraction minérale est l'**hydroxyapatite** $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, avec des taux faibles de carbonates, de magnésium et de phosphate acide. Les cristaux d'hydroxyapatite retrouvés dans le tissu osseux sont de petite taille, mesurant environ 20 nanomètres.

La **maturation de la matrice minérale** est associée à l'**expression de la phosphatase alcaline** et de plusieurs protéines non-collagéniques, incluant l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse 2 (BspII). Ces protéines, liant le phosphate ou le calcium, participent à la régulation d'un dépôt ordonné de minéraux en faisant varier la taille et le nombre des cristaux d'hydroxyapatite formés.

1.1.4. Formation et développement de l'os

Durant les étapes précoces du **développement embryonnaire**, le squelette consiste en un **mélange de membranes fibreuses et de cartilage hyalin**. Entre la sixième et la septième semaine du développement débute le processus de **développement osseux**, l'ossification (ou l'ostéogénèse) commence. Les **deux voies ostéogéniques** sont **l'ossification endochondrale** et **l'ossification intramembraneuse**.

Le tissu osseux est un **tissu de remplacement**, il utilise un modèle tissulaire sur lequel se reposer pour permettre une apposition de la matrice minérale. Dans le développement du squelette, le modèle utilisé est le plus souvent le cartilage, et donnera lieu à l'ossification endochondrale.

1.1.4.1 Ossification endochondrale

Dans **l'ossification endochondrale**, l'os se développe en **remplaçant le cartilage hyalin**. Le cartilage ne devient pas directement de l'os, il sert de modèle pour être progressivement et complètement remplacé par de l'os néoformé. L'ossification endochondrale a une chronologie plus longue que l'ossification intramembraneuse.

Dans les os longs, par exemple, entre 6 et 8 semaines après conception, quelques cellules souches mésenchymateuses se **différencient en chondrocytes** (cellules du cartilage), formant le **squelette cartilagineux**, précurseur des os (**Figure 2a**). Peu après, le **périchondre**, membrane recouvrant le cartilage, apparaît (**Figure 2b**).

A mesure que de la matrice est synthétisée, les chondrocytes au centre du cartilage grandissent en taille. Puis, après calcification de la matrice, les nutriments n'atteignent plus les cellules. Ceci résulte en leur mort et en la **désintégration du tissu cartilagineux** environnant. Les **vaisseaux sanguins** envahissent alors les espaces créés, apportant avec eux des **cellules ostéogéniques**.

A mesure que le cartilage grandit, des **capillaires le pénètrent**, transformant le périchondre en **périoste** et produisant le tissu osseux. Les ostéoblastes forment un **collier périostéal** d'os compact au niveau de la diaphyse autour du cartilage. Au troisième mois de la vie fœtale, le développement des cellules du compartiment osseux et l'ossification s'accroissent en créant un **centre d'ossification primaire**, où l'ossification débute (**Figure 2c**).

Alors que ces changements profonds apparaissent, les chondrocytes contenus dans le cartilage continuent de croître aux extrémités de l'os (formant les futures **épiphyses**), augmentant la taille de l'os en longueur en même temps que l'os remplace le cartilage au niveau des diaphyses. Lorsque le squelette fœtal est complètement formé, le cartilage subsiste uniquement au niveau des articulations comme **cartilage articulaire** et entre les épiphyses et diaphyses comme **plateau épiphysaire**, responsable de la **croissance longitudinale de l'os**. Après la naissance, la même séquence d'évènements apparaît dans les régions épiphysaires, et chacun de ces centres d'activité est alors appelé **centre d'ossification secondaire** (**Figure 2e**).

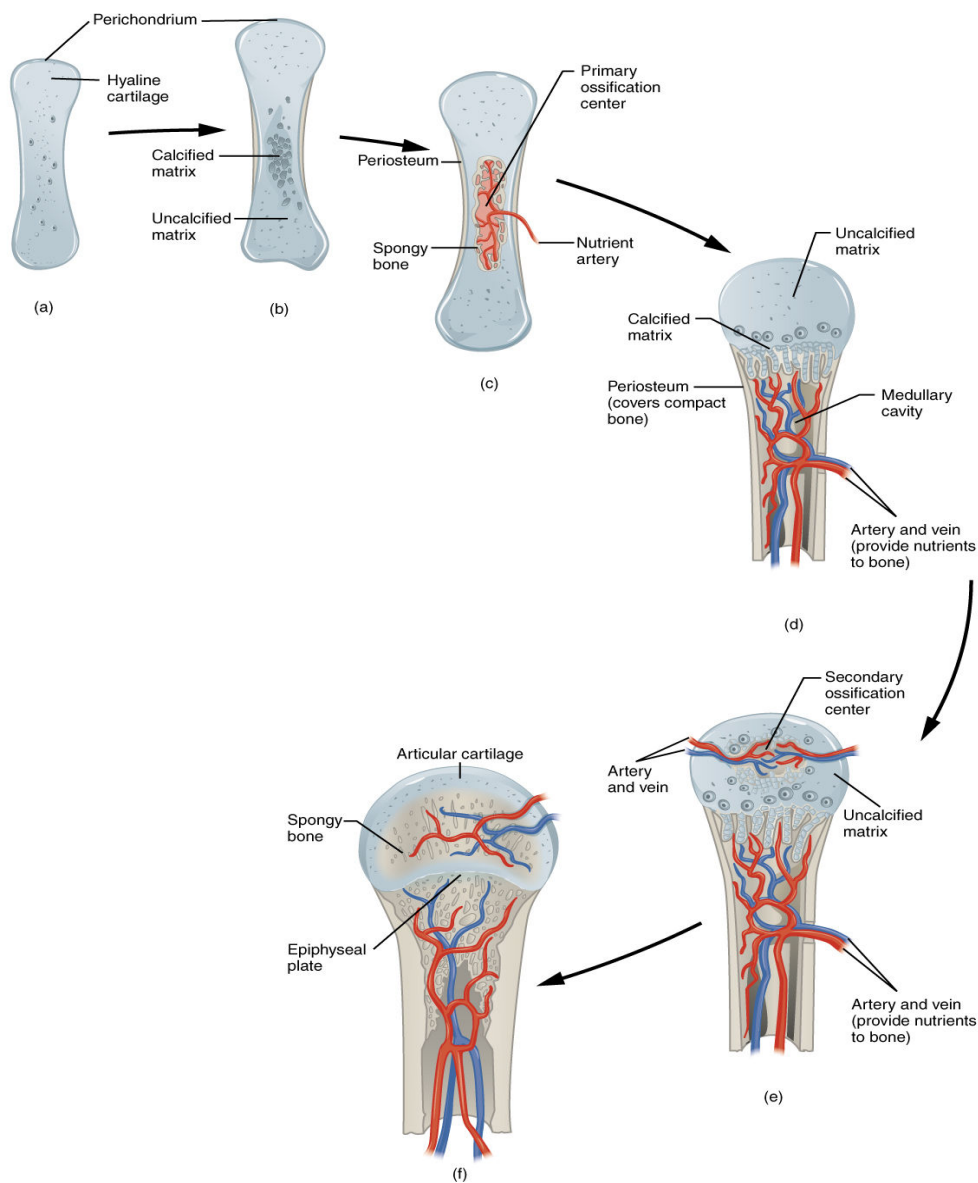


Figure 2: Les différentes étapes de l'ossification endochondrale (source : opentextbc.ca)

1.1.4.2 *Ossification intramembraneuse*

Durant l'**ossification intramembraneuse**, les os compacts et spongieux se développent directement à partir de **feuillets mésenchymateux** (indifférenciés) de tissu conjonctif. La plupart des os crâniens, les os plats de la face, et les clavicules sont formés via un tel procédé. Le processus commence quand les cellules mésenchymateuses du squelette embryonnaire se rassemblent entre elles pour amorcer une différenciation en cellules spécialisées (**Figure 3a**). Certaines de ces cellules se différencieront en cellules **ostéogéniques** donnant par la suite des ostéoblastes quand d'autres deviendront des **capillaires**. Même si ces cellules vont être déployées pour former du tissu osseux, les ostéoblastes précoces apparaissent d'abord en amas appelés **centres d'ossification**.

Les ostéoblastes sécrètent de l'**ostéoïde**, **matrice initialement non calcifiée**, se calcifiant en quelques jours à mesure que des sels minéraux se déposent dessus et piégeant les ostéoblastes. Une fois emprisonnés, les ostéoblastes deviennent des ostéocytes (**Figure 3b**). Pendant que les ostéoblastes se différencient en ostéocytes, les cellules ostéogéniques environnantes se différencient elles en ostéoblastes.

L'ostéoïde sécrété autour du capillaire résulte en une **matrice trabéculaire**, alors que les ostéoblastes à la surface de l'os spongieux deviennent le **périoste** (**Figure 3c**). Le périoste synthétise alors une couche protectrice d'os compact autour de l'os trabéculaire, qui condense les vaisseaux sanguins avoisinants, pouvant aboutir à de la moelle rouge (**Figure 3d**).

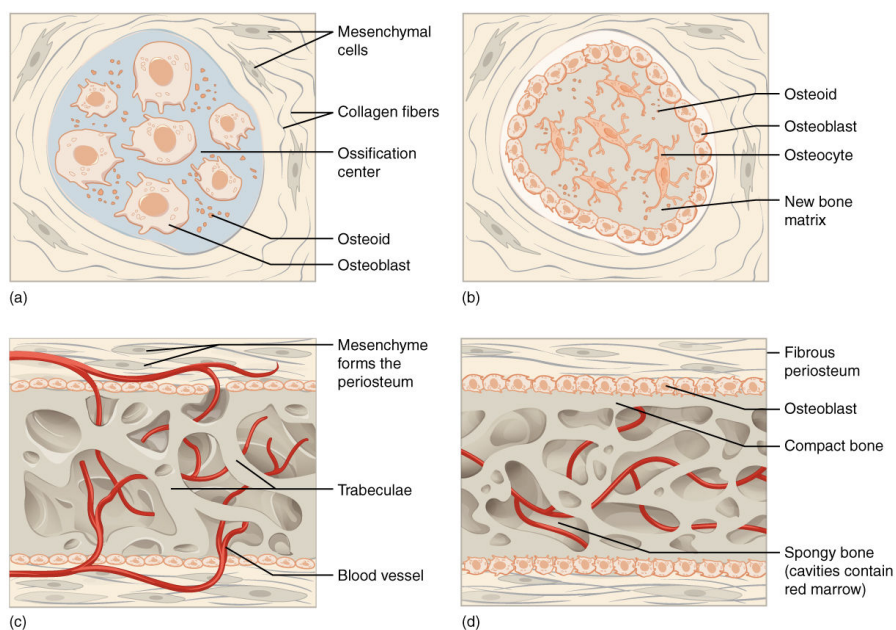


Figure 3: Les différentes étapes de l'ossification intramembraneuse (source : opentextbc.ca)

L'ossification intramembraneuse commence durant la vie *in utero* dans le développement du fœtus et continue jusqu'à l'adolescence. A la naissance, le crâne et les clavicules ne sont pas totalement ossifiés, et les os crâniens ne sont pas soudés, permettant au crâne et aux épaules de se déformer à la naissance. Les derniers os s'ossifiant via l'ossification intramembraneuse, sont les os plats de la face, qui atteignent leur taille adulte à la fin des poussées de croissance.

1.1.5. Le processus de remodelage osseux

L'os compact et l'os spongieux sont des tissus osseux étant en **constant renouvellement**. Ce processus physiologique est appelé **remodelage osseux**. L'observation de ce tissu a permis d'élaborer la conception d'une unité fonctionnelle de remodelage, constituée de **deux parties** comprenant **un groupe ostéoblastique** et un **groupe ostéoclastique**, dont les activités métaboliques sont couplées aussi bien géographiquement dans le tissu que dans le temps. La **durée du cycle** de remodelage osseux s'étend entre **6 et 8 mois** pour un individu adulte, la phase de formation osseuse étant plus longue que la phase de résorption (**Figure 4**).

1.1.5.1 Phase d'activation

Le processus de remodelage est initié par la **phase d'activation**, faisant sortir le tissu osseux de l'état de quiescence par des **facteurs ostéorésorbants** (vitamine D3, prostaglandine E2 et hormone parathyroïde). Les cellules ostéogéniques bordantes se rétractent sous l'action de ces facteurs et **libèrent l'accès de la matrice extracellulaire** osseuse aux ostéoclastes qui vont pouvoir y adhérer.

L'afflux des ostéoclastes est favorisé par la prolifération de leurs précurseurs médullaires sous l'effet de plusieurs molécules, notamment du **M-CSF** (facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages, de l'anglais macrophage colony-stimulating factor).

Les **ostéoclastes matures** proviennent de la **fusion de pré-ostéoclastes** issus de précurseurs mononucléés, provenant eux-mêmes de monocytes activés par le facteur M-CSF sécrété par les ostéoblastes, en réponse à la vitamine D3 et à l'hormone parathyroïde. Les ostéoblastes sont donc des partenaires clés pour la différenciation et la maturation des précurseurs ostéoclastiques. Cette différenciation vers des ostéoclastes matures est dépendante de 3 molécules majoritairement : **RANK** (récepteur activateur du ligand du facteur nucléaire, de l'anglais Receptor Activator of Nuclear factor κ B), **OPG** (ostéoprotégérine) et **ODF** (facteur

de différenciation ostéoclastique, de l'anglais Osteoclastic Differentiation Factor). ODF, dans la membrane des ostéoblastes peut se lier à OPG sécrétée par ces mêmes cellules pour inhiber la différenciation des précurseurs ostéoclastiques, ou à RANK, situé dans la membrane de ces précurseurs pour permettre une activation la différenciation.

1.1.5.2 *Phase de résorption*

Chaque ostéoclaste activé se fixe à la matrice osseuse au niveau du site matriciel de résorption et cette phase de résorption est initiée. Cette phase est séquentielle et s'effectue en **deux étapes**: i) **dissolution de la phase minérale** par acidification du compartiment de résorption et ii) **dégradation de la matrice organique** sous l'action d'enzymes protéolytiques lysosomales.

La morphologie unique des cellules ostéoclastiques témoigne de leur rôle dans la destruction matricielle osseuse (ostéoclasie). La création d'un **anneau de scellage** permet l'isolement d'une chambre de digestion (ou **lacune de Howship**).

La membrane plasmique de la cellule ostéoblastique est polarisée avec un domaine apical, se différenciant en une **bordure à brosse**, comprenant une pompe à protons sécrétant des ions H^+ pour **dissoudre la fraction minérale de la matrice extracellulaire (MEC)** du plancher de la lacune. Cette action est accélérée par l'intermédiaire d'une sécrétion d'enzymes issues des lysosomes telles que la **collagénase**, des **hydrolases acides**, des **métalloprotéases** ou encore de la **cathepsine** qui vont permettre une résorption de la fraction organique de cette matrice en plus de la fraction minérale.

1.1.5.3 *Phase d'inversion*

Quand les ostéoclastes ont terminé de creuser la lacune, ils entrent en **apoptose** et sont progressivement **remplacés par les macrophages**, qui vont permettre de lisser le fond de celle-ci.

1.1.5.4 *Phase de formation*

L'**ostéoformation** se réalise en deux étapes, avec les ostéoblastes ayant un rôle clé : i) **production de MEC** par les ostéoblastes, ii) **minéralisation** de cette MEC.

Une fois la résorption de la MEC osseuse par les ostéoclastes terminée, les cellules ostéogéniques présentes à la surface de la matrice dégradée dans la lacune (appelée ligne cémentante), vont se différencier vers les ostéoblastes. Ces cellules différenciées vont pouvoir dès lors synthétiser de l'ostéoïde, comme expliqué auparavant, afin de combler la lacune. Plusieurs hormones vont permettre la stimulation de production de cette synthèse, notamment la vitamine D3, les androgènes et les oestrogènes.

De même, les ostéoblastes sécrètent plusieurs facteurs de croissance, qui seront stockés dans la MEC, et relargués durant les étapes de résorption pour agir de concert avec les hormones : les **BMPs**, **TGF- β** , **IGF** (facteur de croissance analogue à l'insuline, de l'anglais Insuline-like Growth Factor) et le **FGF2** (facteur de croissance des fibroblastes, de l'anglais Fibroblast Growth Factor). Ces derniers jouent un rôle pivot dans la synthèse osseuse par leur effet combiné sur le recrutement, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et de leurs précurseurs.

La minéralisation sera consécutive à ce dépôt d'ostéoïde. La phosphatase alcaline, enzyme synthétisée par les ostéoblastes, hydrolyse les esters phosphoriques et sera responsable de l'arrêt de la minéralisation. Les ostéoblastes produisent des vésicules servant de réserve pour cette enzyme et pour des ions qui, déversés dans le milieu extracellulaire, feront débiter la minéralisation du tissu ostéoïde en augmentant la concentration locale en ions calcium et phosphate. L'ostéocalcine augmente la concentration locale de calcium extracellulaire et le fixe sur le tissu ostéoïde. La vitamine D3 joue également un rôle important dans la mesure où elle favorise l'absorption intestinale du calcium et la fixation de celui-ci sur l'os.

1.1.5.5 *Phase de quiescence*

Après sécrétion de la MEC du tissu osseux par les ostéoblastes et minéralisation de cette matrice, les cellules vont différencier en **ostéocytes** terminaux et se retrouver **séquestrés** dans la matrice néoformée. Les ostéoblastes restant en périphérie vont entrer en apoptose ou adopter un phénotype de cellules bordantes. Elles vont empêcher les ostéoclastes d'entrer en contact avec la MEC du tissu osseux, et la phase de quiescence du tissu osseux est alors instaurée, achevant le remodelage osseux.

(Sources : dossier.univ-st-etienne.fr ; chups.jussieu.fr)

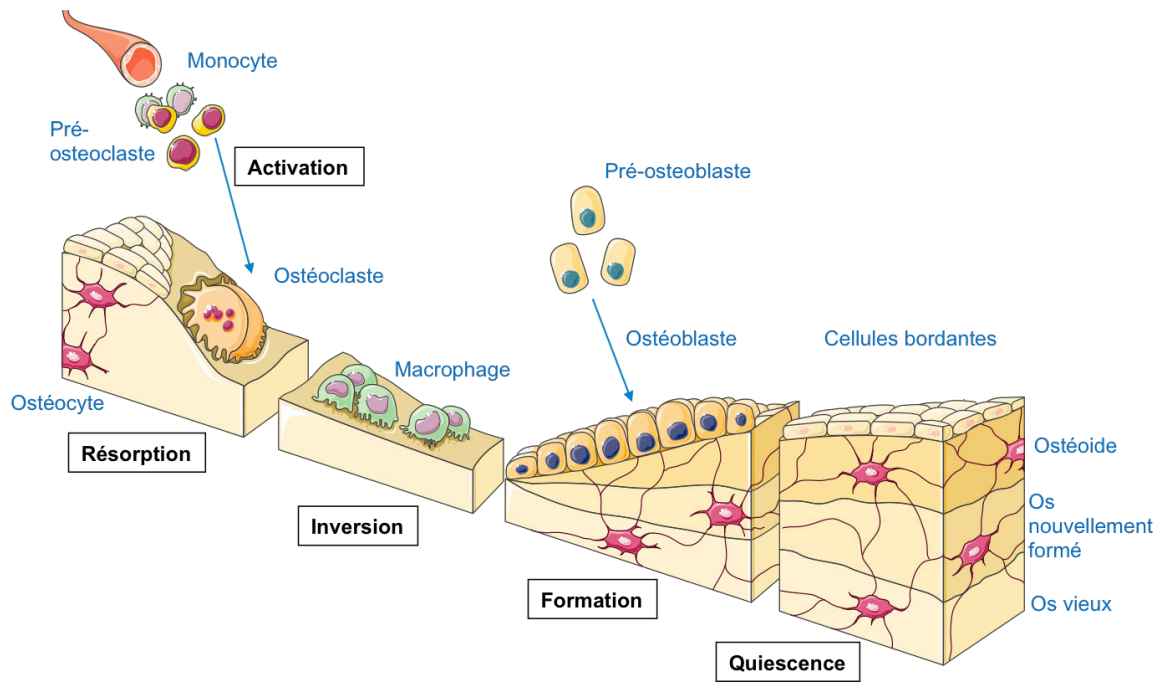


Figure 4: Les différentes étapes du remodelage osseux (source : Servier Medical Art)

1.2. Le tissu cartilagineux

1.2.1. Définition

Le tissu cartilagineux est un **tissu conjonctif spécialisé**, de consistance dure mais non minéralisé contrairement à l'os.

Le tissu cartilagineux présente la particularité vis-à-vis des autres tissus conjonctifs d'être intégralement **dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que de nerfs**. La plupart des cartilages sont **nourris par diffusion** à travers la matrice extracellulaire à partir des capillaires de la couche interne du périchondre. Tous les cartilages de l'organisme adulte sont **pourvus de périchondre** à l'exception des cartilages articulaires. Le périchondre est un tissu conjonctif formé de **fibroblastes** et d'un **réseau dense de fibres de collagène**. Contrairement au cartilage, le **périchondre** est un **tissu vascularisé** assurant un rôle nutritif, de croissance et de réparation pour le cartilage. Il est facile de comprendre alors que le tissu cartilagineux articulaire ne pourra pas se régénérer de lui-même suite à des dégradations.

Sous cette dénomination visiblement uniforme de « cartilage », il existe des cartilages très variés, aussi bien sur le plan moléculaire ou fonctionnel que topographique:

➤ **Les cartilages du système ostéoarticulaire**

- Des cartilages **hyalins** qui font partie des pièces osseuses :
 - cartilages de conjugaison
 - modèles cartilagineux des ébauches osseuses du squelette fœtal
 - cartilages costaux
 - cartilages articulaires
- Des cartilages **fibreux** qui sont situés au voisinage des pièces osseuses :
 - symphyse pubienne
 - disques intervertébraux
 - insertion du tendon d'Achille
 - ménisque du genou

➤ **Les cartilages des voies aériennes et de la sphère ORL**

- Cartilages **hyalins** présents au niveau :
 - fosses nasales
 - cartilage thyroïde, cricoïde et aryénoïde du larynx
 - anneaux trachéaux et cartilages bronchiques
- Cartilages **élastiques** présents au niveau :
 - nez
 - pavillon de l'oreille, conduit auditif externe, trompes d'Eustache
 - épiglotte

Par la suite, le propos de ce manuscrit concernera plus particulièrement le **cartilage hyalin articulaire** et le cartilage hyalin de conjugaison dans le système ostéoarticulaire.

Le cartilage articulaire (**Figure 5**) est une fine couche de tissu conjonctif spécialisé avec des **propriétés viscoélastiques uniques**. Sa principale fonction est de **pourvoir une surface lisse et lubrifiée** pour diminuer les forces de friction de l'articulation et de faciliter la transmission de poids vers l'os sous-chondral. C'est un cartilage unique dans sa capacité à supporter des cycles de charges, ne démontrant pas d'évidence de dommage ou de changement dégénératif. Ce tissu est donc crucial pour les propriétés biomécaniques du système squelettique.

Ce tissu conjonctif comporte **4 zones** pour le cartilage articulaire : i) une **zone superficielle** pour 10 à 20% de l'épaisseur totale du cartilage ; ii) une **zone de transition** d'une épaisseur de 40 à 60% du cartilage total ; iii) une **zone de prolifération** pour 30 à 40% de l'épaisseur

du cartilage ; iv) une **zone d'hypertrophie** pour 5 à 10% de l'épaisseur totale reposant sur l'os sous-chondral. Ces zones vont **définir la répartition des cellules** du compartiment cartilagineux, mais aussi **l'orientation des fibres** de la matrice extracellulaire et sa composition:

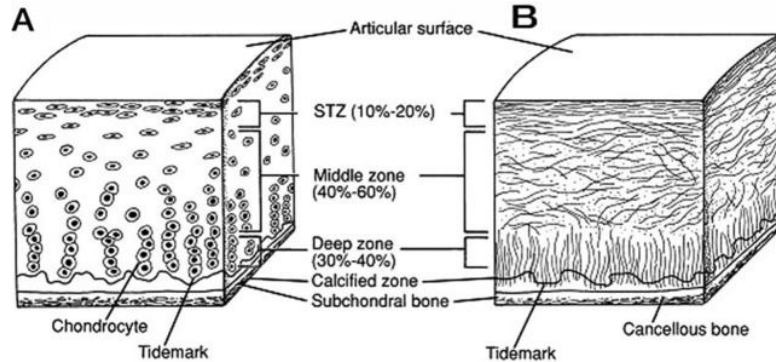


Figure 5: Représentation schématique du cartilage hyalin artériel (Sophia Fox et al., 2009)

A : organisation cellulaire dans les différentes zones du cartilage artériel. B : architecture des fibres de collagène

1.2.2. Les chondrocytes, cellules du compartiment cartilagineux

Les **chondrocytes** sont des **cellules résidentes** dans le cartilage artériel. Les chondrocytes proviennent de la **différenciation des cellules souches mésenchymateuses**, puis de la maturation des précurseurs de chondrocytes, appelés **chondroblastes**, et constituent environ 10% du volume total du tissu cartilagineux artériel. Ces cellules varient en taille, forme et nombre selon la région anatomique du cartilage artériel (voir section 1.2.3. détaillant la MEC de ce compartiment). Par exemple, les chondrocytes provenant de la zone superficielle sont plus petits et ont une densité plus importante que dans les couches profondes de la matrice.

En microscopie électronique, le chondrocyte est de forme **sphérique ou ovoïde**, mesurant entre 30 et 40 μm de diamètre. Ces cellules sont retrouvées dans des logettes au niveau de la MEC du cartilage, appelées **chondroplastes**. La densité de ces cellules dans le tissu cartilagineux varie en fonction du type d'articulation, la zone où ils se trouvent et l'âge de la personne. La couche superficielle est la plus chargée en cellules, et ce nombre diminue avec l'âge.

Le métabolisme des chondrocytes est inédit : il s'agit d'un des rares tissus à fonctionner en **hypoxie**, les cellules fonctionnant en **anaérobie**. Les chondrocytes ne migrent pas et ont une activité mitotique limitée dans le cartilage physiologique.

La nature avasculaire du cartilage fait intervenir une **nutrition** du tissu provenant du **liquide synovial**. Ce liquide ressemble à un dialysat sélectif du plasma, sélectif pour les protéines de haut poids moléculaire, et sert de lubrifiant pour l'articulation. Il empêche également le contact entre deux tissus cartilagineux articulaires.

En situation physiologique, les chondrocytes maintiennent **l'homéostasie du tissu cartilagineux**, entre la synthèse et la dégradation des protéines de structure de la matrice. Cette homéostasie est soumise à de nombreux facteurs : contraintes mécaniques ou encore facteurs de croissance (**TGF- β , IGF, FGF**). Ces facteurs vont réguler la synthèse de protéines matricielles, de protéases et d'inhibiteurs de protéases.

1.2.3. La matrice cartilagineuse

En plus des variations engendrées par les différentes zones du cartilage, la matrice extracellulaire consiste en un **ensemble de régions distinctes**, basées sur leur proximité avec les chondrocytes, leurs compositions et le diamètre des fibrilles de collagène. La matrice extracellulaire peut être divisée en trois régions, **péricellulaire**, **territoriale** et **interterritoriale** (Figure 6).

La **matrice péricellulaire** est une **membrane fine** adjacente à la membrane cellulaire des chondrocytes, l'entourant complètement. Elle contient **principalement des protéoglycanes**, des **glycoprotéines** et des **protéines non collagéniques**. Cette région joue un **rôle fonctionnel** en initiant des signaux de transduction dans le compartiment cartilagineux soumis à des contraintes mécaniques.

La **matrice territoriale** entoure la matrice péricellulaire et est composée de **fibres de collagène**, formant un **réseau en forme de panier** autour des cellules. Cette région est plus épaisse que la première et il a été proposé que cette matrice puisse prévenir les stress mécaniques et autoriser les charges mécaniques.

La **région interterritoriale** est la plus large des 3 régions matricielles. Elle **contribue** grandement aux **propriétés biomécaniques du cartilage articulaire**. Cette région est caractérisée par les **larges fibres de collagène** orientées selon leur localisation dans les

différentes zones : parallèles à la surface dans la zone superficielle, de manière oblique dans la zone de transition, et perpendiculaire à la surface dans la zone profonde. **Les protéoglycanes sont abondants** dans cette région matricielle.

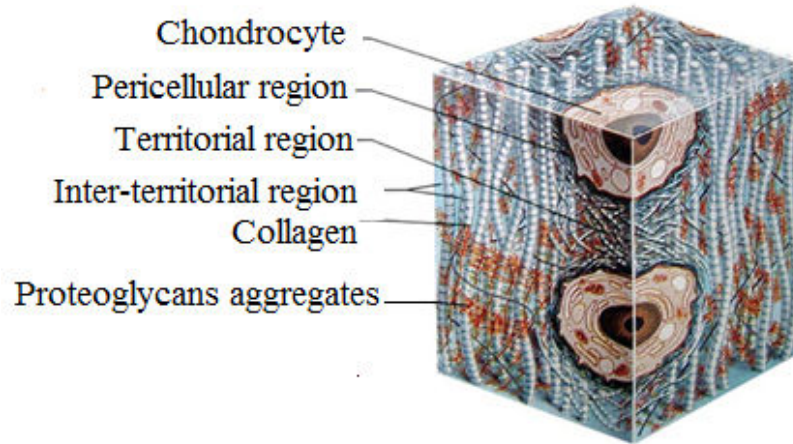


Figure 6 : La matrice extracellulaire cartilagineuse (Landínez-Parra et al., 2012)

Dans un cartilage articulaire physiologique, les **fluides tissulaires représentent 65 à 80 % du poids total**. Les différents collagènes et les protéoglycanes comptent pour la part restante. Plusieurs autres classes peuvent être trouvées en quantité moins importante dans cette MEC, incluant les lipides, les phospholipides, les protéines non collagéniques ainsi que les glycoprotéines.

➤ **L'eau**

L'eau est le **composant le plus abondant** du cartilage articulaire, représentant jusqu'à **80 % de son poids**. Le flux de l'eau à travers le cartilage et au travers de la surface articulaire aide à **transporter** et distribuer les **nutriments** aux chondrocytes, en plus d'assurer une **lubrification** de ce compartiment. Environ un tiers de cette eau est associée aux espaces entre les fibres de collagène, assurant une déformation de la matrice et donc du tissu.

➤ **Les collagènes**

Ces macromolécules assurent un **réseau**, de la même manière que pour la matrice extracellulaire osseuse. Le collagène le plus répandu dans ce tissu est le **collagène de type II**, représentant **25 % du poids humide**, et 95% des collagènes totaux du cartilage, formant des fibres entrecroisées avec des agrégats de protéoglycanes. Ce collagène apparaît sous deux formes : le **collagène de types IIa**, plus long, produit par les chondrocytes dans le

développement du tissu cartilagineux, et le **collagène de type IIIb**, produit dans le cartilage mature. Les autres types de collagène sont les **collagènes de type I, IV, V, VI, IX et XI** dans des proportions moindres. Il s'agit dans ce cas d'un homotrimère de chaîne polypeptidique alpha. Cette triple hélice assure les **propriétés mécaniques** du tissu cartilagineux, ainsi que sa **résistance à la compression**.

➤ **Les protéoglycanes**

Les **protéoglycanes** sont des protéines sous forme monomériques **hautement glycosylées**. Dans le cartilage articulaire, ces protéines représentent le **second groupe le plus représenté** des macromolécules dans la MEC, et comptent pour **10 à 15% du poids humide** de ce tissu conjonctif. Les protéoglycanes consistent en une structure protéique associée à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes linéaires, attachées de manière covalente, ou bien encore à l'acide hyaluronique. Ces chaînes peuvent être composées de plus de 100 monosaccharides, alignées perpendiculairement à l'axe des protéoglycanes, et étant séparées les unes des autres par répulsion stérique. Le cartilage articulaire contient une large variété de protéoglycanes, essentiels pour un fonctionnement physiologique comme l'**aggrécane**, les autres étant le **biglycane** et la **décorine**.

Le protéoglycane le plus large en taille et le plus abondant est l'**aggrécane**, possédant plus de 100 chaînes de sulfate de chondroïtine et une trentaine de chaînes de sulfate de kératine. Cette macromolécule est caractérisée par sa capacité à interagir avec l'acide hyaluronique (HA), pour former de larges agrégats de protéoglycanes avec des protéines de liaison. Cette aggrécane occupe **l'espace interfibrillaire de la MEC du cartilage**, et assure la pression osmotique du cartilage, critique pour résister à des charges compressives.

➤ **Les glycoprotéines**

Ce sont des **protéines non collagéniques**. Elles sont responsables de liaisons collagène-collagène, mais aussi collagène-protéoglycane. L'exemple donné est celui de la **chondroadhérine**, de la **fibromoduline**, ou encore la **fibronectine** et la **tenascine**.

➤ Enzymes protéolytiques

Des **métalloprotéases matricielles** et des **aggrécanases** sont également retrouvées dans la MEC du cartilage. Ces deux enzymes sont importantes dans la dégradation de la matrice au cours du remodelage du tissu cartilagineux.

1.2.4. Formation et développement du tissu cartilagineux : la chondrogenèse

La **chondrogenèse** est l'ensemble des évènements qui conduisent à la **formation du tissu cartilagineux** à partir de **cellules souches mésenchymateuses**. Ces cellules peuvent être obtenues de **trois sources cellulaires distinctes** : 1) les **cellules de la crête neurale** de l'ectoderme neuronal, pouvant former les os crânio-faciaux, 2) le **sclérotome du mésoderme para-axial**, qui aboutira à la formation du squelette axial et 3) les **somatopleures du mésoderme du plateau latéral**, aboutissant à la formation des os longs. Elle se déroule en plusieurs étapes (**Figure 7**):

1.2.4.1 Prolifération et condensation des cellules souches mésenchymateuses

Cette étape fait intervenir des interactions intercellulaires et des interactions entre les cellules et la MEC. Des protéines de jonction sont impliquées, telles que la **N-Cadhérine**, et la **N-CAM** (molécule d'adhésion cellulaire neuronale, de l'anglais Neuron Cell Adhesion Molecule). Les cellules expriment ici le **collagène de type I**.

1.2.4.2 Différenciation des cellules souches en chondroblastes

Différents facteurs de croissance endogènes paracrines, tels que le **TGF- β** , les **BMPs** et les **FGFs** vont permettre l'expression d'un facteur de transcription appelé **Sox9**. Ce facteur de transcription est un **facteur clé** dans la **régulation de la lignée chondrocytaire**. En régulant l'expression de deux autres facteurs de transcription, **Sox5** et **Sox6**, ils vont former le trio Sox qui va permettre la **bascule** entre l'expression du **collagène de type I et le collagène de type II**, constituant majoritaire de la MEC cartilagineuse.

1.2.4.3 *Maturation des chondroblastes en chondrocytes*

Les **chondroblastes** sont des cellules prolifératives, qui vont **secréter la MEC** du compartiment cartilagineux. Il y aura **production de collagène de type II**, mais aussi à ce niveau synthèse et production de protéoglycanes tels que l'**aggrécane**, majoritaire dans le cartilage articulaire.

1.2.4.4 *Hypertrophie chondrocytaire et différenciation terminale*

Les **chondrocytes** vont devenir par la suite **hypertrophiques**, et cesser leur prolifération. Ils expriment le facteur de transcription **Runx2**, le **collagène de type X**, des **métalloprotéases de la matrice** (comme MMP-13 pour la métalloprotéase matricielle-13) ainsi que la **fibronectine**.

1.2.4.5 *Ossification endochondrale*

Cette étape fait la transition entre le développement du tissu cartilagineux et son remplacement par le tissu osseux, comme expliqué dans la section précédente (I.1). La MEC est ici dégradée, et les chondrocytes hypertrophiques vont entrer en apoptose. La colonisation de vaisseaux sanguins, dans l'espace créé de cette apoptose, va recruter des progéniteurs ostéoblastiques, et il s'en suivra la synthèse de tissu osseux.

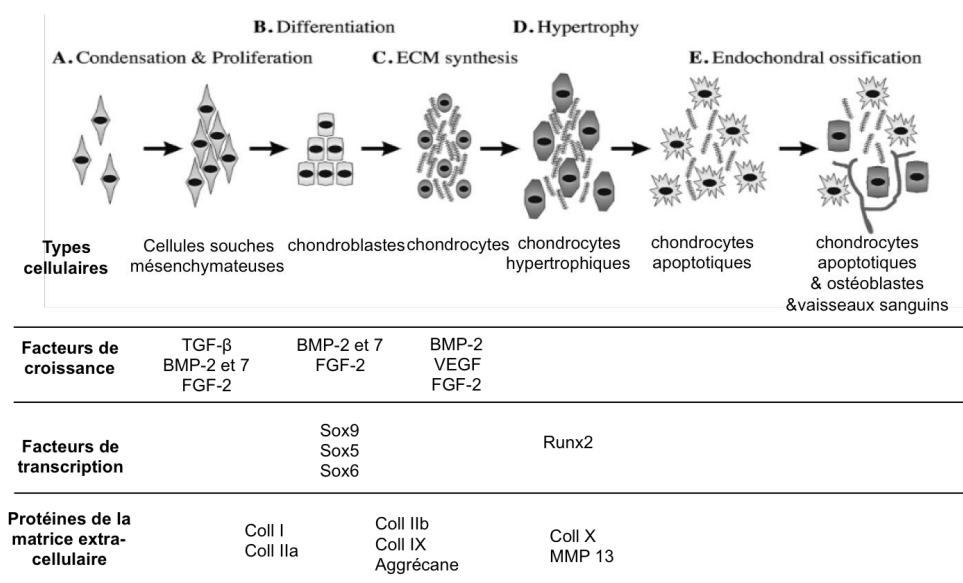


Figure 7: Représentation schématique du développement cartilagineux et osseux avec les différents signaux synthétisés. Adapté de Quintana et al., 2009 et de Kelc et al., 2013

1.2.5. Le remodelage cartilagineux

Le **remodelage** du tissu cartilagineux articulaire est **délicat** : le **renouvellement des collagènes** de ce tissu est **quasiment inexistant**, alors que celui-ci peut prendre **plusieurs centaines de jours pour les protéoglycanes**.

A l'instar du remodelage osseux expliqué auparavant, le remodelage cartilagineux fait intervenir des mécanismes complexes de régulation, impliqués dans le renouvellement et le remodelage de la MEC.

Dans ce tissu, les cellules résidant dans la MEC produisent des facteurs locaux tels que des **cytokines**, des **médiateurs inflammatoires** et des **enzymes dégradant la matrice**. Ces facteurs locaux peuvent stimuler ou inhiber la dégradation ou la formation par des échanges de signaux entre les cellules. Les cellules résidentes doivent agir de concert pour maintenir **l'homéostasie de la MEC**. Les principales classes de médiateurs impliqués dans la formation de la MEC et l'homéostasie cartilagineuse sont :

- **Des cytokines**

Ce groupe joue un rôle dans la **transduction de signal intracellulaire** et dans les interactions entre les cellules. Les **interleukines** sont les cytokines **les plus impliquées** dans le remodelage de la MEC du cartilage (Goldring et al., 1999), alors que les **facteurs de croissance** stimulent préférentiellement la **réplication cellulaire**, la différenciation et l'activation cellulaire pour former du nouveau cartilage (Guerne et al., 1995).

L'interleukine-1 (**IL-1**) et l'**IL-6** sont activées durant des dégradations pathologiques de la MEC du cartilage. L'IL-1 n'est **pas exprimée constitutivement** par les cellules, mais leur synthèse peut être **stimulée par des déclencheurs spécifiques**, souvent associés à des traumatismes locaux, comme des composés dégradant la matrice, d'autres cytokines relarguées par des cellules résidentes, ou des infections bactériennes (Mundy et al., 1992). Un des effets majeurs de l'IL-1 est la stimulation de la synthèse de monoxyde d'azote (**NO**), de prostaglandine E2 (**PGE2**), des métalloprotéases de la matrice, d'**IL-6** par les cellules résidentes. Toutes ces molécules agissent comme des **facteurs diminuant la synthèse cellulaire de la MEC du cartilage** (Westacott and Sharif, 1996). De plus, il a été montré que pour les ostéoblastes et les chondrocytes, **l'IL-1 affectait la synthèse de collagène**, de

phosphatase alcaline et **diminuait** directement la **synthèse d'aggrécane et de collagène**. Dans le cartilage, l'IL-6 stimule la production d'inhibiteur de métalloprotéases matricielles.

D'autres cytokines, comme le **TNF- α et β** (pour facteur de nécrose tumorale de l'anglais Tumor Necrosis Factor) peuvent être impliquées dans la **dégradation du cartilage** et la **résorption osseuse**. Cette cytokine est **produite par les macrophages**, mais également par d'autres cellules telles que les synoviocytes, les chondrocytes et les ostéoblastes. Le TNF- α démontre un **effet catabolisant sur la matrice du cartilage** et induit une chute de celle-ci par stimulation des métalloprotéases et de PGE2.

- **Des facteurs de croissance**

Plusieurs membres de la famille des facteurs de croissance peuvent contrebalancer l'effet catabolique induit par les cytokines en augmentant la synthèse des macromolécules de la matrice cartilagineuse. Le **principal facteur anabolisant est l'IGF-1**, promouvant la croissance et la synthèse matricielle par les cellules du cartilage articulaire (Fortier et al., 2011). Le **TGF- β** peut renverser l'effet catabolique de l'**IL-1** et peut augmenter la réparation du cartilage dans des tissus arthrosiques. La classe des **BMPs**, en particulier BMP-2 peut induire la formation de tissu osseux et cartilagineux (van den Berg, 2001). Les facteurs de croissance de la famille des **FGF** peuvent également réguler cette balance : le **FGF-18** augmente la prolifération des chondrocytes, tandis que le FGF diminue l'activité des enzymes responsable de la dégradation de l'aggrécane.

- **Des stimuli inflammatoires**

Les concentrations de **médiateurs inflammatoires**, comme le monoxyde d'azote **NO** et les prostaglandines sont **supérieures dans l'arthrose inflammatoire** et dans des processus pathologiques de résorption osseuse. La chondrogenèse et l'ossification endochondrale sont des processus de différenciation du cartilage différents, aboutissant à la formation et à la croissance du squelette, dans le développement et les réparations du squelette chez les organismes vertébrés. Ces processus sont contrôlés par de nombreux stress.

- **Des enzymes dégradant la matrice extracellulaire**

Les protéases sont des enzymes qui sont classées selon leurs sites actifs de catalyse : aspartique, cystéine, sérine et métalloprotéase matricielle. Ces enzymes sont produites et

stockées dans les cellules avant d'être sécrétées dans la matrice. Toutes ces enzymes sont **impliquées dans la résorption osseuse** par le biais des ostéoclastes, alors que les métalloprotéases matricielles (**MMP**) sont les enzymes les plus importantes pour la **dégradation de la MEC du cartilage articulaire** ; leur activité est donc fortement régulée dans des conditions physiologiques (Blain, 2007).

(Source : chups.jussieu.fr)

1.3. L'ingénierie tissulaire

L'**ingénierie tissulaire** est un **domaine interdisciplinaire**, qui applique les principes de l'**ingénierie** et des **Sciences de la Vie**, pour la création de biomatériaux actifs qui peuvent soit régénérer, restaurer, maintenir ou augmenter une fonction tissulaire ou l'organisme entier. De nombreux développements ont été réalisés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire durant les vingt dernières années. Ces dernières années, un **nombre croissant de produits commerciaux** issus de cette recherche utilisent différents types cellulaires comme par exemple les cellules souches ou les cellules progénitrices. Un assortiment de biomatériaux, aussi bien naturels que synthétiques, a aussi été utilisé comme des **échafaudages** pour la **délivrance cellulaire** ou comme des **constructions acellulaires**. Ce prochain chapitre traitera de l'historique de l'ingénierie tissulaire, son principe et les différentes solutions que l'ingénierie tissulaire peut offrir, notamment dans les pathologies osseuses ou ostéoarticulaires.

1.3.1. Définition

L'ingénierie tissulaire est un champ interdisciplinaire relativement jeune, mêlant médecine, biologie et ingénierie. Le terme « **ingénierie tissulaire** » fut utilisé pour la **première fois par Fung** de l'université de San Diego en 1985. Cependant, le domaine fut **officiellement défini** dans le premier meeting discutant des approches de l'ingénierie tissulaire en 1988 comme « l'application des principes et méthodes de l'ingénierie et des Sciences de la Vie vers la compréhension de la relation structure-activité dans les tissus normaux et pathologiques de mammifères et le développement de substituts biologiques pour restaurer, maintenir ou augmenter des fonctions » (Nerem and Sambanis, 1995).

L'ingénierie tissulaire a gagné par la suite de l'attention par l'article fondateur publié par Langer et Vacanti en 1993 dans la revue Science (Langer and Vacanti, 1993). Ils ont décrit

cette ingénierie, comme un procédé dans lequel les principes de la biologie et de l'ingénierie sont utilisés pour rassembler les cellules, les molécules biologiques et des matériaux pour augmenter ou remplacer des tissus endommagés. Un moment clé dans ce domaine fut l'étude de Cohen et ses collaborateurs, dans laquelle un modèle de polymère de la forme d'une oreille fut ensemencé avec des chondrocytes et implanté en sous-cutané sur le dos de souris (Cohen et al., 1993).

Traditionnellement, l'ingénierie tissulaire **utilise des constructions ensemencées avec des cellules** qui ont été cultivées dans des bioréacteurs puis implantées par la suite dans le corps. Il était attendu que les cellules prolifèrent alors et remplacent le biomatériau par sécrétion de composés de la MEC au fur et à mesure que le biomatériau d'origine allait être dégradé. Depuis le début des années 2000, des percées ont pu être faites dans ce domaine et ont apporté plusieurs produits sur le marché et en essais cliniques (Lysaght et al., 2008).

1.3.2. Principe de l'ingénierie tissulaire : le triangle d'or

Le **triangle d'or** est souvent utilisé pour conceptualiser l'ingénierie tissulaire (**Figure 8**). Il matérialise le **croisement** entre des **cellules d'intérêt**, un ou plusieurs **biomatériaux** formant le dispositif médical implantable ainsi que des **molécules biologiques**, pouvant être des protéines ou encore des facteurs de croissance.

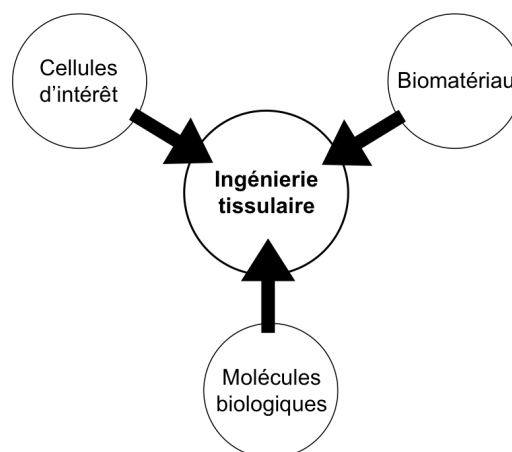


Figure 8: Le triangle d'or dans l'ingénierie.

L'ingénierie tissulaire regroupe deux ou trois constituants : les cellules, le biomatériau et les molécules biologiques

Les approches d'ingénierie tissulaire impliquent **au moins deux composants** de ces trois listés ci-dessus.

L'approche de l'ingénierie peut être adaptée à tous types de tissus visant un processus régénératif, le présent mémoire se concentrera davantage sur l'objet des travaux de recherche, concernant l'ingénierie tissulaire osseuse et ostéoarticulaire.

Chacun de ces composants fera l'objet d'une discussion ci-dessous. Des revues permettent d'établir un récapitulatif détaillé de ces composants dans l'ingénierie osseuse et ostéoarticulaire (Hollinger et al., 2004; Amini et al., 2012).

1.3.2.1 *Les prérequis pour le dispositif médical implantable*

De nombreux dispositifs médicaux, produits d'une variété de biomatériaux utilisant une large gamme de procédés de fabrications, ont été utilisés pour l'ingénierie tissulaire afin de régénérer différents tissus et organes dans le corps. Selon le tissu ciblé, il faut prendre en considération plusieurs paramètres clés dans la conception d'un dispositif médical pour des utilisations cliniques :

(i) **La biocompatibilité**

Le premier critère pour chaque dispositif médical est qu'il doit être **biocompatible**. Les cellules doivent pouvoir y adhérer, fonctionner normalement et migrer sur la surface, et éventuellement dans l'épaisseur du dispositif médical, en commençant à proliférer avant de synthétiser de la nouvelle MEC. Cette construction doit entraîner une réponse immunitaire négligeable, pour éviter des inflammations sévères, pouvant réduire ou induire un rejet de la part du corps humain.

(ii) **La biodégradabilité**

L'objectif de l'ingénierie tissulaire est de permettre aux cellules du corps humain de remplacer le dispositif médical implanté après une certaine période, selon le tissu ciblé. Ces dispositifs médicaux ne sont pas conçus pour être des implants permanents. Ils doivent donc être **biodégradables** pour permettre aux cellules de produire leurs propres matrices extracellulaires (Mikos et al., 1998). Les produits de dégradation des dispositifs médicaux ne doivent également pas être toxiques, et doivent pouvoir être évacués de l'hôte sans causer de dommages à d'autres organes.

(iii) Les propriétés mécaniques

Idéalement, le dispositif médical implantable doit avoir des **propriétés mécaniques adéquates** au site anatomique dans lequel il est implanté. Produire des dispositifs médicaux avec des propriétés mécaniques adéquates est l'une des grandes difficultés pour l'ingénierie de l'os et du cartilage. Pour ces tissus, le dispositif doit maintenir une **intégrité mécanique suffisante** pour supporter le remodelage du tissu (Hutmacher, 2000).

(iv) L'architecture du dispositif médical

L'**architecture du dispositif médical** est d'une grande importance. Ces dispositifs doivent avoir une structure sous forme de **pores interconnectés**, avec des pores de **taille adaptée** ainsi qu'une **grande porosité** pour assurer la colonisation cellulaire et la diffusion adaptée des nutriments et de l'oxygénation. Les produits de dégradation doivent également être capables d'être évacués du corps sans causer d'interférences avec d'autres organes. La limite de la dégradation du cœur du dispositif médical, consécutif à un manque de vascularisation et d'élimination des déchets du centre des dispositifs médicaux, est une préoccupation majeure dans le domaine de l'ingénierie tissulaire (Ko et al., 2007; Phelps and Garcia, 2009).

(v) Les techniques de production

Pour qu'un dispositif médical particulier puisse être envisagé pour une investigation clinique ou une commercialisation, il doit être **possible** de réaliser un **transfert technologique** entre les recherches de laboratoire et une production d'un lot en petite quantité. Le développement d'un dispositif médical à une échelle étendue respectant les bonnes pratiques de fabrication (BPF) est une étape critique pour assurer la translation de stratégies d'ingénierie tissulaire vers la clinique (Hollister, 2009).

1.3.2.2 Les cellules dans l'ingénierie tissulaire

Dans le contexte de l'ingénierie tissulaire osseuse et ostéoarticulaire, la **régénération est conduite physiologiquement par les cellules progénitrices** qui sont capables de former de nouveaux ostéoblastes ou chondrocytes. Ces progéniteurs peuvent arriver du **tissu natif environnant** au site endommagé, ou encore être apportés de **manière exogène** comme une partie de l'ingénierie tissulaire mentionnée ci-dessus.

Une considération importante concernant la **délivrance *ex vivo* de cellules** est leur provenance : elles sont soit **autologues** (récoltées directement chez le patient à opérer), ou **allogéniques** (récoltées chez une personne de la même espèce). Il y a trois stratégies thérapeutiques principales pour traiter un tissu biologique endommagé ou pathologique :

(i) Implantation de cellules isolées

Avec cette stratégie, des populations cellulaires peuvent être directement transplantées, ou des cellules peuvent être cultivées *in vitro* pour accroître leur nombre *ex vivo* avant une réimplantation.

(ii) Implantation d'une construction assemblant des cellules et un dispositif médical

Dans le contexte de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative, l'utilisation de cellules isolées n'est pas limitée au remplacement de cellules endommagées. Une autre méthode consiste à délivrer une **combinaison de cellules isolées ou cultivées *ex vivo*** sur un **dispositif médical** (Kim et al., 2010). Les implants cellularisés sont souvent réalisés en utilisant des **systèmes de culture *in vitro* en 3D**. Ces systèmes peuvent utiliser des cellules primaires du tissu à régénérer, des cellules souches/progénitrices isolées, ou des lignées cellulaires immortalisées.

(iii) Régénération tissulaire *in situ* par des cellules natives

L'isolement et la croissance de cellules souches autologues furent considérés comme étant le futur de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative. Cependant, des limites de coût et de temps de croissance ont amené à repenser le recrutement de cellules natives vers les sites tissulaires endommagés. Pour pouvoir moduler la migration et la différenciation appropriée de progéniteurs endogènes, des **molécules thérapeutiques capables d'affecter les signaux de régulation** de protéines, impliquées dans certaines cascades de signalisations, peuvent être délivrées localement. Le domaine de la **délivrance contrôlée de molécules thérapeutiques**, *via* des biomatériaux adaptés pourra donc remédier à cette limite.

1.3.2.3 Les molécules biologiques dans l'ingénierie tissulaire

Les **molécules biologiques** utilisées pour l'ingénierie tissulaire peuvent avoir **plusieurs formes ou finalités**. Il peut par exemple s'agir de molécules capables de **moduler un processus inflammatoire**. Dans l'ingénierie tissulaire osseuse, des facteurs de croissance peuvent également être utilisés, d'autant plus si l'emploi de cellules souches est envisagé, pour **permettre une différenciation** cellulaire vers la nature souhaitée. Des méthodes pour intégrer ces molécules biologiques aux dispositifs médicaux seront choisies pour les préserver de dégradations trop précoces et diminuer leur quantité, afin de négliger la survenue d'effets secondaires. Les différentes stratégies d'utilisation de facteurs de croissance dans l'ingénierie tissulaire, osseuse et ostéoarticulaire, seront développées dans les prochaines parties.

1.3.3. Les différentes générations de dispositifs médicaux apportées par l'ingénierie tissulaire

Pour permettre une discussion autour des biomatériaux utilisés dans les dispositifs médicaux implantables, il revient de placer ceux-ci dans leur contexte. En effet, l'espérance de vie des pays développés était de 45 ans au début du XX^{ème} siècle en France, quasi-doublant pour atteindre 80 ans à la fin du siècle dernier (Vallet-Regí, 2010). L'accroissement de la population mondiale et l'allongement de l'espérance de vie de l'espèce humaine, a augmenté considérablement l'utilisation de biomatériaux, ce domaine ayant gagné une importance économique et une croissance à un fort taux (Huebsch and Mooney, 2009). Durant les 60 dernières années, des avancées concernant les biomatériaux furent considérables, et trois différentes générations ont pu émerger :

➤ **Première génération : biomatériaux inertes**

Cette première génération de biomatériaux inertes vit le jour dans les années 1950, avec la considération que les biomatériaux devaient être inertes ou **provoquer une réaction minimale avec le tissu de l'hôte** une fois implantés. Des dispositifs médicaux, développés à l'origine pour d'autres industries telles la mécanique, l'aérospatiale, l'automobile et l'industrie chimique, étaient utilisés sur le corps humain.

Une des applications de la première génération de biomatériaux à être utilisée en orthopédie fut le remplacement total de la hanche. La tige fémorale utilisée à l'époque était constituée

d'acier inoxydable (AISI 316), utilisée pour cette application en raison de ses **propriétés de résistance à la compression mécanique et de résistance à la corrosion**. Cependant, l'utilisation en clinique a démontré des contraintes, notamment des **corrosions localisées** et des **usures sévères** au contact entre la tête fémorale et l'acétabulum (Zavaglia and Prado da Silva, 2016). Ces biomatériaux sont aujourd'hui utilisés dans des implants temporaires.

D'autres exemples de matériaux polymériques inertes furent envisagés pour ces biomatériaux de première génération, il s'agit du **polyéthylène**, du **polyuréthane**, du **polypropylène** et des **caoutchoucs de silicone** (Park and Bronzino, 2002). Les caoutchoucs de silicone ont été utilisés pour remplacer des articulations de doigts chez des patients atteints d'arthrose, avec un succès mitigé en raison de fractures, peu après implantation. Ces fractures étaient causées par des mécanismes mécaniques associés à des **dégradations** de la chaîne d'élastomère par des **infiltrations de fluides corporels** et possible réaction enzymatique.

Le polyéthylène de haut poids moléculaire, a été le polymère inerte ayant rencontré le plus grand succès, avec une grande résistance à l'usure. Il est utilisé à l'heure actuelle en orthopédie pour les articulations (principalement pour des implants de genou et prothèse d'acétabulum de hanche).

➤ **La seconde génération : biomatériaux bioactifs et résorbables**

La seconde génération de biomatériau a vu le jour au début des années 1970, du constat que de nombreuses applications biomédicales requéraient des **biomatériaux pouvant interagir avec les tissus de l'hôte**. La raison principale de l'émergence de ce concept a découlé de l'observation que, lors d'applications d'implants orthopédiques, les implants étaient entourés de tissus fibreux, dû à une réponse immunitaire (principalement gouvernée par les macrophages), **empêchant une intégration efficace avec l'os** (ostéointégration). Cette situation est souhaitée pour les implants temporaires, mais pas pour les permanents.

Le pionnier dans l'étude des matériaux de deuxième génération fut Hench (Hench and Cao, 1996), qui a développé des **verres bioactifs, verres biocompatibles** qui ont la **capacité de se lier chimiquement à l'os**. La composition des bioverres a été par la suite largement utilisée et étudiée. Hench a décrit 4 **types de réactions possibles** :

- Si le matériau est toxique, le tissu environnant meurt.
- Si le matériau est non toxique et biologiquement inactif (inerte), un tissu fibreux d'épaisseur variable se forme.
- Si le matériau est non toxique et biologiquement actif (bioactif), une liaison se forme à l'interface.
- Si le matériau est non toxique et se dissout, le tissu environnant le remplace.

Il est connu que les **caractéristiques de surface** du biomatériau implantable sont **cruciales** par rapport à ses interactions avec l'environnement biologique dans lequel il sera implanté (Amini et al., 2012; Motamedian et al., 2015). La **topographie de surface** à différentes échelles (nanométrique et micrométrique), la **composition** de cette surface, le **type de protéines** qui vont adhérer à la surface, la **structure des couches du biomatériau** sont des **paramètres** qui vont **influer sur les interactions** de l'implant avec les cellules et les micro-organismes.

Les **polymères biocompatibles de deuxième génération** sont ceux pouvant supporter les fonctions mécaniques pendant un temps, puis être **dégradés et remplacés** par le tissu osseux de l'hôte (Henkel et al., 2013). Leurs **produits de dégradation**, substances simples et non toxiques (eau, CO₂), sont **éliminés par le métabolisme normal des patients**, sans le recours à une seconde chirurgie pour retirer l'implant. Initialement, ils étaient utilisés pour des **sutures internes**, puis dans de **petits dispositifs** pour des petites fractures de la main et des os de la face. Des exemples de ces polymères sont le **PLLA** (polymère d'acide (L)-lactique), le **PGA** (polymère d'acide glycolique), le **PLGA** (copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique) ou encore le **PCL** (poly (ε-caprolactone)).

➤ **La troisième génération : biomatériaux capables de stimuler une réponse au niveau moléculaire du tissu**

La troisième génération de biomatériaux est apparue au début de ce siècle et a introduit le concept de la **médecine régénérative**. Au lieu de remplacer des tissus endommagés dans le corps humain, l'objectif ici est de développer des systèmes qui encouragent la régénération des tissus. Grâce à une connaissance affinée du fonctionnement des systèmes biologiques, il est envisagé que les biomatériaux soient capables de **stimuler une ou plusieurs fonctions des cellules formant les tissus**.

L'ingénierie tissulaire implique l'utilisation de **diverses molécules et cellules**, combinant l'avantage de la science des matériaux et des traitements pour produire la régénération tissulaire, dans des situations où les cellules du patient n'ont pas la capacité de régénérer le tissu avec le temps (Hutmacher et al., 2007). Ceci nécessite l'application des principes d'ingénierie pour créer un dispositif permettant l'étude, la restauration, la modification et des interactions entre des tissus fonctionnels, naturels ou synthétiques (Henkel et al., 2013). Le développement de cette génération de biomatériau a permis la **régénération de tissus vivants du patient**, par la culture de cellules saines sur des structures biorésorbables, servant de matrice pour un soutien physique et comme substrat adhésif pour la croissance de cellules isolées.

Dans l'ingénierie osseuse et osteocartilagineuse, les différentes générations de biomatériaux cités précédemment peuvent avoir toute leur importance en fonction de l'avancée de la lésion endommageant les tissus. Si cette **lésion** est de **petite taille**, il sera possible d'utiliser différentes combinaisons entre des **biomatériaux**, des **cellules** et des **facteurs de croissance** pour induire une régénération du tissu. Si la taille de cette **lésion** est **plus grande**, il faudra utiliser des biomatériaux permettant un **comblement du tissu endommagé**, et si la taille de la **lésion dépasse une valeur seuil**, il restera **l'alternative de la prothèse** pour remplacer directement le tissu endommagé. La **Figure 9** permet une compréhension de cette ingénierie en fonction de la lésion considérée :

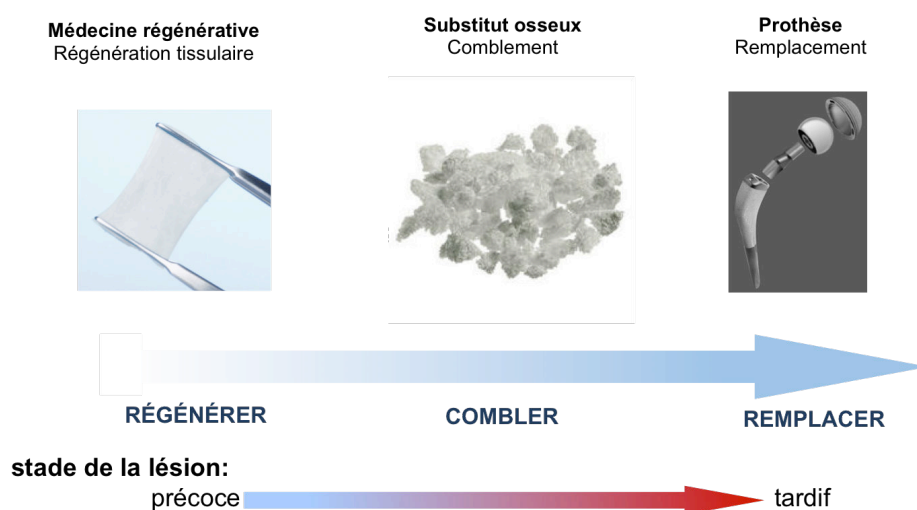


Figure 9: Les solutions proposées par l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse (sources : geistlich.fr ; medicalexpo.com ; adorthopedie.com)

1.4. Cadre réglementaire concernant les médicaments de thérapies innovantes

Etant donné l'essor de l'ingénierie tissulaire, de nombreuses constructions pourraient aboutir à de réelles percées dans le domaine médical. Ces voies de traitements rentrent dans un **cadre réglementaire** toutefois **complexe**, ancien au niveau français (les premiers textes datant de 1996), mais plus récent au niveau européen (directive de 2004 et règlement de 2007), imposant de revoir les définitions et les bases règlementaires du cadre national. Ces changements vont impacter à plusieurs niveaux la réglementation et les régimes d'autorisation en France pour les produits eux-mêmes, et pour les établissements qui développent et souhaitent exploiter ces produits du fait notamment de l'évolution des standards et référentiels de fabrication, qui vont passer des bonnes pratiques tissus cellules par exemple vers les bonnes pratiques de fabrication applicable aux médicaments.

Malgré les efforts de communication sur le continent européen de l'agence européenne du médicament (EMA) (European Medicines Agency en anglais) ou encore au niveau national avec le Leem (les entreprises du médicament) avec l'agence nationale de sécurité du médicament (ANSM), ce cadre règlementaire reste encore méconnu des acteurs, notamment des structures académiques et des TPE/PMEs.

1.4.1. Règlement européen sur les thérapies innovantes

Etabli en 2007 sur le continent européen (CE n°1394/2007), mais rentré en vigueur le 30 décembre 2008 en France, le règlement relatif aux médicaments de thérapies innovantes a considérablement remodelé le cadre règlementaire applicable aux différentes avancées thérapeutiques, employant des mécanismes d'actions ou activités liés au gènes, aux tissus ou aux cellules.

- Ce règlement confirme pour les **spécialités pharmaceutiques**, les produits de **thérapie génique**, de **thérapie cellulaire**, de **l'ingénierie tissulaire**, et aux **médicaments combinés de thérapie innovante**, le statut de **médicament**.
- Ce règlement n'interfère pas avec les principes fondamentaux cités dans la directive 2004/23/CE relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, le contrôle, l'obtention, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des cellules et tissus humains, mais y confère des exigences accrues.

1.4.2. Les différents types de produits

L'instauration du règlement au niveau européen voit émerger **trois grands types de produits** à l'heure actuelle, assortis chacun d'un cadre réglementaire spécifique :

(i) Les médicaments de thérapie innovante (MTI). Cette définition couvre aussi bien les médicaments de thérapie génique que les médicaments de thérapie cellulaire somatique, les médicaments issus de l'industrie tissulaire et cellulaire et les médicaments combinés de thérapie cellulaire (MTI avec un dispositif médical (DM)). Ils suivent le règlement européen n°1394/2007 et sont régulés soit au niveau national pour les essais cliniques, soit au niveau européen pour leur autorisation de mise sur le marché (AMM) ainsi que le suivi après autorisation.

(ii) Les médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement (MTI-PP). Ce sont des MTI conçus pour un **état membre uniquement**. Ils sont soumis au même régime que les MTI en Europe mais **ne nécessitent pas de procédure centralisée d'enregistrement** d'AMM, suivant donc le cadre réglementaire national, qui n'est autre que les règles communautaires transposées au niveau local en matière de qualité et de sécurité. En France, ce type de produit a été introduit dans le code de la santé publique par la loi n°2011-302 de mars 2011.

(iii) Les préparations. Elles concernent les **produits cellulaires ou tissulaires** (autologues ou allogéniques) à **finalité thérapeutique**. Ce ne sont pas à proprement parler des médicaments de thérapie innovante, et contrairement aux MTI et aux MTI-PP ce ne sont pas des médicaments, mais des produits de santé, sous l'autorité de l'ANSM et réglementés au niveau national par la directive 2004/23/CE.

La diversité des cadres réglementaires pour ces produits ayant la même finalité d'assurer la qualité et la sécurité d'emploi pour les patients, il faudra déterminer au plus vite le type de produit pour tenir compte de la législation en vigueur.

Les différences entre les trois types de produits sont les suivantes:

Le produit sera un MTI ou MTI-PP en fonction de deux critères :

- Si des modifications substantielles sont réalisées au cours de la production de cellules, le produit sera alors un MTI et ne pourra pas être une préparation.

- Si les cellules ou les tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) mêmes(s) fonction(s) essentielle(s) chez le donneur et chez le receveur, alors le produit est un MTI et ne pourra pas être une préparation.
- Si l'une de ces conditions n'est pas vérifiée, alors le produit est un MTI (ou un MTI-PP), sinon il est une préparation cellulaire/tissulaire.

1.4.3. Mise en application des médicaments de thérapie innovante

1.4.3.1 Différents types de médicaments de thérapie innovantes

Il y a quatre types de MTI définis selon le règlement européen :

(i) Les médicaments de « thérapie génique »

Il faut que le médicament satisfasse à l'une des caractéristiques suivantes :

- a) Il contient une **substance active** qui contient ou constitue un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique ;
- b) Son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou du produit de l'expression génétique de cette séquence.

(ii) Les médicaments de « thérapie cellulaire somatique »

Il faut que le médicament satisfasse à l'une des caractéristiques suivantes :

- a) Il **contient ou consiste en des cellules ou des tissus qui ont fait l'objet d'une manipulation substantielle de façon à modifier leurs caractéristiques biologiques**, leurs fonctions physiologiques ou leurs propriétés structurelles, ou des cellules ou tissus qui ne sont pas destinés à être utilisés pour la ou les même fonctions essentielles chez le receveur et le donneur ;
- b) Il est présenté comme possédant des propriétés permettant de traiter, prévenir ou de diagnostiquer une maladie à travers l'action métabolique, immunologique ou pharmacologique de ses cellules ou tissus, ou est utilisé chez une personne ou administré à une personne dans une telle perspective.

(iii) Les médicaments « issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire »

Il faut que le médicament satisfasse à l'une des caractéristiques suivantes :

- a) Les **cellules ou tissus ont été soumis à une modification substantielle, de façon à obtenir des caractéristiques biologiques**, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, la réparation ou au remplacement recherchés ;
- b) Les cellules ou les tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et le donneur.

(iv) Les médicaments « combinés de thérapie innovante »

Ce sont des médicaments de thérapie innovante, donc des médicaments de thérapie cellulaire, génique ou d'ingénierie tissulaire, qui satisfont aux conditions suivantes:

- a) Ils intègrent dans leur composition **un ou plusieurs dispositifs médicaux** au sens de l'article 1^{er}, paragraphe 2, point a) de la directive 93/42/CEE, ou bien **un ou plusieurs dispositifs médicaux implantables actifs** au sens de l'article 1^{er}, paragraphe 2, point c) de la directive 90/385/CEE.
- b) Leur **partie cellulaire ou tissulaire doit contenir des cellules ou des tissus viables** ; ou leur partie cellulaire ou tissulaire contenant des cellules ou des tissus non viables doit être susceptible d'avoir sur le corps humain une action qui peut être considérée comme essentielle par rapport à celle des dispositifs précités.

1.4.3.2 Mise sur le marché d'un médicament de thérapie innovante

Comme pour tout médicament ou spécialité pharmaceutique, les **MTI** devront obtenir une **autorisation de mise sur le marché (AMM)**, qui sera obtenue pour ces produits obligatoirement par une procédure centralisée d'autorisation au niveau européen. Cette autorisation est **octroyée** après évaluation de **l'agence européenne du médicament (EMA)**. L'évaluation est **réalisée** par le **comité des médicaments à usage humain (CHMP)** (Committee for medicinal products for human use en anglais) en collaboration avec le comité des thérapies avancées (CAT), comité d'experts chargé de l'évaluation de la qualité, de la sécurité et de l'efficacité des MTI.

Pour les **médicaments combinés de thérapie innovante** incluant des dispositifs médicaux ou des dispositifs médicaux implantables actifs, ces dispositifs doivent satisfaire aux exigences essentielles énoncées dans les directives 93/42/CEE et 90/385/CEE. Ils **devront obtenir le marquage CE** (pour conformité européenne), délivré par un organisme notifié.

Pour obtenir l'apposition du **marquage CE** sur un dispositif médical, le fabricant ou l'importateur doit réaliser, ou faire réaliser, des vérifications de conception, ou des contrôles, ou des essais qui assurent la **conformité du produit aux exigences essentielles de sécurité et de santé (EESS)**, définies selon les directives concernées. De plus, l'obtention de l'AMM pour un médicament combiné de thérapie innovante nécessite que **l'ensemble des molécules utilisées** dans le processus d'**élaboration** de ceux-ci, ou de **modification du dispositif médical** soient **approuvées par des autorités compétentes** (l'EMA en Europe, ou plus largement la FDA pour Food and Drug Administration aux Etats-Unis). Si ce n'est pas le cas, des procédures supplémentaires pour autoriser l'utilisation de certaines molécules seront à prévoir.

1.4.3.3 *Fabrication d'un MTI*

Les **MTI** étant considérés comme des médicaments, ils doivent être **fabriqués conformément aux bonnes pratiques de fabrication (BPF)** applicable aux médicaments à usage humain.

Si l'établissement est situé en France, celui-ci devra être un **établissement pharmaceutique autorisé par l'ANSM**. Cette nécessité s'applique **dès le premier essai clinique**. La directive européenne et la loi française sur les recherches biomédicales prévoient que **tout lot de médicament expérimental doit être certifié par une personne compétente**, qui attestera que le médicament expérimental a été fabriqué dans le respect des **bonnes pratiques de fabrication**, dans un établissement autorisé.

Les **dispositions réglementaires** impliquant les médicaments combinés de thérapies innovantes ou les médicaments de thérapies innovantes, doivent être **considérées au moment de l'élaboration de chaque construction, orientant le fabricant** ou les laboratoires de recherche, dans la démarche à entreprendre si une construction se révèle prometteuse, pour lui permettre de continuer le processus clinique en vue de l'obtention de l'AMM.

(Source : ansm.sante.fr/content/download/40916 consulté le 05/06/17)

Cette partie a permis de définir deux types de tissus conjonctifs différents que sont le tissu osseux et le tissu cartilagineux et d'introduire le concept d'ingénierie tissulaire, domaine de la médecine visant la restauration de ces tissus physiologiques. Elle a également permis de mettre en perspective le champ d'application réglementaire des recherches concernant l'ingénierie tissulaire. Les prochaines parties concerneront les axes étudiés pour permettre une régénération du tissu osseux et ostéocartilagineux, mais aussi pour le comblement osseux de lésions osseuses étendues.

2. Stratégies pour la nanomédecine régénérative osseuse et cartilagineuse

Cette partie consiste à définir un des volets du travail de thèse qui a pour but de développer des stratégies pour la nanomédecine régénérative osseuse et ostéoarticulaire. Il conviendra ici de détailler les différentes pathologies pouvant bénéficier de cette approche, et les moyens pour permettre d'y remédier.

2.1. Les pathologies osseuses et cartilagineuses

2.1.1. Les pathologies chroniques

Dans l'enquête santé et protection sociale (ESPS) réalisée en 2012, les **troubles ostéoarticulaires** sont les **premiers sur la liste des 14 maladies chroniques** proposées dans l'enquête avec respectivement les lombalgies et autres atteintes chroniques du dos pour 19,2% de la population et l'arthrose hors colonne vertébrale pour 14,3%. Les **pathologies chroniques** affectant l'**appareil locomoteur** sont donc **fortement représentées** en France et ailleurs dans le monde. Deux pathologies de cet appareil, l'arthrose et l'ostéoporose y seront détaillées.

➤ **Arthrose**

L'arthrose est caractérisée par un **rétrécissement du cartilage articulaire**, pouvant aller jusqu'à disparaître. L'arthrose est à part entière un processus pathologique, résultant de la destruction et de la réparation du cartilage, il n'est pas entièrement imputable au vieillissement des personnes. La cause du déclenchement de ce processus arthrosique est un **excès de pression** exercée sur le cartilage, aboutissant à deux types de réactions :

- a) **Réaction mécanique** : l'excès de pression va détruire le maillage de collagène de la matrice cartilagineuse, le tissu va alors se gorger d'eau et se fragiliser. Il va par la suite se fissurer, former des ulcères et finir par se rétracter et enfin se fragmenter, les fragments se retrouvant dans la cavité articulaire.
- b) **Réaction biologique** : cet excès de pression va rendre les chondrocytes hyperactifs, synthétisant à la fois des protéoglycanes mais également des enzymes détruisant la matrice cartilagineuse.

Si dans le processus arthrosique, le cartilage est la première cible, d'autres constituants de l'articulation seront également atteints par la suite. La **membrane synoviale** va ainsi créer un **état inflammatoire** pour tenter de dégrader les fragments de cartilage dans la cavité articulaire. Cet état inflammatoire pourra aboutir à un épanchement synovial. **L'os sous-chondral** pourra, dans certaines zones, réagir à l'excès de pression en s'épaississant et créer de l'os néoformé, appelé **ostéophyte**. A mesure que le cartilage sera dégradé, l'os sous-chondral pourra être atteint et être également dégradé à son tour.

(Source : rhumatologie.asso.fr).

➤ **Ostéoporose**

L'ostéoporose associe, aussi bien sur le plan anatomo-pathologique une **diminution d'épaisseur de l'os cortical** qu'une **diminution d'épaisseur des travées osseuses** de l'os spongieux, et des **modifications de l'architecture osseuse**. L'os restant est toutefois normalement minéralisé. Cette raréfaction osseuse, donnant des troubles de l'architecture osseuse, aboutit à une **fragilisation de l'os**, favorisant les fractures pour des traumatismes minimes. Pour le seul pays des Etats-Unis, le nombre de fractures de poignets est évalué à 250000 cas par an, alors que le nombre de tassements vertébraux ostéoporotiques s'élève lui à 1 million par an.

Chez la femme ménopausée, la baisse du taux d'oestrogènes modifie la balance de l'équilibre phosphocalcique et il sera observé une hyperrésorption ostéoclastique non compensée. Chez le sujet âgé, quel que soit son sexe, la carence en calcium et en vitamine D induit une hyperparathyroïdie réactionnelle qui va stimuler également anormalement la résorption osseuse, entraînant également l'ostéoporose.

L'acquisition du capital osseux et l'épaisseur des travées osseuses se constituent lors de l'adolescence, essentiellement dans la période pré-pubertaire. Ce gain de masse osseuse

dépend de l'activité physique et des apports calciques, mais est également génétiquement déterminé. Une mauvaise acquisition de ce capital osseux pourra expliquer pourquoi, chez certains malades, l'ostéoporose survient précocement.

La confirmation du diagnostic d'ostéoporose est faite par **ostéodensitométrie osseuse**, permettant de mesurer **la densité minérale osseuse (DMO)**.

(Source : chu-toulouse.fr).

2.1.2. Les pathologies aiguës

En dehors de pathologies chroniques pouvant s'installer sur des années, il y a des pathologies à la chronologie plus courte. Les deux pathologies listées ci-après peuvent également être explorées pour la régénération tissulaire.

➤ **Les défauts focaux cartilagineux**

Les défauts focaux cartilagineux sont des **lésions cartilagineuses de taille variable** comme pour l'arthrose. Elles sont souvent dues à des traumatismes, comme par exemple une rupture de ligament qui va exposer l'os, frottant la surface chondrale de l'os opposé, pouvant détacher complètement une portion de cartilage.

Ces lésions focales ne sont pas à négliger, une étude de cohorte réalisée en Norvège a démontré que les scores spécifiques de douleurs aux genoux étaient sensiblement comparables entre des patients ayant des lésions focales aux genoux et des patients ayant une arthrose à un stade avancé, candidats pour une prothèse de genou (Heir et al., 2010).

➤ **Fracture osseuse**

Une **fracture osseuse** est une condition dans laquelle il y a une **rupture dans la continuité osseuse**. D'étiologies multiples, dues soit à un accident, l'ostéoporose ou à la répétition d'efforts le plus souvent chez le sujet athlétique, cette pathologie est l'une des pathologies les plus communes, souvent associée à des coûts de traitement excédant les milliards de dollars, une perte de productivité économique ainsi qu'une invalidité personnelle (Bonafede et al., 2013).

Les fractures peuvent être de **plusieurs types**, passant de la fracture ouverte à la fracture en spirale, et concerner potentiellement tous les os du corps humain. L'**os**, au contraire du cartilage, est un **tissu capable de se régénérer de lui-même**. Jusqu'à une certaine limite de

taille, il est possible d'assister à une guérison spontanée d'une fracture si les conditions le permettent.

Différents stades sont impliqués dans la **cicatrisation osseuse**, qui se **régénère par l'ossification endochondrale**, à l'instar du développement des os longs (**Figure 10**). Le premier, consécutif à la fracture, est la formation d'un **hématome**, provenant des berges osseuses entourant le site fracturé et initiant la réponse de guérison. En 48 heures, le chimiotactisme va attirer des cellules inflammatoires, nécessaires pour promouvoir le processus de cicatrisation. Puis, un **tissu de granulation** est formé entre les fragments, permettant la **vascularisation de l'hématome**. Les **cellules progénitrices** à l'intérieur de ce tissu vont proliférer et commencer à se différencier en **fibroblastes** et en **chondroblastes**. Ces cellules vont produire la MEC de tissu fibreux et cartilagineux, formant un **cal ostéocartilagineux**, qui donnera un **cal osseux** suite à la colonisation par les **ostéoblastes**. Celui-ci sera sensible aux forces de cisaillement, alors que des forces de traction et de compression axiales permettent la production matricielle. Ce cal entrera dans un processus de **remodelage** durant plusieurs mois par la suite, pour permettre une consolidation du cal avec l'os. Les temps de guérison varient sensiblement selon l'os considéré et l'âge du patient, les patients jeunes guérissant plus rapidement que les adultes. Afin de maximiser le processus de guérison osseuse, il est préférable d'immobiliser le lieu de fracture pour le stabiliser au moyen d'un plâtre ou d'une attelle pendant 3 à 8 semaines :

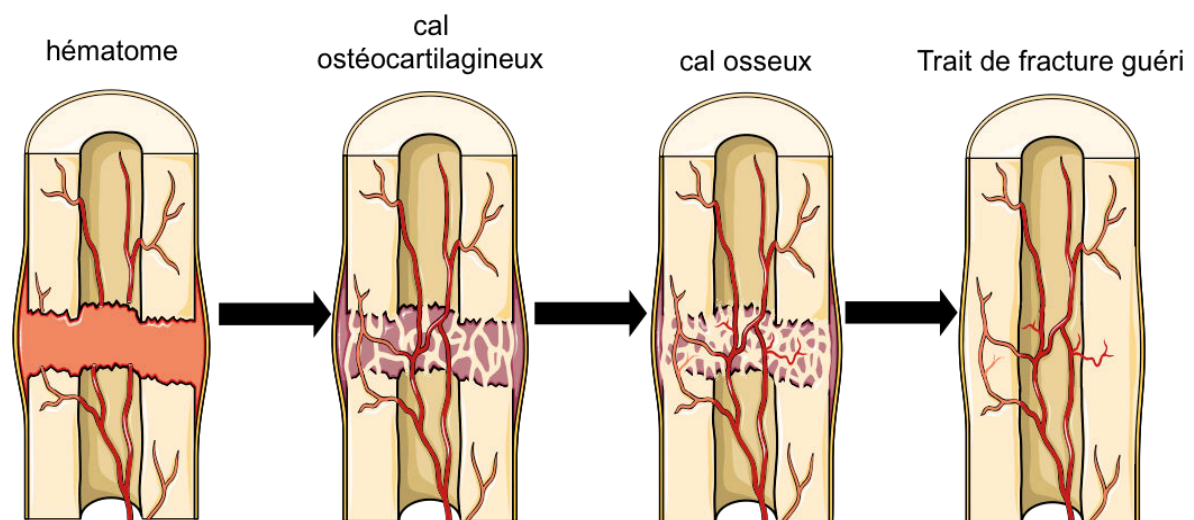


Figure 10: Représentation schématique du processus de cicatrisation osseuse spontanée
(source : Servier Medical Art)

Certaines fractures ne pourront cependant pas guérir spontanément, en raison de leur sévérité ou de leur localisation. Il faudra alors avoir recours à la chirurgie pour permettre un guidage

de la guérison, utilisant des plaques, vis ou encore broches permettant l'immobilisation des fragments osseux.

➤ **Pseudarthrose ou fracture non consolidée**

En dépit d'une bonne stabilisation de l'os fracturé, 5 à 10% des fractures guéries présenteront des défauts de consolidation entre les deux fragments, c'est ce qu'on appelle la pseudarthrose (Buza and Einhorn, 2016).

La pseudarthrose est constatée après expiration du délai habituel de cicatrisation osseuse et constatation radiographique, incitant à penser que la consolidation sera impossible malgré la poursuite de l'immobilisation. Il y a deux types principaux de pseudarthroses, hypertrophiques et atrophiques :

- **Les pseudarthroses hypertrophiques** : elles sont rares pour les fractures fermées et concernent surtout les fractures ouvertes. Les extrémités osseuses sont scléreuses et condensées à la radiographie et sont élargies en forme de pattes d'éléphant. Les fragments ne parviennent pas à se rejoindre et l'espace n'arrive pas à se combler d'os.
- **Les pseudarthroses atrophiques** : dans ces cas plus rares, il n'y a pas de trace d'activité cellulaire au niveau des extrémités osseuses. Celles-ci sont effilées, arrondies et ostéoporotiques.

La cicatrisation osseuse est un mécanisme complexe qui implique plusieurs évènements coordonnés. Il est accepté que les vaisseaux sanguins et le flux sanguin apportent de l'oxygène et des nutriments, mais les cellules et certains facteurs de croissance sont également importants dans ce processus (Carano and Filvaroff, 2003). Une **vascularisation altérée** peut souvent se produire après un traumatisme, mais également dans des conditions pathologiques représentant des comorbidités (par exemple le diabète ou encore chez le fumeur). Cette altération peut compromettre la cicatrisation de l'os, retardant celle-ci, ou causant des **pseudarthroses**, représentant un poids pour les patients ainsi que des coûts de santé augmentés. Assurer un apport sanguin adéquat pour cette cicatrisation représente un réel challenge clinique et représente donc un axe thérapeutique prometteur.

Quand des études sur la cicatrisation de l'os ont lieu, il faut prendre en considération la **taille critique**, à partir de laquelle cette cicatrisation des deux fragments osseux n'est plus possible de par l'hôte lui-même. Cette taille critique est propre à chaque espèce selon l'os considéré. Si

une **lésion osseuse dépasse cette taille critique**, les **apports vasculaires** ainsi que la **progression de la vascularisation ne permettront plus d'initier la cicatrisation osseuse** de manière convenable, et des évènements de pseudarthrose pourront alors apparaître. Il faudra alors chercher à combler le défaut osseux, cette partie sera détaillée dans le prochain volet concernant les stratégies pour le comblement osseux. Cette taille critique sert donc d'outil au moment de la décision de la conduite à tenir pour pouvoir régénérer une fracture osseuse.

2.2. Les solutions thérapeutiques actuelles dans la régénération osseuse et ostéoarticulaire.

Pour pallier les différentes contraintes exprimées dans la description des différentes pathologies, hormis pour les fractures dépassant la taille critique, explicitées dans la prochaine sous-partie, plusieurs axes de réflexion peuvent être envisagés pour permettre une diminution de la douleur liée à des lésions osseuses ou ostéochondrales, ou augmenter le processus de guérison pour les pathologies arthrosiques, ostéoporotiques et pour les lésions osseuses. Il sera détaillé ici les solutions non pharmacologiques, les recommandations pharmacologiques ainsi que les traitements chirurgicaux pouvant être employés pour remédier aux différentes pathologies.

2.2.1. Mesures non médicamenteuses

Elles concernent ce qui peut être entrepris pour limiter la progression de la maladie, ou soulager la douleur liée à celle-ci. Ces mesures concernent plus les pathologies chroniques comme l'ostéoporose et l'arthrose.

Pour la pathologie de l'arthrose, nous avons pu voir qu'elle impliquait une pression excessive au niveau des articulations, installant une dégradation progressive du cartilage.

Plusieurs mesures peuvent donc être envisagées afin de ralentir la progression de cette pathologie. La **réduction de poids du patient** lui permettra de diminuer la pression exercée sur les articulations de la hanche et du genou, retardant la survenue de complications. La **kinésithérapie** ou la **balnéothérapie** peuvent également être conseillées. De plus, des **exercices aquatiques**, de l'**aérobic** ainsi qu'un **renforcement musculaire** des membres inférieurs ont pu démontrer une augmentation fonctionnelle des patients souffrant d'arthrose du genou (Mattos et al., 2016). Ce dernier point peut également être appliqué pour les patients

ostéoporotiques, pour maintenir leur tonus musculaire. Une **stimulation nerveuse électrique transcutanée** permet aussi de réduire la douleur liée à la locomotion des patients. Des **orthèses** peuvent également être portées par les patients de jour comme de nuit pour immobiliser des articulations douloureuses ou inflammatoires, et des chaussures avec des semelles amortissantes peuvent réduire la compression mécanique du genou et de la hanche. Enfin, le **suivi par un physiothérapeute** permettra également de comprendre les gestes du quotidien qui peuvent être réalisés et ceux à proscrire, et des **dispositifs d'assistance** pourront être envisagés, comme une canne, un déambulateur pour diminuer les contraintes mécaniques des articulations.

Ces mesures ne sont pas des traitements en soi, mais la diminution de la douleur et l'amélioration de la qualité de vie pour les patients doivent être systématiquement discutées pour permettre une progression de la pathologie la moins rapide et évolutive.

2.2.2. Traitements pharmacologiques

Pour la **pathologie arthrosique**, la pharmacologie décrira principalement des molécules permettant de **traiter les symptômes inflammatoires** et la **douleur liée** à cette pathologie. Des **antalgiques simples** pour les douleurs légères à modérées pourront être utilisés ou des **anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)** en usage oral ou en utilisation topique sur l'articulation douloureuse. Une **infiltration**, injection de corticoïde d'action lente ou rapide, directement au niveau de l'articulation pourra exercer ses propriétés anti-inflammatoires et antalgiques. Il est aussi possible de réaliser des **injections d'acide hyaluronique**, de **glucosamine** et/ou de **chondroïtine sulfate** pour soulager les symptômes et des **produits viscoélastiques** pour augmenter la viscosité de l'articulation et diminuer les symptômes. D'autres médicaments, des **anti-arthrosiques d'action lente** peuvent être prescrits pour préserver le cartilage, comme par exemple le sulfate de chondroïtine ou encore de la glucosamine par voie orale. Pour les douleurs sévères, des **antalgiques opiacés** seront préconisés.

Pour la **pathologie ostéoporotique**, les traitements médicamenteux ont pour but **de prévenir les fractures** (et non d'augmenter la densité minérale osseuse). Ils sont remarquablement efficaces à condition qu'ils soient pris convenablement, que les précautions d'administration soient respectées et que leur durée de prise soit suffisante. Leur niveau de prévention des fractures ostéoporotiques est supérieur à celui proposé pour les traitements de

l'hypertension, prémunissant du risque d'infarctus ou d'accident vasculaire cérébral (50% contre 30%). Plusieurs thérapeutiques sont alors envisagées:

- **Le raloxifène** : C'est un **modulateur spécifique du récepteur à l'oestradiol** (SERM, de l'anglais Specific Estradiol Receptor Modulator). Cette classe a été développée pour garder les effets bénéfiques des oestrogènes sur le tissu osseux en freinant la résorption osseuse sans impacter d'autres tissus. Ce médicament diminue le risque de fracture vertébrale, mais pas celui des fractures de la hanche.

- **Les bisphosphonates** : Ces molécules, analogues au pyrophosphate, **inhibent l'activité des ostéoclastes**. Ils ont une mauvaise absorption digestive et sont rémanents (se fixent sur les tissus osseux pour plusieurs mois).

- **Le téraparatide** : C'est un dérivé de l'hormone parathyroïdienne qui **stimule la formation osseuse**. Il est le **seul médicament anabolisant actuellement disponible dans le traitement de l'ostéoporose**. Il stimule la formation d'os, ainsi qu'une amélioration de la microarchitecture de l'os. Il permet un recrutement accru des préostéoblastes et une diminution de l'apoptose des ostéoblastes.

- **Le dénosumab** : Il s'agit d'un anticorps monoclonal qui **inhibe la résorption osseuse** par une action dirigée contre une voie activatrice des ostéoclastes (le ligand du récepteur Rank). Ce médicament est indiqué chez des personnes ayant été traitées par des bisphosphonates.

En dehors de ces traitements pharmacologiques, il faut également mentionner la possibilité de supplémenter les patients avec un cocktail vitamino-calcique, contenant du calcium apporté soit par l'alimentation (laitages, eaux riches en calcium), ou bien de la vitamine D sous forme d'ampoules. Cet apport va permettre une augmentation de l'absorption intestinale du calcium, un déficit de cette hormone étant responsable d'effet hypocalcémiant, augmentant le risque de fracture ostéoporotique chez les patients. Une supplémentation en vitamine D permet également de réduire une hyperparathyroïdie secondaire, diminuant les phénomènes de remodelages osseux.

2.2.3. Traitements chirurgicaux

La présente liste de méthodes chirurgicales sera établie principalement pour les lésions au niveau du cartilage, pour des pathologies aiguës majoritairement, ou chronique dans le cas

de l'arthrose, ainsi que pour les lésions osseuses non-consolidées. En effet, la pathologie ostéoporotique n'implique pas de traitement chirurgical, sauf s'il y a des fractures, mais cet aspect sera développé dans la prochaine partie concernant les fractures.

Dans le cadre de traitements chirurgicaux impliquant des lésions focales du cartilage ou pour l'arthrose, trois techniques chirurgicales sont les plus recommandées : la technique de **microfracture**, la **mosaicplastie** et l'**implantation de chondrocytes autologues**.

➤ **La technique de microfracture**

Cette technique fut développée au début des années 1990 par Steadman (Steadman et al., 1999). Il a été recommandé que les **micro-trous générés** soient distribués sur l'intégralité de la lésion du cartilage articulaire, avec une distance de **3-4 millimètres entre deux trous**, et à une **profondeur de 4 millimètres**. Les trous générés ont un diamètre allant de 0,5 à 1 millimètre. L'avantage particulier de cette technique est qu'elle est peu onéreuse et réalisable par arthroscopie, et ne crée que de petits dommages tissulaires. L'importance de créer des trous de petite taille et d'impacter l'os sous-chondral, a pour but de stimuler le sang et la moelle osseuse, qui ne sont pas présents en temps normal dans le compartiment cartilagineux et qui vont grâce à cette technique y avoir accès et pouvoir former un caillot sanguin.

Le **recrutement de la moelle osseuse** va permettre aux cellules souches d'avoir accès au niveau du cartilage microfracturé. Le tissu cartilagineux régénéré sera sous forme de **fibrocartilage**, ayant des propriétés biomécaniques moins importantes (diminution de la viscoélasticité et de la lubrification) et non plus de cartilage hyalin, mais jugées acceptables par les concepteurs de la procédure chirurgicale comparées au cartilage endommagé.

➤ **La mosaicplastie**

L'**autogreffe ostéochondrale**, ou **mosaicplastie** implique la récolte de bouchons ostéochondraux d'une zone non portante afin de remplir des lésions impliquant toute l'épaisseur du cartilage ou de l'os sous-chondral. Les premières publications concernant cette technique furent les études pionnières réalisées par Matsusue et al. (1993) et Hangody et al. (1997). Les bouchons ostéochondraux récupérés doivent remplir la majorité de la zone lésée (entre 60 et 80%).

Il est important que la **récolte** ou l'**implantation** des bouchons soient réalisées avec un **angle de 90° par rapport à la surface du cartilage** articulaire, pour permettre une **adaptation maximale**. Les bouchons sont de forme cylindrique et peuvent avoir un **diamètre de 6 à 9** millimètres et un nombre maximal par lésion osseuse de 4 à 10 bouchons.

Cette technique est principalement **préconisée** pour des **lésions du cartilage** ou de l'**unité ostéochondrale** bien définies et non diffuses et va permettre de restituer une surface articulaire « hyalin-like ». Elle offre entre 80 et 90% de bons résultats au delà de 2 ans selon la localisation de la greffe.

Cependant, cette technique peut entraîner des **complications**, en raison du **nombre de sites opératoires** pouvant entraîner des comorbidités. De plus, il est difficile de pouvoir prédire les résultats à long terme de cette greffe pour les patients, ceux-ci dépendant de la taille de la lésion, de la localisation et de l'existence de lésions associées.

➤ **L'implantation de chondrocytes autologues**

La thérapie cellulaire a été utilisée en clinique depuis une vingtaine d'année. Il existe à présent des variations dans l'implantation de chondrocytes autologues, mais les principes sont toujours les mêmes. Un petit échantillon de cartilage sain est retiré d'une zone non portante chez un patient présentant des lésions articulaires. Les chondrocytes sont ensuite isolés par une digestion enzymatique et mécanique du cartilage, et sont cultivés en monocouche *in vitro*. Quand le nombre de cellules a été suffisamment amplifié, elles sont réimplantées dans une lésion cartilagineuse lors d'une deuxième opération. La suspension de cellules est retenue dans le site endommagé soit à l'aide d'un patch de périoste, soit grâce à une membrane de collagène commerciale, le tout suturé au coin du défaut et collé à l'aide de fibrine (Richardson et al., 2017).

Cette technique a pu montrer une amélioration des capacités fonctionnelles chez les patients (Peterson et al., 2010), régénérant le tissu cartilagineux et offrant une surface bien intégrée avec le cartilage environnant de manière durable (McCarthy and Roberts, 2013). Le temps pour les chondrocytes d'atteindre le nombre de cellules adéquates est fixé entre 4 et 8 semaines. Le plus grand avantage de cette technique est que des défauts cartilagineux plus larges peuvent être régénérés.

Les désavantages de cette technique proviennent de sa nature: deux opérations chirurgicales sont nécessaires, le tissu régénéré est « hyalin-like » et l'expansion des chondrocytes reste à l'heure actuelle onéreuse (entre 2000 et 4000 €). Actuellement, seul Carticel® a reçu l'accord de la FDA pour cultiver les chondrocytes à travers une licence biologique, de la société Genzyme.

2.3. L'ingénierie tissulaire dans la médecine régénérative osseuse et cartilagineuse

Même si les différentes techniques chirurgicales peuvent rencontrer un succès relatif, elles souffrent de limites, comme les propriétés de la région non similaire avec le cartilage environnant (cas du fibrocartilage), un manque d'intégration et une morbidité liée au site donneur (Huey et al., 2012; Moran et al., 2014). La solution pour permettre une régénération du compartiment ostéocartilagineux, tel qu'il est sous forme native, pourrait être apportée par l'ingénierie tissulaire. Il sera fait mention ici de chaque compartiment du triangle d'or (biomatériau, source de cellules, molécules actives) pouvant avoir un réel impact bénéfique pour la régénération ostéoarticulaire, mais aussi pour les lésions osseuses non consolidées.

2.3.1. Les biomatériaux pour la régénération cartilagineuse

Le biomatériau doit répondre à un cahier des charges bien précis à savoir : (i) le taux de biodégradation et de croissance adéquats ; (ii) pouvoir retirer les produits de dégradation (molécules acides provenant de la dégradation de polymères pouvant provoquer une dégénération de la MEC) ; (iii) une morphologie et un phénotype sphérique pour les chondrocytes (Nuernberger et al., 2011) ; (iv) des propriétés de compression similaires au cartilage physiologique ; (v) des propriétés de surface et de tension suffisantes pour fonctionner dans un environnement avec de grandes forces de cisaillement.

Les dommages tissulaires du cartilage débutent principalement à un niveau focal, résultant d'un traumatisme, d'une blessure mécanique, d'une abrasion ou encore d'une déchirure, avant de s'étendre. Le traitement du cartilage articulaire et plus particulièrement celui du genou reste complexe, en raison de sa capacité très limitée d'auto-réparation et sa structure complexe, lui conférant des propriétés fonctionnelles uniques.

Les polymères utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage peuvent être divisés en **polymères naturels et synthétiques**. Les polymères naturels couramment utilisés dans les études cliniques incluent les polysaccharides, les glycosaminoglycanes (GAGs) et des polypeptides. En clinique, les polyesters synthétiques de la famille du copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique (PLGA) sont les polymères synthétiques les plus utilisés. Il sera fait ici une courte liste de ces polymères en fonction de leur nature.

2.3.1.1 *Les polymères naturels*

(a) Les polysaccharides

Les polysaccharides, comme l'**agarose**, l'**alginate** et le **chitosane** démontrent une **similarité structurelle** avec les GAGs naturels, et résultent en une pression osmotique élevée et donc un contenu aqueux important, permettant une transduction des forces mécaniques et un échange des nutriments et des déchets.

- **L'agarose et l'alginate** : L'agarose et l'alginate, dérivés de l'algue marine (Varoni et al., 2012), furent parmi les **premiers hydrogels étudiés** pour l'ingénierie tissulaire cartilagineuse grâce à leur facilité de gélation et d'encapsulation de cellules (Guo et al., 1989). Les hydrogels d'alginate en présence d'ions divalents comme le calcium subissent une gélation en condition douce grâce aux liaisons ioniques (Mauck et al., 2000). Ces hydrogels ont été largement utilisés comme modèles pour étudier les effets du chargement dynamique et d'autres conditions sur le comportement cellulaire (Mauck et al., 2007). Ils ont supporté la formation de tissu cartilagineux aux propriétés similaires au cartilage physiologique (Lima et al., 2006). Les hydrogels utilisant l'alginate et l'agarose sont disponibles sur le marché (Cartipatch® ; banque tissulaire de France, Lyon, France) (Selmi et al., 2008).

- **Le chitosane** : Le chitosane est préparé en réalisant une **N-déacétylation de la chitine**, composé présent dans l'exosquelette des arthropodes. Cette espèce est structurellement similaire aux glycosaminoglycanes retrouvés dans le cartilage (Berger et al., 2004). La méthode de gélation du chitosane peut être induite de manière ionique (Chenite et al., 2000), ou par une réticulation chimique (Mi et al., 2000).

L'avantage majeur de cette molécule est que ses **propriétés biologiques et physico-chimiques** peuvent être **facilement manipulées** en utilisant la réactivité de ses résidus glucosamines (acylation, alkylation, carboxyméthylation, etc.) (Kubota et al., 2000;

Venkatrajah et al., 2013). Cette espèce a été modifiée pour augmenter sa similarité biochimique avec le cartilage et pouvoir préparer des solutions injectables (Park et al., 2009; Jin et al., 2009).

Récemment, un implant basé sur le chitosane (BST-CarGel® ; Biosyntech, Quebec, Canada) a permis de réparer un défaut de 1cm³ chez un modèle de brebis avec du cartilage de forme hyaline plus prononcé que pour la technique de microfracture seule (Hoemann et al., 2005), puis a montré sa supériorité par rapport à la technique chirurgicale seule après 5 années dans un essai clinique multicentrique randomisé (Shive et al., 2015).

(b) Les glycosaminoglycanes (GAGs)

Les GAGs sont un sous-groupe des polysaccharides, présents naturellement dans le cartilage.

- **L'acide hyaluronique**: L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane retrouvé dans le cartilage articulaire et dans le liquide synovial, offrant un **environnement hautement hydraté**. Cet environnement est ainsi capable de séquestrer et de supporter la prolifération et la différenciation des chondrocytes (Toh et al., 2010). L'acide hyaluronique peut être préparé à partir d'une large variété de tissus animaux, ou par fermentation microbiologique pour s'affranchir du risque de pathogènes associés aux animaux (Liu et al., 2011). Cependant, l'acide hyaluronique possède une **résistance mécanique faible**, n'étant pas capable de former un hydrogel sous sa forme naturelle, son squelette polysaccharidique sera modifié (Kim et al., 2011) ou l'espèce sera **associée à d'autres polymères pouvant former des hydrogels** pour la régénération du cartilage.

- **Le sulfate de chondroïtine** : ce **GAG sulfaté** est l'un des GAGs les plus abondants dans la MEC cartilagineuse, offrant de bonnes propriétés d'encapsulation et d'adhésion cellulaire. La difficulté pour son utilisation en ingénierie tissulaire provient de sa **faible résistance thermique**, sa **dégradation enzymatique rapide** et sa **résistance mécanique faible**. Cette dernière contrainte peut être diminuée en l'associant à un autre polymère avec des propriétés de résistance mécanique plus importantes (Suekama et al., 2013).

(c) Les protéines

- **Le collagène** : Etant un constituant naturel du corps humain, les fibres de collagène offrent une **surface d'adhésion naturelle** pour les cellules et sont responsables de la mécano-transduction. Le comportement des chondrocytes est impacté par le type de collagène utilisé

comme support matriciel. Ils maintiennent plus leur phénotype sphérique sur du collagène de type II comparé au collagène de type I (Nehrer et al., 1997). Malgré le fait que l'utilisation du collagène de type II dans les greffes de cartilage permettrait d'imiter plus précisément l'environnement naturel, le **collagène de type I est cependant plus facilement isolable par dissolution dans l'acide acétique**. C'est pourquoi il est **plus fréquemment utilisé en ingénierie tissulaire** (Rajan et al., 2006; Freyria et al., 2009). Les hydrogels à base de collagène sont chimiquement **biomimétiques**, ont un **haut taux de gonflement** et peuvent promouvoir la formation de cartilage par les cellules encapsulées (Yamaoka et al., 2006). Le collagène a l'avantage de **polymériser spontanément en un gel stable à pH neutre** et à température physiologique, le rendant plus approprié pour des hydrogels injectables (Yunoki et al., 2013). Un gel à base de collagène de type I est commercialisé sous le nom de CaReS® (Arthro Kinetics Biotechnology, Krems, Autriche).

- **La fibrine** : C'est une protéine fibreuse principalement responsable de la formation des caillots sanguins, formée à partir de monomères de fibrinogène. Les hydrogels de fibrine peuvent être réalisés à partir de fibrinogène dérivé d'espèces animales et de thrombine purifiée (Ahmed et al., 2007). Ils s'auto-assemblent dans un **réseau polymérique**, permettent l'adhésion cellulaire et miment le processus naturel de formation du caillot sanguin (Li et al., 2015). Cette espèce a **une résistance mécanique faible** et est donc **souvent utilisée en association** avec un polymère aux propriétés de résistance mécanique plus adaptées. La fibrine a été présentée comme pouvant promouvoir la migration et la prolifération de chondrocytes humains quand elle était associée à une membrane de collagène de type I/III à travers l'effet de récepteurs spécifiques à la thrombine (Kirilak et al., 2006).

2.3.1.2 *Les polymères synthétiques*

- **Le copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique (PLGA)** : C'est un **copolymère synthétique linéaire** qui consiste en différents ratios polymériques de ses monomères constitutifs, **l'acide polylactique (PLA)** et **l'acide polyglycolique (PGA)**. Le PLGA se dégrade via l'hydrolyse de ses liaisons ester. Le **PGA** est **relativement hydrophobe** de nature, se dégrade rapidement dans des solutions aqueuses et perd ses propriétés mécaniques de résistance à la traction entre 2 et 4 semaines. Le PLA possède un **groupe méthyl supplémentaire**, le rendant **plus hydrophobe**, avec des taux d'hydrolyse diminués et donc une dégradation plus longue de l'espèce. Le choix du ratio entre les deux espèces précédemment citées formant le copolymère PLGA, permet une maîtrise du taux de

dégradation et offre une intégrité mécanique pouvant durer de quelques semaines à plusieurs mois (Ma, 2004).

- **Le poly(éthylène glycol) (PEG)** : Contrairement au PLGA, le **PEG** est **soluble dans l'eau** et peut être réticulé pour former des hydrogels. Le matériau est **biocompatible** et permet la diffusion de nutriments et de molécules actives dans sa matrice (Hwang et al., 2011). La **forme diacrylée** du PEG offre l'avantage particulier de **pouvoir gélifier *in situ*** par une exposition à une **source lumineuse ultraviolette (UV)** (Elisseeff et al., 1999). L'un des désavantages à l'utilisation des hydrogels à base de PEG est que cette espèce est **bio-inerte**. Cette limite peut être contournée en greffant des molécules bioactives sur le polymère, résultant en la formation de cartilage « hyalin-like » *in vitro* (Nguyen et al., 2011). Récemment, en réticulant ce polymère au chitosane, il a été démontré la formation de cartilage « hyalin-like » également *in vivo* (Chen et al., 2014).

Les propriétés générales des polymères utilisés en clinique pour la réparation des lésions ostéochondrales sont résumées dans le tableau suivant (**Tableau 3**).

Type de polymère	Type de biomatériau	Dégradation	Temps de dégradation	Avantage	Inconvénients
Naturel					
Agarose	Hydrogel (thermique)	Hydrolyse	Lente	Injectable	Pas d'adhésion cellulaire directe, peu de portance
Alginate	Hydrogel (réticulation ionique)	Hydrolyse	Lente	Injectable	Pas d'adhésion cellulaire directe, peu de portance, difficulté à contrôler l'uniformité de la structure
Chitosane	Hydrogel (réticulation ionique) ou solide	Enzymatique, hydrolyse	Lente, dépend du degré de déacétylation	Structure chimique modifiable, permet les interactions cellulaires	Variations dépendant de la source
Acide hyaluronique	Hydrogel	Enzymatique, hydrolyse	Rapide	Composé naturel de la synovie et du cartilage, peu de frictions	Variations dépendant de la source, peu de portance
Sulfate de chondroïtine	Hydrogel	Enzymatique, hydrolyse	Rapide	Composé naturel de la synovie et du cartilage, peu de frictions	Variations dépendant de la source, peu de portance
Collagène	Hydrogel ou solide	Enzymatique	Rapide (semaines)	Composé naturel du cartilage, entièrement dégradé, injectable	Dégradation rapide, propriétés mécaniques instables (dégradation)
Fibrine	Hydrogel (réticulation enzymatique)	Enzymatique	Rapide (semaines)	Injectable	Dégradation rapide, sensible à la rétractation du gel, peu de portance
Synthétiques					
PLGA, PLA, PGA	Solide	Enzymatique, hydrolyse	Ajustable (semaines à mois)	Ratio des monomères détermine le temps de dégradation, entièrement dégradé	Inerte, produits de dégradation acides
PEG	Hydrogel réticulé	Polymère non dégradé	Non dégradé	Injectable	Inerte, peu de portance

Tableau 3: Propriétés générales des polymères utilisés en clinique pour la cicatrisation des lésions cartilagineuses (adapté de Jeuken et al., 2016).

Une liste étendue de la FDA répertorie les polymères qui sont couramment utilisés en clinique. Pour permettre de diminuer les coûts de développement et des procédures d'approbation, les nouvelles constructions sont souvent basées sur les mêmes polymères, cités précédemment. D'autres polymères, moins utilisés en clinique, mais ayant démontré des résultats prometteurs sur des modèles *in vitro* mais aussi *in vivo* sont pour les naturels la **cellulose** (Lin and Dufresne, 2014), la **soie** (Yan et al., 2015), la **gélatine** (Huang et al., 2004) et pour les polymères synthétiques le **polyuréthane** (Hannink et al., 2012), la **polycaprolactone** (PCL) (Lam et al., 2009), l'**alcool polyvinylique** (PVA) (Baker et al., 2012) et le **poly(N-isopropylacrylamide)** (Chen and Cheng, 2006).

Une autre approche serait de former des systèmes plus complexes dans les hydrogels, incorporant non plus un mais plusieurs polymères dans des réseaux indépendants. Ces systèmes présentent non seulement des **propriétés mécaniques accrues** se rapprochant du cartilage natif, mais également une **intégration** avec les tissus environnants tout en faisant la promotion de la **chondrogenèse** *in vivo* (Vega et al., 2017).

2.3.1.3 Les produits commerciaux disponibles

Les produits commerciaux disponibles en clinique pour traiter les défauts ostéocartilagineux partagent souvent des similarités dans les techniques ou les polymères utilisés. D'un point de vue général, deux méthodes sont envisagées pour permettre l'implantation d'une construction dans un défaut ostéocartilagineux mettant à profit l'ingénierie tissulaire (**Figure 11**):

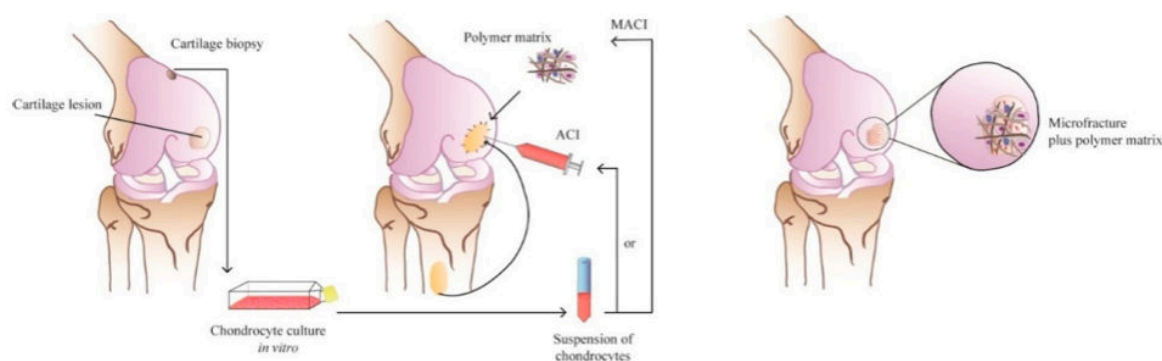


Figure 11: Représentation schématique des techniques de réparation du cartilage utilisant l'ingénierie tissulaire (Jeuken et al., 2016).

A gauche, la technique d'implantation de chondrocytes autologues (ACI de l'anglais Autologous Chondrocytes Implantation) et à droite la technique d'implantation de chondrocytes assistée d'une matrice (MACI de l'anglais Matrix-Assisted Chondrocytes Implantation)

- **L'implantation de chondrocytes assistée d'une matrice** (de l'anglais **MACI** pour Matrix-Assisted Chondrocytes Implantation). Cette méthode est similaire à l'implantation de chondrocytes autologues décrite précédemment, mais **elle utilise une matrice**, un **biomatériau comme support tridimensionnel** pour l'adhérence et la prolifération des chondrocytes, ce qui est sensé résulter en une production accrue de MEC (Kuroda et al., 2011). La méthode de MACI a été pensée pour pallier l'inconvénient de l'implantation de chondrocytes autologues, qui est de manquer de capacité à supporter des charges au niveau de l'articulation, en l'absence de structure de support, causant une dédifférenciation des chondrocytes vers un phénotype fibreux, avec une perte de capacité de production de collagène de type II et de protéoglycanes associés (Caron et al., 2012). Cette méthode est réalisée en **deux temps** : il faut d'abord **prélever des chondrocytes du patient**, les mettre en culture, avant d'**ensemencer un biomatériau**, qui devra résider dans un bioréacteur avant une réimplantation dans le site d'intérêt.

- **La chondrogenèse autologue induite par matrice** (de l'anglais **AMIC** pour Autologous matrix-induced chondrogenesis). Avec l'introduction de biomatériaux mécaniquement plus stables, des **techniques en une étape** permettant de diriger et de moduler la réponse de cicatrisation naturelle, ont gagné de l'intérêt. La méthode AMIC combine la technique de microfracture avec l'implantation d'un biomatériau en une seule étape. La matrice en trois dimensions tolère les charges mécaniques et sa structure ouverte permet un influx de cellules souches mésenchymateuses, qui se différencieront idéalement en chondrocytes (Lee et al., 2014).

Le tableau ci-après permet de voir les **produits commerciaux utilisés en clinique** pour la régénération de lésions ostéochondrales, suivant l'utilisation de l'une ou l'autre des techniques décrites précédemment (**Tableau 4**).

Type de polymère	Produit	Entreprise	composition	procédure	Résultats cliniques
Basé sur le PLGA	BioSeed®-C	BioTissue, AG	PLGA renforcé avec du polydioxane (PDS) ensemencé avec des chondrocytes autologues et suspendus dans de la fibrine	Deux étapes; MACI	Pas de supériorité clinique à l'ICA; radiologiquement meilleur que l'ICA
	Chondrotissue®	BioTissue, AG	Fibre textile de PGA non gonflée traitée avec de l'acide hyaluronique combiné au PRP ou BMC	Une étape; AMIC	Résultats prometteurs avec restauration de cartilage hyalin, pas d'étude comparative valable
Basé sur le collagène	NeoCart®	Histogenics Corporation	biomatériau utilisant du collagène I bovin ensemencé avec des chondrocytes autologues cultivés en biorecteur	Deux étapes; MACI	Bons résultats cliniques et supérieur à la technique de microfracture seule
	NovoCART®3D	TETEC® Tissue Engineering Technologies AG	Biomatériau de collagène et de sulfate de chondroïtine ensemencé avec des chondrocytes autologues	Deux étapes; MACI	Meilleurs résultats chez des personnes exigeantes (sportifs, militaires) mais effet non significatif, taux élevé d'hypertrophie de la greffe
	CaReS®	Arthro Kinetics	Hydrogel utilisant du collagène I de la queue de rat ensemencé avec des chondrocytes autologues et du sang autologue	Deux étapes; MACI	Résultats supérieurs comparé à la technique de microfracture dans des analyses après 3 ans
	Chondro-Gide®	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suisse	Matrice de collagène I/III appliqué après une microfracture, puis utilisation de colle à base de fibrine	Une étape; AMIC	Pas d'étude comparable disponible
	Maioregen®	Fin-Ceramica Faenza S.p.A, Italie	Structure tricouche avec la partie superficielle composée de collagène I, la partie intermédiaire 60% de coll II et 40% d'hydroxyapatite (HAp) et la partie profonde de 40% de coll I et 60% d'HAp	Une étape; AMIC	Pas d'étude comparable disponible
Basé sur d'autres types de polymères	Hyalograft®	Anika Therapeutics, Inc	HYAFF-11S, un ester benzylque de l'acide hyaluronique, ensemencé avec des chondrocytes autologues puis utilisation de colle à base de fibrine	Deux étapes; MACI	Dégradation rapide, sensible à la rétraction du gel, peu de portance
	Cartipatch®	Banque Tissulaire de France	Hydrogel utilisant une suspension d'alginate-agarose (GelForGel) ensemencé avec des chondrocytes autologues dans du sérum autologue	Deux étapes; MACI	Résultats inférieurs comparé à la mosaïcoplastie après 2 ans dans des études comparatives
	BST-CarGel®	Piramal Healthcare Ltd	Chitosan mélangé avec du sang autologue	Une étape; AMIC	Cliniquement équivalent à la technique de microfracture mais radiologiquement supérieur dans des études comparatives
	GelrinC™	Regentis Biomatériaux	Hydrogel de PEG-fibrinogène appliqué en formulation liquide et traité par lumière ultraviolette <i>in situ</i>	Une étape; AMIC	Pas d'étude comparable disponible

Tableau 4 : Aperçu des dispositifs médicaux implantables pour la régénération de lésions cartilagineuses sur le marché, leurs compositions, la procédure utilisée et les résultats cliniques obtenus (adapté de Jeuken et al., 2016).

Des traumatismes causés au niveau du cartilage sont souvent associés à une dégradation plus ou moins prononcée d'une partie de l'os sous-chondral. Dans les premiers temps, la reconstruction de ces défauts ostéochondraux se concentrait principalement sur la partie superficielle du cartilage sans considération pour le tissu sous-chondral, les résultats concernant la réparation étant décevants (Huey et al., 2012). Récemment, des études sur les structures détaillées du tissu ostéochondral ont permis d'élaborer des **biomatériaux plus complexes** pour régénérer ces défauts. Ces biomatériaux sont appelés **biphasiques**, avec un compartiment responsable de la régénération du compartiment cartilagineux et l'autre du tissu sous-chondral, pour des performances de cicatrisation totale accrues (Mendoza-Palomares et al., 2012; Li et al., 2015b).

2.3.2. Les biomatériaux pour la régénération osseuse

Les approches les plus classiques utilisées pour traiter un défaut osseux dans le but de le réparer ou le régénérer est l'utilisation d'autogreffe ou d'allogreffe (Dimitriou et al., 2011). L'autogreffe a été considérée comme étant la référence pour réparer les défauts osseux en raison de ses caractéristiques comme l'histocompatibilité, la non immunogénicité et le potentiel ostéoinducteur/ostéoconducteur (Amini et al., 2012). Cependant, récolter une autogreffe du patient, comme seconde procédure, est considéré comme onéreuse et risquée (causant saignements, inflammations, risques d'infections mais également douleurs chroniques) (St John et al., 2003). Il y a également de nombreux rapports faisant état de traumatismes du site donneur et de morbidité associés avec cette technique.

Pour s'affranchir de ces obstacles, l'ingénierie osseuse, et particulièrement l'ingénierie des substituts osseux synthétiques fut reconnue comme l'alternative aux méthodes traditionnelles. Ceci est très certainement dû à leur approvisionnement illimité, à l'élimination du risque de transmission de pathogènes et au coût relativement faible (Bose et al., 2012). L'ingénierie tissulaire osseuse pourrait enfin aboutir à la conception et la manufacture adaptés pour les patients nécessitant des implants osseux (Li et al., 2011).

Un dispositif médical pour la régénération osseuse doit être **biocompatible**, **bioactif**, **non thrombogénique** et **anti-inflammatoire**. Il doit également posséder des **pores interconnectés** avec des tailles convenables (macropores >150 µm et micropores <20 µm) (Salmasi et al., 2016) pour permettre la **croissance de cellules ostéogéniques *in vivo***. De plus, il doit posséder des **propriétés mécaniques compatibles** et des **cinétiques de dégradation contrôlées**, pour des applications spécifiques à l'ingénierie tissulaire osseuse (Bose et al., 2012). En plus des caractéristiques listées plus haut, le dispositif médical à visée régénérative pour l'os doit **ressembler le plus fidèlement possible à la MEC osseuse**, qui consiste en une matrice composite de collagène de type I et des minéraux sous forme apatitique.

Cependant, dans le cadre de régénération de lésions osseuses peu étendues, comme par exemple la pseudarthrose, les propriétés mécaniques du dispositif médical ne doivent pas nécessairement être proches de celles de l'os non lésé.

Nous nous intéresserons dans cette section à la **régénération osseuse de lésions peu étendues**, ne nécessitant pas obligatoirement l'utilisation de substituts osseux.

Pour permettre une régénération des lésions osseuses, plusieurs pistes ont été avancées pour permettre d'offrir une alternative thérapeutique aux traitements actuels dans le cadre des pseudarthroses par exemple. Pour régénérer ce défaut osseux de petite taille, il est possible d'employer des **biomatériaux implantables** à base de **biopolymères** en clinique pour permettre une **régénération du tissu osseux** au niveau de la lésion non étendue.

2.3.2.1 *Exemples de biomatériaux commerciaux en clinique*

Les **biomatériaux** concernés disponibles en clinique pour la régénération de lésions osseuses sont à l'heure actuelle **peu nombreux**. Il y a **trois biomatériaux** envisagés en clinique, utilisant le **collagène comme matrice 3D résorbable**. En effet, la structure du collagène peut augmenter l'adhérence cellulaire, la prolifération et la différenciation pour des applications dans la médecine régénérative. Cependant, leur nature ainsi que leur dégradation rapide limite le terrain d'application de cette famille de biomatériaux.

Un exemple de membrane collagénique est la **membrane Bio-Gide®** de la société Geistlich (**Figure 12**). Cette membrane est une membrane biphasique composée de collagène de type I. Elle est utilisée pour traiter les lésions osseuses ou pertes osseuses en chirurgie maxillo-faciale par la technique de **régénération osseuse guidée**. L'une des faces de cette membrane est dense et fera face au tissu épithélial pour lui éviter de coloniser le défaut osseux alors que l'autre, fibreuse, permet l'adhérence et la prolifération de cellules osseuses:

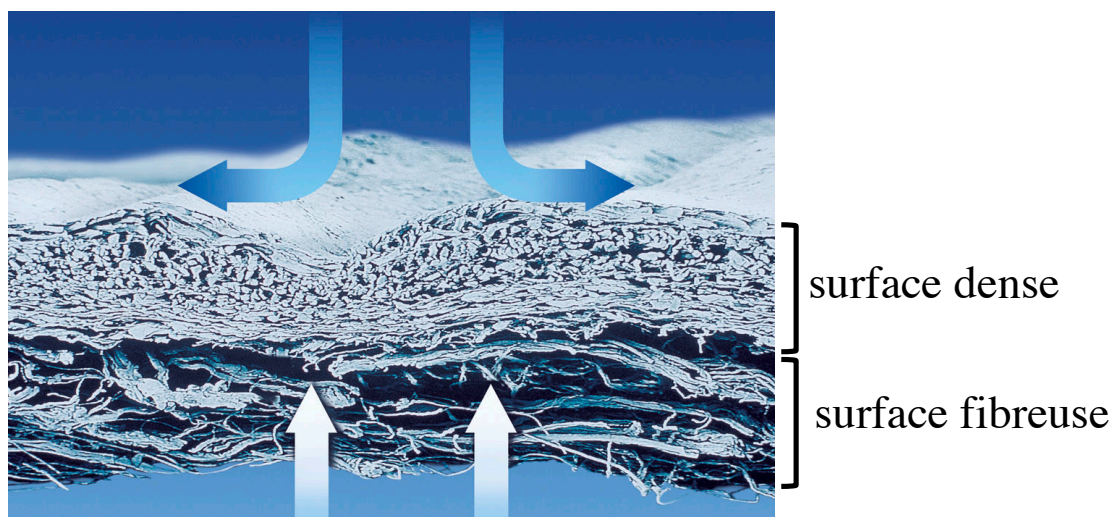


Figure 12: Structure en bicouche de la membrane collagénique Bio-Gide® observée au microscope électronique à balayage (source : www.geistlich.fr)

D'autres systèmes utilisent également des éponges de collagène comme biomatériaux tridimensionnels : c'est le cas de **INFUSE® bone graft** de la société Medtronic. Ce dispositif

est une **éponge de collagène**, qu'il faut imbiber d'une solution de **protéines de morphogénèse osseuse-2 recombinante humaine (rhBMP-2)**, de l'anglais recombinant human Bone Morphogenetic Protein). Ce peptide assure à la construction des propriétés d'ostéoconduction et d'ostéoinduction.

Ce dispositif médical a obtenu une **approbation de la FDA dès 2002** pour être utilisé dans le cadre de la **fusion de vertèbres lombaires** suite à une dégénérescence de disques intervertébraux à l'aide d'un dispositif de fusion, puis en chirurgie dentaire et maxillo-faciale, et enfin dans les traitements de traumatismes osseux.

Il est toutefois à noter que ce **dispositif implantable commercial** est accompagné de **12 mg de rhBMP-2** pour **imbiber de manière passive** l'éponge collagénique. Cette imbibition passive implique un **relargage passif, rapide et incontrôlé** et de telles quantités peuvent être délétères dans le cadre de la régénération osseuse, pouvant causer notamment des ostéolyses et des risques de métastases osseuses par une prolifération exacerbée des cellules osseuses (Tannoury and An, 2014).

La **BMP fut autorisée par la FDA dès 2001**, par l'intermédiaire de **OP-1[®] Implant** de la société Stryker/Olympus Biotech pour le traitement de **lésions osseuses non consolidées récalcitrantes** quand l'autogreffe n'est pas réalisable et que les autres traitements ont échoué, sous puis **OP-1 Putty** pour traiter l'arthrodèse spinale sous l'appellation de « **dispositifs à usage humanitaire** » (de l'anglais HUD pour humanitarian use device). Ces dispositifs sont définis comme pouvant bénéficier à des patients, dans le traitement et le diagnostic de maladies ou de conditions affectant ou se manifestant chez moins de 4000 individus au Etats-Unis par an. Ce sont des dispositifs médicaux comprenant une solution de protéine de morphogénèse osseuse-7 recombinante humaine (**rhBMP-7**), imbibant une matrice de collagène de type I sous forme de poudre lyophilisée.

Même si ces deux variants de la BMP ont permis de traiter des pathologies diverses comme la fusion spinale ou certaines pseudarthroses, il y a des **risques** d'utiliser ces traitements **hors indication**. Une étude rétrospective menée en 2010 a démontré qu'entre l'année 2002 et 2007, jusqu'à **85%** des **actes** ayant utilisé ces deux BMP étaient **hors indication** (Ong et al., 2010).

D'autres biopolymères pourraient trouver leur intérêt dans le traitement de lésions osseuses peu étendues. C'est le cas par exemple du **chitosane**, qui a attiré une attention considérable

dans l'ingénierie tissulaire osseuse en raison de sa **capacité à former des pores**, sa capacité à **se lier avec des molécules anioniques**, son **activité antibactérienne** ainsi que sa nature **biodégradable** (Venkatesan and Kim, 2014). Il peut également être utilisé sous forme de **biomatériau composite** avec d'autres éléments pour augmenter les propriétés mécaniques de l'ensemble, ou lui conférer des propriétés supplémentaires.

La **principale limite à l'utilisation de biopolymères** est le taux de **dégradation rapide des biomatériaux**, mais aussi le risque d'induire une **réaction inflammatoire** au niveau du site implantatoire. Par conséquent, **d'autres polymères, synthétiques** ont été largement étudiés en temps que biomatériaux pour concevoir des dispositifs implantables avec le potentiel de promouvoir la croissance osseuse *in vivo* et ainsi régénérer l'os pour remplacer du tissu manquant. Ces polymères synthétiques sont de plusieurs types et possèdent des **taux de dégradation variables**, sont **facilement modifiables** et **produits en large quantité** (Asti and Gioglio, 2014; Polo-Corrales et al., 2014). Les polymères les plus souvent employés pour la biomédecine sont les **polyesters**, comme le poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (Thadavirul et al., 2014), ou le copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique (PLGA) (Gentile et al., 2014).

2.3.2.2 *Méthodes d'obtention des biomatériaux*

Une variété de processus technologiques furent développés pour permettre la fabrication d'un dispositif implantable 3D poreux pour la régénération osseuse. Il sera fait mention ici des **deux méthodes principales d'obtention**:

- **La technique de lixiviation de porogènes** : Cette technique (de l'anglais solvent casting / particulate leaching) est basée sur le **mélange entre un polymère** dans une solution organique contenant un **porogène** (couramment le chlorure de sodium) insoluble dans un solvant organique, avec une granulométrie et une taille souhaitée. Cette solution va être coulée dans un moule, et le solvant organique sera retiré par évaporation ou lyophilisation (Sander et al., 2004). Les sels sont ensuite retirés par lixiviation à l'aide d'un solvant aqueux. La membrane obtenue deviendra donc poreuse.

Cette méthode a l'avantage d'être **simple**, et il est **possible d'adapter la taille des pores et de la porosité** en adaptant le ratio entre le polymère et le porogène, mais également la nature du porogène utilisé pour la conception de biomatériau. Cependant, la **forme des pores** est souvent **limitée** à la forme cubique caractéristique des cristaux. Aussi, il est **difficile de**

retirer les sels à l'intérieur de la membrane, rendant cette méthode inadaptée pour réaliser des implants épais (dépassant la taille de 3 à 4 mm) (Prasad et al., 2017).

- **La technique d'électrospinning** : Ce processus utilise un champ électrique pour contrôler la formation et le dépôt de fibres polymériques (de taille allant de quelques dizaines de nanomètres à quelques microns) sur un support conducteur (**Figure 13**).

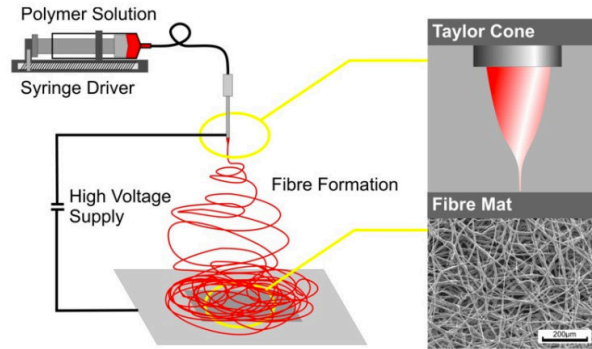


Figure 13: Représentation schématique de la technique d'électrospinning (source : www.swissmntnetwork.ch)

Le **polymère synthétique** d'intérêt est dissout dans un **solvant organique**, puis placé dans une **seringue** montée sur un **pousse-seringue**. La seringue est reliée à une **aiguille** par un tuyau souple. Une **différence de potentiel** est alors appliquée entre l'aiguille et le collecteur, qui va allonger la goutte formée au bout de l'aiguille jusqu'à ce que les forces électrostatiques soient supérieures à la tension de surface de la goutte, il se formera alors un **cône de Taylor**. Le polymère va se déposer de manière aléatoire sur le collecteur sous forme de fibres alors que le solvant s'évaporerait durant cette étape.

Il y a en fait **quatre zones** distinctes pour le polymère électrospinné: au niveau du **cône de Taylor**, une zone de **flux ohmique** de faible accélération, une zone de **flux collectif** de forte accélération et enfin une **zone de collection** au niveau du collecteur (**Figure 14**) :

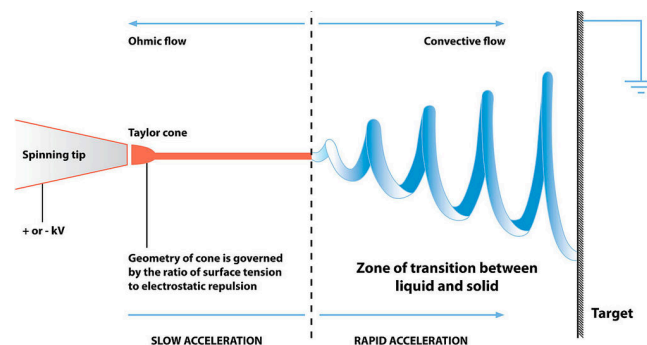


Figure 14 : Matérialisation des différentes zones traversées par le polymère électrospinné (source : wikipedia)

Plusieurs paramètres peuvent influencer la formation des fibres, leurs **tailles**, leurs **formes** et leurs **distributions**. Il y a des **paramètres propres au polymère** tels que la **concentration** du polymère et le **choix du solvant** qui vont influencer la **viscosité de la solution** contenant le polymère et sa **conductivité**. Il y a également des **paramètres liés à l'appareillage** en lui-même, tels que : le **débit**, la **différence de potentiel** entre l'aiguille et le collecteur, le **diamètre d'ouverture** de l'aiguille ainsi que la **distance entre l'aiguille et le collecteur**.

D'autres paramètres liés aux conditions expérimentales sont à prendre en compte, comme la **température** ou l'**humidité relative**. Ces paramètres doivent être maîtrisés pour obtenir des fibres d'aspect souhaité. Cependant, cette technique ne permet pas initialement de maîtriser le dépôt des fibres qui se produit de manière aléatoire.

Cette méthode d'obtention de membranes sous forme de **nanofibres** permet d'obtenir des **biomatériaux macroporeux** et **microporeux** ainsi que des **fibres interconnectées** à l'instar de la technique de lixiviation de porogènes. L'appareillage simple permet des **adaptations** pour des système plus complexes comme un **électrospinning coaxial** (deux solutions de polymères forment des fibres de type cœur/écorce) ou des collecteurs particuliers (un collecteur cylindrique par exemple) permettant également de **moduler l'architecture** et **l'alignement des fibres**. Un autre grand avantage de cette technique est que l'**épaisseur** des membranes peut être **modulée** selon les besoins, pouvant avoir une épaisseur allant de 30 μm à 1 cm (Eap et al., 2015a). Grâce aux travaux de thèse réalisés par Sandy Eap, ayant contribué à réaliser des membranes électrospinnées calibrées et reproductibles, nous avons pu approfondir le développement de **membranes nanofibreuses synthétiques** pour la régénération ostéoarticulaire, ainsi que la régénération de lésions osseuses en utilisant cette technique.

Pour pouvoir **augmenter le potentiel ostéoconducteur et ostéoinducteur** limité de ces dispositifs implantables synthétiques, des **stratégies** ont été pensées pour les fonctionnaliser au moyen de facteurs de croissance.

2.3.3. Les facteurs de croissance cellulaires utilisés en médecine régénérative osseuse et ostéoarticulaire

2.3.3.1 Les facteurs de croissance pour la régénération cartilagineuse

En dehors des biomatériaux, les **facteurs de croissance et de différenciation** sont le **deuxième composant** de la triade pour des applications dans l'ingénierie tissulaire. Ces biomolécules **permettent de rendre les biomatériaux actifs**. Plusieurs facteurs ont été identifiés comme étant impliqués dans la régulation du développement du cartilage et l'homéostasie du cartilage articulaire mature.

Ces facteurs de croissance sont des **composés stimulants** qui aident à **réguler le développement du cartilage** ainsi que le **maintien du phénotype chondrocytaire** (Rosa et al., 2014). Ils sont couramment utilisés pour **induire, accélérer et/ou améliorer la formation** du tissu cartilagineux. Les facteurs les plus utilisés pour stimuler le développement du cartilage sont : le TGF- β , le BMP, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance analogue à l'insuline-1 (IGF-1), ainsi que les protéines Hedgehog (hh) et Wingless (Wnt)

- **TGF- β** : Comme expliqué précédemment, la **superfamille des TGF- β** joue un rôle majeur dans le **développement du cartilage**. Le cartilage articulaire contient de grandes quantités de ce facteur de croissance. Les formes actives **TGF- β 1 et 3** sont considérées comme étant de **puissants stimulateurs** dans la synthèse de protéoglycanes, de collagène de type II et sont également capable d'induire la **différenciation chondrogénique** de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) *in vitro* (Goldring, 2006; Facchini et al., 2006). TGF- β 1 aide dans les **interactions cellulaires** entre les cellules progénitrices et **médient la différenciation hypertrophique**, alors que TGF- β 3 a un effet plus prononcé pour la **différenciation des CSMs** (Tuli et al., 2003).

- **BMPs** : Les protéines de morphogénèse osseuse constituent une large sous-classe de 20 polypeptides dans la superfamille des TGF- β et ont un **rôle essentiel dans la chondrogenèse et l'ostéogénèse** au cours du développement du squelette. Plusieurs BMPs tels que le BMP-2, -4, -7, -13 et -14 peuvent stimuler la différenciation chondrogénique des CSMs, mais également **améliorer la production *in vitro* de collagène de type II et d'aggrécane par les chondrocytes** (Sekiya et al., 2005).

Cependant, si elles sont implantées dans des **zones ectopiques**, les BMPs sont associées à une **ossification endochondrale** avec formation d'os, qui doit être **évitée pour l'ingénierie du cartilage** (Noël et al., 2004). Les BMP-2 et -7 ont obtenu l'autorisation de la FDA pour une utilisation clinique chez les humains (Reddi and Reddi, 2009), mais aucune étude clinique n'a été encore réalisée pour valider leur potentiel pour améliorer la régénération du cartilage.

- **FGFs** : **Deux membres** de la famille des facteurs de croissance des fibroblastes ont été étudiés pour leur rôle dans l'homéostasie cartilagineuse, le **FGF-2 et -18** (Ellman et al., 2008). Une supplémentation de milieu de culture avec du FGF-2 a montré une **augmentation de la prolifération de CSMs** associée à une **augmentation dans la synthèse de protéoglycanes** dans un modèle de culture *in vitro* en trois dimensions (Stewart et al., 2007). De plus, chez le lapin, le FGF-2 a permis de stimuler la restauration du cartilage articulaire (Takafuji et al., 2007). Toutefois, des études récentes ont permis de démontrer que la **réparation du cartilage était dépendante de la quantité de FGF intégrée** selon les modèles d'études (Maehara et al., 2010). Les résultats variés des FGFs dans la chondrogenèse, soulignent le besoin de mieux comprendre et caractériser les voies de signalisation de ces facteurs de croissance, pour le développement de l'ingénierie du cartilage.

- **IGF** : Le rôle de IGF-1 a été longuement étudié pour permettre la réparation du cartilage et il est considéré comme un **médiateur essentiel pour l'homéostasie du tissu cartilagineux et son métabolisme**, en raison de ses capacités à promouvoir la **survie et la prolifération des chondrocytes**, à induire la **différenciation chondrogénique** ainsi qu'à **stimuler la synthèse de protéoglycanes** (Yang and Barabino, 2013; Cucchiariini and Madry, 2014). Plusieurs études *in vitro* ont démontré que **l'utilisation conjointe de IGF-1 et de TGF- β** aboutissait à une **chondrogenèse accrue** (Longobardi et al., 2006). Cependant, les résultats d'études ultérieures *in vivo* ne vont pas dans le même sens (Holland et al., 2007). **IGF-1** a également démontré une **action synergique** s'il était lié au **BMP-7** pour réparer des **défauts cartilagineux** en utilisant des chondrocytes sains et des chondrocytes arthritiques en culture *in vitro* (Chubinskaya et al., 2007).

- **Les protéines de la famille Wiggless et Hedgehog** : Les protéines de ces deux familles ont montré des capacités à promouvoir la chondrogenèse ou à pouvoir agir en synergie avec les autres facteurs de croissance cités plus haut. Ils pourraient être de sérieux candidats pour de futures investigations *in vivo* (Bhardwaj et al., 2015).

2.3.3.2 Les facteurs de croissance pour la régénération osseuse

L'ingénierie tissulaire a également cherché à exploiter les propres capacités physiologiques de l'os pour permettre la régénération physiologique. En effet, les signaux biochimiques d'intérêt (facteurs de croissance, hormones et cytokines) sont sécrétés localement dans des zones engagées dans le remodelage osseux, causant la migration de cellules inflammatoires et de précurseurs et/ou l'activation d'ostéoblastes et d'ostéoclastes (Kanczler and Oreffo, 2008).

Les facteurs de croissance pouvant avoir un intérêt dans la régénération de lésions osseuses sont semblables à ceux utilisables pour la régénération du tissu cartilagineux : les **BMP-2 et -7** (différenciation des ostéoblastes et action proliférative pour BMP-2), les **FGF-1 et -18** (prolifération des cellules ostéoprogénitrices, différenciation ostéogénique des CSMs augmentée), **IGF-1** (prolifération des cellules ostéoprogénitrices et différenciation) et **TGF- β 3** (prolifération et différenciation des ostéoblastes) (Orciani et al., 2017).

Des études cliniques utilisent des **facteurs de croissance** habituellement de l'ordre de grandeur de **quelques microgrammes par millilitre**, comparé aux concentrations physiologiques de ceux-ci étant de l'ordre du nanogramme par millilitre : ceci peut occasionner des **effets secondaires**, comme des croissances osseuses ectopiques, le développement d'anticorps voire une carcinogénèse. En effet, des données conflictuelles sur la dose appropriée de facteurs de croissance pour l'ingénierie osseuse, et par conséquent de l'ingénierie de lésions osseuses existent, avec une large gamme de concentrations étudiées (Gothard et al., 2014). De plus, la dose de facteurs de croissance délivrée *in vivo* par le biomatériau actif dans un défaut osseux (Santo et al., 2013) et l'effet d'une co-administration de plusieurs facteurs de croissance (Kuhn et al., 2013) ne sont pas encore clairement connus.

2.3.3.3 Méthodes de fonctionnalisation des biomatériaux actifs

Pour pouvoir augmenter les propriétés biologiques des dispositifs médicaux implantables synthétiques ou naturels et leur conférer de nouvelles caractéristiques possibles par l'ajout de facteurs de croissance par exemple, les chercheurs se sont intéressés aux **moyens d'intégrer des biomolécules à ces dispositifs médicaux**. En effet, comme cité précédemment, la **grande quantité de BMP recombinante utilisée** pour imprégner des membranes de collagène aboutit à un **pic précoce et supra-physiologique** dans ce cas et à des effets secondaires conséquents. Des voies ont été investiguées pour permettre de

fonctionnaliser plus durablement ces dispositifs médicaux implantables.

Diverses méthodes de fonctionnalisation ont permis de rendre les **biomatériaux actifs**, en prenant en compte la composition du biomatériau ainsi que la biomolécule active et le temps de libération du composé. Deux méthodes principales ont été élaborées : la fonctionnalisation par **liaison chimique** et la fonctionnalisation par **adsorption physique**.

La **fonctionnalisation par liaison chimique** nécessite d'établir une liaison covalente entre le biomatériau et la biomolécule d'intérêt. Cette liaison pourra être réversible ou irréversible. Pour ce faire, il est nécessaire de « traiter » le biomatériau pour lui conférer un groupement réactif, comme par exemple une amine, un hydroxyle ou un groupement carboxyle. Ceci permet d'ancrer la biomolécule à la surface du biomatériau, pour permettre de réduire les quantités utilisées, et empêcher un relargage passif incontrôlé et rapide.

Néanmoins, cette technique présente quelques désavantages. La localisation de la **liaison chimique** peut être faite au niveau du **site actif** de la biomolécule ou bien pourra **modifier sa conformation spatiale**, elle **perdra alors son activité thérapeutique** au niveau cellulaire une fois implantée. Si le bras espaceur entre la biomolécule et le biomatériau est de petite taille, il pourra en résulter un **encombrement stérique** de celle-ci, diminuant de la même manière sa reconnaissance par les cellules et donc son activité. Enfin, le fait de greffer une biomolécule à la surface du biomatériau, **ne la protège pas forcément d'une dégradation** par les différents composés cellulaires tels les protéases par exemple. Le **temps de demi-vie** des biomolécules une fois implantées **ne sera pas allongé**, celles-ci pouvant être dégradées avant de réaliser leurs activités thérapeutiques.

La **fonctionnalisation par adsorption physique** quant à elle fait intervenir **des liaisons** non pas covalentes, mais des **liaisons de faibles énergies** (électrostatiques, liaisons hydrogène ou de Van der Waals). Il est possible de réaliser une adsorption simple d'une biomolécule à la surface du biomatériau, mais les liaisons étant de faibles énergies, les biomolécules pourront rapidement se dissocier du biomatériau, faisant perdre l'intérêt de la technique. La technique la plus éprouvée mettant à profit l'adsorption physique est la technique de film multicouche de polyelectrolytes (**Figure 15**, de l'anglais « layer-by-layer » (LbL)) (Decher, 1997). Pour cette technique, une alternance de dépôt entre une espèce chargée positivement et un autre négativement va créer de nombreuses interactions de faibles énergies.

Entre les **dépôts de polyanions et de polycations**, des **étapes de rinçages** sont nécessaires

afin de retirer toutes les espèces n'ayant pu interagir avec les précédentes. Une fois les deux espèces déposées (représentant un cycle), on recommence le même procédé, pour obtenir une succession de bicouches polyanions/polycations.

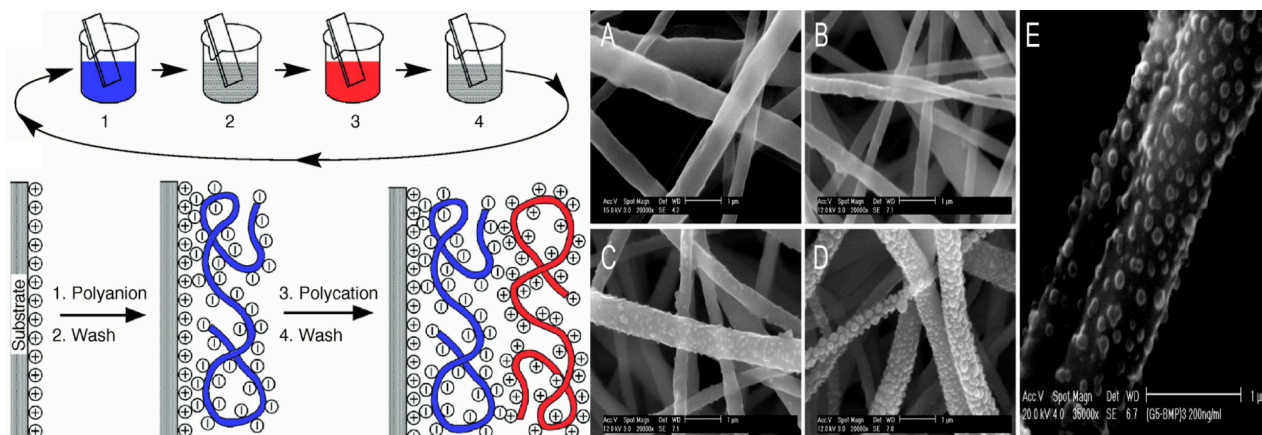


Figure 15: Représentation de la technique de (LbL) par une alternance d'immersions de polyanions et de polycations et visualisation de la formation de nanoréservoirs thérapeutiques (Decher, 1997; Mendoza-Palomares et al., 2012)

A gauche, représentation schématique de formation d'un film multicouche. A droite, visualisation par microscopie électronique de la technologie de formation de nanoréservoirs incorporant de la BMP-2 sur des fibres synthétiques électrospinnées en mettant à profit la technique de LbL. (A) nanofibres électrospinnées, (B) 1 cycle de fonctionnalisation (NR₁), (C) 3 cycles de fonctionnalisation (NR₃), (D) 6 cycles de fonctionnalisation (NR₆), (E) grossissement de la condition C.

La technique de **formation du film multicouche de polyélectrolytes** est la technique de fonctionnalisation retenue pour les travaux de thèse. Cette technique a été largement utilisée au sein du laboratoire pour **fonctionnaliser des biomatériaux** aussi bien **synthétiques** (Mendoza-Palomares et al., 2012; Ferrand et al., 2014; Eap et al., 2014a) que **naturels** (Eap et al., 2014b). L'adaptation de cette technique de dépôts de polyélectrolytes permet de générer des **nanoréservoirs** à la **surface des implants nanofibreux** sous forme de **gouttelettes isolées** permettant ainsi, d'une part **l'accès au biomatériau en lui-même**, et d'autre part aux **biomolécules thérapeutiques (Figure 15)** (brevet n° WO 2012113812 A1). La biomolécule va alors être intégrée à l'intérieur de ce nanoréservoir, permettant une **protection** vis-à-vis des **éléments extérieurs**. De plus, cette protection sous forme de **nanoréservoirs évite un relargage passif** de par sa nature : les cellules d'intérêt, pour avoir accès aux biomolécules, devront dégrader le revêtement formé par le nanoréservoir. Ainsi, les **biomolécules** seront **diffusées de manière contrôlée** par les cellules. Il s'agit d'un relargage actif dépendant du contact cellulaire.

Il est également à noter que la fonctionnalisation du biomatériau peut directement avoir lieu

au niveau de la formulation. En effet, certaines espèces peuvent être combinées à des polymères synthétiques ou naturels pour pallier leurs propriétés mécaniques de compressions inadéquates. Par exemple, il est possible de **créer des composites de chitosane avec des matériaux bioactifs inorganiques** comme de l'hydroxyapatite, du phosphate tricalcique, ou encore des polymères organiques comme le collagène, des nanotubes de carbone ou le poly(éthylène glycol) pour augmenter les propriétés mécaniques de la construction composite (Venkatesan and Kim, 2014).

Pour la méthode d'électrospinning, il est possible **d'intégrer plusieurs composés** dans une même solution, ou bien de réaliser un **électrospinning coaxial** en utilisant un solvant aqueux, pouvant encapsuler des **biomolécules** voire des **facteurs de croissance** à l'intérieur des fibres pour permettre un relargage maîtrisé (Wang et al., 2016).

2.3.4. Les sources cellulaires utilisées pour la médecine régénérative osseuse et ostéoarticulaire

Le but ultime pour la réparation de l'unité ostéoarticulaire ainsi que pour la régénération de lésions osseuses est de trouver une source cellulaire idéale qui peut être facilement isolée, et peut être cultivée pour exprimer et synthétiser des éléments des MEC correspondantes. Ces cellules peuvent être des **cellules primaires autologues** déjà différenciées à l'instar de l'utilisation de chondrocytes en clinique, ou encore des **cellules souches indifférenciées**, attirant un intérêt grandissant comme sources cellulaires alternatives.

2.3.4.1 Les chondrocytes

Les **chondrocytes**, cellules constituant le **cartilage mature et fonctionnel** sont le choix le plus évident et ont été largement étudiés pour la réparation du cartilage (Lee and Hui, 2006). Ces cellules participent au **maintien et au remodelage de la matrice cartilagineuse** par une **régulation fine des processus anaboliques et cataboliques** impliquant les métalloprotéases matricielles (MMPs de l'anglais Matrix Metalloproteinase) et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMPs de l'anglais Tissue Inhibitory Metalloproteinases) (Chung and Burdick, 2008). Les chondrocytes adultes ont été isolés de plusieurs sources comme le cartilage articulaire, la cloison nasale, les côtes ou le cartilage de l'oreille et utilisés pour l'ingénierie tissulaire cartilagineuse (Keeney et al., 2011; Zeng et al., 2015). Plusieurs études se sont concentrées sur l'utilisation de chondrocytes articulaires comme une source

cellulaire viable pour la réparation du cartilage, mais souffrent de **limitations** comme une **procédure de récolte invasive**, une **morbidity du site donneur**, une **perte de fonction**, un **rendement cellulaire** ainsi qu'une **prolifération faibles**, et une **faible bioactivité** (Chung and Burdick, 2008). Une étude a comparé les différentes sources de chondrocytes hyalins (nasal, costal et articulaire) et a démontré que les chondrocytes nasaux et costaux étaient supérieurs aux chondrocytes articulaires en terme de quantité de cartilage formé après transplantation (Isogai et al., 2006).

Une des limitations majeures à l'emploi des chondrocytes est leur **instabilité en culture *in vitro*** qui cause la **perte de leurs phénotypes**. Ceci aboutit à la **perte d'expression des marqueurs chondrogéniques**, principalement le collagène II et l'aggrécane et finalement à une **bascule vers un phénotype fibroblastique** (Darling and Athanasiou, 2005). La **dédifférenciation** des chondrocytes peut être **réversible**, ils peuvent retrouver leur phénotype différencié s'ils sont **placés dans un environnement tridimensionnel**. La redifférenciation des chondrocytes est **impacté par la topologie de surface des biomatériaux**. Woodfield et ses collaborateurs (2006) ont montré qu'un **substrat** avec une **faible adhérence cellulaire supportait le phénotype chondrocytaire** et maintenait une morphologie arrondie. Ces chondrocytes doivent provenir de sources autologues adultes pour éviter des réactions immunogéniques pouvant aboutir à un rejet pour le patient.

Une alternative aux chondrocytes serait d'utiliser des chondrocytes allogéniques de fœtus ou juvéniles, présentant une augmentation de production de glycosaminoglycanes et de collagène de type II par rapport les chondrocytes adultes et ne possédant pas d'activité immunogénique (Adkisson et al., 2010; Mahmoudifar and Doran, 2010). Cependant cette source de cellules peut être limitée par sa rareté et les considérations éthiques.

2.3.4.2 Les ostéoblastes

A l'instar des chondrocytes pour le tissu cartilagineux, les **ostéoblastes** semblent être les cellules les plus appropriées pour la **régénération osseuse** car ce sont les **cellules résidentes naturelles de ce tissu** et elles peuvent être utilisées comme source autologue. Pour les stratégies d'ingénierie osseuse, les ostéoblastes sont **obtenus à partir de biopsies de l'os du patient**. Malgré cet avantage, l'utilisation de ces cellules apporte des limites pour la régénération osseuse. Ces cellules sont présentes en **quantité limitée** dans les biopsies osseuses, le tissu osseux étant plus riche en MEC qu'en cellules. De plus, l'ingénierie tissulaire nécessite un **nombre conséquent de cellules**, alors que la **prolifération des**

ostéoblastes est relativement lente (Heath, 2000).

Les deux sources de cellules primaires citées, les chondrocytes ainsi que les ostéoblastes, présentent initialement des propriétés intéressantes pour une utilisation en médecine régénérative. Cependant, certaines limites concernant la méthode d'obtention de ces cellules, leur prolifération limitée ainsi qu'une perte de fonction lors de l'expansion cellulaire *in vitro* ont poussé les équipes de recherche à envisager d'autres sources de cellules, comme les cellules souches mésenchymateuses multipotentes, ou encore des cellules souches totipotentes.

2.3.4.3 Les sources de cellules souches

Récemment, les **cellules souches mésenchymateuses (CSMs) multipotentes** ont gagné en intérêt, aussi bien dans la régénération du tissu ostéoarticulaire que pour la régénération osseuse, en **alternative** à l'utilisation de chondrocytes ou des ostéoblastes autologues, en raison d'une **facilité d'isolement** de ces cellules ainsi qu'une **expansion élevée *in vitro***. Les CSMs ont une forte capacité proliférative et peuvent être dérivées de nombreux tissus, incluant la **moelle osseuse**, le **tissu adipeux**, la **synovie**, le **périoste**, le **cordons ombilical** (appelé encore la **gelée de Wharton**) ou le **placenta** (Pittenger et al., 1999; Diekman et al., 2010; Arufe et al., 2010; Reppel et al., 2014).

Pour satisfaire à la définition de CSMs et selon la société internationale pour la thérapie cellulaire, les **critères minimaux** pour la standardisation de CSMs humaines sont :

- Ces cellules doivent être **adhérentes à la surface d'un plastique** en culture *in vitro*
- Elles **doivent exprimer** le CD105, CD73 et CD90, avoir un **faible taux** de CMH-I et **être négatives** pour le CMH-II, CD45, CD34, CD14 et CD11b
- Elles doivent être **capables de se différencier** en **ostéoblastes**, en **adipocytes** et en **chondroblastes *in vitro*** (Dominici et al., 2006)

La différenciation des CSMs *in vitro* vers les lignées ostéogéniques, chondrogéniques et adipocytaires démontre bien le **potentiel de multipotence** de ces cellules (Pittenger et al., 1999) vers des **cellules spécialisées** du tissu mésenchymateux. Les CSMs peuvent également **potentiellement se différencier en cellules non mésenchymateuses** comme les **myocytes**, les **cellules ligamentaires**, **neuronales** ainsi que les **cardiomyocytes** (Chapel et al., 2003), mais la compréhension de cette plasticité des CSMs n'est pas encore élucidée.

Les CSMs comprennent souvent une **population hétérogène** de cellules, avec des proliférations ainsi que des potentiels chondrogéniques ou ostéogéniques variés (Huang et al., 2010; Eslaminejad and Faghihi, 2011). Une **identification des marqueurs spécifiques** pour l'isolement de ces sous-populations de cellules avec des potentiels chondrogéniques et ostéogéniques plus importants pourra augmenter la formation de ces tissus caractéristiques.

Les CSMs sont en **faible quantité selon les sites de prélèvement**. Par exemple, dans les **ponctions de moelle osseuse**, les CSMs ne représentent que **0,001% à 0,01% de la population cellulaire totale** de la moelle (Pittenger et al., 1999). Ce fait est compensé par leur rapide expansion en culture *in vitro*.

Une autre propriété remarquable concernant les CSMs est que ces cellules **ne sont pas immunogènes**. Les propriétés immunomodulatrices des CSMs pourraient être de vraies alternatives aux contraintes considérables du domaine de la médecine régénérative.

Plusieurs témoignages existent sur les **effets suppresseurs des CSMs sur l'activité des cellules immunitaires**. La co-culture entre des CSMs et des lymphocytes T a résulté en une inhibition de la prolifération cellulaire de ces derniers (Di Nicola et al., 2002). Cet effet est vraisemblablement dû à la **sécrétion de facteurs solubles** incluant des interleukines, prostaglandines ou encore par contact cellulaire direct (Bassi et al., 2011). Hormis une activité sur les lymphocytes T, les cellules souches mésenchymateuses exercent leur immunomodulation par un **effet inhibiteur sur la prolifération des lymphocytes B** et la sécrétion d'anticorps par ces cellules (Rasmusson et al., 2007). De plus, ces cellules inhibent la différenciation, la maturation et l'activation des cellules dendritiques (Bassi et al., 2011). Enfin, les CSMs peuvent **inhiber la prolifération des cellules NK** et changer leurs phénotypes, leurs sécrétions de cytokines ainsi que leurs propriétés cytotoxiques (Sotiropoulou et al., 2006). Les CSMs expriment un niveau modéré de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et très peu de classe II et n'expriment pas de molécules de co-stimulation (Klyushnenkova et al., 2005).

Même si les propriétés hypo-immunogéniques des CSMs ont éveillé un intérêt médical pour établir des banques allogéniques de ces cellules pour des applications cliniques en médecine régénérative, une importante question reste à prendre en considération. Est-ce que ces cellules gardent leur propriété immunomodulatrices une fois différenciées? Liu et ses collaborateurs (Liu et al., 2006) ont utilisé un modèle de lapin pour apporter une réponse. Leurs résultats ont montré que des **CSMs différenciées** vers la lignée ostéogénique **n'exprimaient pas le CMH**

de classe II en culture *in vitro*, mais la transplantation de ces cellules différenciées faisait **perdre leurs propriétés immunomodulatrices *in vivo***.

En plus des cellules souches mésenchymateuses, multipotentes, **d'autres sources cellulaires** pourraient se révéler très prometteuses pour l'ingénierie tissulaire dans la médecine régénérative. Il s'agit des **cellules souches embryonnaires (CSEs)** et des **cellules pluripotentes induites (iPS)**, de l'anglais induced Pluripotent Stem cells). Ces deux sources cellulaires sont pluripotentes.

Les CSEs sont des cellules dérivées de la masse cellulaire interne de l'embryon au stade blastocyste. Les CSEs humaines ont été introduites à la fin des années 1990 (Thomson et al., 1998). Leur capacité **d'auto-renouvellement illimité** ainsi qu'une capacité de **différenciation vers les trois feuillets** (mésoderme, ectoderme, endoderme) ont persuadé les scientifiques que cette source de cellules pourrait être appropriée pour une utilisation clinique. Les CSEs ont une **capacité de renouvellement illimité** tant qu'elles sont exposées à une monocouche cellulaire nourricière ou au **facteur inhibiteur de leucémie (LIF)**, de l'anglais Leukemia Inhibitory Factor). La différenciation est initiée après le retrait de cette monocouche ou du facteur de croissance, résultant en la formation de trois agrégats cellulaires appelés corps embryoïdes. Ces corps peuvent se **différencier localement dans les dérivés des trois feuillets germinaux** (Seong et al., 2010). Ainsi, les CSEs pourraient être une source potentielle de cellules souches dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Cependant, une **incompatibilité immunologique**, la **possibilité d'induire des tératomes** après transplantation en raison de leur forte prolifération, ainsi que des **limites imposées par des considérations éthiques** ont rendu les scientifiques réticents à utiliser les CSEs comme source cellulaire pour la médecine régénérative dans l'ingénierie tissulaire (Undale et al., 2009).

Présentes lors des premiers stades du développement de l'embryon, **les cellules souches embryonnaires** sont relativement faciles à cultiver *in vitro*. Toutefois leur obtention passe par la destruction d'un embryon, ce qui pose un problème éthique. De ce fait, **leur utilisation est actuellement interdite en France**. Des dérogations permettant la réalisation de recherches dans des conditions extrêmement contrôlées peuvent toutefois être accordées par **l'Agence de la Biomédecine**.

En raison des limitations mentionnées concernant l'emploi des CSEs, les scientifiques ont tenté d'établir des cellules souches « CSE-like », connues sous le nom de **cellules**

pluripotentes induites ou **iPS**. Ces cellules sont induites à partir de cellules somatiques par une transduction réalisée à l'aide de plasmide ou d'adénovirus (Takahashi and Yamanaka, 2006). En fait, les iPS sont des CSEs spécifiques au patient sans contraintes éthiques et qui ne déclenchent pas de réaction immunitaire (Li et al., 2010).

Toutes les cellules adultes qui prolifèrent peuvent être utilisées pour cette reprogrammation. Les **fibroblastes cutanés** sont les cellules les plus utilisées car elles sont **faciles d'accès**. Mais des essais concluants ont eu lieu avec bien d'autres type de cellules : **kératinocytes**, **adipocytes**, **cellules hématopoïétiques**. Ces cellules ont un potentiel considérable pour la médecine régénérative du fait de leur **facilité d'accès**, leur **croissance illimitée** ainsi que la **pluripotence** induite chez ces cellules. Le potentiel de différenciation de ces cellules vers les cellules de différentes lignées, à l'instar des CSEs a été confirmé (Wernig et al., 2007).

Malgré leur capacité, certaines limites doivent toutefois être considérées pour l'utilisation de ces iPS pour des applications cliniques, comme la **méthode de transduction** par des **adénovirus ou des plasmides**. De plus, les scientifiques estiment que la **reprogrammation n'est pas complète**, dans le sens où des **modifications du génome** acquises au cours de la vie de la cellule **persistent après la reprogrammation** (modifications épigénétiques). Il est également légitime de se demander si la reprogrammation elle-même n'induit pas de **mutations** ou de **modifications génétiques** pouvant altérer le fonctionnement de ces cellules iPS. Les applications à l'heure actuelle des CSEs et des cellules iPS sont encore à un stade préliminaire en raison des limitations posées par les **considérations éthiques et politiques**, aussi bien que les limites dans **l'instabilité génomique**, les **réactions de rejet** et la **capacité d'induire des tumeurs** (Si et al., 2015).

En dehors des cellules primaires différenciées (chondrocytes, ostéoblastes), les **CSMs** sont d'**excellents candidats pour une utilisation thérapeutique**, pouvant révolutionner le domaine de l'ingénierie tissulaire. Toutefois, à la vue des différents essais cliniques réalisés par les équipes travaillant sur le sujet, la **variabilité** entre la **qualité cellulaire** provenant de différents donneurs et de différents tissus, des **protocoles non harmonisés**, des **dosages cellulaires** ainsi que des **fréquences d'administration différentes** rendent les **résultats difficiles à interpréter**.

Une **standardisation des protocoles de culture cellulaire**, de **différenciation**, de **d'expansion** ainsi qu'un **système de contrôle qualité** de ces procédés devraient être établie pour

permettre d'étudier plus finement l'impact de l'utilisation de ces cellules souches. Les cellules pluripotentes (CSEs, iPS), doivent encore fournir des preuves de leur innocuité pour espérer être utilisées en clinique dans la médecine régénérative. Pour avoir des **effets thérapeutiques comparables**, il faudrait que ces **cellules soient rigoureusement identiques**. Pour cela, il faut considérer le phénotype, le potentiel fonctionnel et la sécurité microbiologique des cellules. L'établissement de **bonnes pratiques de fabrications (BPF) permettrait de produire l'ensemble des cellules souches selon un contrôle qualité scientifique et rigoureux**.

Il est maintenant établi que les cellules s'adaptent à leurs environnements avec la production de signaux qui auront pour conséquence la prolifération cellulaire et la différenciation (Baker and Chen, 2012). La **croissance de cellules de mammifères *in vitro*** en utilisant les méthodes de culture traditionnelles est **relativement éloignée de la complexité que les cellules rencontrent dans de réels tissus vivants**. L'une des différences majeures est la **forme et la géométrie** que les cellules adoptent quand elles grandissent sur une surface plane comme les flasques de culture. La **croissance sur des surfaces bidimensionnelles** résulte en un **aplatissement cellulaire** et un **remodelage de la cellule** par l'intermédiaire de son **cytosquelette**. De tels changements ont démontré une altération de l'expression génique (Vergani et al., 2004). L'aplatissement cellulaire affecte également la forme du noyau, qui peut affecter l'expression génique et la synthèse protéique. Ceci a un **impact significatif sur les performances cellulaires** et par conséquent va influencer sur les **résultats d'essais biologiques**. Par exemple, les cultures de cellules en monocouche seraient plus sensibles aux agents thérapeutiques (Sun et al., 2006).

Un environnement plus approprié pour la culture cellulaire pourrait augmenter la **précision prédictive de tests thérapeutiques**, mais aussi **étendre la compréhension de la morphogenèse tissulaire** (Yamada and Cukierman, 2007). La **culture tridimensionnelle** de cellules a donc connu un **intérêt croissant** ces dernières années pour permettre **d'optimiser la structure cellulaire**, mais aussi la **pertinence des tests physiologiques *in vitro***. Cette **dimension supplémentaire** permet **d'augmenter les contacts intercellulaires**, responsables d'une **augmentation de signaux intercellulaires**, facilitant les processus de développement et permettant d'établir des **structures plus complexes**. De plus, la structure tridimensionnelle permet aux cellules de s'organiser en **structures « tissu-like »** à travers une expression plus uniforme de molécules d'adhésion distribuées autour de la surface cellulaire (Cukierman et al., 2002). Dans la culture tridimensionnelle, les récepteurs et les molécules d'adhésion sont

plus naturellement dispersées à la surface cellulaire, contrairement à la culture 2D dans laquelle les cellules sont polarisées et les protéines de liaison tendent à être concentrées sur la surface ventrale des cellules au contact de la surface plastique (Bokhari et al., 2007).

Des solutions apportées par l'ingénierie tissulaire existent pour offrir des alternatives aux méthodes conventionnelles réalisées dans le cadre de la médecine régénérative pour des lésions focales cartilagineuses, impactant ou non l'os sous-chondral, ou bien encore pour des lésions osseuses non consolidées par exemple. Pour des lésions osseuses de taille étendue, d'autres stratégies seront établies afin de combler la perte tissulaire. Ces solutions feront l'objet d'un développement dans la prochaine partie.

3. Stratégies pour le comblement de lésions osseuses étendues

3.1. Pathologies osseuses

Comme nous l'avons vu précédemment, l'os a la capacité de se réparer de lui-même en mettant en place le processus de consolidation osseuse expliqué dans la partie précédente (voir la section 2.1.2.2 Fracture osseuse). Cependant, il existe des situations cliniques qui requièrent de grandes proportions de régénération osseuse pour des défauts osseux de taille supérieure pouvant être causés par d'**importants traumatismes, des infections osseuses, des résections tumorales osseuses** par exemple.

Ces pathologies nécessitent au vu de la taille du défaut plus important, des stratégies visant à **comblent ces défauts**.

Le choix est fait ici de citer parmi les pathologies induisant une perte osseuse et pouvant nécessiter un comblement osseux, celles associées au domaine maxillo-facial.

3.1.1. Maladies parodontales

La maladie parodontale est une maladie qui regroupe les affections impactant le **parodonte**, qui est l'ensemble des tissus de soutien de la dent (**Figure 16**):

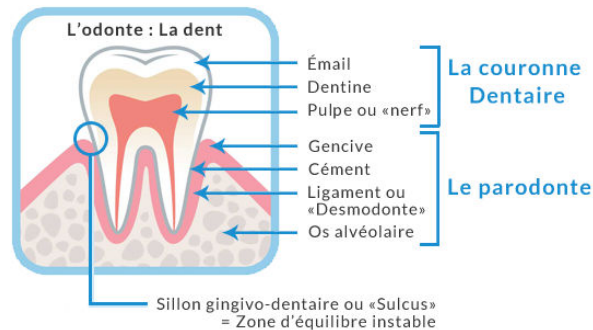


Figure 16: Représentation schématique de la couronne dentaire et du parodonte (source internet : Dr Lumbroso, 2014)

Le parodonte est composé de l'**os alvéolaire** du maxillaire ou de la mandibule, du **ligament alvéolo-dentaire** ou **desmodonte**, de la **gencive** et du **cément** de la racine dentaire (**Figure 17**). Il permet donc un **ancrage stable et efficace de la dent** ainsi que son **soutien**. Outre la gencive qui recouvre l'os alvéolaire, le ligament alvéolo-dentaire sert de lien entre le cément (enveloppe minéralisée entourant la racine des dents) et l'os alvéolaire.

La maladie parodontale est consécutive à une **gingivite**. La gingivite implique une inflammation de la gencive causée par l'**accumulation de plaque bactérienne** au niveau du **sillon gingivo-dentaire**. Elle est entièrement **réversible** avec une hygiène dentaire adaptée. Si cette inflammation persiste, il va alors se créer une **poche parodontale** au niveau du sillon, permettant l'**accumulation de bactéries**. La bactérie principalement incriminée dans la parodontite est *Porphyromonas gingivalis*. Si cette poche s'étend en profondeur dans le parodonte, la parodontite sera alors diagnostiquée (**Figure 17**). Elle impliquera des **lésions du desmodonte**, perturbant l'ancrage des racines de la dent dans l'os alvéolaire, qui sera également touché par une **perte osseuse**.

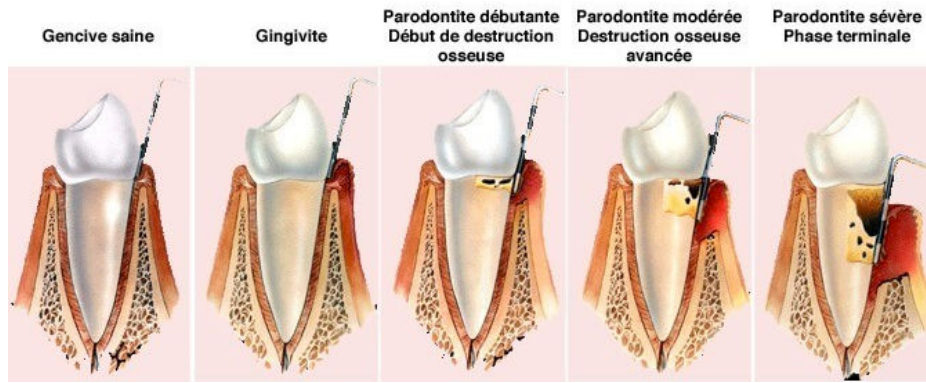


Figure 17: Installation progressive de la parodontite associée à une perte osseuse (source internet : Dr Lumbroso, 2014)

La maladie parodontale est une **maladie multifactorielle** provenant des bactéries responsables d'une **altération de la réponse inflammatoire** (Akcali et al., 2014; Huck et al., 2015). De plus, les débris issus de ces bactéries peuvent migrer dans la circulation générale et impacter secondairement d'autres compartiments. Des études ont pu corroborer un **lien entre la parodontite et des maladies systémiques** (Azarpazhooh and Tenenbaum, 2012), quoique les mécanismes entiers ne sont pas encore élucidés. La maladie parodontale comporte des **facteurs de risques avérés** tels que le **tabagisme** (Jansson and Lavstedt, 2002) ou le **diabète** (Saini et al., 2011), et des **facteurs de risques probables** comme l'**âge** (Albandar and Kingman, 1999), le **sexe** (Eke et al., 2012), l'**ethnie** (Eke et al., 2012), le **stress** (Ng and Keung Leung, 2006) ou encore les **maladies systémiques** (Genco and Borgnakke, 2013).

La parodontite réduit la fonction masticatoire par la **réduction de la masse osseuse mandibulaire et maxillaire**, et provoque dans des stades avancés la **perte des dents**. Cette conséquence invalidante et inesthétique pour les patients peut avoir un impact sur la qualité de vie, mais aussi sur les dépenses publiques de santé.

L'épidémiologie de cette affection est considérable : une revue systématique a montré à partir de 72 études regroupant plus de 290 000 sujets âgés de plus de 15 ans que la maladie parodontale était la **sixième pathologie en terme de prévalence** (Kassebaum et al., 2014). Sur les sujets étudiés, les auteurs ont observé que près de 11% étaient atteints de parodontite, avec une prévalence variant selon les pays étudiés. Cette prévalence est associée à des coûts de traitements élevés, avoisinant les 50 milliards de dollars par année dans le monde.

3.1.2. Les principales tumeurs maxillo-mandibulaires

3.1.2.1 Les kystes

Par définition, on parle de kystes pour des **cavités intraosseuses** dont la paroi est **revêtue d'épithélium** et dont le contenu est secrété par le tissu de revêtement. Il faut distinguer les **kystes d'origine dentaire** (les plus fréquents) des **kystes d'origine non dentaire**.

Les **kystes d'origine dentaire** ont une étiologie **inflammatoire** dans la plupart des cas, mais peuvent aussi être **dentigères** ou encore **épidermoïdes**.

Les **kystes inflammatoires** se développent à l'occasion d'une infection dentaire (carie, pulpite, nécrose). Les **kystes dentigères** sont également très fréquents. Des débris épithéliaux ou les cordons épithéliaux reliant le follicule dentaire à la lame épithéliale se différencient en cavités kystiques. Les **kystes épidermoïdes** dérivent des restes épithéliaux de la lame dentaire qui unissent la gencive à l'organe au stade cloche.

Pour les **kystes non dentaires**, les **kystes fissuraires** et les **kystes du canal nasopalatin** sont les représentants, avec une prévalence moindre que pour les kystes dentaires. Les **kystes fissuraires** proviennent d'une **inclusion épithéliale** au niveau des fentes faciales embryonnaires. Les **kystes du canal nasopalatin** proviennent vraisemblablement d'une **prolifération de débris épithéliaux** qui vont causer un recouvrement du canal incisif.

3.1.2.2 Les tumeurs

Parmi les tumeurs intervenant dans la sphère maxillo-faciale, il convient de citer les **tumeurs bénignes** ainsi que les **tumeurs malignes**. Les tumeurs bénignes peuvent être épithéliales, mésoenchymateuses ou les deux origines et peuvent être dentaires ou non.

La **tumeur** bénigne d'origine **dentaire** la plus fréquemment rencontrée est la tumeur épithéliale ou **améloblastome**. Ces tumeurs dérivent des **améloblastes** (cellules produisant l'émail dentaire) qui ont perdu la capacité à fabriquer l'émail. L'âge de survenue de ces tumeurs est situé entre quinze et trente ans. Ce sont des tumeurs à développement progressif et asymptomatique. Pour les tumeurs **non dentaires**, il convient de citer les tumeurs **osseuses** (ostéome ostéoïde, ostéoblastome et ostéome), **cartilagineuses** (chondrome, ostéochondrome, chondroblastome et fibrome chondromyxoïde) ainsi que les tumeurs **conjonctives** (dysplasie

fibreuse). Ces tumeurs non dentaires sont sensiblement similaires dans leurs aspects ainsi que dans les traitements à celles rencontrées dans les localisations sur d'autres os.

Les **tumeurs malignes d'origine non dentaire**, à l'instar des tumeurs bénignes non dentaires, sont sensiblement similaires aux tumeurs localisées sur d'autres os. Les **tumeurs osseuses (ostéosarcome)** sont l'exemple le plus représenté. Il s'agit de tumeurs primitives de l'os dont les cellules tumorales élaborent un tissu osseux ostéoïde. Il y a également les **chondrosarcomes** et les **fibrosarcomes**, plus rares.

Les **tumeurs malignes d'origine dentaire** concernent les **carcinomes** et les **sarcomes odontogéniques** qui sont des lésions tumorales exceptionnelles.

L'ensemble de ces pathologies nécessite, après diagnostic, une résection du tissu kystique ou tumoral, mais également de l'os sain entourant le site lésionnel. Suivant la taille de la résection, l'utilisation de matériau pour le comblement osseux peut s'avérer nécessaire.

En dehors des traumatismes osseux tels que les fractures, d'autres pathologies peuvent également nécessiter des stratégies de comblement comme la maladie parodontale ou encore les lésions kystiques ou tumorales. Ces dernières pathologies ont toutefois une prévalence bien plus faible que les deux premières dans la prise en charge des pertes osseuses.

3.2. Solutions thérapeutiques actuelles utilisées pour les lésions osseuses étendues

3.2.1. Mesures non médicamenteuses et traitements pharmacologiques

Les mesures non médicamenteuses comme les solutions pharmacologiques concernant les lésions osseuses étendues participent à la guérison optimale des patients. Pour les **lésions osseuses étendues** causées par un traumatisme, ces **mesures** sont **sensiblement équivalentes aux mesures énoncées dans la partie concernant les lésions ostéochondrales** (voir les parties 2.2.1 et 2.2.2) pour prendre en charge la douleur associée au traumatisme, ou apporter une supplémentation vitamino-calcique pour permettre une meilleure cicatrisation osseuse, mais également pour la rééducation post-opératoire des patients.

La **prise en charge de l'inflammation** pour la **maladie parodontale** peut également **réduire la propagation de l'infection bactérienne** et **ralentir la destruction du tissu osseux** mandibulaire ou maxillaire. Pour les **tumeurs bénignes ou malignes**, il est également à noter

qu'une chimiothérapie associée à une radiothérapie devra être mise en place, mais cet aspect ne sera pas abordé dans ce manuscrit.

3.2.2. Traitements chirurgicaux en orthopédie

➤ **Traitements chirurgicaux en orthopédie**

Les défauts osseux liés à des traumatismes en orthopédie peuvent être classifiés en deux catégories : les **défauts cavitaires** quand la perte osseuse n'affecte pas les propriétés biomécaniques mais interfère avec la synthèse osseuse et les **défauts segmentaires** quand les propriétés mécaniques ainsi que la stabilité de structure de l'os, comme organe, sont menacées (Yu et al., 2013).

La chirurgie réparatrice reste toujours un traitement de choix pour ces lésions, et la **greffe osseuse autologue** est considérée comme **l'approche standard en clinique**, dans le but **d'exploiter la capacité naturelle de l'os à se régénérer**, quand un défaut osseux apparaît. Les défauts osseux étendus sont eux cependant mieux traités par des greffes allogéniques en dépit de leur nature moins ostéogénique.

Dans plusieurs cas, la **correction d'un défaut osseux** nécessite des **interventions chirurgicales lourdes** utilisant des techniques de greffes osseuses. Ces techniques, plus ou moins agressives peuvent induire un **risque d'infection**, en plus **d'induire des douleurs** et ne garantissent pas forcément une correction complète du défaut.

Quand un défaut osseux étendu doit être traité, le **défi** est **double** : d'une part, **l'os doit rester recouvert** par la peau ou les muscles, l'absence de couverture par les tissus mous provoquera une **nécrose** et la non-viabilité des tentatives thérapeutiques. D'autre part, même un os bien recouvert nécessitera une **vascularisation convenable et fonctionnelle** d'une taille appropriée. Si ces conditions ne sont pas remplies, la cicatrisation osseuse n'aura pas lieu.

Il sera fait ici mention de deux techniques chirurgicales ayant rencontré le plus de succès pour la cicatrisation du tissu osseux suite à un traumatisme important : la **technique d'Ilizarov** et la **technique de Masquelet**.

- **Technique d'Ilizarov**

Dès 1969, une publication apparaissait concernant la technique d'Ilizarov ayant pour but de traiter « les défauts tubulaires des os longs grâce à l'un de leurs fragments » (Ilizarov and Ledjaev, 1969). Il a cependant fallu attendre les années 1980 pour que des auteurs italiens puisse donner du crédit à cette technique (Landini et al., 1984). Cette méthode met à profit le **concept d'ostéogénèse par distraction (Figure 18)**.

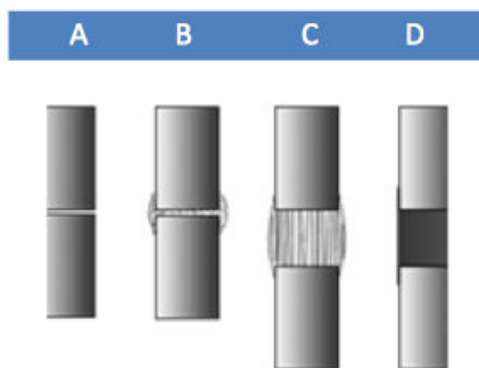


Figure 18: Représentation schématique de l'ostéogénèse par distraction en 4 étapes
(source : www.intechopen.com)

A) réalisation d'une ostéotomie, B) période de latence (formation d'un cal), C) période de distraction, D) période de consolidation

En créant une fracture dans le cortex osseux, le processus de formation d'un cal est obtenu après immobilisation durant 7 à 10 jours. Ensuite, une **distraction fine** de moins de 1 mm par jour est exercée et la **lacune osseuse est progressivement comblée**.

Depuis son introduction pour le traitement de pseudarthrose, cette technique a été utilisée mondialement et est connue également sous le nom de transport osseux. Il a été montré que **durant l'allongement osseux, les tissus mous s'étirent également dans un processus de métaplasie physiologique** (Paley et al., 1989). Elle a également obtenu de **bons résultats** dans le cadre de **traitements de perte osseuse**, pouvant aller en théorie jusque 18 à 20 cm de long selon l'auteur de la technique.

Le dispositif utilisé pour cette technique utilise la **fixation externe (Figure 19)**: il est composé de **fixateurs circulaires**, modulaires. Des anneaux en acier ou en titane sont **fixés à l'os par des broches** (appelées broches de Kirschner). Les anneaux sont reliés entre eux par des jeux de vis et de boulons. L'anneau supérieur est fixé à l'os sain par les broches en tension qui vont transférer les contraintes vers le dispositif externe, transférées jusqu'à

l'anneau inférieur qui sera lui aussi fixé à l'os sain, préservant le site de fracture. L'anneau du milieu sert de soutien aux fragments osseux.



Figure 19: Dispositif d'Ilizarov traitant une fracture du tibia et de la fibula sur la jambe droite (source : wikipedia)

La construction circulaire ainsi que les broches en tension dans ce dispositif, permettent un meilleur support structurel que les systèmes de fixation monolatéraux et permettent de supporter des poids plus rapidement.

Cette technique permet donc une **bonne immobilisation des fragments osseux** et peuvent traiter aussi bien les **pseudarthroses** que les **pertes osseuses conséquentes, traumatiques** ou causées par des **résections de tissus tumoraux osseux**. Elle permet également de **corriger des malformations osseuse** (Golyakhovsky and Frankel, 2010).

Cependant, malgré les avantages proposés par cette technique, quelques complications peuvent apparaître durant la durée du traitement, comme des **infections** ou des **dystrophies** et de **sévères douleurs** ayant amené certains patients à l'amputation. La **durée de ce traitement** (croissance osseuse de 1mm par jour) et ses **conséquences négatives** ont découragé plusieurs thérapeutes à considérer l'ostéogénèse par distraction chez des patients avec des pertes osseuses conséquentes, et les cas complexes sont souvent envoyés dans des centres spécialisés (Paley, 1990).

Les connaissances sur cette technique d'Ilizarov, une plus grande expérience ainsi que de meilleurs moyens de fixation ont toutefois permis aux chirurgiens de mieux l'appliquer. De plus, de nouvelles approches ont été testées, principalement en expérimentation animale, combinant la technique d'Ilizarov avec l'ingénierie tissulaire (Marcacci et al., 2007; Sunay et

al., 2013; Dehghan et al., 2015). Néanmoins, elle reste sujette à des complications et ne peut pas systématiquement assurer un résultat satisfaisant, suite à une perte osseuse importante.

- **La technique de Masquelet**

Initialement, la technique de Masquelet permettait la reconstruction d'un défaut situé sur les os longs, par une **membrane induite** sur une **tige en ciment acrylique** insérée, pour remplir le défaut (**Figure 20**). Une **seconde étape chirurgicale**, une fois la membrane induite, consiste à **retirer le ciment** et à **comblar la lacune osseuse avec une autogreffe d'os spongieux** (Masquelet et al., 2000).

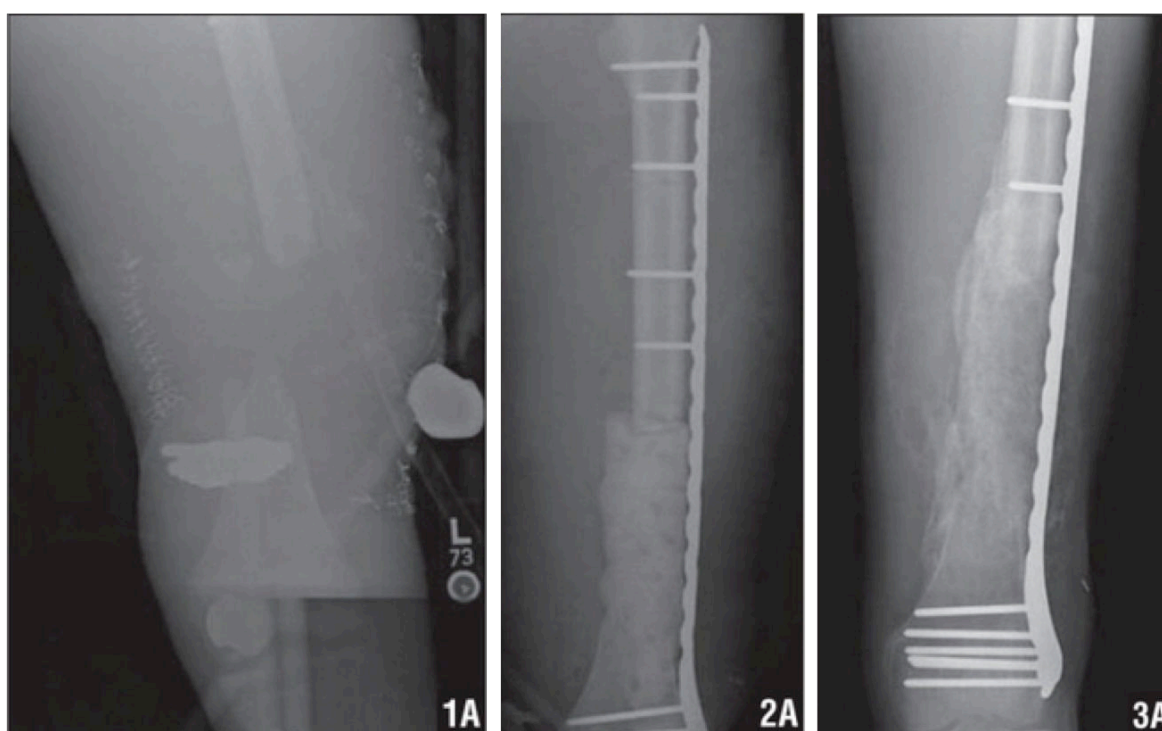


Figure 20: Consolidation osseuse d'une fracture ouverte par la technique de Masquelet (Donegan et al., 2011)

Après réduction de la fracture osseuse ouverte (1A), les fragments osseux sont alignés au moyen d'une plaque et de vis, puis le ciment acrylique est inséré dans le défaut osseux (2A). Après 4 à 5 semaines, le ciment est retiré et une greffe osseuse est introduite à l'intérieur de la membrane induite. Après 4 mois, l'os est consolidé et le patient peut supporter des charges sans manifester de douleurs (3A).

Des études approfondies sur le modèle animal ont montré que la **membrane induite compartimente le défaut osseux**, le protégeant de l'environnement cellulaire de la couche musculaire (Klaue et al., 2009). Cette technique a gagné un intérêt grandissant ces dernières années pour le **traitement de défauts osseux importants** (Apard et al., 2010). De bons

résultats ont également été obtenus en réalisant une **étude large** utilisant cette technique avec **une autre autogreffe**, moins contraignante que la collecte d'os spongieux (la **technique forage-irrigation-aspiration** de l'anglais reamer-irrigator-aspirator ou RIA), avec une morbidité réduite pour la collecte de greffe autologue (Stafford and Norris, 2010).

Les études histologiques de caractérisation réalisées sur des membranes induites chez l'homme, ont démontré que la **meilleure vascularisation était obtenue après un délai de 30 jours** de latence, et que **ce niveau diminuait de 60% pendant les 20 jours suivants** (Aho et al., 2013). Les membranes induites durant 30 jours présentaient l'expression la plus haute de **VEGF**, d'**IL-6** et de **collagène de type I** alors que des membranes âgées de 60 jours exprimaient moins de 40% de ces niveaux. De plus, la formation du propeptide de protocollagène de type I était deux fois plus élevée, alors que la fixation de calcium était 4 fois plus importante pour des membranes de 30 jours par rapport à celles de 60 jours. Les auteurs de l'étude ont conclu que la deuxième intervention chirurgicale devait avoir lieu avant le deuxième mois suivant l'implantation du ciment acrylique (Aho et al., 2013).

Un **affinage de la technique de Masquelet** a récemment été publié par les auteurs originaux (Mauffrey et al., 2016), et des **études plus approfondies** ont été réalisées après un essai multicentrique (Fischer et al., 2016). Il a été montré que la formation osseuse par cette technique provient d'une émulation incomplète de l'expression des cytokines dans la régénération physiologique de l'os (Fischer et al., 2016). **Une augmentation franche de l'IGF-1** a été rapportée avec la technique de Masquelet, alors que la **contribution du TGF- β est plus faible**.

Ces deux techniques chirurgicales sont les principales techniques pour réussir avec le temps à combler une lacune osseuse importante en orthopédie. Elles permettent de **rétablir des défaut osseux** conséquents aux origines diverses : traumatiques, ou encore suite à des résections d'os consécutifs à des infections du tissu osseux (**ostéites**), mais encore pour permettre de **corriger des défauts congénitaux** de structure ou de fonction. Il est intéressant de noter que ces **deux techniques chirurgicales** peuvent être **adaptées avec des stratégies utilisant l'ingénierie tissulaire**. Cependant, certaines contraintes limitent l'utilisation de ces techniques chirurgicales, notamment le temps nécessaire pour pouvoir rétablir le tissu osseux, et la technique en elle même pouvant être sujette à des complications.

3.2.3. Traitements chirurgicaux de la sphère maxillo-faciale

Les **pathologies dentaires** évoquées auparavant peuvent nécessiter des **greffes osseuses** pour restaurer le capital osseux initial. En effet, la **diminution du volume osseux** peut **impacter l'attache de la dent** sur le support osseux et causer une perte de celle-ci. Si l'os mandibulaire et maxillaire est **privé de dent**, un **phénomène de résorption osseuse** aura lieu.

Durant les 6 mois après la **perte de la dent**, le **volume osseux peut être diminué de 40%**, avec des variations selon les personnes et les pathologies impliquées. Parfois, cette résorption est si intense qu'il faut user de **stratégies pour stimuler la synthèse osseuse** afin de pouvoir réaliser la pose **d'implant dentaire sur un socle osseux suffisant**.

Outre les lésions cancéreuses, qui peuvent entraîner des résections osseuses maxillaires ou mandibulaires importantes et nécessitant forcément des greffes d'os autologue dans ces cas précis, la pathologie parodontale ainsi que les lésions kystiques peuvent être traitées par des actes chirurgicaux simples et moins invasifs. Il sera fait mention ici de ces techniques permettant de restaurer un volume osseux suffisant à la réhabilitation prothétique.

- **Grefe de la crête alvéolaire ou greffe de cavité**

Comme énoncé précédemment, **l'extraction simple d'une dent** ou sa **perte (Figure 21-step 1)**, par diminution du volume osseux entraîne une **cavité entourée par de l'os alvéolaire**. Le but unique de cet os est de servir de support à la dent. Quand une **dent** est **perdue**, l'os alvéolaire va commencer à se **résorber (Figure 21-step 2)**, à moins qu'il soit directement remplacé par une nouvelle dent, un implant, ou dans ce cas une **greffe de la crête alvéolaire** ou « **greffe de cavité** ».

Cette **greffe de cavité** est conçue pour **remplir le vide créé** par la dent manquante et maintenir le volume de cet espace (**Figure 21-step 3**). Après le remplissage de la lacune osseuse par des **biomatériaux de comblement**, le volume comblé est **recouvert par une membrane de régénération tissulaire guidée**, servant de **couvercle étanche** pour empêcher l'invagination de tissus épithéliaux dans la lacune (**Figure 21-step 4**), puis la **gencive est suturée** à l'aide de fils résorbables (**Figure 21-step 5**). Durant le temps de latence, l'os naturel aura l'opportunité de proliférer et remplir cet espace. Selon la taille de la lacune à

comblent, le temps de greffe alvéolaire nécessite entre 3 et 6 mois de consolidation pour permettre la pose d'un implant.

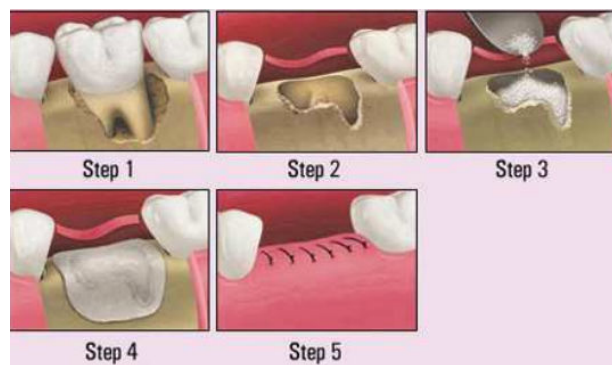


Figure 21: Greffe de la crête alvéolaire (source : ericjacksondds.com)

- **La greffe sous-antrale ou procédure d'élévation du plancher du sinus**

Le maxillaire ou mâchoire supérieure possède plusieurs qualités qui en font un **tissu unique** pour la **greffe et la pose d'implants**. La différence la plus significative en comparaison de la mandibule réside dans la **présence du sinus maxillaire**. Ce sinus est l'un des **espaces aériens naturels** qui sont présents dans tous les crânes humains (**Figure 22**). Son rôle est de **réchauffer, hydrater et filtrer l'air** lorsque nous respirons. Il peut se localiser à proximité des racines des dents dans la mâchoire supérieure. Lors d'une résorption osseuse importante, l'espace osseux supra-sinusien peut même être extrêmement réduit.



Figure 22: Sinus maxillaire s'étendant autour des molaires de la mâchoire supérieure
(source : Connecticut maxillofacial surgeons Inc.)

En conséquence de cette relation, quand une dent est perdue, le résultat peut **diminuer l'épaisseur de l'os entre la cavité orale et la cavité aérienne**. Ceci peut rendre la pose d'un

implant maxillaire postérieur bien plus difficile que pour le reste de la mâchoire supérieure, obligeant les chirurgiens à développer une technique pour parer à ce problème.

La **greffe sous-antrale** ou **procédure d'élévation du plancher du sinus** (« sinus lift ») est réalisée depuis plusieurs années pour permettre d'utiliser des **implants en remplacement des molaires maxillaires**.

Cette procédure est réalisée en créant des **petites fenêtres** dans le sinus au dessus de la racine maxillaire des dents (**Figure 23-1**). L'intégrité de la membrane de revêtement du sinus n'est pas impactée par cette procédure, elle est simplement rehaussée pour former une cavité (**Figure 23-2**) qui pourra être **remplie avec des matériaux de comblement** sensiblement équivalents à ceux utilisés pour la greffe de crête alvéolaire (**Figure 23-3**). Une **période de latence** de 6 à 9 mois est réclamée pour permettre à la greffe de se consolider avec l'os environnant (**Figure 23-4**). Cette augmentation du volume osseux permettra par la suite la **pose d'un implant** (**Figure 23-5**).

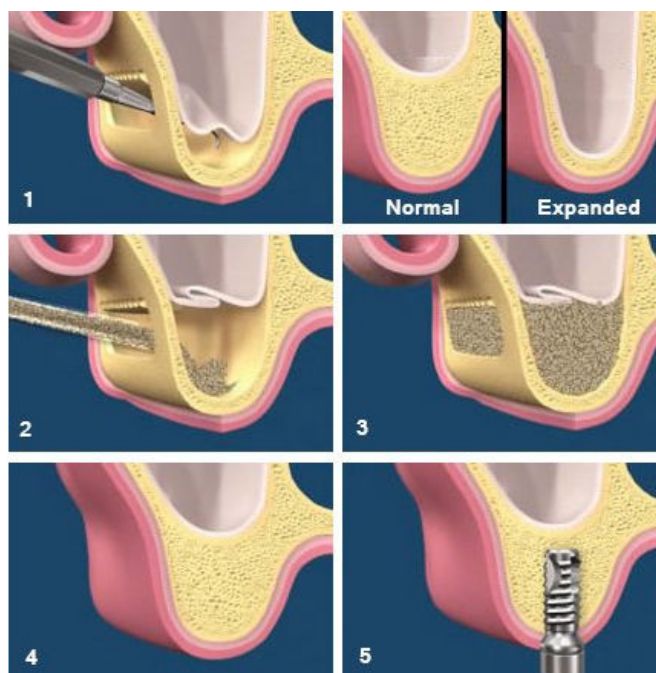


Figure 23: Procédure d'élévation du plancher du sinus
(source : dentalimplantcostguide.com)

Ces deux techniques visant à **recréer du volume osseux** peuvent être combinées avec la **stratégie de régénération osseuse guidée** au moyen de biomatériaux dédiés décrits auparavant (voir partie 2.3.1 Les biomatériaux utilisés dans la régénération des lésions osseuses).

3.3. L'ingénierie tissulaire dans le traitement de lésions osseuses étendues

3.3.1. Les biomatériaux utilisés dans le traitement de lésions osseuses étendues

Comme exprimé auparavant, les **défauts osseux de tailles conséquentes** causés par des traumatismes, des fractures ou des infections par exemple, ne permettent pas de cicatriser par le processus de guérison spontanée du tissu osseux. Ceci peut résulter en des **défauts permanents** entraînant une **perte de fonction**. La capacité qu'a l'os à se régénérer diminue avec l'âge, il y a donc un besoin de trouver des traitements dédiés pour les patients, la prévalence des pathologies du squelette étant susceptible d'être augmentée avec l'accroissement de l'espérance de vie et le vieillissement des populations. Le **tissu osseux** est à l'heure actuelle **le deuxième tissu le plus transplanté après le sang** (Oryan et al., 2014).

Dans le **traitement des défauts osseux**, la référence reste la **greffe osseuse** : cette **greffe** pourrait être **utilisée seule ou en combinaison avec d'autres biomatériaux** pour permettre une **consolidation osseuse par une ostéoinduction**, une **ostéoconduction** et une **ostéogénèse**. Les autogreffes étant **limitées** dans les **fractures pathologiques** et les défauts osseux massifs, d'autres greffes ont été introduites pour s'affranchir des limites de l'autogreffe dans de telles situations (Dimitriou et al., 2011). Les autres techniques sont l'utilisation d'allogreffe, de xéno greffe ou de biomatériaux de l'ingénierie synthétique. Chacune des options choisies pour le comblement de défaut osseux présente des avantages et des inconvénients (**Tableau 5**).

	Avantages	Inconvénients
Autogreffe	Ostéogénique Ostéoconducteur Ostéoinducteur	Morbidité élevée, douleur et infection au niveau du site donneur Manque de vascularisation Quantités limitées
Allogreffe ou Xéno greffe	Ostéoconducteur Ostéoinducteur Grandes quantités Pas de morbidité du site donneur	Manque d'ostéogénicité et de vascularisation Risque de rejet plus élevé Risque de transmission de maladie Coûts élevés
Biomatériaux	Capacité à intégrer des facteurs de croissance et des cellules pour l'ostéogénicité et l'intégration Peut correspondre parfaitement au site du défaut Pas de morbidité du site donneur	Ostéogénicité limitée par la porosité du matériel Biodégradabilité limitée des différents biomatériaux Faible néovascularisation Réponse immunitaire inconnue Propriétés mécaniques limitées

Tableau 5: Avantages et inconvénients des différentes greffes osseuses
(adapté de Orciani et al., 2017)

Les **capacités réparatrices intrinsèques des greffes** osseuses représentent un **modèle naturel à reproduire** en utilisant de nouvelles options thérapeutiques dans les stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse : un **biomatériau approprié**, des **facteurs de croissance** et/ou des **cellules**.

Les biomatériaux doivent **supporter la colonisation, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire**. Ils doivent également posséder des **propriétés physico-chimiques appropriées** (rigidité, biodégradabilité, etc.) qui sont essentielles pour la formation tissulaire et sa résistance aux contraintes mécaniques (**Tableau 6**).

Biocompatibilité	Capacité à supporter l'activité cellulaire normale sans effet toxique chez les tissus hôtes en particulier durant la dégradation Propriétés ostéoconductrices, ostéoinductrices et ostéogéniques
Biodégradabilité	Dégradation contrôlée d'un biomatériau avec le temps nécessaire pour générer de l'espace pour la croissance du nouveau tissu osseux et, éventuellement le remplacement du biomatériau synthétique Taux de dégradation peut être adapté pour les applications requises
Taille des pores et porosité	Caractéristique critique pour la diffusion de l'oxygène et des nutriments pour la survie et la prolifération cellulaire Taille des pores minimum de 100µm Taille des pores de 200 à 350µm interconnectés optimale pour la croissance du tissu osseux Structures mésoporeuses (micro et macroporosité) sont meilleures que celles macroporeuses pour supporter l'adhésion cellulaire La porosité influence la tenue mécanique du biomatériau
Propriétés mécaniques	Devrait correspondre avec les propriétés de l'os pour faire face aux tensions mécaniques et réagir aux transferts de charges Les différences entre les caractéristiques mécaniques de l'os cortical et spongieux influencent la conception du biomatériau

Tableau 6: Caractéristiques des biomatériaux pour les stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse (adapté de Orciani et al., 2017).

La partie précédente concernant les biomatériaux peut être utilisée pour le comblement de lésions osseuses. En pratique, le **manque d'intégrité mécanique** des différents produits empêche la considération d'une exploration clinique pour les lésions osseuses étendues. Il sera fait mention ici de stratégies pour établir des **biomatériaux** ayant des **compositions et des propriétés mécaniques** similaires à l'os physiologique.

3.3.1.1 *Les produits naturels*

Les produits naturels comprennent, en plus des greffes allogéniques particulières qui ne seront pas étudiées dans ce chapitre, la matrice osseuse déminéralisée. Cette **matrice osseuse déminéralisée** (de l'anglais demineralized bone matrix ou **DBM**) est un **dérivé allogénique** ou **xénogénique hautement transformé** avec au moins **40% du contenu minéral de la matrice osseuse retiré** par un acide, alors que les collagènes et les protéines non-collagéniques et les facteurs de croissance restent intacts (Boyce et al., 1999). Une **intégrité structurelle** ainsi que des **propriétés mécaniques de résistance à la compression inférieures** à l'autogreffe confèrent à la DBM une utilisation principale dans le **comblement de défauts osseux** (Finkemeier, 2002). L'**ostéoconduction** de cette matrice est apportée par la **structure matricielle** pour la population cellulaire et en générant du nouveau tissu osseux après les traitements de déminéralisation (Khan et al., 2005). Les propriétés **ostéoinductrices** de cette matrice sont déterminées par la **présence de facteurs de croissance**, qui est **directement corrélée à la méthode d'obtention** de la matrice. L'**intégration** de la DBM est similaire à la **greffe osseuse autologue**, avec les facteurs de croissances déclenchant la **cascade de l'ossification endochondrale**, formant du nouveau tissu osseux au site d'implantation (Wang and Yeung, 2017).

3.3.1.2 *Les produits synthétiques*

Comme mentionné auparavant, les **quantités limitées** en approvisionnement pour les greffes allogéniques et autologues, face aux demandes chez une population vieillissante en plus de **limitations propres aux greffes autologues et allogéniques**, ont permis la floraison sur le marché de **substituts osseux synthétiques** (Wu et al., 2014). Le **sulfate de calcium**, les **céramiques de phosphate de calcium** ainsi que les **verres bioactifs ou bioverres**, ou les **combinaisons** de ceux-ci, sont les substituts synthétiques les plus communs à l'heure actuelle (Zwingenberger et al., 2012).

- **le sulfate de calcium** : Le sulfate de calcium, aussi connu sous le nom **d'emplâtre de Paris**, est une sorte de **céramique biodégradable et ostéoconductrice** de formule CaSO_4 . Le produit a été utilisé comme matériau de comblement depuis 1892. Le sulfate de calcium est préparé en chauffant du gypse avec une structure cristalline alpha hémihydratée, et peut être **modélisé selon plusieurs formes**, comme des **sphères** ou encore des **fluides visqueux injectables** qui durcissent *in vivo* (Roberts and Rosenbaum, 2012). Bien que **manquant de structure macroporeuse**, le sulfate de calcium a un **fort taux de résorption** et une

résistance à la compression faible, ce qui ne le rend utile que dans le cadre du comblement de **petits défauts osseux** (Carson and Bostrom, 2007). Cependant, la **facilité de préparation** et le **faible coût** de cette espèce permettraient de regagner un intérêt en thérapeutique, si le sulfate de calcium était **combiné** à un autre substitut osseux synthétique.

- **Les céramiques de phosphate de calcium** : les céramiques de phosphate de calcium sont constituées d'**hydroxyapatite de calcium (HAp)**, de **phosphate tricalcique (TCP)** et de la **combinaison** des deux espèces pour former des **phosphates de calcium biphasiques**, composés chimiques **similaires à la matrice minéralisée de l'os** (Zwingenberger et al., 2012). Ce sont des sels minéraux synthétiques produits normalement par **agglomération à de hautes températures**, en excluant la vapeur d'eau et formés par **compaction à haute pression**. Les dispositifs implantables poreux, les implants denses non poreux ou les particules granulaires poreuses sont les formes commerciales les plus répandues.

Etant **bioabsorbables** avec une **excellente ostéoconductivité**, les céramiques de phosphate de calcium ont gagné en intérêt et ont été largement expérimentées en clinique (Oonishi et al., 1997; Schwartz and Bordei, 2005; Scheer and Adolfsson, 2009). Contrairement au ratio calcium/phosphate (Ca/P) des phosphates de calcium biphasiques, qui dépend de la quantité d'HAp et de TCP, les ratios pour l'HAp et le TCP, qui sont les deux espèces de céramiques les plus représentées, sont bien connus. Plusieurs paramètres de ces céramiques comme le **taux de résorption** et les **propriétés mécaniques** sont strictement liés à ce **ratio Ca/P**. De plus, la **structure cristalline et poreuse** est également un facteur de choix au moment de sélectionner la céramique de phosphate de calcium.

(a) L'hydroxyapatite

L'HAp est un minéral naturel d'apatite de calcium avec la formule $Ca_{10}[PO_4]_6[OH]_2$ (**ratio Ca/P de 1,67**) et compose environ **50% du poids du tissu osseux**, lui conférant d'excellentes propriétés **ostéoconductrices** et **ostéointégratives** (Bhatt and Rozental, 2012). Les propriétés mécaniques de l'HAp sont similaires à l'os spongieux, cassant et faible aux forces de tensions et de cisaillement, mais **résistant aux forces de compression**. La **macroporosité** (diamètre des pores >100µm) et l'**interconnectivité** des pores synthétiques **permettent l'adhésion**, la **prolifération** et la **différenciation** des cellules ostéoprogénitrices, mais aussi la **vascularisation** et le **développement de tissu osseux ultérieur** après implantation *in vivo* (Eggl et al., 1988). Cependant, le ratio Ca/P relativement élevé et la cristallinité retardent le taux de résorption de l'HAp. Il a été démontré que lorsque des

cylindres poreux d'HAp sont implantés dans l'os spongieux chez un modèle de lapin, seulement 5,4% de réduction du volume est observé après 6 mois, contre 85,4% pour le TCP durant le même temps (Eggli et al., 1988). Consécutivement, l'HAp restant peut compromettre les propriétés mécaniques au niveau du cal osseux. C'est pourquoi **l'HAp seule est plus souvent appliquée comme revêtement d'implant**, pour des broches ou dans des sites avec peu de stress mécanique (Tonino et al., 2009; Bhatt and Rozental, 2012).

Cette contrainte peut être contournée avec le **développement récent d'HAp nanocristalline** qui, avec un ratio surface/volume plus grand, permet non seulement de diminuer la température d'agglomération des céramiques d'HAp, mais augmente également le taux de résorption de l'espèce (Kattimani et al., 2016).

(b) Le phosphate tricalcique

Le phosphate tricalcique, et plus précisément sa forme rhomboédrique **β (β -TCP)** a attiré l'attention depuis sa découverte en 1920 (Albee, 1920). De formule chimique **$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$** , le β -TCP possède un ratio **Ca/P de 1,5**, plus faible que pour l'HAp, ce qui explique son accélération de résorption et de dégradation. Comme l'HAp, le β -TCP a une **structure avec plus de pores interconnectés**, pouvant directement bénéficier à l'invasion vasculaire et au remodelage osseux (Bhatt and Rozental, 2012), mais **réduit les propriétés mécaniques** de résistance à la compression (Ogose et al., 2006). A cause d'une **instabilité thermodynamique** à pH physiologique, une fraction de TCP sera inévitablement convertie en hydroxyapatite après implantation, diminuant partiellement la dégradation du β -TCP (Wang and Yeung, 2017). La majorité sera résorbée par phagocytose après 6 à 24 mois, avec une fraction restant pendant des années (Bohner, 2001). Ceci rend le β -TCP efficace pour remplir des défauts osseux causés par des traumatismes ou des tumeurs bénignes, mais défavorable pour une utilisation en tant que substitut osseux, en raison de son profil de biodégradation imprévisible (Finkemeier, 2002).

Récemment, des recherches ont été réalisées sur **l'amélioration de l'angiogenèse en utilisant le TCP dans des défauts osseux** (Malhotra and Habibovic, 2016). Plusieurs hypothèses ont été proposées comme la **structure poreuse** (Xiao et al., 2015) ou encore **l'effet du transfert ionique** suivant la dégradation des céramiques de phosphate calcique et leur homéostasie (Di Marco et al., 2013), mais des investigations doivent encore être menées pour comprendre cet effet.

(c) Le phosphate de calcium biphasique

Le phosphate de calcium biphasique est une **autre céramique commerciale** fréquemment utilisée, obtenue en **mélangeant de l'HAp et du TCP** dans des concentrations différentes dans le but de **combinaison des avantages des deux sels minéraux**. En ajustant la formulation, le **taux de dissolution** et les **propriétés mécaniques peuvent être contrôlées** et donc servir en tant qu'implants en eux-mêmes ou bien comme revêtement d'implants.

- **Les verres bioactifs** : les verres bioactifs, appelés aussi bioverres font référence à un **groupe de céramiques synthétiques basées sur la silice**. Cette classe était à l'origine constituée de silice (SiO_2), d'oxyde de sodium (Na_2O), d'oxyde de calcium (CaO) et de pentoxyde de phosphore (P_2O_5) (Hench et al., 1971). Cette composition fut modifiée par la suite pour être **plus stable** en ajoutant de l'oxyde de potassium (K_2O), de l'oxyde de magnésium (MgO) et de l'oxyde de bore (B_2O_3) ; le **composé clé, la silice**, représentant entre 45 à 52% du poids net de la formulation (Bhatt and Rozental, 2012). L'optimisation des constructions a permis un **pontage physique** puissant entre le bioverre et l'os hôte, initié par la silice. Cette capacité de liaison à l'os semble être consécutive **la condensation de phosphate et de calcium** à sa surface à la surface de la silice après exposition aux fluides corporels suite à l'implantation, et la **formation consécutive d'hydroxyapatite** à la surface des bioverres (Välimäki and Aro, 2006).

Ce revêtement fin d'HAp absorbe les protéines et attire les cellules ostéoprogénitrices. De plus, cette couche biologique d'HAp est **partiellement remplacée par de l'os** par un processus de substitution lent après une implantation (Neo et al., 1994). La **porosité** et le **taux de résorption** relativement rapide dans les deux premières semaines d'implantation, permettent une croissance néo-vasculaire suivant le dépôt de nouveau tissu osseux (Kurien et al., 2013).

Les bioverres 45S5 (46,1% molaire de SiO_2 , 24,4% Na_2O , 26,9% CaO et 2,6% P_2O_5) (NovaBone Products LLC, Etats-Unis) et le **S53P4** (53,8% molaire de SiO_2 , 22,7% Na_2O , 21,8% CaO et 1,7% P_2O_5) (BonAlive Biomaterials, Finlande) sont les deux produits commerciaux les plus répandus comme substituts osseux synthétiques.

Comme pour les céramiques, les propriétés mécaniques des bioverres sont défavorables et tendent vers une grande friabilité, pouvant avoir des répercussions néfastes pour la synthèse osseuse après comblement. Une autre stratégie pourrait permettre d'élaborer de bons

biomatériaux pour des applications en tant que substituts osseux synthétiques : il s’agit des **composites**. Comme expliqué auparavant dans la deuxième partie, il est **possible de combiner différentes sources de biomatériaux**, naturels ou synthétiques, avec d’autres classes, afin d’obtenir des **biomatériaux composites** pouvant bénéficier de **propriétés favorables** de chacun des composants. Récemment, des équipes ont tenté d’établir plusieurs de ces combinaisons appelés **biomatériaux composites**, voire **nanocomposites** selon la taille des biomatériaux utilisés (Sahoo et al., 2013).

3.3.1.3 *Les produits commerciaux disponibles*

La diversité des biomatériaux utilisés à l’heure actuelle impose des formes diverses pour des applications de comblement par ces substituts osseux synthétiques. Le **Tableau 7** ci-dessous dresse **l’ensemble des dispositifs implantables** pour le comblement osseux ayant **obtenu** dernièrement **l’approbation par la FDA** pour une **utilisation en clinique**, et sont les stratégies thérapeutiques les plus souvent utilisées en alternative aux autogreffes et à l’utilisation d’os allogénique ou xénogénique.

Nom du produit	Entreprise	Description du produit	Forme
Actifuse®	Baxter international	Phosphate de calcium avec addition de silice	Bloc
Vitoss®	Orthovita	Phosphate de calcium avec bioverre	Bloc
Nanobone®	ARTOSS GmbH	Nanohydroxyapatite dans une matrice gélifiée de silice	Granules irréguliers
CS bone graft®	BioStructures, LLC	Phosphate de calcium biphasique dans une matrice poreuse de collagène I	Bandeau
Bioactive®	BioStructures, LLC	Granules de phosphate de calcium et de bioverre et polymère résorbable	Injectable
nanOss Bioactive®	Pioneer Surgical Tech.	Granules poreux d’HAp dans une matrice poreuse de gélatine porcine	Bloc
Antartik® Sponge	Medical Biomat	Phosphate de calcium biphasique dans une éponge de collagène I et III	Eponge
BioSphere®	Synergy Biomedical	Particules de bioverre 45S5 dans une matrice phospholipidique résorbable	Injectable
NovaBone		Granules de calcium-phospho-silice	
BIOACTIVE®	NovaBone Products	dans une matrice de collagène I	Bandeau
Pro-Dense®	Wright Medical Tech.	Sulfate de calcium et phosphate de calcium	Injectable

Tableau 7: Exemple de dispositifs médicaux implantables pour le comblement osseux ayant obtenu l’approbation de la FDA. Traduit de Mishra et al., 2016

3.3.2. Les facteurs de croissance cellulaires utilisés dans le traitement de lésions osseuses étendues.

Hormis les facteurs déjà listés précédemment concernant la régénération osseuse (voir la partie 2.3.3.2 Les facteurs de croissance pour la régénération osseuse), un **facteur critique** est à prendre en considération pour la cicatrisation de lésions osseuses étendues.

En effet, la **vascularisation locale** au niveau des **sites osseux lacunaires** a été identifiée comme étant le **paramètre le plus significatif affectant la régénération osseuse**. Le **facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF)** de l'anglais vascular endothelial growth factor) est la voie dominante des deux voies hormonales contrôlant l'angiogenèse avec la voie de l'angiopoïétine (Tsiridis et al., 2007). Hormis pour l'angiogenèse, le **VEGF** a également démontré pouvoir posséder **des propriétés ostéogéniques**, par augmentation de l'expression génique de Runx2 chez des cellules souches mésenchymateuses et production minérale (Keramaris et al., 2008; Murakami et al., 2017).

Dans le processus de cicatrisation osseuse, le **VEGF est initialement libéré depuis l'hématome** et favorise le **développement des cellules endothéliales** pour induire une **invasion vasculaire** (Roberts and Rosenbaum, 2012) dans un **environnement hypoxique** (Wan et al., 2008). Durant l'ossification endochondrale, le **VEGF est sécrété par les chondrocytes hypertrophiques** dans le plateau de croissance épiphysaire pour **promouvoir l'invasion de vaisseaux sanguins** du cartilage et le flux sanguin qui facilitera la formation du nouveau tissu osseux (García et al., 2016).

Les travaux de Kaigler et ses collaborateurs (Kaigler et al., 2006) sur un modèle de **défaut osseux de taille critique** sur le rongeur ont porté sur l'utilisation de bioverres seuls ou contenant du VEGF. Une **augmentation de la vascularisation et de la qualité osseuse fut observée avec le groupe contenant du VEGF**, mais aucune différence significative ne fut démontrée quant à la quantité d'os néoformé. Un résultat similaire a été documenté par la même équipe (Leach et al., 2006), soulignant que le **VEGF contribue à la maturation osseuse**, mais non à la quantité du tissu osseux formé. De nombreuses preuves ont établi l'importance de la collaboration entre l'angiogenèse et les facteurs de croissance ostéoinductifs pour la régénération osseuse (Hankenson et al., 2011).

Le **succès des constructions dans l'ingénierie tissulaire** osseuse est donc tributaire de la **vascularisation des dispositifs médicaux implantables**, car elle apporte les **nutriments**

essentiels et l'oxygénation adéquats au tissu tout en retirant les déchets métaboliques cellulaires (Mao and Mooney, 2015).

Les **échecs** dans l'utilisation de substituts osseux synthétiques, causés par **la non-intégration au tissu hôte environnant** et la nécrose, sont liés à un **manque de vascularisation** de ces implants, **spécialement dans le cadre de larges défauts osseux** (Mercado-Pagán et al., 2015).

Même si le rôle primordial du VEGF dans l'angiogenèse durant la cicatrisation osseuse a été confirmé et des résultats prometteurs ont été démontrés pour des recherches précliniques, **le VEGF est très instable** et a une **demi-vie limitée *in vivo*** (de l'ordre de la dizaine de minutes). Une délivrance de gène est souvent utilisée pour tester ce facteur de croissance. De plus, le risque d'hémangiomes ou de récurrences de tumeurs stimulées par VEGF, spécialement pour les patients ayant reçu des protocoles de radiothérapie ou d'excisions de tumeurs, limitent l'utilisation de VEGF dans les essais cliniques. L'étude de l'effet de ce facteur proangiogénique sur la cicatrisation osseuse sont très limités (García et al., 2016), et la posologie du VEGF doit être la plus précise possible (Kerammaris et al., 2008).

3.3.3. Les sources cellulaires utilisées dans le traitement de lésions osseuses étendues.

Les **cellules** pouvant être utilisées dans l'ingénierie tissulaire de **lésions osseuses étendues sont similaires** à celles utilisées pour la régénération de **lésions osseuses** citées dans le précédent chapitre. Il s'agit majoritairement des CSMs de différentes sources citées précédemment (voir à la partie 2.3.3 Les sources de cellules souches).

L'un des plus gros défi dans l'ingénierie tissulaire osseuse pour des tailles importantes en clinique est la **limitation dans le transport de nutriments et l'élimination des déchets métaboliques** (Grayson et al., 2011). La **distribution des cellules** dans le tissu osseux physiologique est limitée à une **distance de 200 µm du capillaire le plus proche, distance efficace** pour la diffusion de l'oxygène et des nutriments (Fan et al., 2014). Les CSMs de la moelle osseuse résident dans la couche externe des vaisseaux sanguins dans une position subendothéliale (murale) (Bianco et al., 2013)(**Figure 24**).

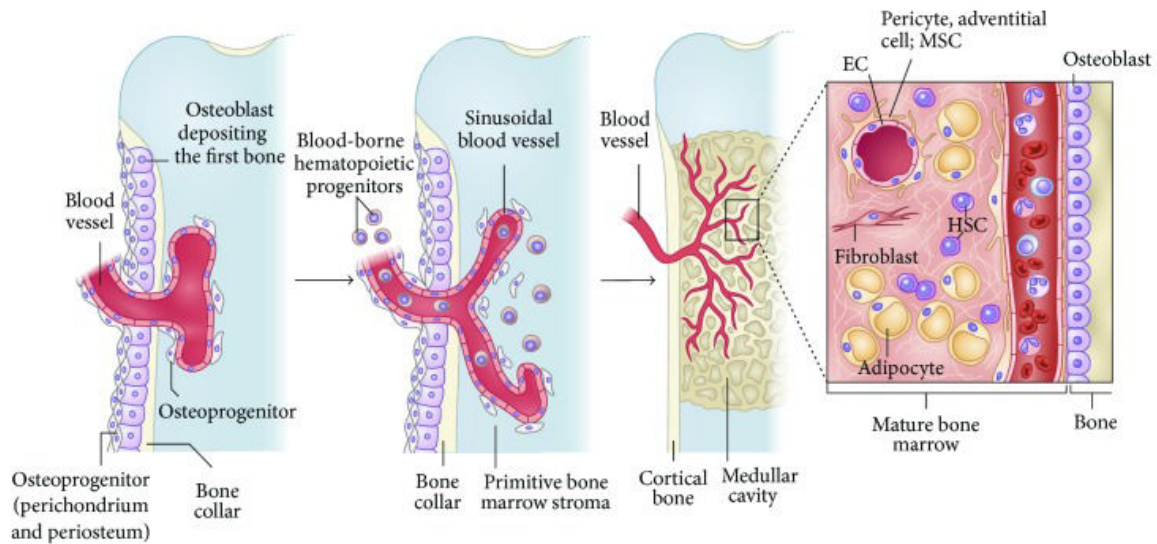


Figure 24: Position murale des CSMs dans la moelle osseuse durant le développement osseux après invasion de la cavité par les vaisseaux sanguins (Bianco et al., 2013)

De **nouvelles stratégies** de développement pour des **substituts osseux synthétiques vascularisés** ont été développées dans le but de permettre de vasculariser des implants initialement dépourvus de structures vasculaires. Ces stratégies permettent ainsi d'éviter la formation de zone de nécrose au niveau du centre des implants et assurent un apport physiologique en oxygène et en nutriments aux cellules colonisant l'implant pour synthétiser de la matrice extracellulaire.

Hutton et Grayson (Hutton et Grayson, 2014) ont schématisé ces **différentes approches** pour **augmenter la viabilité cellulaire post-implantation** pour l'ingénierie tissulaire osseuse, par des stratégies de vascularisation de substituts osseux.

Ces stratégies sont la **pré-vascularisation *in vitro***, la **pré-vascularisation ectopique** et la **vascularisation orthotopique (Figure 25)**. Elles permettent de générer des réseaux vasculaires dans les substituts osseux selon différents moyens :

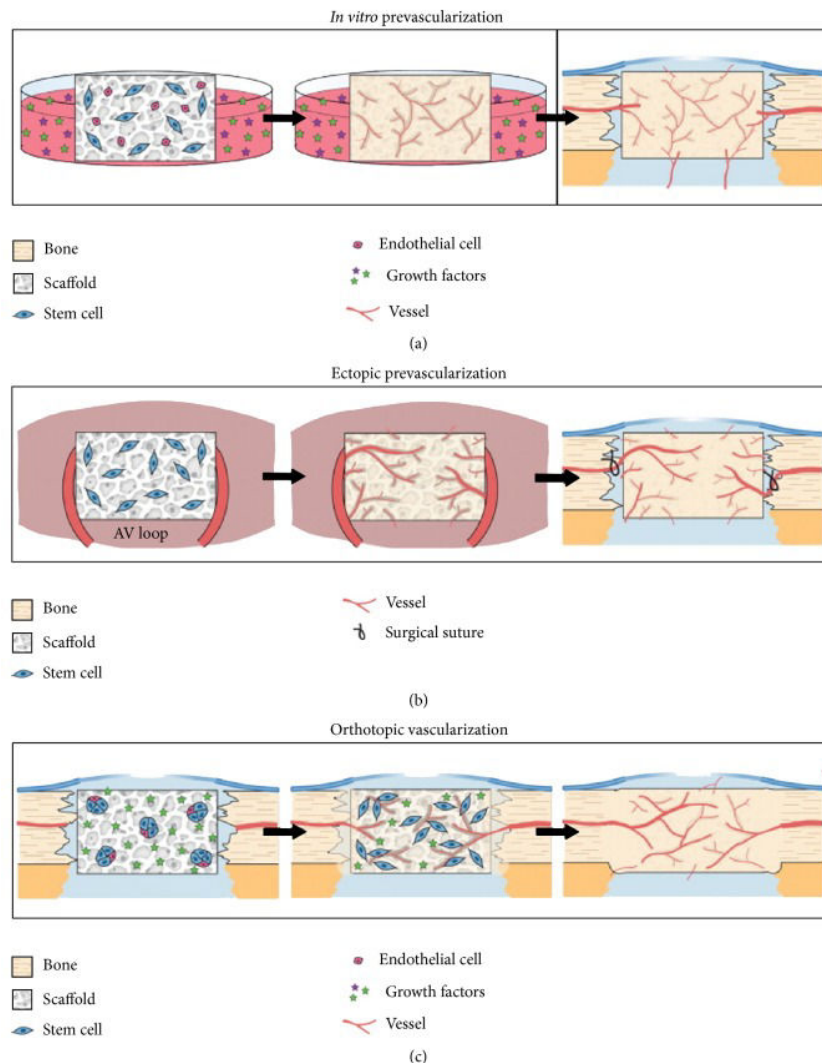


Figure 25: Stratégies de vascularisation d'un substitut osseux pour l'ingénierie tissulaire osseuse (Hutton and Grayson, 2014)

La méthode de **pré-vascularisation *in vitro*** implique la **formation de vaisseaux** par des **facteurs de croissance exogènes** durant une période de culture *in vitro* au sein d'un bioréacteur, utilisant des CSMs et des cellules endothéliales. Après implantation dans le défaut osseux, les capillaires créés vont en théorie rapidement s'anastomoser, pour permettre la perfusion du substitut dans sa globalité.

La **pré-vascularisation ectopique *in vivo*** implique l'**implantation du biomatériau dans une zone hautement vascularisée**, comme les muscles, ou de **réaliser une boucle artérioveineuse (Figure 26, AV)**, pour permettre une **croissance vasculaire importante dans le substitut osseux synthétique**. Dans ce cas, ce sera le corps qui servira de bioréacteur.

L'implant est ensuite disposé dans le défaut osseux et les vaisseaux suturés avec les vaisseaux environnants pour une perfusion sanguine immédiate.

La **vascularisation orthotopique *in vivo*** implique l'**implantation directe de biomatériaux fonctionnalisés** avec des facteurs de croissance ostéoinductifs et/ou vasculaires et ensemencés par des CSMs et des cellules endothéliales **dans le défaut osseux** pour une **régénération tissulaire *in situ***. Les cellules vont alors s'organiser au sein du biomatériau et permettre une anastomose avec le tissu osseux physiologique environnant.

Cependant, des **protocoles de culture sophistiqués *in vitro*** permettant le développement en **synergie** entre l'os et la vascularisation, **doivent encore être établis** pour une vascularisation optimale de substituts osseux. Ceci est dû au fait que les **motifs biochimiques**, qui **stimulent le développement osseux**, ont tendance à **limiter la croissance vasculaire**, et *vice versa* (Meury et al., 2006; Hutton and Grayson, 2014).

II. Objectifs de la thèse

Mon objectif de thèse a été de développer de nouvelles méthodologies innovantes pour la conception de médicaments de thérapie innovante, visant des applications diverses à savoir la médecine régénérative osseuse, cartilagineuse ainsi que le comblement osseux. L'objectif des différents travaux a été de créer des biomatériaux synthétiques aux propriétés bénéfiques, et pouvant constituer des alternatives thérapeutiques aux méthodes actuelles. De plus, ces travaux ont également permis d'optimiser des biomatériaux déjà autorisés pour une utilisation clinique. Les dispositifs médicaux implantables que nous avons développés sont biocompatibles, biodégradables et structurés à l'échelle du nanomètre. Ils permettent une accélération de la réparation tissulaire en imitant les topologies physiologiques des matrices extracellulaires. De plus, nous avons utilisé une stratégie de fonctionnalisation qui nous a permis d'encapsuler des facteurs de croissance en faibles quantités pour potentialiser la réparation tissulaire. Dans le but d'améliorer ces biomatériaux et de constituer des matériaux vivants de 3^{ème} génération, nous les avonsensemencés avec des cellules d'intérêt, pour accroître l'effet thérapeutique. L'ensemble des molécules utilisées durant les travaux étant autorisé par la FDA, les constructions réalisées pourraient avoir de futures applications en clinique.

Les travaux de thèse ont concerné trois volets :

Volet 1 : Optimisation d'un implant pour la régénération de lésions osseuses.

Nous avons, dans un premier temps, étudié la régénération de lésions osseuses grâce à un biomatériau synthétique nanocomposite à base de chitosane et dopé par des nanoparticules de silice.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'efficacité de biomatériaux synthétiques nanofibreux de polycaprolactone (PCL) produits par électrospinning développés au sein du laboratoire, en les combinant à des cellules mésenchymateuses humaine de la moelle osseuse sous forme de microtissus.

Volet 2 : Développement d'un implant pour la régénération de l'unité os-cartilage.

Dans un premier temps, nous avons développé un implant bicompartimenté, doté d'une membrane collagénique porcine (Bio-Gide®),ensemencée avec des microtissus de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) pour régénérer l'os sous-chondral. Ce compartiment a été associé à un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, lui aussi contenant des microtissus de hCSMs pour régénérer le compartiment cartilagineux.

Un deuxième implant bicompartimenté a été réalisé dans le but de régénérer l'unité ostéocondrale, avec des biomatériaux synthétiques. A ces fins, le compartiment membranaire (Bio-Gide®) a été remplacé par un implant de polycaprolactone (PCL), doté de nanoréservoirs à base de chitosane et comprenant un facteur de croissance ostéogénique (BMP-7). Ce compartiment actif a été équipé d'un hydrogel afin de moduler l'hypertrophie du cartilage, en utilisant des microtissus « hybrides » composés de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) et de cellules primaires de chondrocytes humains (hCh).

Volet 3 : Optimisation du recrutement vasculaire à partir d'implants actifs

L'objectif de ce volet a été d'élaborer une nouvelle stratégie pour accélérer le recrutement vasculaire au sein d'un biomatériau synthétique pour le comblement osseux. Dans un premier temps, nous avons fonctionnalisé un implant de PCL 3D par des nanoréservoirs contenant des nanoparticules de VEGF. Ce biomatériau actif a étéensemencé avec des cellules ostéoblastiques et des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs). Cette double fonctionnalisation nous a permis d'étudier l'organisation des cellules endothéliales *in vitro*, mais aussi le recrutement vasculaire de l'hôte après implantation *in vivo*.

III. Matériels et méthodes

1. Elaboration et fonctionnalisation de dispositifs médicaux

1.1. Les différents biomatériaux utilisés pour l'ingénierie tissulaire

1.1.1. Fabrication de membrane synthétique « home-made » par électrospinning

➤ Matériels et réactifs

- Appareil d'électrospinning « Digital Electrospinning Apparatus » EC-DIG (IME Technologies, Pays-Bas)
- Pousse-seringue (ProSense B.V, Allemagne)
- Seringue de 5 mL
- Tuyau souple en polydiméthylsiloxane (PDMS)
- Aiguille 21G (0,8mm de diamètre)
- Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (80000 Da) (Capa 6800, Perstorp, Suède)
- Dichlorométhane (DCM) (Sigma-Aldrich, France)
- Diméthylformamide (DMF) (Sigma-Aldrich, France)
- Balance de précision Discovery (Ohaus, Suisse)
- Eprouvette graduée de 10 mL
- Barreau aimanté et agitateur magnétique

➤ Méthode

Pour obtenir des nanofibres électrospinnées, il convient de dissoudre la PCL dans un mélange de solvants composé de dichlorométhane (DCM) et de diméthylformamide (DMF). Cette solution est composée de 23% de PCL (dans le cas des membranes fines) ou de 26 % (dans le cas des implants épais, appelés 3D), dans un mélange DCM/DMF de 40/60 (v/v). Cette solution est ensuite injectée grâce à un pousse-seringue selon certaines conditions (**Tableau 8**).

	Membrane fine	Implant 3D
Temps d'électrospinning	20 minutes	2 heures
Débit (mL.h⁻¹)	0,4	1,2
Voltage (kV)	22	+15/ -5 (aiguille/collecteur)
Température (°C)	19 ± 2	23 ± 2
Humidité relative (%)	45 ± 5	30 ± 5
Épaisseur	30 µm	1 cm

Tableau 8: Caractéristiques techniques pour l'électrospinning de biomatériaux à base de PCL

Pour l'électrospinning de membranes fines, une feuille d'aluminium est posée sur le collecteur afin de recueillir les fibres de PCL électrospinnées. Pour les implants 3D, une plaque de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) ayant un trou de 2,5 cm de diamètre est utilisée pour concentrer le flux de fibres et permettre l'accroissement de l'implant en hauteur. Les solvants résiduels issus de la synthèse de ces biomatériaux sont ensuite évaporés en étuvant les matériaux à 45°C toute la nuit.

1.1.2. Fabrication d'un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique

➤ Matériels et réactifs

- Alginate (Sigma-Aldrich, France)
- Acide hyaluronique (HA) (Lifecore Biomedical, Chaska, USA)
- Chlorure de sodium (NaCl) (Euromedex, France)
- Chlorure de calcium (CaCl₂) (Sigma-Aldrich, France)

➤ Méthode

Pour permettre la fabrication d'un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique (HA), il faut en premier lieu dissoudre l'alginate (12 mg.mL⁻¹) et l'acide hyaluronique (3 mg.mL⁻¹) dans une solution saline (NaCl 0,15 M). On rajoute ensuite une solution de chlorure de calcium (CaCl₂) à 102mM à la solution pendant 15 minutes à 37°C pour faire polymériser la solution et obtenir l'hydrogel d'intérêt.

1.1.3. Implant à base de chitosane nanocomposite dopée de nanoparticules de silice

Les membranes à base de chitosane nanocomposite dopées de nanoparticules de silice ont été développées au sein du laboratoire du Professeur Arruebo (Université de Saragosse, Espagne).

Les nanoparticules de silice ont été préparées par la méthode de Stöber : condensation de molécules de tetraoxysilane (TEOS) en présence d'ammoniaque (NH₄OH) dans l'éthanol (EtOH).

Les membranes de chitosane ont été préparées par la méthode de lyophilisation. Les solutions stock de chitosane ont été dissoutes dans l'acide acétique pour obtenir des solutions aqueuses à 0,1M. Les solutions obtenues ont été mélangées à différentes concentrations, mélangées avec la solution de nanoparticules de silice formées et disposées dans des tubes Eppendorf, puis mises à lyophiliser.

1.2. Stratégie de fonctionnalisation des biomatériaux

1.2.1. Solutions utilisées

➤ Matériels et réactifs

- Bouteille en verre
- Barreau aimanté et agitateur magnétique
- pH-mètre (Mettler-Toledo, Columbus, USA)

Pour la médecine régénérative osseuse et cartilagineuse :

- Tampon acide 2-morpholinoéthane sulfonique (MES) (Sigma-Aldrich, France)
- Chlorure de sodium (NaCl) (Euromedex, France)
- Chitosan (Protasan, UPCL 113, Novamatrix, Norvège)
- Protéine de la morphogénèse osseuse humaine 7 (en anglais rhBMP-7) (Bio Basic Inc, Euromedex, France)

Pour le comblement de lésions étendues par substituts osseux:

- Tampon acide 2- morpholinoéthane sulfonique (MES) (Sigma-Aldrich, France)
- Chlorure de sodium (NaCl) (Euromedex, France)
- Chitosan (Protasan, UPCL 113, Novamatrix, Norvège)
- Nanoparticules (NP) de VEGF (collaboration avec l'université John Moores, Liverpool, Angleterre)
- Albumine de sérum bovin (de l'anglais BSA) (Euromedex, France)

- Albumine de sérum bovin dotée de nanoparticules d'or (BSA gold, 15 nm) (Aurion, Wageningen, Pays-Bas)

➤ Méthode

La stratégie de fonctionnalisation retenue pour doter nos dispositifs médicaux avec des facteurs de croissance, est la technologie nanoréservoirs par la technique de LbL. Les solutions utilisées sont préparées à différentes concentrations selon l'étude réalisée : pour des études concernant la nanomédecine régénérative osseuse, la BMP-7 est utilisée, pour des études concernant la stratégie de vascularisation de substituts osseux synthétiques pour le comblement osseux, le VEGF est utilisé, encapsulé dans des nanoparticules. Ces nanoparticules ont été obtenues par la méthode de gélation ionotrope en collaboration avec l'Université John Moores de Liverpool en Angleterre (**Tableau 9**).

	BMP-7	Nanoparticules de VEGF
Tampon	MES/NaCl (40mM/0,15M) (pH 5,5)	MES/NaCl (40mM/0,15M) (pH 5,5)
Espèce chargée positivement (polycations)	Chitosan (0,5 mg.mL ⁻¹)	NP (1mg.mL ⁻¹) + Chitosan (0,5 mg.mL ⁻¹)
Espèce chargée négativement (polyanions)	BMP-7 (200 ng.mL ⁻¹)	BSA (200 ng.mL ⁻¹) ou BSA gold (dilution au 200 ^{ème} de la solution commerciale)

Tableau 9: Récapitulatif des espèces utilisées pour fonctionnaliser les dispositifs médicaux

1.2.2. Fonctionnalisation des dispositifs médicaux : technologie nanoréservoirs

➤ Matériels et réactifs

- Membranes fines et implants 3D de PCL électrospinné
- Membrane nanofibreuse de collagène (Bio-Gide[®], Geistlich, Germany)
- Lame de rasoir
- Emporte-pièce de 3 mm (JLB340 Boehm[®], France) ou de 5 mm (Biopsy Punch, Stiefel, Afrique du Sud)
- Solution tampon MES
- Solution tampon Tris
- Solutions de polyanions et de polycations
- Tampon phosphate salin (PBS) (Invitrogen, Life Technologies, France)

➤ Méthode

Afin de fonctionnaliser les différents dispositifs médicaux étudiés, ceux-ci sont placés en plaques multipuits. Les échantillons sont stérilisés par irradiation UV pendant une heure dans une solution d'alcool puis, avant d'initier la fonctionnalisation, rincés avec le tampon d'intérêt (MES ou Tris) pendant 30 minutes. Cette solution tampon est ensuite remplacée par une solution de polycations (**Tableau 9**) pendant 15 minutes. Après cette étape, 3 rinçages successifs (de 5 minutes chacun) sont effectués pour retirer l'excédent de charge présent en solution. Après rinçage, la solution de polyanions (**Tableau 9**) est ajoutée dans les puits durant 15 minutes, avant de rincer à nouveau les puits avec le tampon adéquat. L'alternance de dépôts représente un cycle de fonctionnalisation. Ce cycle est répété 6 fois pour obtenir des dispositifs médicaux contenant des nanoréservoirs actifs adsorbés à la surface de ceux-ci. A la fin du dernier cycle de fonctionnalisation, les échantillons sont rincés avec du tampon phosphate salin (PBS) pour équilibrer le pH.

1.3. **Caractérisation de la fonctionnalisation des dispositifs médicaux**

➤ Matériel et réactifs

- Dispositif médical non fonctionnalisé
- Dispositif médical fonctionnalisé
- Porte-échantillon (Euromedex, France)
- Ruban adhésif conducteur double face (Nisshin, Tokyo, Japon)
- Balzers SCD30

- Balzers CED30
- Hitachi S800
- Détecteur à scintillation YAG
- Paraformaldéhyde (PFA) 4%
- Tampon phosphate salin (PBS)
- Ethanol 25%, 50%, 75%, 90%, 100% (Euromedex, France)
- Hexamethyldisilazane (HMDS) (Euromedex, France)

➤ Méthode

Après fonctionnalisation, les échantillons sont fixés à l'aide du paraformaldéhyde (PFA) 4% à 4°C pendant 15 minutes. Une fois la fixation terminée, le PFA est retiré des puits, et les échantillons sont rincés trois fois à l'aide de PBS. Pour une observation en microscopie électronique, les échantillons sont déshydratés : cette étape est réalisée par des bains successifs croissants d'éthanol (25%, 50%, 75%, 90%, 100%). Une dernière étape de déshydratation par l'hexadiméthylsilazane (HMDS) permet de retirer toute trace d'eau dans l'échantillon. Il est alors fixé sur un porte-échantillon avec un ruban adhésif conducteur. Avant l'observation au microscope électronique, les échantillons sont métallisés à l'aide d'une pulvérisation d'un mélange or-palladium (Balzers SCD30) sous vide ou carbonés (Balzers CED30). Les échantillons sont alors observés au microscope électronique à balayage Hitachi S800 (la tension d'accélération des électrons est de 5kV pour les échantillons métallisés, 15 kV pour les échantillons carbonés). Si la BSA gold est utilisée durant la fonctionnalisation des dispositifs médicaux, les échantillons sont uniquement carbonés et les électrons rétrodiffusés sont collectés à l'aide d'un détecteur à scintillation YAG.

2. Analyse *in vitro* des dispositifs médicaux

2.1. Culture cellulaire

2.1.1. Milieux de culture et types cellulaires

➤ Matériel et réactifs

- Ostéoblastes humains primaires (hObs) (PromoCell, Heidelberg, Allemagne)
- Cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) (PromoCell)
- Chondrocytes humains primaires (hChs) (PromoCell)
- Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs) (PromoCell)
- Pénicilline-streptomycine (BioWhittaker®, Lonza, France)

Milieux de croissance et « supplément mix » :

- Milieu de croissance pour ostéoblastes (PromoCell)
- « Supplément mix » pour ostéoblastes (PromoCell)
- Milieu de croissance pour cellules endothéliales (PromoCell)
- « Supplément mix » pour cellules endothéliales (PromoCell)
- Milieu de croissance pour cellules souches mésenchymateuses (PromoCell)
- « Supplément mix » pour cellules souches mésenchymateuses (PromoCell)
- Milieu de croissance pour cellules chondrocytaires humaines (PromoCell)
- « Supplément mix » pour cellules chondrocytaires humaines (PromoCell)

Milieu de différenciation ostéogénique :

- Alpha-MEM (Minimum Essential Medium Eagle) (Lonza,)
- L-glutamine (PAA, France)
- Sérum de veau foetal (SVF)(Gibco[®], Life Technologies, France)
- Fungizone
- Pénicilline-streptomycine (Lonza)
- Acide ascorbique (Sigma)
- β -glycérophosphate (Sigma)
- Dexaméthasone (Sigma)

Milieu de différenciation chondrogénique :

- Alpha-MEM (Minimum Essential Medium Eagle) (BioWhittaker[®], Lonza, France)
- L-glutamine (2mM) (PAA, France)
- Sérum de veau foetal (SVF) (Gibco[®], Life Technologies, France)
- Fungizone
- Pénicilline-streptomycine (Lonza)
- Acide ascorbique (Sigma-Aldrich, France)
- Dexaméthasone (Sigma)
- L-proline (Sigma)

Afin de mesurer les efficacités *in vitro* de nos dispositifs médicaux implantables, nous avons choisi d'utiliser des ostéoblastes primaires humains (**hObs**) issus de l'os trabéculaire, des cellules souches mésenchymateuses humaines (**hCSMs**) issues de la moelle osseuse, des chondrocytes humains primaires adultes (**hChs**) et des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (**HUVECs**).

Les cellules ont été cultivées dans leur **milieu de prolifération spécifique**, complémenté par du **supplément mix** ainsi qu'une solution de **pénicilline** (50 U.mL⁻¹) et de **streptomycine** (50 μ g.mL⁻¹).

Le **milieu de différenciation ostéogénique** consiste en un milieu de culture classique (**Alpha-MEM**) supplémenté avec de la **L-Glutamine** (2mM), du sérum de veau foetal décomplémenté (**SVF**) à 10%, de la **fungizone** (250 U.mL⁻¹), un mélange **pénicilline-streptomycine** (50 U.mL⁻¹ -50 μ g.mL⁻¹), de l'**acide ascorbique** (60 μ g.mL⁻¹), du **β -glycérophosphate** (10 mM) et de la **dexaméthasone** (10 nM).

Le **milieu de différenciation chondrogénique** consiste quant à lui en un milieu de culture classique (**Alpha-MEM**), supplémenté avec de la **L-Glutamine** (2mM), du sérum de veau foetal décomplémenté (**SVF**) à 10%, de la **fungizone** (250 U.mL⁻¹), un mélange **pénicilline-streptomycine** (50 U.mL⁻¹-50 µg.mL⁻¹), de la **L-Proline** (40 µg.mL⁻¹), de l'**acide ascorbique** (50 µg.mL⁻¹) et de la **dexaméthasone** (10 nM).

2.1.2. Sous-culture ou passage

➤ Matériel et réactifs

- Flacon de culture cellulaire T-75 (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne)
- Pipette de 2, 5, 10 mL
- Incubateur BB15 CO₂ Incubator (Thermo Scientific, France)
- Cellule de Neubauer (Preciss, France)
- Tube à fond conique (Falcon, Dutscher, France)
- Centrifugeuse Jouan BR4i multifunction Centrifuge (Thermo Electron Corporation, France)
- Cellules HO_b, hCSM, hCh, HUVECs, CLG-EC
- Tampon phosphate salin (PBS) (Invitrogen, Life Technologies, France)
- Trypsine (BioWhittaker[®], Lonza, France)
- Acide éthylène-diamine-tetraacétique (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- Solution d'acutase (Promocell, Heidelberg, Allemagne)
- Milieux de culture pour cellules associés (HO_b, hCSM, hCh, HUVECs, CLG-EC)
- Sérum de veau foetal (SVF)(Gibco[®], Life Technologies, France)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma, France)

➤ Méthode

Les différents types de cellules sont cultivés dans des flacons de culture cellulaire T-75 avec leurs milieux de culture appropriés, et placés en incubateur, à une température constante de 37,5°C ainsi qu'une saturation en CO₂ à 5%. Le milieu de culture est remplacé tous les 2 à 3 jours. A confluence (85-90%), les cellules sont passées. Pour cela, après un rinçage au PBS, de la trypsine (0,03% v/v) ainsi que de l'acide éthylène-diamine-tetraacétique (EDTA) (0,4 mg.mL⁻¹) les cellules sont mises au contact de ces cellules pendant 3 min à 37°C. Une solution commerciale d'acutase est utilisée pour la même finalité concernant les hCSMs. Les solutions (trypsine/ EDTA ou acutase) sont ensuite neutralisées en ajoutant 10 mL de milieu de culture frais. Le volume final permet ensuite un comptage du nombre de cellules (cellule de Neubauer) et est centrifugé (220 g, 5 min). Une fois centrifugé, le surnageant est retiré et le culot contenant les cellules est resuspendu avec le volume de milieu de culture aboutissant à la concentration cellulaire souhaitée pour l'ensemencement. Le

reste de suspension cellulaire est enfin placé dans des nouveaux flacons de culture cellulaire à leurs densités propres (4000 HOb. cm^{-2} , 10000 hCSM. cm^{-2} , 5000 hCh. cm^{-2} , 7500 HUVECs. cm^{-2}) pour prolifération, ou stockés dans l'azote liquide dans une solution de SVF à 10% v/v de diméthylsulfoxyde pour une conservation à long terme.

2.1.3. Formation de microtissus

➤ Matériel et réactifs

- Flacon de culture cellulaire T-75 (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne)
- Pipette de 2, 5, 10 mL
- Cônes de 200 μL
- Pipette de 100 μL
- Incubateur BB15 CO₂ Incubator (Thermo Scientific, France)
- Cellule de Neubauer (Preciss, France)
- Tube à fond conique (Falcon, Dutscher, France)
- Centrifugeuse Jouan BR4i multifunction Centrifuge (Thermo Electron Corporation, France)
- Plaque 96 puits GravityPLUS™ 3D Culture (InSphero AG, Zurich, Suisse)
- Cellules HOb, hCSM, hCh
- Tampon phosphate salin (PBS) (Invitrogen, Life Technologies, France)
- Trypsine (BioWhittaker®, Lonza, France)
- Acide éthylène-diamine-tetraacétique (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- Solution d'accutase (Promocell, Heidelberg, Allemagne)
- Milieux de culture pour cellules associés (HOb, hCSM, hCh)
- Tubes Eppendorf

➤ Méthode

Le point de départ de la formation des microtissus commence par la resuspension du culot de cellules après passage. La technique utilisée pour former des microtissus est appelée technique de la goutte suspendue, au moyen de plaques de culture spéciales permettant la croissance des cellules au sein d'une goutte de milieu de culture (**Figure 26**).

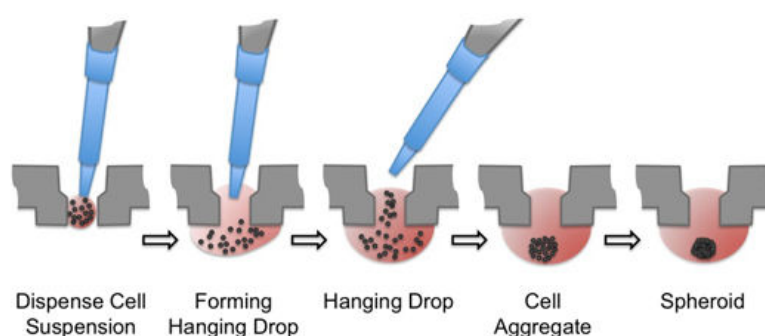


Figure 26: Principe de la formation de microtissus par la technique de la goutte suspendue (Horman et al., 2013)

Pour former les microtissus, un nombre déterminé de cellules est cultivé en suspension dans un puits. Pour cela, un volume de 40 μL de milieu de culture contenant les cellules appropriées est déposé dans chaque puits. Le fond de la plaque est rempli de PBS, afin d'assurer une atmosphère humide à l'intérieur de la plaque. Les cellules sont cultivées durant 5 jours pour former des microtissus. Après cette durée, on récupère les microtissus en les aspirant avec le milieu de culture à l'aide d'une micropipette pour être ensemencés sur les différents dispositifs médicaux.

2.2. Monitoring de l'évolution de l'activité métabolique cellulaire

➤ Matériel et réactifs

- Appareil de lecture de plaque MultiskanFC (Thermo Scientifique, France)
- Milieu de culture (HOb, hCSM, hCh, HUVECs) supplémenté
- Solution AlamarBlue[®] de test de viabilité cellulaire (Thermo Scientific, France)
- Echantillons cellularisés, fonctionnalisés ou non
- Echantillons contrôles respectifs, fonctionnalisés ou non

➤ Principe

Le test de viabilité cellulaire AlamarBlue[®] incorpore un indicateur fluorimétrique, qui peut varier selon l'activité métabolique des cellules de l'échantillon. Cette réaction de transformation de la resazurine en resafurine, en fonction de l'environnement réducteur des cellules permet de bien suivre l'évolution de l'activité métabolique cellulaire, et de donner un aperçu de l'activité de prolifération cellulaire au sein des échantillons. La mesure d'absorbance des échantillons, selon leur état de réduction, permet de quantifier cette activité réductrice, et de retranscrire l'évolution des cellules dans le temps. Cette molécule, réduite ou non, est non toxique et peut être réutilisée sur les mêmes échantillons tout au long de la durée du test. On pourra alors, en comparant les valeurs de réduction, déterminer si l'ajout de molécules actives sur les constructions comprenant des cellules, a un impact négatif ou non sur l'activité métabolique des cellules.

➤ Méthode

Pour réaliser le test de viabilité cellulaire, les échantillons sont incubés à 3 jours, 7 jours, 14 jours, 21 jours et 28 jours avec une solution (milieu de culture à 10% v/v de solution

AlamarBlue®) pendant 4 heures. Des puits contenant la solution d'AlamarBlue® des implants non ensemencés serviront de contrôle négatif. La solution est ensuite prélevée et est disposée en duplicat dans une plaque 96 puits pour lecture de la densité optique (DO) au spectrophotomètre (MultiskanFC). La lecture est faite à deux longueurs d'onde : 570 nm et 595 nm, caractéristiques de l'état oxydé et réduit de la resazurine.

Les valeurs collectées sont analysées pour donner le pourcentage de réduction de l'échantillon test selon la formule :

$$\% \text{ réduction} = [(\epsilon_{\text{ox}, 595} A_{570}) - (\epsilon_{\text{ox}, 570} A_{595})] / [(\epsilon_{\text{red}, 570} A'_{595}) - (\epsilon_{\text{red}, 595} A'_{570})] \times 100$$

avec :

$\epsilon_{\text{ox}, 595}$ = coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée (bleue) à 595 nm

$\epsilon_{\text{ox}, 570}$ = coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée (bleue) à 570 nm

$\epsilon_{\text{red}, 570}$ = coefficient d'extinction molaire de la forme réduite (rouge) à 570 nm

$\epsilon_{\text{red}, 595}$ = coefficient d'extinction molaire de la forme réduite (rouge) à 595 nm

A_{570} = absorbance du puits test à 570 nm

A_{595} = absorbance du puits test à 595 nm

A'_{570} = absorbance du contrôle négatif à 570 nm

A'_{595} = absorbance du contrôle négatif à 595 nm

A la fin du test de viabilité cellulaire, du milieu frais selon les types cellulaires est rajouté aux puits, et les plaques sont replacées à l'incubateur, avec un changement de milieu tous les deux à trois jours.

2.3. Analyse qualitative de l'expression protéique

➤ Matériel et réactifs

- Microscope à épifluorescence DM 400 B (Leica, Allemagne)
- Source laser associée au microscope (Leica, Allemagne)
- Lames en verre
- Milieu de montage (Dako, France)
- Lamelle
- Echantillons ensemencés, fonctionnalisés ou non
- PBS (Sigma)
- PFA 4% (Sigma)

- Triton X-100 (Sigma)
- Albumine de sérum bovin (BSA) (Euromedex, France)
- Anticorps primaire (**Tableau 10**)
- Anticorps secondaire (**Tableau 11**)
- Alexa fluor 546[®] phalloïdine (Invitrogen, France)
- 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (Euromedex, France)
- Milieu de montage (Dako) (Sigma)

Y primaire utilisé	Facteur de dilution	Espèce cible	Espèce d'origine	source
Run x 2	1 :200	humain	Lapin	Sigma-Aldrich
Ostéocalcine	1 :200	humain	Souris	Santa Cruz Biotechnologies
BspII	1 :200	humain	Lapin	Santa Cruz Biotechnologies
Sox 9	1 :200	humain	Lapin	Sigma-Aldrich
Aggrecan	1 :200	humain	Lapin	Sigma-Aldrich
Collagène II	1 :200	humain	Lapin	Sigma-Aldrich
CD31	1 :400	humain	Lapin	Sigma-Aldrich

Tableau 10: Liste des différents anticorps primaires utilisés

Y secondaire utilisé	Facteur de dilution	Espèce cible	Espèce d'origine	source
Alexa Fluor 488 [®]	1 :200	lapin	Chèvre	Life Technologies
Alexa Fluor 488 [®]	1 :200	souris	Chèvre	Life Technologies

Tableau 11: Liste des différents anticorps secondaires utilisés

➤ Méthode

Après différents temps de culture, les échantillons cellularisés sont d'abord rincés au PBS puis fixés au PFA à 4% pendant 15 minutes à 4°C. Au terme de la fixation, le PFA est retiré des échantillons par un nouveau rinçage au PBS. Ensuite, les échantillons sont mis au contact d'une solution de Triton X-100 à 0,1% (v/v) pour la perméabilisation et de BSA 1% (m/v) pour la saturation pendant 1 heure à température ambiante. Après 3 lavages au PBS, les échantillons sont incubés avec l'anticorps primaire durant la nuit à +4°C ou 2 heures à température ambiante. Les échantillons sont à nouveau rincés et incubés avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor 488[®] durant 1 heure 30 minutes à température ambiante. Après rinçage au PBS, les échantillons sont incubés avec de l'Alexa fluor 546[®] phalloïdine durant 20 minutes à température ambiante, afin d'observer les filaments d'actine du

cytosquelette intracellulaire. Après rinçage au PBS, les noyaux des cellules sont marqués par du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) à 200 ng.mL⁻¹ durant 10 minutes à température ambiante. Après lavages au PBS, les échantillons sont montés entre lame et lamelle grâce au milieu de montage (Dako). Les échantillons épais sont observés tels quels sur des lames avec un microscope à épifluorescence (DM 4000 B (Leica)) avec une caméra (DFC 300 FX (Leica)). L'acquisition des images se fait via à un logiciel (Pixia).

2.4. Mesure de l'expression génique par rétrotranscription-réaction en chaîne par polymérase quantitative

➤ Matériel et réactifs

- NanoDrop ND-1000 spectrophotomètre (*NanoDrop TechnologiesTM*).
- Cycleur thermique *Eppendorf mastercycler personalTM*
- CFX Connect Real Time System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France)
- Echantillons ensemencés, fonctionnalisés ou non
- Kit High pure RNA Isolation (*RocheTM*)
- iScriptTM reverse transcription supermix (Bio-Rad)
- iTaqTM Universal SYBR[®] green supermix (Bio-Rad)

Gène cible	Séquence dans le sens direct	Séquence inversée
Aggrecane	5'-TCCCCTGCTATTTTCATCGAC-3'	5'-CCAGCAGCACTACCTCCTTC-3'
Collagène II	5'-CGTCCAGATGACCTTCTCTACG-3'	5'-TGAGCAGGGCCTTCTTGAGT-3'
Run x 2	5'-CCAACCCACGAATGCACTATC-3'	5'-TAGTGAGTGGTGGCGGACATAC-3'
Sox 9	5'-GGAATGTTTCAGCAGCCAAT-3'	5'-TGGTGTCTGAGAGGCACAG-3'
Actine B	5'- GATGAGATTGGCATGGCTTT-3'	5'-CACCTTCACCGTTCCAGTTT-3'
Ostéocalcine	Numéro de séquence : 199173(Qiagen)	
BspII	Numéro de séquence : 004967(Qiagen)	

Tableau 12: Liste des amorces utilisées durant la RTqPCR quantitative

➤ Méthode

La première étape est d'extraire, à partir d'échantillons cellulaires, l'ensemble des ARNm présents. Cette extraction est réalisée à l'aide du Kit High pure RNA Isolation et selon

les recommandations du fabricant (Roche). Brièvement, les échantillons sont lysés, et passés à travers une colonne d'affinité pour récupérer les ARNm. La quantité ainsi que la pureté de ceux-ci est quantifiée via le spectrophotomètre d'absorption (Nanodrop ND-1000). Les échantillons contenant les ARNm sont ensuite amplifiés pour donner des ADNc en utilisant le supermix de rétrotranscription iScript™ (Bio-Rad) avec le cycleur thermique (Eppendorf) selon les recommandations du fabricant. Après cela, l'étape de réaction en chaîne par polymérase en temps réel est assurée en utilisant le supermix iTaq™ Universal SYBR® green avec le système de cyclage CFX connect real time avec les conditions suivantes : une étape de dénaturation initiale à 95°C durant 2 minutes, suivie de 39 cycles de dénaturation à 95°C durant 5 secondes, appariement à 60°C pendant 30 secondes et extension à 65°C pendant 5 secondes.

2.5. Observation des échantillons par analyse histologique

➤ Matériel et réactifs

- Microtome manuel RM 2165 (Leica, Allemagne)
- pH-mètre (Mettler-Toledo, Columbus, USA)
- Microscope optique DM 4000 B (Leica, Allemagne)
- PFA 4% (Sigma)
- CaCl₂ (Sigma-Aldrich)
- Echantillons ensemencés, fonctionnalisés ou non
- Paraffine liquide
- Solutions LMR-1 et LMR-2
- Ethanol (70°, 90°, absolu)
- Histolaque LMR® (Labo moderne, France)
- Cryostat Jung CM3000 (Leica, Allemagne)
- PBS (Sigma)
- OCT composé 4583 (Tissue-Tek®, Sakura, Pays-Bas)
- Lame SUPERFROST® PLUS (Thermo Scientific)
- Eau distillée

Coloration Safranin O/ Fast Green :

- Fast Green (Sigma-Aldrich)
- Acide acétique (Sigma-Aldrich)
- Safranin O (Sigma-Aldrich)

Coloration Bleu Alcian :

- Bleu Alcian (Sigma-Aldrich)
- Nuclear Fast Red (Sigma-Aldrich)

Coloration au rouge d'alizarine:

- rouge d'alizarine (Sigma-Aldrich)

➤ Principe

Les différentes colorations histologiques permettent, selon les études, de marquer spécifiquement les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes (GAG) pour la coloration **Safranine O-Fast Green**, les GAG pour la coloration **Bleu Alcian**, et la minéralisation pour la coloration **au rouge d'alizarine**. Pour permettre une analyse histologique des différents dispositifs médicaux durant les différentes expériences, il faut au préalable réaliser des coupes fines. Pour permettre cela, les échantillons doivent être inclus dans une matrice rigide. Après l'étape d'inclusion et de coupe, il sera possible de réaliser les diverses colorations histologiques.

➤ Inclusion

Deux méthodes d'inclusion sont possibles, pour permettre une coupe des échantillons, dans l'OCT et dans la paraffine :

- **Dans l'OCT**

Les échantillons, après 28 jours de culture, sont rincés 2 fois à l'aide de PBS puis fixés avec du PFA 4% à 4°C pendant 15 minutes. Après rinçage au PBS, les échantillons sont incorporés dans un moule contenant de l'OCT et placés à -80°C durant la nuit pour faire prendre en masse. Les blocs d'OCT, ainsi durcis, sont sortis du moule et placés dans l'enceinte du cryostat afin d'être coupés dans une atmosphère à -30°C pour maintenir l'état solide du bloc. La taille des coupes est réglée sur 30µm. Les coupes sont ensuite déposées sur des lames.

- **En paraffine**

Les échantillons sont rincés 2 fois à l'aide de PBS puis fixés avec du PFA 4% à 4°C pendant 15 minutes. Les échantillons sont ensuite montés en paraffine liquide pour former des blocs qui seront par la suite coupés en séries (taille de coupe de 7µm). Ces coupes sont alors déposées sur des lames puis sont déparaffinées à l'aide de bains de solutions de LMR-1 et LMR-2 de 5 minutes chacun. Elles sont ensuite réhydratées par une immersion dans des bains d'éthanol en concentration décroissante (éthanol absolu, 90°, 70°) et enfin rincées à l'eau courante puis à l'eau distillée.

Après les différentes préparations des échantillons selon les coupes au cryostat ou au microtome, les colorations histologiques sont réalisées :

➤ Coloration histologique

- **Coloration Safranine O- Fast Green**

La coloration histologique commence par un bain dans une solution de Fast Green (0,02% m/v) durant 5 minutes puis un bain d'acide acétique (1% v/v) de 30 secondes et se termine par un bain dans une solution de Safranine O (0,1% m/v) durant 5 minutes. A la fin de la coloration, les lames sont rincées et sont déshydratées en utilisant l'inverse du processus de réhydratation (commençant par l'eau distillée et se terminant par la solution de LMR-2). Ces lames sont ensuite montées avec de l'histolaque et des lamelles, puis observées au microscope optique (Leica DM 4000 B).

- **Coloration Bleu Alcian**

La coloration bleu alcian est une solution comprenant du bleu alcian à 1% dans une solution d'acide acétique à 3%. Le pH de la solution doit être ajusté à 2,5 avant utilisation du colorant. Les lames comprenant les échantillons sont immergées dans la solution de bleu alcian durant 2 heures puis sont rincées et immergées dans une solution de Fast Red durant 20 minutes. Les lames sont ensuite rincées, puis déshydratées et enfin montées pour pouvoir être observées au microscope (Leica DM 4000 B).

- **Coloration au rouge d'alizarine**

La solution de rouge d'alizarine est une solution d'eau distillée contenant 2% (m/v) de rouge d'alizarine. Le pH de la solution est situé entre 4,1 et 4,3. Les coupes sont baignées dans cette solution durant 20 minutes, puis rincées à l'eau distillée. Les lames sont alors montés avec un milieu de montage (Dako) et observées au microscope optique (Leica DM 4000 B).

3. Caractérisation *in vivo* des dispositifs médicaux

3.1. Les différents dispositifs médicaux testés

Les travaux de thèse ont concerné plusieurs dispositifs médicaux implantables qui ont pu être expérimentés sur le modèle murin (**Tableau 13**).

Dispositif médical	fonctionnalisation	Cellules utilisées	Implantation	Application
CS-NC	NF		Calvaria (2mm)	Régénération osseuse
PCL 3D	NF	HO _b MT vs cellules seules	Calvaria (2mm)	Régénération osseuse
PCL fine-Alg/HA	NR (BMP-7)	hCSM/hCh (MT)	Sous-cutanée	Régénération ostéochondrale
PCL 3D	NR (NP _{VEGF}) vs NF	HO _b	Sous-cutanée	Comblement osseux

Tableau 13: Différents dispositifs médicaux testés en expérimentation animale

Abréviations : CS-NC : Membrane nanocomposite à base de chitosan dopée en nanoparticules de silice ; NF : non fonctionnalisé ; vs : versus ; MT : microtissus ; Alg/HA : hydrogel composé d'alginate et d'acide hyaluronique ; NR : nanoréservoirs ; NP_{VEGF} : nanoparticule encapsulant le VEGF

3.2. Expérimentation animale

Les protocoles expérimentaux ont été autorisés par le « Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche » sous le numéro d'accréditation 01716.01. Le comité d'Éthique de Strasbourg nommé « Comité Régional de réflexion Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg » (CREMEAS) a également validé les différentes études conduites chez l'animal.

L'ensemble des expérimentations animales ont été conduites sur des souris appelées « nude », immunodéficientes (Cr1 : NIH-Foxn1^{nu}, Charles River, L'arbesle, France). Le choix de ce modèle murin vient du fait que l'ensemble des combinaisons testées entre les différents dispositifs sont additionnés de cellules humaines à l'exception de l'étude portant sur le dispositif nanocomposite (CS-NC). La souris nude permet donc l'étude de cellules humaines sur des dispositifs médicaux et l'expérimentation animale sans apparition d'effets secondaires pour le rongeur. Deux types d'implantations ont été effectués: une implantation en site osseux

(en calvaria) et en site non-osseux (en sous-cutanée). Il sera fait mention ici de la procédure pour chacune des implantations.

3.2.1. Implantation en calvaria

➤ Matériel et réactifs

- Micromoteur Suni™ (Satelec®, France)
- Contre-angle bague rouge
- Fraise boule diamantée (1,8 mm)
- Emporte pièce de 5mm (Biopsy Punch, Stiefel, Afrique du Sud)
- Matériel de chirurgie de base sur le rongeur : pince, ciseaux, scalpel, fil de suture (Coated VICRYL®, Ethicon, Etats-Unis)
- Microscope optique MZ 9.5 (Leica, Allemagne)
- Source lumineuse CLS 150 X (Leica, Allemagne)
- Balance PE 3600 (Mettler DeltaRange®, Columbus, USA)
- Aiguille 27G hypodermique (Dutscher, France)
- Seringues 1mL
- Kétamine 500 (Centravet, Nancy, France)
- Xylazine (Rompun 2%) (Centravet, Nancy, France)
- PBS (Sigma)
- Povidone iodée (Mylan, Etats-Unis)

➤ Méthode

Les souris ont été acclimatées au sein de l'animalerie une semaine avant toute manipulation. Les instruments de chirurgie, avant d'être utilisés, sont nettoyés et stérilisés par la flamme. La solution anesthésique est préparée avant l'expérimentation animale : il s'agit d'une solution aqueuse contenant de la kétamine 500 (concentrée à 2 mL.kg⁻¹) et de la xylazine (Rompun 2%) (concentrée à 0,5 mL.kg⁻¹). Le matériel servant à réaliser les défauts osseux est constitué d'un micromoteur équipé d'un contre-angle, relié à une fraise boule diamantée de 1,8 mm de diamètre. Les souris sont pesées afin de déterminer la dose de solution anesthésique contenant de la kétamine et de la xylazine à utiliser (dosage de 10 mg.kg⁻¹), qui est administrée à la souris par une injection intrapéritonéale. Une fois l'anesthésie efficace, les souris sont positionnées en décubitus ventral sur une plaque en verre pour faciliter la manipulation du rongeur, et une incision d'une longueur de 2,5 cm environ est pratiquée au sommet du crâne. La suite de la chirurgie sur le rongeur dépend de la taille de la lésion à créer.

➤ Lésion de petite taille (2 mm)

La lésion est pratiquée au niveau de la zone pariétale du crâne de la souris à l'aide de la fraise boule diamantée d'un diamètre de 1,8 mm. La taille de la lésion autorise à procéder à deux lésions bilatérales sur le crâne de la souris, pour diminuer le nombre d'animaux utilisés à chaque expérimentation en vertu de la règle des 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner) qui prévaut en expérimentation animale.

3.2.2. Implantation en sous-cutanée

➤ Matériel et réactifs

- Matériel de chirurgie de base sur le rongeur : pince, ciseaux, scalpel, fil de suture (Coated VICRYL[®], Ethicon, Etats-Unis)
- Microscope optique MZ 9.5 (Leica, Allemagne)
- Source lumineuse CLS 150 X (Leica, Allemagne)
- Balance PE 3600 (Mettler DeltaRange[®], Columbus, USA)
- Aiguille 27G hypodermique (Dutscher, France)
- Seringues 1mL
- Kétamine 500 (Centravet, Nancy, France)
- Xylazine (Rompun 2%) (Centravet, Nancy, France)
- PBS
- Povidone iodée (Mylan, Etats-Unis)

➤ Méthode

Une fois l'anesthésie efficace, les souris sont positionnées en décubitus ventral sur une plaque en verre pour faciliter la manipulation du rongeur, et des incisions de 3 à 4 mm environ sont pratiquées sur le dos du rongeur. La peau du rongeur est ensuite séparée des muscles, et les dispositifs médicaux implantables sont logés dans cette niche. En vertu de la règle des 3R, une souris peut recevoir jusque 6 implants sous-cutanés (2 colonnes de 3 implants de part et d'autre de la colonne vertébrale). A la fin de la chirurgie, les ouvertures cutanées sont suturées à l'aide d'un fil résorbable VICRYL[®], et de la povidone iodée (10%) est appliquée au niveau du site cutané, comme antiseptique. Les souris sont placées ensuite sur un plateau chauffant et leur état général est observé jusqu'à réveil, et tout au long de la durée de l'expérience.

3.2.3. Injection pré-explantatoire de calcéine

➤ Matériel et réactifs

- Aiguille 27G hypodermique (Dutscher, France)
- Seringues 1mL
- PBS (Sigma)
- Calcéine (Sigma- Aldrich)

➤ Principe

La calcéine est un composé utilisé pour détecter la néoformation de tissus osseux. En effet, ce composé fluorescent va, dans la circulation générale, se fixer aux ions Ca^{2+} et, en même temps que le calcium, être incorporé à l'os néo-formé.

➤ Méthode

La solution de calcéine consiste en une solution de PBS contenant de la calcéine (2 mg.mL⁻¹). L'injection pré-explantatoire de calcéine consiste en une injection sous cutanée de cette solution (10 mg.kg⁻¹) chez la souris, 10 jours et 3 jours avant la date d'explantation. L'état général des souris est observé avec attention après ces injections.

3.2.4. Explantation des dispositifs médicaux après expérimentation animale

➤ Matériel et réactifs

- Matériel de chirurgie : pinces, ciseaux, scalpels
- Pentobarbital sodique (54,7 mg.mL⁻¹) (Centravet, Nancy, France)
- Aiguille 27G hypodermique (Dutscher, France)
- Seringues 1mL
- PBS (Sigma)
- PFA 4% (Sigma)
- Solution de Bouin- Hollande

➤ Méthode

Après différents temps d'implantation (2 semaines à 90 jours), les animaux sont sacrifiés par une injection létale de pentobarbital sodique faite en intrapéritonéale (10 mg.kg⁻¹) et une démyélation de l'animal. Une fois l'animal sacrifié, les implants peuvent être récupérés pour des études ultérieures. Deux cas de figure se présentent, en fonction du site implantatoire :

➤ **Explantation en calvaria**

Les souris sont placées en décubitus ventral. Pour avoir accès à la boîte crânienne, une incision de la peau recouvrant le crâne est faite pour rendre l'implant visible. Une incision méticuleuse autour de l'implant est réalisée à l'aide de ciseaux en laissant une marge suffisante d'os hôte autour de l'implant d'intérêt. Cet explant est placé dans une solution de fixation (Bouin Hollande ou PFA à 4%).

➤ **Explantation en sous-cutané**

Les souris sont placées en décubitus ventral. Les implants sont accessibles en incisant autour de la zone d'implantation pour un accès à l'ensemble des implants. La peau autour des échantillons sera encore préservée pour ne pas altérer la structure des implants. Ces explants sont placés dans une solution de fixation (Bouin Hollande ou PFA à 4%).

3.3. Observation de la production matricielle

3.3.1. Coloration histologique

➤ **Matériels et réactifs**

- Microtome manuel RM 2165 (Leica, Allemagne)
- pH-mètre (Mettler- Toledo, Columbus, USA)
- Microscope optique DM 4000 B (Leica, Allemagne)
- Explants de calvaria
- Solution de Bouin Hollande
- EDTA
- PBS
- Paraffine liquide
- Lame et lamelle
- Colorant Hématoxyline-éosine
- Colorant Mallory
- Milieu de montage histologique (Labo-moderne, France)

➤ **Principe**

L'objectif de ces colorations histologiques est de marquer la matrice à l'intérieur de l'implant synthétique, ainsi que les cellules.

➤ Méthode

Une fois le dispositif médical retiré du rongeur, il est fixé à l'aide d'une solution de Bouin-Hollande. La fixation terminée, les échantillons sont déminéralisés à l'aide d'une solution d'EDTA diluée à 15% dans une solution de PBS, pendant une semaine à 4°C. Les échantillons sont ensuite inclus dans une solution de paraffine, et coupés à l'aide d'un microtome manuel (la taille de coupe étant de 7µm), puis déposés sur des lames et déparaffinés. Après cette étape, les échantillons sont colorés soit à l'aide d'une solution de coloration hématoxyline-éosine, soit une coloration au trichrome de Mallory, rincés puis montés à l'aide du milieu de montage histolaque, recouverts d'une lamelle et observés au microscope optique.

3.3.2. Coloration immunohistochimique de l'ostéocalcine

Le principe de cette analyse est de marquer par immunohistochimie l'ostéocalcine sur des échantillons coupés au microtome manuel.

➤ Matériels et réactifs

- Anticorps primaire (Enzo Life Sciences, Lausen, Suisse)
- Anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (OmniRabbit, Ventana, Roche)
- Tetrahydrochlorure de diaminobenzidine (DAB) (Chromomap DAB, Ventana, Roche)
- Hématoxyline de Carazzi (Sigma)
- PBS (Sigma)
- Eau distillée

➤ Méthode

Une fois le dispositif médical retiré du rongeur, il est fixé à l'aide d'une solution de Bouin-Hollande. La fixation terminée, les échantillons sont déminéralisés à l'aide d'une solution d'EDTA diluée à 15% dans une solution de PBS, pendant une semaine à 4°C. Les échantillons sont ensuite inclus dans une solution de paraffine, et coupés à l'aide d'un microtome manuel (la taille de coupe étant de 7µm), puis déposés sur des lames et déparaffinés. Ils sont ensuite incubés avec un anticorps primaire dirigé contre l'ostéocalcine (facteur de dilution : 1 :2000) pendant 8 minutes. Après incubation, les échantillons sont rincés 3 fois au PBS, puis incubés avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort durant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite rincés au PBS et incubés avec une solution de DAB agissant comme chromogène durant une minute. Les échantillons sont rincés à l'eau distillée et incubés pendant 5 minutes avec de l'hématoxyline de Carazzi pour marquer

les noyaux cellulaires. Après rinçage à l'eau distillée, les échantillons sont montés à l'aide du milieu de montage histolaque, recouverts d'une lamelle et observés au microscope optique.

3.4. Observation de la minéralisation des dispositifs médicaux

3.4.1. MEB-Spectroscopie à rayon X

L'étude utilisant la spectroscopie à rayon X couplée au microscope électronique à balayage a été réalisée dans le cadre d'une collaboration (Professeur Manuel Arruebo, département d'ingénierie chimique, université de Saragosse).

➤ Matériels et réactifs

- Inspect™ F50 (FEI , Hillsboro, Oregon, Etats-Unis)
- Spectromètre à rayon X
- PFA à 4% (Sigma)
- PBS (Sigma)
- Ethanol 25%, 50%, 75%, 90%, 100% (Euromedex, France)
- Hexamethyldisilazane (HMDS) (Euromedex, France)

➤ Principe

Le principe de cette technique est de déterminer la composition des différents dispositifs médicaux explantés. Pour cela, une microscopie électronique à balayage est réalisée, conjointement à une spectroscopie à rayon X, pour permettre d'établir une cartographie du dispositif médical en fonction de ses différents constituants atomiques (calcium, phosphore, etc.).

➤ Méthode

Les dispositifs médicaux, une fois explantés, sont fixés dans une solution de PFA à 4%, durant 15 minutes à 4°C. Pour cette étude, seuls des échantillons de calvaria ont été analysés. Ils sont ensuite déshydratés et montés sur un porte-échantillon pour être métallisés par pulvérisation de platine. Les échantillons sont alors observés au microscope électronique à balayage (Inspect™ F50) couplé à un spectromètre à rayon X. La tension d'accélération des électrons est de 10kV pour les échantillons.

3.4.2. Microtomographie assistée par ordinateur (micro-CT)

L'étude de la minéralisation portant sur la microtomographie assistée par ordinateur a été réalisée dans le cadre d'une collaboration (Professeur David Brasse, institut multidisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg).

➤ Matériels et réactifs

- Microtomographe à rayon X
- Aiguille 27G hypodermique (Dutscher, France)
- Seringues 1mL
- Kétamine 500 (Centravet, Nancy, France)
- Xylazine (Rompun 2%) (Centravet, Nancy, France)

➤ Méthode

Les souris sont anesthésiées légèrement par une solution de kétamine 500 (concentrée à 2 mL.kg⁻¹) et de xylazine (Rompun 2%)(concentrée à 0,5 mL.kg⁻¹)(dose de 5mg.kg⁻¹) puis placées dans un microtomographe à rayon X en décubitus ventral afin de limiter les mouvements du rongeur. Un total de 5 examens par rayons X à différents temps (3 jours puis 10, 17, 25 et 31 jours) ont été effectués sur chaque animal. Pour chaque examen, un total de 768 radiographies ont été prises, à 360° autour de la zone d'intérêt avec une tension d'accélération des rayons de 40kV, et une intensité de 200 mA. Les images sont ensuite analysées par des algorithmes de reconstruction de cônes pour produire en temps réel une image 3D de la zone d'intérêt.

3.5. Observation de la synthèse de glycosaminoglycanes dans les dispositifs médicaux

➤ Matériels et réactifs

- Microtome manuel RM 2165 (Leica, Allemagne)
- pH- mètre (Mettler- Toledo, Columbus, USA)
- microscope optique DM 4000 B (Leica, Allemagne)
- PFA
- CaCl₂
- Cacodilate trihydraté
- Echantillonsensemencés, fonctionnalisés ou non
- Paraffine liquide
- Lame

- PBS
- Colorant Safranin O/ Fast Green
- Colorant Bleu Alcian

➤ Méthode

La méthode de coloration des lames pour observation de la production de glycosaminoglycanes, après expérimentation animale, est la même que pour les échantillons après culture *in vitro*. La méthodologie de préparation des échantillons est donc la même que celle expliquée dans le paragraphe 2.5.1.

3.6. Analyse du recrutement vasculaire des dispositifs médicaux

➤ Matériels et réactifs

- Microscope optique MZ 9.5 (Leica, Allemagne)
- Source lumineuse CLS 150 X (Leica, Allemagne)
- Appareil photo Olympus
- Scalpels
- Explants cellularisés et fonctionnalisés
- Explants cellularisés et non fonctionnalisés

➤ Principe

Le principe de l'observation macroscopique du recrutement vasculaire dans un explant sous-cutané au contact de la peau est de mettre en évidence les vaisseaux sanguins de l'hôte qui migrent vers les dispositifs médicaux. Un comptage manuel permettra de déterminer quantitativement ce nombre.

➤ Méthode

Après explantation des dispositifs médicaux sous-cutanés, une vue d'ensemble de l'intégralité des dispositifs médicaux est capturée à l'aide d'un appareil photo Olympus monté sur le stéréomicroscope optique. Ensuite, un cliché avec un grossissement plus important est fait pour chaque implant. Cette image sera analysée avec le logiciel Photoshop. Chaque vaisseau terminal relié à l'implant est marqué, et une numération est faite pour déterminer quantitativement le nombre de vaisseaux terminaux recrutés par l'implant en sous-cutané.

	Médecine régénérative osseuse	Médecine régénérative cartilagineuse	Comblement osseux	
<i>In vitro</i>	Analyse quantitative	RTPCR (runx2, BspII, ostéocalcine)	RTqPCR (Sox9, Coll-II, Aggrécane)	ELISA (VEGF)
	Fluorescence	Runx2 BspII Ostéocalcine	Sox9 Collagène II Aggrécane	CD 31
	Histologie	Rouge d'alizarine	Bleu Alcian Safranin O/ fast green	
<i>In vivo</i>	Implantation	calvaria/ sous-cutanée	sous-cutanée	sous-cutanée
	Fluorescence	calcéine		
	MEB	MEB- spectroscopie à rayon X		
	Histologie	Mallory/ Hématoxyline- éosine Immunohistochimie (ostéocalcine)	Bleu Alcian Safranin O/ fast green	Hématoxyline/ éosine
	Tomographie	oui	non	non

Tableau 14: Récapitulatif des techniques utilisées durant le travail de thèse

IV. Résultats et discussion

Chapitre 1

Propriété ostéogénique d'un biomatériau nanocomposite à base de chitosane et de nanoparticules de silice

Article 1

- ❖ Keller, L., Regiel-Futyra, A., Gimeno, M., Eap, S., Mendoza, G., Andreu, V., Wagner, Q., Kyzioł, A., Sebastian, V., Stochel, G., Arruebo M., Benkirane-Jessel N. (2017). Chitosan-based nanocomposites for the repair of bone defects. *Nanomedicine : Nanotechnol. Biol. Med.* 13, 2231–2240.

1. Contexte et objectif

La prévalence des maladies osseuses est en augmentation, due à l'allongement de la durée de vie et au vieillissement de la population. Les traitements utilisés en clinique à l'heure actuelle pour la régénération osseuse sont principalement basés sur les greffes osseuses (autogreffes ou allogreffes), mais ceux-ci sont toujours associées à des contraintes comme la quantité d'os disponible, la comorbidité, l'allongement du temps de convalescence (autogreffes) et la transmission de pathogènes (greffe allogénique). Pour pallier ces limitations, de nouvelles stratégies thérapeutiques se sont développées les dernières années. L'une des approches principales pour la régénération tissulaire est de développer un biomatériau tridimensionnel qui imite finement la matrice extracellulaire osseuse. Plusieurs molécules ont été utilisées pour produire des biomatériaux, incluant des matériaux naturels dérivés d'espèces animales ou végétales (collagène, fibrine ou chitosane) et des matériaux synthétiques comme les céramiques et les polymères. Les implants basés sur des polymères d'origine naturelle sont attractifs en raison de leur biocompatibilité, biodégradation, faible toxicité, baisse de réaction inflammatoire, ainsi que leurs caractéristiques similaires aux tissus humains.

Le chitosane (CS), dérivé semi-synthétique de la chitine, est un aminopolysaccharide polycationique produit par N-déacétylation alcaline du biopolymère naturel. Une vaste gamme d'application du chitosane résulte de ses multiples propriétés physico-chimiques et biologiques. Ces propriétés dépendent fortement de son poids moléculaire et de son degré de déacétylation. Le CS est connu comme étant biocompatible, biodégradable et possédant des propriétés antimicrobiennes contre les bactéries et les champignons. Sa biocompatibilité et ses faibles effets toxiques ont été rapportés dans de nombreuses études, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Levengood and Zhang, 2014). Cependant, son utilisation comme biomatériau pour la régénération osseuse reste limitée en raison de ses faibles propriétés de résistance à la compression. C'est pourquoi, en raison de la facilité de préparation et ses propriétés inhérentes, il y a eu un intérêt grandissant à combiner ce biomatériau avec d'autres agents pour accroître ses propriétés de résistance et envisager de possibles applications en clinique.

L'objectif de cette étude a été de développer un biomatériau composite de chitosane et de nanoparticules de silice (SiO₂) (CS-NC), pour favoriser la régénération du tissu osseux. En effet, la silice possède plusieurs propriétés bénéfiques pour la régénération osseuse. Cette espèce est responsable d'un pontage physique au tissu osseux une fois implanté par des

mécanismes d'échanges d'ions et de condensation de calcium et de phosphate, permettant de générer de l'hydroxyapatite sur une surface riche en silice, typiquement les nanoparticules de silice dans cette étude. De plus, combiner des nanoparticules de silice à d'autres espèces pour former des matériaux composites a permis d'augmenter la force de résistance à la compression de la structure (Jumahat et al., 2010; Masturi et al., 2011).

La biocompatibilité de ce dispositif implantable a été évaluée *in vitro* en présence d'ostéoblastes primaires humains (hObs) puis par implantation *in vivo*. Ainsi, l'efficacité du biomatériau composite pour la régénération d'un défaut en site osseux (calvaria) a été évaluée sur un modèle murin après analyse histopathologique.

2. Résultats et discussion

Une analyse par microscopie électronique à balayage a été utilisée pour caractériser la morphologie et la taille des pores des biomatériaux nanocomposites à deux concentrations choisies de chitosane : 2,5 et 10 mg.mL⁻¹ ayant des poids moléculaires différents : L pour un poids moléculaire faible (environ 369 kDa) ; M pour moyen (1278 kDa) ; H pour un poids moléculaire élevé (2520 kDa). Aucune différence significative n'a été obtenue dans la distribution des tailles de pores pour les différents poids moléculaires de chitosane étudiés. La concentration du polymère n'a pas non plus influencé la morphologie et la distribution des pores. La construction retenue pour les études a été celle avec un poids moléculaire de chitosane moyen, à la concentration de 10 mg.mL⁻¹.

En ajoutant une petite quantité de nanoparticule de silice (0,32 mg.mL⁻¹) dans la solution de chitosane, la résistance à la compression du nanocomposite obtenue a été augmentée de 30% atteignant un module d'Young de 173,3 MPa (la force de compression de l'os cortical humain atteignant 170 MPa). Cette résistance à la compression est donc identique pour la construction nanocomposite que pour l'os cortical physiologique, il a donc été possible de doter notre implant d'une résistance à la compression similaire au tissu osseux physiologique.

La biocompatibilité du biomatériau nanocomposite a été testée en ensemençant des ostéoblastes primaires et en mesurant leur activité métabolique durant 21 jours par le test à l'Alamar Blue®. Le suivi de l'activité métabolique de ces ostéoblastesensemencés sur l'implant nanocomposite nous permet de conclure quant à la biocompatibilité du matériau composite avec l'activité métabolique des ostéoblastes. Après 21 jours, nous avons observé une formation de sphéroïdes, ce qui n'est pas le cas pour des matrices tridimensionnelles

d'autres types (comparaison avec une matrice tridimensionnelle de PCL ainsi qu'une matrice tridimensionnelle de collagène). Ceci pourrait constituer un avantage pour la régénération osseuse, la conformation en 3D pouvant accélérer le processus de minéralisation. En effet, la formation de sphéroïdes a été décrite comme étant un événement menant à la promotion de processus de régénération tissulaire, en utilisant par exemple des CSMs.

L'analyse histopathologique a montré des différences de population cellulaire durant le temps d'implantation pour le biomatériau CS-NC en site osseux (calvaria) chez l'animal (souris nude). A deux semaines, il y a présence de macrophages, suivie par la production de tissu collagénique accompagné d'une angiogenèse prononcée à 4 semaines. A 8 semaines, un tissu collagénique plus dense et mature a été observé à l'intérieur de l'implant, avec plusieurs zones minéralisées et des vaisseaux sanguins organisés.

Les analyses immunohistologiques ont montré la progression dans la formation du tissu osseux par la distribution des ostéoblastes et l'expression de l'ostéocalcine. A deux semaines les ostéoblastes sont visualisés à l'interface hôte/dispositif médical implantable, puis l'expression de la protéine a été observée à l'intérieur du CS-NC. A 8 semaines, cette expression était plus dispersée.

Ces résultats ont pu démontrer que les biomatériaux CS-NC sont biocompatibles et constituent un support de base efficace pour la formation de tissu osseux, promouvant une régénération osseuse adéquate.

Malgré les résultats prometteurs obtenus par les biomatériaux à base de chitosane en terme de biocompatibilité et d'ostéoconduction, la plupart des études concernant la régénération osseuse *in vivo* analysent des matériaux tels que les céramiques (hydroxyapatite ou phosphates calciques) et des polymères synthétiques (copolymère d'acide lactique et glycolique, acide poly-lactique). Cependant, la matrice extracellulaire osseuse est principalement composée de fibres de collagène minéralisées, les biomatériaux dédiés à la régénération de ce tissu devraient donc avoir les mêmes caractéristiques, à savoir une grande porosité pour promouvoir l'adhésion et la prolifération, une biodégradabilité et certains des matériaux précédemment cités en sont limités (Dong et al., 2014). Plusieurs auteurs ont alors évalué l'élaboration de nouveaux implants à base de chitosane modifiée pour promouvoir une stabilité mécanique, une biocompatibilité, la minéralisation, l'angiogenèse et ainsi accroître la régénération osseuse (Talebian et al., 2014). D'autres ont combiné le chitosane avec d'autres

espèces, telles l'hydroxyapatite (Ji et al., 2015), le polyéthylène glycol avec des bioverres ou encore des nanoparticules de silice (Li et al., 2015a) pour améliorer le chitosane.

D'autres études portant sur des combinaisons utilisant le chitosane ont montré de bons résultats, notamment pour l'hydroxyapatite et d'alginate (Jin et al., 2012), l'alginate supplémenté avec de la BMP-2 (Florczyk et al., 2013) ou encore les fibres de soie et le TGF- β 1 dans des modèles *in vivo* de régénération osseuse (Tong et al., 2016).

3. Conclusions

Les dispositifs médicaux implantables à base de chitosane peuvent donc être considérés comme une approche thérapeutique intéressante pour la régénération de lésions osseuses. Les études portant sur la culture *in vitro* ont montré une propension des cellules mésenchymateuses (ostéoblastes) à proliférer en sphéroïdes de conformation tridimensionnelle. L'analyse *in vivo* de l'implantation de ces dispositifs médicaux en site osseux (calvaria) a montré une grande efficacité du chitosane comme biomatériau ostéoconducteur et ostéoinductif. Il a également démontré une bonne biocompatibilité avec le tissu osseux hôte par la présence de tissu collagénique dans l'intégralité de l'implant nanocomposite, et également le recrutement précoce d'ostéoblastes. Les biomatériaux à base de chitosane sont donc des sources d'intérêt sérieuses pour l'ingénierie osseuse.

Chitosan-based nanocomposites for the repair of bone defects

L. Keller, PhD^{a,1}, A. Regiel-Futyra, PhD^{b,1}, M. Gimeno, PhD^c, S. Eap^a,
G. Mendoza, PhD^{d,e,f,*}, V. Andreu, PhD^{d,e,f,*}, Q. Wagner, PhD^a, A. Kyzioł, PhD^b,
V. Sebastian, PhD^{d,e,f}, G. Stochel, PhD^b, M. Arruebo, PhD^{d,e,f}, N. Benkirane-Jessel, PhD^a

^aINSERM, Unité Mixte de Recherche UMR 1109, Team "Osteoarticular and Dental Regenerative NanoMedicine," Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, UDS, Strasbourg, France

^bFaculty of Chemistry, Jagiellonian University, Kraków, Poland

^cFaculty of Veterinary, Department of Animal Pathology, University of Zaragoza, Spain

^dDepartment of Chemical Engineering, Aragon Institute of Nanoscience (INA), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

^eNetworking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, 28029, Madrid, Spain

^fAragon Health Research Institute (IIS Aragón), 50009, Zaragoza, Spain

Received 13 December 2016; accepted 8 June 2017

Abstract

Chitosan scaffolds of different deacetylation degrees, average molecular weights and concentrations reinforced with silica nanoparticles were prepared for bone tissue regeneration. The resulting nanocomposites showed similar pore sizes (<300 μm) regardless the deacetylation degree and concentration used in their formulation. Their mechanical compression resistance was increased by a 30% with the addition of silica nanoparticles as nanofillers. The biocompatibility of the three-dimensional chitosan scaffolds was confirmed by the Alamar Blue assay in human primary osteoblasts as well as the formation of cell spheroids indicative of their great potential for bone regeneration. *In vivo* implantation of the scaffolds in a mice calvaria defect model provided substantial evidences of the suitability of these nanocomposites for bone tissue engineering showing a mature and dense collagenous tissue with small foci of mineralization, vascularized areas and the infiltration of osteoblasts and osteoclasts. Nevertheless, mature bone tissue formation was not observed after eight weeks of implantation. © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Chitosan; Silica nanoparticles; Scaffold; Bone regeneration; Human primary osteoblasts

The prevalence of bone diseases is markedly growing due to the increase in life expectancy and the population aging, becoming a global public health problem and representing a burden for health care systems. Current clinical treatments for bone healing, replacement or regeneration are based on the use of bone grafts (autografts or allografts) and bone graft substitutes, which differ in their strength and osteoconductive, osteoinductive and osteogenic potential.¹ However, due to the limitations associated with their clinical use, the ongoing search of other therapeutic strategies is focused on the development of novel

graft substitutes for their implantation in the damaged bone region. One of the main approaches for tissue regeneration includes the development of 3-dimensional (3D) scaffolds that closely mimic the composition and the fibrillary structure of the bone extracellular matrix.^{2,3} Besides, a highly porous structure and suitable surface chemistry and topography are required for facilitating cell adhesion, cell growth and proliferation, diffusion of oxygen and nutrients, and for the removal of metabolic waste created during the regenerative process. Regardless of the porous structure, porosity greater than 75% and pore sizes of above 150

Conflict of interest: There is no conflict of interest to be declared.

Financial support: This work was supported by ERC Consolidator Grant program (ERC-2013-CoG-614715, NANOHEDONISM). CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R&D&I Plan 2008-2011 financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the European Regional Development Fund.

*Corresponding authors at: Universidad de Zaragoza, Centro de Investigación Biomédica de Aragón-CIBA, Planta A-Sala Postdoctorales, 50009 Zaragoza.

E-mail addresses: gmmenc@unizar.es (G. Mendoza), vandreu@unizar.es (V. Andreu).

¹ Both authors contributed equally to the work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.007>

1549-9634/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

μm appear to be necessary to achieve osteoconductive properties, although these morphological characteristics are going to depend on the repair, rate of remodeling and rate of degradation of the scaffolding material.^{4,5} From a mechanical point of view, it is also necessary that the mechanical properties of the scaffold are comparable to the ones of the defective site to act as a temporary skeleton and to provide sufficient mechanical integrity to withstand the loadings during the bone remodeling process, restoring the normal biomechanical function of the bone.

Several biomaterials have been used for the fabrication of the aforementioned scaffolds, including natural materials derived from animals or plants (collagen, fibrin, hyaluronan and chitosan) and synthetic materials, such as bioactive ceramics and a wide range of synthetic polymers.⁶ Scaffolds composed of natural origin polymers are attractive owing to their biocompatibility, biodegradability, low toxicity and chronic inflammatory response, and due to their biological characteristics and structural similarities with human tissues.

In that sense, chitosan (CS), a derivative of chitin, is a polycationic aminopolysaccharide produced *via* alkaline N-deacetylation process of the naturally occurring biopolymer.⁷ Its linear chains consist of β -1,4-linked N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine units which are susceptible of biodegradation. A wide range of CS applications results from its unique set of versatile physicochemical and biological properties. In contrast to chitin, CS is soluble in most dilute acidic solutions at pH below 6.5 (pKa value \sim 6.3).⁸ The physicochemical and biological properties of CS significantly depend on its average molecular weight and deacetylation degree (DD) being both characteristics dependent on the biological origin of the polymer and on the deacetylation process conditions used.⁹ CS is known to be biocompatible, biodegradable and antimicrobial against several bacterial and fungal strains.^{10–12} Its biological inertness and low toxic effects have been supported by numerous *in vitro* and *in vivo* studies. No allergic and inflammatory reactions after CS-based materials implantation, injection or topical application on the human body were proven.^{13,14} However, its use as scaffold is currently limited by having reduced mechanical properties. In that sense, due to its ease of processing and the above-mentioned properties, there has been a growing interest in the combination of CS with other materials in an attempt to increase its mechanical resistance and widen its application in the biomedical field as scaffolding. This disadvantage has been overcome by modifying CS scaffolds with bioactive inorganic materials (hydroxyapatite, tricalcium phosphate) or synthetic polymers (such as poly(vinyl alcohol) and poly(ethylene glycol)) and natural polymers (collagen).^{15,16} In that way, it has been proven that the addition of nanofillers such as carbon nanotubes, clay and silica significantly enhances the mechanical, electrical, and thermal stability of the polymers.^{17–19} It is important to mention that several evidences suggest that silicon plays an important role in bone formation and health. To date, its potential biological action on the bone turnover is unclear but it has been suggested that it is involved in collagen synthesis and matrix mineralization.²⁰ So, Beck *et al.* reported that bioactive silica based nanoparticles stimulate osteoblast differentiation and mineralization and suppress osteoclast differentiation *in vitro* as well as enhance bone mineral density *in vivo*.²¹ Furthermore,

composite mesoporous silica nanoparticle/CS nanofibers have been proposed as effective scaffolds in bone tissue applications due to their promotion of osteoblast attachment, proliferation osteogenic differentiation and bone formation.²² Also, it has been described that the incorporation of nano-silica in CS/chondroitin sulfate nanocomposites improves the mechanical property of scaffolds and enhances the rate of mineralization and serum protein adsorption.²³

On the other hand, recently, a next generation of biomaterials is emerging in the medicine regenerative field, focusing on the design of bioactive and resorbable scaffolds. These hybrid materials incorporate inert nanostructured scaffolds, bioactive factors and living cells capable of constituting the bone tissue matrix, guiding and accelerating the bone healing process.²⁴ In that way, specific cell types such as mesenchymal stem cells, osteoblasts or osteogenic progenitor cells are seeded directly on 3D scaffolds prior to *in vivo* implantation in bone defects. Several studies have observed proliferation, migration, and differentiation of osteoblast-like cells in collagen type I scaffolds likewise the synthesis of osteocalcin, a specific protein of osteoblastic function.²⁴ In addition, it has been demonstrated that MG-63 osteoblasts-like cells are able to attach and proliferate in CS scaffolds regardless of its degree of acetylation (DA), retaining their osteoblastic phenotype.²⁵

In this work, we report the synthesis and characterization of tridimensional scaffolds composed of CS reinforced with SiO₂ nanoparticles to favor bone tissue regeneration. *In vitro* biocompatibility studies of these nanocomposites pre-seeded with human primary osteoblasts were carried out before *in vivo* implantation. Subsequently, their osteogenic, osteoinductive and osteoconductive potential for the reconstruction of full-thickness calvarial defects was evaluated in a mice model after histopathologic examination.

Methods

Materials

CSs (from *Sigma-Aldrich*) with low (L, \sim 369 kDa, from chitin of crab shells), medium (M, \sim 1278 kDa, from chitin of crab shells) and high (H, \sim 2520 kDa, from chitin of crab shells) average molecular weights were used for the scaffolds preparation. The deacetylation degrees of CS L, M and H grades were $86 \pm 3\%$, $89 \pm 2\%$ and $85 \pm 3\%$, respectively.²⁶ An aqueous solution of acetic acid (99.8% *Sigma-Aldrich*) was used as a solvent for the polymer. Sucrose ($>99.0\%$ *Sigma-Aldrich*) was used as a cryoprotectant during the lyophilization process. Tetraethoxysilane (TEOS, *Sigma-Aldrich*), ammonium hydroxide (Ammonia, ACS reagent 28%) and absolute ethanol (EtOH, *Sigma-Aldrich*) were used to synthesize SiO₂ nanoparticles (SiO₂ NPs).

Synthesis of silica nanoparticles

\sim 100 nm SiO₂ NPs were produced following the well-known Stober method,²⁷ which is based on the hydrolysis and condensation reaction of TEOS in the presence of NH₄OH in EtOH (molar ratio TEOS: EtOH: NH₃:H₂O = 1:280:18:56).

Briefly, 2.6 mL of ammonia was added to 15 mL of ethanol and stirred for 5 min. Subsequently, a solution of 15 mL of ethanol and 0.40 mL of TEOS was added to the initial basic solution. The final solution was magnetically stirred at 400 rpm for 50 min at 30 °C. The SiO₂ NPs were collected by centrifugation, washed 3 times with ethanol and re-dispersed in water.

Chitosan solutions preparation

CS stock solutions were prepared as follows: 99.8% acetic acid was diluted to obtain 0.1 M aqueous solution; CS flakes were added into glass bottles with the solvent, equipped with a magnetic stirrer and placed in an oil bath. Heating (65 °C) and mixing were maintained until clear solutions were obtained (around 12 h). For each CS, solutions at four different concentrations were prepared: 2.5, 5.0, 7.5, 10 mg/mL. All solutions were prepared with deionized water. Before the preparation of the nanocomposites, sucrose was dissolved in CS solutions to obtain a final concentration of 10 wt.% as well as SiO₂ nanoparticles at a final concentration of 0.32 mg/ml in order to strengthen the CS scaffold structure acting as nanofillers.

Scaffolds preparation and characterization

CS L/M/H solutions with sucrose and SiO₂ nanoparticles were placed in Eppendorf tubes and frozen. Samples were then lyophilized during 18 h (Christ Alpha 1-2 LD Plus) to render the porous scaffolds. The surface morphology of the nanocomposites was observed using scanning electron microscopy (SEM, Quanta FEG-250, FEI, US). Pore sizes in the scaffolds were measured according to the SEM micrographs and presented as relative frequency of pore-size graphs (ImageJ[®] software) measuring 80 pores.

Mechanical testing

Uniaxial compression tests were performed in a universal hydraulic testing machine Instron 8874 to evaluate the mechanical strength of the bare CS scaffolds and the reinforced ones (using SiO₂ nanoparticles). This machine has a resolution of 1 N for a 25 kN load cell and a displacement control test was applied at an axial velocity of 0.1 mm/s. CS-based scaffold and CS scaffolds incorporating SiO₂ nanoparticles as nanofillers were tested. As we mentioned in the previous section, to prepare the SiO₂-loaded CS scaffolds a suspension in water (0.32 mg/ml) was used; consequently, a third group was also analyzed which includes the formation of CS scaffolds with the same water content as the reinforced one but without the addition of silica. Un-filled, SiO₂-reinforced CS scaffolds and scaffolds prepared using the same dilution as the one used in the reinforced ones but without the addition of silica were subjected to unconfined compression uniaxial tests, positioning the specimens (6.7 × 6.3 mm) between two steel disks and allowing a lateral displacement of the upper end. Three valid tests were carried out for each group. The Young's modulus for compression was calculated.

Cell culture

Human osteoblasts (HOBs) (Promocell, Heidelberg) were cultured with human osteoblast growth medium (Promocell, Heidelberg) complemented with osteoblast supplement mix (Promocell, Heidelberg) and incubated at 37 °C in a humidified

atmosphere of 5% CO₂. When cells reached subconfluence, they were harvested with trypsin (Ozyme) and subcultured. After checking cell viability by Trypan Blue, they were seeded on the 3D SiO₂ NPs/CS scaffolds in 96 well plates at a density of 10⁵ cells by scaffold and cultured during 14 days for further implantation, or during 21 days for *in vitro* studies, in complemented human osteoblast growth medium, at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. As controls, cells were seeded at the same density in 3D Polycaprolactone (PCL) as previously reported²⁸ and in 3D collagen sponges (BD Bioscience), and cultured during 21 days.

Cell viability and proliferation

AlamarBlue[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to assess the scaffold biocompatibility at D3, D7, D14, and D21. Cells were cultured in 10% AlamarBlue[®]/Dulbecco's Modified Eagle's Medium (medium without phenol red; Lonza, France) solution in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO₂. After 4 h, incubation medium was transferred to 96-well plates and measured at 570 nm and 595 nm in order to determine the percentage of AlamarBlue[®] reduction. Statistical analyses were obtained by *t* test (*n* = 5).

To verify the cellular colonization of the nanocomposites, the staining of the nuclei was performed. For that, samples of 3D SiO₂ NPs/CS, 3D PCL and 3D collagen sponge cultured with HOBs during 21 days were rinsed with PBS and fixed with paraformaldehyde (4%) during 10 min at 4 °C. Samples were rinsed three times with PBS and incubated with DAPI solution (200 nM) during 10 min at room temperature. After several washing steps with PBS, samples were observed by epifluorescent microscopy (Leica DM 4000B).

In vivo implantation in nude mice

In regards to ethics, experiments followed European Union regulations (Directive 2010/63/EU), and were performed according to authorized investigator Dr. N Jessel (Director of the Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine team), holder of a personal license from Préfecture du Bas-Rhin (number 67–315), who oversaw animal experiments performed. All experiments were done in the Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine de Strasbourg with the approval number A 67-482-35 from the Veterinary Public Health Service of the Préfecture du Bas-Rhin, representing the French Ministry of Agriculture, Department of Veterinary Science. The studies were conducted to ensure a humane care of animals. For further implantations, all surgery was performed under ketamine and xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering. The study was run with nude male mice (CrI: NIH-Foxn1^{tmu}; Charles River, L'Arbresle, France) 6 weeks old. Anesthesia of the mice was performed with an intraperitoneal injection of 100 mg/kg of ketamine (VIRBAC Santé Animale; Centravet Centravet, Nancy, France) and injection of 10 mg/kg of xylazine (Rompun[®] 2%). They were then placed in ventral decubitus on a heating table, under aseptic conditions. After skin incision, two defects (2 mm size) were generated in the parietal zone of the skull using an electric drill using a sterile round burr under irrigation of sterile normal saline to avoid heating. SiO₂

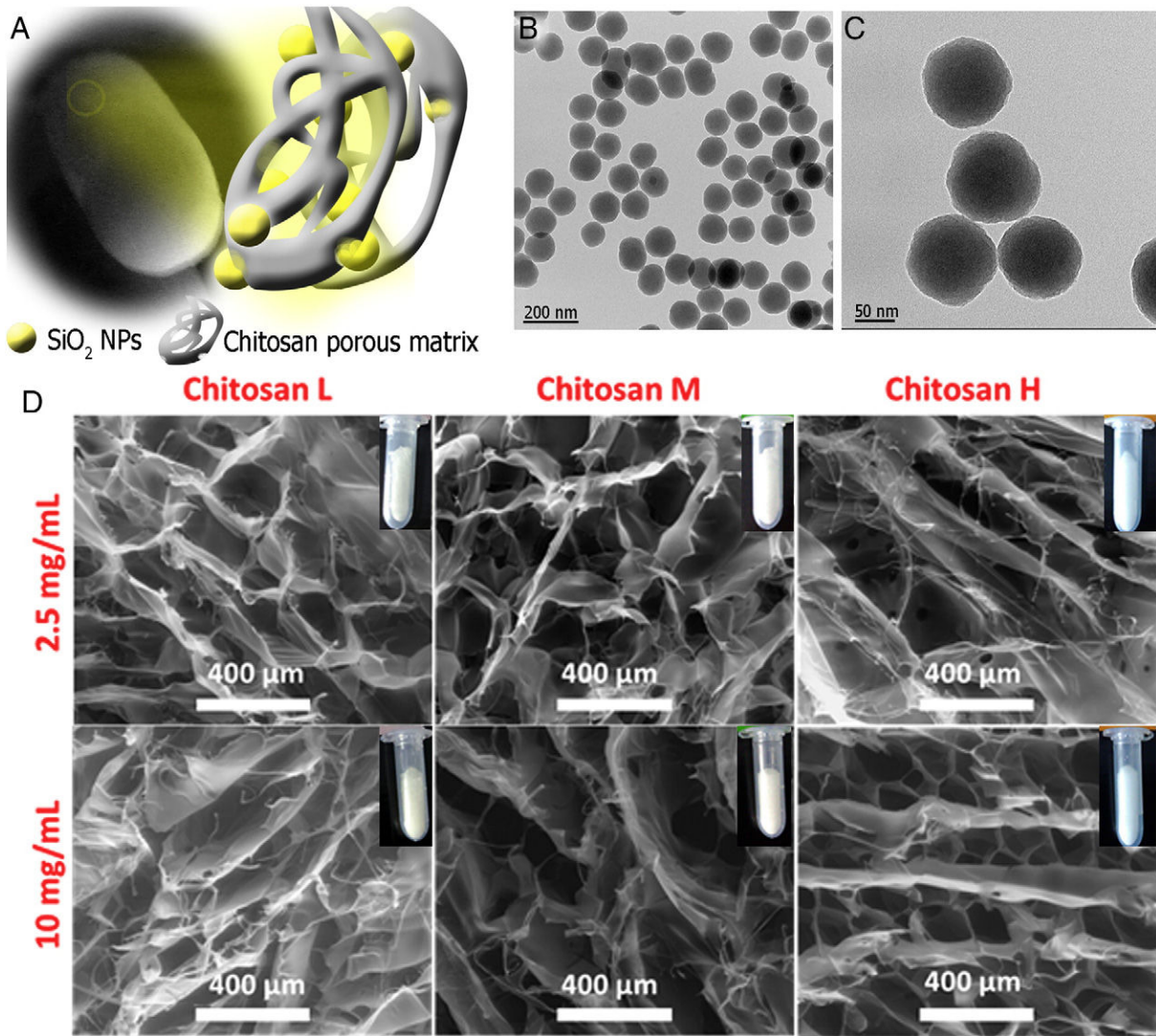


Figure 1. Characterization of SiO₂-chitosan scaffolds. (A) Representative SiO₂-chitosan scaffold and a schematic representation of the SiO₂ integration in the chitosan porous matrix. (B) TEM photograph of the silica nanoparticles prepared. (C) TEM photograph with high magnification of produced SiO₂ nanoparticles. (D) SEM micrographs of CS L, M and H based scaffolds at two concentrations: 2.5 and 10 mg/mL.

NPs/CS scaffolds were then implanted and negative controls (hole) were also performed. Animals were sutured (Ethicon 9/0, Ethicon France, Issy Les Moulineaux, France) and their behavior observed after waking up. For *in vivo* analysis, mice were sacrificed after 2 weeks, 4 weeks and 8 weeks with an injection of ketamine lethal dose.

Histological analysis

Samples were fixed in 4% PFA solution for 24 h at 4 °C and demineralized in an EDTA solution pH 7.1 for 24 h. The samples were processed in a Tissue-Tek Express X50 (Sakura) following the manufacturer's instructions. Immediately, paraffin infiltrated samples were embedded in a mold with liquid paraffin to form a block using the paraffin embedding station Leica EG1150 H. Sections of 3 μm thickness were cut from paraffin blocks using a rotary microtome (Leica RM225; Leica Microsystems) and

mounted on microscopy slides, dried at 45 °C for 1 h and stored at room temperature. Paraffin sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through a series of decreasing concentrations of ethanol. Sections were washed with H₂O. Slides of adjacent sections were processed using histological staining methods in an automatic multistainer (Leica ST5020, Multistainer Workstation). For hematoxylin and eosin (H&E) staining, histological sections were stained with Carazzi's hematoxylin for 10 min and washed in water for 5 min. Afterwards, the slides were stained with eosin for 10 min. After washing, sections were dehydrated in a series of increasing concentrations of ethanol and washed twice in xylene. Sections were mounted in permanent mounting medium and covered with cover slips using a Leica CV5030 fully automated glass coverslipper (Leica Microsystems).

Mallory trichrome staining for topographical delimitation of the connective tissue was applied to the calvaria bone samples.

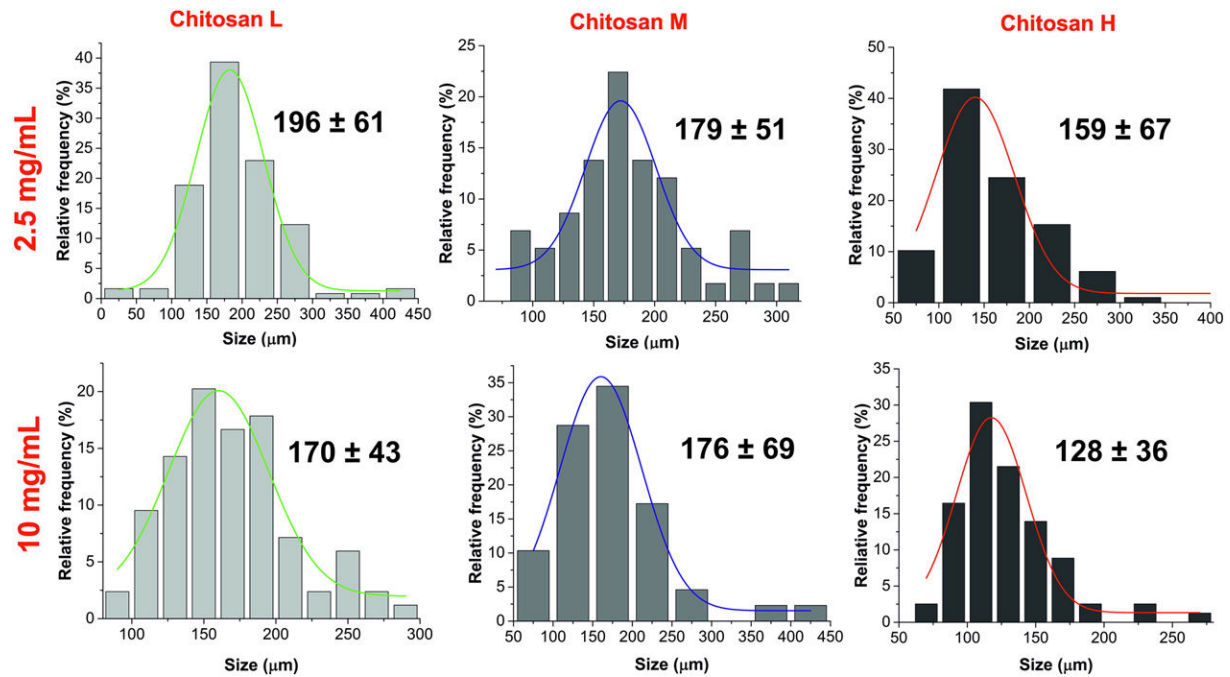


Figure 2. Pore sizes relative frequency based on SEM micrographs of CS L/M/H based scaffolds. Data are presented as mean \pm SD ($n = 80$).

The sections were immersed in Harris's hematoxylin for 10 min. Cytoplasm and muscles fibers were stained with Mallory solutions for 10 min. After that, the sections were placed in light green solution for 10 min to stain the collagen and reticulin fibers. Sections were rapidly dehydrated in a series of increasing concentrations of ethanol and washed twice in xylene. Sections were mounted in permanent mounting medium and covered with cover slips using a Leica CV5030 fully automated glass coverslipper (Leica Microsystems).

The H&E and Mallory stained sections were examined with a Nikon H5505 microscope and photographed with a Nikon digital sight camera.

Immunohistochemical analysis

For OCN immunohistochemistry staining, an automated immunostaining platform was used (Ventana Discovery XT, Roche). Slides were first deparaffinized in xylene and re-hydrated through a series of graded ethanol until water. Antigen retrieval was performed with proteinase and endogenous peroxidase was then blocked (peroxide hydrogen at 3%). Slides were incubated with OCN antibody (Enzo Life Sciences cat #ALX-210-333-C100) at 1:2000 dilution for 8 min. After the primary antibody, slides were incubated with the corresponding visualization system (OmniRabbit, Ventana, Roche) conjugated with horseradish peroxidase. Immunohistochemical reaction was developed using 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) as a chromogen (Chromomax DAB, Ventana, Roche or DAB solution, Dako) and nuclei were counterstained with Carazzi's hematoxylin. Finally, the slides were dehydrated, cleared and mounted with permanent mounting medium for microscopic evaluation.

Results

Electron microscopic and mechanical studies

Figure 1, A depicts a representative SiO₂-chitosan scaffold where 105 \pm 5 nm spherical SiO₂ nanoparticles (Figure 1, B-C) were homogeneously distributed in the CS matrix during the lyophilization process. Figure 1, D shows the sets of SiO₂-CS scaffolds produced with different deacetylation degrees (L, M and H) and concentrations (2.5-10 mg/ml) of CS. Scanning electron microscopy (FEI QUANTA FEG-250) was used to characterize the morphology and pore sizes of the obtained nanocomposites at two selected concentrations: 2.5 and 10 mg/mL. No significant differences in the pore-size distributions of the scaffolds based on CS L/M/H were observed. Polymer concentrations also did not influence the morphology and pore sizes. The size distribution was measured using the ImageJ® software and presented as relative frequency in Figure 2. In most cases pore sizes did not exceed 300 μ m. Based on the obtained results, and previously obtained biological characteristics of the polymer,²⁶ CS scaffolds with medium molecular weight (prepared from solutions at 10 mg/mL) were chosen for the further mechanical and biological studies. Scaffolds without silica nanoparticles were also excluded from the study due to the reduced mechanical properties of the unfilled chitosan (See Table S1) because it has been reported that the ultimate compressive strength for human cortical bone is 170 MPa.²⁹ By adding a small amount of silica nanoparticles (0.32 mg/ml in the precursor solution) as nanofillers the mechanical compression resistance of the chitosan nanocomposites was increased by a 30% reaching a Young's modulus for compression as high as 173.3 MPa. Therefore, the tensile or compressive stress is highly reduced with the addition of silica nanoparticles guaranteeing the scaffold response to loading.

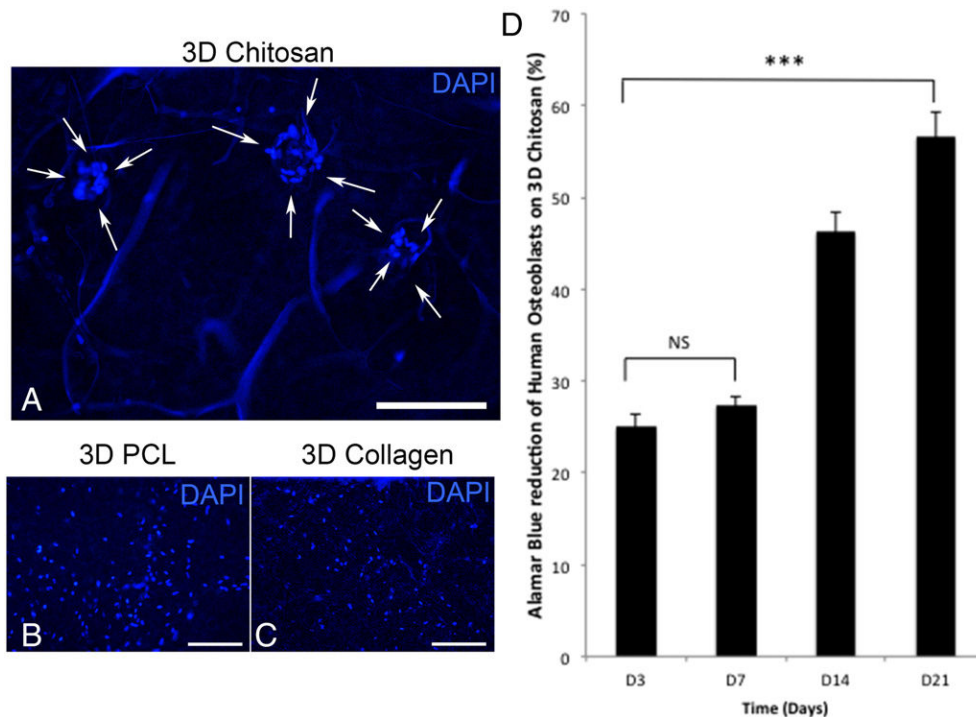


Figure 3. Biocompatibility of 3D SiO₂ NPs/CS scaffold with human primary osteoblasts. (A) Osteoblast cells were cultured on the 3D SiO₂ NPs/CS scaffold and cultured during 21 days. The scaffold induced a 3D spheroid conformation in the cells comparing to cells growing on other 3D scaffolds; (B) 3D PCL and (C) 3D Collagen. (D) After seeding on the 3D SiO₂ NPs/CS scaffold, an Alamar Blue® test was performed at 3, 7, 14 and 21 days of culture. All values were expressed as mean ± SEM. Differences were considered significant at 95% CI (***P* < 0.01 = extremely significant; ****P* < 0.05 = very significant; **P* < 0.1 = significant). Bars = standard deviation. Cells showed an increased metabolic activity during culture time, proof of biocompatibility. Scale bars = 200 μm.

Biocompatibility of the 3D CS

To verify if the 3D SiO₂ NPs/CS scaffold could offer a favorable environment for bone regeneration, the biocompatibility of human primary osteoblast (HOBs) cells was evaluated *in vitro* by measuring their metabolic activity during 21 days. It was observed that the SiO₂ NPs/CS scaffold induced the formation of spheroids, tridimensional conformation for HOBs (Figure 3, A), while others 3D scaffolds as 3D PCL (Figure 3, B) or 3D collagen sponges (Figure 3, C) did not. These findings could constitute an advantage for bone regeneration, as the 3D conformation of osteoblastic cells can accelerate the processes of mineralization.^{30,31} Moreover, during the Alamar Blue® test, a significant increase was observed in the cellular metabolic activity (from D7 to D21: *p* = 0.00015) (Figure 3, D), showing the biocompatibility of our SiO₂ NPs/CS scaffold with osteoblastic cells. Interesting results were observed from D4 to D7, where non-significant differences in the cell activity were observed. This might be related to the formation of spheroids during this time period.

Histopathological and immunohistochemical studies

Histopathological analysis showed changes in cellular population over time for the SiO₂ NPs/CS scaffold group (Figures 4 and 5; S1). At two weeks, a primary major macrophage response occurs (Figure 4, A), followed by the

production of collagenous tissue with a pronounced angiogenesis at four weeks (Figure 4, C). At eight weeks a more mature and dense collagenous tissue was formed inside the scaffold (Figure 4, E), with several areas of organized blood vessels and mineralization. Additionally, at four and eight weeks there was a moderate infiltration of two types of cells compatible with osteoblasts and osteoclasts. However, at eight weeks the control group exhibited a homogeneous collagenous tissue with no signs of osseous differentiation. Mallory's trichrome stain allowed a more accurate visualization of collagenous fibers (blue stain), especially from four weeks onwards at the scaffold group (Figure 4, B, D and F). The collagenous tissue formation is the basis for the ossification process.

Immunohistochemical analysis showed the progress of bone tissue formation through the differences of osteoblasts distribution by evaluation of the OCN expression in the scaffold group. At two weeks osteoblasts were visualized in the bone/scaffold interface (Figure 5, A). At 4 weeks there was a massive expression of this protein, allowing observation of clearly osteoblasts in almost all microscopic fields within the scaffold area (Figure 5, B and C). At 8 weeks this expression was more multifocal but the osteoblasts showed strong positivity (Figure 5, D). These results demonstrate that SiO₂-CS scaffolds are biocompatible and an efficient basis for new bone formation promoting an adequate repair of calvarial bone defects during the time studied.

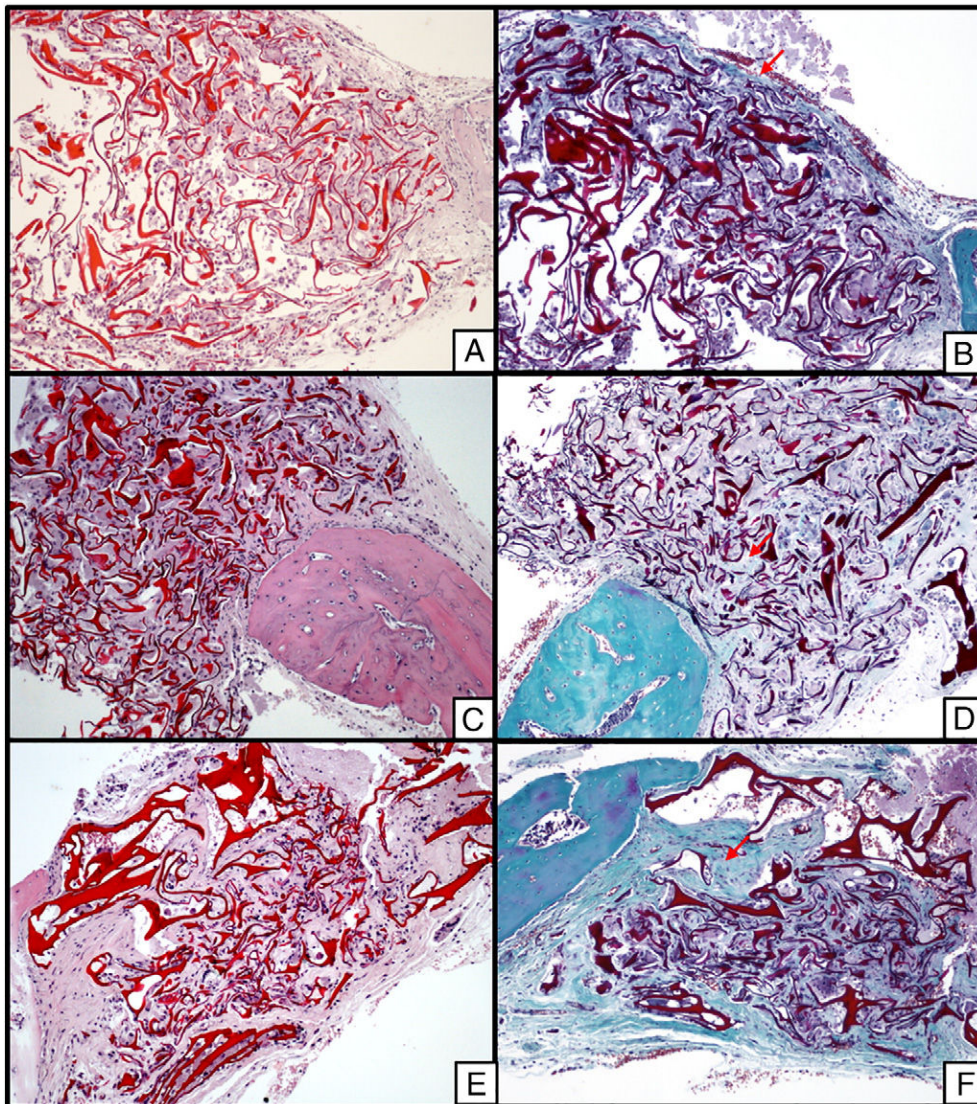


Figure 4. Histological analysis over time for the SiO₂ NPs/CS scaffold group with H&E and Mallory's trichrome staining. (A) 2 weeks. Multifocal distribution of macrophages. Note that the cells have little adhesion H&E, 10 \times . (B) 2 weeks. Collagen fibers stained blue located at the external border of the scaffold (arrow) Mallory's trichrome stain, 10 \times . (C) 4 weeks. Abundant proliferation of collagenous tissue in all scaffold's area H&E, 10 \times . (D) 4 weeks. Collagen fibers multifocally distributed at the external border and inside the scaffold (arrow) Mallory's trichrome stain, 10 \times . (E) 8 weeks. Well-formed mature collagenous tissue inside the scaffold H&E, 10 \times . (F) 8 weeks. Collagenous tissue predominates in all scaffold area (arrow) Mallory's trichrome stain, 10 \times .

Discussion

In the last years, bone tissue engineering has been focused on the search of novel biomaterials which should allow bone regeneration providing the appropriate architecture and biocompatibility to achieve osteoinduction. In this sense, CS has emerged as a highly biocompatible and osteoconductive natural polysaccharide whose degradation products do not exert cytotoxic effects.³² Furthermore, it has demonstrated its ability to induce cell migration and differentiation³³ as well as cell proliferation which has been found dependent on CS concentration, displaying higher osteogenic proliferation rates at higher CS concentrations (12 wt.%) reaching, at the same time, a high compressive modulus of almost 18 MPa³⁴ though not enough for

human bone as pointed above.²⁹ Despite these promising data, most studies regarding bone regeneration *in vivo* have studied other materials such as bioactive ceramics (*e.g.* hydroxyapatite, calcium phosphates),¹⁶ synthetic polymers (*e.g.* polycaprolactone, poly(lactic-co-glycolic acid)^{35,36} or proteins (*e.g.* silk fibroin).³⁷ However, bone extracellular matrix is mainly composed of mineralized collagen fibers so it appears that scaffolds for bone tissue engineering should fulfill the same features, that is, high porosity, strength and biodegradability, to promote cell adhesion and proliferation and some of the previous materials are limited.^{38,39} Several authors have evaluated scaffolds of modified CS promoting mechanical stability, biocompatibility, mineralization, angiogenesis and, thus, bone healing^{40,41} or CS combined with other materials, as we have

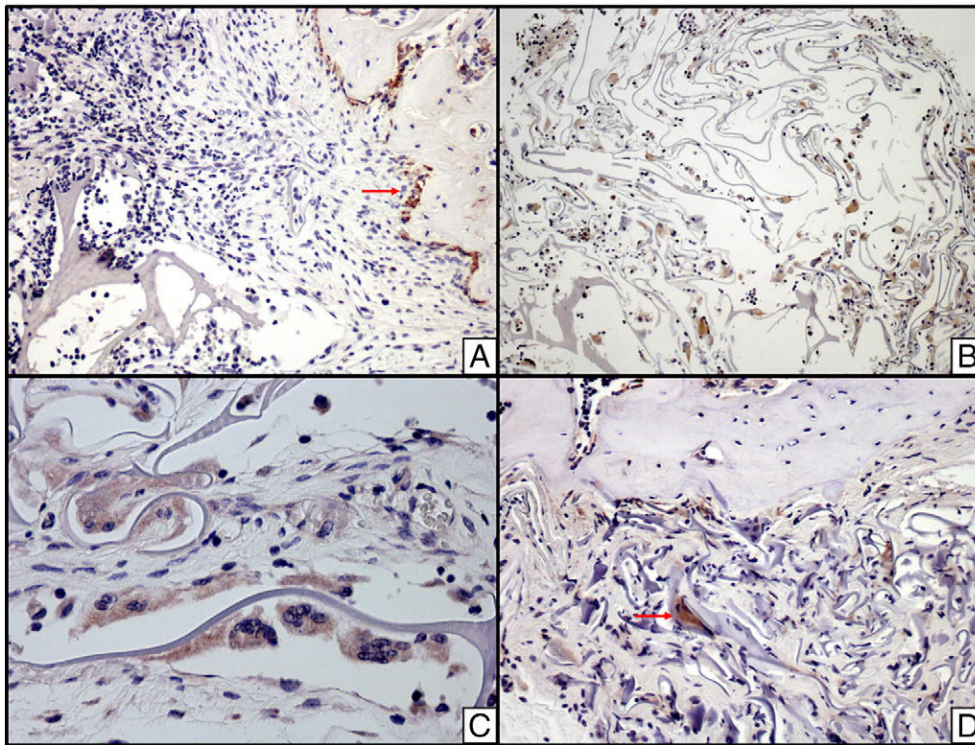


Figure 5. Immunohistochemical staining of OCN of the SiO₂ NPs/CS scaffolds over time. (A) 2 weeks. OCN expression in osteoblasts limited to the bone/scaffold interface (arrow) IHQ, 20×. (B) 4 weeks. There are several osteoblasts with strong positivity to OCN near to the CS threads IHQ, 10×. (C) 4 weeks. Positive staining for OCN in multinucleated cells compatible with osteoclasts IHQ, 40×. (D) 8 weeks. Positive staining for OCN with more multifocal and sparse positive cells (arrow) IHQ, 40×.

performed, such as alginate,⁴² hydroxyapatite,⁴³ hyaluronic acid,⁴⁴ polyethylene oxide and bioactive glasses³⁹ or silica nanoparticles²² in order to support compression and tension forces mediated by CS and at the same time to enhance its mechanical strength thanks to the addition of these materials.^{22,45}

Our work showed the biocompatibility of 3D CS scaffolds loaded with silica nanoparticles promoting *in vitro* cell proliferation and the formation of osteoblastic spheroids, which was not observed in other 3D scaffolds based on PCL or collagen, pointing towards the suitability and susceptibility of our nanocomposites to be colonized by those cells. The formation of spheroids has been highlighted as a leading event in the promotion of tissue regenerative processes such as the healing of injured tendons with equine umbilical cord-derived mesenchymal stem cells.⁴⁶ The link between the formation of rabbit corneal keratocytes spheroids and CS degree of deacetylation was demonstrated to be dependent on its surface roughness and stiffness.⁴⁷ In this sense, the link between DD and cell adhesion and differentiation has been widely reported.^{14,25,48,49} Those previous results show that a low DD is the most suitable characteristic, though the formation of osteoblast-like spheroids has also been recorded at moderate DD (49%) which would indicate that the amount of amine groups in the scaffold promotes electrostatic interactions between CS and cell proteoglycans favoring cell adhesion.²⁵ Accordingly, our studies have shown the spontaneous formation of osteoblastic spheroids

in vitro together with osteoinductive and osteoconductive effects *in vivo* using high DD CS (89%). On the other hand, scaffolds' ideal porosity is also a controversial issue in bone regeneration, though mean values of pore diameter higher than 150 μm have been pointed as required for the achievement of bone tissue growth, a value which is in the same range as our scaffolds. However, not only porosity is relevant in bone repair, with the material used in the scaffold and pore interconnection also being crucial.²⁵

In vivo, our 3D scaffolds demonstrated the high efficiency of CS as osteoinductive and osteoconductive material after implantation in mice calvaria defects promoting the scaffold colonization by osteoblasts after four weeks of implantation. Furthermore, the neovascularization and the evidence of mineralization together with the presence of osteoclasts eight weeks after the implantation of the scaffold are promising evidences for the application of CS scaffolds in bone regeneration. CSs combined with silk fibroin and hydroxyapatite in nanofibrous membranes have also been shown as effective scaffolding for bone formation in an *in vivo* subcutaneous mice model showing mineralization and OCN expression at the same time points tested in our study (4 and 8 weeks) though these results are attributed to the combination of the three compounds and to the presence of mesenchymal stem cells pre-seeded in the scaffolds.³² Accordingly, the combination of CS with hydroxyapatite and alginate in *in vivo* bone repair in mice showed close results after 4 and 8 weeks of implantation.⁵⁰ The addition of

growth factors, such as the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), to silk fibroin/CS scaffolds, in order to induce osteogenesis in a rabbit *in vivo* model, displayed good results regarding biocompatibility, mineralization and osteoconductivity after 8 weeks of the implantation, though the effects of CS alone were not studied.⁵¹ BMP-2 has been added to CS-alginate scaffolds in a rat model of critical size calvaria defect showing almost 72% of defect closure and osteogenesis after 16 weeks as well as a good ability to promote differentiation of mesenchymal stem cells.⁵²

Tissue engineering is a promising tool in bone regeneration as an alternative to bone transplantation. CS scaffolds may be considered as a potential approach because of their reduced immune response, high biocompatibility and bactericidal effects. Our work shows the great potential of CS as an effective tool in tissue engineering enabling cell colonization of the scaffold *in vivo* and promoting mineralization and bone formation.

Acknowledgments

We thank the HistoPathology Core Unit of the Spanish National Cancer Research Centre (CNIO) for immunohistochemistry staining of osteocalcin and the Pathological Anatomy and Microscopy Core Unit from IACS/IIS Aragon (Spain) for the tissue samples processing and H&E and Mallory staining. A. Regiel-Futyra would like to thank Dr. Klaudyna Śpiewak (Faculty of Chemistry, Jagiellonian University) for her excellent technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.007>.

References

- Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H* 2010;**224**(12):1329-43.
- Polo-Corales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol* 2014;**14**(1):15-56.
- Carletti E, Motta A, Migliaresi C. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods Mol Biol* 2011;**695**:17-39.
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 2012;**40**(5):363-408.
- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;**26**(27):5474-91.
- Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z, Verma V, Rashid H, Glogauer M. Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. *Materials (Basel)* 2015;**8**(9):5744-94.
- Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2011;**36**(8):981-1014.
- Yi H, Wu L-Q, Bentley WE, et al. *Biofabrication with Chitosan*; 2005.
- Zhang H, Neau SH. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 2001;**22**(12):1653-8.
- Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *J Microbial Biotechnol* 2009;**2**(2):186-201.
- Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smaghe Guy, Steurbaut W. *Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action*; 2003.
- Shigemasa Y, Minami S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996;**13**:383-420.
- Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects—an update. *J Pharm Pharmacol* 2001;**53**(8):1047-67.
- Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* 2001;**22**(3):261-8.
- Cai X, Tong H, Shen X, Chen W, Yan J, Hu J. Preparation and characterization of homogeneous chitosan-poly(lactic acid)/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering and evaluation of its mechanical properties. *Acta Biomater* 2009;**5**(7):2693-703.
- Levengood SKL, Zhang M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Chem B* 2014;**2**(21):3161.
- Olad A, Farshi Azhar F. The synergetic effect of bioactive ceramic and nanoclay on the properties of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite-montmorillonite scaffold for bone tissue engineering. *Ceram Int* 2014;**40**(7):10061-72.
- Venkatesan J, Qian ZJ, Ryu B, Ashok Kumar N, Kim SK. Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan—natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Carbohydr Polym* 2011;**83**(2):569-77.
- Sowjanya JA, Singh J, Mohita T, et al. Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. *Biointerfaces* 2013;**109**:294-300.
- Jugdaohsingh R. Silicon and bone health. *J Nutr Health Aging* 2007;**11**(2):99-110.
- Beck GR, Ha SW, Camalier CE, et al. Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. *Nanomedicine* 2012;**8**(6):793-803.
- Li K, Sun H, Sui H, et al. Composite mesoporous silica nanoparticle/chitosan nanofibers for bone tissue engineering. *RSC Adv* 2015;**5**(23):17541-9.
- Kavya KC, Dixit R, Jayakumar R, Nair SV, Chennazhi KP. Synthesis and characterization of chitosan/chondroitin sulfate/nano-SiO₂ composite scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol* 2012;**8**(1):149-60.
- Wiesmann HP, Nazer N, Klatt C, Szuwart T, Meyer U. Bone tissue engineering by primary osteoblast-like cells in a monolayer system and 3-dimensional collagen gel. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;**61**(12):1455-62.
- Amaral IF, Sampaio P, Barbosa MA. Three-dimensional culture of human osteoblastic cells in chitosan sponges: the effect of the degree of acetylation. *J Biomed Mater Res A* 2006;**76A**(2):335-46.
- Regiel A, Iruستا S, Kyzioł A, Arruebo M, Santamaria J. Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology* 2013;**24**(1):15101.
- Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci* 1968;**26**(1):62-9.
- Eap S, Ferrand A, Palomares CM, et al. Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering. *Biomed Mater Eng* 2012;**22**(1-3):137-41.
- Yamada H, Evans FG. *Strength of Biological Materials*. Huntington NY: Robert E. Krieger Pub; 1970.
- Jähn K, Richards RG, Archer CW, Stoddart MJ. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2010;**20**:149-61.
- Long MW, Kale S, Biermann S, Edwards C, Tarnowski C, Morris M. Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone. *Nat Biotechnol* 2000;**18**(9):954-8.
- Lai G-J, Shalmon KT, Chen J-P. Response of human mesenchymal stem cells to intrafibrillar nanohydroxyapatite content and extrafibrillar nanohydroxyapatite in biomimetic chitosan/silk fibroin/nanohydroxyapatite nanofibrous membrane scaffolds. *Nanomedicine* 2015;**10**:567-84.

33. Costa-Pinto AR, Correlo VM, Sol PC, et al. Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells seeded on melt based chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 2009;**10**(8):2067-73.
34. Jana S, Florczyk SJ, Leung M, Zhang M. High-strength pristine porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *J Mater Chem* 2012;**22**(13):6291.
35. Roosa SMM, Kemppainen JM, Moffitt EN, Krebsbach PH, Hollister SJ. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an *in vivo* model. *J Biomed Mater Res A* 2010;**92A**(1):359-68.
36. Shen H, Hu X, Yang F, Bei J, Wang S. The bioactivity of rhBMP-2 immobilized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds. *Biomaterials* 2009;**30**(18):3150-7.
37. Hofmann S, Hilbe M, Fajardo RJ, et al. Remodeling of tissue-engineered bone structures in vivo. *Pharm Biopharm* 2013;**85**(1):119-29.
38. Dong S, Sun J, Li Y, Li J, Cui W, Li B. Electrospun nanofibrous scaffolds of poly (l-lactic acid)-dicalcium silicate composite via ultrasonic-aging technique for bone regeneration. *Mater Sci Eng C* 2014;**35**:426-33.
39. Talebian S, Mehrali M, Mohan S, et al. Chitosan (PEO)/bioactive glass hybrid nanofibers for bone tissue engineering. *RSC Adv* 2014;**4**(90):49144-52.
40. Lee JY, Nam SH, Im SY, et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J Control Release* 2002;**78**(1–3):187-97.
41. Muzzarelli RA, Zucchini C, Ilari P, et al. Osteoconductive properties of methylpyrrolidinone chitosan in an animal model. *Biomaterials* 1993;**14**(12):925-9.
42. Kuo CK, Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 2001;**22**(6):511-21.
43. Ji J, Tong X, Huang X, et al. Sphere-shaped nano-hydroxyapatite/chitosan/gelatin 3D porous scaffolds increase proliferation and osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells from gingival fibroblasts. *Biomed Mater* 2015;**10**(4):45005.
44. Fakhari A, Berkland C. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomater* 2013;**9**(7):7081-92.
45. Saravanan S, Leena RS, Selvamurugan N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Biol Macromol* 2016;**93**(Part B):1354-65.
46. Griffon DJ, Cho J, Wagner JR, et al. Effects of hypoxia and chitosan on equine umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* 2016;**2016**:1-11.
47. Chou SF, Lai JY, Cho CH, Lee CH. Relationships between surface roughness/stiffness of chitosan coatings and fabrication of corneal keratocyte spheroids: effect of degree of deacetylation. *Biointerfaces* 2016;**142**:105-13.
48. Prasitsilp M, Jenwithisuk R, Kongsuwan K, Damrongchai N, Watts P. Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. *J Mater Sci Mater Med* 2000;**11**(12):773-8.
49. Amaral IF, Lamghari M, Sousa SR, Sampaio P, Barbosa MA. Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: the effect of the degree of acetylation. *J Biomed Mater Res A* 2005;**75A**(2):387-97.
50. Jin HH, Kim DH, Kim TW, et al. In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan–alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biol Macromol* 2012;**51**(5):1079-85.
51. Tong S, Xu DP, Liu ZM, Du Y, Wang XK. Synthesis of and in vitro and in vivo evaluation of a novel TGF- β 1-SF-CS three-dimensional scaffold for bone tissue engineering. *Mol Med* 2016;**38**(2):367-80.
52. Florczyk SJ, Leung M, Li Z, Huang JI, Hopper RA, Zhang M. Evaluation of three-dimensional porous chitosan-alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications. *J Biomed Mater Res A* 2013;**101**(10):2974-83.

Chapitre 2

Propriété ostéogénique d'un implant nanofibreux synthétique associé à des sphéroïdes de cellules mésenchymateuses humaines

Article 2

- ❖ Wagner, Q., Keller, L., Offner, D., Eap, S., Musset, A.-M., Arruebo, M., Kelm, J.M., Schwinté, P., and Benkirane-Jessel, N. (2015). Integrating Microtissues in Nanofiber Scaffolds for Regenerative Nanomedicine. *Materials* 8, 6863–6867.

Article 3

- ❖ Wagner, Q., Keller, L., Idoux-Gillet, Y., Eap, S., Brasse, D., Schwinté, P., Arruebo, M., and Benkirane-Jessel, N. (2017). Nanoengineered implant as a new platform for regenerative nanomedicine using 3D well-organized human cell spheroids. *Int. J. Nanomedicine* 12, 447–457.

1. Contexte et objectif

Les techniques d'ingénierie tissulaire utilisant les cellules impliquent souvent l'emploi de biomatériaux tridimensionnels avec des propriétés structurelles et mécaniques proches des tissus physiologiques. Nous avons développé au sein du laboratoire une membrane synthétique nanostructurée à base de poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (Ferrand et al., 2014) par la technique de l'électrospinning. Cette technique peut produire des membranes 3D allant jusque 1 centimètre, possédant une porosité adéquate ainsi que des pores interconnectés. Cette membrane tridimensionnelle a montré son potentiel ostéogénique une fois équipée de nanoréservoirs contenant un facteur de croissance (BMP-7) dans les études *in vitro* et *in vivo* (Eap et al., 2015a). Aujourd'hui, la plupart des matériaux tridimensionnels combinent un nombre important de cellules pour maximiser les interactions cellules/biomatériau, mais dans les tissus, les interactions cellules-cellules sont celles qui sont les plus importantes (Kale et al., 2000).

L'objectif de cette étude a été de combiner un biomatériau nanostructuré synthétique tridimensionnel (PCL) et des sphéroïdes, microtissus sphériques ostéoblastiques humains primaires. Cette stratégie « double tridimensionnelle » pourrait permettre d'augmenter l'efficacité thérapeutique des dispositifs médicaux implantables sans utilisation de molécules bioactives.

2. Résultats et discussion

L'implant de PCL 3D a été produit par la technique d'électrospinning, permettant la superposition de fines couches nanofibreuses. Cette structure tridimensionnelle conduit à une grande macroporosité distribuée de manière hétérogène entre les couches déposées. Les nanofibres offrent une grande surface grâce à leur faible diamètre, ce qui permet de se rapprocher de la MEC du compartiment osseux. De plus, la distribution aléatoire des nanofibres permet une distribution aléatoire de tailles de pores. Ces caractéristiques sont nécessaires pour la régénération osseuse, imitant la topographie micrométrique et nanométrique. Ainsi, le matériau 3D offre une grande surface favorisant l'adhésion cellulaire, la croissance cellulaire et la vascularisation après implantation *in vivo*. Cependant, pour accélérer le processus de régénération du tissu osseux, nous y avons ajouté des cellules.

L'objectif de l'étude a été d'accélérer la minéralisation osseuse dans un modèle *in vitro* et *in vivo*. Les cellules utilisées dans cette étude sont les ostéoblastes humains primaires (hObs).

Ces cellules vont minéraliser et exprimer des marqueurs spécifiques après ensemencement dans l'implant tridimensionnel. La formation osseuse par ingénierie tissulaire *in vitro* peut être divisée en deux étapes : la colonisation cellulaire de l'implant et la maturation tissulaire à l'intérieur de celui-ci. Ainsi, la capacité d'infiltration cellulaire des hObs a été analysée. Nous avons comparé un ensemencement de cellules isolées et de MT après 21 jours. Un marquage de minéralisation par coloration au rouge d'alizarine a révélé une formation osseuse au cœur de l'implant ensemencé par les MT *in vitro*. La minéralisation ainsi que l'infiltration cellulaire ont été limitées pour les implants ensemencés par les cellules hObs isolées.

Ces implants ont également été testés *in vivo* dans un modèle de défaut osseux en calvaria. Après 4 semaines d'implantation, les résultats démontrent clairement que la minéralisation est plus importante en utilisant des implants ensemencés par des MT.

Nous avons comparé l'utilisation de MTs seuls par rapport à ces même MTs ensemencés sur l'implant tridimensionnel de PCL (« double 3D »). Une analyse par spectrophométrie à rayon X de dispersion d'énergie (EDS pour energy dispersive X-ray spectrophotometry), couplée à la microscopie électronique à balayage a été utilisée pour étudier les cinétiques de calcification. Plusieurs particules aléatoires, des implants testés, ont été collectées pour réaliser une cartographie représentative des échantillons. Cette cartographie a indiqué une claire colocalisation du calcium et du phosphore, indiquant la présence d'os néoformé et après 4 semaines, le ratio Ca/P déterminé est de 0,768 pour la condition contrôle (défaut osseux uniquement), de 1,101 pour les MT seuls, et de 1,701 pour les MT ensemencés sur l'implant tridimensionnel (double 3D). Une analyse par micro-CT a permis de monitorer la fermeture du défaut osseux, accéléré pour les MT ensemencés sur l'implant. Les résultats montrent donc une très nette amélioration de la régénération osseuse grâce à la stratégie double 3D sans ajout de facteur de croissance.

Deux stratégies sont utilisées pour augmenter l'efficacité de l'ingénierie tissulaire, la première est l'utilisation de cellules, la seconde étant basée sur l'utilisation de facteurs de croissance. L'équipe a précédemment publié la preuve qu'une matrice tridimensionnelle était nécessaire pour augmenter la régénération osseuse, car des capsules relarguant du BMP-2 combinées à des cellules souches embryonnaires, n'induisaient pas de formation d'os sans un support tridimensionnel assuré par un implant, alors que son ajout permettait cette induction (Facca et al., 2010).

Dans ce travail, l'augmentation de la vitesse de minéralisation osseuse grâce à l'implant constitué de deux structures tridimensionnelles (PCL 3D et MTs) peut s'expliquer par la formation de MTs d'ostéoblastes avant leur ensemencement sur l'implant, accélérant la sécrétion de MEC spécifique au tissu osseux. De plus, cette stratégie a permis d'accélérer la minéralisation, qui n'a pas été corrélée avec la prolifération cellulaire. Cette observation est en accord avec le fait, que la prolifération cellulaire n'est pas nécessairement le moteur de l'infiltration cellulaire et la maturation tissulaire, et qu'elle dépend aussi de la migration tissulaire (Yoon et al., 2016). De plus, la maturation et la minéralisation arrivent après la phase proliférative quand les cellules quittent le cycle prolifératif. Les MT permettent un arrêt de la prolifération par une inhibition de contact cellulaire, pour entrer directement en phase de maturation, permettant une accélération de la minéralisation. La minéralisation des ostéoblastes nécessite des contacts entre les cellules, mais aussi entre les cellules et la matrice. Par cette double stratégie, les deux contacts sont amplifiés permettant une accélération de la minéralisation.

3. Conclusions

Les biomatériaux nanostructurés permettent d'être moins invasifs, offrant une diminution du temps de convalescence et une diminution des risques d'infection post-opératoire ou de complications. Le dispositif associant une matrice 3D à des cellules organisées en microtissus a permis une formation osseuse accélérée aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Ce concept « double 3D » pourrait être étendu à la régénération d'autres organes, tels le cœur ou la peau par exemple.

Communication

Integrating Microtissues in Nanofiber Scaffolds for Regenerative Nanomedicine

Laetitia Keller^{1,2,†}, Quentin Wagner^{1,2,†}, Damien Offner^{1,2,3,†}, Sandy Eap^{1,2,†}, Anne-Marie Musset^{2,3}, Manuel Arruebo⁴, Jens M. Kelm⁵, Pascale Schwinté^{1,2,*} and Nadia Benkirane-Jessel^{1,2,3,*}

Received: 26 August 2015 ; Accepted: 28 September 2015 ; Published: 9 October 2015

Academic Editor: Dusan Losic

- ¹ INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), “Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine” laboratory, UMR 1109, Faculté de Médecine, Strasbourg Cedex F-67085, France; lkeller@unistra.fr (L.K.); wagner.quentin@gmail.com (Q.W.); doffner@unistra.fr (D.O.); sandyeap@yahoo.fr (S.E.); musset@unistra.fr (A.-M.M.)
 - ² Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 place de l’Hôpital, Strasbourg F-67000, France
 - ³ Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), Strasbourg F-67000, France
 - ⁴ Department of Chemical Engineering and Aragon Nanoscience Institute, University of Zaragoza, C/Mariano Esquillor, s/n, Zaragoza 50018, Spain; arruebom@unizar.es
 - ⁵ InSphero AG, Wagistrasse 27, Schlieren 8952, Switzerland; jens.kelm@insphero.com
- * Correspondences: nadia.jessel@inserm.fr (N.B.-J.); pschwinte@unistra.fr (P.S.);
Tel.: +33-368-853-376 (N.B.-J.)
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: A new generation of biomaterials focus on smart materials incorporating cells. Here, we describe a novel generation of synthetic nanofibrous implant functionalized with living microtissues for regenerative nanomedicine. The strategy designed here enhances the effectiveness of therapeutic implants compared to current approaches used in the clinic today based on single cells added to the implant.

Keywords: nanofibrous implant; microtissues; regenerative nanomedicine; bone regeneration

1. Introduction

Bone regeneration is a complex, well-orchestrated physiological process, which occurs during normal healing of fractures, and is involved in continuous remodeling throughout adult life. In the clinic, bone regeneration can be required in large quantities [1], such as for skeletal reconstruction of large bone defects resulting from trauma, tumor resection or cases in which the regenerative process is compromised (non-unions, osteoporosis). Current processes promoting bone-regeneration, including the free fibula vascularized graft, autologous bone graft, allograft implantation, and use of growth factors are unsatisfactory as they induce insufficient quantities of bone [2]. Current cell-based tissue engineering techniques often involve the use of 3D scaffold materials with appropriate mechanical and structural properties, to trigger the regenerative response of cells. Such scaffolds have been developed through various fabrication techniques [3] (electrospinning, microfabrication, lithography, etc.).

The key for a clinically transferable tissue engineering approach is the fast maturation of the tissue throughout the whole scaffold to support healing processes as shown for the bone, or to replace dysfunctional tissue. Most 3D models combine a small number of cells with a large amount of scaffold (natural or synthetic), maximizing cell-to-scaffold interactions, but in most *in vivo* tissues, cell-to-cell interactions are the most important [4]. The use of cell microtissues without external extracellular

matrix is largely used for drug screening however, for regenerative medicine, single cells combined with scaffolds are still the predominant dogma.

Here we report a novel approach in bone tissue engineering leading to bone induction, combining nanofibrous poly(ϵ -caprolactone) (PCL) scaffolds [5,6] together with preformed tridimensional bone microtissues from osteoblasts.

2. Results and Discussion

A 700 μm thick electrospun PCL nanofibrous scaffold was manufactured to generate the tissue engineered bone graft (Figure 1). Electrospun nanofibers have an extremely high specific surface area, due to small fiber diameters, mimicking the collagen extracellular matrix [7].



Figure 1. Light micrograph of 700 μm thick PCL (poly(ϵ -caprolactone)) electrospun-nanofiber scaffold.

Our aim was to investigate the capacity of osteoblasts cultivated as 3D microtissues to colonize the thick matrix and to lead to mineralization (bone formation). Thus, we followed *in vitro* the cell infiltration potency of osteoblasts (OB) microtissues seeded on the scaffold, by fluorescence confocal microscopy, and traced mineralization through Alizarin Red staining histology.

After microtissue adherence onto the scaffold, cells began to spread after 3 days of culture, exhibiting osteoblast migration along the nanofibers (Figure 2).

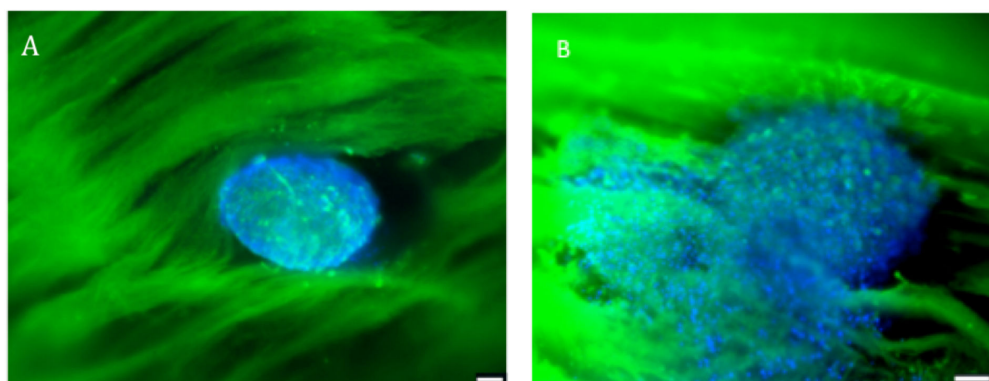


Figure 2. Fluorescence confocal microscopy visualization of human primary osteoblasts microtissues seeded onto the scaffold, and stained with DAPI (showing DNA) and PLL-FITC (showing the nanofibers). (A) Microtissue nesting in the scaffold at day 0; (B) Microtissue at day 3 of *in vitro* culture in the scaffold. Scale bar = 100 μm . $n = 3$.

Staining by Alizarin Red to check the formation of neo-calcified tissue revealed high bone formation within the core of the thick PCL scaffold seeded with OB microtissues after 28 days (Figure 3).

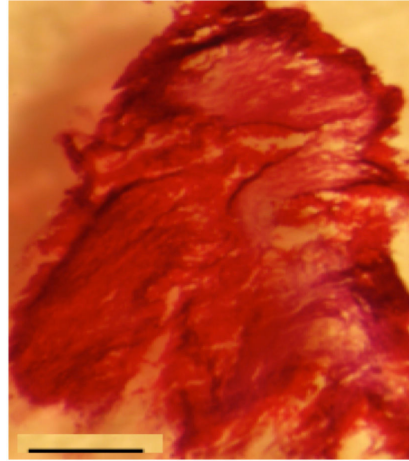


Figure 3. Alizarin Red staining of PCL scaffold seeded with Osteoblasts microtissues: *In vitro* bone induction and mineralization on the PCL electrospun nanofibers seeded with microtissues after 28 days of *in vitro* culture. Scale bar = 1 mm. $n = 3$.

In vivo, subcutaneous implantation of the hybrid 3D implant was performed on nude mice. Implants were recovered after four weeks, cut in sections and stained with Mallory coloration. The histological sections clearly demonstrate that cells originating from the microtissues migrated and colonized the whole scaffold (Figure 4).

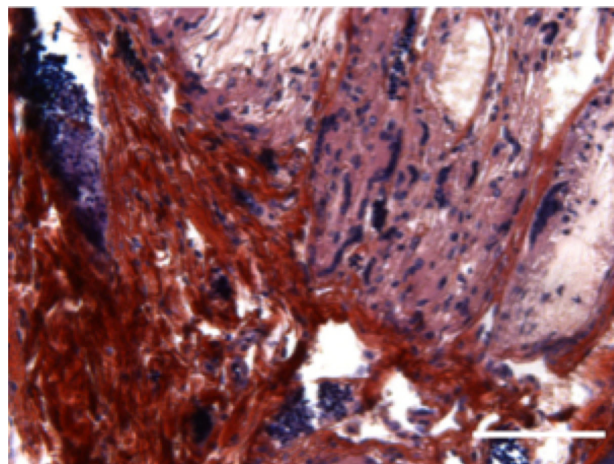


Figure 4. Subcutaneous implantation of hybrid 3D electrospun-nanofibrous implant in mice leads to bone formation: *In vivo* bone induction in PCL 3D scaffold with human primary osteoblasts microtissues 4 weeks after subcutaneous implantations in nude mice. Scale bar = 100 μm . $n = 5$ mice.

Here we demonstrate that combining two conceptual different tissue-engineering strategies, PCL nanofibers scaffolds (3D biomaterial) seeded with bone microtissues (3D cell aggregate), leads to bone tissue formation observed *in vitro* and *in vivo*, after subcutaneous implantation, without even any need of growth factors.

Some recent study has shown that the release of BMP-2 growth factor from capsules together with injection of embryonic stem cells without the presence of a hydrogel matrix did not induce

bone regeneration, but it did when a scaffold was additionally implanted [8]. Recently, in our group, we have shown that by using the present thick 3D PCL nanofibrous scaffold, combined with single cells, the cell colonization and mineralization of the implant occur but without any bone induction in the core of the implant (submitted manuscript). Thus the implantation of this kind of scaffold is not enough in the case of large lesions, even with injection of single cells: To favor maturation of the tissue throughout the entire scaffold, the optimization of cell-cell-interactions (and not solely cell-scaffold interactions) as they prevail in natural tissues, is an important factor [3,9]. In consequence, the second strategy consisting in seeding cell microtissues in the scaffold appears most relevant.

3. Experimental Section

Chemicals. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL), analytical grade (MW 80000), was obtained from Perstorp (Sweden). PCL was dissolved in a mixture of dichloromethane/dimethylformamide (DCM/DMF 40/60 v/v) at 27% w/v and was stirred overnight before use.

Electrospinning. A standard electrospinning set-up apparatus EC-DIG purchased from IME Technologies (Eindhoven, Netherlands) was used to fabricate the PCL 3D nanofibrous scaffolds. The PCL solution was poured into a 5 mL syringe and ejected through a 21G needle of 0.8 mm outer diameter at a flow rate of 1.2 mL/h via a programmable pump (ProSense). The electrospun jet was focused by the use of a poly(methyl methacrylate) (PMMA) 2.5 mm thick mask drilled with a hole (diameter of 25 mm) placed over the conductive collector. The collector was placed at a 16 cm distance from the needle. A voltage of +15 kV was applied on the needle, whereas -5 kV was applied on the collector during the electrospinning process.

Cell culture. Human primary osteoblasts were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany). Osteoblasts were cultured in a specific osteoblast growth medium together with complement and $50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ penicillin, $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ streptomycin, $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ amphotericin B. The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . When cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin and sub-cultured.

Microtissue culture. Osteoblasts were seeded in GravityPLUS™ plate (InSphero AG, Zürich, Switzerland) to produce microtissues. 1×10^4 cells per microtissue were seeded in these plates and cultivated during 5 days. For bone formation, osteoblast microtissues were then seeded onto the PCL 3D scaffolds for *in vitro* studies and *in vivo* implantations.

***In vitro* analysis of mineralization using Alizarin Red S staining.** Alizarin Red S powder was dissolved in distilled water at a concentration of 2 g for 100 mL. The samples were incubated in the Alizarin Red solution for 20 min and then rinsed with distilled water several times. The samples were embedded in Tissue-Tek OCT™ Compound to be cut in sections ($35 \mu\text{m}$) with a cryostat (LEICA JUNG CM 3000). The sections were then observed under the optical microscope (LEICA DM 4000 B). Number of experiments $n = 3$.

Confocal microscopy. Human osteoblast single cells or microtissues were seeded onto PCL 3D electrospun scaffolds and cultivated for 1 and 21 days before fixation with PFA 4%. Then, cell nuclei were stained with DAPI and nanofibers were stained with PLL-FITC. Fluorescence microscopy was performed with a confocal microscope Zeiss LSM 700.

***In vivo* subcutaneous implantation in nude mice.** All procedures were designed in compliance with the recommendations of the European Union (2010/63/EU) for the care and use of laboratory animals. Ethics statement: Experiments followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU), and were performed according to authorized investigator N. Jessel (Director of the “Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine” Team), holder of a personal license from “Préfecture du Bas-Rhin” (No. 67-315), who oversaw experiments done on mice. All experiments were done in the “Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine de Strasbourg” with the approval number: A 67-482-35 from the Veterinary Public Health Service of the “Préfecture du Bas-Rhin”, representing the French Ministry of Agriculture, Department of Veterinary Science. All surgery was performed under Ketamine and Xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

The study was run with Nude male mice (Crl: NIH-Foxn1^{nu} Charles River, France) 6 weeks of age. The mice were anesthetized with an intra-peritoneal injection of 100 mg/kg of ketamin (VIRBAC Santé Animale, Centravet, Italy) and 10 mg/kg of Xylazin (Rompun[®] 2%, Centravet, Italy). Mice were anesthetized and implanted with a PCL 3D implant seeded with osteoblast microtissues. The samples were implanted between skin and muscles behind the mice ears. $n = 5$ mice were used. After 4 weeks of implantation, mice were sacrificed and the samples extracted for analysis.

Histological analysis. The implants were fixed with Bouin Hollande solution during 2 days. Then, they were dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations, cleared with toluene and embedded in paraffin wax. Sections were cut at 7 μm using a sledge microtome and mounted on glass slides. After the removal of paraffin wax, sections of subcutaneous implants were stained using Mallory coloration during 2 days. Number of experiments $n = 3$.

4. Conclusions

Here we report the development and therapeutic impact of advanced bone implants combining nanostructured biomaterials with cell microtissues. We suggest reconsidering the current tissue-engineering approach, by seeding cell microtissues instead of single cells onto scaffolds. By using nanofibrous scaffolds, we believe that this strategy could lead to a new generation of higher-quality engineered tissues, with accelerated production times and potentially lower costs. This concept is not limited to bone tissue engineering and might operate also for other tissues such as skin tissue engineering.

Acknowledgments: This work was supported by the project NanoOSCAR from the “Agence Nationale de la Recherche, ANR”. N.J., L.K., P.S. is indebted to SATT Conectus for the financial support. We are indebted to Hervé Gegout for his help on histology. We are indebted to Arielle Ferrandon for her technical support.

Author Contributions: Laetitia Keller, Quentin Wagner, Damien Offner and Sandy Eap have equally contributed to this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Salgado, A.J.; Coutinho, O.P. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 743–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Chatterjea, A.; Meijer, G. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells Int.* **2010**, *2010*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kim, H.N.; Jiao, A. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 536–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kale, S.; Biermann, S. Three-dimensional cellular development is essential for *ex vivo* formation of human bone. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 954–958. [[PubMed](#)]
5. Hench, L.L.; Polak, J.M. Third-generation biomedical materials. *Science* **2002**, *295*, 1014–1017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mendoza-Palomares, C.; Ferrand, A. Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* **2012**, *6*, 483–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sell, S.; Barnes, C. Extracellular matrix regenerated: Tissue engineering via electrospun biomimetic nanofibers. *Polym. Int.* **2007**, *56*, 1349–1360. [[CrossRef](#)]
8. Facca, S.; Cortez, C. Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. *Proc. Natl. Anal. Sci. USA* **2010**, *107*, 3406–3411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kelm, J.M.; Fussenegger, M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 195–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Nanoengineered implant as a new platform for regenerative nanomedicine using 3D well-organized human cell spheroids

Laetitia Keller^{1,2,*}Ysia Idoux-Gillet^{1,2,*}Quentin Wagner^{1,2,*}Sandy Eap^{1,2,*}David Brasse³Pascale Schwinté^{1,2}Manuel Arruebo⁴Nadia Benkirane-Jessel^{1,2}

¹INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), "Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine"

Laboratory, UMR 1109, Faculté de Médecine, FMTS, ²University of Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, ³CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), UMR 7178, IPHC (Hubert Curien Multidisciplinary Institute), Strasbourg, France; ⁴Department of Chemical Engineering, INA (Aragon Nanoscience Institute), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

*These authors contributed equally to this work

Abstract: In tissue engineering, it is still rare today to see clinically transferable strategies for tissue-engineered graft production that conclusively offer better tissue regeneration than the already existing technologies, decreased recovery times, and less risk of complications. Here a novel tissue-engineering concept is presented for the production of living bone implants combining 1) a nanofibrous and microporous implant as cell colonization matrix and 2) 3D bone cell spheroids. This combination, double 3D implants, shows clinical relevant thicknesses for the treatment of an early stage of bone lesions before the need of bone substitutes. The strategy presented here shows a complete closure of a defect in nude mice calvaria after only 31 days. As a novel strategy for bone regenerative nanomedicine, it holds great promises to enhance the therapeutic efficacy of living bone implants.

Keywords: bioengineering, implants, osteoblasts, matrix mineralization, microtissues

Introduction

In the last two decades there has been considerable development in tissue repair, through tissue-engineering techniques and sophisticated biomaterials. These developments do not only aim at producing substitutes for damaged organs but also participate in the development of regenerative medicine in order to restore tissue function. In particular, there has been increasing interest in developing smart scaffolds mimicking the extracellular matrix, in order to favor long-term cell grafting.¹ Structural design of biomimetic scaffolds has been improved at the micro- and nanoscale using designed nanostructures, from nanofibers,^{2,3} to nanogrooves,^{4,5} and using different nanomaterials such as carbon nanotubes^{6,7} and graphene material.^{8,9} Nanotechnologies like nanoparticles or nanoreservoirs have also been introduced for the bioactivation of the scaffolds through the controlled release of bioactive therapeutics.¹⁰⁻¹⁵

During the consolidation of a fracture, or during the continuous physiological bone remodeling, bone regeneration takes place. Medical applications for tissue-engineered (TE) bone implants can be divided into four categories. 1) Bone fracture: 10% of the bone fractures (1.5 million patients per annum worldwide) cannot be treated by standard therapies (autogenous, allogeneic, and xenogeneic grafts) because the damaged sites are too large.¹⁶ 2) Spinal fusion: some bone tissue from the patient himself or from a donor, is combined with the natural bone formation to fuse the vertebrae. This procedure, by causing immobilization of the vertebrae, enables elimination of the pain caused by their abnormal motion.^{17,18} 3) Sinus lift: in dentistry the loss of upper back teeth results over time in some bone shrinkage or resorption in the corresponding area,

Correspondence: Nadia Benkirane-Jessel; Pascale Schwinté
INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), "Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine" Laboratory, UMR 1109, Faculté de Médecine, FMTS, F-67085, Strasbourg Cedex, France
Tel +33 3 68 85 3376
Email nadia.jessel@inserm.fr; pschwinte@unistra.fr

as a consequence, the sinuses will expand in the empty space left by the bone loss. A sinus lift is required to place a dental implant to provide the needed space for introducing additional bone in that area.^{19,20} 4) Alveolar ridge augmentations: these consist of surgical bone grafting procedures for patients suffering from bone loss in the upper jaw. The number of patients in this field amounts to approximately 4.5 million per annum worldwide.^{21–25} Among these clinical applications, some require the use of filling the defect by the means of bone substitutes to mimic mechanical properties of bone. The regenerative medicine domain aims to regenerate bone in the case of early lesions with biomaterials close to physiological environment of bone. These biomaterials will be used to prevent and to avoid the necessity of bone substitutes. In this case bone mechanical properties are not required.

In bone tissue engineering, natural biomaterials (such as collagen and cellulose) or synthetic ones (such as metals and ceramics) have been evaluated for their applicability to improve the bone healing process.²⁴ First-generation implants mostly comprised metal materials (eg, dental titanium implants) and were created to restore the function of the injured tissue. Unfortunately, over time they often led to inflammation and infection, were subject to joint loosening process, and failed to achieve proper cell adhesion. Later, a second generation of implant biomaterials emerged, on the basis of the use of well-tolerated nontoxic medical grade-labeled materials containing a bioactive component to induce a specific cell response, such as hip prostheses coated with the osteoconductive hydroxyapatite. However, such implants are not completely integrated within living tissues, as they do not induce efficient cell adhesion and are still subjected to detachment.²⁶ The third generation, now under investigation, focuses on hybrid and nanostructured materials. Those bioactive materials incorporate inert nanostructured scaffolds and living cells to engineer living biomaterials capable of guiding bone healing.²⁵

The bone regenerative nanomedicine market is a new niche applying biomimetic scaffolds, growth factors, and/or cells to restore living tissues in the case of small early lesions as preventive nanomedicine. In this manuscript we will describe the use of nanofibrous and microporous scaffolds and human primary bone cells. For the achievement of damaged tissue reconstruction and functional recovery, cell-based tissue-engineering therapies require the presence of 3D scaffolds to boost the regenerative potential of autologous primary cells or stem cells. These 3D scaffolds require perfectly defined tunable structural and mechanical properties to achieve this purpose. A large number of scientific researches have been focused on the development of 3D scaffolds for specific tissue applications, using fabrication techniques such as electrospinning, microfabrication,

lithography, or self-assembly.²⁷ Next-generation implants target robust, durable, and rapid tissue regeneration. The double 3D advanced implants reported here are 3D “nest-egg-like”, thick nanofiber-based implants seeded with 3D living human micro-tissues (MTs) rather than single cells. It has been established that the efficiency of 3D living cells in tissue engineering is related to their capacity to mimic the embryonic development, and reproduce physiological properties.^{28,29}

The actual needs of the regenerative medicine field are not only to increase the speed of bone regeneration but also to use non-animal-origin compounds. Collagen membranes clinically used today are unfortunately of animal origin. We report here a new approach in bone tissue regeneration resulting in a superior bone mineralization in a nude mice calvaria defect model, combining 3D nanofibrous poly(ϵ -caprolactone) (PCL) material (US Food and Drug Administration-approved synthetic polymer for clinical use)^{15,30} together with preformed well-organized 3D bone MTs derived from human primary osteoblasts (OBs). This sophisticated double 3D strategy could enhance the efficacy of therapeutic implants without adding bioactive molecules. By combining this 3D nanofibrous implant with preformed tridimensional bone MTs derived from OBs, we have recently reported in a short communication³¹ that it is possible to achieve a more efficient bone regeneration than when using just single cells. In this work we have characterized in detail the new bone formation with additional characterization techniques, to validate the concept.

Materials and methods

Electrospinning

The poly (ϵ -caprolactone) nanofibrous scaffolds were fabricated with a standard electrospinning apparatus (EC-DIG; IME Technologies, Geldrop, the Netherlands). PCL, analytical grade (Perstorp AB, Perstorp, Sweden) was dissolved in dichloromethane/dimethylformamide (40/60, v/v), 27% (w/v) and stirred overnight before use. The PCL solution (5 mL syringe) dispensed at a flow rate of 1.2 mL/h (ProSense pump) was ejected through a 21 G needle (0.8 mm outer diameter), undergoing an electric potential difference. The fiber collector was placed at 16 cm height from the needle, a voltage of +15 kV was applied on the needle, and –5 kV was applied on the collector during the electrospinning process. The electrospun fiber jet was projected into a localized hole (diameter of 25 mm) drilled in a poly(methyl methacrylate) mask (2.5 mm thick) placed over the conductive collector.³⁰

Scanning electron microscopy

The electrospun PCL scaffold was gold-coated (Edwards Sputter Coater) and examined under a scanning electron

microscope (SEM; Hitachi TM1000) operating in conventional mode (high vacuum).

Cell culture

OBs from PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany) were grown in a specific OB growth medium (PromoCell) containing supplement mix (PromoCell) and incubated at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂. Cells, when reaching sub-confluence, were harvested with trypsin and subcultured.

Microtissue culture

For the formation of microtissues (MTs), OB cells were seeded in GravityPLUS™ plates (InSphero AG, Zürich, Switzerland) at a density of 2.5×10⁵ cells/mL. Each MT was formed from 1×10⁴ cells and was grown for 5 days. For in vitro studies and in vivo implantations OB-MTs were then collected and seeded onto the PCL scaffolds.

Cell viability and proliferation

A total of 4×10⁴ OB single cells were seeded on top of PCL scaffolds deposited in 48-well plates (n=3) and four OB-MTs of 1×10⁴ cells each were seeded onto other PCL scaffolds for comparison (n=3). After 3 days of culture, the plates were incubated in 10% AlamarBlue®/Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) solution, in a humid atmosphere at 37°C and 5% CO₂. After 4 hours, 200 µL of incubation medium from each well was transferred to 96-well plates and measured at 570 and 630 nm to calculate the percentage of AlamarBlue reduction. The same protocol was applied again at 14 and 21 days to study cell proliferation.

In vitro mineralization analysis

After 28 days of culture, these samples were incubated for 20 minutes in Alizarin Red staining solution (2%, w/v) and rinsed several times with distilled water. The samples were then embedded in Tissue-Tek® optimum cutting temperature (OCT) Compound and cut in 35 µm thin sections using a cryostat (Leica Jung CM3000), for observation under optical microscope (Leica DM4000 B).

Confocal microscopy

OBs or OB-MTs were seeded onto PCL electrospun scaffolds and grown for 1, 3, or 21 days. After fixation of the samples with paraformaldehyde 4%, cell nuclei were stained using 200 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l., Lyon, France) and scaffold nanofibers were stained by soaking the scaffold in a fluorescent poly-lysine-fluorescein isothiocyanate solution.

Samples were examined with a confocal microscope Zeiss LSM 700.

Fluorescence microscopy

After their 5 days of growth in GravityPLUS™ plates (InSphero), OB-MTs were fixed with 4% paraformaldehyde solution, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and incubated in Alexa Fluor 546-conjugated phalloidin (Molecular Probes, Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) for F-actin staining and in 200 nM DAPI solution (Sigma-Aldrich Co.) for cell nuclei staining. Samples were observed under a fluorescence microscope (Leica DM4000 B).

Calvaria defects and in vivo implantation

Mice experiments were performed in accordance with the current European Union regulations (Directive 2010/63/EU), authorized and controlled by investigator Dr N Benkirane-Jessel (Director of the Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine team), holder of an appropriate license for this study from "Préfecture du Bas-Rhin" (number 67-315). All experiments were done in an approved laboratory (the "Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine de Strasbourg") with the approval number A 67-482-35 from the Veterinary Public Health Service of the "Préfecture du Bas-Rhin," on behalf of the French Ministry of Agriculture, Department of Veterinary Science. For tissue implantations, all surgery was performed under ketamine and xylazine anesthesia following established protocols, and all efforts were made to avoid or minimize animal suffering. Anesthesia was realized by intraperitoneal injection of ketamine 100 mg/kg (Virbac Santé Animale; Centravet, Nancy, France) and xylazine 10 mg/kg (Rompun,® [Bayer Healthcare, Division Animal Health, France] 2%). After anesthesia, 6-week-old nude mice (CrI: NIH-Foxn1nu; Charles River, L'Arbresle, France) underwent a surgical double implantation in the calvaria: on one side of the calvaria a PCL 3D implant (500 µm thick, 2 mm of diameter) seeded with hOB single cells, and on the other side a PCL 3D implant seeded with OB-MTs. The calvaria defects (500 µm deep and 2 mm in diameter) were drilled in the parietal zone of the skull using a sterile round burr, under irrigation of sterile saline solution, before implantation of the scaffolds. For the whole study, approximately 35 mice were used. After 4 weeks of implantation, mice were sacrificed by intraperitoneal injection of a deadly dose of ketamine and the implants were extracted for further analysis.

In vivo calcein injection

Injections of calcein in phosphate-buffered saline (10 mg/kg, Sigma-Aldrich Co.) were performed subcutaneously on mice,

on the third and tenth days before necropsy. Four weeks after the calvaria implantation, mice were sacrificed and implants extracted. The samples were embedded in Tissue-Tek OCT Compound, frozen at -20°C and cut in sections using a cryostat Leica Jung CM3000. To stain cell nuclei, thin sections were dipped in 200 nM DAPI solution (Sigma-Aldrich) 5 minutes. Sections were mounted using antifading medium and examined under fluorescence microscope.

SEM-EDS X-ray

The morphology and composition of the various scaffolds were analyzed using a field emission SEM (InspectTM F50; FEI, Hillsboro, OR USA) combined with an energy-dispersive X-ray spectrometer (EDS), to map the elemental composition of the samples. The sample surfaces were Pt-sputtered for allowing SEM observation and examined using an accelerating voltage of 10 kV and work distance of 10 mm. Statistical analyses were performed using analysis of variance test ($n=4$).

Micro-computed tomography (CT) analysis of calvaria defects in nude mice

Mice were scanned with a X-ray microtomography^{32,33} under light ketamine xylazine anesthesia. Five X-ray examinations were performed (day [D3], D10, D17, D25, and D31 after surgery). For each examination, the animal was centrally positioned in the view field and 768 radiographies were acquired over 360° at 40 kV and 200 mA. Images were reconstructed by means of a cone-beam reconstruction algorithm, producing real-time 3D imagery of the linear attenuation coefficient with a 0.05 mm isotropic voxel size. The threshold used to identify bone structures was set at 0.05 mm^{-1} . The volume of the new bone was evaluated as the number of voxels above the threshold inside a region of interest centered on the hole. Bone growth was given as the percentage of bone volume visualized compared to the first measurement performed at D3.

Results

3D porous polymeric material for bone regeneration

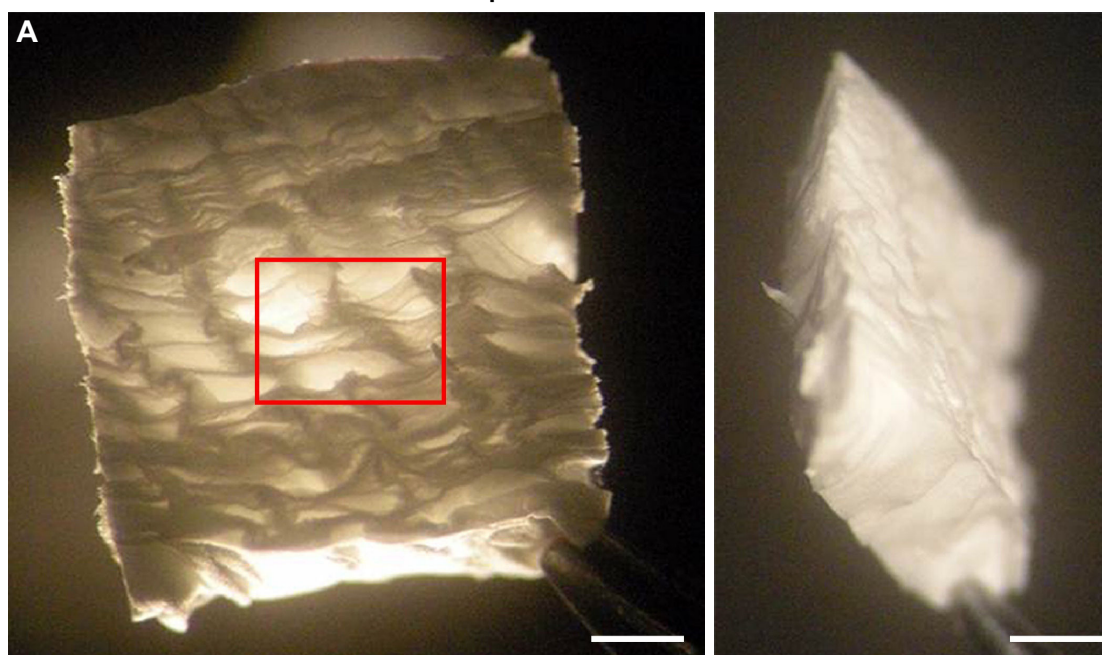
Recently, we reported an excellent bone regeneration after *in vivo* implantation in mice using electrospun PCL nanofibrous implants (50 μm thick), leading to a complete cell colonization and bone induction inside the implant.^{15,34} This 3D PCL scaffold^{15,30} was produced by the electrospinning technique (Figure 1A). The electrospun nanofiber scaffolds present superposition of thin nanofibrous layers (Figure 1B). This 3D structure leads to high-macroporosity heterogeneously

distributed between the stratified nanofibrous layers.³⁰ The nanofibers (Figure 1C) composing the superposed layers (Figure 1B) have a very high specific surface area per volume ratio, because of the small diameters of the fibers, resembling the collagen extracellular matrix³⁵ (Figure 1C and D). Random interactions between the different deposited nanofiber layers throughout the electrospinning process result in a random distribution of the pore sizes. These exceptional characteristics of nanofibrous implants are required properties for the targeted application¹⁵ as they mimic the micro- to nanoscale topography of the extracellular matrix, offering high surface area and porosity, thereby favoring cell adhesion, cell in-growth, and vascularization after *in vivo* implantation.^{36,37} However, to accelerate the bone healing process, a scaffold alone was not sufficient. For bone repair at the early stages, before it becomes necessary to fill the defect with a bone substitute, regenerative nanomedicine can repair and regenerate bone tissue by using not only scaffolds (synthetic or collagen membranes), but also growth factors and cells.

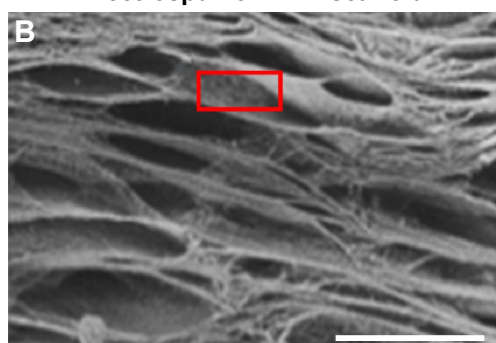
Double 3D implant to increase bone regeneration

For small lesions intended to be treated by regenerative medicine, and not requiring mechanical replacement of bone tissue, the use of a thick rather than thin PCL electrospun nanofibrous scaffold is not easy to develop for bone regeneration. Indeed, for such lesions a thick scaffold alone or seeded with single cells was not sufficient to achieve colonization deep within the implant. The objective of this study was to accelerate bone mineralization *in vitro* and *in vivo*. We used the hOB cells, which will mineralize and express specific markers after seeding on the 3D scaffold. For regenerative medicine, the important point is to have expression of differentiation markers allowing induction of bone formation and mineralization: the faster these markers are secreted, the faster bone is regenerated. Thus here, time of expression prevails on quantity to compare single cells and MTs. This study attempted to increase the speed of bone growth by using OB-MTs (Figure 2) instead of single cells (OBs) as commonly used today.³⁰ The formation of TE bone *in vitro* can be subdivided into two stages: (i) cellular colonization of the scaffold, and (ii) tissue maturation (bone formation) throughout the scaffold. Therefore, we evaluated the cell infiltration capability of single-cell OBs seeded onto the nanofiber scaffold (Figure 3B), and we compared it with OB-MT-seeded constructs after 21 days in culture (Figure 3E). Cell morphology, cell penetration depth, and bone formation were studied. Results did not reveal major

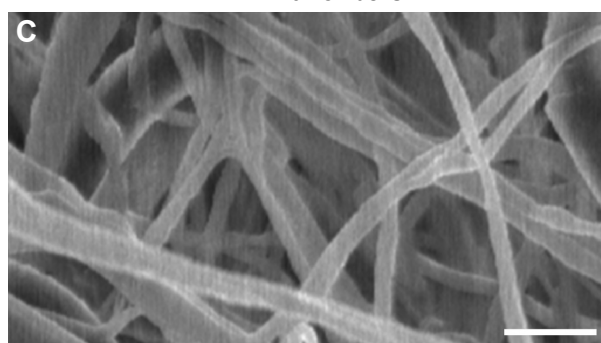
Electrospun 3D PCL scaffold



Electrospun 3D PCL scaffold



PCL nanofibers



D

Fiber diameter from C	Pore length from B	Pore height from B	Porosity from A
689.1 nm \pm 44.9	467.7 μ m \pm 44.9	183.3 μ m \pm 19.7	93.5%

Figure 1 Design of 3D electrospun nanofiber scaffold.

Notes: (A) Light micrographs of different views of PCL electrospun 3D scaffold showing a superposition of thin layers made of nanofibers and interconnected macroporosity. (B) SEM observation of the porosity and the thin superposed layers of electrospun PCL constituting the 3D PCL (magnification of inset in A). (C) SEM observation of PCL nanofibers constituting thin layers of scaffold A, showing the nanoscale diameter of fibers (magnification of inset in B). (D) Parameters of the biodegradable 3D PCL membrane: Fiber diameter, pore length and height, and porosity. Porosity was estimated by weight and volume of the sample. Scale bars = 1 mm (A); 500 μ m (B); 2 μ m (C).

Abbreviations: PCL, poly(ϵ -caprolactone); SEM, scanning electron microscope.

differences on the surface of the scaffold between OB-MT and OB groups (Figure 3A, B, D and E). However, staining for calcified tissue by Alizarin Red revealed bone formation in the core of the scaffolds seeded with OB-MTs at 21 days, *in vitro* (Figure 3F), whereas cell infiltration into the porous structure of the OB-seeded scaffold was rather limited, with

a penetration depth in the scaffold of only a few layers, and not present through the entire scaffold (Figure 3C). Actually, this observation may explain why there has been in the past successful treatment of small lesions but only limited success in fully repopulating thicker scaffolds.^{15,38} When seeding with OB-MTs instead of OB single cells,

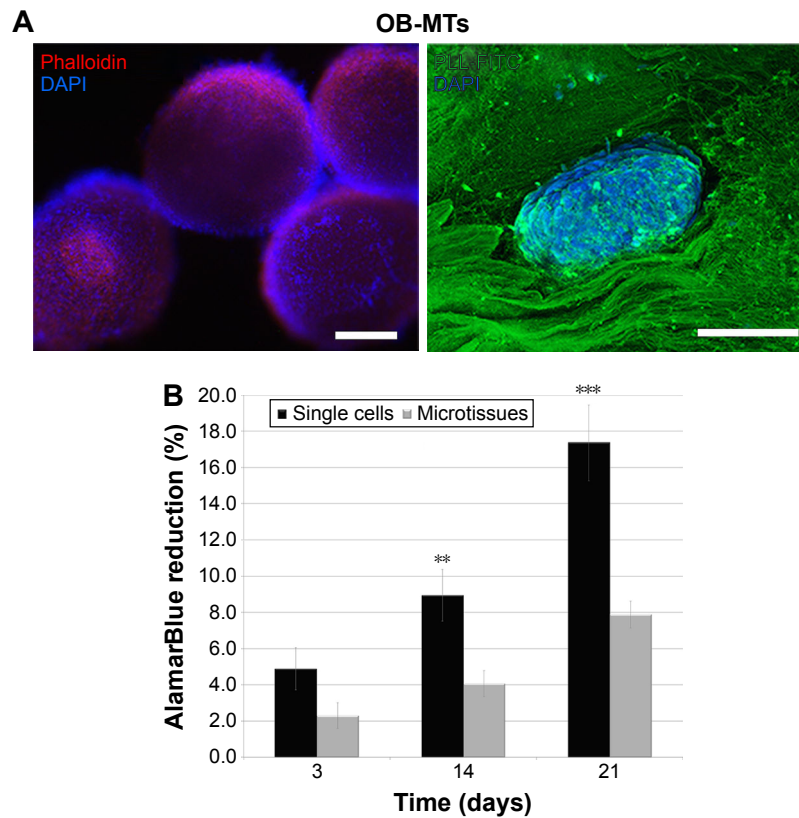


Figure 2 Osteoblastic microtissues formation and biocompatibility with nanofibrous PCL 3D.

Notes: (A) Left: fluorescence micrograph of OB-MTs stained in blue with DAPI (showing DNA) and in red with phalloidin (showing actin), just after their formation, before their seeding on 3D PCL. Right: confocal fluorescence microscopy visualization of OB-MTs one day after seeding onto the 3D PCL, and stained in blue with DAPI (showing nuclei) and in green with poly-lysine-FITC (on the nanofibers) leading to visualization of the living microtissue nesting in the implant. (B) Human osteoblasts proliferation seeded onto the 3D electrospun implant. In vitro proliferation of human osteoblasts after seeding with single cells (OBs) or microtissues (OB-MTs) on the thick nanofiber implant after 3, 14, and 21 days. Error bars (n=3), **P=0.01 and ***P=0.001 (analysis of variance). Scale bars =100 μm.

Abbreviations: DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; FITC, fluorescein isothiocyanate; OB-MTs, human primary osteoblast microtissues; PCL, poly(ε-caprolactone); PLL, poly-lysine.

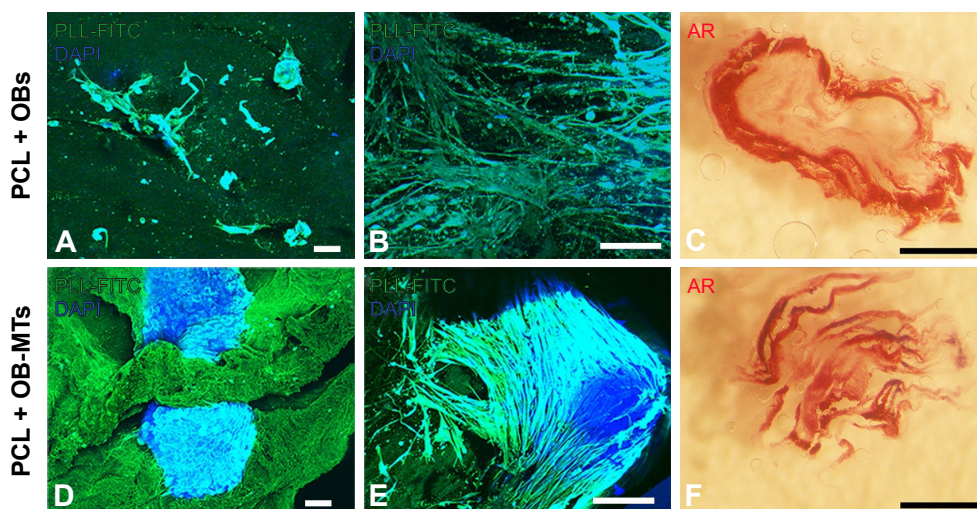


Figure 3 Behavior of osteoblasts seeded on 3D nanofibrous PCL as single cells or as microtissues.

Notes: Fluorescence confocal microscopy visualization (A, B, D, E) of OBs (A, B) and OB-MTs (D, E) grown onto the 3D PCL, and visualized in blue with DAPI (DNA staining) and green with poly-lysine-FITC (nanofibers staining) after 3 days (A and D) and 21 days (B and E) in vitro. (C, F) AR of bone induction and mineralization on the 3D thick PCL electrospun nanofiber seeded with OB single cells (C) and OB-MTs (F) after 21 days. Scale bars =100 μm (A, B, D, E), and 1 mm (C, F).

Abbreviations: DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; AR, Alizarin Red staining; FITC, fluorescein isothiocyanate; OB, human primary osteoblast; OB-MTs, human primary osteoblast microtissues; PCL, poly(ε-caprolactone); PLL, poly-lysine.

International Journal of Nanomedicine downloaded from https://www.dovepress.com/ by 130.79.98.126 on 21-Jun-2017 For personal use only.

infiltration and bone formation within the core regions of the scaffold were high, as shown by Alizarin Red stain, and interestingly, this was not a result of accelerated cell proliferation, as higher AlamarBlue reduction was observed for the OB-seeded scaffolds throughout the 21-day cell-culture time (more than double at day 21, Figure 2B). After MTs had adhered to the scaffold, cells even began to colonize it after 3 days of culture, showing OB migration along nanofibers (Figure 3A, B, D and E).

With a view to achieve robust bone formation using a thick nanofibrous bone-like implant, we evaluated a novel tissue-engineering concept combining living OB 3D MTs with PCL electrospun nanofiber scaffolds by implanting these grafts in nude mice after creating a calvaria defect. For bone regeneration studies, cranial reconstruction constitutes a very interesting technique, because calvaria is an anatomical bone part undergoing limited mechanical stress, unlike axial skeleton, which withstands compressive loads.^{39,40} A hole of 2 mm in diameter and 500 μm thick was drilled (bone defect) into the domelike superior portion of the mouse cranium. Thus, we investigated the potential improvement of bone formation through incorporation of living OB-MTs into the electrospun thick nanofibrous implant (double 3D strategy). We have followed in vivo bone mineralization onto PCL 3D scaffolds with single OBs (Figure 4A) compared to bone mineralization onto PCL 3D scaffolds with OB-MTs double 3D implants (Figure 4B) 4 weeks after calvaria implantations in nude mice and calcein injection. Our results clearly indicate that more bone mineralization is present when using OB-MTs-seeded scaffolds (Figure 4B).

After confirming superior colonization and mineralization capacity of MT-seeded scaffolds in vitro and in vivo,

OB-MTs only (n=6) and OB-MTs seeded on a PCL scaffold (n=14) were prepared as grafts for a mouse calvaria defect model (Figure 5). For the analysis of bone formation, SEM-EDS X-ray analysis was used to study the kinetics of calcification, in which phosphorous is shown in green, calcium is shown in red, and carbon is shown in blue (Figure 5A). Several random particles from different parts of the sample were selected to perform the SEM-EDS X-ray analysis to obtain a representative average of each sample. The SEM-EDS X-ray maps of the implants displayed a clear colocalization of calcium and phosphorous signals indicating new bone formation (Figure 5A). At 4 weeks postimplantation, Ca/P weight ratios were calculated to determine the conversion rate into natural bone. The control bone defect (hole) showed a Ca/P ratio of 0.768, whereas the OB-MTs without scaffold displayed a Ca/P ratio of 1.101. However, the PCL scaffolds loaded with living OB-MTs resulted in a Ca/P ratio of 1.701, indicating hydroxyapatite deposition, in agreement with previous literature.⁴¹ Statistical analysis showed a highly significant difference between OB-MT groups and PCL+OB-MTs ($P < 0.001$). We also used micro-CT as a noninvasive low-radiation method to assess the bone-defect-healing process in three dimensions (Figure 5B). It produces high-resolution images and permits accurate quantitative analysis of bone structural parameters. The 3D representation of the bone defect at days 3, 10, 17, 25, and 31 showed that at day 3 the diameter of the hole was identical between each group (Figure 5B). In the advanced double 3D implant group, the diameter of the defect decreased significantly faster than in the OB-MT group. Quantification of bone growth over 31 days clearly shows an accelerated and more complete bone formation

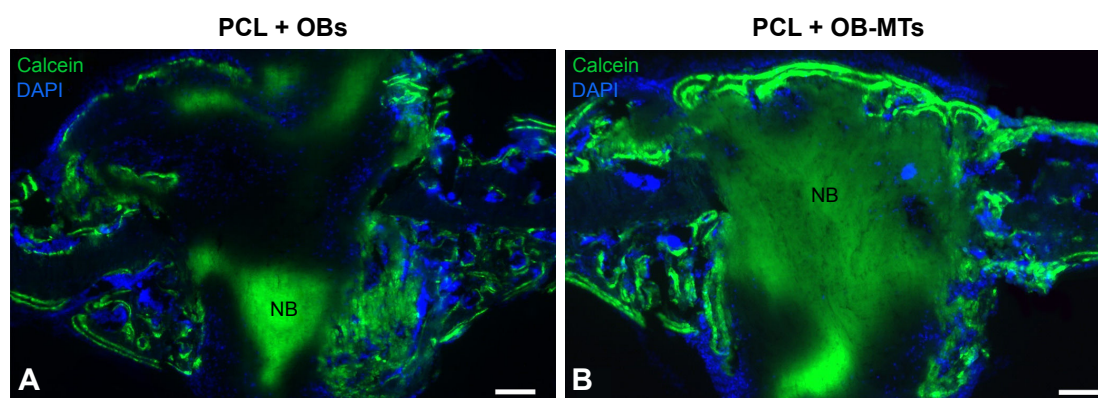


Figure 4 Advantage of using osteoblastic microtissues for bone mineralization and repair (double 3D strategy).

Notes: Implantation of advanced double 3D electrospun nanofiber implants in mice induces bone mineralization. In vivo bone mineralization in PCL 3D seeded with single OBs (**A**), compared PCL 3D seeded with OB-MTs (**B**), 4 weeks after calvaria implantations in nude mice. Cell nuclei are labeled in blue, stained with DAPI; bone formation is visualized in green, tinted with calcein. Scale bars =100 μm (**A**, **B**).

Abbreviations: NB, new bone; OB, human primary osteoblast; OB-MTs, human primary osteoblast microtissues; PCL, poly(ϵ -caprolactone).

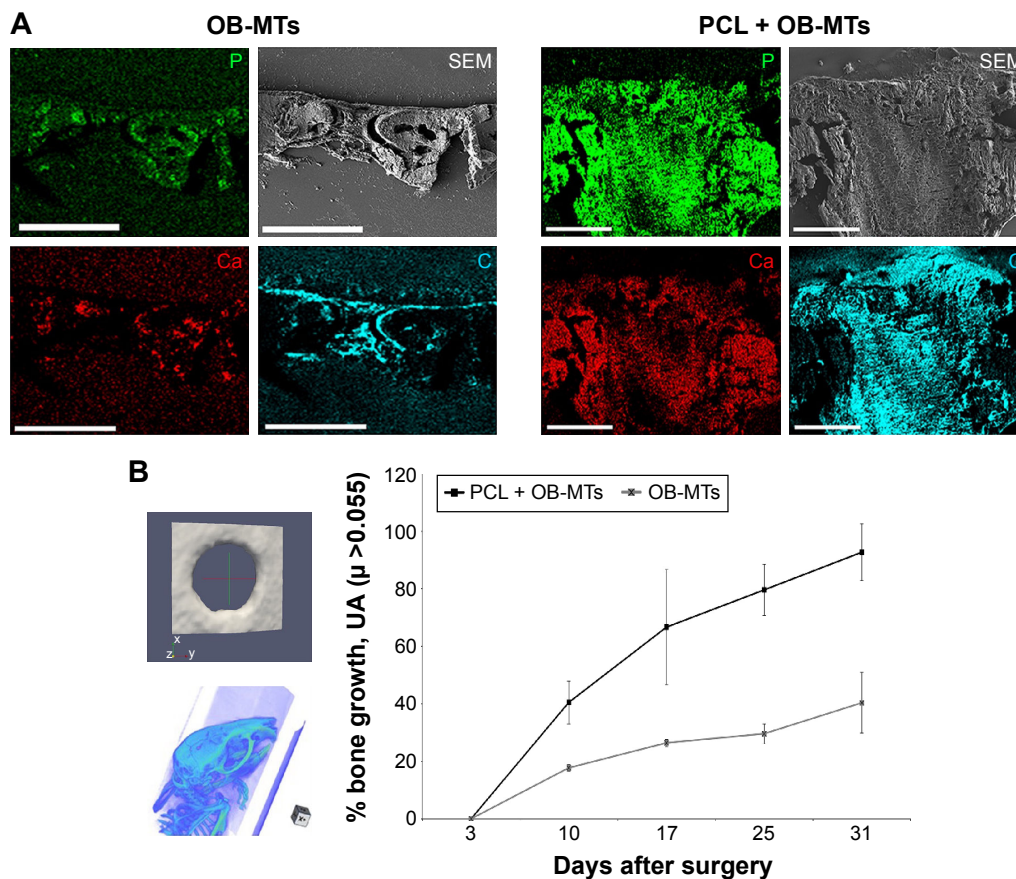


Figure 5 OB-MTs seeded onto the 3D electrospun thick implant (double 3D strategy) and bone regeneration analysis.

Notes: (A) SEM micrographs and SEM-EDS X-ray maps showing the elemental composition as well as morphology of the grafts 4 weeks after implantation in mice calvaria. OB-MTs loaded with 3D PCL or alone. Elemental mapping of phosphorous (green), calcium (red), and carbon (blue) is depicted. Visualization of the grafts by SEM (gray). (B) Micro-computed tomography (micro-CT) analysis. 3D representation of the drilled hole at day 3, leading to bone regeneration analysis of two groups of mice. Group 1: hole seeded with OB-MTs. Group 2: hole after implantation of the 3D PCL implant seeded with OB-MTs (double 3D implant). At day 3, the diameter of the holes is identical for each group. In the 3D PCL + OB-MTs group, the diameter of the hole decreased faster than in the OB-MTs group. Scale bars = 400 μ m (A).

Abbreviations: EDS, energy-dispersive X-ray spectrometer; OB-MTs, human primary osteoblast microtissues; PCL, poly(ϵ -caprolactone); SEM, scanning electron microscope.

when using the double 3D implant as compared with OB-MT implants without scaffold (Figure 5B).

Discussion

Current principles of bone tissue engineering focus on the material properties themselves, active molecules, and cells, to accelerate bone repair efficiency. Many groups develop 3D synthetic polymeric biocompatible and biodegradable materials allowing osteoinduction.^{42–44} This 3D environment is favorable to proliferation, cell differentiation, and mineralization, when equipped with a large amount of single cells. The classical tissue-engineering strategy using single dispersed cells on a biocompatible biomaterial has been predominant over the last 20 years. However, more recently, it has been shown that mineralization could be accelerated by using cells in a 3D conformation (pellet, spheroid, MT).⁴⁵ Our strategy combines both the 3D scaffold and the 3D MTs

instead of single cells. These 3D scaffolds are expected to enable cell migration and maturation through their entire thickness as tissue replacement elements. However, this concept has shown its limitations as clinical use of TE grafts is still modest, because of the fact that these grafts do not allow for sufficient and robust bone regeneration and millions of cells are needed to colonize the scaffolds.⁴⁶ Furthermore, the speed of bone regeneration needs to be improved to beneficially impact quality of life of the patients. In light of the huge potential of creating living TE grafts, new concepts have to evolve, which would give a clear benefit to the patient. Here we demonstrate that by combining two different tissue-engineering strategies, PCL nanofibrous scaffolds together with bone MTs, we reach superior bone tissue formation in vitro as well as in vivo, following implantation in a bony defect model without making use of additional growth factors (Figures 4 and 5).

Two strategies are currently used to improve tissue-engineering efficiency: the first is making use of cells, and the second is based on growth factors. For instance, nowadays in surgery, the Medtronic collagen membrane is used and actually simply soaked in highly concentrated BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) growth factor solution, to increase bone repair, but this leads to an uncontrolled release and with an excessive dose. In a previous publication, we had ourselves demonstrated that the necessity of a scaffold to improve bone induction as mixed capsules releasing BMP-2 together with embryonic stem cells, without the presence of a scaffold, could not induce bone regeneration, whereas by the additional implantation of a scaffold, bone formation was actually induced.¹³

It has been reported that in terms of survival, growth, and differentiation signals, the OB cells will secrete specific biomarkers such as BMPs, RANKL, IL-6, and M-CSF.^{47–50} Furthermore, *in vivo*, biomaterials of third generation (living biomaterials) enable recruitment of cells to help tissue regeneration through paracrine secretion factors. Active biomaterials for bone tissue engineering are based on the use of active molecules or cells to improve their efficiency. In this work, we used OB cells as MTs, instead of single cells, to avoid the use of active molecules. Indeed, by using double 3D environment including well-organized MTs and 3D scaffold, we demonstrated that this combination was sufficient to accelerate mineralization *in vitro*. The combination of cells and scaffolds providing appropriate biological moieties was the most promising strategy to improve *in vivo* bone formation. In this work, the effect of MTs on the increase of bone mineralization speed in the double 3D implant could be explained by the 3D configuration, increasing the speed of extracellular matrix and growth factors secretion, specific to bone repair. Additionally, with this strategy, we observed an accelerated mineralization, which was not correlated with cell proliferation. It is consistent with the fact that cell proliferation is not necessarily the major driver for cell infiltration and tissue maturation, and cell infiltration also depends on cell migration^{51,52} (Figure 3). Furthermore, maturation and mineralization occur after proliferation phase when cells exit from proliferative cycle. MTs allow proliferation arrest, by cell contact inhibition, to enter directly into maturation phase, leading to an accelerated mineralization. Mineralization of OB cells requires not only cell–cell but also cell–matrix interactions.^{53,54} By our double 3D strategy, we amplify these two requirements, leading to an accelerated mineralization and more robust bone formation *in vitro* as well as *in vivo*. Moreover, single cells or even MTs injection in the absence of a scaffold has the major disadvantage to fail in keeping the transplanted cells inside the defect.

The main point for a tissue-engineering solution to be clinically transferable is the fast and successful maturation of new tissue throughout the scaffold to achieve the healing processes, as shown for the bone, or to replace dysfunctional tissue. Most 3D models provide a combination of a small number of cells with a large amount of scaffold (natural or synthetic), thereby optimizing cell–scaffold interactions; however, in most natural living tissues, cell–cell interactions are the most prominent.⁵⁵ Compared with conventional single-cell suspensions, MTs perfectly mimic native tissues in terms of structural and functional properties.²⁸ The differences in bone formation between the two seeding formats are striking. Both *in vitro* and *in vivo*, the advanced double 3D implants demonstrated more complete mineralization (Figure 4). Thus, a promising strategy to improve bone formation is to engineer bone *in vitro* by generating a functional bone implant from a combination of a biomaterial and cells, rather than to implant solely biomaterials.⁵⁶

Conclusion

Nanostructured biomaterials for surgical implantations are designed as less invasive, resulting in earlier recovery and less risks for postoperative infection or complications. These innovations are expected to improve the quality of life of patients and expectancy, and reduce health care costs. The advanced double 3D bone implant developed here, combining a nanostructured bioactive biomaterial and predifferentiated osteogenic MTs, resulted in superior bone formation *in vitro* as well as *in vivo*. On the basis of this result, we suggest that it would be an improvement to reconsider the current tissue-engineering dogma by replacing single cells with MTs for seeding on scaffolds. In combination with further improvements in nanofibrous scaffolds design, we think that the double 3D strategy could lead to a new generation of improved engineered bone grafts, with faster production times and potentially reduced costs. This concept of tissue engineering is not limited to bone and might be applied, for instance, to cardiovascular or skin tissue engineering.

Acknowledgments

This work was financially supported by the project Nano-OSCAR from the “Agence Nationale de la Recherche”. NBJ is indebted to Nancy CHU, “Hôpital Central, Chirurgie Orthopédique et Traumatologie” (INSERM to Hospital Interface Contract). We are indebted to Lionel Thomas and Jean-Michel Gallone from the IPHC, Strasbourg, for the micro-CT analysis. We thank Jens Kelm for his collaboration in MTs preparation. We are also indebted to Dr Nadia Messadeq and Jean-Luc Weickert for their help with SEM. We also thank Victor Sebastian and Carlos Cuestas for their

help with the HRTEM and SEM-EDX analysis, respectively, and Randy Strube for reading the manuscript.

Author contributions

Study design and conduct: NBJ, PS. Molecular biology experiments and histological analyses: LK, QW, YIG, SE. μ CT and biomechanics: DB, SE. SEM-EDX analysis: MA. Drafting and revising manuscript: MA, PS, NBJ, LK, YIG. NBJ takes responsibility for the integrity of the data analysis. All authors contributed toward data analysis, drafting and revising the paper and agree to be accountable for all aspects of the work.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Cheng AY, Garcia AJ. Engineering the matrix microenvironment for cell delivery and engraftment for tissue repair. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(5):864–871.
- Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(1):13–22.
- Kane R, Mal PX. Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone. *Mater Today (Kidlington)*. 2013;16(11):418–423.
- Metzger W, Schwab B, Miro MM, et al. Induction of osteogenic differentiation by nanostructured alumina surfaces. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(5):831–845.
- Watari S, Hayashi K, Wood JA, et al. Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves. *Biomaterials*. 2012;33(1):128–136.
- Gusić N, Ivković A, VaFaye J, et al. Nanobiotechnology and bone regeneration: a mini-review. *Int Orthop*. 2014;38(9):1877–1884.
- Lim JY, Loisel AE, Lee JS, Zhang Y, Salvi JD, Donahue HJ. Optimizing the osteogenic potential of adult stem cells for skeletal regeneration. *J Orthop Res*. 2011;29(11):1627–1633.
- Nayak TR, Andersen H, Makam VS, et al. Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS Nano*. 2011;5(6):4670–4678.
- Depan D, Pesacreta TC, Misra RDK. The synergistic effect of a hybrid graphene oxide–chitosan system and biomimetic mineralization on osteoblast functions. *Biomater Sci*. 2014;2(2):264–274.
- Zhang S, Uludağ H. Nanoparticulate systems for growth factor delivery. *Pharm Res*. 2009;26(7):1561–1580.
- Wang X, Wenk E, Zhang X, Meinel L, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. *J Control Release*. 2009;134(2):81–90.
- Fioretti F, Mendoza-Palomares C, Helms M, et al. Nanostructured assemblies for dental application. *ACS Nano*. 2010;4(6):3277–3287.
- Facca S, Cortez C, Mendoza-Palomares C, et al. Active multilayered capsules for in vivo bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3406–3411.
- Facca S, Lahiri D, Fioretti F, et al. In vivo osseointegration of nano-designed composite coatings on titanium implants. *ACS Nano*. 2011;5(6):4790–4799.
- Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S, et al. Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano*. 2012;6(1):483–490.
- O’Keefe RJ, Mao J. Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic – an overview. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011;17(6):389–392.
- Lieberman JR, Friedlaender GE, editors. *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. New York: Springer; 2005.
- Lewandrowski KU, editor. *Advances in Spinal Fusion: Molecular Science, BioMechanics, and Clinical Management*. Florida, Boca Raton: CRC Press; 2003.
- Woo I, Le BT. Maxillary sinus floor elevation: review of anatomy and two techniques. *Implant Dent*. 2004;13(1):28–32.
- Schwartz-Arad D, Herzberg R, Dolev E. The prevalence of surgical complications of the sinus graft procedure and their impact on implant survival. *J Periodontol*. 2004;75(4):511–516.
- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*. 2004;4(8):743–765.
- Chatterjea A, Meijer G, van Blitterswijk C, de Boer J. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells International*. 2010;(2010):1–12.
- Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008;3(4):254–264.
- Daw R, Tonzani S. Biomaterials. *Nature*. 2009;462(7272):425–425.
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363–408.
- Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002;295(5557):1014–1017.
- Kim HN, Jiao A, Hwang NS, et al. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(4):536–558.
- Kelm JM, Fussenegger M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol*. 2004;22(4):195–202.
- Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol*. 2011;21(12):745–754.
- Eap S, Ferrand A, Palomares CM, et al. Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering. *Biomed Mater Eng*. 2012;22(1–3):137–141.
- Keller L, Wagner Q, Offner D, et al. Integrating microtissues in nanofiber scaffolds for regenerative nanomedicine. *Materials*. 2015;8(10):6863–6867.
- Levi B, James AW, Nelson ER, et al. Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS One*. 2010;5(6):e11177.
- Brasse D, Humbert B, Mathelin C, Rio MC, Guyonnet JL. Towards an inline reconstruction architecture for micro-CT systems. *Phys Med Biol*. 2005;50(24):5799–5811.
- Ferrand A, Eap S, Richert L, et al. Osteogenic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol Biosci*. 2013;14(1):45–55.
- Sell S, Barnes C, Smith M, et al. Extracellular matrix regenerated: tissue engineering via electrospun biomimetic nanofibers. *Polymer Int*. 2007;56(11):1349–1360.
- Ingavle GC, Leach JK. Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20(4):277–293.
- Nisbet DR, Forsythe JS, Shen W, Finkelstein DI, Horne MK. Review paper: a review of the cellular response on electrospun nanofibers for tissue engineering. *J Biomater Appl*. 2009;24(1):7–29.
- Amini AR, Adams DJ, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Optimally porous and biomechanically compatible scaffolds for large-area bone regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(13–14):1376–1388.
- Mankani MH, Kuznetsov SA, Wolfe RM, Marshall GW, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem Cells*. 2006;24(9):2140–2149.
- Kelm JM, Breitbach M, Fischer G, et al. 3D microtissue formation of undifferentiated bone marrow mesenchymal stem cells leads to elevated apoptosis. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(7–8):692–702.
- George A, Ravindran S. Protein templates in hard tissue engineering. *Nano Today*. 2010;5(4):254–266.

42. Gerges I, Tamplenizza M, Lopa S, et al. Creep-resistant dextran-based polyurethane foam as a candidate scaffold for bone tissue engineering: synthesis, chemico-physical characterization, in vitro and in vivo biocompatibility. *Int J of Polymeric Materials*. 2016;65(14):729–740.
43. Siqueira IA, Corat MA, Cavalcanti B, et al. In vitro and in vivo studies of novel poly(D,L-lactic acid), superhydrophilic carbon nanotubes, and nanohydroxyapatite scaffolds for bone regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(18):9385–9398.
44. Pati F, Song TH, Rijal G, Jang J, Kim SW, Cho DW. Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration. *Biomaterials*. 2015;37:230–241.
45. Jähn K, Richards RG, Archer CW, Stoddart MJ. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *Eur Cell Mater*. 2010;20:149–161.
46. Jakob M, Saxer F, Scotti C, et al. Perspective on the evolution of cell-based bone tissue engineering strategies. *Eur Surg Res*. 2012;49(1):1–7.
47. Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, Basdra EK, Papavassiliou AG. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol Med*. 2009;15(5):208–216.
48. Atkins GJ, Kostakis P, Pan B, et al. RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2003;18(6):1088–1098.
49. Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways. *J Biol Chem*. 2008;283(17):11535–11540.
50. Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N. New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Orthop*. 2012;3(11):175–181.
51. Abed E, Moreau R. Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and magnesium in the stimulation of osteoblast proliferation and migration by platelet-derived growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;297(2):C360–C368.
52. Yoon JK, Kim HN, Bhang SH, et al. Enhanced bone repair by guided osteoblast recruitment using topographically defined implant. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(7–8):654–664.
53. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J*. 1990;4(13):3111–3123.
54. Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J*. 1995;15:118–140.
55. Kale S, Biermann S, Edwards C, Tarnowski C, Morris M, Long MW. Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone. *Nat Biotechnol*. 2000;18(9):954–958.
56. Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science*. 2012;338(6109):917–921.

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Chapitre 3

Implants collagéniques hybrides enrichis de microtissus à des fins de régénération de l'unité os-cartilage

Article 4

- ❖ Wagner Q., Keller L., Schwinté P., Benkirane-Jessel N. (2015). Double Compartmented and Hybrid Implant Outfitted with Well-Organized 3D Stem Cells for Osteochondral Regenerative Nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*. 10, 2833-2845.

1. Contexte et objectif

Le cartilage articulaire est un tissu hyalin spécifique contenant des chondrocytes produisant une matrice extracellulaire composée d'eau, de collagène de type II, de glycosaminoglycanes et d'autres glycoprotéines. Cette matrice particulière permet des résistances aux forces de compression et de cisaillement. Dans la capsule intra-articulaire, le cartilage est composé de plusieurs strates, de la zone articulaire à la zone hypertrophique en contact avec l'os sous-chondral, toutes ces zones faisant partie de l'unité ostéochondrale (Schwinté et al., 2014). A cause du manque de cellules et de l'absence de vascularisation, le tissu cartilagineux est incapable de s'auto-régénérer. De plus, il est établi que des lésions au niveau du cartilage impactent généralement l'os sous-chondral.

Les stratégies de réparation du cartilage en clinique sont actuellement : la technique de microfractures, la mosaïcoplastie, l'implantation de chondrocytes autologues (ACI) ou l'implantation de chondrocytes autologues assistée d'une matrice (MACI). L'ensemble de ces techniques aboutit à la formation de fibrocartilage et rencontre un succès limité sur le long terme car les petites lésions peuvent révéler des anomalies dans la structure de l'os sous-chondral (Frenkel and Di Cesare, 1999; Özmeriç et al., 2014). Pour s'affranchir de ces limites, des approches pour l'ingénierie tissulaire cartilagineuse ont émergé.

L'objectif de cette étude est de développer un dispositif médical offrant un environnement adéquat pour la formation de tissu cartilagineux mais également d'os sous-chondral. L'implant est bicompartimenté, composé d'une membrane commerciale de collagène (Bio-Gide[®]) pour l'os sous-chondral, déjà utilisée en clinique pour la régénération tissulaire guidée. Cette membrane est associée à un hydrogel d'alginate pour le cartilage. Cet implant est associé à des microtissus (MT) de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) dérivées de la moelle osseuse. Ces cellules, cultivées en microtissus sont capables d'imiter les étapes de la différenciation endochondrale durant le développement. Ces microtissus ont été associés dans un premier temps à la membrane collagénique pour activer la minéralisation de l'implant en profondeur, puis recouvert par un hydrogel d'alginate pour leur différenciation chondrogénique.

2. Résultats et discussion

➤ Premier compartiment : régénération de l'os sous-chondral

Les microtissus de hCSMs ont d'abord étéensemencés sur la membrane collagénique de Bio-Gide® en milieu chondrogénique pour permettre une activation de la minéralisation. La biocompatibilité fut confirmée par l'analyse de l'activité métabolique durant 28 jours *in vitro*. Après 28 jours de culture avec un milieu de différenciation chondrogénique, les MT tendent à coloniser la membrane de collagène et la minéralisation a été confirmée par analyse au rouge d'alizarine. Les MT expriment des gènes et protéines spécifiques du cartilage hypertrophique (Runx2) et de la minéralisation osseuse (BspII, ostéocalcine), montré par immunofluorescence et par RTqPCR.

➤ Deuxième compartiment : régénération du cartilage

Les MT ont été cette fois cultivés dans un hydrogel composé d'alginate et d'acide hyaluronique durant 28 jours avec un milieu de différenciation chondrogénique. Cette différenciation chondrogénique fut confirmée par immunofluorescence de marqueurs spécifiques du cartilage (Sox9, collagène II et aggrecane) ainsi que par colorations histologiques des glycosaminoglycanes avec le bleu alcian et le Safranin O/ fast green. L'analyse de l'expression de Sox9 et de l'aggrecane par RTqPCR a également démontré une augmentation entre le 7^{ème} et le 28^{ème} jour de culture. Les marqueurs de la minéralisation osseuse (BspII et ostéocalcine) étaient exprimés en faible quantité par opposition au compartiment nanofibreux.

➤ Combinaison des compartiments : environnement triplement tridimensionnel

Les MT de cellules souches mésenchymateuses ont étéensemencés sur la membrane de Bio-Gide®, couverts par l'hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique et cultivés dans un milieu de différenciation chondrogénique. La cohésion entre les deux compartiments est assurée par les MTsensemencés sur la matrice collagénique et recouverts par l'hydrogel. Dans cette condition, les MTs étaient à la fois au contact de la membrane nanofibreuse et de l'hydrogel. Des MT ont également étéensemencés à l'intérieur de l'hydrogel.

Pour analyser la minéralisation du dispositif médical hybride, une coloration au rouge d'alizarine a été réalisée après 28 jours de culture *in vitro*. Cette coloration a montré une

fraction minéralisée plus importante de l'implant, au contact de la membrane nanofibreuse de collagène, l'hydrogel n'ayant pas été coloré. De plus, la coloration au bleu alcian a montré une présence importante de GAGs dans l'hydrogel.

Dans des études précédentes, notre équipe a démontré que les hCSMs pouvaient être de bons candidats pour la régénération osseuse lorsqu'elles étaient ensemencées en monocouche (Eap et al., 2015a) ou MT (Schiavi et al., 2015). Dans cette étude, nous avons montré que l'utilisation de MT de hCSMs peut représenter un bon outil pour la régénération ostéochondrale. L'association de ces cellules souches en MT permet en effet d'imiter la condensation mésenchymateuse durant les premières étapes du développement endochondral embryonnaire (Fennema et al., 2013). Cette agrégation pourrait augmenter significativement la différenciation chondrogénique (Lehmann et al., 2013). Les MT ont montré ici qu'ils pouvaient se différencier non seulement dans l'hydrogel, mais aussi au contact de la membrane collagénique de Bio-Gide®, avec plus de marqueurs de minéralisation, prouvant que la cellule suit la différenciation endochondrale. Pour expliquer ces résultats observés, les études ont pu montrer que des cellules souches ensemencées sur un dispositif implantable fibreux, étaient plus susceptibles de devenir des chondrocytes hypertrophiques, car les motifs RGD pouvaient promouvoir leur adhésion et l'hypertrophie (Loeser, 2014).

Actuellement, la plupart des techniques chirurgicales conduisent à la formation d'un fibrocartilage qui permet dans une moindre mesure la fonctionnalité mécanique du cartilage articulaire (Redman et al., 2005; Caldwell and Wang, 2015). Chaque technique possède ses limites : la technique de microfracture implique la perforation de l'os sous-chondral pour recruter les cellules progénitrices vers le site lésionnel ; la mosaïcplastie utilisant des autogreffes ostéochondrales nécessite des biopsies saines autologues ; l'ACI requiert un nombre suffisant de chondrocytes qui vont se différencier pour donner du fibrocartilage ; la MACI permet de maintenir plus longtemps le profil chondrogénique de l'implant que l'ACI. Cependant, celle-ci ne prend pas en considération l'os sous-chondral pour régénérer le cartilage (Schuette et al., 2017). C'est pourquoi les chercheurs se sont concentrés sur la création de dispositifs médicaux composés de plusieurs couches (Levingstone et al., 2014; Steele et al., 2014; Yucekul et al., 2017) visant la reconstruction des différentes strates de l'unité ostéochondrale.

3. Conclusions

Nous avons développé un implant hybride bicompartimenté, composé d'une membrane collagénique permettant la régénération de l'os sous-chondral, et d'un hydrogel pour former le tissu cartilagineux et ce à partir d'un seul type de cellule souche. Cette construction a étéensemencée avec des MT de cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées de la moelle osseuse. L'analyse des compartiments isolés a pu démontrer un phénotype différent des cellules souches mises en culture avec le même milieu de différenciation. Au contact de la membrane collagénique nanofibreuse, les cellules ont adopté un phénotype osseux avec la présence de minéralisation ainsi que l'expression de protéines osseuses (Runx2, BspII, ostéocalcine). A l'intérieur de l'hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, les MT ont adopté le phénotype chondrogénique avec l'expression de protéines spécifiques du cartilage (Sox9, collagène II, aggrecane) et synthétisé des glycosaminoglycans (coloration histologique). La combinaison des deux compartiments a permis de maintenir cette différence entre le compartiment membranaire et l'hydrogel, avec présence de minéralisation au niveau de la matrice collagénique et coloration de glycosaminoglycans dans l'hydrogel.

Cet implant hybride bicompartimenté a ainsi pu reproduire le gradient naturel de minéralisation du cartilage articulaire. Cette nouvelle approche thérapeutique basée sur la combinaison de deux compartiments est ajustable puisqu'elle peut être modifiée par différentes sources de cellules, de molécules actives et qu'elle pourrait ainsi être appliquée à la régénération d'autres tissus.

Double compartmented and hybrid implant outfitted with well-organized 3D stem cells for osteochondral regenerative nanomedicine

Aim: Articular cartilage repair remains challenging, because most clinical failures are due to the lack of subchondral bone regeneration. We report an innovative approach improving cartilage repair by regenerating a robust subchondral bone, supporting articular cartilage. **Materials & methods:** We developed a compartmented living implant containing triple-3D structure: stem cells as microtissues for embryonic endochondral development mimic, nanofibrous collagen to enhance mineralization for subchondral bone and alginate hydrogel for cartilage regeneration. **Results & conclusion:** This system mimics the natural gradient of the osteochondral unit, using only one kind of stem cell, targeting their ability to express specific bone or cartilage proteins. Mineralization gradient of articular cartilage and the natural 'glue' between subchondral bone and cartilage were reproduced *in vitro*.

Keywords: hMSCs • human mesenchymal stem cells • microtissues • MTs • nanofibrous collagen implant • osteoarticular regeneration • regenerative nanomedicine

Articular cartilage is a specific hyaline tissue containing chondrocytes producing an extracellular matrix (ECM) composed of water, collagen II, glycoaminoglycans and other glycoproteins. This particular ECM provides important tensile and compressive strength, function of the articular zones. In the intra-articular capsule, the cartilage is divided into several layers, from the articular zone to the hypertrophic zone in contact with the subchondral bone, all of these layers included in the osteochondral unit [1–3]. Due to the lack of cells and vasculature, cartilage tissue has limited capacity for self-repair. Moreover, it is established nowadays that the cartilage damage (articular lesions of grade IV, osteochondral fractures, osteochondritis dissecans) also reaches the subchondral bone, making the regenerated fibrocartilage frangible in orthopedic surgery, because the cartilage is regenerated on a weakened subchondral bone basis [4–6]. The repair of osteochondral defects still remains challenging and tissue engineering is in constant development. The regeneration of subchondral bone should take place

alongside articular cartilage regeneration, to increase the efficiency of newly formed tissues integration to the host tissues. In the clinic today, repair strategies such as microfractures, mosaicplasty, ACI (autologous chondrocytes implantation), MACI (matrix-induced ACI) lead to the formation of fibrocartilage and have limited success, focusing on long-term repair limited to small lesions and can reveal subchondral bone abnormality [4–8]. To overcome these clinical drawbacks, osteochondral tissue engineering approaches were developed. Cells, scaffold materials, or both are basically used in cartilage tissue engineering and procedures using scaffolds have drawn increasing attention [9–11]. These scaffolds, used to mimic the 3D physiological environment of the ECM, tend to offer an ideal environment for cell attachment, proliferation and differentiation. Actually, a large number of materials such as synthetic polymers (PGA (polyglycolic acid), PLA (poly lactic acid), PEG, PCL (poly-ε-caprolactone) or natural substrates (alginate, collagen, fibrin, gelatin/agarose...) have been developed [10,12–19].

Laetitia Keller^{†,1,2}, Quentin Wagner^{†,1,2}, Pascale Schwinté^{†,1} & Nadia Benkirane-Jessel^{*,1,2}

¹INSERM UMR1109, Osteoarticular & Dental Regenerative Nanomedicine, Faculté de Médecine, FMTS, F-67085 Strasbourg, France

²Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 place de l'Hôpital, F-67000 Strasbourg, France

*Author for correspondence:

Tel.: +33 368853376

nadia.jessel@inserm.fr

[†]Authors contributed equally

Moreover, in recent years, the use of mesenchymal stem cells (MSCs) in cartilage engineering has been developed due to drawbacks generated by the use of cartilage cells (chondrocytes): dedifferentiation and limited proliferation *in vitro*, donor site morbidity and limited availability. Indeed, the most important limiting factor in articular lesion repair is the harvesting of a sufficient number of autologous chondrocytes and the fact that chondrocytes lose their phenotype during *in vitro* expansion [20–22]. Furthermore, clinical studies have shown that autologous hMSCs have equivalent or higher potential than chondrocytes after implantation, in cartilage repair [23]. For these reasons, adult MSCs derived from bone marrow are ideal candidates to replace human chondrocytes. Indeed, these cells are defined as self-renewal, immunosuppressive and multipotent as they have the ability to differentiate into chondrocytes or osteoblasts under specific conditions [24–27]. Moreover, chondrogenic differentiation of hMSCs is now well established and represents a paradigm for scientists and this capacity has been shown with several biomaterials [28–31]. Furthermore, hMSCs are already used in clinical trials, and are considered as a medical product under the regulations for advanced therapeutic medicinal products (ATMPs) [32–35].

To transcend the limitations of current therapies, we propose here a triple-3D implant providing an adequate environment for cartilage and subchondral bone formation. This implantable medical device is able to stimulate bone regeneration, creating a solid basis for subchondral bone and sustaining cartilage repair on its surface. This implant, containing collagen Bio-Gide® membrane for subchondral bone engineering (compartment 1), and alginate hydrogel for cartilage engineering (compartment 2), was associated to human MSCs (hMSCs) derived from bone marrow. These hMSCs were cultured as 3D cell microtissues, able to mimic the endochondral differentiation process during the development (first 3D structure). Indeed, it is well established now that 3D culture can improve bone and cartilage differentiation of MSCs [36–39], and that the condensation of cells is a prerequisite for chondrogenic differentiation [40–42] (this step is generally reproduced in high-density micromass or pellet-culture system *in vitro*). These microtissues (MTs) were first associated with a porcine collagen membrane (Bio-Gide) (second 3D structure, compartment 1), to activate their mineralization in depth, and after that covered by the alginate hydrogel (third 3D structure, compartment 2) to inhibit proliferation and mineralization of the hMSCs. This bilayered implant tends to mimic the natural environment of the osteochondral unit.

We show here that mineralization was activated by hMSCs in contact with the nanofibrous collagen membrane, and that the MTs embedded in the alginate hydrogel were able to differentiate into chondrocytes, with less mineralization occurring. This hybrid system implant enables to reproduce the natural mineralization gradient of articular cartilage and creates the natural ‘glue’ between subchondral bone and articular cartilage on its surface.

Materials & methods

Cell culture

hMSCs (Promocell, Heidelberg, Germany) were cultured in a proliferation medium (Promocell, Heidelberg, Germany) complemented with supplement mix serum (Promocell, Heidelberg, Germany), 50 U/ml of penicillin and 50 µg/ml of streptomycin. The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. When cells reached subconfluence, they were harvested with trypsin and subcultured to form MTs. Before forming MTs, the hMSCs were labeled with PKH-26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich, France). To form MTs, 3000 hMSCs were cultured in each droplet in suspension of 40 µl of medium in a 3D culture plate system (GravityP-LUST™ 3D Culture, InSphero AG, Zürich, Switzerland) during 5 days. The same number of formed MTs was then seeded in each well on glass or collagen membrane (24 MTs/cm²) (Bio-Gide, Geistlich, Germany) and covered (n = 6) or not (n = 6) by alginate hydrogel.

Culture in alginate/HA hydrogel

hMSC MTs were suspended in a solution of alginate (Sigma-Aldrich) (12 mg/ml) and hyaluronic acid (HA) (Lifecore Biomedical, Chaska, USA) (3 mg/ml). The alginate/HA solution was then polymerized with a solution of CaCl₂ (Sigma-Aldrich) at 102 mM, during 15 min at 37°C. The MTs embedded in alginate/HA were then cultured in medium complemented with 1 mM of CaCl₂.

hMSC differentiation

After being seeded on Bio-Gide (n = 12) or in alginate/HA hydrogel, (n = 18) the hMSC MTs were cultured during 3 days in their proliferation medium (Promocell, Heidelberg, Germany) and then (day 3: D3) in chondrogenic medium consisting in Alpha-MEM complemented with L-glutamine (2 mM), SVF (10%), fungizone (250 U/ml), penicilline-streptomycine (10 U/ml), L-proline (40 µg/ml), dexamethasone (10 nM) and ascorbic acid (50 µg/ml) during 25 days. The cultures were stopped after 7 days (D7) and 28 days (D28) to analyze the chondrogenic differentiation and mineralization of hMSC MTs.

Alamar Blue® test

To analyze the metabolic activity of hMSC MTs grown in the various conditions, the Alamar Blue test (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) was used. For that, the cells were cultivated during 4 h in a solution of 10% (v/v) Alamar Blue in a complete medium without phenol red. Duplicates of each culture medium well were then analyzed with a spectrometer (FC Multiskan) at the 570 and 595 nm wavelengths. For each test, n = 3. The p value was determined by a *t* test.

Quantitative RT-PCR

For the MTs grown in the alginate/HA-polymerized hydrogel, samples were first dissolved in a solution of citrate (55 mM), NaCl (0.15 M) and EDTA (30 mM). The total RNA was extracted from the MTs with the high pure RNA Isolation Kit (Roche). The RetroTranscription was performed with the iScript™ reverse Transcription Supermix (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). The Real-time PCR reaction were then carried out using the iTaq™ Universal SYBR® green super mix (BioRad) and the CFX cycler system (BioRad) with the following cycle condition: an initial denaturation step of 95°C for 2 min was performed, followed by 39 cycles of denaturation at 95°C for 5 s, annealing at 60°C during 30 s and extension at 65°C for 5 s. For each test, n = 3. Statistical significance was determined by a *t* test. The primers used are represented in **Tables 1 & 2**.

Indirect immunofluorescence

Samples of alginate hydrogel were first fixed with a solution of 4% paraformaldehyde containing 100 mM of cacodylate trihydrate and 10 mM of CaCl₂. Samples without alginate hydrogel were fixed with a solution of 4% paraformaldehyde. They were then embedded in OCT Tissue Tek® (Optimum Cutting Temperature; Fisher Scientific, France) and frozen before being cut with a cryostat (Leica CM 3000). For indirect immunofluorescence, samples were then treated with a solution of 0.1% Triton and 1% BSA for saturation and permeabilization. Primary antibodies were then added during 2 h at room temperature at the 1/200 concentration. Primary antibodies used were: rabbit anti-Sox9 (Sigma-Aldrich), rabbit anti-Runx2 (Sigma-Aldrich),

rabbit anti-Aggregan (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), rabbit anti-Collagen II (Sigma-Aldrich), rabbit anti-BspII (Santa Cruz Biotechnologies) and mouse anti-osteocalcin (Santa Cruz Biotechnologies). After rinses with PBS, 488 Alexa Fluor anti-rabbit or anti-mouse (Molecular Probes; Life Technologies, Fisher Scientific, Illkirch, France) Life Technologies) (1/200) were added during 1 h at room temperature. PBS rinses were made and phalloidin (Molecular Probes; Life Technologies) (1/200) was added during 20 min at room temperature. A DAPI (Sigma-Aldrich) solution (200 nM) was then added to the sample to observe cell nuclei. After mounting with Dako® (Dako, Courtaboeuf, France), the samples were observed with an epifluorescent microscope (Leica DM 4000B).

Alizarin red staining

For alizarin red staining, the samples were rinsed with distilled water and a solution of 1% (m/v) Alcian Blue (Sigma-Aldrich) at pH 1 was added during 20 min at room temperature. Samples were then rinsed with distilled water and mounted with Dako to be observed with bright field microscope (Leica DM 4000B).

Alcian Blue staining

For Alcian Blue staining, the samples were rinsed with distilled water and a solution of 2% (m/v) Alcian Blue (Sigma-Aldrich) at pH 4.2 was added during 2 h at room temperature. Samples were then rinsed with distilled water, counter-stained with Nuclear Fast Red (Sigma-Aldrich) during 5 min, dehydrated and mounted with Histolaque LMR® (LaboModerne, France) to be observed with bright field microscope (Leica DM 4000B).

Results

Our proposed therapeutic medical device is the combination of two compartments equipped with hMSC MTs for osteochondral regeneration. In this manuscript, we have analyzed the compartments separately before the combination. The 1st implant compartment was dedicated to the subchondral bone regeneration and the 2nd implant compartment was devoted to the cartilage regeneration.

Table 1. Primers used during quantitative RT-PCR experiments.

Target gene	Forward	Reverse
ACAN (Aggregan)	5'-TCCCCTGCTATTTTCATCGAC-3'	5'-CCAGCAGCACTACCTCCTTC-3'
ACTIN B	5'-GATGAGATTGGCATGGCTTT-3'	5'-CACCTTCACCGTTCCAGTTT-3'
COL2A1 (Collagen II)	5'-CGTCCAGATGACCTTCTACG-3'	5'-TGAGCAGGGCCTTCTTGAGT-3'
RUNX2	5'-CCAACCCACGAATGCACTATC-3'	5'-TAGTGAGTGGTGGCGGACATAC-3'
SOX9	5'-GGAATGTTTCAGCAGCCAAT-3'	5'-TGGTGTCTGAGAGGCACAG-3'

Table 2. Osteogenic primers used in experiments.

Target gene	Accession number	Supplier
OCN (Osteocalcin)	NM 199173	Quiagen, Courtaboeuf, France
BSP-II (Bsp II)	NM 004967	Quiagen

1st compartment: mineralization capacity of hMSC MTs seeded on Bio-Gide collagen membrane (2nd tridimensional environment in the hybrid implant)

Our objective is to regenerate the osteochondral unit, the subchondral bone and the cartilage by using the same MSCs; we first examined the chondrogenic capacity of hMSCs in the form of 3D MTs by analyzing their metabolic activity and their capacity to express chondrogenic proteins. To monitor the chondrogenic capacity of hMSC MTs, cells were seeded on glass and grown with chondrogenic medium during 28 days. The survival of hMSCs under these conditions was followed by the Alamar Blue test, showing a constant metabolic activity all along the culture (Supplementary Figure 1A). After 7 days *in vitro* in chondrogenic medium, the hMSC MTs were able to express the transcription factor Sox9 (Supplementary Figure 1B), a regulator of chondrogenic differentiation able to induce cartilage specific proteins expression. At this stage, expression of Runx2 was also detected (Supplementary Figure 1B). Sox9, Runx2, Collagen II and Aggrecan, specifically expressed by cartilaginous ECM, were also expressed after 28 days (Supplementary Figure 1C). These results show that MTs of hMSCs are suitable candidates for chondrogenic differentiation.

With a view to engineering a hybrid implant mimicking the bone-cartilage unit, we first associated our hMSC MTs with a nanofibrous collagen membrane (Bio-Gide, compartment 1), in the purpose of activating mineralization. hMSC MTs were seeded on Bio-Gide collagen membrane and biocompatibility was confirmed by an Alamar Blue test during 28 days *in vitro* (Supplementary Figure 2). We then tested their capacity to differentiate/mineralize in chondrogenic medium. After 28 days in chondrogenic medium, hMSC MTs tended to colonize the membrane and mineralization of the MTs was confirmed by Alizarin Red staining (Figure 1). MTs expressed proteins specific for hypertrophic cartilage (Runx2) and specific for bone mineralization (Bsp II, Ocn), as shown by indirect immunofluorescence (Figure 2A & B). We next used real-time PCR to quantify the expression of gene specific for mineralization during the culture on Bio-Gide (Figure 2C). The analysis of data revealed that *RUNX2*, *OCN* and *BSP-II* were not only expressed but also significantly increased from D7 to D28. These data showed that hMSC MTs on Bio-Gide nanofibers

were differentiated in hypertrophic chondrogenic cells that mineralized after 28 days *in vitro*.

2nd compartment: chondrogenic capacity of hMSC MTs in alginate/HA hydrogel (3rd tridimensional environment in the hybrid implant)

In the next step of our hybrid implant construction; we examined the effect of the alginate/HA hydrogel (compartment 2) in terms of chondrogenic phenotype activation. During 28 days, the hMSC MTs were embedded in alginate/HA hydrogel and grown in chondrogenic medium (Figure 3A). Chondrogenic differentiation of hMSC MTs on alginate hydrogel was confirmed by immunolocalization of cartilage tissue marker proteins: sox9, Collagen II and Aggrecan (Figure 3B) as well as histological staining of Glycoaminoglycans by Alcian blue and Safranin-O-fast green (Figure 3C). Expression of proteins specific for cartilage tissue was quantified by RT-PCR (Figure 3D): *SOX9* and *ACAN* were significantly upregulated from D7 to D28. *COL2A1* gene was also expressed during the culture (Figure 3D).

Furthermore, we used quantitative real time PCR (Figure 4) to evaluate a possible difference in the differentiation and mineralization of MTs cultured on Bio-Gide (Figure 1A) and on alginate/HA hydrogel (Figure 3A). Interestingly, as compared with hMSC MTs grown on nanofibrous collagen Bio-Gide membrane (compartment 1) (Figure 4A), the expression of the mineralization genes *OCN* and *BSP-II* at the term of the culture was significantly weak and the differences were significant. *OCN* and *BSP-II* were expressed after 7 days of culture in alginate (compartment 2) (Figure 4B) but significantly decreased at D28. Thus, alginate/HA hydrogel improved chondrogenic differentiation of hMSC MTs with less mineralization compared with the Bio-Gide nanofibrous collagen membrane. These results demonstrate that hMSC MTs differentiate more into a chondrogenic phenotype in alginate/HA hydrogel than on collagen nanofibrous membrane.

Compartments combination: hMSCs in a triple-3D environment for the osteoarticular unit regeneration

In the last step of our construction, we combined the three environments previously described: the 1st tridimensional environment of the hMSCs provided by their organization into so-called MTs, the 2nd tridi-

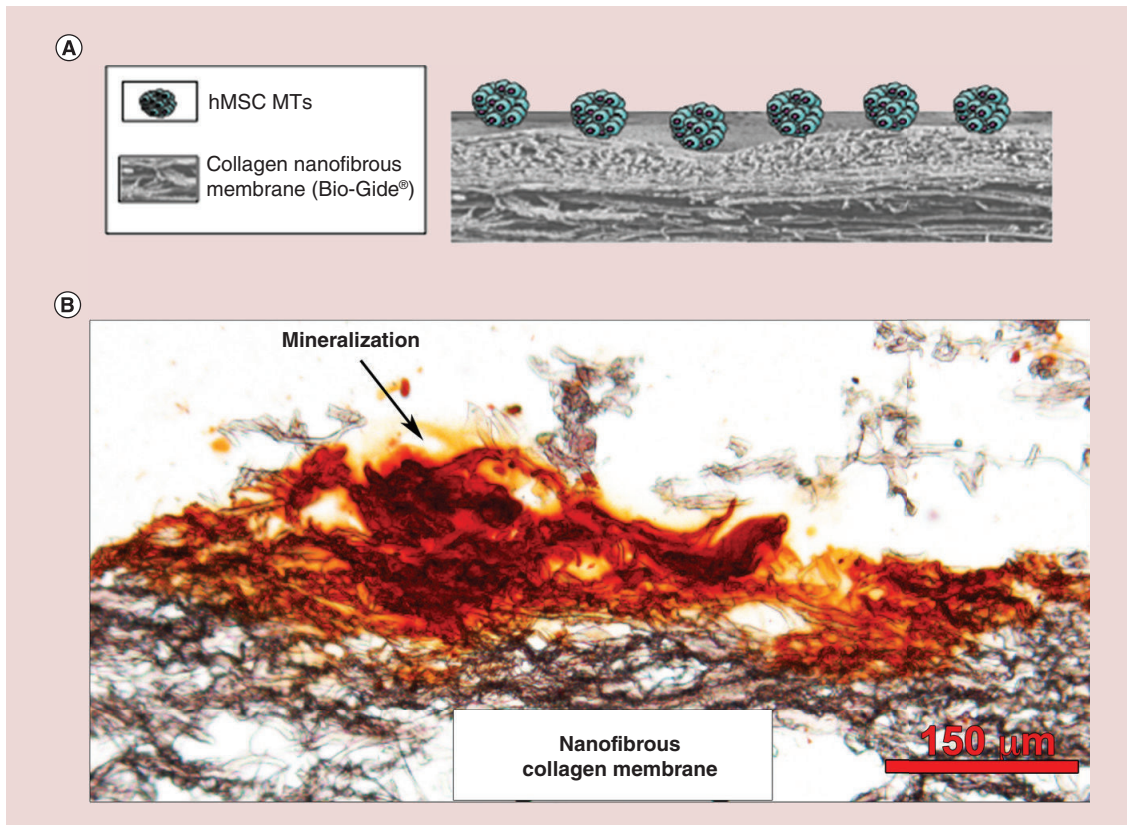


Figure 1. Mineralization of human mesenchymal stem cell microtissues on Bio-Gide® collagen membrane (compartment 1). hMSC MTs were cultured on Bio-Gide® nanofibrous collagen membrane for 28 days (A). Mineralization of hMSCs was observed by alizarin red staining (B). Scale bar = 150 µm. hMSC: Human mesenchymal stem cell; MT: Microtissue.

mensional environment when these MTs are embedded into the nanofibrous collagen scaffold (compartment 1) and the 3rd tridimensional environment provided by the alginate/HA hydrogel (compartment 2). The whole combination was aimed at activating the osteochondral differentiation of the MSCs to target osteochondral unit regeneration.

To create the 'glue' of mineralization between bone and articular cartilage, the hMSC MTs were seeded on Bio-Gide, covered by the alginate/HA hydrogel and cultured with chondrogenic medium. Under these conditions, MTs were at the same time in contact with the Bio-Gide membrane and with the alginate/HA hydrogel (Figure 5A). hMSC MTs were also added in the hydrogel to engineer the chondral part of the implant (Figure 5A). To monitor the mineralization in the different parts of the expected triple-3D hybrid implant, an alizarin red staining was performed after 28 days of culture in chondrogenic medium (Figure 5C). This staining showed the mineralized part of the implant, in contact with the nanofibrous collagen membrane (compartment 1), and no mineralization in the alginate/HA hydrogel (compartment 2) (Figure 5C).

Moreover, AlcianBlue staining showed the important presence of MTs in the Alginate part of the implant (compartment 2), and the more restricted staining of the nanofibrous part of the implant (compartment 2) (Figure 5C).

To summarize, in the first compartment of the implant (collagen membrane) we have confirmed the osteogenic gene expression (Runx2, Bsp II, Ocn) by hMSC MTs showing the mineralization. In the second compartment (alginate/HA hydrogel), we have shown chondrogenic gene expression (Sox9, Collagen II, Aggrecan) with no mineralization. The results are schematized in Figure 5B showing the *in vitro* osteogenic/chondrogenic gradient resulting from our hybrid triple-3D, double compartment implant.

Discussion

In this study we developed a triple-3D hybrid implant to activate osteochondral bidifferentiation from one kind of stem cell (hMSCs). In previous studies, we have shown that hMSCs could represent good candidates for bone regeneration when used as monolayer [16] or as MTs [43]. In the present study, we have shown

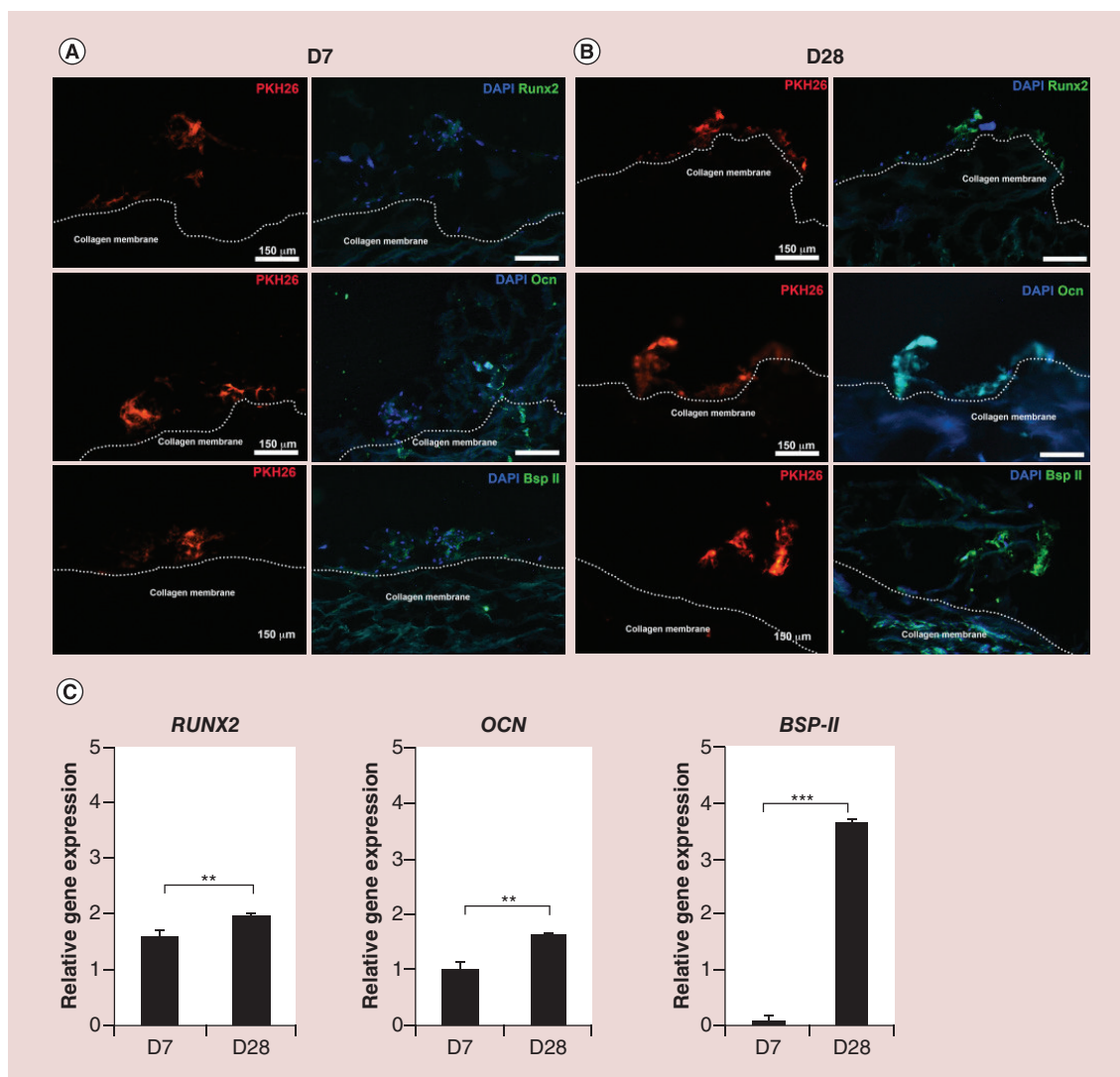


Figure 2. Osteogenic expression of human mesenchymal stem cell microtissues on Bio-Gide® collagen membrane (compartment 1). hMSC MTs were cultured on Bio-Gide® collagen membrane in chondrogenic medium for 28 days. By indirect immunofluorescence (A & B), colonization of the membrane is visible by red color, showing hMSCs previously labeled with the intramembranous marker PKH26. At 7 days (A) and at 28 days (B), proteins specific for hypertrophic cartilage and bone mineralization (Runx2, Bsp II, Ocn) are visible in green. In blue, the nuclei are visible by DAPI staining. Mineralization (*RUNX2*, *OCN*, *BSP-II*) was also observed by QRT-PCR (C) at D7 and D28 (n = 3). All values are expressed as mean ± SEM. Differences were considered significant at 95% CI (**p < 0.01 = extremely significant; **p < 0.05 = very significant; *p < 0.1 = significant). Scale bars = 150 µm. D: Day; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; hMSC: Human mesenchymal stem cell; MT: Microtissue.

that the use of MSCs MTs could also represent a good tool for articular cartilage tissue engineering. First, the association of MSCs in a 3D MT structure allows to mimic the natural mesenchymal condensation during the first stage of the embryonic endochondral development [40–42,44]. Therefore, aggregation of these cells in such a 3D MT structure (compared with previously used ‘micromass,’ micropellet) could enhance significantly the chondrogenic differentiation [37,45]. The difference between micromass and MTs resides in the fact that, for MT formation, less cells are needed and

hMSCs intercellular interactions occur naturally (self-assembling and self-organization) during the droplet suspension culture [44,46,47]. We have reported here that the two types of materials used in this study, nanofibrous collagen membrane and alginate/HA hydrogel, exhibited good biocompatibility for hMSC MTs proliferation and differentiation. hMSC MTs were able not only to differentiate into chondrocytes in alginate hydrogel but also on Bio-Gide collagen membrane alone, with more mineralization markers, showing that the cells undergo endochondral differentiation.

Currently, the majority of therapeutics failures in articular cartilage repair result from the fact that the repaired cartilage is reconstructed on a weakened subchondral bone, especially in the case of osteochondral lesions caused by traumas or osteochondritis dissecans [48]. Nowadays, most of clinical surgical techniques lead to fibrocartilage formation and no functional mechanic recovery of the joint [7–9,20,49]. These techniques are subchondral drilling and microfractures leading to progenitor cells recruitment in the lesion

promoting defect repair; mosaicplasty using autograft of osteochondral plug requiring healthy osteochondral part of the joint of the same patient, ACI (autologous chondrocytes implantation) needing sufficient number of autologous chondrocytes which dedifferentiate to fibrocartilage); MACI (matrix-induced ACI) enabling to preserve a more chondrogenic state of cells than ACI [7–9,20,49]. In recent years, efforts have been made to develop biomaterials mimicking the articular ECM, named ‘matrix-assisted chondrocyte implanta-

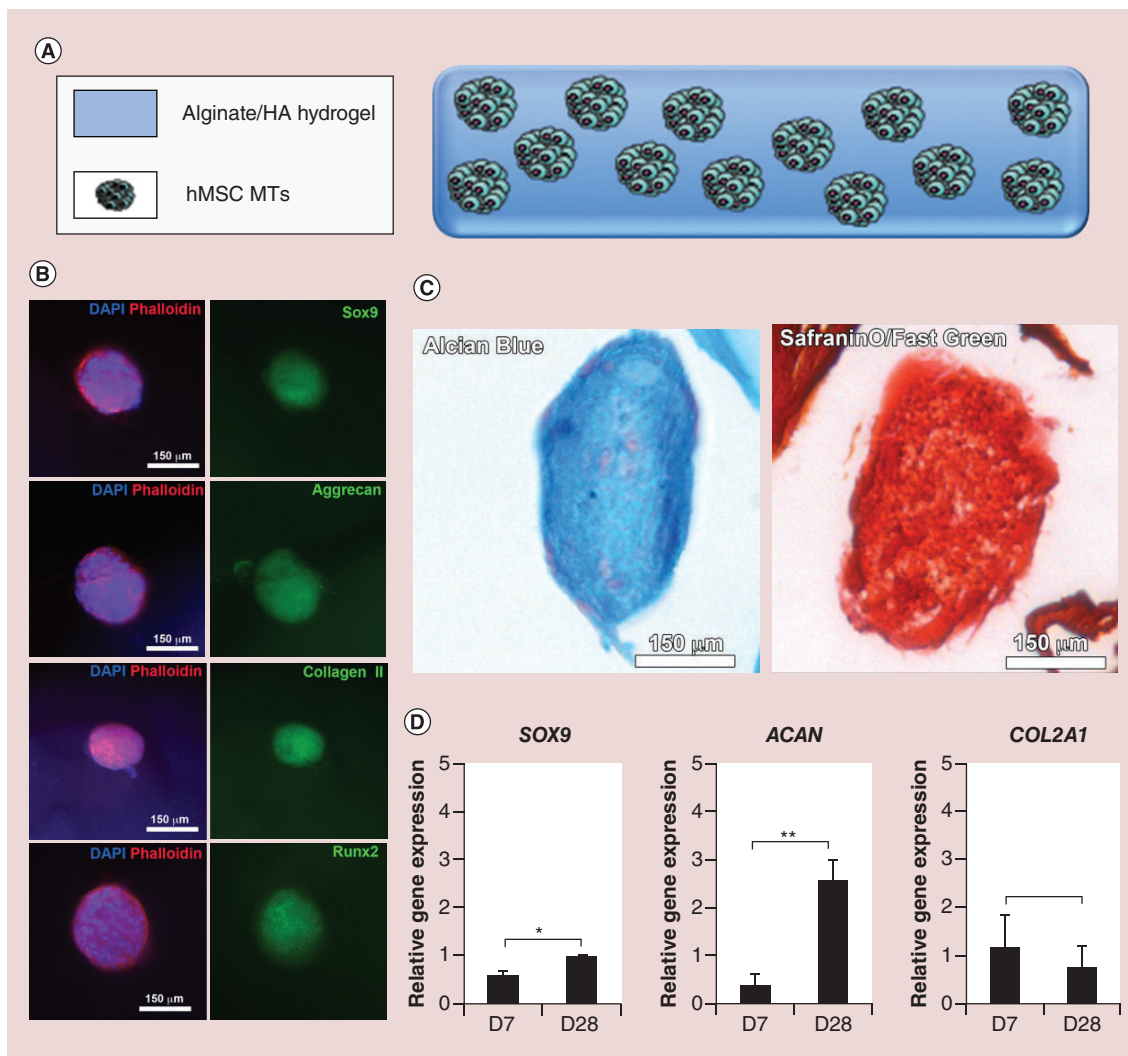


Figure 3. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cell microtissues in alginate/hyaluronic acid hydrogel (compartment 2). hMSCs MTs were cultured in alginate hydrogel in chondrogenic medium (A). Chondrogenic differentiation was observed by indirect immunofluorescence at 28 days (B) by protein expression of Sox9, Aggrecan, Collagen II and Runx2 (in green). Actin is visible in red by phalloidin staining, and nuclei are visible in blue by DAPI staining. Histological staining showing glycosaminoglycans secretion by Alcian Blue and Safranin-O-Fast Green at 28 days (C). Chondrogenic differentiation (SOX9, ACAN, COL2A1) was observed by QRT-PCR at D7 and D28 (D) (n = 3). All values are expressed as mean \pm SEM. Differences were considered significant at 95% CI (**p < 0.01 = extremely significant; **p < 0.05 = very significant; *p < 0.1 = significant). Scale bars = 150 μ m. D: Day; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; HA: Hyaluronic acid; hMSC: Human mesenchymal stem cell; MT: Microtissue.

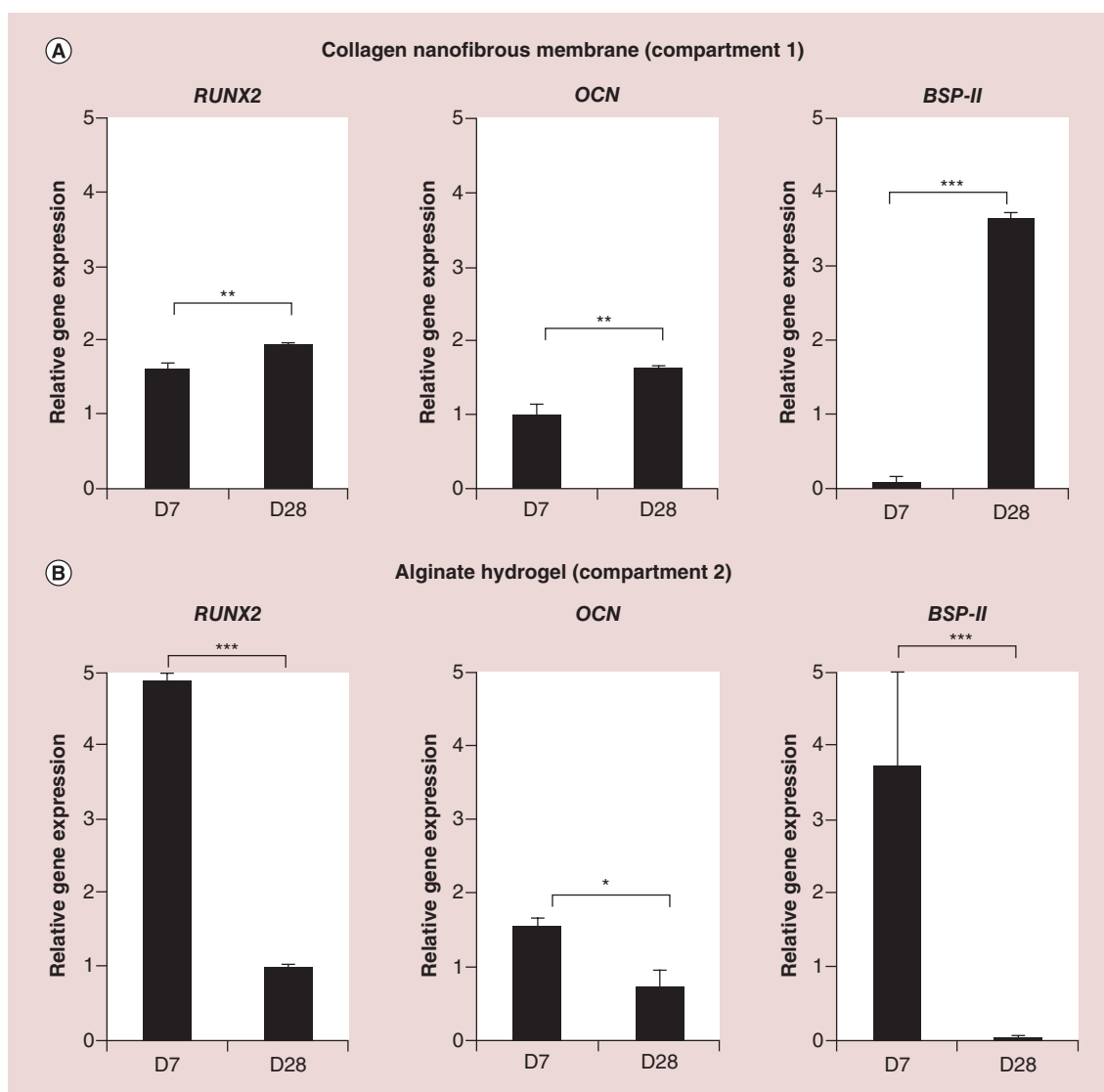


Figure 4. Mineralization of human mesenchymal stem cell microtissues on Bio-Gide® collagen nanofibrous membrane (compartment 1) and in alginate hydrogel (compartment 2). hMSC MTs were cultured in chondrogenic medium for 28 days on the compartment 1 (A) and in the compartment 2 (B). Mineralization (*RUNX2*, *OCN*, *BSP-II*) was observed by QRT-PCR at D7 and D28 (n = 3). All values are expressed as mean ± SEM. Differences were considered significant at 95% CI (**p < 0.05 = very significant; ***p < 0.01 = extremely significant; *p < 0.1 = significant). D: Day; hMSC: Human mesenchymal stem cell; MT: Microtissue.

tion' (MACI), such as the Cartipatch® product using autologous chondrocytes. This strategy does not take into consideration the regeneration of the subchondral bone [48,50]. But more recently, researchers have been focusing on the use of multilayered materials to induce at the same time various phenotypes, all originating from one kind of stem cells [10,51-54]. These multilayered materials aim at the reconstruction of the multiple layers of the osteochondral unit. In this study, we have focused on hMSCs from bone marrow and developed a hybrid implant able to mimic first, the subchondral

bone ECM (via the Bio-Gide collagen I membrane compartment) and second, the cartilage ECM (via the alginate/HA hydrogel compartment). In our study, the same stem cells MTs, when seeded on Bio-Gide collagen membrane, proliferated more and were able to differentiate into hypertrophic chondrocytes, and also upregulated the gene expression of *RUNX2*, *BSP-II* and *OCN*, markers for the entry of cells in the mineralization way. Actually, some studies have shown that stem cells seeded on fibrous scaffold (fibrin) were more amenable to become hypertrophic chondrocytes, as

RGD motifs could promote their adhesion and subsequent hypertrophy [55]. Moreover, in comparison with alginate which does not promote cell adhesion, fibrin can cause the decrease of glycoaminoglycans expression [30,56,57]. This effect of the environment and adhesion promotion on cells was visible in our experiments, particularly when the decrease observed in Aggrecan expression was significant in nanofibrous collagen

Bio-Gide compared with alginate/HA hydrogel (compare **Figure 3D & Supplementary Figure 3**). Indeed, this fibrous membrane can represent a good tool to mimic the calcified cartilage region and promote bone regeneration with MSCs via the endochondral way. Furthermore, we have shown that in the alginate/HA hydrogel, the hMSC MTs were able to differentiate into chondrocytes. This kind of polymeric material

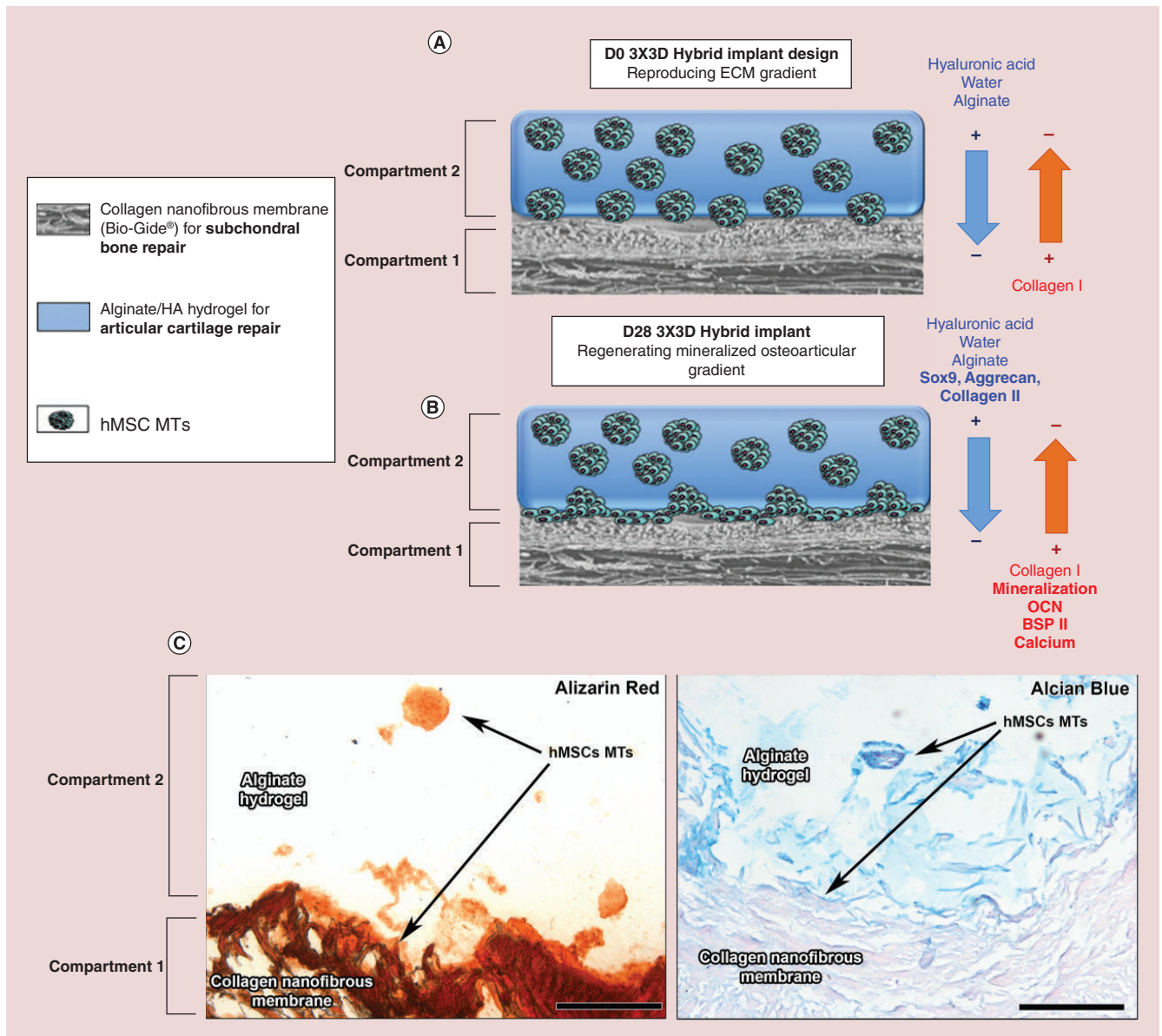


Figure 5. Triple 3D hybrid implant for osteochondral unit repair. (A & B) Scheme representing gradients created by the multilayered hybrid implant. The scaffold mimics the biological and structural cues of the native osteochondral unit (A), leading to both subchondral bone and cartilage repair (B). The mineralized osteoarticular gradient can be reproduced by the triple 3D implant leading to create the natural ‘glue’ between articular cartilage and subchondral bone. After 28 days in chondrogenic medium, calcium deposition is visible in red by alizarin red staining (C). More important red staining is visible for proliferated hMSC MTs in contact with collagen membrane, compared with hMSC MTs in alginate/HA hydrogel (C). (D) The Alcian blue staining shows the glycoaminoglycans in blue in the triple 3D hybrid implant, with more blue staining in the alginate/HA hydrogel compartment. Scale bars = 400 μ m. ECM: Extracellular matrix; HA: Hyaluronic acid; hMSC: Human mesenchymal stem cell; MT: Microtissue; OCN: Osteocalcin.

was already shown as beneficial for cartilage engineering and repair, and has been used for the transplantation of cells in several clinical trials [13,58,59]. Indeed, this unmodified hydrogel, which has attractive properties such as immobilization of cells, can also benefit to the chondrogenic differentiation because it does not promote mammalian cell attachment and proliferation [60,61]. Associating these two types of 3D materials (Alginate/HA hydrogel, nanofibrous Bio-Gide collagen membrane) with hMSC MTs, we have elaborated a multilayered biomaterial for regeneration of the osteochondral unit. In this hybrid implant, based on the Bio-Gide nanofibrous membrane, covered with the alginate/HA hydrogel, the hMSC MTs reproduce the gradient in osteogenic and chondrogenic expression physiologically found in the articular cartilage (Figure 5). The hMSC MTs in contact with the Bio-Gide membrane were able to undergo chondrogenic differentiation with mineralized secreted matrix, as an osteochondral differentiation way for hMSCs (Figure 5).

By using this triple 3D structure combining hMSC MTs, alginate/HA hydrogel and Bio-Gide nanofibrous/nanoporous collagen membrane, as hybrid living implant, we can mimic natural cues of subchondral bone-cartilage unit architecture. To measure the performance of our triple-3D implant, we have examined in this study the *in vitro* osteo-chondrogenic capacity of stem cells MTs. Recently, we have shown that we are able to induce bone regeneration *in vivo* after implantation of the same collagen membrane, used in this study, seeded with hMSC MTs in mice calvaria defects. We have as well-shown colonization of this nanofibrous and nanoporous collagen membrane *in vivo*, after implantation (acting as a stimulus for *in situ* bone regeneration) improving bone formation [43,62]. Moreover, this nanofibrous and microporous collagen membrane already used in the clinic today is suitable not only for bone repair [63,64], as it offers a good integration to the surrounding tissue [65], but can also offer a good environment for angiogenesis and cells colonization [66,67].

In our system, in order to mimic the bone-cartilage unit of the joint, we used not only the nanofibrous collagen membrane as a matrix to regenerate bone but also hMSC MTs associated with alginate/HA hydrogel to regenerate a new cartilage on the new bone. By using this strategy, we can regenerate a subchondral bone as a glue between bone and cartilage.

Conclusion

We report here the formation of a living hybrid implant able to mimic the natural cues of the osteochondral unit. This innovative strategy is based on the combination of a triple 3D environment organized in a multi-

compartmented well-defined structure. The triple 3D environment design is featured by hMSCs (from bone marrow) as well-organized MTs, nanofibrous collagen membrane and alginate/HA hydrogel. Our results pinpoint the capacity of our hybrid and living implant to generate the natural gradient of mineralization in the physiological osteochondral unit. We think that this hybrid compartmented implant can improve subchondral bone regeneration supporting articular cartilage on its surface.

Our technological approach fulfils the goal of regenerating the entire bone-cartilage unit by using the same stem cells. *In vitro*, this system has demonstrated its capacity to mimic the natural architecture of the bone-cartilage unit, using collagen membrane combined with only one kind of stem cell assembled in MTs, targeting their ability to express specific proteins of bone mineralization or cartilage regeneration when incorporated into an hydrogel. This hybrid implant enables to reproduce the natural mineralization gradient of articular cartilage taking into account the junction between bone and cartilage (subchondral 'glue'). Our innovative therapeutic medical implant based on two designed compartments is an adaptable medical device. This adjustable technology can be tuned by using different kinds of cells, active drugs and biomaterials and thereby applied for the regeneration of other tissues such as skin and vasculature.

Future perspective

For robust and durable articular cartilage regeneration, it is necessary to repair this tissue on a solid subchondral bone basis. Recently, researches have been focusing on the development of bilayered implants, to mimic the natural layers present in the osteochondral unit. We report here an innovative therapeutic medical device based on two designed compartments mimicking the natural cues of the osteochondral unit and improving subchondral bone regeneration and cartilage stabilization. Our innovative therapeutic medical implant based on two designed compartments is an adaptable medical device. This adjustable technology can be tuned by using different kinds of cells, active drugs and biomaterials and thereby applied for the regeneration of other tissues such as skin and vasculature. This should help to improve the therapeutic efficacy of the current, less sophisticated biomaterials in the field of regenerative surgery.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by the project Nano OSCAR from the 'Agence Nationale de la Recherche, ANR' and SATT Co-nectus. The authors are indebted to 'Faculté de Chirurgie

Dentaire' Strasbourg for financial support. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Executive summary

Hybrid implant design for osteochondral unit regeneration

- We have developed a bilayered implant composed of nanofibrous collagen and alginate hydrogel to improve the osteochondral unit regeneration.

Triple-3D strategy to improve biomimetism

- Our strategy combines three tridimensional structures: stem cell microtissues, nanofibrous collagen membrane and alginate/hyaluronic acid hydrogel. This triple-3D implant is able to mimic the physiological extracellular environment of the osteochondral unit.

Multidifferentiation of one kind of stem cells

- Human mesenchymal stem cell microtissues can express different levels of bone and mineralization depending on the material where they are present.

Triple-3D strategy to improve subchondral bone regeneration in articular cartilage repair

- We think that this strategy is able to improve the regeneration of a solid subchondral bone, sustaining articular cartilage on its surface.

References

Papers of special note have been highlighted as:

•• of considerable interest

- Schwinté P, Keller L, Eap S *et al.* Osteoarticular regenerative nanomedicine: advances and drawbacks in articular cartilage regeneration implants. *Austin J. Nanomed. Nanotechnol.* 2(4), 13 (2014).
- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (391 Suppl.), S26–S33 (2001).
- Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1(6), 461–468 (2009).
- Frenkel SR, Di Cesare PE. Degradation and repair of articular cartilage. *Front. Biosci.* 4, 671–685 (1999).
- Ozmeriç A, Alemdaroğlu KB, Aydoğan NH. Treatment for cartilage injuries of the knee with a new treatment algorithm. *World J. Orthop.* 5(5), 677–684 (2014).
- Versier G, Dubrana F. French Arthroscopy Society. Treatment of knee cartilage defect in 2010. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* 97(8 Suppl.), S140–S153 (2011).
- Falah M, Nierenberg G, Soudry M, Hayden M, Volpin G. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *Int. Orthop.* 34(5), 621–630 (2010).
- Panseri S, Russo A, Cunha C *et al.* Osteochondral tissue engineering approaches for articular cartilage and subchondral bone regeneration. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 20(6), 1182–1191 (2012).
- Matsiko A, LIVINGSTONE TJ, O'Brien FJ. Advanced strategies for articular cartilage defect repair. *Materials* 6(2), 637–668 (2013).
- Nooeaid P, Salih V, Beier JP, Boccaccini AR. Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. *J. Cell. Mol. Med.* 16(10), 2247–2270 (2012).
- Nukavarapu SP, Dorcenus DL. Osteochondral tissue engineering: current strategies and challenges. *Biotechnol. Adv.* 31(5), 706–721 (2013).
- Frenkel SR, Cesare PED. Scaffolds for articular cartilage repair. *Ann. Biomed. Eng.* 32(1), 26–34 (2004).
- Spiller KL, Maher SA, Lowman AM. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng. Part B Rev.* 17(4), 281–299 (2011).
- Zhang W, Lian Q, Li D *et al.* Cartilage repair and subchondral bone migration using 3D printing osteochondral composites: a one-year-period study in rabbit trochlea. *Biomed. Res. Int.* 2014, 746138 (2014).
- Zhang L, Hu J, Athanasiou KA. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 37(1–2), 1–57 (2009).
- Eap S, Keller L, Schiavi J *et al.* A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int. J. Nanomedicine* 10, 1061–1075 (2015).
- Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S *et al.* Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 6(1), 483–490 (2012).
- Eap S, Keller L, Ferrand A *et al.* Nanomechanical properties of active nanofibrous implants after *in vivo* bone regeneration. *Nano Life* 04, 1450001 (2013).
- Ferrand A, Eap S, Richert L *et al.* Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol. Biosci.* 14(1), 45–55 (2013).

- 20 Caldwell KL, Wang J. Cell-based articular cartilage repair: the link between development and regeneration. *Osteoarthritis Cartil.* 23(3), 351–362 (2014).
- 21 Von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267(5611), 531–532 (1977).
- 22 Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 15(4), 1313–1321 (1978).
- 23 Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai B-C, Lee EH. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am. J. Sports Med.* 38(6), 1110–1116 (2010).
- 24 Magne D, Vinatier C, Julien M, Weiss P, Guicheux J. Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol. Med.* 11(11), 519–526 (2005).
- 25 Woods A, Wang G, Beier F. Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J. Cell. Physiol.* 213(1), 1–8 (2007).
- 26 Beane OS, Darling EM. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. *Ann. Biomed. Eng.* 40(10), 2079–2097 (2012).
- 27 Seo S, Na K. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 806891 (2011).
- 28 Kim H-J, Lee J-H, Im G-I. Chondrogenesis using mesenchymal stem cells and PCL scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* 92(2), 659–666 (2010).
- 29 Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Park K-H. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in fibrin constructs evaluated *in vitro* and in nude mouse and rabbit defects models. *Biomaterials* 32(6), 1495–1507 (2011).
- 30 Ma K, Titan AL, Stafford M, Zheng C, Levenston ME. Variations in chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin/alginate blended hydrogels. *Acta Biomater.* 8(10), 3754–3764 (2012).
- 31 Baghaban Eslaminejad M, Malakooty Poor E. Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration. *World J. Stem Cells* 6(3), 344–354 (2014).
- 32 Slaper-Cortenbach ICM. Current regulations for the production of multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfus. Med. Hemother.* 35(4), 295–298 (2008).
- 33 Gómez-Barrena E, Solá CA, Bunu CP. Regulatory authorities and orthopaedic clinical trials on expanded mesenchymal stem cells. *Int. Orthop.* 38(9), 1803–1809 (2014).
- 34 Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L, Shi Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* 34(6), 747–754 (2013).
- 35 Kim N, Cho S-G. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J. Intern. Med.* 28(4), 387–402 (2013).
- 36 Zhang L, Su P, Xu C, Yang J, Yu W, Huang D. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol. Lett.* 32(9), 1339–1346 (2010).
- 37 Wolf F, Candrian C, Wendt D *et al.* Cartilage tissue engineering using pre-aggregated human articular chondrocytes. *Eur. Cell. Mater.* 16, 92–99 (2008).
- 38 Sasaki J-I, Matsumoto T, Egusa H *et al.* *In vitro* reproduction of endochondral ossification using a 3D mesenchymal stem cell construct. *Integr. Biol. (Camb.)* 4(10), 1207–1214 (2012).
- 39 Ruedel A, Hofmeister S, Bosserhoff A-K. Development of a model system to analyze chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6(12), 3042–3048 (2013).
- 40 Frenz DA, Jaikaria NS, Newman SA. The mechanism of precartilaginous mesenchymal condensation: a major role for interaction of the cell surface with the amino-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Dev. Biol.* 136(1), 97–103 (1989).
- 41 DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartil.* 8(5), 309–334 (2000).
- 42 Singh P, Schwarzbauer JE. Fibronectin and stem cell differentiation – lessons from chondrogenesis. *J. Cell Sci.* 125(16), 3703–3712 (2012).
- 43 Schiavi J, Keller L, Morand DN *et al.* Active implant combining human stem cell microtissues and growth factors for bone-regenerative nanomedicine. *Nanomedicine (Lond.)* 10(5), 753–763 (2015).
- We describe in this paper the possibility to use mesenchymal stem cells as microtissues to improve the *in vivo* bone tissue regeneration with a nanofibrous collagen membrane equipped with nanoreservoirs of BMP-7.
- 44 Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* 31(2), 108–115 (2013).
- Describes the advantage of using cells in a tridimensional structure, as spheroids in tissue engineering.
- 45 Lehmann M, Martin F, Mannigel K, Kaltschmidt K, Sack U, Anderer U. Three-dimensional scaffold-free fusion culture: the way to enhance chondrogenesis of *in vitro* propagated human articular chondrocytes. *Eur. J. Histochem.* 57(4), e31 (2013).
- 46 Kelm JM, Fussenegger M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol.* 22(4), 195–202 (2004).
- 47 Dean DM, Morgan JR. Cytoskeletal-mediated tension modulates the directed self-assembly of microtissues. *Tissue Eng. Part A* 14(12), 1989–1997 (2008).
- 48 Selmi T a. S, Verdonk P, Chabot P *et al.* Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: outcome at two years. *J. Bone Joint Surg. Br.* 90(5), 597–604 (2008).
- 49 Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur. Cell Mater.* 9, 23–32; discussion 23–32 (2005).
- 50 Kon E, Filardo G, Di Matteo B, Perdida F, Marcacci M. Matrix assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage treatment. *Bone Joint Res.* 2(2), 18–25 (2013).

- 51 Chen J, Chen H, Li P *et al.* Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone *in vivo* using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials* 32(21), 4793–4805 (2011).
- 52 Yan L-P, Silva-Correia J, Oliveira MB *et al.* Bilayered silk/silk-nanoCaP scaffolds for osteochondral tissue engineering: *in vitro* and *in vivo* assessment of biological performance. *Acta Biomater.* 12, 227–241 (2015).
- 53 Liu M, Yu X, Huang F, Cen S, Zhong G, Xiang Z. Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair. *Orthopedics* 36(11), 868–873 (2013).
- 54 Steele J a. M, McCullen SD, Callanan A *et al.* Combinatorial scaffold morphologies for zonal articular cartilage engineering. *Acta Biomater.* 10(5), 2065–2075 (2014).
- 55 Yasuda T, Shimizu K, Nakagawa Y, Ishikawa H, Nishihara H, Nakamura T. Possible involvement of RGD (arg-gly-asp)-containing extracellular matrix proteins in rat growth plate chondrocyte differentiation in culture. *J. Bone Miner. Res.* 11(10), 1430–1437 (1996).
- 56 Connelly JT, García AJ, Levenston ME. Inhibition of *in vitro* chondrogenesis in RGD-modified three-dimensional alginate gels. *Biomaterials* 28(6), 1071–1083 (2007).
- 57 Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25(16), 3211–3222 (2004).
- 58 Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210(4472), 908–910 (1980).
- 59 Atala A, Kim W, Paige KT, Vacanti CA, Retik AB. Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J. Urol.* 152(2 Pt 2), 641–643; discussion 644 (1994).
- 60 Pokrywczynska M, Drewa T, Jundzill A, Lysik J. Alginate is not a good material for growth of rapidly proliferating cells. *Transplant. Proc.* 40(5), 1664–1667 (2008).
- 61 Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20(1), 45–53 (1999).
- 62 Eap S, Ferrand A, Schiavi J *et al.* Collagen implants equipped with “fish scale”-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine (Lond.)* 9(8), 1253–1261 (2014).
- **We describe in this paper an active living collagen implant with highly promising bone-regenerative properties.**
- 63 Schlegel AK, Möhler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials* 18(7), 535–538 (1997).
- 64 Tawil G, El-Ghoule G, Mawla M. Clinical evaluation of a bilayered collagen membrane (Bio-Gide) supported by autografts in the treatment of bone defects around implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 16(6), 857–863 (2001).
- 65 Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Sager M, Becker J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clin. Oral Implants Res.* 17(4), 403–409 (2006).
- 66 Jardelino C, Takamori ER, Hermida LF, Lenharo A, Castro-Silva II, Granjeiro JM. Porcine peritoneum as source of biocompatible collagen in mice. *Acta Cir. Bras.* 25(4), 332–336 (2010).
- 67 Willershausen I, Barbeck M, Boehm N *et al.* Non-cross-linked collagen type I/III materials enhance cell proliferation: *in vitro* and *in vivo* evidence. *J. Appl. Oral Sci.* 22(1), 29–37 (2014).

Chapitre 4

Implant synthétique hybride enrichis de microtissus à des fins de médecine régénérative ostéocondrale

Article 5

- ❖ Wagner Q., Keller L., Pugliano M., Breda P., Ehlinger M., Schwinté P. and Benkirane-Jessel N. (2015). Bi-layered Nano Active Implant with Hybrid Stem Cell Microtissues for Tuned Cartilage Hypertrophy. *Journal of Stem Cell Research and Therapeutics*. 1(1):00004. DOI:10.15406/jsrt.2015.01.00004

1. Contexte et objectif

Nous avons développé un implant bicompartimenté pour la régénération de lésions ostéochondrales. Cependant, nous avons remplacé dans cette étude le compartiment visant la régénération de l'os sous-chondral précédent (Bio-Gide®) par une membrane synthétique. En effet, la membrane de Bio-Gide® possède deux limitations inhérentes à sa composition. Nous avons cherché à remplacer cette membrane par une membrane synthétique, obtenue au laboratoire par la méthode d'électrospinning. Cette membrane nanostructurée présente des micropores favorables à la pénétration cellulaire. Cette étude a donc eu pour but de tester un implant bicompartimenté composé de la membrane électrospinnée de PCL formant des nanofibres comme socle pour la régénération de l'os sous-chondral. Ces nanofibres ont été dotées de nanoréservoirs de BMP-7 pour favoriser la différenciation ostéogénique de ce compartiment. Le deuxième compartiment est un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique comprenant des MT « hybrides » de hCSMs combinées à des chondrocytes humains primaires (hChs).

2. Résultats et discussion

➤ Premier compartiment : Régénération de l'os sous-chondral

L'équipe a développé la technologie des nanoréservoirs pour des implants aussi bien naturels que synthétiques (Mendoza-Palomares et al., 2012; Ferrand et al., 2014; Eap et al., 2014b) et contenant un relargage actif dépendant du contact cellulaire. L'avantage de cette technologie réside dans le fait que les biomatériaux génèrent un relargage actif de molécules dépendant de l'adhésion cellulaire et de la dégradation cellulaire de ceux-ci (Mendoza-Palomares et al., 2012). L'encapsulation de ces facteurs de croissance permet de diminuer fortement la quantité de facteurs de croissance utilisée, tout en causant une augmentation de la biodisponibilité des facteurs de croissance après implantation. De plus, les cinétiques de relargage seront plus soutenues dans le temps que celles utilisant des facteurs de croissance par simple imprégnation passive (comme l'exemple de l'implant InductOs® utilisant jusque 12 mg de BMP-2).

Précédemment, il a été démontré au sein du laboratoire que des nanoréservoirs de BMP-7 sur des membranes collagéniques (Bio-Gide®) étaient capables d'augmenter la minéralisation d'ostéoblastes humains (hObs) ou de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs)

en monocouche ou bien en microtissus (Schiavi et al., 2015; Eap et al., 2015a). Le remplacement de ce matériau naturel (d'origine animale) par des polymères synthétiques pourrait permettre une diminution de la réponse inflammatoire ainsi que du risque de rejet *in vivo*.

Pour confirmer la différenciation ostéogénique de microtissus de hCSMs sur la membrane de PCL électrospinnée et fonctionnalisée par des nanoréservoirs de BMP-7, nous avons réalisé la culture dans un milieu de différenciation ostéogénique durant 28 jours. La membrane est biocompatible avec les MT de hCSMs, l'activité métabolique des cellules augmentant tout au long du temps de culture. Après 14 jours de culture, les MT sont capables d'exprimer des marqueurs spécifiques de l'os (Runx2, ostéocalcine et BspII) pour les implants fonctionnalisés et non fonctionnalisés. Runx2, facteur de transcription induit quand les cellules mésenchymateuses entrent dans la différenciation ostéogénique est exprimé dans les deux conditions. Il est intéressant de noter que Runx2 et l'ostéocalcine semblent être plus fortement exprimés en présence de nanoréservoirs. Avec cette stratégie, nous pouvons outrepasser les approches actuelles en clinique (membrane de collagène imbibée de facteurs de croissance BMP) pour la réparation osseuse, avec des doses supra-physiologiques ainsi qu'un relargage passif massif de BMP, pouvant induire des effets secondaires potentiellement graves comme des croissances osseuses ectopiques.

➤ **Deuxième compartiment : régénération du cartilage**

Pour l'ingénierie du cartilage, à la surface du support osseux fonctionnalisé, nous avons utilisé le même hydrogel que dans l'étude précédente, composé d'alginate et d'acide hyaluroniqueensemencé avec des hCSMs. Les hCSMs ont démontré une augmentation de la différenciation chondrogénique par rapport à ces mêmes cellules isolées (Wolf et al., 2008; Lehmann et al., 2013). De plus, il a été montré que la co-culture entre des CSMs et des chondrocytes induisait une différenciation chondrogénique des CSMs avec moins de marqueurs hypertrophiques (Hubka et al., 2014).

Pour cette étude, nous avons choisi d'augmenter les interactions cellulaires en utilisant deux types cellulaires (hCSMs et hChs). Dans ce but, des microtissus hybrides (hCSMs/hChs) ont été cultivés dans un milieu non chondrogénique (milieu de prolifération pour hCSMs). L'expression des glycosaminoglycanes et du marqueur hypertrophique Runx2 a été analysée pour ces MT hybrides. La différenciation chondrogénique de ces MT a été observée par

coloration spécifique des GAGs (glycosaminoglycanes). La RTqPCR a ensuite été utilisée pour comparer l'expression de Runx2 dans les MT hybrides par rapport à des MT de hCSMs uniquement et a révélé une diminution significative de ce marqueur précoce d'hypertrophie pour les MT hybrides. L'utilisation des hChs a donc permis d'induire la différenciation chondrogénique en ayant une diminution du phénotype hypertrophique, qui représente la transition des chondrocytes vers l'ossification endochondrale.

Les biomatériaux à base d'alginate ont pu démontrer leur impact bénéfique dans l'ingénierie du cartilage et sa régénération, et ont été utilisés pour la transplantation de cellules dans plusieurs essais cliniques (Hunziker, 2002; Spiller et al., 2011). En effet, ces hydrogels non modifiés aux propriétés attractives, comme l'immobilisation des cellules, peuvent aussi bénéficier à la différenciation chondrogénique car ils ne produisent pas d'attachement et de prolifération des cellules (Pokrywczynska et al., 2008). L'utilisation d'hydrogel d'alginate pour mimer l'environnement naturel du cartilage associé à l'utilisation de MT hybrides est une stratégie adaptée pour régénérer le tissu cartilagineux articulaire avec une hypertrophie moindre.

➤ **Combinaison des deux compartiments : régénération ostéochondrale**

Pour l'élaboration du deuxième compartiment ayant pour visée la régénération du cartilage, nous avons utilisé un hydrogel d'alginateensemencé avec des MT hybrides composés de hCSMs et de hChs. Les chondrocytes autologues sont des sources cellulaires utilisées conventionnellement pour les chirurgies réparatrices du cartilage par la technique d'ACI et de MACI, mais ces techniques sont associées à des limitations comme le nombre de cellules disponibles ainsi que la dédifférenciation des chondrocytes vers un phénotype fibroblastique durant l'amplification en culture 2D *in vitro* (Huey et al., 2012; Caldwell and Wang, 2015). En associant les hChs aux hCSMs sans utiliser de milieu de différenciation chondrogénique, nous avons pu reproduire des microtissus chondrogéniques et prévenir leurs hypertrophies. Nous pensons que l'association entre un MT hybride, un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique et une membrane nanostructurée de PCL formant un nouveau médicament combiné de thérapie innovante pourrait régénérer premièrement l'os sous-chondral, soutenant lui même la régénération du cartilage articulaire à sa surface.

Pour étudier le comportement de ces MT hybrides *in vivo*, nous avons implanté ces dispositifs en sous-cutané sur un modèle de souris « nude ». Après 90 jours et explantation, une coloration spécifique du cartilage a été réalisée. Les deux compartiments de l'implant étaient

visibles après 90 jours d'incubation *in vivo*, montrant la fraction osseuse de l'implant (coloration verte par la coloration Safranin O/ fast green) et le compartiment cartilagineux présentant des GAGs (coloration bleue par coloration au bleu Alcian ou rouge par la coloration safranin-O/ Fast green).

3. Conclusions

Nous avons développé un implant synthétique bicompartimenté composé d'une membrane nanostructurée à base de PCL électrospinné et doté de nanoréservoirs de BMP-7 permettant la régénération de l'os sous-chondral ainsi qu'un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique pour former le tissu cartilagineux. Cette construction a étéensemencée avec des MT hybrides de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) dérivées de la moelle osseuse ainsi que des chondrocytes humains primaires (hChs). En étudiant l'expression de Runx2, nous avons montré que cette stratégie pouvait moduler le phénotype hypertrophique des hCSMs. La capacité de ce médicament combiné de thérapie innovante a pu être démontrée par l'étude *in vivo* la régénération du compartiment sous-chondral ainsi que du compartiment cartilagineux.

Le succès d'une thérapie de défauts ostéochondraux doit être atteint en ciblant non seulement le cartilage, mais aussi son socle osseux sous-chondral. En associant des biomatériaux nanostructurés bioactifs, avec des hydrogels d'alginate et d'acide hyaluronique incorporant des MT hybrides, il a été possible de concevoir un dispositif implantable capable de régénérer le cartilage articulaire mais aussi l'os sous chondral. La technique d'électrospinning permet d'adapter le temps du processus, et donc de moduler l'épaisseur de la membrane en fonction de l'épaisseur du défaut sous-chondral, avantage non négligeable par rapport à l'utilisation de la membrane Bio-Gide® présentant une épaisseur unique.

Ces résultats démontrent une approche prometteuse pour développer des dispositifs implantables nanostructurés et bioactifs dans le domaine de la nanomédecine régénérative ostéoarticulaire. Cette combinaison peut être adaptée en utilisant différents types cellulaires, différentes molécules actives et pourrait s'appliquer à la régénération d'autres tissus.

Bi-layered Nano Active Implant with Hybrid Stem Cell Microtissues for Tuned Cartilage Hypertrophy

Abstract

Repair of articular cartilage defects remains challenging, as a majority of these defects reach the *subchondral bone*. The objectives of this work were first, to develop a new advanced therapeutic implant for osteoarticular repair, and second, to prevent hypertrophy of the articular cartilage region. For this aim, we developed a bi-compartmented implant, presenting a first layer for *subchondral bone* regeneration: Compartment 1, composed of a nanofibrous poly (ϵ -caprolactone) membrane equipped with BMP-7 growth factor nanoreservoirs, second layer for cartilage regeneration: Compartment 2, composed of alginate/hyaluronic acid hydrogel. To modulate hypertrophy, compartment 2 was seeded with *microtissues* of human *mesenchymal stem cells* co-cultured with human chondrocytes as differentiation inductors. This new strategy offers an appropriate double 3D environment (microtissues in Hydrogel) as inductive trigger for cartilage regeneration with tuned hypertrophy.

Keywords: Regenerative nanomedicine; Nanofibrous PCL implant; Human mesenchymal stem cells (hMSCs); Microtissues (MTs); Hypertrophy; BMP-7

Research Article

Volume 1 Issue 1 - 2015

Laetitia Keller^{1,2,#}, Quentin Wagner^{1,2,#}, Marion Pugliano¹, Pierre Breda¹, Matthieu Ehlinger¹, Pascale Schwinte^{1#} and Nadia Benkirane-Jessel^{1,2*}

¹Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine, Faculte de Medecine, France

²Universite de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, France

#These authors have equally contributed to this work.

*Corresponding author: Nadia Benkirane-Jessel, INSERM UMR1109, Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine, Faculte de Medecine, FMTS, F-67085 Strasbourg, France, Universite de Strasbourg, Faculte de Chirurgie Dentaire, 1 place de l'Hopital, F-67000 Strasbourg, France, Tel: +33-368853376; E-mail: nadia.jessel@inserm.fr

Received: April 24, 2015 | Published: July 23, 2015

Abbreviations: BMP: Bone Morphogenic Protein; Bsp-II: Bone Sialoprotein-II, CHI: Chitosan; ECM: extracellular matrix; F: Functionalized; FDA: Food and Drug Administration; GAGs: Glycosaminoglycans; HA: Hyaluronic Acid; hCHs: human Chondrocytes; hMSCs: human Mesenchymal Stem Cells; LbL: Layer by Layer; MTs: Microtissues; NF: No Functionalized; Ocn: Osteocalcin; PEG: Polyethylene Glycol; PGA: Poly Glycolic Acid; PLA: Poly Lactic Acid; PCL: Poly(ϵ -Caprolactone); *Runx2*: Runt-related transcription factor 2; TGF: Transforming Growth Factor

Introduction

The articular cartilage is a very specific conjunctive tissue divided in several layers, from the articular zone on the articular surface to the mineralized *subchondral bone* in contact with the surrounding bone [1-3]. To resist to the compression and provide a low-friction surface for the joint, the osteochondral unit presents a high specific extracellular matrix (ECM) organization in each layer, from high density GAGs (glycosaminoglycans) absorbing water in the articular zone to a more collagen type I matrix in the *subchondral bone* [1-3]. Due to the lack of vascularisation and cells, articular cartilage has a weak capacity for self-repair. Therefore, repair of osteochondral lesions still remains challenging, as the articular cartilage lesion also affects the *subchondral bone* underneath, and often results in fibrous and frangible repaired tissue [4-8]. In order to increase the efficiency of articular cartilage repair, it is essential to first repair a solid *subchondral bone*, supporting articular cartilage regeneration on its surface.

Nanomaterials have a great potential in the field of regenerative medicine, especially in osteoarticular applications [1,9]. For bone

and cartilage, lots of materials have been developed to mimic the physiological extracellular matrix of tissues. They originate from natural substrates (collagen, alginate, gelatin, agarose, fibrin) or are synthetic materials (PEG (polyethylene glycol), PLA (poly lactic acid), PGA (poly glycolic acid) [10,11]. Recently, focus has been made on new generations of nanotechnology-based biomaterials.

As guidance offered by such materials allows the restoration of tissues by mimicking the ECM, nanofibrous scaffolds play a central role in modern strategies in nanomedicine [12,13]. Our group has developed biodegradable electrospun nanofibrous materials using some FDA (Food and Drug Administration) approved polymer such as poly (ϵ -caprolactone) (PCL) [14,15]. Furthermore, the functionalization of these new generation biomaterials, by incorporation of bioactive molecules, increases their efficiency to induce cell differentiation and tissue repair [14-32]. To this end, we have recently developed new strategies for active therapeutic implants associating FDA approved components [14,15,33-36]. We have reported the incorporation of active growth factors (TGF β , BMP-2, BMP-7) as a coating for nanofibrous scaffolds (synthetic or natural). The mechanism of the nanoreservoirs release of active therapeutics is cell contact dependent. These systems are already validated both *in vitro* and *in vivo* for the increase of the speed of bone regeneration [14,15,33-37].

In recent years, in the field of bone and osteoarticular regenerative medicine, the use of adult mesenchymal stem cells (MSCs) provides an increasing interest. Derived from adult tissues, MSCs are defined as self-renewable, multipotent and immunosuppressive. Able to differentiate in chondrocytes or osteoblasts under specific conditions [38-41], these stem cells represent ideal candidates for the osteochondral regeneration.

Indeed, with autologous chondrocytes, the procurement of a sufficient number of *autologous cells* is limited and these cells easily lose their phenotype *in vitro* [8,42,43]. In recent years, it has been shown that MSCs cultured in a 3D structure, named “micromass” or “pellet”, have a more important capacity to differentiate in the chondrogenic way, compared to their use as single cells [44,45]. Moreover, the use of spheroids (self-assembling microtissues) is known to mimic the embryonic condensation occurring during the embryonic *endochondral* development [46-49]. Indeed, in recent studies, we have shown that hMSCs, used as single cells but also in 3D well-organized *microtissues* (MTs), were able to produce bone *in vitro* and *in vivo* when associated with a nanofibrous membrane equipped with BMP-7 nanoreservoirs [35,36].

In the clinic today, repair strategies (microfracture, mosaicplasty etc...) mostly lead to the formation of fibrocartilage and have limited success, focusing on long-term repair limited to small lesions, and can reveal *subchondral bone* abnormality [4-8]. To overcome these clinical drawbacks, osteochondral tissue engineering approaches using multi-layered materials for the bone-cartilage unit regeneration (subchondral bone together with articular cartilage) have recently emerged [7,50-55]. In this work, we focussed on subchondral bone and cartilage regeneration and developed an implant composed of two compartments: one for *subchondral bone*, and the other for *articular cartilage* regeneration.

To mimic the physiological cues of the bone-cartilage unit, we have used

- (i) a nanofibrous polymeric membrane equipped with nanoreservoirs of BMP-7 for the *subchondral bone* regeneration (Compartment 1)
- (ii) Hyaluronic acid/alginate hydrogel for the articular cartilage repair (Compartment 2) seeded with hybrid *microtissues* (human MSCs combined with human chondrocytes), mimicking the endochondral differentiation development. With the compartment 1, we achieved the *subchondral bone* regeneration. We have confirmed that the presence of BMP-7 nanoreservoirs in this compartment (PCL membrane) is a good tool for *subchondral bone* repair. With the compartment 2, we achieved cartilage repair with less hypertrophy of the engineered cartilage.

Material and Methods

Bioactive PCL nanofibrous membrane design

PCL nanofibrous membranes (50 μm thick) were obtained by the electrospinning method as described previously [14,15]. Addition of BMP-7 nanoreservoirs (CHI/BMP-7)6 on the nanofibers was performed by the Layer-by-Layer (LbL) technology [37]. For that, the PCL membrane was dipped successively (6 times during 15 min) in alternate solutions of Chitosan (CHI) (Protasan UP CL 113; Novamatrix, Sandvika, Norway; 500 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and BMP-7 (Euromedex, Souffelweyersheim, France; 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) prepared in MES buffer (2-N-morpholino ethane sulfonic acid; Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA; 0.04 M, NaCl 0.15 M) at pH 5.5. Each bath was followed by a rinsing step in a solution of MES buffer (0.04 M, NaCl 0.15 M).

Cell culture

Human *mesenchymal stem cells* (hMSCs) and human *chondrocytes* (hCHs) (PromoCell, Heidelberg, Germany) were cultured in a proliferation medium (Promocell, Heidelberg, Germany) complemented with supplement mix serum (Promocell, Heidelberg, Germany), 50 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ of penicillin and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of streptomycin. The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . When cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin and sub-cultured to form *microtissues* (MTs). To form hMSCs MTs, 3 000 hMSCs were cultured in each droplet in suspension of 40 μL of medium in 3D culture plate system (GravityPLUS™ 3D Culture, InSphero AG, Zurich, Switzerland) during 5 days. To form hybrid MTs, 1000 hCHs and 2000 hMSCs were cultured in a droplet. The same number of formed MTs was then seeded in each nanofibrous PCL membrane (24 MTs. cm^{-2}) or in alginate/HA hydrogel.

Culture in alginate/HA hydrogel

Microtissues (MTs) were suspended in a solution of alginate (Sigma Aldrich) (12 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and hyaluronic acid (HA) (Lifecore Biomedical, Chaska, USA) (3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). The alginate/HA solution was then polymerized with a solution of CaCl_2 (Sigma Aldrich) at 102mM, during 15min at 37 °C. The *microtissues* embedded in alginate/HA were then cultured in medium complemented with 1mM of CaCl_2 .

Microtissues differentiation

After seeding on PCL nanofibrous membrane functionalized (F) or not (NF) with BMP-7 nanoreservoirs, hMSCs MTs were cultured during 28 days in osteogenic medium consisting in Alpha-MEM complemented with L-glutamine (2mM), SVF (10%), fungizone (250 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), penicilline-streptomycine (10 μmL^{-1}), ascorbic acid (60 μm), β -glycerophosphate (10mM) and dexamethasone (10nM). After seeding in alginate/HA hydrogel, hybrid MTs were cultured during 28 days in hMSCs proliferation medium (Promocell, Heidelberg, Germany), and hMSCs MTs were cultured during 28 days in chondrogenic medium consisting in Alpha-MEM complemented with L-glutamine (2mM), SVF (10%), fungizone (250 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), penicilline-streptomycine (10 μmL^{-1}), L-Proline (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), dexamethasone (10nM) and ascorbic acid (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Indirect Immunofluorescence

Samples were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and were then treated with a solution of 0.1% Triton and 1% BSA for saturation and permeabilisation. Primary antibodies were then added during 2 hours at room temperature at the 1/200 concentration. Primary antibodies used were: rabbit anti-Runx2 (Sigma Aldrich), mouse anti-Osteocalcin (Ocn) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit anti-BspII Sigma Aldrich). After rinses with PBS, 488 Alexa Fluor anti-rabbit or anti-mouse (Molecular Probes; Life Technologies, Fisher Scientific, Illkirch, France) (1/200) were added during 1 hour at room temperature. PBS rinses were made and phalloidin (Molecular Probes; Life Technologies) (1/200) was added during 20min at room temperature. A DAPI (Sigma-Aldrich) solution (200nM) was then added to the sample to observe cell nuclei. After mounting with Dako® (Dako, Courtaboeuf, France), the samples were observed

with an epifluorescent microscope (Leica DM 4000B).

Alamar Blue® test

To analyse the metabolic activity of hMSCs MTs, the Alamar Blue® test (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used. For that, the cells were cultivated during 4 hours in a solution of 10% (v/v) Alamar Blue® in a complete medium without phenol red. Duplicates of each culture medium well were then analysed with a spectrometer (FC Multiskan) at the 570 and 595 nm wavelengths. For each test, n=3. The p value was determined by a t-paired test.

Quantitative RT-PCR

For the MTs grown in the alginate/HA-polymerized hydrogel, samples were first dissolved in a solution of citrate (55mM), NaCl (0,15 M) and EDTA (30mM). The total RNA was extracted from the MTs with the high pure RNA Isolation Kit (Roche). The RetroTranscription was performed with the iScript™ reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The Real-time PCR reaction were then carried out using the iTaq™ Universal SYBR® green super mix (Bio-Rad) and the CFX cycler system (Bio-Rad) with the following cycle condition: an initial denaturation step of 95 °C for 2 min was performed, followed by 39 cycles of denaturation at 95 °C for 5 seconds, annealing at 60 °C during 30 seconds and extension at 65 °C for 5 seconds. For each test, n=3. Statistical significance was determined by a t paired test (Table 1).

Table 1: The primers used.

Target gene	Forward	Reverse
ACTIN B	5'-GATGAGATTGGCATG-GCTTT-3'	5'-CACCTTACCAGTTC-CAGTTT-3'
RUNX2	5'-CCAACCCACGAATGCAC-TATC-3'	5'-TAGTGAGTGGTGCCGGA-CATAC-3'

In vivo experimentation

Animals and tissues: All procedures were designed in compliance with the recommendations of the European Union (2010/63/EU) for the care and use of laboratory animals. Ethics statement: Experiments followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU), and were performed according to authorized investigator Dr. N. Jessel (Director of the "Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine" Team), holder of a personal license from "Prefecture du Bas-Rhin" (No. 67-315), who oversaw experiments done on mice. All experiments were done in the "Animalerie Centrale de la Faculte de Medecine de Strasbourg" with the approval number: A 67-482-35 from the Veterinary Public Health Service of the "Prefecture du Bas-Rhin", representing the French Ministry of Agriculture, Department of Veterinary Science. For further tissues implantations, all surgery was performed under Ketamine and Xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering. Nude male mice (CTR: NIH-Foxn1nu, Charles River, France), 6 weeks of age, were anesthetized with intra-peritoneal injection of 100 mg.kg⁻¹ of ketamine (VIRBAC Sante Animale, Centravet) and 10 mg.kg⁻¹

of Xylazine (Rompun® 2%, Centravet). The nano structured bioactive implant was implanted behind the ears of mice, between skin and muscles. After 90 days, the animals were sacrificed with an intra-peritoneal injection of lethal dose of ketamine, to examine the explant by histological staining.

Histological staining of glycosaminoglycans

Samples of alginate hydrogel were first fixed with a solution of 4% para formaldehyde (PFA) containing 100mM of cacodylatetrihydrate and 10mM of CaCl₂. Samples were then embedded in paraffin for serial sections of 7 µm. For Safranin O/ Fast green staining, the samples were rinsed with PBS and dipped in a solution of Fast green (0,02% m/v), acetic acid (1% m/v) and finally Safranin O (0,1% m/v). For Alcian Blue staining, the samples were rinsed with distilled water and a solution of 2% (m/v) Alcian Blue (Sigma-Aldrich) at pH 4.2 was added during 2 hours at room temperature. Samples were then rinsed with distilled water, dehydrated and mounted with Histolaque LMR® (Labo Moderne, France) to be observed with bright field microscope (Leica DM 4000B).

Results and Discussion

PCL membrane equipped with BMP-7 nanoreservoirs for subchondral bone repair (compartment 1)

In bone regenerative medicine field, bioactive biomaterials mimicking the extracellular matrix have been developed [56,57]. As examples, Medtronic offers InductOs®, which is a basic collagen matrix (of animal origin) soaked in osteogenic growth factor BMP-2 (12mg), and Stryker® offers the same collagen membrane soaked in BMP-7 [58,59]. Despite their application in clinic, the release of these active molecules from these materials is passive and not controlled. Recently, we have developed a nano reservoirs technology, on synthetic or natural membranes [14,15,33,35,36] with active cell contact dependent release. The advantage of this technology resides in the fact that this material generates an active release of molecules dependent on the cells' adhesion on the nano reservoirs and their cell-dependent degradation [14], leading to an increase of growth factor bioavailability after implantation. For *bone tissue* repair, we have previously shown that BMP-7 nano reservoirs on collagen membrane (Bio Gide® from Geistlich) were able to increase mineralization of human osteoblasts and *mesenchymal stem cells* (hMSCs), seeded as single cells or as *microtissues* (MTs) [35,36]. The replacement of this natural material (of animal origin) by a synthetic polymer, can be a key to avoid inflammatory response and rejection *in vivo*. For that purpose, we developed electro spun nano fibrous membranes based on the poly (ε-caprolactone) (PCL), which is an FDA approved polymer [14,15]. This material, when equipped with nano reservoirs of BMP-2, can increase the speed of bone marker expression *in vitro* after 14 days and *in vivo* [14,15]. As a strategy to enhance *subchondral bone* regeneration efficiency *in vivo*, we used BMP-7 functionalized (F) nanofibrous PCL membrane and human *mesenchymal stem cells*. To confirm the osteogenic differentiation of hMSCs MTs on functionalized (F) PCL membrane, these hMSCs MTs were cultured in osteogenic medium during 28 days (Figure 1). The PCL (F) membrane was

biocompatible with hMSC MTs, as the cells metabolic activity increased all along the culture (Figure 1A). In the literature, it is reported that BMP-7 acts as an attenuator of cell cycling during early osteogenic differentiation of hMSCs [60] and our results are in accordance with previous observations [35,36]. After 14 days, hss MTs were able to express bone specific markers (*Runx2*, *Ocn*, *BspI*) on the (NF) and (F) PCL membrane (Figure 1B). *Runx2*, a transcription factor induced when *mesenchymal cells* are in the bone differentiation way was expressed in the two conditions (F, NF). Interestingly, *Runx2* and *Osteocalcin* (*Ocn*) seem to be more important in the presence of the nanoreservoirs (NRs) (Figure 1B). These results were in accordance with expected results as we previously showed the osteogenic differentiation of hMSCs as single cells with BMP-7 NRs [36], or as MTs [35]. As collagen represented a good tool for hMSCs MTs differentiation [35], the PCL electro spun nano fibrous membrane equipped with BMP-7 nano reservoirs can represent a good support for these cells and for bone regeneration *in vivo*. With this strategy, we can overcome the current approaches used in the clinic today (Stryker collagen soaked in BMP-7) for bone repair, leading to overdosing due to the massive and passive release of BMP-7, inducing adverse side effects.

Hybrid MTs in alginate/HA hydrogel for cartilage regeneration with tuned hypertrophy (Compartment 2)

To engineer cartilage on the bone surface functionalized support (compartment 1), we used Alginate/HA hydrogel seeded with *stem cells* to mimic the articular cartilage compartment. First, hMSCs in well-organized MTs were used to mimic the condensation during the *endochondral* differentiation way during *embryonic* development [46-49]. Already used in the cartilage-engineering field, MSCs cultured in a 3D configuration (micromass, pellet) show increased chondrogenic differentiation compared to MSCs single cells [44,45]. Moreover, it was shown that co-culture of MSCs with chondrocytes induces a chondrogenic differentiation of MSCs with less hypertrophic markers [61-64]. On the other hand, single cells and 2D culture systems can dedifferentiate chondrocytes via fibroblastic phenotype [65,66]. Rather than performing culture with growth factors, culture modes with cellular interactions have been shown to generate more physiological cues and doses. The paracrine signal between chondrocytes and MSCs is dependent on the distance between cells and an excessive distance blocks their interaction [67].

In this work we chose to increase these cell-cell interactions by using a co-culture of two kinds of cells (hMSCs and hCHs) in *microtissues* (MTs). Having shown that hMSCs MTs in HA/hydrogel can represent a good tool for chondrogenic differentiation, the next step was to analyse the effect of hCHs on hMSCs in MTs (Figure 2). For that purpose, hybrid MTs (hMSCs/hCHs) were cultured in alginate/HA hydrogel during 28 days in non chondrogenic medium (MSC proliferation medium). The glycosaminoglycans (GAGs) expression and the hypertrophic marker *Runx2* were then evaluated in the MTs (Figure 2B & 2C). We first observed the chondrogenic differentiation of these hybrid MTs by staining

specific GAGs (Figure 2B). QRT-PCR was then used to compare the expression of *RUNX2* in hybrid MTs and in hMSCs MTs, and revealed a significant decrease in *RUNX2* in the MTs containing hCHs (hybrid MTs) (Figure 2C). The use of hCHs in combination with hMSCs in MTs allows inducing a less hypertrophic phenotype. Alginate polymeric material was already shown as beneficial for cartilage engineering and repair, and has been used for the transplantation of cells in several clinical trials [11,68,69]. Indeed, this unmodified hydrogel, which has attractive properties such as immobilization of cells, can also benefit to the chondrogenic differentiation because it does not promote mammalian cell attachment and proliferation [70,71]. Using alginate hydrogel to mimic the natural environment of articular cartilage, associated with co-cultured hMSCs/hCHs in a tridimensional well organized conformation (hybrid MTs), is a good strategy to regenerate articular cartilage tissue with less hypertrophy.

Nano functionalized compartmented implant design (compartment 1+ compartment 2)

A majority of articular cartilage defects reach the *subchondral bone* and articular cartilage repair is done on frangible *subchondral bone* [4-8]. To increase the efficiency of cartilage repair we have used, not only an alginate hydrogel (compartment 2) seeded with hybrid MTs for cartilage repair, but also a functionalized membrane (compartment 1) for *subchondral bone* regeneration. By using this innovative strategy, our proposed therapeutic medical device associates two compartments in order to reproduce the bone-cartilage unit (Figure 3A).

For the design of the compartment 2, we have used alginate hydrogel seeded with hybrid MTs (hMSCs and Chondrocytes: hCHs). Autologous chondrocytes are used in conventional cell-based therapy, but these techniques are associated with several limitations such as the number of cells available and dedifferentiation in 2D culture [8,42,43]. By associating hCHs and hMSCs in MTs without the need of chondrogenic medium, we were able to produce chondrogenic MTs, and to prevent their hypertrophy (Figure 2). We assume that by associating hybrid MTs, alginate/HA hydrogel and a membrane equipped with BMP-7 nanoreservoirs, as a new advanced therapeutic medicinal device, we could regenerate first a robust *subchondral bone*, itself sustaining stable articular cartilage regeneration on its surface.

To demonstrate the behavior of these hybrid MTs *in vivo* on the membrane (F), we subcutaneously implanted our nanostructured therapeutic medical device (Figure 3A & 3B). After 90 days, implants were retrieved and cartilage specific staining (GAGs) of the samples was performed (Figure 3C). The two compartments of the implant were visible after 90 days *in vivo*, showing the bone part of the implant in green (Safranin O/ Fast green) (compartment 1) and the GAGs functional compartment visible in blue (Alcian Blue) or in red (Safranin O/ Fast green) (compartment 2) (Figure 3C). During implantation time, these two compartments were vascularized and cells coming from the *microtissues* migrated all along the alginate structure and membrane, showing viability of these associated structures (Figure 3C).

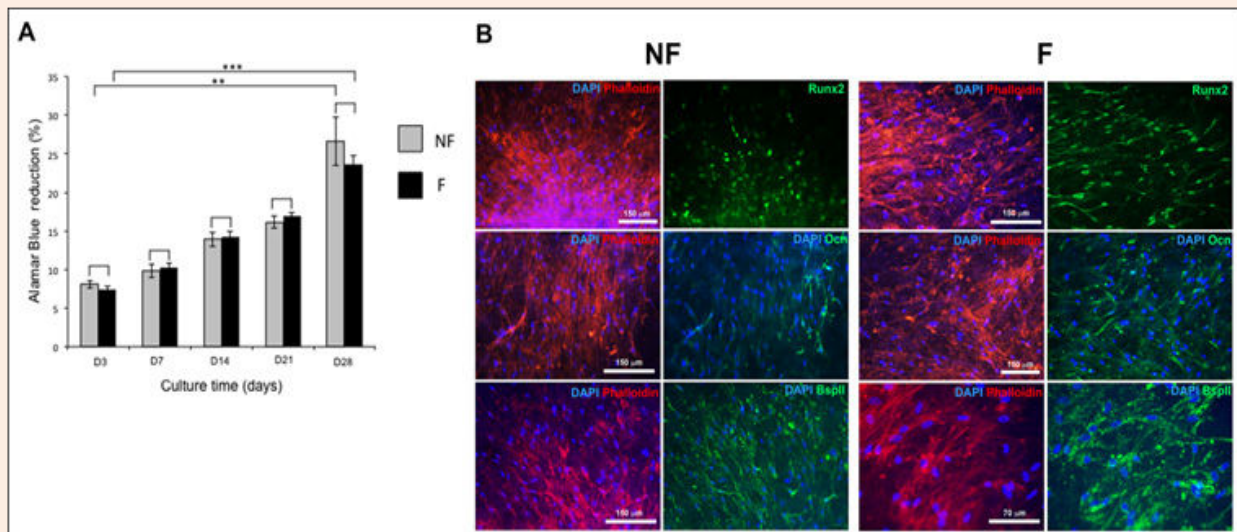


Figure 1: Osteogenic behaviour of hMSCs MTs on nanofibrous PCL equipped with (CHI-BMP-7) nanoreservoirs (compartment 1).
(A) Metabolic activity was measured by an Alamar Blue® test after 3, 7, 14, 21 and 28 days. n=3. All values are expressed as mean +/- SEM. Differences were considered significant at 95% confidence level (** $P < 0.01$ = extremely significant; ** $P < 0.05$ = very significant, * $P < 0.1$ = significant). No significant differences were observed between cells growing on functionalized (F) and not functionalized (NF) nanofibrous membrane (t paired test).
(B) Expression of proteins specific to the bone tissue for hMSCs MTs growing on functionalized (F) and not functionalized (NF) nanofibrous PCL membrane after 14 days *in vitro*. *Runx2*, *Ocn* (Osteocalcin) and *BspII* (Bone sialoprotein II) were visible in green after indirect immunofluorescence. The nuclei were stained in blue with DAPI and actin in red with phalloidin.

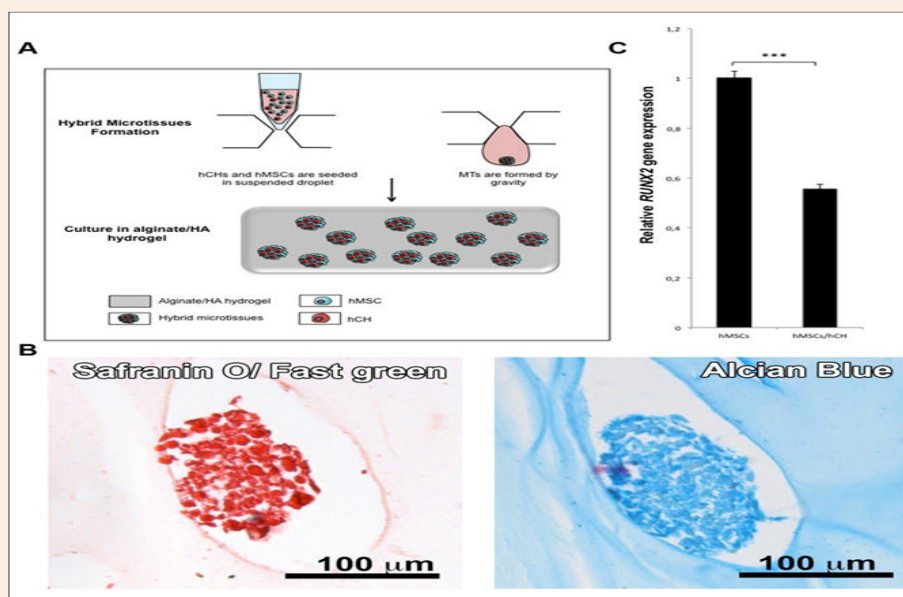


Figure 2: Chondrogenic behaviour and hypertrophy evaluation of hybrid MTs in alginate/HA hydrogel (compartment 2).
(A) Hybrid MTs were formed by culturing hCHs and hMSCs in droplet suspension in a non-chondrogenic medium. After 5 days, hybrid MTs were embedded in alginate/HA hydrogel during 28 days without chondrogenic medium.
(B) Histological staining of hybrid MTs specific to glycosaminoglycans visible in blue (Alcian Blue) and in red (Safranin O/ Fast Green).
(C) Relative expression of the hypertrophic marker *RUNX2* for hybrid MTs compared to hMSCs MTs in chondrogenic medium after 28 days. *RUNX2* is significantly decreased in the hybrid MTs compared to the hMSCs MTs. n=3. All values are expressed as mean +/- SEM. Differences were considered significant at 95% confidence level (** $P < 0.01$ = extremely significant; ** $P < 0.05$ = very significant, * $P < 0.1$ = significant), (t test).

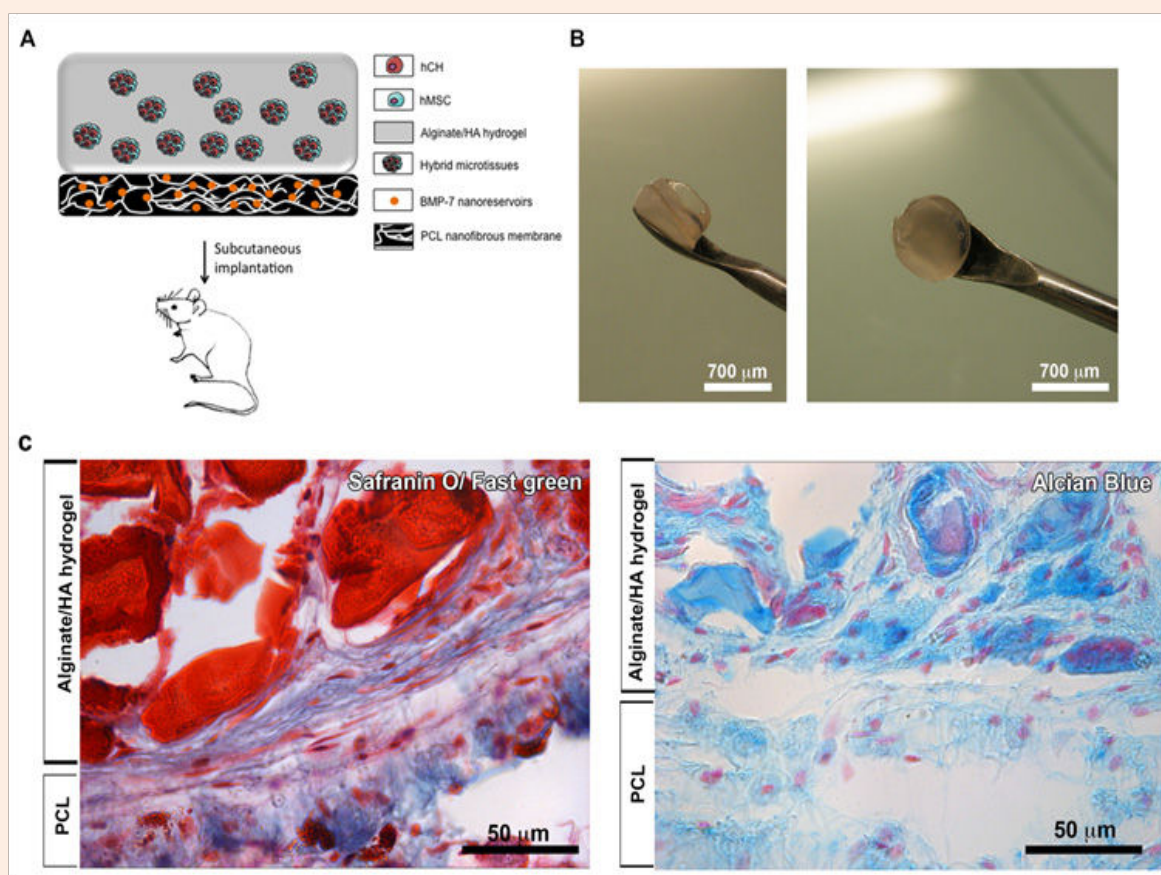


Figure 3: Nanostructured bioactive implant design (compartment 1 and compartment 2 association) for tuned cartilage hypertrophy. (A,B) The nanofibrous PCL membrane equipped with BMP-7 nanoreservoirs (compartment 1) was associated with the alginate/HA hydrogel containing hybrid MTs (compartment 2) and the system was implanted subcutaneously during 90 days in nude mice. (C) Safranin O/Fast green and Alcian Blue histological staining showing glycosaminoglycans in red and blue (respectively) in the Alginate/HA compartment compared to the (CHI-BMP-7), PCL part of the implant.

Conclusion

In this manuscript, we used not only a nano fibrous electrospun membrane fortified with active nano reservoirs of therapeutics (BMP-7) for *subchondral bone* repair (compartment 1) but also an appropriate 3D environment for *mesenchymal stem cells* based on an hydrogel and microtissues for cartilage regeneration with less hypertrophy. These hMSCs were co-cultured with human chondrocytes (hCHs) as inductors in *microtissues* and placed in some alginate/HA hydrogel (compartment 2). Based on *RUNX2* expression, we show that with this double 3D strategy, we are able to modulate the hypertrophic phenotype of the differentiated cells. We have as well-shown *in vivo subchondral bone* and cartilage regeneration by combining both compartment 1 and 2.

Success of osteochondral defect treatment can be achieved by targeting not only cartilage repair but also robust *subchondral bone*. By associating human *mesenchymal stem cells*/bioactive nano structured material, with alginate hydrogel/3D well-organized

co-cultured hMSCs, we are able to engineer an implant designed for the articular cartilage but also for the *subchondral bone tissue repair*. By using a nano fibrous bioactive PCL membrane, and alginate hydrogel combined with *stem cells* and chondrocytes *microtissues*, we enhance the cell-cell interactions and optimize the micro environment for subsequent cartilage-bone regeneration. Furthermore, with the use of hybrid *microtissues* (hCHs, hMSCs) in double 3D environment (alginate /HA, MT), we were able to modulate the hypertrophy of the cells in the articular cartilage compartment. These results demonstrate a promising approach to develop a nano structured and bioactive implantable medical device in the field osteoarticular regenerative nano medicine. Our proposed advanced therapeutic medicinal device opens a new strategy for cartilage repair combining the double 3D active environment of *stem cells* (Hybrid microtissues in hydrogel) and the nanofibrous active membrane for *subchondral bone* repair. Our innovative technology based on cells *microtissues* and hydrogels, as a double 3D environment, is an adaptable advanced therapeutic

medical device. This technology can be tuned by using different kinds of cells, active drugs and polymers (natural or synthetic) and thereby applied for the regeneration of other tissues such as skin and vasculature.

Acknowledgements

This work was supported by the project Nano OSCAR from the "Agence Nationale de la Recherche", ANR and SATT Conectus. We are indebted to "Faculté de Chirurgie Dentaire" Strasbourg for financial support.

Conflict of Interest

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

References

- Schwinte P, Keller L, Eap S, Mainard D, Benkirane-Jessel N (2014) Osteoarticular Regenerative Nanomedicine: Advances and Drawbacks in Articular Cartilage Regeneration Implants. *Austin J Nanomed Nanotechnol* 2(4): 1025.
- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, et al. (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* (391suppl) : S26-S33.
- Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA (2009) The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1(6): 461-468.
- Falah M, Nierenberg G, Soudry M, Hayden M, Volpin G (2010) Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *Int Orthop* 34(5): 621-630.
- Panseri S, Russo A, Cunha C, Bondi A, Di Martino A, et al. (2012) Osteochondral tissue engineering approaches for articular cartilage and subchondral bone regeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20(6): 1182-1191.
- Redman SN, Oldfield SF, Archer CW (2005) Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 9: 23-32; discussion 23-32.
- Matsiko A, Levingstone TJ, O'Brien FJ (2013) Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair. *Materials* 6(2): 637-668.
- Caldwell KL, Wang J (2015) Cell-based articular cartilage repair: the link between development and regeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 23(3): 351-362.
- Schwinte P, Keller L, Lemoine S, Gottenberg J, Benkirane-Jessel N, et al. (2015) Nano-engineered scaffold for osteoarticular regenerative medicine. *J Nanomed Nanotechnol* 6(1): 258.
- Frenkel SR, Cesare PED (2004) Scaffolds for articular cartilage repair. *Ann Biomed Eng* 32(1): 26-34.
- Spiller KL, Maher SA, Lowman AM (2011) Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev* 17(4): 281-299.
- Madurantakam PA, Cost CP, Simpson DG, Bowlin GL (2009) Science of nanofibrous scaffold fabrication: strategies for next generation tissue-engineering scaffolds. *Nanomedicine (Lond)* 4(2): 193-206.
- Zhang YZ, Su B, Venugopal J, Ramakrishna S, Lim CT (2007) Biomimetic and bioactive nanofibrous scaffolds from electrospun composite nanofibers. *Int J Nanomedicine* 2(4): 623-638.
- Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S, Fioretti F, Ladam G (2012) Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 6(1): 483-490.
- Ferrand A, Eap S, Richert L, Lemoine S, Kalaskar D, et al. (2013) Osteogenic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol Biosci* 14(1): 45-55.
- Rossi F, van Griensven M (2014) Polymer functionalization as a powerful tool to improve scaffold performances. *Tissue Eng Part A* 20(15-16): 2043-2051.
- Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazzon M, Liley M, et al. (2010) The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomater* 6(10): 3824-3846.
- Wheeldon I, Farhadi A, Bick AG, Jabbari E, Khademhosseini A (2011) Nanoscale tissue engineering: spatial control over cell-materials interactions. *Nanotechnology* 22(21): 212001.
- Choi JH, Park YW, Park TH, Song EH, Lee HJ, et al. (2012) Fuzzy nanoassembly of polyelectrolyte and layered clay multicomposite toward a reliable gas barrier. *Langmuir* 28(17): 6826-6831.
- Wang D, Rogach AL, Caruso F (2002) Semiconductor quantum dot-labeled microsphere bioconjugates prepared by stepwise self-assembly. *Nano Lett* 2(8): 857-861.
- Berth G, Voigt A, Dautzenberg H, Donath E, Mohwald H (2002) Polyelectrolyte complexes and layer-by-layer capsules from chitosan/chitosan sulfate. *Biomacromolecules* 3(3): 579-590.
- Jessel N, Atalar F, Lavalley P, Mutterer J, Decher G, et al. (2003) Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Advanced Materials* 15(9): 692-695.
- Hiller J, Mendelsohn JD, Rubner MF (2002) Reversibly erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers. *Nature Materials* 1(1): 59-63.
- Benkirane-Jessel N, Schwinte P, Falvey P, Darcy R, Haikel Y, et al. (2004) Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Advanced Functional Materials* 14(2): 174-182.
- Jessel NB, Schwinte P, Donohue R, Lavalley P, Boulmedais F, et al. (2004) Pyridylamino- β -cyclodextrin as a molecular chaperone for lipo polysaccharide embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Adv Funct Mater* 14(10): 963-969.
- Benkirane-Jessel N, Lavalley P, Hübsch E, et al. (2005) Short-time tuning of the biological activity of functionalized poly electrolyte multilayers. *Adv Funct Mater* 15(4): 648-654.
- Gangloff SC, Ladam G, Dupray V, Fukase K, Brandenburg K, et al. (2006) Biologically active lipid A antagonist embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Biomaterials* 27(9): 1771-1777.
- Jessel N, Oulad-Abdelghani M, Meyer F, Lavalley P, Haikel Y, et al. (2006) Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(23): 8618-8621.
- Dierich A, Le Guen E, Messaddeq N, Stoltz J-F, Netter P, et al. (2007) Bone formation mediated by synergy-acting growth factor

- embedded in a poly electrolyte multilayer film. *Advanced Materials* 19(5): 693-697.
30. Zhang X, Sharma KK, Boeglin M, Ogier J, Mainard D et al. (2008) Transfection ability and intracellular DNA pathway of nanostructured gene-delivery systems. *Nano Lett* 8(8): 2432-2436.
31. Lee J, Kotov NA (2009) Notch ligand presenting acellular 3d microenvironments for *ex vivo* human hematopoietic stem-cell culture made by layer-by-layer assembly. *Small* 5(9): 1008-1013.
32. Shim BS, Podsiadlo P, Lilly DG, Agarwal A, Lee J, et al. (2007) Nanostructured thin films made by dewetting method of layer-by-layer assembly. *Nano Lett* 7(11): 3266-3273.
33. Eap S, Ferrand A, Schiavi J, Keller L, Kokten T, et al. (2014) Collagen implants equipped with "fish scale"-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine (Lond)* 9(8): 1253-1261.
34. Facca S, Cortez C, Mendoza-Palomares C, Messadeq N, Dierich A, et al. (2010) Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8): 3406-3411.
35. Schiavi J, Keller L, Morand DN, De Isla N, Huck O, et al. (2015) Active implant combining human stem cell microtissues and growth factors for bone-regenerative nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)* 10(5): 753-763.
36. Eap S, Keller L, Schiavi J, Huck O, Jacomine L, et al. (2015) A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int J Nanomedicine* 10:1061-1075.
37. Decher G (1997) Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multi composites. *Science* 277(5330): 1232-1237.
38. Magne D, Vinatier C, Julien M, Weiss P, Guicheux J (2005) Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol Med* 11(11): 519-526.
39. Woods A, Wang G, Beier F (2007) Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J Cell Physiol* 213(1): 1-8.
40. Beane OS, Darling EM (2012) Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. *Ann Biomed Eng* 40(10): 2079-2097.
41. Seo S, Na K (2011) Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2011: 80689 -80691.
42. Von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, et al. (1977) Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267(5611): 531-532.
43. Benya PD, Padilla SR, Nimni ME (1978) Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 15(4): 1313-1321.
44. Wolf F, Candrian C, Wendt D, Farhadi J, Heberer M, et al. (2008) Cartilage tissue engineering using pre-aggregated human articular chondrocytes. *Eur Cell Mater* 16: 92-99.
45. Lehmann M, Martin F, Mannigel K, Kaltschmidt K, Sack U, et al. (2013) Three-dimensional scaffold-free fusion culture: the way to enhance chondrogenesis of *in vitro* propagated human articular chondrocytes. *Eur J Histochem* 57(4): e31.
46. Frenz DA, Jaikaria NS, Newman SA (1989) The mechanism of precartilaginous mesenchymal condensation: a major role for interaction of the cell surface with the amino-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Dev Biol* 136(1): 97-103.
47. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS (2000) Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 8(5): 309-334.
48. Singh P, Schwarzbauer JE (2012) Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis. *J Cell Sci* 125(16): 3703-3712.
49. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3d complex tissues. *Trends in Biotechnol* 31(2): 108-115.
50. Nooaeid P, Salih V, Beier JP, Boccaccini AR (2012) Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. *J Cell Mol Med* 16(10): 2247-2270.
51. Nukavarapu SP, Dorcemus DL (2013) Osteochondral tissue engineering: current strategies and challenges. *Biotechnol Adv* 31(5): 706-721.
52. Chen J, Chen H, Li P, Diao H, Zhu S, et al. (2011) Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone *in vivo* using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials* 32(21): 4793-4805.
53. Yan LP, Silva-Correia J, Oliveira MB, Vilela C, Pereira H, et al. (2015) Bilayered silk/silk-nano Cap scaffolds for osteochondral tissue engineering: *in vitro* and *in vivo* assessment of biological performance. *Acta Biomater* 12: 227-241.
54. Liu M, Yu X, Huang F, Cen S, Zhong G, et al. (2013) Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair. *Orthopedics* 36(11): 868-873.
55. Steele JA, McCullen SD, Callanan A, Autefage H, Accardi MA, et al. (2014) Combinatorial scaffold morphologies for zonal articular cartilage engineering. *Acta Biomater* 10(5): 2065-2075.
56. Porter JR, Ruckh TT, Papat KC (2009) Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog* 25(6): 1539-1560.
57. Lee SH, Shin H (2007) Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59(4-5): 339-359.
58. Kanakaris NK, Mallina R, Calori GM, Kontakis G, Giannoudis PV (2009) Use of bone morphogenetic proteins in arthrodesis: clinical results. *Injury* 40(Suppl 3): S62-S66.
59. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, et al. (2002) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 84-A(12): 2123-2134.
60. Lavery K, Hawley S, Swain P, Rooney R, Falb D, et al. (2009) New insights into BMP-7 mediated osteoblastic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *Bone* 45(1): 27-41.
61. Cooke ME, Allon AA, Cheng T, Kuo AC, Kim HT, et al. (2011) Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. *Osteoarthritis Cartilage* 19(10): 1210-1218.
62. Hubka KM, Dahlin RL, Meretoja VV, Kasper FK, Mikos AG (2014) Enhancing chondrogenic phenotype for cartilage tissue engineering:

- monoculture and coculture of articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev* 20(6): 641-654.
63. Meretoja VV, Dahlin RL, Kasper FK, Mikos AG (2012) Enhanced chondrogenesis in co-cultures with articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 33(27): 6362-6369.
64. Tsuchiya K, Chen G, Ushida T, Matsuno T, Tateishi T (2004) The effect of coculture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype *in vitro*. *Materials Science and Engineering: C* 24(3): 391-396.
65. Caron MM, Emans PJ, Coolsen MM, Voss L, Surtel DA, et al. (2012) Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage* 20(10): 1170-1178.
66. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S (1960) The loss of phenotypic traits by differentiated cells *in vitro*. I. dedifferentiation of cartilage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 46(12): 1533-1542.
67. Lai JH, Kajiyama G, Smith RL, Maloney W, Yang F (2013) Stem cells catalyze cartilage formation by neonatal articular chondrocytes in 3d biomimetic hydrogels. *Sci Rep* 3(3553): 1-9.
68. Lim F, Sun AM (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210(4472): 908-910.
69. Atala A, Kim W, Paige KT, Vacanti CA, Retik AB (1994) Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J Urol* 152(2 Pt 2): 641-643.
70. Pokrywczynska M, Drewa T, Jundzill A, Lysik J (2008) Alginate is not a good material for growth of rapidly proliferating cells. *Transplant Proc* 40(5): 1664-1667.
71. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ (1999) Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20(1): 45-53.

Chapitre 5

Dispositif médical implantable thérapeutique innovant pour améliorer la vascularisation des implants osseux

Article 6

- ❖ Wagner Q., Offner D., Idoux-Gillet Y., Saleem I., Satyanarayana Somavarapu S., Schwinté P., Benkirane-Jessel N., Keller L. (2016). Advanced Nanostructured Medical Device Combining Mesenchymal Cells and VEGF Nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization. *Nanomedicine (Lond)*. 11(18), 2419–2430.

1. Contexte et objectif

Actuellement, les procédures chirurgicales de réparations osseuses, requièrent encore toujours l'utilisation de tissus autologues additionnels (autogreffe, allogreffe ou xélogreffe) pour restaurer la fonctionnalité physiologique du tissu endommagé. Pour s'affranchir des complications associées avec ces techniques chirurgicales (comorbidités, quantités limitées, réactivités du tissu hôte et possible rejets, risques de transmission de pathogènes), de nouvelles stratégies d'ingénierie tissulaire basées sur les cellules et utilisant des biomatériaux sophistiqués ont été développées. Ces dernières années, des biomatériaux innovants mimant la MEC ont été conçus, basés sur l'environnement de cette matrice à l'échelle nanométrique et micrométrique (Dvir et al., 2011; Kane and Ma1, 2013; Gusić et al., 2014). Plus récemment avec le développement des biomatériaux de deuxième génération, il y eu un intérêt grandissant pour l'utilisation des nanoparticules (NPs) et des nanoréservoirs contenant des molécules actives pour permettre de rendre le dispositif médical implantable bioactif.

La régénération osseuse est un processus physiologique complexe, qui se déroule pour cicatrifier des fractures, et est impliqué dans le remodelage osseux durant la vie adulte. Par le passé, plusieurs matériaux ont été développés pour augmenter la réparation du tissu osseux. La première génération de biomatériaux développée impliquait des matériaux inertes sans aucune interaction avec les autres composés, avec l'exemple des prothèses. La seconde génération de biomatériaux (revêtement bioactif, biomatériaux mimant la MEC) a été développée pour promouvoir une activité biologique en supportant les fonctions de l'implant. La troisième génération est une combinaison entre un dispositif médical implantable et des composés cellulaires et possède les propriétés biodégradables et bioactives (Amini et al., 2012).

Les applications pour l'ingénierie tissulaire osseuse sont nombreuses et dépendent de la sévérité des lésions à cicatrifier. Le champ des prothèses vise à remplacer totalement une fraction d'os consécutivement à des traumatismes sévères ou à des complications issues de ces fractures. Les substituts osseux ciblent le comblement de défauts osseux pour des lésions de tailles intermédiaires (pouvant aller jusqu'à la taille de 60cm³), et se posent en amont en alternative à l'ablation et à la pose de prothèse. Ce domaine nécessite des biomatériaux qui imitent les propriétés de l'os physiologique. Récemment, le domaine de la médecine

régénérative a été développé pour réparer des lésions à des stades précoces et promouvoir la régénération tissulaire par des matériaux qui seront remplacés par un tissu biologiquement fonctionnel. L'objectif est d'intervenir en amont de situations où un comblement osseux par des substituts serait indiqué.

Chaque dispositif conçu pour réparer ou régénérer l'os doit exprimer une ou plusieurs de ces propriétés (Bauer and Muschler, 2000). L'ingénierie tissulaire osseuse s'est donc traditionnellement concentrée sur la combinaison entre des dispositifs ostéoconducteurs, des facteurs de croissance ostéoinductifs et des cellules ostéoprogénitrices ou encore des ostéoblastes pour réparer ou régénérer l'os. Le système vasculaire tient un rôle clé dans le tissu osseux. En fait, l'échange de nutriments et déchets entre les cellules et les capillaires dans le tissu osseux est limité à des distances allant de 100 à 300 μm (Mercado-Pagán et al., 2015). Concevoir des dispositifs médicaux autour de cette limite de diffusion est vital pour le succès de l'implantation, la vascularisation est sans doute le plus grand défi dans l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative, y compris l'ingénierie tissulaire osseuse.

La formation de vaisseaux sanguins dans un biomatériau tridimensionnel reste encore complexe à l'heure actuelle (Kaully et al., 2009; Tsigkou et al., 2010). Pour accélérer la vascularisation à l'intérieur d'un implant, plusieurs matériaux aux propriétés pro-angiogéniques furent développés, la majorité basée sur l'activité cellulaire (Guerrero et al., 2013; Sasaki et al., 2015), ou l'activité de facteurs additionnels (Wernike et al., 2010; Wang et al., 2015). Le facteur principal de l'angiogenèse est le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), plus précisément le VEGF₁₆₅ qui agit comme un initiateur ainsi qu'un modulateur de la cascade de signalisation résultant en une prolifération et une migration des cellules endothéliales pour la formation de nouveaux vaisseaux. De plus, le VEGF possède un rôle pivot dans la cicatrisation osseuse (Kleinheinz et al., 2005), et le relargage continu de ce facteur de croissance a été démontré comme étant garant d'une cicatrisation osseuse efficace (Wernike et al., 2010). Le VEGF ne servira pas uniquement à la prolifération des cellules endothéliales, mais il pourra également recruter des macrophages et des cellules mononuclées, qui produiront à leur tour des facteurs angiogéniques additionnels (Grunewald et al., 2006).

Durant les dernières années, des dispositifs implantables associés à des cellules endothéliales ont donc été créés avec le but de promouvoir la vascularisation des biomatériaux (Baignera and Ribatti, 2013). D'autres études ont rapporté le développement de nanoparticules (NPs)

chargées de VEGF pour l'ingénierie tissulaire osseuse. La plupart de ces études offrent un relargage contrôlé de VEGF dépendant de plusieurs paramètres (température, pH, etc.) (Geng et al., 2011; Mohandas et al., 2015).

L'objectif est de développer une stratégie permettant à un matériau d'accélérer le recrutement vasculaire. Pour ce faire, notre étude s'est concentrée sur une encapsulation de facteur angiogénique (VEGF) dans des nanoparticules. Ces nanoparticules ont été intégrées à l'implant par la technologie de nanoréservoirs, pour obtenir un accès dépendant du contact cellulaire aux NPs contenant du VEGF sur une matrice tridimensionnelles nanostructurée à base de PCL électrospinné. Afin d'étudier l'efficacité du matériau actif *in vitro*, nous avons utilisé les cellules endothéliales HUVECs. Les cellules HUVECs sont facilement extraites et obtenues en large nombre. Ces cellules sont fréquemment utilisées *in vitro* dans les études d'angiogenèse, car elles sont capables de s'organiser spontanément en structures « capillaires-like », sans l'aide de facteurs de croissance additionnels angiogéniques et peuvent spontanément s'anastomoser avec la vascularisation hôte (Arnaoutova and Kleinman, 2010). De plus, des cellules mésenchymateuses ostéoblastiques (hObs) ont été utilisées pour augmenter l'efficacité de la construction de notre implant actif, premièrement en permettant l'adhésion aux HUVECs et ensuite en adoptant des propriétés de cellules murales.

2. Résultats et discussion

Nous avons développé un implant actif tridimensionnel équipé de nanoréservoirs contenant des NPs de VEGF. Notre équipe a auparavant développé un implant 3D nanostructuré et poreux de PCL par la méthode d'électrospinning pour la régénération osseuse (Eap et al., 2015a). Cet implant présente des micropores et des macropores interconnectés constitués de nanofibres capables d'imiter le collagène présent dans la MEC du tissu osseux physiologique pour favoriser la colonisation des vaisseaux sanguins. La haute porosité de ce biomatériau et une interconnexion augmentée des pores permet d'augmenter l'infiltration et la colonisation cellulaire (Eap et al., 2015b). Dans cette étude, nous avons d'abord conçu des nanoparticules incorporant le VEGF (en collaboration avec le Professeur Imran Saleem de l'université John Moores, Liverpool) pour équiper nos nanofibres. Ces nanoparticules sont composées soit de chitosane, soit d'un mélange chitosane/acide hyaluronique formant la coque des NPs. Ces nanoparticules sont synthétisées par la méthode de gélation ionotropique, avec du VEGF encapsulé à l'intérieur des constructions. Les nanoparticules ont une taille de $175 \pm 4,1 \text{ nm}$ pour les NPs à base de chitosane seule et de $167 \pm 10,6 \text{ nm}$ pour les NPs à base de

mélange chitosane/acide hyaluronique. L'observation des deux types de NPs en microscopie électronique à transmission (MET) n'a pas montré de différence significative dans la taille et la forme des deux types de constructions. La condition optimale pour obtenir un dépôt homogène le long des nanofibres a été de préparer une solution composée de chitosane (500mg.mL^{-1}) avec une concentration de NPs de 2mg.mL^{-1} représentant le polycation, et la BSA (200 ng.mL^{-1}) représentant le polyanion. Ce dépôt homogène de nanoréservoirs contenant des NPs incorporant le VEGF le long des nanofibres a été observé par des études de colocalisation avec de la BSA marquée à l'or, remplaçant la BSA. Nous avons ainsi pu obtenir un implant tridimensionnel équipé de nanoréservoirs contenant des NPs de VEGF de manière homogène à la surface des nanofibres.

Nous avons ensuite voulu tester le comportement des cellules HUVECs au contact des nanoparticules de VEGF. Pour cela, et parce que ces cellules nécessitent des motifs collagéniques pour pouvoir adhérer à la surface d'un biomatériau, nous avons utilisé un gel de collagène pour augmenter l'adhérence à la surface de notre implant. Le comportement des cellules dans le gel a été d'abord observé par des études en fluorescence. En présence de ces NPs, les cellules HUVECs ont montré une organisation régulière et linéaire ressemblant à des tubules, comparé aux HUVECs cultivées sans NPs contenant du VEGF. Etant donné que l'organisation des cellules endothéliales en réseau a été obtenue dans des gels de collagène de type I en présence de NPs de VEGF, nous avons ensuite analysé le comportement de ces cellules dans l'implant tridimensionnel doté de NPs de VEGF dans des nanoréservoirs. Dans ces conditions, le test à l'Alamar Blue[®] n'a pas montré de différence significative entre les deux conditions (fonctionnalisé par rapport à non fonctionnalisé) à chaque temps de culture, prouvant la biocompatibilité des implants nanofibreux équipés de NPs de VEGF avec les cellules endothéliales. Cependant, une différence significative a été observée pour l'implant non fonctionnalisé entre le 3^{ème} et le 28^{ème} jour de culture *in vitro*. Ceci peut être expliqué par la perte de gel de collagène contenant les cellules endothéliales durant le temps d'incubation. La réorganisation des cellules endothéliales a également été observée pour l'implant tridimensionnel actif. Ainsi, nous avons démontré que notre implant actif pouvait accélérer la réorganisation des cellules endothéliales.

Pour s'affranchir de l'utilisation d'un gel de collagène sur nos implants, nous avons étudié la stratégie de pré-ensemencement de cellules HUVECs par des cellules mésenchymateuses adultes d'ostéoblastes (hObs) qui pourraient permettre l'adhésion de cellules endothéliales sur notre implant polymérique. En fait, les cellules d'origine mésenchymateuse, de par leurs

capacités à sécréter de la MEC ont été exploitées pour augmenter l'adhérence cellulaire sur des matériaux non-collagéniques (Xu et al., 2014). De plus, les hObs et les cellules souches mésenchymateuses sont connues pour augmenter la stabilité de la formation de structures tubulaires des cellules endothéliales *in vitro* (voir en **Annexe 1** une étude portant sur un ensemencement séquentiel entre des hCSMs et des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs) sur un support tridimensionnel collagénique doté de facteur de croissance angiogénique) et *in vivo* (Tsigkou et al., 2010; Pill et al., 2015). Nous avons d'abord analysé la biocompatibilité des implants actifs et pré-ensemencés par des hObs, puis recouverts par des cellules HUVECs. Les analyses ont montré une augmentation de l'activité métabolique durant toute la culture. Au 14^{ème} jour, une différence significative est apparue pour les implants contenant des nanoréservoirs contenant des NPs de VEGF, montrant une activité métabolique plus importante. De plus, au 28^{ème} jour de culture *in vitro*, des structures endothéliales semblables à des tubules ont été plus souvent retrouvées pour les implants actifs. Ces résultats ont été obtenus par immunofluorescence indirecte dirigée contre un marqueur spécifique des cellules endothéliales (CD31). Les cellules endothéliales ont ainsi pu adhérer sur le socle cellulaire fourni par les cellules mésenchymateuses pré-ensemencées, et former des réseaux capillaires sur cette matrice tridimensionnelle.

Nous avons par la suite implanté ce dispositif médical actif (présence de nanoréservoirs contenant des NPs de VEGF) et vivant (hObs+ HUVECs) en sous-cutané chez la souris nude pour observer le comportement des cellules endothéliales hôtes. Après 4 et 8 jours d'implantation, une observation macroscopique a montré que les dispositifs dotés de nanoréservoirs étaient capables d'augmenter le recrutement vasculaire de l'hôte de 20%.

Durant la dernière décennie, des essais ont été entrepris pour accélérer la vascularisation dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse (Grunewald et al., 2006; Kaully et al., 2009). Les stratégies simples utilisant des implants se sont d'abord concentrées sur l'utilisation de cellules endothéliales (HUVECs, progéniteurs endothéliaux (EPC, de l'anglais Endothelial Progenitor Cells)) puis sur l'utilisation de molécules actives (VEGF, Ang1), agissant sur ces cellules pour promouvoir la prolifération, la migration, le bourgeonnement et l'établissement de nouveaux vaisseaux sanguins fonctionnels. Le VEGF joue un rôle clé dans la réparation et le remodelage osseux. Cependant, si une dose excessive de ce facteur de croissance est libérée dans un temps court, ceci peut conduire à la genèse de vaisseaux imparfaits et non fonctionnels voire la progression de tumeurs. La stratégie adoptée de double encapsulation par la même espèce (chitosane), formant à la fois la coque des NPs, et le revêtement des

nanoréservoirs permet d'obtenir un relargage continu dans le temps et contrôlé par l'activité cellulaire.

Avec la combinaison des deux stratégies sur un même biomatériau (NPs de VEGF et utilisation d'hObs), il a été possible d'accélérer le recrutement vasculaire pour l'implant *in vivo*. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le VEGF dans la construction n'était pas uniquement accessible de par les NPs, mais aussi que les cellules hObs et HUVECs utilisées secrètent en synergie une quantité plus importante de facteurs angiogéniques comparé aux cellules HUVECs seules (Clarkin et al., 2008). De plus, l'accès des hObs aux NPs de VEGF peut directement augmenter la prolifération et la migration de ces cellules (Athanasopoulos et al., 2007). Ainsi, dans cette double stratégie, les cellules endothéliales vont adhérer au biomatériau dopé en NPs de VEGF par la sécrétion au préalable de MEC par les ostéoblastes. Les hObs, dégradant les nanoréservoirs, vont avoir accès au VEGF et vont pouvoir sécréter des facteurs angiogéniques utilisables par les cellules endothéliales.

3. Conclusion

Ce travail a permis de développer une stratégie pour un implant actif afin de permettre une accélération de l'organisation cellulaire des cellules endothéliales. Cette stratégie peut augmenter la vascularisation *in situ* et peut ainsi améliorer le potentiel de réparation du tissu osseux *in vivo*. Dans cette étude, un implant nanostructuré de PCL électrospinné, hautement poreux, a été rendu actif par des nanoréservoirs contenant des nanoparticules de VEGF et a permis d'accélérer la vitesse de réorganisation des cellules endothéliales. Le dispositif implantable, actif non seulement par le facteur de croissance pour les cellules endothéliales, mais aussi par la présence de cellules ostéoblastiques pré-ensemencées, offre un relargage contrôlé par les cellules dans le temps de molécules angiogéniques pour des applications dans l'ingénierie tissulaire osseuse. Ce double effet obtenu *in vivo* avec ce dispositif, actif et vivant, pourrait être transférable à la clinique, en utilisant le potentiel thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses.

Advanced nanostructured medical device combining mesenchymal cells and VEGF nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization

Aim: Success of functional vascularized tissue repair depends on vascular support system supply and still remains challenging. Our objective was to develop a nanoactive implant enhancing endothelial cell activity, particularly for bone tissue engineering in the regenerative medicine field. **Materials & methods:** We developed a new strategy of tridimensional implant based on cell-dependent sustained release of VEGF nanoparticles. These nanoparticles were homogeneously distributed within nanoreservoirs onto the porous scaffold, with quicker reorganization of endothelial cells. Moreover, the activity of this active smart implant on cells was also modulated by addition of osteoblastic cells. **Results & conclusion:** This sophisticated active strategy should potentiate efficiency of current therapeutic implants for bone repair, avoiding the need for bone substitutes.

First draft submitted: 29 April 2016; Accepted for publication: 20 July 2016; Published online: 16 August 2016

Keywords: endothelial cells • nanoreservoirs • VEGF nanoparticles

Surgical reconstructive procedures frequently require the use of additional tissues (autograft, xenograft, allograft) to restore the physiological functionality of damaged tissues. To overcome the complications associated with these methodologies (site morbidity, limited availability and host tissue reactivity), cell-based tissue-engineering strategies using sophisticated biomaterials have been developed. In the recent years, a plethora of advanced biomaterials mimicking extracellular matrix were designed, based on the micro- and nanoscale environment of tissues, using nanotechnologies such as graphene, nanogrooves and carbon nanotubes [1–8]. More recently, and with the development of the third-generation materials, there has been an increasing interest in developing nanoparticles (NPs) and nanoreservoirs containing active molecules able to bioactivate scaffolds [9–14].

Bone regeneration is a complex, well-orchestrated physiological process, which occurs

during normal healing of fractures, and is involved in continuous remodeling throughout adult life. In the past, a lot of active materials have been developed to improve bone tissue repair *in vivo* [15–18]. The first generation of biomaterials developed involved inert materials without any interaction with other components (prostheses...). Second-generation biomaterials (bioactive coating, biomimicking materials) were developed to promote biological activity while supporting implant functions, and were either resorbable or bioactive. The third-generation biomaterials are a combination between medical device and biological components (bioactive protein coating, endothelialization) and possess both bioresorbable and bioactive properties [19,20].

Applications for bone tissue engineering are various and depend on the severity of injuries to repair. The prosthesis domain aims at the replacement of bone after ablation due to severe injuries. The bone substitutes domain targets the substitution of bone-by-bone sub-

Quentin Wagner^{1,2}, Damien Offner^{1,2}, Ysia Idoux-Gillet^{1,2}, Imran Saleem³, Satyanarayana Somavarapu⁴, Pascale Schwinté^{1,2}, Nadia Benkirane-Jessel^{1,2} & Laetitia Keller^{1,2}

¹INSERM (French National Institute of Health & Medical Research),

"Osteoarticular & Dental Regenerative Nanomedicine" Laboratory, UMR 1109, Faculté de Médecine, F-67085 Strasbourg Cedex, FMST, France

²Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 place de l'Hôpital, F-67000 Strasbourg, France

³School of Pharmacy & Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, Liverpool, L3 3AF, UK

⁴Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, University College London, 29-39 Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK

*Author for correspondence:

Tel.: +33 368 853 376
nadia.jessel@inserm.fr

[†]These authors contributed equally

stitute in the case of important lesions (up to 60 cm³), to prevent ablation. This domain needs materials that mimic the mechanical properties of healthy bone. More recently, the domain of regenerative medicine was developed to operate at an early stage, and promote the tissue regeneration by materials totally replaced by a functional and biological tissue without clear high mechanical properties. The aim is to avoid reaching the stage of filling by substitute. During the last few years, sophisticated biomaterials for bone regenerative medicine were developed in clinic, for example, in treatment of nonunion fractures or with guided tissue regeneration in the periodontal disease treatment. Those materials can be made bioactive by adding living cells or active growth factors. Among these strategies for bone tissue regeneration, two kinds of active materials can be considered: materials combined with active molecules targeting bone tissue regeneration (BMP-2, BMP-7) [15–18,21–26]; or active materials indirectly acting on bone repair through combination with angiogenic factors (VEGF, Ang1) [27–32], which have gained increased attention recently.

Indeed, vascularization of biomaterials prior to their implantation is a key feature for tissue repair as establishment of a vascular network provides nutrients, soluble factors, phosphate and calcium necessary for the bone healing process. For healthy tissue repair, the formation of blood vessels in 3D-engineered biomaterials still remains challenging today [27–29,33]. In order to increase vascularization within the implanted site, several active angiogenic materials were developed with majority based on cell activities [34–36] or added factors activity [30–32]. One of the main growth factors involved in angiogenesis is VEGF₁₆₅ which acts as an initiator and a modulator of the signaling cascade resulting in proliferation and migration of endothelial cells toward formation of new blood vessels [37,38]. Moreover, VEGF possesses a pivotal role during bone healing [38], and the sustained release of this growth factor was shown to promote the efficacy of bone regeneration [30]. Not only does VEGF activate proliferation and migration of endothelial cells, but it also recruits mononuclear and macrophage cells, which produce additional angiogenic factors [39]. Consequently, during the last few years, tridimensional scaffolds associated with endothelial cells were developed for the cell-based strategy with the goal to promote biomaterials vascularization [33–36]. Various studies have reported the development of VEGF-loaded NPs for bone regeneration, wound-healing angiogenesis, or inhibition of the graft shrinkage [40–43]. Most of these models offer a controlled release of VEGF, depending on various parameters (temperature, pH, ...). Herein, *via* entrapping VEGF-NPs in active nanoreservoirs,

we obtain cell contact-dependent access of NPs, depending solely on cells biological needs, avoiding short-lived effect and instability [44]. Moreover, this strategy of nanoreservoirs with chitosan allows keeping NPs with the biomaterials into the site of damage, and protects them from degradation activity due to their short life span, contrary to a passive release and diffusion *in situ*. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) are easily extractable and expanded to large numbers. These cells are frequently used for *in vitro* studies of angiogenesis since they are able to spontaneously organize into capillary-like structures without the help of additional angiogenic growth factors, and can spontaneously anastomosis with the host vasculature [29,45,46].

Recently, we developed by some electrospinning method a thick porous 3D nanofibrous poly(ϵ -caprolactone) (3D-PCL) scaffold able to accelerate the regeneration of a robust mineralized bone [22,23,47]. Herein, we have developed a double strategy combining both HUVECs and VEGF-NPs-active 3D nanofibrous scaffold to improve vascularization in tissue engineering for regenerative medicine applications focusing on bone regeneration. VEGF-NPs were used and integrated to the scaffold employing the layer-by-layer (LbL) technology, enabling an active cell-dependent release of the active molecule [14,48]. Moreover, mesenchymal cells (HOBs) were used to increase the efficiency of the designed nanoactive 3D scaffold, first by adhesion of endothelial cells (HUVECs), and then by improving endothelial cells activity.

Materials & methods

3D nanofibrous PCL scaffold preparation

PCL 80 kDa, analytical grade, was obtained from Perstorp (Malmö, Sweden). The PCL solution was prepared as previously described [22,23,47]: a solution of PCL (23% w/v in dimethylformamide: methylene chloride 1:1 v/v) was electrospun at high voltage (20 kV at the beginning), which was increased during the process (ending at 26 kV). The electrospinning device (EC-DIG electrospinning apparatus; IME Technologies, Eindhoven, Netherlands) delivered the solution at a constant rate of 1.2 ml/h in a 35% humidity and 30°C atmosphere. The distance between the needle and the collector was set at 16 cm. The electrospun jet was focused in a 25 mm hole within a 2.5 mm thick poly(methyl methacrylate) mask plate placed over the conductor. The electrospinning process was stopped when the designed material reached a thickness around 10 mm. Pieces of 3 mm diameter and 700 μ m of thickness were then cut for the experiments. The 3D electrospun nanofibrous membranes were kept in a desiccator at 45°C to remove residual solvents.

Preparation of VEGF-NPs & VEGF-NPs (hyaluronic acid)

Chitosan hydrochloride (CS; 30–400 kDa, HEPPE medical chitosan GmbH (HMC[®]), Germany) NPs were produced using an ionotropic gelling method. Sodium tripolyphosphate (TPP) (85%, Sigma-Aldrich Co., MO, USA) solution (1 mg/ml) was added dropwise to CS solution (1 mg/ml) at a ratio of 1:5 w/w under constant stirring at room temperature. The resultant NPs suspension was left under stirring for 20 min to ensure complete particle formation. hVEGF₁₆₅-loaded NPs were obtained using the same method incorporating VEGF (VEGF-NPs) 200 µl (0.05% w/v) with TPP solution. Chitosan/hyaluronic acid (HA) NPs were prepared by the same ionotropic gelling method, with modifications. HA (10–20 kDa, Lifecore Biomedical, Chaska, Minnesota, USA; 0.625 mg/ml) was dissolved in ultrapure water and mixed with TPP solution (1 mg/ml) at a ratio 3.75:1 w/w under constant stirring at room temperature. This polyanionic phase was then added dropwise to CS (1 mg/ml) at a ratio of 1:1.80 w/w (HA/TPP: CS) under constant stirring at room temperature. VEGF-NPs (HA) were obtained using the same method incorporating VEGF (VEGF-NPs [HA]) 200 µl (0.05% w/v) with TPP/HA solution. To obtain dry powders, all were freeze-dried. Samples were frozen at -80°C, 24 h with trehalose at ratio 1:8 (Trehalose: CS) and then freeze-dried for 28 h (Virtis Advantage, SP Scientific, PA, USA).

Nanoparticles' size characterization

Particle size analyses of freeze-dried samples were performed using dynamic light scattering (Zetasizer Nano series DTS 1060, Malvern Instruments Ltd, UK). Two milligrams of VEGF-NPs and VEGF-NPs (HA) were dispersed in 2 ml of 2-N-morpholino ethane sulfonic acid (MES) buffer (Sigma-Aldrich Co., 0.04 M MES, 0.15 M NaCl, pH 5.5), loaded into a cuvette and data recorded at 25°C (n = 3 suspensions).

Poly-lysine fluorescein-isothiocyanate staining of VEGF-NPs

Glass slides were treated with poly-glutamic acid (Sigma-Aldrich) (500 µm/ml) for 15 min, rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min followed by addition with VEGF-NPs (3 mg/ml) for 15 min at room temperature. Finally, samples were rinsed in PBS for 15 min and then with poly-lysine fluorescein-isothiocyanate for 15 min. Glass slides were then observed under an epifluorescent microscope (LEICA DM 4000 B, Leica Microsystems, France).

Transmission electron microscopy observation

For visualization of VEGF-NPs and VEGF-NPs (HA), freeze-dried sample was dispersed in water and applied

to an electronic microscopy copper grid and stained with 2% phosphotungstic acid solution. The NPs were imaged by transmission electron microscopy (TEM) using an FEI CM 120 BioTwin transmission electron microscope (Philips Electron Optics BV, Netherlands) using acceleration voltage 120.0 kV (CM120, Philips Co., The Netherlands).

VEGF-NPs nanoreservoirs formation on 3D-PCL scaffold

VEGF-NPs were dissolved at 2 mg/ml in MES buffer (pH 5.5) and chitosan was added at a concentration of 0.5 mg/ml (Protasan UP CL 113, Novamatrix, Sandvika, Norway). The creation of nanoreservoirs containing VEGF-NPs on the nanofibers was carried out using the LbL technology: briefly the 3D electrospun scaffold was dipped six-times during 15 min alternately in solutions of NPs and bovine serum albumin (BSA) gold (Aurion, Binnenhaven, Wageningen, The Netherlands) or BSA (200 ng/ml; Euromedex, Souffelweyersheim, France). Each bath was followed by a rinsing step with MES buffer.

Scanning electron microscopy observation

To analyse the morphology of the functionalized 3D-PCL scaffolds, samples were fixed in paraformaldehyde 4% for 10 min at 4°C, then dehydrated and observed with a scanning electron microscope (SEM Hitachi TM 1000 or FEG Sirion XL; FEI) in conventional mode (high vacuum) by collecting either secondary electrons or a combination of secondary and retro-diffused electrons.

Cell culture

HUVECs and human primary osteoblasts (HOBs) were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany). The cells were cultured in specific growth medium (endothelial cell growth medium, osteoblast growth medium, respectively, PromoCell). The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. When cells reached confluence, they were harvested with trypsin (Ozyme, France) and subcultured.

HUVECs culture in collagen gel

HUVECs culture medium was mixed with collagen I (2 mg/ml; Institut de biotechnologie Jacques Boy, Reims, France), and NaOH (0.1 M) was added to adjust the pH of the preparation. The cellular suspension of HUVECs, containing or not VEGF-NPs (2 mg/ml), was added and the final solution was seeded on 3D-PCL scaffolds or in small Petri dishes, in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂ to polymerize the collagen gel. Cells in collagen gel on scaffolds were

then cultured in their corresponding growth medium in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂.

Cell viability

Alamar Blue® (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) was used to assess cell metabolic activity over time. In this study, 4×10^4 human osteoblasts were first seeded on 3D-PCL scaffolds containing or not nanoreservoirs of VEGF-NPs. After 7 days, 4×10^4 HUVECs were seeded on this precoated scaffold, and samples were cultured during a total of 28 days in a proliferative medium consisting of 50% HOB medium/50% HUVEC medium. Analyses were performed at days 7, 9, 14, 21 and 28 by culturing cells with a solution of 10% Alamar Blue/Dulbecco's Modified Eagle's Medium without phenol red (Lonza, Levallois-Perret, France) during 4 h in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. The same experiments were performed with HUVECs cells in collagen gel seeded on 3D-PCL equipped or not with VEGF-NPs (days 3, 7, 14, 21 and 28). Optical density of supernatants was measured at 575 and 590 nm in order to determine the percentage of Alamar Blue reduction. Statistical analyses were obtained by *t*-paired Student test.

Subcutaneous *in vivo* implantation in nude mice

All procedures regarding animals and tissues were designed in agreement with the recommendations of the EU (2010/63/EU), and were performed according to authorized investigator Dr N Jessel (Director of the Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine team), holder of a personal license from Préfecture du Bas-Rhin (number 67–315), who oversaw experiments done on mice. All experiments were performed in the Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine de Strasbourg with the approval number A 67–482–35 from the Veterinary Public Health Service of the Préfecture du Bas-Rhin, representing the French Ministry of Agriculture, Department of Veterinary Science.

The study involved nude male mice (CrI: NIH-Foxn1tm; Charles River, L'arbresle, France) 6 weeks of age. The mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of 100 mg/kg of ketamine (VIRBAC Santé Animale; Centravet, Nancy, France) and injection of 10 mg/kg of Xylazine (Rompun® 2%, VIRBAC Santé Animale; Centravet, France) and animals were placed in a ventral decubitus position on a heating plate, under strict aseptic conditions. After skin incision, 3 mm long 3D-PCL scaffolds, with and without VEGF-NPs nanoreservoirs, which had been seeded with HOBs and HUVECs for 2 weeks (14 days), were subcutaneously implanted in the mice. The skin was then sealed with sutures and the mice' behavior was

observed after waking up and during the incubation time. The mice were sacrificed with an intraperitoneal injection of a lethal dose of ketamine and the samples were extracted after 4 and 8 days of implantation.

Immunofluorescence staining

Samples were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 10 min at 4°C and permeabilized with a 0.1% Triton X-100 solution for an hour at room temperature. To specifically label the surface of endothelial cells, samples were incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti-CD31 (1/400, Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA), followed by 1 h incubation at room temperature with the secondary anti-IgG of mouse coupled to Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Fisher Scientific, France). Samples were then incubated for 20 min in a solution of Alexa fluor 546-conjugated phalloidin (1/200, Life Technologies, Fisher Scientific). After this step, a solution of 200 nM DAPI (Sigma-Aldrich) was added to mark the nuclei of exposed cells. Observation of the samples was carried out using an epifluorescence microscope (Leica DM 4000 B).

Results

VEGF-NPs to design a nanoactive 3D biomaterial

To increase the efficiency of tissue repairing *in vivo*, we developed an active tridimensional biomaterial equipped with VEGF-NPs. Our team previously developed a 3D porous PCL scaffold (Figure 1A) by the electrospinning method, for bone regeneration [22,23,47]. As previously described, this 3D-PCL implant (Figure 1B) presents a superposition of spaced stratified layers of PCL nanofibers, facilitating macropores formation. This is an interconnected microporous/macroporous scaffold, constituted of nanofibers (700 μm of thickness; fibers of 689 ± 45 nm in diameter) able to mimic the collagen present in the extracellular matrix of healthy bone tissue, in favor of blood vessel colonization [22,23,47]. In this study, to make this 3D nanofibrous scaffold active, we first manufactured VEGF-NPs, and then added these to our 3D biomaterial. The VEGF-NPs are composed of chitosan forming the shell of the NPs, and VEGF encapsulated within the NPs. These VEGF-NPs were obtained by inotropic gelling and freeze-drying method (Figure 1C). These NPs have a mean size of 175.4 ± 4.1 nm for VEGF-NPs and 167.5 ± 10.6 nm for VEGF-NPs containing HA (VEGF-NPs [HA]) (Figure 1D). These observations, together with transmission electron microscopy observations (Figure 1E & F), did not show significant differences in size between the two types of VEGF-NPs. Then, we functionalized the 3D scaffold (Figure 2) by depositing VEGF-NPs. To this end, we employed our nanores-

ervoirs technology using the LbL technique [14]. After having tested different concentrations of VEGF-NPs to form the nanoreservoirs with chitosan solutions, we have found that the optimal condition to obtain a homogeneous deposition of NPs all along nanofibers of the scaffold, and throughout all the thickness of our 3D nanofibrous PCL, was a VEGF-NPs concentration of 2 mg/ml (data not shown). The LbL (BSA/VEGF-NPs)₆-treated nanofibers (Figure 2B) showed a more homogeneous deposition of VEGF-NPs encapsulated within nanoreservoirs all along the fibers (Figure 2B), confirmed by co-localization with gold-labeled BSA LbL (Figure 2C), compared with a single adsorption of VEGF-NPs (Figure 2A). Hence, we were able to design a porous tridimensional scaffold mimicking extracellular matrix (ECM) and homogeneously equipped with VEGF-NPs, ready to receive endothelial cells.

VEGF-NPs active 3D scaffold effect on endothelial cells

As endothelial cells require collagen motifs to adhere to a biomaterial, we used collagen gel to increase endothelial cells adhesion to the 3D-PCL scaffold. Behavior of endothelial cells in the presence of VEGF-NPs was first analyzed and results were observed by fluorescence staining. In the presence of VEGF-NPs, endothelial cells showed regular linear, tubule-like, cell organization (Figure 3C), compared with HUVECs cultured without additional VEGF-NPs (Figure 3B). As the endothelial cells organization in the presence of VEGF-NPs was confirmed in the collagen gel, we next analyzed the behavior of endothelial cells on the VEGF-NPs-active 3D-PCL scaffold. In this condition, Alamar Blue test showed no significant difference between cells cultured on VEGF-NPs scaffold and nonfunctionalized scaffold at each time point (Figure 3A), showing biocompatibility of VEGF-NPs nanofibrous scaffold with endothelial cells. However, significant difference was found for the nonfunctionalized scaffold between days 3 and 28. This result could be explained by a loss of collagen gel containing endothelial cells, during the incubation time. Endothelial cells reorganization was also observed in this active tridimensional material (Figure 3E). Hence, we showed that our 3D-PCL scaffold equipped with VEGF-NPs was active, and biocompatible for rapid endothelial cells activity and reorganization.

Double effect of VEGF-NPs active 3D-PCL & osteoblasts on endothelial cells

We sequentially used mesenchymal cells (HOBs) as a coating of VEGF-NPs active 3D-PCL, for the adhesion of endothelial cells.

We first investigated the biocompatibility of our 3D VEGF-NPs-active nanofibrous material preseeded with

HOBs during 7 days, and then covered by endothelial cells. Analysis showed an increase in the metabolic activity all along the culture and after seeding of endothelial cells on HOBs (Figure 4A). Interestingly, the metabolic activity was more important when endothelial cells were seeded on an HOB precoated VEGF-NPs active scaffold (Figure 4A) compared with cells seeded in collagen gel (Figure 3). At day 14, a significant difference occurred with cells cultured on VEGF-NPs biomaterials, showing more significant metabolic activity than cells without VEGF-NPs ($p = 0.018$) (Figure 4A). Moreover, at day 28, more tubule-like endothelial structures were observed on the VEGF-NPs 3D-PCL scaffold (Figure 4C). These results were observed by indirect immunofluorescence against endothelial-specific marker CD31 (Figure 4B & C). Endothelial cells (visible in green) were first able to adhere to the scaffold without any collagen gel (Figure 4B) and second, they were able to form tubule-like and linear structures on this double active implant (Figure 4C). We then subcutaneously implanted our double active scaffold in nude mice to observe its influence on host endothelial cells (Supplementary Figure 1). After 4 and 8 days *in vivo*, the macroscopic view of the implant revealed that when equipped with VEGF-NPs nanoreservoirs (NRs), it was able to increase the host vasculature recruitment (host endothelial cells) toward implant by 20% compared with nonfunctionalized one (Supplementary Figure 1). These results show the potential double activity of our scaffold with regard to endothelial cells. The effect of our implant on tubule-like structures formation was obtained by the addition of VEGF-NPs and improved by the precoating with human osteoblast cells HOBs.

Discussion

VEGF-NPs encapsulated in nanoreservoirs on a 3D scaffold to accelerate implant vascularization

In the last decade, a large variety of active biomaterials have been developed for tissue engineering [1,12–14,21–26,49–60]. Focusing on either cartilage or bone tissue regeneration and controlled and active release of growth factor, our team has developed several active nanofibrous materials equipped with active nanoreservoirs of BMP-2 and BMP-7 [14,21–26]. These natural collagen (Bio-Gide[®], Geistlich Pharma, France SA) or polymeric (PCL) implants showed great potential in regenerative nanomedicine for bone regeneration with primary autologous cells (human mesenchymal stem cells, HOBs) [14,21–26]. The tridimensional electrospun PCL nanofibrous scaffold appeared to be promising due to its biomimicking architecture, with high porosity and enhanced pore interconnectivity, improving cell colonization and infiltration [22,23]. Particularly for bone tissue

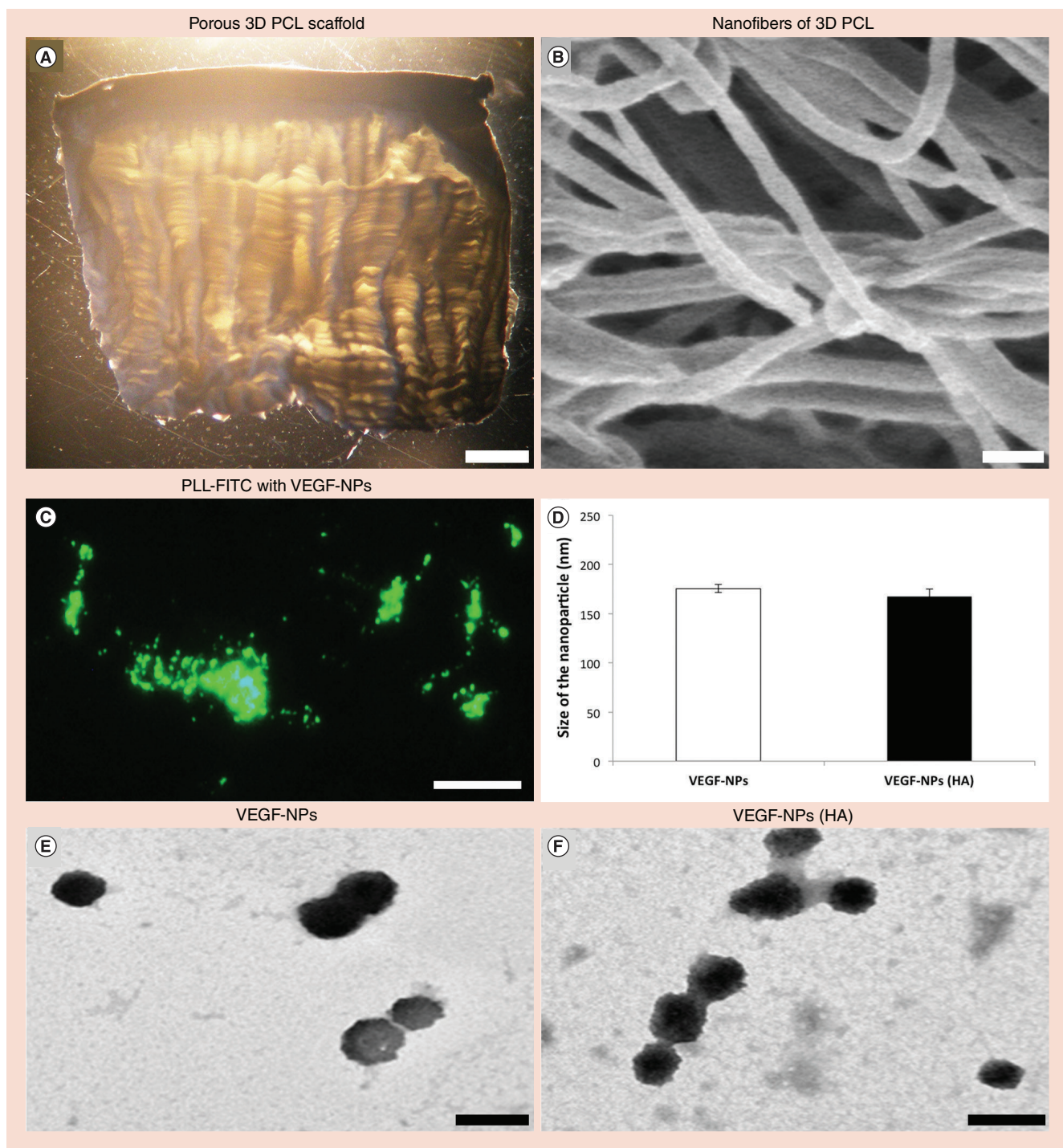


Figure 1. (A) Macroscopic view of the tridimensional nanofibrous PCL porous scaffold. (B) SEM image of nanofibers forming the 3D-PCL scaffold. (C) Fluorescence visualization of the VEGF-NPs, coated with PLL-FITC after adsorption on glass. (D) Size measurement of the VEGF-NPs (designed with chitosan or a mixture of chitosan/hyaluronic acid) determined by dynamic light scattering ($n = 3$). All values are expressed as mean \pm SEM. (E & F) TEM pictures of the VEGF-NPs confirming their size and shape. Scale bars: (A) 2 mm, (B) 400 nm, (C) 1 μ m, (E & F) 200 nm. FITC: Fluorescein isothiocyanate; HA: Hyaluronic acid; NP: Nanoparticle; PCL: Poly(ϵ -caprolactone); PLL: Poly-L-lysine.

engineering and blood supply during the early stages of postimplantation, it is necessary to provide a fast and sufficient blood perfusion within implants for calcium and phosphorus distribution, nutrients and oxygen dif-

fusion, and elimination of wastes. Bone healing can be improved by adjusting the speed of vascularization, and during the last 5 years, attempts have been made to increase vascularization in the tissue-engineering field [27–29,33,38,39]. Hence, basic strategies using scaffolds focused first on the use of cells (HUVEC, EPC) [30–32], and second on the use of active molecules (VEGF, Ang1.) operating on endothelial cells [34–36] to promote proliferation, migration, sprouting and establishment of functional blood vessel. In our strategy, we chose to use not only VEGF active molecules (VEGF-NPs), but also endothelial and mesenchymal cells. VEGF plays a pivotal role in bone healing and remodeling. Moreover, if a local excessive dose of VEGF is released over a short time period, this leads to generation of nonfunctional and leaky blood vessels. To this end, a more sustained release over time is required to promote angiogenesis [30], which is the case in our strategy of nanoreservoirs. Hence, the effects of VEGF on biological processes are dose dependent. Our technology of nanoreservoirs created by LbL allowed a homogeneous distribution of VEGF-NPs all over the scaffold and enabled an active and controlled release of VEGF-NPs, dependent on the cells contact to the nanoreservoirs [14,48]. In our strategy, HUVECs cells will recognize and adhere to chitosan, whether it is present on NPs or in our nanoreservoirs functionalization. In the case of active nanoreservoirs, cells will degrade nanoreservoirs by enzymatic reaction and will have an access to the NPs containing VEGF. Moreover, encapsulated active molecules represent a major advantage considering the short half-life of the VEGF (50 min). Our nanoreservoir technology overcomes potential damages that can occur to VEGF by protecting it within nanoreservoirs.

Double effect of VEGF-NPs & mesenchymal cells (HOBs) on endothelial cells organization

Our nanofibrous scaffold was obtained from polycaprolactone by electrospinning. This nanostructured material has already shown its efficacy in terms of bone regeneration with mesenchymal stem cells and primary human osteoblastic cells [14,21–23]. Moreover, this 3D material leads to a homogeneous attachment of osteoblastic cells [14,21–23]. When dotted with chitosan-growth factor nanoreservoirs, 3D-PCL allows cell adhesion specifically in clusters onto the nanoreservoirs, contrary to nonfunctionalized PCL. The adherence of osteoblastic cells in clusters will further create a cluster of endothelial cells adhesion, where these cells will reorganise, thanks to the angiogenic environment provided by osteoblastic cells. However, adhesion of endothelial cells requires collagen moieties [61,62]. Hence, in this study we used a collagen gel to improve endothelial cells adhesion. In these condi-

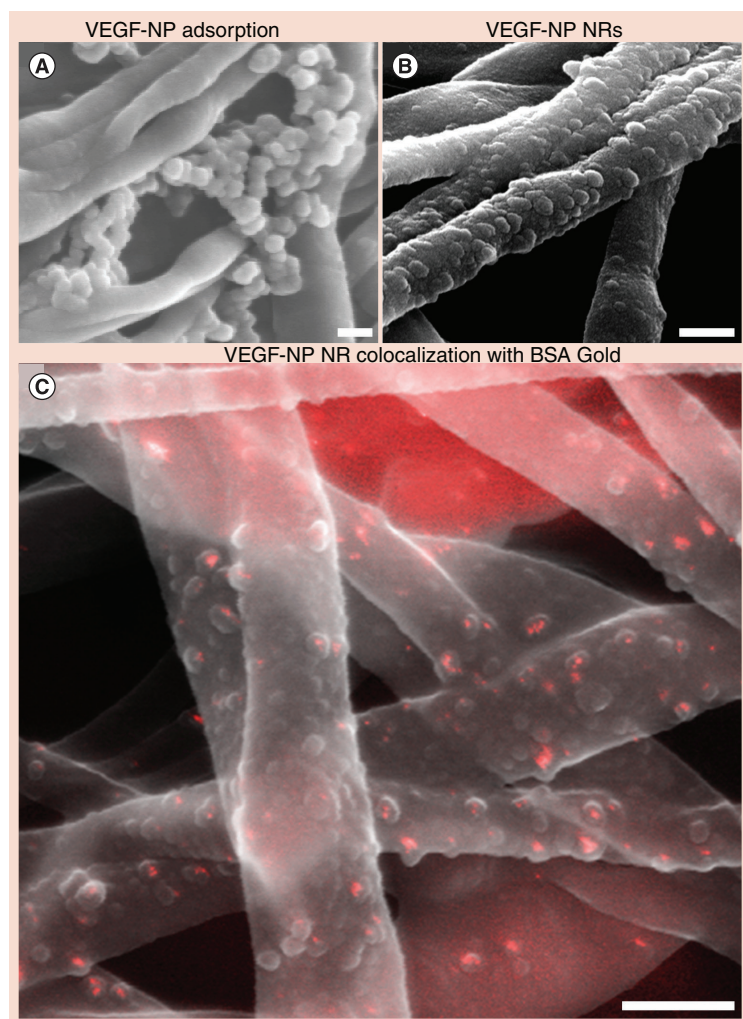


Figure 2. SEM visualization of the active VEGF-NPs on 3D-PCL nanofibers.

(A) Simple adsorption of VEGF-NPs (1 mg, overnight) onto the 3D-PCL scaffold. (B & C) VEGF-NP functionalization of the 3D-PCL using NR technology (LbL): (B) Homogeneous repartition of the VEGF-NP NRs all along the nanofibres, and (C) co-localization of the same NRs when gold-labeled BSA replaced BSA. Scale bars: 400 nm.

BSA: Bovine serum albumin; NP: Nanoparticle; NR: Nanoreservoir

tions, HUVECs were able to reorganize linearly, in the presence of VEGF-NPs directly in collagen gel or onto the 3D-PCL scaffold. However, the use of collagen with 3D-PCL scaffold presents technical limitations. Hence, in this study we adapted another alternative to improve endothelial cells adhesion to PCL, with the use of functionalized PCL scaffolds precoated with mesenchymal cells. In our study, the sequential seeding, with mesenchymal osteoblastic cells prior to endothelial cells, leads to a primo-access of mesenchymal cells to VEGF. These cells will serve as anchor to endothelial cells attachment to the biomaterial; and secretor of growth factor for activation/reorganization of endothelial cells.

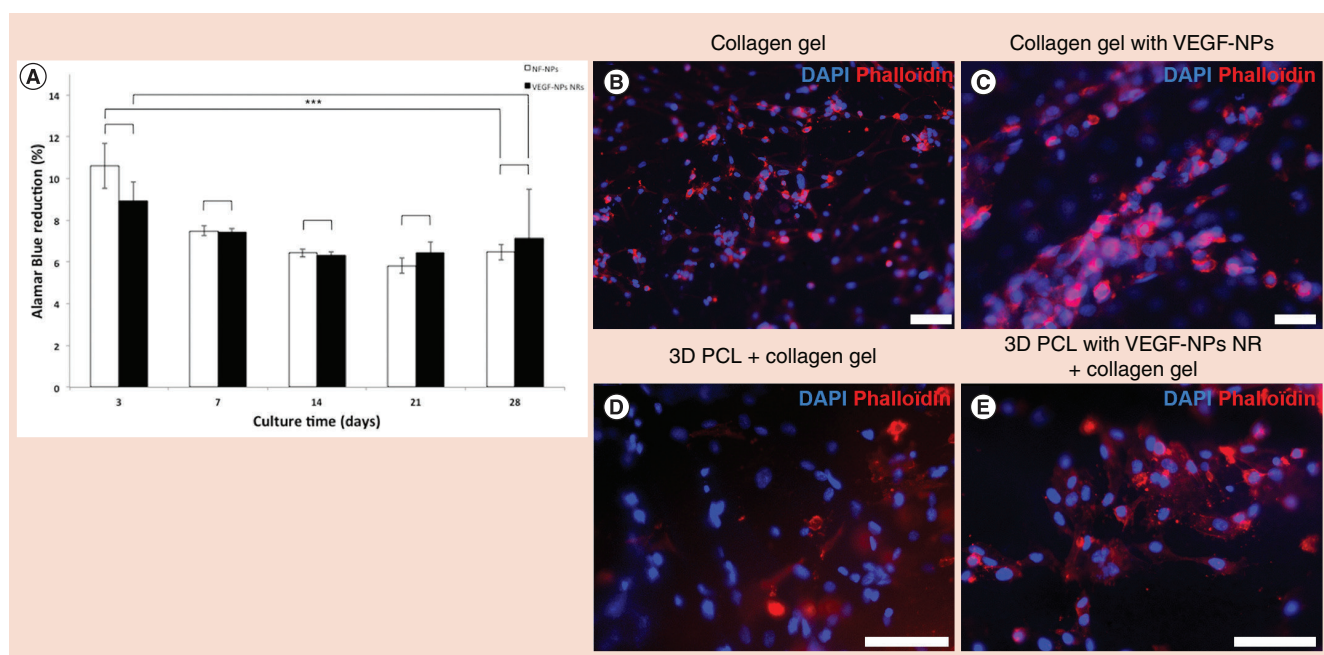


Figure 3. *In vitro* biocompatibility of VEGF-NPs with endothelial cells. (A) An Alamar Blue® test was performed on a 3D-PCL scaffold functionalized with VEGF-NPs nanoreservoirs, embedded in a collagen gel containing endothelial cells. This test was performed at 3, 7, 14, 21 and 28 days post-embedding (n = 3). All values are expressed as mean ± SEM. Differences were considered significant at 95% CI. (B–E) Cells organization visualized by fluorescence staining (Blue DAPI staining for the nuclei, red phalloidin staining for actin cytoskeleton). HUVECs were seeded in a collagen gel without VEGF-NPs (B) or with VEGF-NPs (C) and cultured on a 3D-PCL scaffold containing VEGF-NPs nanoreservoirs (E) or not (D). Scale bars: (B–E) 100 μm. *p < 0.1 = significant; **p < 0.05 = very significant; ***p < 0.01 = extremely significant. NP: Nanoparticle; NR: Nanoreservoir; PCL: Poly(ε-caprolactone).

In this study we developed an active scaffold able to improve and accelerate endothelial cells organization in tubule-like structures and host vasculature recruitment in the implant after implantation to ameliorate tissue-engineering efficacy. After showing the efficiency of VEGF-NPs on HUVECs behavior, we used HOBs to improve their adhesion on PCL scaffold. Actually, cells of mesenchymal origin, either by their capacity to secrete extracellular matrix (decellularized matrix) or by their own particular nature, were exploited to improve cell attachment on noncollagen materials [48,63,64]. Processes of angiogenesis and bone formation are thought to be in close interaction in bone healing. Moreover HOBs and mesenchymal stem cells are known to increase the stability of *in vitro* and *in vivo* tubule-like structure formation by endothelial cells [29,65]. Recently, much attention has been implemented in endothelial cells as mediators of osteogenic differentiation, since the combined use of mesenchymal cells (HOBs, mesenchymal stem cells) significantly enhanced the ability of osteogenic differentiation tissue *in vitro* [22,23,66–68]. With the combination of the two strategies in one material (VEGF-NPs and the use of HOBs), we were able to accelerate host vascularization of the implant *in vivo*. These results could be explained

by the fact that VEGF was not only available *via* our NPs for exogenic endothelial cells added to the scaffold, but also that HOBs and HUVECs used synergistically secrete more angiogenic factors compared with HUVECs alone [69]. Moreover, the access of HOBs to the VEGF-NPs can increase the secretion of angiogenic factors in the implant, resulting in the VEGF molecules acting directly on osteoblasts proliferation and migration [70]. Thus, in our double strategy, endothelial cells will adhere to the VEGF-NPs material *via* the prior matrix secretion of HOBs. HOBs, degrading nanoreservoirs by enzymatic reaction, will have an access to the VEGF-NPs, and will secrete angiogenic factor used by HUVECs. Based on the capacity of exogenous endothelial cells to anastomose with host vasculature [29], we subcutaneously implanted our double active implant and observed an enhanced initiation of host vasculature in the implant containing VEGF-NPs compared with the nonfunctionalized scaffold. Controlled drug release is an important field for human health. In most cases, the materials developed for regenerative medicine, using VEGF [40–43], lead to a high-dose passive release with overdoses, side effects and the progression of tumors [71], particularly in regeneration of tissues damaged after irradiation. With our double strategy,

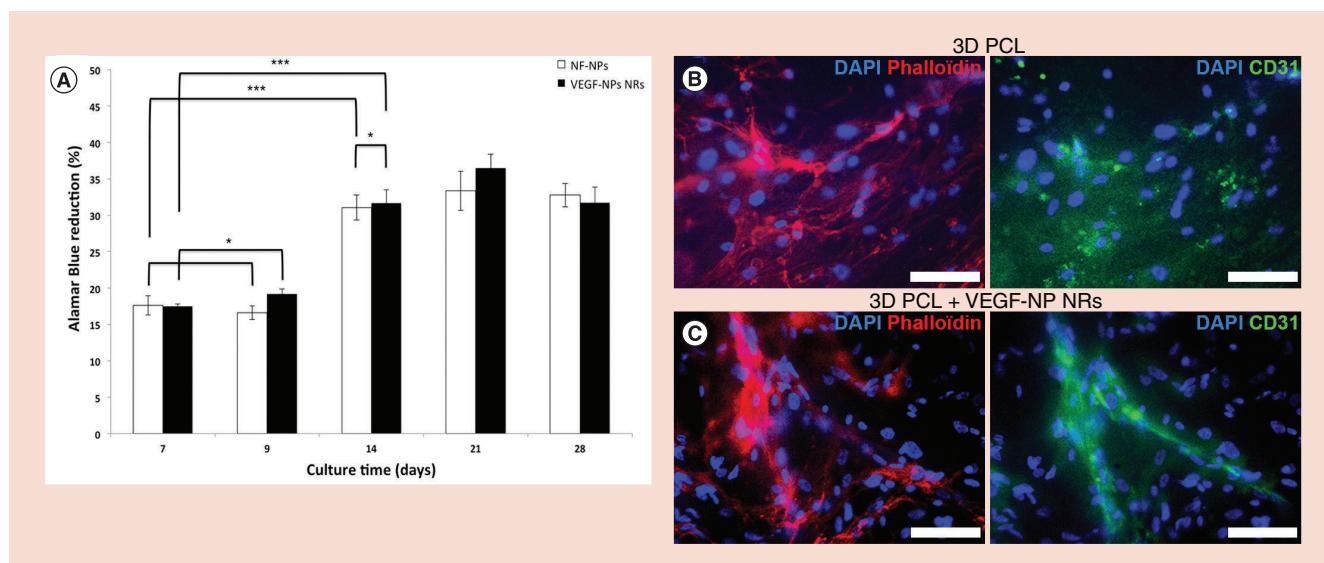


Figure 4. *In vitro* behavior of HUVECs cultured on the double active VEGF-NPs 3D-PCL scaffold. Active VEGF- NPs PCL was first pre-coated with osteoblasts (HOBs) (cultured during 7 days) and then seeded with HUVECs and cultured during a total of 28 days. **(A)** Alamar Blue® test was performed on a 3D-PCL scaffold functionalized with empty-NPs (chitosan nanoparticle, VEGF free, noted as NF-NPs) nanoreservoirs or with VEGF-NPs NRs at D7 (prior to HUVECs addition), D9, D14, D21 and D28 (n = 3). All values are expressed as mean ± SEM. Differences were considered significant at 95% CI. **(B & C)** Cells organization visualized by fluorescence staining at D28. In blue, DAPI staining for the nuclei; in red, phalloidin staining for actin cytoskeleton and in green, CD31 for the specific staining of endothelial cells. Scale bars: 100 μm.

*p < 0.1 = significant; **p < 0.05 = very significant; ***p < 0.01 = extremely significant.

CD31: Cluster of differentiation 31; NF: Nonfunctionalized; NP: Nanoparticle; NR: Nanoreservoir; PCL: Poly(ε-caprolactone).

VEGF release is sustained and dependent on cells adhesion and contact, and reliant on their own needs. Moreover, the growth factor release is localized at the desired site, avoiding thus side effects.

Conclusion

In the last few years, new tissue-engineering strategies for bone repair have focused on vascularization to improve the quality of repaired tissues. In this work, our aim was to develop a new strategy of active implant leading to improve endothelial cells organization. This strategy can improve vascularization *in situ* and can enhance the repair potential of tissues *in vivo*. In this study, we developed a 3D biodegradable and polymeric scaffold, highly porous, active for endothelial cells organization and improving the speed of cell reorganization by incorporating VEGF-NPs. This scaffold was active toward endothelial cells not only *via* the incorporation of VEGF-NPs, but also *via* incorporation of osteoblast cells as pre-coating on our 3D-PCL nanofibrous scaffold. This work highlights the nanofibrous implant potential, offering an active and sustained release of angiogenic growth factor for regenerative medicine application. The double effect obtained *in vivo* with this living implant can be transferred to the clinic, taking advantage of the therapeutic potential of mesenchymal stem cells.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/nnm-2016-0189

Acknowledgements

The authors thank J-L Weickert and V Demais for their help with SEM acquisition, and J-S Remy and B Frisch for the use of the zetalyzer device.

Financial & competing interests disclosure

Q Wagner, L Keller and D Offner are indebted to Faculté de Chirurgie Dentaire for the financial support. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Executive summary

Design of a tridimensional active material for regenerative medicine

- We have developed here a VEGF-active tridimensional polymeric material containing a homogeneous repartition of nanoparticles with a cell contact-dependant active release.
- The entrapment of VEGF nanoparticles in nanoreservoirs is able to have an effect on endothelial cells behavior.
- This material offers an active and sustained release of angiogenic growth factor for regenerative medicine application.

Double strategy to promote endothelial cell reorganization for regenerative medicine

- The adhesion of mesenchymal cells onto the VEGF nanoreservoirs material enables to potentiate its own capacity to act on endothelial cells behavior.
- The use of mesenchymal cells and VEGF nanoparticles can increase the endothelial cells reorganization.
- This double strategy can promote angiogenesis after implantation and can potentiate the current implants used in regenerative medicine.

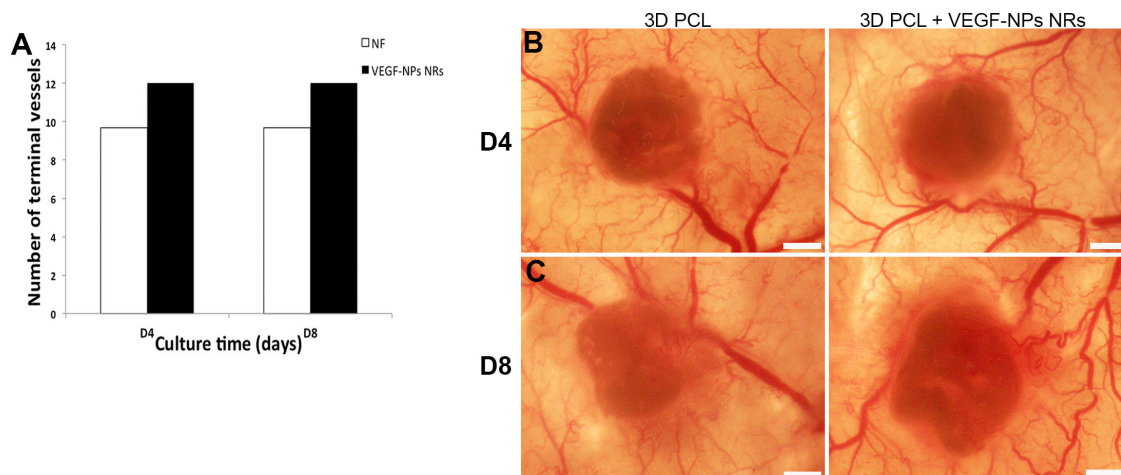
References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest.

- Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat. Nanotechnol.* 6(1), 13–22 (2011).
- GusiĆ N, IvkoviĆ A, VaFaye J *et al.* Nanobiotechnology and bone regeneration: a mini-review. *Int. Orthop.* 38(9), 1877–1884 (2014).
- Kane R, Ma1 PX. Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone. *Mater. Today (Kidlington)* 16(11), 418–423 (2013).
- Lim JY, Loissele AE, Lee JS, Zhang Y, Salvi JD, Donahue HJ. Optimizing the osteogenic potential of adult stem cells for skeletal regeneration. *J. Orthop. Res.* 29(11), 1627–1633 (2011).
- Metzger W, Schwab B, Miro MM *et al.* Induction of osteogenic differentiation by nanostructured alumina surfaces. *J. Biomed. Nanotechnol.* 10(5), 831–845 (2014).
- Nayak TR, Andersen H, Makam VS *et al.* Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS Nano* 5(6), 4670–4678 (2011).
- Watari S, Hayashi K, Wood JA *et al.* Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves. *Biomaterials* 33(1), 128–136 (2012).
- Gong T, Xie J, Liao J, Zhang T, Lin S, Lin Y. Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Res.* 10(3), 15029 (2015).
- Zhang S, Uludağ H. Nanoparticulate systems for growth factor delivery. *Pharm. Res.* 26(7), 1561–1580 (2009).
- Wang X, Wenk E, Zhang X, Meinel L, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. *J. Control. Release* 134(2), 81–90 (2009).
- Fioretti F, Mendoza-Palomares C, Helms M *et al.* Nanostructured assemblies for dental application. *ACS Nano* 4(6), 3277–3287 (2010).
- Facca S, Cortez C, Mendoza-Palomares C *et al.* Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(8), 3406–3411 (2010).
- Facca S, Lahiri D, Fioretti F *et al.* In vivo osseointegration of nano-designed composite coatings on titanium implants. *ACS Nano* 5(6), 4790–4799 (2011).
- Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S *et al.* Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 6(1), 483–490 (2012).
- Describes the methodology and the interest of the nanoreservoirs technology built up on nanofibrous materials.
- Giannoudis PV, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury.* 40(Suppl. 3), S1–S3 (2009).
- Jimi E, Hirata S, Osawa K, Terashita M, Kitamura C, Fukushima H. The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. *Int. J. Dent.* 2012, e148261 (2012).
- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 9(1), 66 (2011).
- Nyberg E, Holmes C, Witham T, Grayson WL. Growth factor-eluting technologies for bone tissue engineering. *Drug Deliv. Transl. Res.* 6(2), 184–194 (2016).
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40(5), 363–408 (2012).
- Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 295(5557), 1014–1017 (2002).
- Ferrand A, Eap S, Richert L *et al.* Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol. Biosci.* 14(1), 45–55 (2014).
- Eap S, Ferrand A, Palomares CM *et al.* Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering. *Biomed. Mater. Eng.* 22(1–3), 137–141 (2012).
- Describes the methodology and efficient parameters to assess the design of a thick tridimensional nanofibrous material by electrospinning process.
- Eap S, Keller L, Schiavi J *et al.* A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and

- stem cells for bone regeneration. *Int. J. Nanomedicine* 10, 1061–1075 (2015).
- Describes the advantage of a tridimensional nanofibrous poly(e-caprolactone) material with living stem cells and growth factor for bone regenerative medicine.
- 24 Schiavi J, Keller L, Morand D-N *et al.* Active implant combining human stem cell microtissues and growth factors for bone-regenerative nanomedicine. *Nanomedicine (Lond.)* 10(5), 753–763 (2015).
- 25 Eap S, Ferrand A, Schiavi J *et al.* Collagen implants equipped with “fish scale”-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine (Lond.)* 9(8), 1253–1261 (2014).
- 26 Eap S, Keller L, Ferrand A *et al.* Nanomechanical properties of active nanofibrous implants after in vivo bone regeneration. *Nano LIFE* 4(1), 1450001–1450010 (2013).
- 27 Kaully T, Kaufman-Francis K, Lesman A, Levenberg S. Vascularization – the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15(2), 159–169 (2009).
- 28 Mercado-Pagán ÁE, Stahl AM, Shanjani Y, Yang Y. Vascularization in bone tissue engineering constructs. *Ann. Biomed. Eng.* 43(3), 718–729 (2015).
- 29 Tsigkou O, Pomerantseva I, Spencer JA *et al.* Engineered vascularized bone grafts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(8), 3311–3316 (2010).
- 30 Wernike E, Montjovent M-O, Liu Y *et al.* VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation *in vivo*. *Eur. Cell Mater.* 19, 30–40 (2010).
- 31 Wang K, Chen X, Pan Y *et al.* Enhanced vascularization in hybrid PCL/gelatin fibrous scaffolds with sustained release of VEGF. *Biomed. Res. Int.* 2015, 865076–865086 (2015).
- 32 Lenze U, Pohl F, Seitz S *et al.* Influence of osteogenic stimulation and VEGF treatment on in vivo bone formation in hMSC-seeded cancellous bone scaffolds. *BMC Musculoskelet. Disord.* 15, 350–360 (2014).
- 33 Baiguera S, Ribatti D. Endothelialization approaches for viable engineered tissues. *Angiogenesis* 16(1), 1–14 (2013).
- 34 Sasaki J-I, Hashimoto M, Yamaguchi S *et al.* Fabrication of biomimetic bone tissue using mesenchymal stem cell-derived three-dimensional constructs incorporating endothelial cells. *PLoS ONE* 10(6), e0129266 (2015).
- 35 Guerrero J, Catros S, Derkaoui S-M *et al.* Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater.* 9(9), 8200–8213 (2013).
- 36 McFadden TM, Duffy GP, Allen AB *et al.* The delayed addition of human mesenchymal stem cells to pre-formed endothelial cell networks results in functional vascularization of a collagen-glycosaminoglycan scaffold in vivo. *Acta Biomater.* 9(12), 9303–9316 (2013).
- 37 Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(5), 359–371 (2006).
- 38 Kleinheinz J, Stratmann U, Joos U, Wiesmann H-P. VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 63(9), 1310–1316 (2005).
- 39 Grunewald M, Avraham I, Dor Y *et al.* VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124(1), 175–189 (2006).
- 40 Geng H, Song H, Qi J, Cui D. Sustained release of VEGF from PLGA nanoparticles embedded thermo-sensitive hydrogel in full-thickness porcine bladder acellular matrix. *Nanoscale Res. Lett.* 6(1), 312–320 (2011).
- 41 Subbiah R, Hwang MP, Van SY *et al.* Osteogenic/angiogenic dual growth factor delivery microcapsules for regeneration of vascularized bone tissue. *Adv. Healthc. Mater.* 4(13), 1982–1992 (2015).
- 42 Mohandas A, Anisha BS, Chennazhi KP, Jayakumar R. Chitosan–hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 127, 105–113 (2015).
- 43 Jiang X, Xiong Q, Xu G *et al.* VEGF-loaded nanoparticle-modified BAMAs enhance angiogenesis and inhibit graft shrinkage in tissue-engineered bladder. *Ann. Biomed. Eng.* 43(10), 2577–2586 (2015).
- 44 Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S *et al.* Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 6(1), 483–490 (2012).
- 45 Arnaoutova I, Kleinman HK. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat. Protoc.* 5(4), 628–635 (2010).
- 46 Dickinson LE, Moura ME, Gerecht S. Guiding endothelial progenitor cell tube formation using patterned fibronectin surfaces. *Soft Matter.* 6(20), 5109–5119 (2010).
- 47 Eap S, Morand D, Clauss F *et al.* Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce bone. *Biomed. Mater. Eng.* 25(0), 79–85 (2015).
- 48 Tang Z, Wang Y, Podsiadlo P, Kotov NA. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. *Adv. Mater.* 18(24), 3203–3224 (2006).
- 49 Chatterjea A, Meijer G, van Blitterswijk C, de Boer J. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells International* (2010). <https://www.hindawi.com/journals/sci/2010/215625/abs/>
- 50 Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials. *Science* 263(5154), 1715–1720 (1994).
- 51 Hubbell JA. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (NY)* 13(6), 565–576 (1995).
- 52 Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 428(6982), 487–492 (2004).
- 53 Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science* 295(5557), 1009–1014 (2002).
- 54 Chaikof EL, Matthew H, Kohn J, Mikos AG, Prestwich GD, Yip CM. Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. *Ann. NY Acad. Sci.* 961, 96–105 (2002).
- 55 Yang C, Hillas PJ, Báez JA *et al.* The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs* 18(2), 103–119 (2004).

- 56 Kumar G, Tison CK, Chatterjee K *et al.* The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials* 32(35), 9188–9196 (2011).
- 57 Pulella SR, Andres C, Chen W, Xu C, Wang L, Kotov NA. Permeability replication of artificial glomerular basement membranes in nanoporous collagen multilayers. *J. Phys. Chem. Lett.* 2(16), 2067–2072 (2011).
- 58 Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng. Part B Rev.* 14(1), 61–86 (2008).
- 59 Choi J-Y, Jung H-J, Park B-J, Joung Y-K, Park K-D, Han D-K. Adhesion behavior of chondrocyte and osteoblast on surface-modified biodegradable PLLA films and scaffolds. *Polymer Korea* 36(3), 357–363 (2012).
- 60 Shah NJ, Hong J, Hyder MN, Hammond PT. Osteophilic multilayer coatings for accelerated bone tissue growth. *Adv. Mater. Weinheim* 24(11), 1445–1450 (2012).
- 61 de Mel A, Jell G, Stevens MM, Seifalian AM. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. *Biomacromolecules* 9(11), 2969–2979 (2008).
- 62 Lin Q, Ding X, Qiu F, Song X, Fu G, Ji J. In situ endothelialization of intravascular stents coated with an anti-CD34 antibody functionalized heparin-collagen multilayer. *Biomaterials* 31(14), 4017–4025 (2010).
- 63 Xu Y, Yan M, Gong Y, Chen L, Zhao F, Zhang Z. Response of endothelial cells to decellularized extracellular matrix deposited by bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7(12), 4997–5003 (2014).
- 64 Moroni F, Mirabella T. Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering. *Am. J. Stem Cells* 3(1), 1–20 (2014).
- 65 Pill K, Hofmann S, Redl H, Holnthoner W. Vascularization mediated by mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: a comparison. *Cell Regen. (Lond.)* 4, 8 (2015).
- 66 Pedersen TO, Blois AL, Xing Z *et al.* Endothelial microvascular networks affect gene-expression profiles and osteogenic potential of tissue-engineered constructs. *Stem Cell Res. Ther.* 4(3), 52–62 (2013).
- 67 Grellier M, Bordenave L, Amédée J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 27(10), 562–571 (2009).
- Describes the importance of reciprocal interactions between osteoblastic and endothelial cells, occurring during bone development, and its importance to generate a vascularized construct for bone regeneration.
- 68 Brennan M, Davaine J-M, Layrolle P. Pre-vascularization of bone tissue-engineered constructs. *Stem Cell Res. Ther.* 4(4), 96–99 (2013).
- 69 Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CPD. Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 214(2), 537–544 (2008).
- 70 Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *J. Biol. Chem.* 282(37), 26746–26753 (2007).
- 71 Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 102(8), 898–901 (2000).



Supplementary Figure 1. *In vivo* effect of the double active VEGF-NPs 3D PCL on host vessels recruitment.

(A) Number of terminal vessel counted after subcutaneous implantation of the double active scaffolds (VEGF NPs NRs and osteoblast pre-coating before HUVEC seeding) at D4 and D8.

(B) Macroscopic view of the implants at D4 and D8, for the non-functionalized 3D PCL and the double active 3D PCL (VEGF NPs NRs and osteoblast pre-coating before HUVEC seeding). Scale bar: 1mm (B).

D, days; NF, non-functionalized; NPs, nanoparticles; NRs, nanoreservoirs; PCL, poly(ϵ -caprolactone); VEGF, vascular endothelial growth factor.

V. Conclusions et perspectives

Notre équipe a développé différentes stratégies d'optimisation pour l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse. Les travaux engagés durant la thèse se sont concentrés sur une source de cellules souches mésenchymateuses pour l'ingénierie osseuse et cartilagineuse, dérivées de la moelle osseuse pour une application clinique. Il serait intéressant de tester le potentiel thérapeutique d'autres sources de cellules souches mésenchymateuses pour l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse, comme les CSMs adultes dérivées de tissu adipeux, ou encore d'origine fœtale, isolées à partir de la gelée de Wharton. Ces sources cellulaires offrent un plus grand nombre de cellules après prélèvement, qui se révèle moins contraignant (liposuction pour les cellules dérivées du tissu adipeux, prélèvement sur le cordon ombilical, considéré comme un déchet opératoire pour les cellules souches fœtales) que l'obtention de cellules souches dérivées de la moelle osseuse, obtenues après ponction de la crête iliaque principalement.

Selon les compartiments tissulaires étudiés, les réflexions ont porté sur différents aspects répétés ici :

Volet 1 : Optimisation d'un implant pour la régénération de lésion osseuse

Dans un premier temps, et en collaboration avec l'équipe du Professeur Arruebo (Université de Saragosse, Espagne), l'étude portant sur une membrane nanocomposite à base de chitosane (d'origine naturelle) dopée de nanoparticules de silice a permis d'observer la biocompatibilité et les propriétés ostéoinductrices de cet implant *in vitro* et *in vivo*. L'ajout de nanoparticules de silice dans la construction a donc permis d'optimiser les propriétés de la membrane de chitosane pour l'ingénierie osseuse, en plus d'augmenter la résistance à la compression de la construction nanocomposite (**Article 1**).

Une deuxième étude a porté sur la stratégie d'ensemencement d'un dispositif implantable synthétique tridimensionnel composé de nanofibres électrospinnées de poly(ϵ -caprolactone). L'ensemencement de cellules mésenchymateuses sous forme de microtissus a permis une meilleure pénétration et colonisation de l'implant par les ostéoblastes comparé à un ensemencement de cellules en monocouche. La combinaison des deux structures tridimensionnelles a démontré une formation osseuse accrue au sein de l'implant, qui a été également observée après implantation *in vivo* en site osseux (calvaria). L'ensemencement de

dispositifs médicaux par des microtissus représente donc une stratégie prometteuse pour l'ingénierie osseuse (**Articles 2 et 3**).

Les perspectives sont importantes pour les deux constructions différentes. Le choix a été porté sur l'utilisation de cellules mésenchymateuses. Pour une future application clinique, il conviendrait de tester ces mêmes dispositifs implantables avec des cellules souches mésenchymateuses pour observer la contribution éventuelle de ces sources de cellules dans les deux systèmes. De même, la contribution de facteurs de croissance ostéogéniques (BMP-2 ou BMP-7) intégrés à ces systèmes à l'intérieur de nanoréservoirs pour un relargage actif continu permettrait une accélération de la cicatrisation osseuse.

Les facteurs de croissance pourraient également être multiples en trouvant la bonne formulation pouvant correspondre à la temporalité de la régénération osseuse. Ce dispositif implantable actif, imaginé ici avec deux facteurs de croissance différents pourrait très bien être tout aussi bien être modulé avec d'autres types de molécules biologiques pouvant avoir un impact dans la régénération osseuse.

Pour le dispositif implantable composé de nanofibres synthétiques de PCL et à l'instar de la membrane de chitosane dopée par des nanoparticules de silice, un ajout d'hydroxyapatite (principal constituant de la matrice minéralisée du tissu osseux) dans la composition de l'implant pourrait également aller dans le sens d'une accélération de la cicatrisation osseuse, en plus d'augmenter les propriétés mécaniques de la construction, se rapprochant ainsi de celle du tissu osseux physiologique (Li et al., 2012). Cette hydroxyapatite pourrait être ajoutée durant le processus d'électrospinning (dans la solution contenant le polymère d'intérêt ou dans une autre solution pour un électrospinning co-axial).

Ces différentes stratégies pourraient également s'appliquer sur d'autres types de biomatériaux, tels ceux basés sur les bioverres ou leurs composites, pour étudier, selon les mêmes conditions, quel support matriciel pourrait obtenir les meilleurs résultats en terme de régénération osseuse.

Volet 2 : Optimisation d'un implant pour la régénération de l'unité os-cartilage.

Pour ces études, nous avons créé deux implants bicompartimentés pour l'ingénierie du cartilage qui prend également en considération le socle osseux sous-chondral, pour la régénération de l'unité os cartilage.

Le premier implant généré a été composé d'une membrane collagénique d'origine porcine commerciale (Bio-Gide®), présentant un double revêtement responsable de la régénération de l'os sous-chondral par sa fraction nanofibreuse ainsi qu'un hydrogel composé d'alginate et d'acide hyaluronique pour régénérer le compartiment cartilagineux. Cet implant a été ensemencé par des microtissus de cellules souches mésenchymateuses à l'interface entre la membrane collagénique et de l'hydrogel, servant de colle biologique, mais également à l'intérieur de l'hydrogel. Cette construction a été capable selon les études *in vitro* avec un même milieu de différenciation d'orienter la différenciation de cellules souches mésenchymateuses humaines vers un phénotype osseux mais aussi un phénotype chondrocytaire. Il a été possible de reproduire le gradient physiologique de minéralisation ainsi que le gradient de marqueurs spécifiques du cartilage hyalin articulaire (**Article 4**).

Le deuxième implant généré suit la même logique de compartimentation, avec une membrane synthétique nanostructurée de PCL produite par la méthode d'électrospinning remplaçant la membrane collagénique et offrant une maîtrise de l'épaisseur du compartiment en fonction des besoins et du volume d'os sous-chondral impacté. Ces nanofibres ont été dotées de nanoréservoirs contenant un facteur de croissance ostéogénique, le BMP-7, permettant un relargage actif continu et d'utiliser une quantité moindre (nanogrammes) de ce dernier que dans l'implant commercial (milligrammes), pour limiter la survenue d'effets indésirables. Le deuxième compartiment est quant à lui le même, composé d'un mélange entre l'alginate et l'acide hyaluronique. Un ensemencement de l'hydrogel par des microtissus hybrides composés de cellules mésenchymateuses souches humaines et des chondrocytes humains primaires a permis une modulation de l'hypertrophie du compartiment cartilagineux observé durant les études *in vitro*. La bicompartimentation de notre construction double et contenant les microtissus hybrides a été maintenue *in vivo* chez la souris, permettant une régénération simultanée de la zone sous-chondrale et du cartilage (**Article 5**).

Ces constructions sont en cours d'études précliniques sur un modèle de lésion ostéochondrale chez la brebis : un implant bicompartimenté avec une membrane collagénique de Bio-Gide® ou bien une membrane de PCL électrospinnée pour la régénération de l'os sous-chondral, doté ou non de facteur de croissance (BMP-2), ainsi qu'un hydrogel composé d'alginate et d'acide hyaluronique pour la régénération du cartilage. Cet hydrogel est ensemencé avec des microtissus de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse des brebis. Pour tester le potentiel pluripotent de ces cellules, des tests de différenciation adipogénique, chondrogénique et ostéogénique sont réalisés. L'étude portera sur la cytotoxicité de la

construction afin d'évaluer la sécurité d'emploi de ce potentiel médicament combiné de thérapie innovante, ainsi que l'efficacité de celui-ci à pouvoir régénérer un défaut ostéocondral dans le temps.

Une perspective pourrait permettre plus finement d'imiter la MEC du compartiment cartilagineux. En effet, le cartilage est composé de différentes strates, avec des orientations de fibres de collagène différentes selon la profondeur du cartilage. Deux études récentes ont réussi dans ce sens à mimer cette hétérogénéité dans l'architecture du compartiment cartilagineux (Steele et al., 2014; Delcroix et al., 2016), mais leurs stratégies pour générer ces dispositifs complexes présentent des limites. Premièrement, la méthode d'obtention de l'implant en plusieurs étapes (3 étapes d'électrospinning dans la première étude, 9 étapes successives dans la deuxième étude), n'autorise pas de stratégies de cellularisation alors que la stratégie développée dans le laboratoire permet en une étape de générer un hydrogel en même temps que le chargement de celui-ci avec des microtissus. D'autre part, les dispositifs générés sont fibreux, ce qui pourrait impliquer une limitation temporelle dans la tenue du phénotype chondrocytaire avec la survenue précoce de fibrocartilage.

Des hydrogels renforcés par des fibres ont été proposés pour imiter le tissu cartilagineux et pour permettre d'augmenter les performances mécaniques de l'hydrogel, utilisant l'impression 3D pour réaliser ce renforcement (Cha et al., 2014; Visser et al., 2015), ou des fibres préfabriquées (Liao et al., 2013). Le diamètre de telles fibres atteint souvent l'échelle micrométrique, un ordre de grandeur plus important que pour les fibres de collagène dans le tissu physiologique (nanométrique). En revanche, la méthode l'électrospinning peut produire des nanofibres et est un procédé bon marché, inspirant des articles de revues récents sur la formation de fibres électrospinnées orientées couplées à des hydrogels pour former des implants nanocomposites (Butcher et al., 2014; Xu et al., 2016). L'introduction de ces nanofibres orientées dans les hydrogels pourrait permettre de mieux imiter l'environnement cellulaire *in vivo* et permettre la mécanotransduction durant la régénération du tissu cartilagineux.

Volet 3 : Optimisation du recrutement vasculaire d'implants actifs

Dans ce volet, nous avons établi une combinaison qui permettait d'accélérer une hiérarchisation de cellules endothéliales sous forme de tubules sur un support matriciel tridimensionnel synthétique développé au laboratoire (implant tridimensionnel de PCL produit par électrospinning). Les nanofibres composant la matrice synthétique ont été dotées

de nanoréservoirs contenant des nanoparticules de VEGF. L'ensemencement séquentiel entre des cellules mésenchymateuses (ostéoblastes humains primaires) suivi par un ensemencement de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine sur un support doté de nanoréservoirs a permis cette hiérarchisation observée en culture *in vitro*, mais aussi d'accélérer le recrutement vasculaire de l'hôte vers l'implant après implantation *in vivo* après observation macroscopique.

Les perspectives concernant ce volet sont importantes. En effet, l'étude préliminaire réalisée pour observer cette combinaison entre un facteur de croissance et un ensemencement séquentiel de deux types cellulaires différents a été faite sur une matrice tridimensionnelle à base de polymère électrospinné. Bien que ce polymère offre une structuration semblable à la MEC du tissu osseux, les propriétés mécaniques de la construction ne sont pas comparables au tissu osseux. Les perspectives seraient à court terme d'évaluer le transfert de cette combinaison, servant de preuve de concept, vers un support qui serait un véritable substitut osseux synthétique.

Pour approfondir l'étude de la combinaison du VEGF et l'ensemencement séquentiel de cellules, nous envisageons l'utilisation d'une matrice commercialisée pour le comblement osseux : la membrane AntartikTM Sponge de la société Medical Biomat. Cette membrane est composée de collagène pour 10% de la composition, et 90% de phosphate calcique biphasique (mélange de 60% d'hydroxyapatite et de 40% de phosphate tricalcique). AntartikTM Sponge est présentée comme un substitut osseux composé d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique dispersés dans une matrice de collagène de type I et III. Elle est utilisée pour le comblement de divers types de défauts osseux, aussi bien pour des raisons chirurgicales, traumatiques ou pathologiques. Ses indications sont les suivantes : prélèvement osseux (compact ou spongieux), résection d'une tumeur osseuse, ostéosynthèse, arthrodèse, pseudarthrose, ostéotomie, etc.

Pour étudier sur ce support l'accélération d'une hiérarchisation des cellules endothéliales, la combinaison portera au préalable sur l'équipement des fibres et feuillets collagéniques avec des nanoréservoirs contenant le VEGF associé à l'héparine, ligand naturel du facteur de croissance et co-activateur du récepteur au VEGF (VEGFR) (Ashikari-Hada et al., 2005). Une fois ces fibres dotées de nanoréservoirs du mélange héparine/VEGF, l'ensemencement séquentiel portera sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs)

dérivées de la moelle osseuse avant un ensemencement par les cellules HUVECs pour des études *in vitro* et *in vivo*.

Les études, portant ici sur un substitut osseux synthétique qui est une éponge collagénique, pourront par la suite être transposées sur un autre modèle de substitut osseux, ayant des propriétés mécaniques robustes et en adéquation avec celle du tissu osseux physiologique, pour permettre un recrutement vasculaire accéléré ainsi qu'une intégration tissulaire maximale.

La perspective la plus aboutie pourrait provenir des percées récentes dans le domaine de la technologie et de l'ingénierie tissulaire offerte par l'impression 3D. Les différents substituts osseux synthétiques sont en effet produits dans le but de combler un défaut osseux, et le professionnel de santé en charge du comblement doit réaliser une coupe ou un tassement des différents implants à disposition. L'impression 3D permet elle de synthétiser un implant en relation avec le défaut osseux constaté. Il sera alors possible pour le dispositif de correspondre le plus précisément aux caractéristiques du défaut osseux constaté. Ces implants, avec des propriétés mécaniques les plus proches du tissu osseux physiologique, pourraient être dotés de la même combinaison développée dans les travaux de thèse, pour permettre un recrutement de la vascularisation de l'hôte et une intégration tissulaire maximale.

Ces nombreuses perspectives de recherches montrent la voie qui est ouverte à l'élaboration de stratégies innovantes pour la santé ayant pour considération l'amélioration de la guérison des tissus lésés ainsi que la réduction de la souffrance des patients.

VI. Annexes

Annexe 1

- ❖ Wagner Q., Offner D., Idoux-Gillet Y., Gegout H., Ferrandon A., Schwinté P., Musset A-M., Benkirane-Jessel N., Keller L. (2017). Hybrid Collagen Sponge and Stem Cells as a New Combined Scaffold Able to Induce the Re-Organization of Endothelial Cells into Clustered Networks. *Biomed. Mater. Eng.* 28, S185–S192

Hybrid collagen sponge and stem cells as a new combined scaffold able to induce the re-organization of endothelial cells into clustered networks

Damien Offner^{a,b,c,*}, Quentin Wagner^{a,b,*}, Ysia Idoux-Gillet^{a,b}, Hervé Gegout^b, Arielle Ferrandon^{a,b}, Pascale Schwinté^{a,b}, Anne-Marie Musset^{b,c}, Nadia Benkirane-Jessel^{a,b,**} and Laetitia Keller^{a,b}

^a INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), ‘Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine’ Laboratory, UMR 1109, Faculté de Médecine, F-67085 Strasbourg cedex, FMTS, France

^b Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 8 rue Sainte Elisabeth, F-67000 Strasbourg, France

^c Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), 1 place de l’Hôpital, F-67000 Strasbourg, France

Abstract. The time needed to obtain functional regenerated bone tissue depends on the existence of a reliable vascular support. Current techniques used in clinic, for example after tooth extraction, do not allow regaining or preserving the same bone volume. Our aim is to develop a cellularized active implant of the third generation, equipped with human mesenchymal stem cells to improve the quality of implant vascularization. We seeded a commercialized collagen implant with human mesenchymal stem cells (hMSCs) and then with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). We analyzed the biocompatibility and the behavior of endothelial cells with this implant. We observed a biocompatibility of the active implant, and a re-organization of endothelial cells into clustered networks. This work shows the possibility to develop an implant of the third generation supporting vascularization, improving the medical care of patients.

Keywords: Collagen implant, vascularization, mesenchymal stem cells, endothelial cells

1. Introduction

Recently, in the regenerative medicine field, a plethora of biomaterials based on polymeric PLA (poly lactic acid), PGA (polyglycolic acid), PCL (poly-ε-caprolactone) or natural (collagen, alginate, fibrin, chitosan) components were developed, aiming to offer an ideal environment supporting tissue regeneration after implantation. More particularly for bone tissue engineering, the implantation of collagen implants in a bone defect is a practice whose aim is hemostasis [1], commonly used after a tooth extraction for example. Collagen promotes the formation of a stable clot and helps reduce post-operative

*These authors have equally contributed to this work.

** Corresponding author. Tel.: +33 368853376; E-mail: nadia.jessel@inserm.fr.

bleeding [2]. Moreover, the clinical use of collagenic biomaterials in dental surgery promotes guided bone regeneration, *inter alia* by means of tissue exclusion [3]. However, none of the techniques currently used in clinics to preserve or regain a good quality of bone or its initial volume (bone substitutes, allografts, xenografts, membranes of collagen for guided bone regeneration) gives satisfaction [4]. Furthermore, some xenografts have disadvantages such as high cost and low presence of autogenous bone in the rebuilt tissue volume, due to the low degradation of the material [5].

The deposit of a simple collagen implant into bone defects does not provide satisfactory results, compared to natural bone healing [6–10]. Thus, during these last decades, several kinds of active materials were developed [11–16]. These materials can be active by the addition of growth factors, or by the addition of living cells, to create a material of the third generation, which is specifically the case for regenerative medicine. Indeed, for bone regenerative medicine, collagen sponges have the advantage to be able to locally deliver active molecules (growth factors, antibiotics. . .) [17–20]. Studies have shown that the addition of bone morphogenetic protein (BMP) to collagen sponges significantly improved bone regeneration [21–24]. However, this technique also presents a major inconvenient: the local release of the molecules is too fast and thus, causes overdosing and adverse effects [18].

Another approach to influence the quality and speed of bone regeneration is the ability to facilitate the development of a vascular network in the bone tissue during regeneration. This network will provide the nutrients and minerals necessary for cells, conveying cellular waste [25–27], and therefore avoid the potential necrosis in the middle of bone defects of a moderate size. Nowadays, with the development of materials of the third generation, the single use of cells can be associated to the materials to increase efficiency of materials and tissue repair. The important use of human mesenchymal stem cells (hMSCs) in regenerative medicine comes from their important therapeutic effects [28,29]. These cells are not only able to directly contribute to tissue healing and repair by bone tissue differentiation, but also indirectly *via* paracrine secretion of angiogenic, neurogenic and anti-apoptotic factors [30]. Moreover, and particularly for the formation of vascular network, it was well demonstrated that these cells act as mural cells stabilizing blood vessels [31,32].

Our ultimate objective is to develop active materials of the third generation offering a perfect environment for vascularization. In this work, we used a porous collagen sponge, combined with hMSCs as a support for human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and we followed the biocompatibility and behavior *in vitro* of this combined scaffold.

2. Material and methods

2.1. Scanning electron microscopy (SEM)

Collagen sponges (Pangen[®], Resorbable haemostatic collagen compress, Urgo Medical) were cut in pieces and fixed in paraformaldehyde (PFA) 4% for 10 minutes at 4°C. They were then dehydrated, and observed with a scanning electron microscope (SEM Hitachi[™] 1000 or FEG Sirion XL; FEI) in conventional mode (high vacuum) with a secondary electron detector.

2.2. Cell culture

Collagen sponges (Pangen[®], Resorbable haemostatic collagen compress, Urgo Medical) were cut (5 mm of diameter) and placed in multi-wall pates. They were then sterilized by 30-minutes exposure

to UV light (254 nm, 30 W, distance 20 cm), and equilibrated in contact with 1 mL of serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) prior to cell culture. HUVECs and hMSCs were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany). The cells were cultured in specific growth medium supplemented with supplement mix (respectively endothelial cell growth medium, and mesenchymal stem cells growth medium, PromoCell). The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. When cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin and subcultured.

2.3. Biocompatibility

Alamar Blue[®] (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) was used to assess cell metabolic activity over time. The Alamar Blue[®] test is a water-soluble, non-toxic, colorimetric redox indicator that changes color in response to cell metabolism. 15×10^3 MSCs were seeded on each collagen sponge. 7 days after, 55×10^3 HUVECs were seeded on the same sponges, and samples were cultured during a total of 21 days in a proliferative medium consisting of half MSC-medium, and half HUVECs-medium ($n = 4$). At D3, D14, and D21, cells were incubated in 10% Alamar Blue[®]/D-MEM without phenol red (Lonza, Levallois-Perret, France) solution in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. After 4 h, incubation medium was transferred to 96-well plates and absorbances at 570 and 595 nm were measured to determine the percentage of Alamar Blue[®] reduction. Statistical analysis was obtained by Student t-test. A probability p -value < 0.05 was considered significant to reject the null hypothesis.

2.4. Immunofluorescence

After 21 days of culture, samples were fixed with 4% PFA during 10 minutes at 4°C, rinsed with PBS, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 1 h. Indirect immunostaining was performed after the fixation. To visualize specifically the surface of endothelial cells, samples were incubated overnight at 4°C using Rb Anti-CD31 (1/400, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA). Alexa Fluor 488 anti-Rb (1/200, Life Technologies) was then applied to samples for 2 hours. After rinses with PBS, samples were incubated for 20 minutes with a solution of Alexa Fluor 546-conjugated phalloidin (1/200, Molecular Probes, Life Technologies, Fisher Scientific, Illkirch, France). Finally, for nuclear staining, samples were incubated for 10 minutes with a solution of 200 nM DAPI (Sigma-Aldrich). Samples were then observed with a microscope equipped for epifluorescence (LEICA DM4000B).

3. Results

Scanning electron microscopy observations of the collagen sponge showed a porous biomaterial with a smooth surface (Fig. 1). These observations demonstrated clearly that this scaffold offer an adequate environment for cell colonization, recruitment and proliferation. To verify next the biocompatibility of the collagen sponge with human mesenchymal stem cells and with endothelial cells, we analyzed the evolution of their metabolic activity during the co-culture *in vitro*. This follow-up was performed using Alamar Blue[®] (Fig. 2). These tests showed a significant increase of cells metabolic activity from day 3 (D3) to day 14 (D14). Moreover this metabolic activity stabilized from day 14 (D14) to day 21 (D21). These results are not only consistent with the fact that this collagen implant equipped with mesenchymal stem cells is biocompatible for endothelial cells, but also for a cell reorganization. To next analyze the behavior of endothelial cells on the hMSCs coated collagen sponge, we performed a specific staining of HUVECs by indirect immunofluorescence against CD31 (Cluster of differentiation-31), a specific



Fig. 1. Urgo resorbable bovine collagen I implant. (A) Macroscopic view. (B), (C) Scanning electron microscopy of the collagen implant. Scale bars = 1 cm (A); 200 μ m (B); 5 μ m (C).

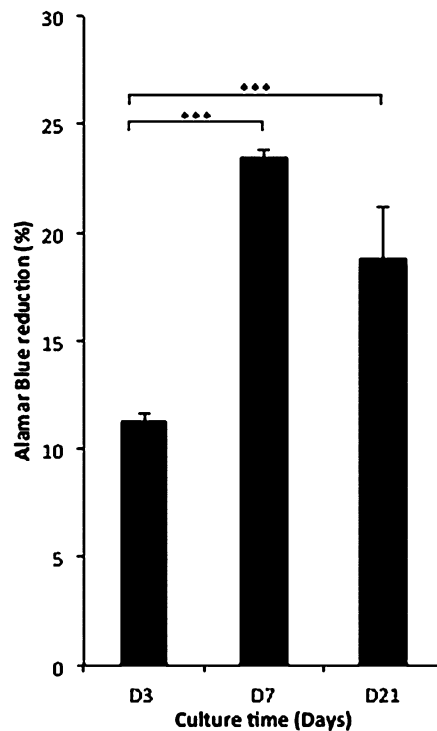


Fig. 2. Biocompatibility of the collagen implant seeded with human mesenchymal stem cells and human endothelial cells. The metabolic activity of cells was analyzed (at D3, D14, D21) *in vitro* by an AlamarBlue[®] test during the culture period time ($n = 4$). Statistical analysis was obtained by Student t-test. All values are expressed as mean \pm SEM. Differences were considered significant at 95% CI. * $p < 0.1$ = significant; ** $p < 0.05$ = very significant; *** $p < 0.01$ = extremely significant.

surface marker of endothelial cells. After 21 days of culture, we observed a reorganization of endothelial cells as “cluster” (Fig. 3). Taking together, these results clearly show the ability of the collagen sponge to support the reorganization of endothelial cells in the presence of human mesenchymal stem cells.

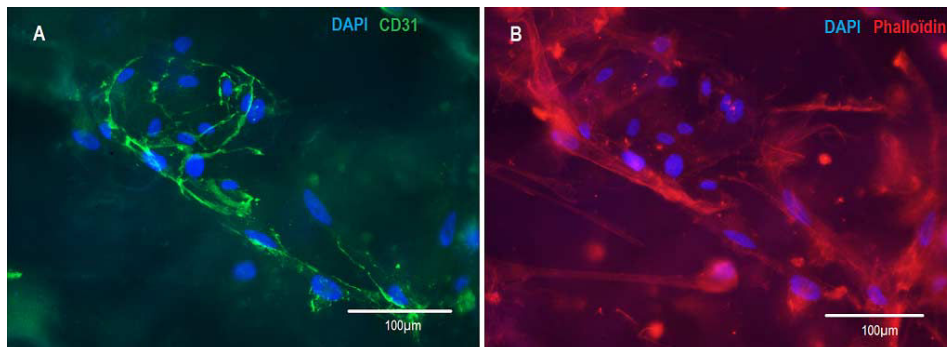


Fig. 3. Behavior of endothelial cells in collagen implant of the third generation. Collagen sponges (Urgo medical, Pangen[®]) were seeded with human mesenchymal stem cells and cultured during 7 days. After 7 days, human endothelial cells (HUVECs) were seeded on the same sample. The culture was maintained for a total of 21 days. (A) After 21 days, endothelial cells were observed by a specific immune-staining against CD31 (in green). (B) The total cells were also observed in red by phalloidin for actin and in blue by DAPI staining of the nuclei. Scale bars = 100 μ m.

4. Discussion

For efficient tissues repair, the formation of a functional vascular network plays an essential role for biomaterials host integration, providing essential nutrients necessary for the healing process. Different strategies improving vascularization and aspiring more healthy tissues construct were developed [33]. These strategies focus on the modeling of adequate scaffold morphology, the addition of growth factors, and/or the use of living cells [33]. In this work, we showed that the Urgo (Pangen[®]) collagen implant combined with human mesenchymal stem cell represents a biocompatible material of the third generation able to support the endothelial cells reorganization. This reorganization can be assigned to the great therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. Indeed, these last years, it was well demonstrated and established that adult mesenchymal stem cells have an intrinsic angiogenic role [27]. Moreover, it has been shown that there is an interaction between MSCs and endothelial cells (ECs) within a co-culture [34–38], causing an increase in the secretion of growth factors [26,34,39] such as the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [27,40], and an increase in the osteogenic potential [26,41]. In our work, we chose to exploit the therapeutic effects of human mesenchymal stem cells, acting as maintainer of endothelial cells, and we were able to observe that a network reorganization of cells occurred without any additional input of VEGF.

VEGF is a protein involved in angiogenesis. VEGF is a pro-angiogenic factor inducing stem cell differentiation into endothelial cells [42–44]. Moreover, VEGF allows the recruitment of macrophages and mononuclear producing additional angiogenic factors [45]. New bone regeneration strategies are specifically focused on its use coupled with active materials [40,46]. In our previous works, we validated a strategy of nanocontainers using FDA-approved molecules, for an accelerated bone regeneration using BMP-7 or BMP-2, and adult mesenchymal stem cells [47–50]. This nano-strategy leads to a local delivery, cell-contact dependent of the growth factors, avoiding side effects after implantation [16]. More specifically for vascularization in bone tissue healing, we transferred this technology to a polymeric tridimensional implant equipped with VEGF nanoparticles able to promote endothelial cells reorganization and host blood vessels recruitment after implantation [51].

Our crucial purpose is to meet the demand from clinicians by developing a technique to enhance the quality and speed of bone vascularization and regeneration, using FDA-approved molecules. This

could ensure a good quality of bone support and reduce the time before an implant surgery in dentistry for example, time during which the patient remains toothless or bearer of a potentially uncomfortable removable prosthodontics.

5. Conclusion

The current bone regeneration techniques used in the clinic today, for example after a tooth extraction, do not allow preserving or regaining the same volume and the same quality of bone. Natural bone healing process offers for example a usable dental implant support, but it happens that the volume of bone after healing is insufficient, and that the time before a possible implant surgery is crippling for the patient. We showed here that the combined use of a collagen sponge with human mesenchymal stem cells could represent a great support to endothelial cells reorganization. This promising approach of living implant of the third generation was biocompatible and allowed endothelial cells organization and vascularization. This new strategy could represent a real advantage to increase the speed of bone vascularization in bone tissue regeneration and filling.

Acknowledgement

The authors thank Valérie Demais for the characterization of the scaffolds by SEM.

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- [1] L. Ardekian, R. Gaspar, M. Peled, B. Brener and D. Laufer, Does low-dose aspirin therapy complicate oral surgical procedures?, *J Am Dent Assoc* **131** (2000), 331–335. doi:[10.14219/jada.archive.2000.0176](https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0176).
- [2] A. Scarano, G. Murmura, A. Di Cerbo, B. Palmieri, V. Pinchi, L. Mavriqi et al., Anti-hemorrhagic agents in oral and dental practice: An update, *Int J Immunopathol Pharmacol* **26** (2013), 847–854. doi:[10.1177/039463201302600402](https://doi.org/10.1177/039463201302600402).
- [3] G. Avila-Ortiz, S. Elangovan, K.W.O. Kramer, D. Blanchette and D.V. Dawson, Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: A systematic review and meta-analysis, *J Dent Res* **93** (2014), 950–958. doi:[10.1177/0022034514541127](https://doi.org/10.1177/0022034514541127).
- [4] R.E. Jung, A. Philipp, B.M. Annen, L. Signorelli, D. Thoma, C.H.F. Hämmerla et al., Radiographic evaluation of different techniques for ridge preservation after tooth extraction: A randomized controlled clinical trial, *J Clin Periodontol* **40** (2013), 90–98. doi:[10.1111/jcpe.12027](https://doi.org/10.1111/jcpe.12027).
- [5] T. Traini, P. Valentini, G. Iezzi and A. Piattelli, A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure, *J Periodontol* **78** (2007), 955–961. doi:[10.1902/jop.2007.060308](https://doi.org/10.1902/jop.2007.060308).
- [6] J.P. Fiorellini, T.H. Howell, D. Cochran, J. Malmquist, L.C. Lilly, D. Spagnoli et al., Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation, *J Periodontol* **76** (2005), 605–613. doi:[10.1902/jop.2005.76.4.605](https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.4.605).
- [7] Y. Takahashi, E. Marukawa and K. Omura, Application of a new material (β -TCP/collagen composites) in extraction socket preservation: An experimental study in dogs, *Int J Oral Maxillofac Implants* **28** (2013), 444–452. doi:[10.11607/jomi.2794](https://doi.org/10.11607/jomi.2794).
- [8] C. Mannai, D. Leake, A. Pizzoferrato, G. Ciapetti and C. Sangiorgi, Histologic evaluation of purified bovine tendon collagen sponge in tooth extraction sites in dogs, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **61** (1986), 315–323. doi:[10.1016/0030-4220\(86\)90408-1](https://doi.org/10.1016/0030-4220(86)90408-1).

- [9] M.D. Finn, S.R. Schow and E.D. Schneiderman, Osseous regeneration in the presence of four common hemostatic agents, *J Oral Maxillofac Surg* **50** (1992), 608–612. doi:[10.1016/0278-2391\(92\)90443-4](https://doi.org/10.1016/0278-2391(92)90443-4).
- [10] H. Zigdon, D. Lewinson, T. Bick and E.E. Machtei, Vertical bone augmentation using different osteoconductive scaffolds combined with barrier domes in the rat calvarium, *Clin Implant Dent Relat Res* **16** (2014), 138–144. doi:[10.1111/j.1708-8208.2012.00452.x](https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2012.00452.x).
- [11] S. Zhang and H. Uludağ, Nanoparticulate systems for growth factor delivery, *Pharm Res* **26** (2009), 1561–1580. doi:[10.1007/s11095-009-9897-z](https://doi.org/10.1007/s11095-009-9897-z).
- [12] X. Wang, E. Wenk, X. Zhang, L. Meinel, G. Vunjak-Novakovic and D.L. Kaplan, Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering, *J Control Release* **134** (2009), 81–90. doi:[10.1016/j.jconrel.2008.10.021](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.10.021).
- [13] F. Fioretti, C. Mendoza-Palomares, M. Helms et al., Nanostructured assemblies for dental application, *ACS Nano* **4** (2010), 3277–3287.
- [14] S. Facca, C. Cortez, C. Mendoza-Palomares et al., Active multilayered capsules for in vivo bone formation, *Proc Natl Acad Sci USA* **107** (2010), 3406–3411. doi:[10.1073/pnas.0908531107](https://doi.org/10.1073/pnas.0908531107).
- [15] S. Facca, D. Lahiri, F. Fioretti et al., In vivo osseointegration of nano-designed composite coatings on titanium implants, *ACS Nano* **5** (2011), 4790–4799.
- [16] C. Mendoza-Palomares, A. Ferrand, S. Facca et al., Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics, *ACS Nano* **6** (2012), 483–490.
- [17] I. Yetim, O.V. Ozkan, A. Dervişoğlu, K. Erzurumlu and E. Canbolant, Effect of gentamicin-absorbed collagen in wound healing in pilonidal sinus surgery: A prospective randomized study, *J Int Med Res* **38** (2010), 1029–1033. doi:[10.1177/147323001003800329](https://doi.org/10.1177/147323001003800329).
- [18] S. Eap, A. Ferrand, J. Schiavi, L. Keller, T. Kokten, F. Fioretti, D. Mainard, G. Jadam and N. Benkirane-Jessel, Collagen implants equipped with ‘fish scale’-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration, *Nanomedicine* **9** (2014), 1253–1261. doi:[10.2217/nmm.13.122](https://doi.org/10.2217/nmm.13.122).
- [19] A. Ferrand, S. Eap, L. Richert et al., Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors, *Macromol Biosci* **14** (2014), 45–55. doi:[10.1002/mabi.201300283](https://doi.org/10.1002/mabi.201300283).
- [20] K. Kurpinski, J. Stephenson, R.R.R. Janairo, H. Lee and S. Li, The effect of fiber alignment and heparin coating on cell infiltration into nanofibrous PLLA scaffolds, *Biomaterials* **31** (2010), 3536–3542. doi:[10.1016/j.biomaterials.2010.01.062](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.062).
- [21] S.-H. Choi, C.-K. Kim, K.-S. Cho, J.-S. Huh, R.G. Sorensen, J.M. Wozney et al., Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs, *J Periodontol* **73** (2002), 63–72. doi:[10.1902/jop.2002.73.1.63](https://doi.org/10.1902/jop.2002.73.1.63).
- [22] H.-C. Chiu, C.-Y. Chiang, H.-P. Tu, U.M. Wikesjö, C. Susin and E. Fu, Effects of bone morphogenetic protein-6 on periodontal wound healing/regeneration in supraalveolar periodontal defects in dogs, *J Clin Periodontol* **40** (2013), 624–630. doi:[10.1111/jcpe.12075](https://doi.org/10.1111/jcpe.12075).
- [23] U.M. Wikesjö, P. Guglielmoni, A. Promsudthi, K.S. Cho, L. Trombelli, K.A. Selvig et al., Periodontal repair in dogs: Effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment, *J Clin Periodontol* **26** (1999), 392–400. doi:[10.1034/j.1600-051X.1999.260610.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.1999.260610.x).
- [24] N.M. Blumenthal, G. Koh-Kunst, M.E.A.F. Alves, D. Miranda, R.G. Sorensen, J.M. Wozney et al., Effect of surgical implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bioabsorbable collagen sponge or calcium phosphate putty carrier in intra bony periodontal defects in the baboon, *J Periodontol* **73** (2002), 1494–1506. doi:[10.1902/jop.2002.73.12.1494](https://doi.org/10.1902/jop.2002.73.12.1494).
- [25] D. Puppi, F. Chiellini, A.M. Piras and E. Chiellini, Polymeric materials for bone and cartilage repair, *Prog Polym Sci* **35** (2010), 403–440. doi:[10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006).
- [26] J. Guerrero, S. Catros, S.M. Derkaoui, C. Lalande, R. Siadous et al., Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis, *Acta Biomater* **9** (2013), 8200–8213. doi:[10.1016/j.actbio.2013.05.025](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.05.025).
- [27] S.S.I. Edwards, G. Zavala, C.P. Prieto, M. Elliott et al., Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton’s jelly in dermal regeneration, *Angiogenesis* **17** (2013), 851–866. doi:[10.1007/s10456-014-9432-7](https://doi.org/10.1007/s10456-014-9432-7).
- [28] L.L. Hench and J.M. Ploack, Third-generation biomedical materials, *Science* **295** (2002), 1014–1017. doi:[10.1126/science.1067404](https://doi.org/10.1126/science.1067404).
- [29] J. Henkel, M.A. Woodruff, D.R. Epari et al., Bone regeneration based on tissue engineering conception – A 21st century perspective, *Bone Res* **1** (2013), 216–248. doi:[10.4248/BR201303002](https://doi.org/10.4248/BR201303002).
- [30] X. Wei, X. Yang, Z. Han, F. Qu, L. Shao and Y. Shi, Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy, *Acta Pharmacol Sin* **34** (2013), 747–754. doi:[10.1038/aps.2013.50](https://doi.org/10.1038/aps.2013.50).
- [31] O. Tsigkou, I. Pomerantseva, J.A. Spencer et al., Engineered vascularized bone grafts, *PNAS* **107** (2010), 3311–3316. doi:[10.1073/pnas.0905445107](https://doi.org/10.1073/pnas.0905445107).

- [32] P. Au, L.M. Daheron and D.G. Duda et al., Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels, *Blood* **111** (2008), 1302–1305. doi:[10.1182/blood-2007-06-094318](https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-094318).
- [33] S. Baiguera and D. Ribatti, Endothelialization approaches for viable engineered tissues, *Angiogenesis* **16** (2013), 1–14. doi:[10.1007/s10456-012-9307-8](https://doi.org/10.1007/s10456-012-9307-8).
- [34] Q.H. Chen, A.R. Liu, H.B. Qiu and Y. Yang, Interaction between mesenchymal stem cells and endothelial cells restore endothelial permeability via paracrine hepatocyte growth factor *in vitro*, *Stem Cell Res Ther* **6** (2015), 44. doi:[10.1186/s13287-015-0025-1](https://doi.org/10.1186/s13287-015-0025-1).
- [35] C. Premer, A. Blum, M.A. Bellio, I.H. Schulman et al., Allogeneic mesenchymal stem cells restore endothelial function in heart failure by stimulating endothelial progenitor cells, *EBioMedicine* **2** (2015), 467–475. doi:[10.1016/j.ebiom.2015.03.020](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.03.020).
- [36] K.M. Fish and R.J. Hajjar, Mesenchymal stem cells & endothelial function, *EBioMedicine* **2** (2015), 376–377.
- [37] K. Phil, S. Hofmann, H. Redl and W. Holthöner, Vascularization mediated by mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: A comparison, *Cell Regen (Lond)* **4** (2015), 8.
- [38] N.K. Paschos, W.E. Brown, R. Eswaramoorthy, J.C. Hu and K.A. Athanasiou, Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture, *J Tissue Eng Regen Med* **9** (2015), 488–503. doi:[10.1002/term.1870](https://doi.org/10.1002/term.1870).
- [39] C.E. Clarkin, R.J. Emery, A.A. Pitsillides and C.P.D. Wheeler-Hones, Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells, *J Cell Physiol* **214** (2008), 537–544. doi:[10.1002/jcp.21234](https://doi.org/10.1002/jcp.21234).
- [40] T. Kaully, K. Kaufman-Francis, A. Lesman and S. Levenberg, Vascularization – The conduit to viable engineered tissues, *Tissue Eng Part B Rev* **15** (2009), 159–169.
- [41] M. Grellier, L. Bordenave and J. Amédée, Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: Implications for tissue engineering, *Trends Biotechnol* **27** (2009), 562–571. doi:[10.1016/j.tibtech.2009.07.001](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.07.001).
- [42] M. Jazayeri, A. Allameh, M. Soleimani, S.H. Jazayeri, A. Piryaei and S. Kazemnejad, Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells, *Cell Biol Int* **32** (2008), 1183–1192. doi:[10.1016/j.cellbi.2008.07.020](https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.07.020).
- [43] A.K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger and L. Claesson-Welsh, VEGF receptor signaling – In control of vascular function, *Nat Rev Mol Cell Biol* **7** (2006), 359–371. doi:[10.1038/nrm1911](https://doi.org/10.1038/nrm1911).
- [44] J. Kleinheinz, U. Stratmann, U. Joos and H.P. Wiesmann, VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration, *J Oral Maxillofac Surg* **63** (2005), 1310–1316. doi:[10.1016/j.joms.2005.05.303](https://doi.org/10.1016/j.joms.2005.05.303).
- [45] M. Grunewald, I. Avraham, Y. Dor et al., VEGF-induced adult neovascularization: Recruitment, retention, and role of accessory cells, *Cell* **124** (2006), 175–189. doi:[10.1016/j.cell.2005.10.036](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.036).
- [46] U. Lenze, F. Pohlig, S. Seitz et al., Influence of osteogenic stimulation and VEGF treatment on in vivo bone formation in hMSC-seeded cancellous bone scaffolds, *BMC Musculoskelet Disord* **15** (2014), 350. doi:[10.1186/1471-2474-15-350](https://doi.org/10.1186/1471-2474-15-350).
- [47] J. Schiavi, L. Keller, D.N. Morand et al., Active implant combining human stem cell microtissues and growth factors for bone-regenerative nanomedicine, *Nanomedicine* **10** (2015), 753–763. doi:[10.2217/nmm.14.228](https://doi.org/10.2217/nmm.14.228).
- [48] S. Eap, L. Keller, J. Schiavi et al., A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration, *Int J Nanomedicine* **10** (2015), 1061–1075. doi:[10.2147/IJN.S72670](https://doi.org/10.2147/IJN.S72670).
- [49] L. Keller, Q. Wagner, M. Pugliano et al., Bi-layered nano active implant with hybrid stem cell microtissues for tuned cartilage hypertrophy, *J Stem Cell Res Ther* **1** (2015), 0004.
- [50] L. Keller, P. Schwinté, E. Gomez-Barrena, M. Arruebo and N. Benkirane-Jessel, Smart implants as a novel strategy to regenerate well-founded cartilage, *Trends Biotechnol* **35** (2017), 8–11. doi:[10.1016/j.tibtech.2016.05.008](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.05.008).
- [51] Q. Wagner, D. Offner, Y. Idoux-Gillet et al., Advanced nanostructured medical device combining mesenchymal cells and VEGF nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization, *Nanomedicine (Lond)* **11** (2016), 2419–2430. doi:[10.2217/nmm-2016-0189](https://doi.org/10.2217/nmm-2016-0189).

Annexe 2

- ❖ Keller L., Offner D., Schwinté P., Morand D., Wagner Q., Gros CI., Bornert F., Bahi S., Musset AM., Benkirane-Jessel N., Fioretti F. (2015). Active nanomaterials to meet the challenge of dental pulp regeneration. *Materials*. 8 : 7461-7471

Review

Active Nanomaterials to Meet the Challenge of Dental Pulp Regeneration

Laetitia Keller^{1,2,†}, Damien Offner^{1,2,3,†}, Pascale Schwinté^{1,2}, David Morand^{1,2},
Quentin Wagner^{1,2}, Catherine Gros^{1,2,3}, Fabien Bornert^{1,2,3}, Sophie Bahi^{1,2,3},
Anne-Marie Musset^{2,3}, Nadia Benkirane-Jessel^{1,2,3} and Florence Fioretti^{1,2,3,*}

Received: 28 August 2015 ; Accepted: 19 October 2015 ; Published: 5 November 2015

Academic Editor: Marco Salerno

- ¹ French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), Osteoarticular and Dental, Regenerative Nanomedicine, UMR 1109, Faculté de Médecine de l'Université de Strasbourg and FMFS, 11 rue Humann, Strasbourg 67000, France; lkeller@unistra.fr (L.K.); damien.offner@hotmail.fr (D.O.); pschwinte@unistra.fr (P.S.); davidnicolas.morand@gmail.com (M.D.); wagner.quentin@gmail.com (Q.W.); catherine-isabelle.gros@chru-strasbourg.fr (C.G.); bornertfabien@gmail.com (F.B.); sophie.bahi@wanadoo.fr (S.B.); nadia.jessel@inserm.fr (N.B.-J.)
 - ² Faculté de Chirurgie Dentaire de l'Université de Strasbourg, 8 rue Ste Elisabeth, Strasbourg 67000, France; anne.marie.musset@chru-strasbourg.fr
 - ³ Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), Université de Strasbourg, Strasbourg 67000, France
- * Correspondence: f.fioretti@unistra.fr; Tel.: +33-3-68-85-33-76
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The vitality of the pulp is fundamental to the functional life of the tooth. For this aim, active and living biomaterials are required to avoid the current drastic treatment, which is the removal of all the cellular and molecular content regardless of its regenerative potential. The regeneration of the pulp tissue is the dream of many generations of dental surgeons and will revolutionize clinical practices. Recently, the potential of the regenerative medicine field suggests that it would be possible to achieve such complex regeneration. Indeed, three crucial steps are needed: the control of infection and inflammation and the regeneration of lost pulp tissues. For regenerative medicine, in particular for dental pulp regeneration, the use of nano-structured biomaterials becomes decisive. Nano-designed materials allow the concentration of many different functions in a small volume, the increase in the quality of targeting, as well as the control of cost and delivery of active molecules. Nanomaterials based on extracellular mimetic nanostructure and functionalized with multi-active therapeutics appear essential to reverse infection and inflammation and concomitantly to orchestrate pulp cell colonization and differentiation. This novel generation of nanomaterials seems very promising to meet the challenge of the complex dental pulp regeneration.

Keywords: regenerative nanomedicine; dental pulp; endodontic regeneration; electrospun nanofibrous membrane

1. Dental Pulp Vitality

The dental pulp located in the heart of the tooth (endodontic area) allows its vitality. The main endodontic tissue is a soft connective tissue that is well innervated and vascularized, and composed of collagen fibers, fibroblasts and dental stem cells. In its periphery, layers of odontoblasts are differentiated cells producing dentin. The whole pulp can sense the slightest mechanical, chemical and thermal stimuli and pulp cells can defend against various oral aggressions and microorganisms.

After a significant aggression, as any other connective tissue, the pulp responds with an inflammation process in order to eliminate pathogens and to allow repair. Due to its confinement in a hard chamber and its unique blood irrigation and lymphatic circulation, pulp inflammation (pulpitis)

is a complex and painful process that is difficult to control and dissipate. Generally, it results in pulp necrosis (Figure 1).

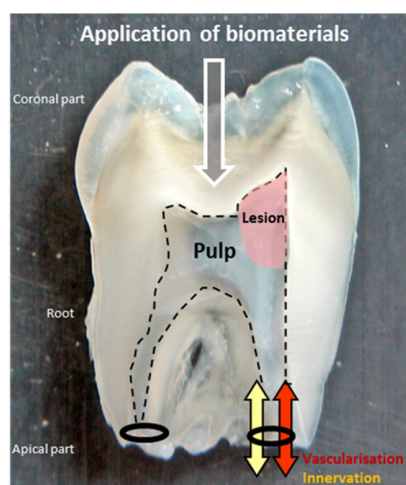


Figure 1. Section of an extracted tooth. The pulp is in the endodontic space delimited by the odontoblast layer (dotted line). Its inflammation is a complex process difficult to dissipate due to its confinement in a hard chamber and its unique blood irrigation and lymphatic circulation from the apical part. Biomaterials can be applied by the coronal side to regenerate the injured tissue of the lesion.

Pulpitis is often so painful and clinically irreversible that the surgical removal of the whole pulp from the tooth is required. All the cellular and molecular content is removed, whatever its regenerative potential, to be replaced by an inert polymer material (a natural latex named gutta percha), leaving the tooth without defenses.

This inflammation is considered to be clinically irreversible because to date there are not enough suitable biomaterials to properly control its different features.

The vitality of the pulp is so fundamental to the functional life of the tooth that new and smart biomaterials are required to avoid this current drastic treatment and to regenerate the lost endodontic tissues. Biomaterials functionalized through different nanotechnologies could be absolutely strategic [1].

2. Dental Pulp Regeneration

Regeneration of the pulp tissue is the dream of many generations of dental surgeons and will revolutionize clinical practice. The potential of regenerative medicine suggests that it would be possible to meet the challenge of this complex regeneration.

There are three crucial steps for this regeneration: (i) damaged tissues must be safely disinfected and all microorganisms must be eliminated by well-targeted antimicrobials [2]; (ii) the control of inflammation must occur at different levels of the tissue, meaning that the inflammatory phenotype of cells, the destructive exudation and damaged extracellular matrix must disappear; (iii) the regeneration of lost pulp tissue must take place, developing the type I collagen matrix with fibroblasts, innervation, vascularization and the odontoblast layer. For this final step, the endodontic regenerative active biomaterials must promote colonization and proliferation of the different competent cells at the tissue injury [1,3] (Figure 2).

The strategies of regeneration depend on the state of the dental pulp: the stage of inflammation and volume of damaged and infected tissues. For less important lesions, it is possible to perform an indirect or direct capping on the pulp with the biomaterials [4]. For more significant lesions, drilling to access the endodontic space is needed to apply the biomaterials in the coronal part or deeper in

the root pulp. When the tooth is immature, the induction of a calcified barrier becomes required to close the incompletely formed injured root (apexification). The most applied regenerative strategy is to encourage continuous physiological development and formation of the root, which means to promote apexogenesis [5].

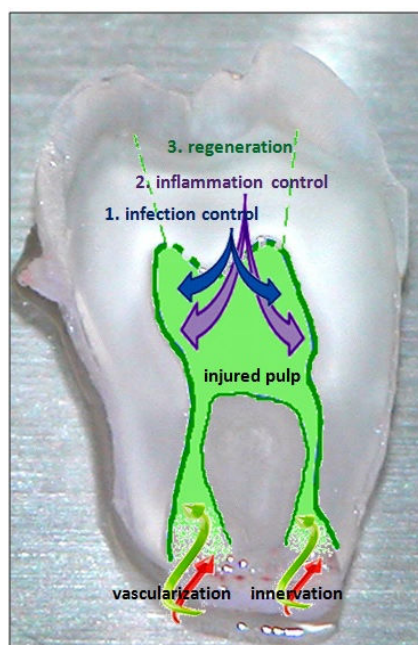


Figure 2. The three crucial steps of endodontic regeneration: (1) control of infection; (2) control of inflammation; and finally (3) regeneration of the injured pulp tissues: the type I collagen matrix with fibroblasts, innervation, vascularization and the odontoblast layer.

3. Regenerative Medicine for Dental Pulp

For dental pulp regeneration, a very promising procedure is root revascularization. After disinfection by local triple antibiotics, a broach is inserted into the root canal beyond its length in order to make the blood arise from the vessels of the surrounding bone to the root. Thus, by this procedure, teeth can recover vitality and apexification or apexogenesis can be obtained [6,7]. This procedure, providing clot fibrin and cells in the necrotic pulp tissue, needs to be supplemented by smart biomaterials in order to increase reproducibility and to promote a whole, well-orchestrated regeneration [8,9].

In order to carry the dental pulp regeneration, different kinds of postnatal stem cells have been isolated and studied from different tissues, including brain, skin, hair follicles, skeletal muscle, bone marrow and dental tissue [10,11]. Three types of dental mesenchymal stem cells were isolated and characterized: (i) from the pulp of permanent teeth, dental pulp stem cells (DPSC) [12]; (ii) from primary teeth, immature dental stem cells (IDPS) and stem cells of human exfoliated teeth (SHED) [13,14]; and (iii) from surrounding pulp tissues, periodontal ligament stem cells (PDLSC), stem cells from apical papilla (SCAP) and dental follicle progenitor cells (DFPC) [15–18].

The DPSC and the SHED are able to regenerate dental pulp [19,20]. The ability of SHED to differentiate *in vivo* into endothelial cells may contribute to pulp vascularization [21]. The SCAP showing capacity for dentin regeneration and for the expression of neurogenic markers can produce vascularized pulp-like tissue *in vivo* in root canals [16,22,23].

Procurement and multiplication of these dental stem cells is more complicated than for BMSC (bone marrow stem cells). When there is whole pulp necrosis, a lot of exogenous competent cells are needed [6,7,24]. Thus, adding proper nanomaterials supporting the exogenous cells can be very

interesting. Whatever the number of cells in the endodontic pulp, it is possible to get some autologous cells from the apical part of the tooth by the technique of root revascularization.

After a root revascularization of immature teeth, the SCAP may be responsible for the root edification and the more fragile DPSC remaining may contribute to pulp regeneration and differentiation into odontoblasts-like cells [25]. These capabilities of competent cells by the “cell homing” technique can be optimized by functionalized biomaterials. Nanomaterials specifically able to attract DPSC to the injured site from the healthy part of the pulp can also be very interesting to develop [6,7,19,20].

Some authors showed that SFD-1 (stromal cell-derived factor-1) and bFGF (basic fibroblast growth factor) are good molecules to induce this “cell homing” of DPSC [26]. PDGF (platelet-derived growth factor) and bFGF also promote the recruitment of local host competent cells for dental pulp regeneration [27].

The bone morphogenetic proteins also play an important role in the biology of pulp cells. Studies have shown that the expression of Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) is increased during terminal differentiation of odontoblasts and that BMP-7 promotes the formation of reparative dentin mineralization *in vivo* [28–30]. BMP-2 derived from dentin is required for the differentiation of SHED into odontoblasts [31]. The growth factors BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 and Gdf11 are important molecules for stem cell differentiation and their ability to induce dentinogenesis [28,32–34]. Expression of BMP receptors BMPR-IA, BMPR-IB and BMP-II was demonstrated on dental pulp cells as SHED, DPSC, and pulp fibroblasts [31]. Bone sialoprotein (BSP) is also important for stimulating the differentiation of pulp cells that are able to secrete mineralizable matrices after pulp exposure [30,35].

Enough nutriment and oxygen is critical for sustaining the activity of regenerative cells. To enhance neovascularization is a challenge for pulp regeneration considering the anatomical characteristics of endodontic confinement. Adding to the revascularization technique [6,7], different growth factors are able to promote vascular network formation. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a pro-angiogenic factor inducing stem cell differentiation into endothelial cells [21,36]. VEGF induces dental pulp stromal stem cells (DP-SC) to acquire endothelial cell-like features when they are cultured in a fibrin scaffold [37]. VEGF enhances the differentiation of SHED cultured in collagen lattices into vascular endothelial cells [21]. A case report shows that the root revascularization can be optimized by the endodontic use of PRP (platelet rich plasma) [38].

Whatever the competent cells selected, a biodegradable colorless scaffold is necessary to control their colonization and their regenerative activity. Some aberrant pulp mineralization was observed after endodontic injection of stem cells without scaffold. The probability of producing a new functional tissue pulp by exclusively injecting stem cells without matrix or signaling molecules is very low [1,39,40].

The most suitable for dental pulp regeneration are three-dimensional (3D) implantable or injectable scaffolds [1,19]. Pulp is a soft tissue protected mechanically by hard tissue, so a rigid scaffold is not necessary. The difficulty is the access to the narrow canals of the root. Thus, 3D implantable scaffolds must be flexible enough.

Several scaffolds have been studied [23,41]. Hydrogels of natural or synthetic polymers are suitable biomaterials for dental pulp regeneration because they can be injected and their water content offers a suitable viscosity and flexibility [3,27,41]. Self-assembled peptide hydrogels have been proposed [42]. A peptide matrix composed of multiple sequences of RADA (arginine-alanine-aspartate-alanine) has been shown to promote cell growth and differentiation of DPSC [11,43–45]. An injectable and light-curing drug delivery vehicle of Poly (Ethylene Glycol) Maleate Citrate (PEGMC) hydrogel was proposed for direct pulp capping and showed promising results with a proper cell viability and control of the calcium hydroxide incorporated [46]. Hyaluronic acid hydrogels show good results to carry endodontic regeneration but inhibit the innervation [47].

The quantity and the size of pores inside the hydrogels, crucial for diffusion of nutrients, active biomolecules, and cellular waste transport, are determined by the quantity and the size of the particles than can be incorporated [48]. The minimal size of pores for tissue regeneration must be 100 μm [49]. The influence of the size of the pores on proliferation and differentiation on dental pulp stem cells has been studied on poly(l-lactic acid) scaffolds [50]. Different technologies were proposed in order to create this favorable porosity in hydrogels [51]. The disadvantages in the use of hydrogels are the long fabrication process (particularly self-assembled peptide hydrogels) and the limited incorporation of nanofibers [52–55].

4. Nanomaterials for Dental Pulp Regeneration

Nanomaterials for dental pulp regeneration can be used alone, or with growth factors, drugs or stem cells. To build biomaterials at the nanoscale level is very crucial for dental pulp regeneration. It allows the concentration of many different functions in a small volume and presents the advantage of increasing the quality of targeting while controlling the cost and delivery of the active molecules.

These endodontic nanomaterials can be reservoirs of antibacterial and anti-inflammatory molecules and they deliver growth factors guiding the migration, proliferation, and differentiation of the different pulp cells: fibroblasts, vascular and nervous cells, and odontoblasts.

Nano-assemblies targeting the first step of dental pulp regeneration have been built with two polymers carrying an anti-inflammatory hormone: Poly-L-Lysine Dendrigrift (DGL), Poly-Glutamic Acid (PGA) and α -Melanocyte Stimulating Hormone (alpha MSH). PGA-alpha-MSH induces the reduction of inflammation of pulp connective tissue, acting on fibroblasts, monocytes and macrophages. DGLG4-PGA- α -MSH nano-assemblies promote the initiation of the regeneration of pulp connective tissue, providing adhesion and multiplication of pulp fibroblasts [56]. In endodontic infections, some bacteria always remain and can grow again. The long-term action of these reservoirs built by layer-by-layer nanotechnology could be needed to prevent inflammation aggravation and to let tissue regeneration occur [24].

Nanotechnologies also allow the construction of biomimetic scaffolds. Scaffolds of natural nanofibers are known to support endodontic regeneration. The root revascularization can be optimized by the use of type I collagen scaffolds [57]. Collagen scaffolds are appropriate for cell homing induced by FGF-b [26].

Nanofibrous and microporous membranes are very promising to promote dental pulp regeneration as a mimetic extracellular matrix [58]. By electrospinning, matrices of different synthetic and natural polymers are built, with nanofibers of diameters closest to the size of collagen nanofibers (50 to 500 nm). The electrospun randomized nanofiber network and the created micropores (diameter inferior to 100 μm) mimic the pattern of the connective tissue matrix [55,59] (Figure 3A). Electrospun matrices of PCL (poly(ϵ -caprolactone)) show favorable results for connective tissue regeneration [60,61]. The capacity of these matrices to be functionalized may also allow success in the different steps of the complex endodontic regeneration (Figure 3B).

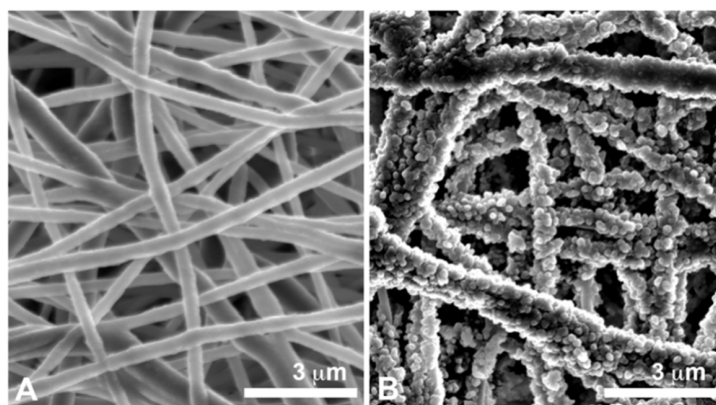


Figure 3. Scanning Electron Microscopy (SEM) observations. (A) Nanofibrous polycaprolactone membrane with an electrospun nanofiber network that mimics the pattern of the connective tissue matrix (B) Nanofibrous polycaprolactone membrane functionalized with nanoreservoirs of growth factors.

The functionalization by active molecules incorporated in scaffolds is the best drug delivery system. Different strategies of functionalization of electrospun nanofibers are possible: by plasma or wet chemical treatment, by surface graft polymerization, and by incorporation into the polymer solution to electrospin [62]. This last technique, named co-axial electrospinning, leads to an encapsulation of the bioactive molecule inside the nanofibers for a delayed action. Antioxidants and antibiotics were incorporated inside PCL nanofibers [63]. The association of electrospinning and electrospraying is used to functionalize nanofibers during their production. Nanofibers of PMMA (poly(methyl methacrylate)) were well functionalized by alpha acid lipoic or by sodium fluorides [64].

The strategy of functionalization of nanofibers by nanoreservoirs of BMP-2 or BMP-7 shows a great efficiency for bone regeneration and increases the differentiation of MSC (mesenchymal stem cell), accelerating the tissue regeneration *in vivo* [65–67].

Different nanofibrous microporous scaffolds provide an excellent environment for dentin regeneration. Electrospun PCL/gelatin scaffolds with nano-hydroxyapatite enhance the differentiation of DPSC towards an odontoblast-like phenotype [68]. Nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds functionalized by BMP-7 and dexamethasone promote dentin regeneration [69,70].

The mineralization of electrospun PCL scaffolds is particularly attractive for dentin tissue engineering by promoting the growth and odontogenic differentiation of HDPC (human dental pulp cells) [71]. The incorporation of mesoporous bioactive glass nanoparticles inside nanofibrous PCL-gelatin matrices also enhances this odontogenic differentiation of HDPC [72]. Nanofibrous gelatin/magnesium phosphate scaffolds provide a controlled release of metallic ions, which enhances dentin regeneration by DPSCs [73].

Nanofibrous PCL membranes are also suitable scaffolds for the regeneration of the bone-tooth unit. These nanomaterials functionalized with BMP-4 and Noggin increase bone tissue regeneration and favorably control the root development after an immature tooth implantation in a mice model [74]. Thus, they can be considered as the first promising nanomaterials for apexogenesis [75].

The functionalization of nanofibrous PCL membranes by NGF (neural growth factor) promotes innervation ascending from the root to the coronal part of the pulp *in vivo*, which is a particularly strategic point for dental pulp regeneration [76].

These electrospun nanofibrous scaffolds can also optimize the disinfection by local antibiotics. Electrospun nanofibrous scaffolds of polydioxanone containing two antibiotics of the revascularization technique (metronidazole and ciprofloxacin) [6,7] show their antimicrobial capacity and their cytocompatibility and constitute a biologically safe antimicrobial drug delivery system for endodontic regeneration [77,78].

5. Conclusion

Nanotechnologies optimize the distribution of active molecules and the extracellular mimetic structure of scaffolds. Thus, they appear essential to control/inhibit infection and inflammation and to orchestrate pulp cell colonization and differentiation. In the future, nanotechnologies would be able to build temporally and spatially controlled drug delivery systems of several crucial bioactive molecules. These multi-functionalized nanomaterials would help to meet the challenge of complex dental pulp regeneration.

Acknowledgments: We are indebted to Faculty of Dental Surgery (University of Strasbourg, UDS) for supporting Laetitia Keller, David Morand and Quentin Wagner. We thank Satt Conectus Alsace for supporting Pascale Schwinté.

Author Contributions: Laetitia Keller, Damien Offner, Anne-Marie Musset, Nadia Benkirane-Jessel and Florence Fioretti wrote the paper and answer to reviewers. Pascale Schwinté provided her expertise and references about electrospun scaffolds and hydrogels. David Morand and Quentin Wagner provided their expertise and references about bioactive molecules. Catherine Gros, Fabien Bornert and Sophie Bahi contributed to the figures.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Murray, P.E.; Garcia-Godoy, F.; Hargreaves, K.M. Regenerative endodontics: A review of current status and a call for action. *J. Endod.* **2007**, *33*, 377–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fouad, A.F. The microbial challenge to pulp regeneration. *Adv. Dent. Res.* **2011**, *23*, 285–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sun, H.H.; Jin, T.; Yu, Q.; Chen, F.M. Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering. *J. Tissue Eng. Reg. Med.* **2011**, *5*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Komabayashi, T.; Zhu, Q. Innovative endodontic therapy for anti-inflammatory direct pulp capping of permanent teeth with a mature apex. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* **2010**, *109*, 75–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lin, L.M.; Rosenberg, P.A. Repair and regeneration in endodontics. *Int. Endo. J.* **2011**, *44*, 889–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Iwaya, S.I.; Ikawa, M.; Kubota, M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent. Traumatol.* **2001**, *17*, 185–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Thibodeau, B.; Teixeira, F.; Yamauchi, M.; Caplan, D.J.; Trope, M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J. Endod.* **2007**, *33*, 680–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Reynolds, K.; Johnson, J.D.; Cohenca, N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: A case report. *Int. Endod. J.* **2009**, *42*, 84–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Simon, S.R.; Tomson, P.L.; Berdal, A. Regenerative endodontics: Regeneration or repair? *J. Endod.* **2014**, *40*, 267–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Volponi, A.A.; Pang, Y.; Sharpe, P.T. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 715–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Demarco, F.F.; Conde, M.C.; Cavalcanti, B.N.; Casagrande, L.; Sakai, V.T.; Nör, J.E. Dental pulp tissue engineering. *Braz. Dent. J.* **2011**, *22*, 3–13. [[PubMed](#)]
12. Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahimi, J.; Robey, P.G.; Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 13625–13630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kerkis, I.; Kerkis, A.; Dozortsev, D.; Stukart-Parsons, G.C.; Gomes Massironi, S.M.; Pereira, L.V.; Caplan, A.I.; Cerruti, H.I. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* **2006**, *184*, 105–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Miura, M.; Gronthos, S.; Zhao, M.; Lu, B.; Fisher, L.W.; Robey, P.G.; Shi, S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 5807–5812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Seo, B.M.; Miura, M.; Gronthos, S.; Bartold, P.M.; Batouli, S.; Brahim, J.; Young, M.; Robey, P.G.; Wang, C.Y.; Shi, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **2004**, *364*, 149–155. [[CrossRef](#)]
16. Sonoyama, W.; Liu, Y.; Fang, D.; Yamaza, T.; Seo, B.M.; Zhang, C.; Zhang, C.; Liu, H.; Gronthos, S.; Wang, C.-Y.; *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE* **2006**, *1*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sonoyama, W.; Liu, Y.; Yamaza, T.; Tuan, R.S.; Wang, S.; Shi, S.; Huang, G.T.-J. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study. *J. Endod.* **2008**, *34*, 166–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Morsczeck, C.; Gotz, W.; Schierholz, J.; Zeilhofer, F.; Kuhn, U.; Mohl, C.; Sippl, C.; Hoffmann, K.H. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* **2005**, *24*, 155–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Casagrande, L.; Cordeiro, M.M.; Nör, S.A.; Nör, J.E. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* **2011**, *99*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Iohara, K.; Nakashima, M.; Ito, M.; Ishikawa, M.; Nakasima, A.; Akamine, A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J. Dent. Res.* **2004**, *83*, 590–595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Sakai, V.T.; Zhang, Z.; Dong, Z.; Neiva, K.G.; Machado, M.A.A.M.; Shi, S.; Santos, C.F.; Nör, J.E. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 791–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Huang, G.T.; Gronthos, S.; Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* **2009**, *88*, 792–806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Huang, G.T.; Yamaza, T.; Shea, L.D.; Djouad, F.; Kuhn, N.Z.; Tuan, R.S.; Shi, S. Stem/progenitor cell-mediated *de novo* regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an *in vivo* model. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 605–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fioretti, F.; Mendoza-Palomares, C.; Avoaka-Boni, M.C.; Ramarosan, J.; Bahi, S.; Richert, L.; Granier, F.; Benkirane-Jessel, N.; Haikel, Y. Nano-odontology: Nanostructured assemblies for endodontic regeneration. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2011**, *7*, 471–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Huang, G.T. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: Conservation of stem cells for regeneration. *J. Dent.* **2008**, *36*, 379–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Suzuki, T.; Lee, C.H.; Chen, M.; Zhao, W.; Fu, S.Y.; Qi, J.J.; Chotkowski, G.; Eisig, S.B.; Wong, A.; Mao, J.J. Induced migration of dental pulp stem cells for *in vivo* pulp regeneration. *J. Dent. Res.* **2011**, *90*, 1013–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kim, J.Y.; Xin, X.; Moioli, E.K.; Chung, J.; Lee, C.H.; Chen, M.; Fu, S.Y.; Koch, P.D.; Mao, J.J. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 3023–3031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Nakashima, M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol.* **1994**, *39*, 1085–1089. [[CrossRef](#)]
29. Nakashima, M.; Reddi, A.H. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1025–1032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Decup, F.; Six, N.; Palmier, B.; Buch, D.; Lasfargues, J.J.; Salih, E.; Goldberg, M. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin. Oral Investig.* **2000**, *4*, 110–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Casagrande, L.; Demarco, F.F.; Zhang, Z.; Araujo, F.B.; Shi, S.; Nör, J.E. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 603–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Rutherford, R.B.; Wahle, J.; Tucker, M.; Rueger, D.; Charette, M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol.* **1993**, *38*, 571–576. [[CrossRef](#)]
33. Jepsen, S.; Albers, H.K.; Fleiner, B.; Tucker, M.; Rueger, D. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *J. Endod.* **1997**, *23*, 378–382. [[CrossRef](#)]
34. Six, N.; Decup, F.; Lasfargues, J.J.; Salih, E.; Goldberg, M. Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2002**, *13*, 225–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Six, N.; Lasfargues, J.J.; Goldberg, M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Biol.* **2002**, *47*, 177–187. [[CrossRef](#)]
36. Jazayeri, M.; Allameh, A.; Soleimani, M.; Jazayeri, S.H.; Piryaei, A.; Kazemnejad, S. Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol. Int.* **2008**, *32*, 1183–1192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Marchionni, C.; Bonsi, L.; Alviano, F.; Lanzoni, G.; Di Tullio, A.; Costa, R.; Montanari, M.; Tazzari, P.L.; Ricci, F.; Pasquinelli, G.; *et al.* Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2009**, *22*, 699–706. [[PubMed](#)]
38. Torabinejad, M.; Turman, M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: A case report. *J. Endod.* **2011**, *37*, 265–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Bansal, R. Regenerative endodontics: A state of the art. *Indian J. Dent. Res.* **2011**, *22*, 122–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Iohara, K.; Zheng, L.; Ito, M.; Ishizaka, R.; Nakamura, H.; Into, T.; Matsushita, K.; Nakashima, M. Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31[−]/CD146[−] side population cells from a canine tooth. *Regen. Med.* **2009**, *4*, 377–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Luo, Y.; Shoichet, M.S. A photolabile hydrogel for guided three-dimensional cell growth and migration. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 249–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Galler, K.M.; Cavender, A.; Yuwono, V.; Dong, H.; Shi, S.; Schmalz, G.; Hartgerink, J.D.; D'Souza, R.N. Self-assembling peptide amphiphile nanofibers as a scaffold for dental stem cells. *Tissue Eng. Part A.* **2008**, *14*, 2051–2058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Misawa, H.; Kobayashi, N.; Soto-Gutierrez, A.; Chen, Y.; Yoshida, A.; Rivas-Carrillo, J.D.; Navarro-Alvarez, N.; Tanaka, K.; Miki, A.; Takei, J.; *et al.* PuraMatrixTM facilitates bone regeneration in bone defects of calvaria in mice. *Cell Transplant.* **2006**, *15*, 903–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Narmoneva, D.A.; Oni, O.; Sieminski, A.L.; Zhang, S.; Gertler, J.P.; Kamm, R.D.; Lee, R.T. Self-assembling short oligopeptides and the promotion of angiogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4837–4846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Thonhoff, J.R.; Lou, D.I.; Jordan, P.M.; Zhao, X.; Wu, P. Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials *in vitro*. *Brain Res.* **2008**, *1187*, 42–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Komabayashi, T.; Wadajkar, A.; Santimano, S.; Ahn, C.; Zhu, Q.; Opperman, L.A.; Bellinger, L.L.; Yang, J.; Nguyen, K.T. Preliminary study of light-cured hydrogel for endodontic drug delivery vehicle. *J. Invest. Clin. Dent.* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kitamura, C.; Nishihara, T.; Terashita, M.; Tabata, Y.; Washio, A. Local regeneration of dentin-pulp complex using controlled release of FGF-2 and naturally derived sponge-like Scaffolds. *Inter. J. Dent.* **2012**, *2012*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Puppi, D.; Chiellini, F.; Piras, A.M.; Chiellini, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 403–440. [[CrossRef](#)]
49. Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5474–5491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Conde, C.M.; Demarco, F.F.; Casagrande, L.; Alcazar, J.C.; Nör, J.E.; Tarquinio, S.B. Influence of poly-L-lactic acid scaffold's pore size on the proliferation and differentiation of dental pulp stem cells. *Braz. Dent. J.* **2015**, *26*, 93–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Betz, M.W.; Yeatts, A.B.; Richbourg, W.J.; Caccamese, J.F.; Coletti, D.P.; Falco, E.E.; Fisher, J.P. Macroporous hydrogels upregulate osteogenic signal expression and promote bone regeneration. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1160–1168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Barnes, C.P.; Sell, S.A.; Boland, E.D.; Simpson, D.G.; Bowlin, G.L. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 1413–1433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Holzwarth, J.M.; Ma, P.X. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2011**, *32*, 9622–9629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Smith, I.O.; Liu, X.H.; Smith, L.A.; Ma, P.X. Nano-structured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1*, 226–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ma, P.X. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater. Today* **2004**, *7*, 30–40. [[CrossRef](#)]

56. Fioretti, F.; Mendoza-Palomares, C.; Helms, M.; Al Alam, D.; Richert, L.; Arntz, Y.; Rinckenbach, S.; Garnier, F.; Haïkel, Y.; Gangloff, S.C.; *et al.* Nanostructured assemblies for dental application. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3277–3287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Yamauchi, N.; Yamauchi, S.; Nagaoka, H.; Duggan, D.; Zhong, S.; Lee, S.M.; Teixeira, F.B.; Yamauchi, M. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *J. Endod.* **2011**, *37*, 390–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Albuquerque, M.T.; Valera, M.C.; Nakashima, M.; Nör, J.E.; Bottino, M.C. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *J. Dent. Res.* **2014**, *93*, 1222–1231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Beachley, V.; Wen, X. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 868–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Mendoza-Palomares, C.; Ferrand, A.; Facca, S.; Fioretti, F.; Ladam, G.; Kuchler-Bopp, S.; Regnier, T.; Mainard, D.; Benkirane-Jessel, N. Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* **2012**, *6*, 483–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Eap, S.; Morand, D.; Clauss, F.; Huck, O.; Stoltz, J.F.; Lutz, J.C.; Benkirane-Jessel, N.; Keller, L.; Fioretti, F. Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce bone. *Biomed. Mater. Eng.* **2015**, *25*, 79–85. [[PubMed](#)]
62. Yoo, H.S.; Kim, T.G.; Park, T.G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1033–1042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Huang, Z.M.; He, C.L.; Yang, A.; Zhang, Y.; Han, X.J.; Yin, J.; Wu, Q. Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2006**, *77*, 169–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Park, C.H.; Kim, K.H.; Lee, J.C.; Lee, J. *In-situ* nanofabrication via electrohydrodynamic jetting of countercharged nozzles. *Polym. Bull.* **2008**, *61*, 521–528. [[CrossRef](#)]
65. Ferrand, A.; Eap, S.; Richert, L.; Lemoine, S.; Kalaskar, D.; Demoustier-Champagne, S.; Atmani, H.; Mély, Y.; Fioretti, F.; Schlatter, G.; *et al.* Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 45–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Li, G.; Zhang, T.; Li, M.; Fu, N.; Fu, Y.; Ba, K.; Deng, S.; Jiang, Y.; Hu, J.; Peng, Q.; *et al.* Electrospun fibers for dental and craniofacial applications. *Curr. Stem Cell. Res. Ther.* **2014**, *9*, 187–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Eap, S.; Keller, L.; Schiavi, J.; Huck, O.; Jacomine, L.; Fioretti, F.; Gauthier, C.; Sebastian, V.; Schwinté, P.; Benkirane-Jessel, N. A Living thick nanofibrous implant bi-functionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 1061–1075.
68. Yang, X.; Yang, F.; Walboomers, X.F.; Bian, Z.; Fan, M.; Jansen, J.A. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *93*, 247–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Wang, J.; Liu, X.; Jin, X.; Ma, H.; Hu, J.; Ni, L.; Ma, P.X. The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds *in vitro* and *in vivo*. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3856–3863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Wang, J.; Ma, H.; Jin, X.; Hu, J.; Liu, X.; Ni, L.; Ma, P.X. The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7822–7830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Kim, J.J.; Bae, W.J.; Kim, J.M.; Kim, J.J.; Lee, E.J.; Kim, H.W.; Kim, E.C. Mineralized polycaprolactone nanofibrous matrix for odontogenesis of human dental pulp cells. *J. Biomater. Appl.* **2014**, *28*, 1069–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Kim, G.H.; Park, Y.D.; Lee, S.Y.; El-Fiqi, A.; Kim, J.J.; Lee, E.J.; Kim, H.W.; Kim, E.C. Odontogenic stimulation of human dental pulp cells with bioactive nanocomposite fiber. *J. Biomater. Appl.* **2015**, *29*, 854–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Qu, T.; Jing, J.; Jiang, Y.; Taylor, R.J.; Feng, J.Q.; Geiger, B.; Liu, X. Magnesium-containing nanostructured hybrid scaffolds for enhanced dentin regeneration. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20*, 2422–2433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Keller, L.; Kuchler-Bopp, S.; Mendoza, S.A.; Poliard, A.; Lesot, H. Tooth engineering: Searching for dental mesenchymal cells sources. *Front. Physiol* **2011**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Kuchler-Bopp, S.; Bécavin, T.; Kökten, T.; Fioretti, F.; Benkirane-Jessel, N.; Keller, L. Nanostructured hybrid materials for bone-tooth unit regeneration. *Open J. Reg. Med.* **2013**, *2*, 47–52. [[CrossRef](#)]

76. Eap, S.; Bécavin, T.; Keller, L.; Kökten, T.; Fioretti, F.; Weickert, J.L.; Deveaux, E.; Benkirane-Jessel, N.; Kuchler-Bopp, S. Nanofibers implant functionalized by neural growth factor as a strategy to innervate a bioengineered tooth. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3*, 386–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Palasuk, J.; Kamocki, K.; Hippenmeyer, L.; Platt, J.A.; Spolnik, K.J.; Gregory, R.L.; Bottino, M.C. Bimix antimicrobial scaffolds for regenerative endodontics. *J. Endod.* **2014**, *40*, 1879–1884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Bottino, M.C.; Kamocki, K.; Yassen, G.H.; Platt, J.A.; Vail, M.M.; Ehrlich, Y.; Spolnik, K.J.; Gregory, R.L. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J. Dent. Res.* **2013**, *92*, 963–969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe 3

- ❖ Richert L., Keller L., Wagner Q., Bornert F., Gros C., Bahi S., Clauss F., Bacon W., Clézardin P., Benkirane-Jessel N., Fioretti F. (2015) Nanoscale Stiffness Distribution in Bone Metastasis. *World J. Nano Sci. Eng.* 05, 219.

Nanoscale Stiffness Distribution in Bone Metastasis

Ludovic Richert^{1*}, Laetitia Keller^{2,3*}, Quentin Wagner^{2,3}, Fabien Bornert^{2,3,4},
Catherine Gros^{2,3,4}, Sophie Bahi^{2,3,4}, François Clauss^{2,3,4}, William Bacon^{2,3,4},
Philippe Clézardin⁵, Nadia Benkirane-Jessel^{2,3,4}, Florence Fioretti^{2,3,4}

¹Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR, Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg (UdS), Illkirch, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine, UMR, Faculté de Médecine de l'Université de Strasbourg and FMTS, Strasbourg, France

³Faculté de Chirurgie Dentaire de l'Université de Strasbourg (UdS), Strasbourg, France

⁴Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR, Faculté de Médecine Laënnec de l'Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

Email: f.fioretti@unistra.fr

Received 21 August 2015; accepted 28 December 2015; published 31 December 2015

Copyright © 2015 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Nanomechanical heterogeneity is expected to have an effect on elasticity, injury and bone remodelling. In normal bone, we have two types of cells (osteoclasts and osteoblasts) working together to maintain existing bone. Bone cancers can produce factors that make the osteoclasts work harder. This means that more bone is destroyed than rebuilt, and leads to weakening of the affected bone. We report here the first demonstration of the nanoscale stiffness distribution in bone metastases before and after treatment of animals with the bisphosphonate Risedronate, a drug which is currently used for the treatment of bone metastases in patients with advanced cancers. The strategy used here is applicable to a wide class of biological tissues and may serve as a new reflection for biologically inspired scaffolds technologies.

Keywords

Bone Metastasis, Stiffness, Risedronate

1. Introduction

As cancer becomes more advanced, it tends to spread throughout the body, with the bones being a common site

*These authors contributed equally to this work.

How to cite this paper: Richert, L., Keller, L., Wagner, Q., Bornert, F., Gros, C., Bahi, S., Clauss, F., Bacon, W., Clézardin, P., Benkirane-Jessel, N. and Fioretti, F. (2015) Nanoscale Stiffness Distribution in Bone Metastasis. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 5, 219-228. <http://dx.doi.org/10.4236/wjnse.2015.54023>

of spread for many cancers [1]. Spread of cancer to the bone from its original site is referred to as bone metastases. Treatment may consist of radiation therapy, bisphosphonates, hormone therapy and/or chemotherapy, depending upon the type of cancer from which the metastasis originated [2] [3].

Researchers are evaluating ways to avoid or decrease the ache or break caused by bone metastasis, not just provide treatment once they occur. Myeloma and some secondary bone cancers can produce factors that make the osteoclasts work harder [1]-[4]. This means that more bone is destroyed than rebuilt, and leads to weakening of the affected bone. This can cause pain and means that the bone can fracture or break more easily; in this case, ablation of metastasis bone and implantation of biomaterials are needed.

As many natural materials, bone is heterogeneous. Mechanical heterogeneity is expected to exist at different length scales. It has become evident that the nanoscale properties of bone participate in its macroscopic biomechanical function [4]-[7]. At the macroscopic level, considerable variations in mechanical properties have been detected for different tissues locations [8], as well as for regions within a specific location [9]. Microscopically, indentation has further identified differences in modulus and hardness for specific features such as lamellae (thin and thick) in osteons of bone which have been recognized as collagen fibril orientation, as well as variations in mineral composition [10] [11]. The cellular remodelling process resulting in a combination of new and old bone is a result of this heterogeneity at this length scale [12]. Atomic force microscopy (AFM)-based nanoindentation has been used to distinguish mechanically heterogeneous microscale regions in bone tissue from genetically modified mice [13]-[16]. These studies also raise important issues as to whether heterogeneity is advantageous or disadvantageous to the mechanical function of bone [17]. Recently, the detailed study of the consequences of heterogeneity, in particular at the nanoscale, was reported [18].

An inherent feature of bones is their heterogeneity in the collagen fibril orientation and the mineral content. This particular spatial structure has a direct incidence on their elasticity even on the nanometer scale [18]. The elasticity, or equivalently the stiffness, of a material can be quantified using nano-indentation. It consists in fixing a probe (most often a sphere, a cone or a pyramid) at the end of the cantilever of an atomic force microscope (AFM) and to measure the deflection of the cantilever when the material to be characterized is pushed into contact with the probe. The applied force is derived from the deflection, and the indentation is derived from the deflection and the material displacement. In this way, we obtain a so-called force curve. If the material behaves as an elastic solid, a force curve can be interpreted using Hertzian mechanics [19]. This characterization method was used to compare healthy bone, bone with metastases, and bone after treatment with bisphosphonates.

Bisphosphonates drugs are used for the treatment of cancer-related hypercalcemia and treatment of bone metastases in patients with advanced cancers [2]. Bisphosphonates decrease the rate of bone destruction in patients with bone metastases and clinical studies have demonstrated that bisphosphonates can significantly decrease the pain and number of fractures induced by bone metastases.

Bisphosphonates are established in the treatment of skeletal metastases [12]. They have a common P-C-P structural feature consisting in a central carbon atom correlated to two phosphonate moieties, and two substituents (R1, R2) (Figure 1). Phosphonate and R1 (preferably hydroxyl) groups allow bisphosphonates to bind

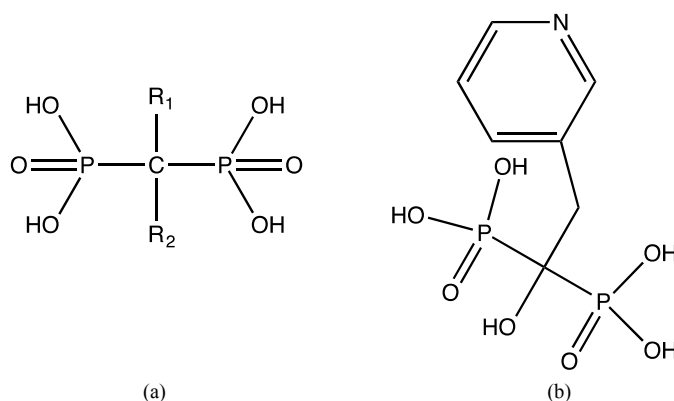


Figure 1. (a) Chemical structure of bisphosphonate drugs. P-C-P common structural feature of bisphosphonates and location of the specific R1 and R2; (b) Chemical structure of the Risedronate (RIS) antitumor drug (2-(3-pyridinyl)-1-hydroxyethylidene-bisphosphonic acid).

avidly to bone hydroxyapatite, while R2 determines their effectiveness to inhibit osteoclast-mediated bone resorption [3]. Clinically, bisphosphonates significantly diminish bone destruction rate, pain and fractures associated with bone metastases [2]. Moreover, there is extensive *in vivo* preclinical evidence that bisphosphonates reduce skeletal tumor burden and inhibit bone metastasis formation in animals [12]. Among proposed mechanisms of actions, bisphosphonates may render bone a less favorable microenvironment for metastasis development by reducing osteoclast-mediated bone resorption, which, in turn, deprives tumor cells of bone-derived growth factors required for their proliferation. Additionally, bisphosphonates were shown to exert direct antitumor action, as they inhibited tumor cell adhesion, invasion, and proliferation, and induced apoptosis of various human tumor cell lines *in vitro* [3]. However, to date this clear direct antitumor potential was not verified *in vivo* [10], due to the high affinity of bisphosphonates for bone mineral which must obstruct their availability for tumor cells. We undeniably observed a significantly higher potency of soluble compared to mineral-bound bisphosphonates at inhibiting tumor cell adhesion to bone *in vitro* [1]. Therefore strategies are needed to optimize bisphosphonates bioavailability and direct antitumor activity *in vivo*.

As well, cells are constantly changing their mechanical environment [20] and nanomechanical heterogeneity detection could facilitate damage detection in the extracellular matrix and improved remodelling responses. The heterogeneous nanomechanical prototypes measured experimentally could in turn induce local heterogeneous strains when loaded macroscopically. Such strains are expected to be increased by the softer surrounding cellular matrix of osteocytes [21] and also expected to influence interstitial fluid flow.

The objective of this work was to analyze the nanomechanical distribution of breast cancer bone metastasis before and after treatment of metastatic animals with Risedronate, the usually administrated drug in clinic. In this study, we have first analyzed by radiography, histology and histomorphometry the legs from metastatic mice and compared them with those from animals that had not been injected with breast cancer cells (naive mice).

By radiography, we have analyzed and compared the healthy bone without metastasis (**Figure 2(a)**), bone with metastasis induced after inoculation (**Figure 2(b)**) and the treated bone after treatment by Risedronate (**Figure 2(c)**).

After radiography on day 32 after tumor cell injection, we have shown that metastatic animals had large osteolytic lesions in hind limbs when compared to the bones of naive mice (**Figure 2**, panels b vs a). Metastatic animals were then treated either with the bisphosphonate Risedronate (administered by subcutaneous injection in

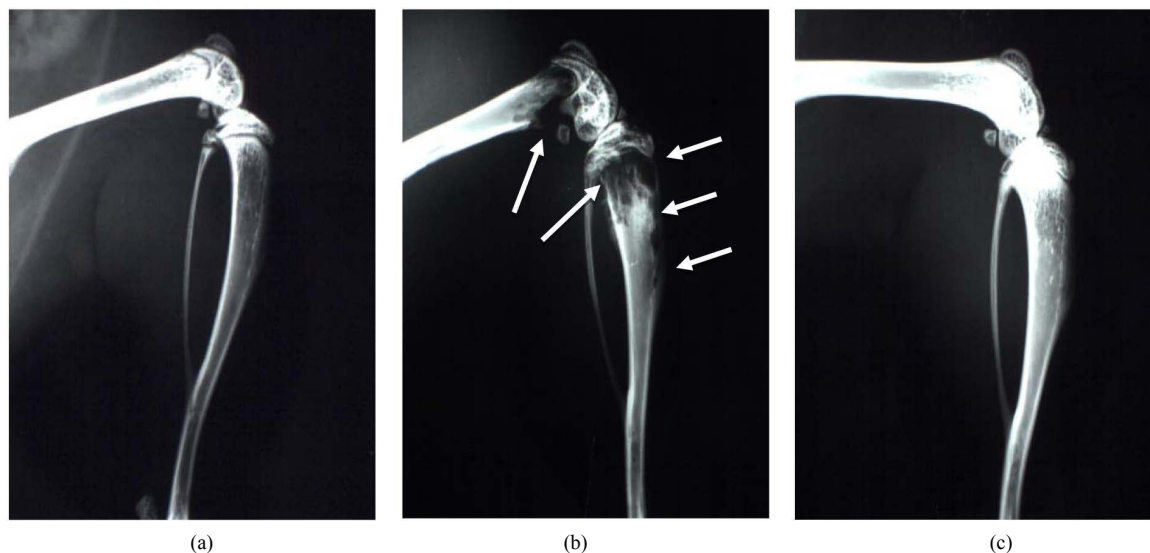


Figure 2. Identification of bone metastasis on radiographs of hind limbs from mice not injected with tumor cells with healthy bone, Naïve (a); b and c radiographs were obtained from different mice at day 32 after CHO- β 3 tumor cells inoculation. PBS was used as vehicle and corresponds to bone with metastasis (b); Risedronate was used to treat mice and the radiographs represent the treated bone (c). The radiographs displayed are examples that best illustrate the effects of treatments. Arrows indicate osteolytic lesions.

PBS, used here as the vehicle) or the vehicle only.

After radiographic analysis, we examined the effect of Risedronate on the extent of bone destruction and determined the size of bone metastasis (**Table 1**).

Our results indicate clearly the antitumor efficacy of the treatment by Risedronate (0.6 mm² for treated bone, compared to 5 mm² for bone without treatment). We also performed histology and compared tumor burden and soft tissue volume ratio before and after treatment by Risedronate (**Figure 3** and **Table 2**).

The images shown in **Figure 3** are examples that best illustrate the effects of the treatments with Risedronate (**Figure 3(c)**) compared to no treated bone with tumor cells (asterisk in **Figure 3(b)**). To get more information

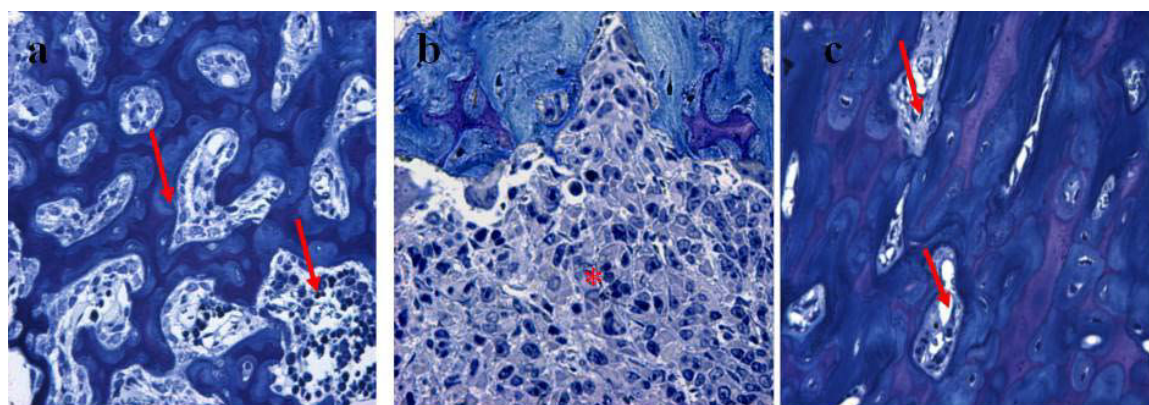


Figure 3. Optical microscopy visualization after semi-thin section (7 μ m) Histologic analysis of hind limbs from mice naïve with healthy bone (a); b and c were obtained from different mice at day 32 after CHO- β 3 tumor cells inoculation. PBS was used as vehicle and corresponds to bone with metastasis (b); Risedronate was used to treat mice and represent the treated bone (c). After toluidine blue stain, bone is stained blue and tumor cells zone were represented by asterisk. The arrows indicate the bone marrow.

Table 1. Tumor size determination after radiography.

Treatment*	Radiography (Tumor size (mm ² /mouse))
Naive “healthy bone”	0
Vehicle “bone metastasis”	5 \pm 0.6
Risedronate “treated bone”	0.6 \pm 0.08 [§]

*Drug administration was initiated from the time of tumor cell inoculation (day 0) to the end of the protocol (day 32). All measurements were made 32 days after tumor cell injection. Naive animals had not been injected with tumor cells and correspond to the healthy bone. PBS was used as vehicle for animals injected with tumor cells and correspond to bone metastasis. Risedronate animals treated by daily dose of 150 μ g/kg, s.c. (clinical dose for patient with bone metastasis). Results are expressed as the mean \pm SD (2 Naive mice, 3 Vehicle mice and 3 Risedronate mice). [§]P < 0.01, compared to the vehicle-treated group. Statistical pairwise comparisons were made using Mann-Whitney U test.

Table 2. Histomorphometry from histology analysis.

Treatment*	Histomorphometry ^c	
	BV/TV (%)	TB/STV (%)
Naive “healthy bone”	22.7 \pm 1.8 [§]	0
Vehicle “bone metastasis”	9.5 \pm 2.6	42.4 \pm 3.6
Risedronate “treated bone”	33.2 \pm 2.4 [§]	6.4 \pm 3.4 [§]

Naive animals are mice that had not been injected with tumor cells. Risedronate (150 μ g/kg, daily) was administered to metastatic animals by subcutaneous injection in 0.1 mL PBS (vehicle). Control mice bearing metastatic lesions received a daily treatment with the vehicle only. ^aDrug administration was initiated from the time of tumor cell inoculation (day 0) to the end of the protocol (day 32). ^cHistomorphometry was performed on legs from naive and metastatic animals. BV/TV: bone volume/tissue volume ratio (a measurement of the bone volume). TB/STV: tumor burden/soft tissue volume ratio (a measurement of the tumor volume). Results are expressed as the mean \pm SD (2 Naive mice, 3 Vehicle mice and 3 Risedronate mice). [§]P < 0.01, compared to the vehicle-treated group. Statistical pairwise comparisons were made using Mann-Whitney U test.

concerning the quantification of bone, we analyzed finely by histomorphometry the histologic data and determined the ratio bone volume/tissue volume and tumor burden/soft tissues volume (Table 2).

The beneficial effect of the treatment is demonstrated by the increase of the ratio BV/TV from 9.5% for bone without treatment to 33.2% for the treated bone. We have also shown that after treatment the ratio TB/STV was 6.4% in comparison to 42.4% without treatment.

Metastatic animals treated with Risedronate had osteolytic lesions that were 95% smaller than those of tumor-bearing animals treated with the vehicle only (Table 1 and Figure 2(c)). Histologic analysis of hind limbs with metastases from vehicle-treated mice showed that tumor cells completely filled the bone marrow cavity and bone trabeculae were almost completely destroyed when compared to the bone histology of legs from naive mice (Figure 2, panels b vs a). By contrast, the extent of bone trabeculae in legs from Risedronate-treated mice was markedly increased, indicating a complete prevention of bone loss by the bisphosphonate (Figure 2(c)). In this respect, histomorphometric analysis of metastatic hind limbs from mice treated with Risedronate showed that the bone volume (BV) to tissue volume (TV) ratio was statistically significantly higher than that corresponding to vehicle-treated animals and naive mice (Table 2 and Figure 2). Risedronate also decreased the tumor burden (TB) to soft tissue volume (STV) ratio by 85% compared with vehicle (Table 2 and Figure 2).

In order to get more information about the structure of bone after Risedronate treatment, we analyzed and compared by electron microscopy the bones from naive animals with those obtained from metastatic animals treated with the bisphosphonate. By optical microscopy, we visualized different cells (Figure 3) after semi-thin sections (7 μm) of the different bone and toluidine blue stain. Figure 3(b) shows the invasion of bone by tumor cells working harder to destroy bone. In Figure 3(a) and Figure 3(c), we have a normal bone with bone marrow section and mineralized bone with osteoblasts and osteoclasts. In Figure 3(c), we can also see more mineralization than in Figure 3(a). This result could be explained by the capacity of Risedronate to induce mineralization.

Bones from naive animals and metastatic animals treated or not with Risedronate were next analyzed by Atomic Force Microscopy (AFM) in order to examine the ultrastructure and nanomechanical spatial heterogeneity of the bone tissue (Figure 4).

The raw indentation curves were obtained by atomic force microscopy with diamond-like tip (Figure 4(a)). We report here the first demonstration of the ultrastructure and nanomechanical spatial heterogeneity of bone

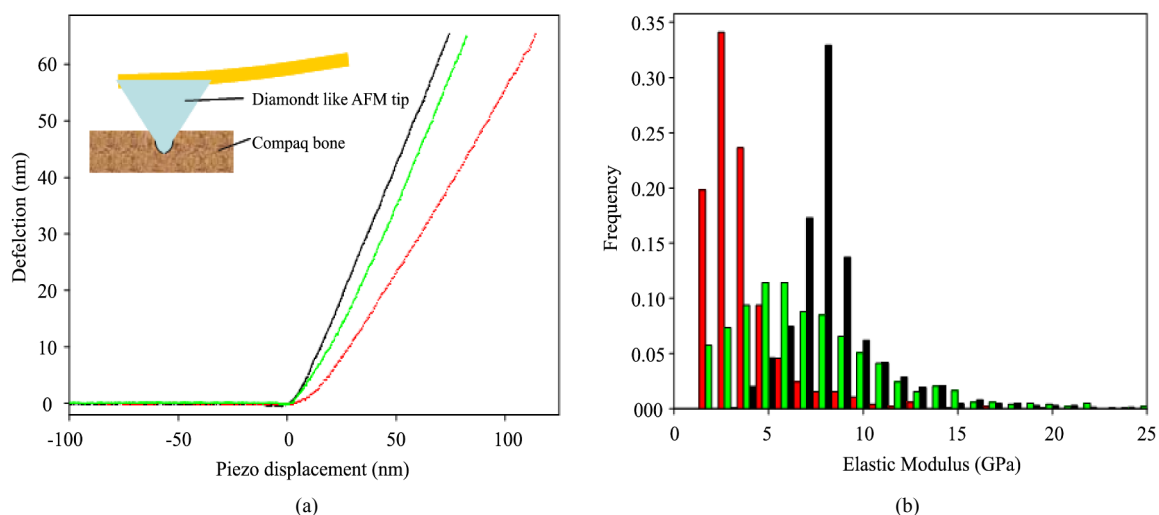


Figure 4. Representative raw indentation curves (a) and comparison of bone stiffness distribution (b). (a) Raw indentation curves obtained by atomic force microscopy with diamond like tip (100 nm of radius) for naive healthy bone (black bar), vehicle bone with metastasis (red bar) and Risedronate treated bone (green bar) selected in the highest value of distribution. (b) Bone stiffness distributions for naive healthy bone (black bars) with a median of 8.14 GPa (first quartile = 6.39 GPa, third quartile = 10.33 GPa), for bone with metastasis and Risedronate treated bone (green bars) with a median of 5.45 GPa (first quartile = 3.49 GPa, third quartile = 8.08 GPa), and vehicle bone with metastasis (red bars) with a median of 2.38 GPa (first quartile = 1.60 GPa, third quartile = 3.39 GPa), obtained after computation of the elastic modulus from nanoindentation data.

stiffness with metastasis and the effect of the treatment on this nanomechanical distribution. The distribution of elastic modulus highlights the major decrease of elastic modulus in bone with metastasis (see histograms above). The median value is divided by a factor larger than 3 (8.14 GPa for healthy bone, 2.38 GPa for bone with metastasis). The Risedronate treatment reduces this decrease with an intermediate median value of 5.45 GPa. The differences in median and quartile interval underscore in particular the strong softening of malignant bone with respect to the healthy bone. Furthermore, it should be emphasized that the Risedronate treatment leads to a significant recovering of the nanomechanical stiffness. To observe more finely these differences, spatial distribution of elastic modulus has been recorded (Figure 5).

In Figure 5, for each nanoindentation data spaced of 300 nm, the elastic modulus is represented by a colour value. The three types of bone present heterogeneity in the spatial elastic modulus repartition (Figure 5(b),

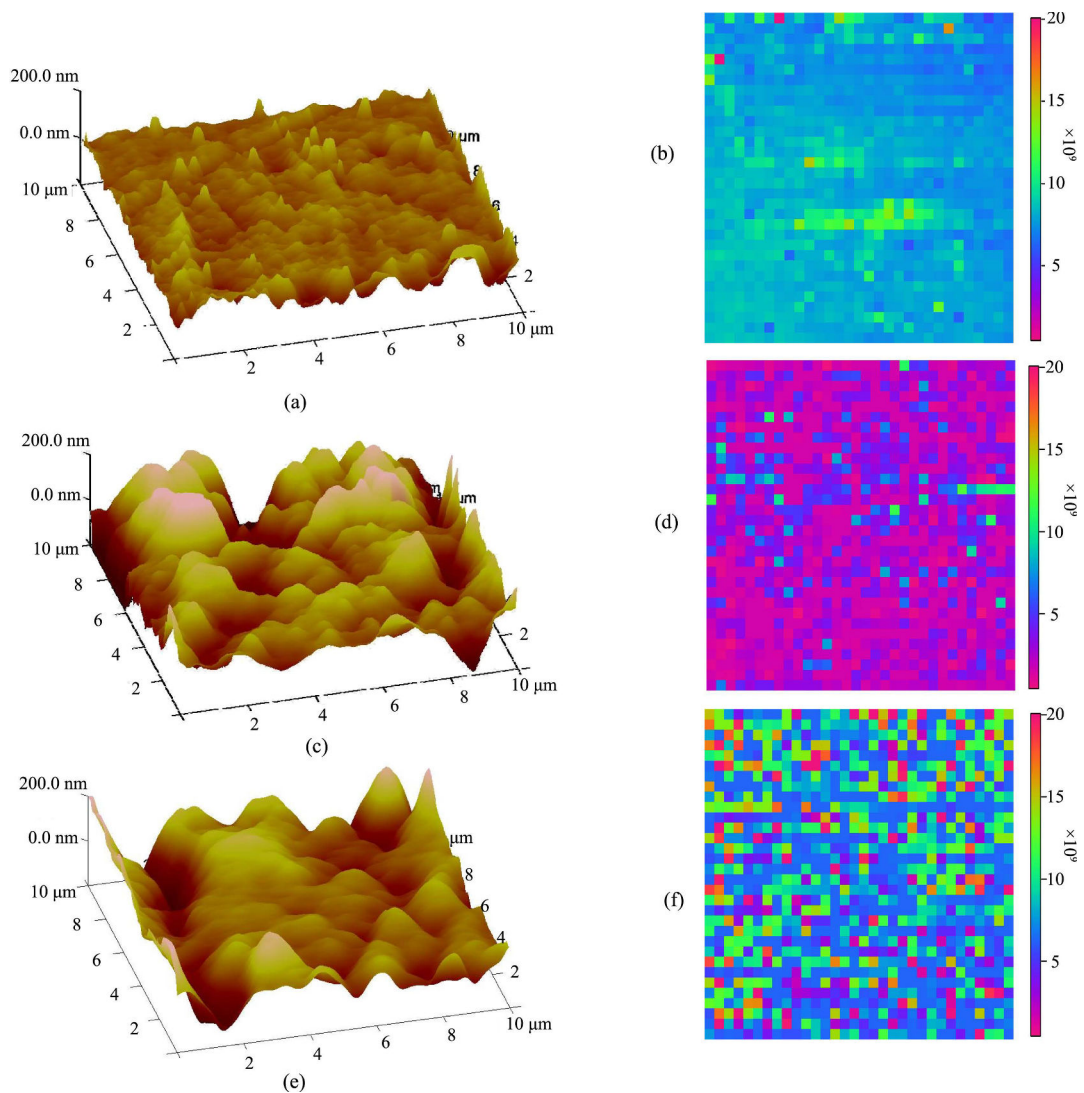


Figure 5. Ultrastructure and nanomechanical spatial heterogeneity of bone stiffness. (a) An a.c. intermittent contact-mode AFM height image ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) viewed perpendicular to the naive healthy bone axis with a RMS of 21.0 nm; (b) 2D contour map ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) of elastic modulus calculated from nanoindentation data; (c) An a.c. intermittent contact-mode AFM height image ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) viewed perpendicular to the vehicle bone with metastasis axis with a RMS of 55.3 nm. (d) 2D contour map ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) of elastic modulus calculated from nanoindentation data; (e) An a.c. intermittent contact-mode AFM height image ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) viewed perpendicular to the Risedronate treated bone axis with a RMS of 50.1 nm; (f) 2D contour map ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) of elastic modulus calculated from nanoindentation data.

Figure 5(d), Figure 5(f)), but the bone with metastasis and Risedronate treatment is particularly heterogeneous as revealed by the wide range of values of E present in the $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ sample (**Figure 5(f)**).

In summary, bone is constantly being broken down and renewed. It is living tissue that needs exercise to gain strength. Bone metastasis occurs when cancer cells from the primary tumor relocate to the bone. Metastatic bone disease develops as a result of the many interactions between tumor cells and bone cells. This leads to disturbance of normal bone metabolism, with the increased osteoclast activity seen in most, if not all, tumor types providing a rational target for treatment.

Like many natural materials, bone is mechanically heterogeneous with spatial distributions in the shape, size and composition of its constituent. It is expected that nanomechanical heterogeneity influence elasticity, damage, fracture and remodelling of bone. We report here the first demonstration of the nanoscale stiffness distribution in bone metastasis before and after treatment of animals with Risedronate, a drug which is currently used for the treatment of bone metastases in patients with advanced cancers. This concept is generally applicable to a broad class of natural materials because nanomechanical heterogeneity expected to be ubiquitously presented.

2. Methods

2.1. Specific Drug for Treatment

Bisphosphonate Risedronate [2-(3-pyridinyl)1-hydroxyethylidene-bisphosphonic acid] was obtained from Procter and Gamble Pharmaceuticals (Mason, OH, USA). The drug was dissolved in water and stored at 4°C.

2.2. Mouse Model of Breast Cancer Bone Metastasis

All procedures involving mice including their housing and care, the method by which they were killed, and all experimental protocols were conducted in accordance with a code of practice established by the ethical committee in Lyon (France). This study was monitored on a routine basis by the attending veterinarian according to ensure continued compliance with the proposed protocols. Four-week-old female Balb/c athymic (nu/nu) mice were purchased from Charles River (St. Germain sur l'Arbresle, France). The bone metastasis experiments in mice were conducted as previously described, using B02 cells, a subpopulation of the human MDA-MB-231 breast cancer cell line that was selected for the high efficiency with which it metastasizes to bone after intravenous inoculation [22]. B02 cells (5×10^5 cells in 100 μL phosphate-buffered saline) were injected into the tail vein of anesthetized (130 mg/kg ketamin and 8.8 mg/kg xylazin) mice on day 0. Based on an average body weight of 20 g for 4-wk-old mice, risedronate (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) was given daily to animals by subcutaneous injection in 100 μL PBS (vehicle). Control mice received a daily treatment with the vehicle only. On day 32 after tumor cell inoculation, radiographs of anesthetized animals were taken with the use of MIN-R2000 film (Kodak) in an MX-20 cabinet X-ray system (Faxitron X-ray Corporation). Osteolytic lesions are recognized on radiographs as demarcated radiolucent lesions in the bone. The area of the osteolytic lesions was measured using a Visiolab 2000 computerized image analysis system (Explora Nova, La Rochelle, France) and the extent of bone destruction per animal was expressed in mm^2 , as described previously [22]. Anesthetized animals were killed by cervical dislocation following radiography at day 32.

2.3. Bone Histology and Histomorphometry

Bone histology and histomorphometric analysis of bone tissue sections were performed as previously described [22]. Vehicle- and bisphosphonate-treated tumor-bearing animals were killed at day 32, and both hind limbs from each animal were dissected, fixed in 80% (vol/vol) alcohol, dehydrated, and embedded in methylmethacrylate. A microtome (Polycut E, Reichert-Jung, Heidelberg, Germany) was used to cut 7 μm thick sections of undecalcified long bones, and the sections were stained with Goldner's trichrome. Histologic and histomorphometric analyses were performed on Goldner-stained longitudinal medial sections of tibial metaphysis with the use of a computerized image analysis system (Visiolab 2000). Histomorphometric measurements [bone volume (BV)/tissue volume (TV) and tumor volume (TV)/soft tissue volume (STV) ratios] were performed in a standard zone of the tibial metaphysis, situated at 0.5 mm from the growth plate, including cortical and trabecular bone. The BV/TV ratio represents the percentage of bone tissue. The TV/STV ratio represents the percentage of tumor tissue.

2.4. Sample Preparation and Characterization

2.4.1. Sample Preparation

Condylar tibia metaphysis were carefully sectioned under PBS (Gibco) flow by means of a sawing machine equipped with a diamond disk (Isomet, Buehler, Evanston, IL) into transversal sections about 2 mm thick from the proximal top (200 rpm speed).

Distal surfaces of sections were first set on AFM disks (Ted Pella Inc., Redding, CA) with wax (Kerr) and polished under distilled water flow by means of gradually disks fixed on polishing machine (Escil, Chassieu, France): G 1200, G 4000 silicon carbide and 3 μm , 0.1 μm microabrasive diamond polyester disks (40 rpm speed). Samples were stored in PBS solution until imaging and measuring.

The Tapping Mode™ AFM imaging at room humidity and temperature was used with Multimode AFM (Veeco, Santa Barbara, CA) on hydrated samples with a silicon probe MPP11100 (Veeco, Santa Barbara, CA) with tip radius about 10 nm and a resonant constant of 230 kHz. The roughness was determined by Root Mean Squared (RMS) approach on a $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ AFM images.

2.4.2. Nanoindentation

Nanoindentation experiments were analyzed in ambient conditions using the PicoForce microscope (Veeco, Santa Barbara, CA) and NW-DT-NCHR cantilevers (42 $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ of spring stiffness, 100 nm of tip radius, Nano World, Schaffhausen, Switzerland). Stiffness (dynamic elastic modulus, E) measurements of bone samples were performed as described previously [18]. Tai *et al.* verified that loading/unloading rates between 0.5 - 5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ did not lead to statistically representative differences in calculated bone moduli [18]. Therefore, we carried out displacement-controlled nanoindentation by loading at a rate of 1 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ up to a trigger force of 5 μN followed by unloading at the same rate. To derive the elastic modulus, E , we use the Hertzian relation, derived for paraboloidal tips, between applied force, F , and resulting indentation, δ , namely

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu^2} R^{1/2} \delta^{3/2}$$

where ν is the Poisson ratio and R is the tip radius. The Poisson ratio for cortical bone is 0.325 [23]. Values of the elastic modulus were derived from the experimental force vs. indentation curve over the indentation domain ranging from 20% up to 95% of the maximum indentation corresponding to the maximum applied force of 5 μN . A minimum of 100 nm inter-indentation spacing was considered to be sufficiently large for minimal interference with adjacent residual in elastically deformed zone as well as remaining stresses.

2.5. Statistical Analysis

The three histograms shown in **Figure 4(b)** have been compared using One-Way ANOVA on ranks (*i.e.* Kruskal-Wallis test; Sigmasat, Systat Software, Chicago, IL). They differ significantly ($P < 0.001$). Consequently, a pairwise comparison was undertaken (using Dunn's method) which showed that the three pairs of groups differed significantly ($P < 0.05$).

2.6. Histological and Electron Microscopic Analysis

The samples were fixed in Karnovsky fixative, postfixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at 4°C, dehydrated through graded alcohol and embedded in Epon 812. Semi-thin sections were cut at 7 μm and stained with toluidine blue, and histologically analysed by light microscopy. Ultrathin sections were cut at 70 nm and contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Morgagni 268 electron microscope.

Acknowledgements

This work was supported by the NanoOSCAR ANR project from the “Agence Nationale la Recherche”, the “Fondation Avenir”, the “Ligue contre le Cancer du Haut-Rhin, Région Alsace” and “Cancéropôle du Grand Est”. LK and QW thank the “Faculté de Chirurgie Dentaire” of Strasbourg. Histology was made by Dr N. Messadeq.

References

- [1] Boissier, S., Magonetto, S., Frappart, L., Cuzin, B., Ebetino, F.H., Delmas, P.D. and Clezardin, P. (1997) Bisphosphonates Inhibit Prostate and Breast Carcinoma Cell Adhesion to Unmineralized and Mineralized Bone Extracellular Matrices. *Cancer Research*, **57**, 3890-3894.
- [2] Coleman, R.E. (2008) Risks and Benefits of Bisphosphonates. *British Journal of Cancer*, **98**, 1736-1740. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6604382>
- [3] Stresing, V., Daubine, F., Benzaid, I., Monkkonen, H. and Clezardin, P. (2007) Bisphosphonates in Cancer Therapy. *Cancer Letters*, **257**, 16-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2007.07.007>
- [4] Fantner, G.E., Hassenkam, T., Kindt, J.H., Weaver, J.C., Birkedal, H., Pechenik, L., Cutroni, J.A., Cidade, G.A., Stucky, G.D., Morse, D.E. and Hansma, P.K. (2005) Sacrificial Bonds and Hidden Length Dissipate Energy as Mineralized Fibrils Separate during Bone Fracture. *Nature Materials*, **4**, 612-616. <http://dx.doi.org/10.1038/nmat1428>
- [5] Gao, H., Ji, B., Jager, I.L., Arzt, E. and Fratzl, P. (2003) Materials Become Insensitive to Flaws at Nanoscale: Lessons from Nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 5597-5600. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0631609100>
- [6] Gupta, H.S., Wagermaier, W., Zickler, G.A., Raz-Ben Aroush, D., Funari, S.S., Roschger, P., Wagner, H.D. and Fratzl, P. (2005) Nanoscale Deformation Mechanisms in Bone. *Nano Letters*, **5**, 2108-2111. <http://dx.doi.org/10.1021/nl051584b>
- [7] Tai, K., Ulm, F.J. and Ortiz, C. (2006) Nanogranular Origins of the Strength of Bone. *Nano Letters*, **6**, 2520-2525. <http://dx.doi.org/10.1021/nl061877k>
- [8] Morgan, E.F., Bayraktar, H.H. and Keaveny, T.M. (2003) Trabecular Bone Modulus-Density Relationships Depend on Anatomic Site. *Journal of Biomechanics*, **36**, 897-904. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290\(03\)00071-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290(03)00071-X)
- [9] Pope, M.H. and Outwater, J.O. (1974) Mechanical Properties of Bone as a Function of Position and Orientation. *Journal of Biomechanics*, **7**, 61-66. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9290\(74\)90070-0](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9290(74)90070-0)
- [10] Gupta, H.S., Stachewicz, U., Wagermaier, W., Roschger, P., Wagner, H.D. and Fratzl, P. (2006) Mechanical Modulation at the Lamellar Level in Osteonal Bone. *Journal of Materials Research*, **21**, 1913-1921. <http://dx.doi.org/10.1557/jmr.2006.0234>
- [11] Rho, J.Y., Roy, M.E., 2nd, Tsui, T.Y. and Pharr, G.M. (1999) Elastic Properties of Microstructural Components of Human Bone Tissue as Measured by Nanoindentation. *Journal of Biomedical Materials Research*, **45**, 48-54. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199904\)45:1<48::AID-JBM7>3.0.CO;2-5](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199904)45:1<48::AID-JBM7>3.0.CO;2-5)
- [12] Martin, R.B. and Burr, D.B. (1989) *Structure, Function and Adaptation of Compact Bone*. Raven Press, New York.
- [13] Balooch, G., Balooch, M., Nalla, R.K., Schilling, S., Filvaroff, E.H., Marshall, G.W., Marshall, S.J., Ritchie, R.O., Derynck, R. and Alliston, T. (2005) TGF-Beta Regulates the Mechanical Properties and Composition of Bone Matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 18813-18818. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507417102>
- [14] Jaasma, M.J., Bayraktar, H.H., Niebur, G.L. and Keaveny, T.M. (2002) Biomechanical Effects of Intraspecimen Variations in Tissue Modulus for Trabecular Bone. *Journal of Biomechanics*, **35**, 237-246. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290\(01\)00193-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290(01)00193-2)
- [15] Peterlik, H., Roschger, P., Klaushofer, K. and Fratzl, P. (2006) From Brittle to Ductile Fracture of Bone. *Nature Materials*, **5**, 52-55. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290\(01\)00193-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290(01)00193-2)
- [16] Phelps, J.B., Hubbard, G.B., Wang, X. and Agrawal, C.M. (2000) Microstructural Heterogeneity and the Fracture Toughness of Bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, **51**, 735-741. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-4636\(20000915\)51:4<735::AID-JBM23>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/1097-4636(20000915)51:4<735::AID-JBM23>3.0.CO;2-G)
- [17] Currey, J. (2005) Structural Heterogeneity in Bone: Good or Bad? *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, **5**, 317.
- [18] Tai, K., Dao, M., Suresh, S., Palazoglu, A. and Ortiz, C. (2007) Nanoscale Heterogeneity Promotes Energy Dissipation in Bone. *Nature Materials*, **6**, 454-462. <http://dx.doi.org/10.1038/nmat1911>
- [19] Engler, A.J., Richert, L., Wong, J.Y., Picart, C. and Discher, D.E. (2004) Surface Probe Measurements of the Elasticity of Sectioned Tissue, Thin Gels and Polyelectrolyte Multilayer Films: Correlations between Substrate Stiffness and Cell Adhesion. *Surface Science*, **570**, 142-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.susc.2004.06.179>
- [20] Ehrlich, P.J. and Lanyon, L.E. (2002) Mechanical Strain and Bone Cell Function: A Review. *Osteoporosis International*, **13**, 688-700. <http://dx.doi.org/10.1007/s001980200095>
- [21] You, L., Cowin, S.C., Schaffler, M.B. and Weinbaum, S. (2001) A Model for Strain Amplification in the Actin Cy-

toskeleton of Osteocytes Due to Fluid Drag on Pericellular Matrix. *Journal of Biomechanics*, **34**, 1375-1386.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290\(01\)00107-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290(01)00107-5)

- [22] Peyruchaud, O., Serre, C.M., NicAmhlaibh, R., Fournier, P. and Clezardin, P. (2003) Angiostatin Inhibits Bone Metastasis Formation in Nude Mice through a Direct Anti-Osteoclastic Activity. *Journal of Biomechanics*, **278**, 45826-45832
- [23] Cowin, S.C. (1999) Bone Poroelasticity. *Journal of Biomechanics*, **32**, 217-238.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290\(98\)00161-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290(98)00161-4)

VII. Références

- Adkisson, H.D., Martin, J.A., Amendola, R.L., Milliman, C., Mauch, K.A., Katwal, A.B., Seyedin, M., Amendola, A., Streeter, P.R., and Buckwalter, J.A. (2010). The potential of human allogeneic juvenile chondrocytes for restoration of articular cartilage. *Am. J. Sports Med.* *38*, 1324–1333.
- Ahmed, T.A.E., Griffith, M., and Hincke, M. (2007). Characterization and inhibition of fibrin hydrogel-degrading enzymes during development of tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng.* *13*, 1469–1477.
- Aho, O.-M., Lehenkari, P., Ristiniemi, J., Lehtonen, S., Risteli, J., and Leskelä, H.-V. (2013). The mechanism of action of induced membranes in bone repair. *J. Bone Joint Surg. Am.* *95*, 597–604.
- Akcali, A., Huck, O., Buduneli, N., Davideau, J.-L., Köse, T., and Tenenbaum, H. (2014). Exposure of *Porphyromonas gingivalis* to cortisol increases bacterial growth. *Arch. Oral Biol.* *59*, 30–34.
- Albandar, J.M., and Kingman, A. (1999). Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J. Periodontol.* *70*, 30–43.
- Albee, F.H. (1920). Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann. Surg.* *71*, 32–39.
- Amini, A.R., Laurencin, C.T., and Nukavarapu, S.P. (2012). Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* *40*, 363–408.
- Apard, T., Bigorre, N., Cronier, P., Duteille, F., Bizot, P., and Massin, P. (2010). Two-stage reconstruction of post-traumatic segmental tibia bone loss with nailing. *Orthop. Traumatol. Surg. Res. OTSR* *96*, 549–553.
- Arnaoutova, I., and Kleinman, H.K. (2010). In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat. Protoc.* *5*, 628–635.
- Arufe, M.C., De la Fuente, A., Fuentes, I., de Toro, F.J., and Blanco, F.J. (2010). Chondrogenic potential of subpopulations of cells expressing mesenchymal stem cell markers derived from human synovial membranes. *J. Cell. Biochem.* *111*, 834–845.
- Ashikari-Hada, S., Habuchi, H., Kariya, Y., and Kimata, K. (2005). Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *J. Biol. Chem.* *280*, 31508–31515.
- Asti, A., and Gioglio, L. (2014). Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *Int. J. Artif. Organs* *37*, 187–205.
- Athanasopoulos, A.N., Schneider, D., Keiper, T., Alt, V., Pendurthi, U.R., Liegibel, U.M., Sommer, U., Nawroth, P.P., Kasperk, C., and Chavakis, T. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *J. Biol. Chem.* *282*, 26746–26753.

- Azarpazhooh, A., and Tenenbaum, H.C. (2012). Separating fact from fiction: use of high-level evidence from research syntheses to identify diseases and disorders associated with periodontal disease. *J. Can. Dent. Assoc.* *78*, c25.
- Baghaban Eslaminejad, M., and Malakooty Poor, E. (2014). Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration. *World J. Stem Cells* *6*, 344–354.
- Baiguera, S., and Ribatti, D. (2013). Endothelialization approaches for viable engineered tissues. *Angiogenesis* *16*, 1–14.
- Baker, B.M., and Chen, C.S. (2012). Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* *125*, 3015–3024.
- Baker, M.I., Walsh, S.P., Schwartz, Z., and Boyan, B.D. (2012). A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* *100*, 1451–1457.
- Bassi, Ê.J., Aita, C.A.M., and Câmara, N.O.S. (2011). Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J. Stem Cells* *3*, 1–8.
- Bauer, T.W., and Muschler, G.F. (2000). Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin. Orthop.* 10–27.
- van den Berg, W.B. (2001). Uncoupling of inflammatory and destructive mechanisms in arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* *30*, 7–16.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., and Gurny, R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* *57*, 35–52.
- Bhardwaj, N., Devi, D., and Mandal, B.B. (2015). Tissue-engineered cartilage: the crossroads of biomaterials, cells and stimulating factors. *Macromol. Biosci.* *15*, 153–182.
- Bhatt, R.A., and Rozental, T.D. (2012). Bone graft substitutes. *Hand Clin.* *28*, 457–468.
- Bianco, P., Cao, X., Frenette, P.S., Mao, J.J., Robey, P.G., Simmons, P.J., and Wang, C.-Y. (2013). The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat. Med.* *19*, 35–42.
- Blain, E.J. (2007). Mechanical regulation of matrix metalloproteinases. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *12*, 507–527.
- Bohner, M. (2001). Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *Eur. Spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.* *10 Suppl 2*, S114-121.
- Bokhari, M., Carnachan, R.J., Cameron, N.R., and Przyborski, S.A. (2007). Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *J. Anat.* *211*, 567–576.
- Bonafede, M., Espindle, D., and Bower, A.G. (2013). The direct and indirect costs of long

bone fractures in a working age US population. *J. Med. Econ.* *16*, 169–178.

Bose, S., Roy, M., and Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* *30*, 546–554.

Boyce, T., Edwards, J., and Scarborough, N. (1999). Allograft bone The Influence of Processing on Safety and Performance. *Orthop. Clin. North Am.* *30*, 571–581.

Butcher, A.L., Offeddu, G.S., and Oyen, M.L. (2014). Nanofibrous hydrogel composites as mechanically robust tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* *32*, 564–570.

Buza, J.A., and Einhorn, T. (2016). Bone healing in 2016. *Clin. Cases Miner. Bone Metab. Off. J. Ital. Soc. Osteoporos. Miner. Metab. Skelet. Dis.* *13*, 101–105.

Caldwell, K.L., and Wang, J. (2015). Cell-Based Articular Cartilage Repair: The Link between Development and Regeneration. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* *23*, 351–362.

Carano, R.A.D., and Filvaroff, E.H. (2003). Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov. Today* *8*, 980–989.

Caron, M.M.J., Emans, P.J., Coolen, M.M.E., Voss, L., Surtel, D. a. M., Cremers, A., van Rhijn, L.W., and Welting, T.J.M. (2012). Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage* *20*, 1170–1178.

Carson, J.S., and Bostrom, M.P.G. (2007). Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury* *38*, S33–S37.

Cha, C., Soman, P., Zhu, W., Nikkhah, M., Camci-Unal, G., Chen, S., and Khademhosseini, A. (2014). Structural Reinforcement of Cell-Laden Hydrogels with Microfabricated Three Dimensional Scaffolds. *Biomater. Sci.* *2*, 703–709.

Chapel, A., Bertho, J.M., Bensidhoum, M., Fouillard, L., Young, R.G., Frick, J., Demarquay, C., Cuvelier, F., Mathieu, E., Trompier, F., et al. (2003). Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J. Gene Med.* *5*, 1028–1038.

Chen, J.-P., and Cheng, T.-H. (2006). Thermo-responsive chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) injectable hydrogel for cultivation of chondrocytes and meniscus cells. *Macromol. Biosci.* *6*, 1026–1039.

Chen, Z., Zhao, M., Liu, K., Wan, Y., Li, X., and Feng, G. (2014). Novel chitosan hydrogel formed by ethylene glycol chitosan, 1,6-diisocyanatohexan and polyethylene glycol-400 for tissue engineering scaffold: in vitro and in vivo evaluation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* *25*, 1903–1913.

Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M.D., Hoemann, C.D., Leroux, J.C., Atkinson, B.L., Binette, F., and Selmani, A. (2000). Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* *21*, 2155–2161.

Chubinskaya, S., Hakimiyan, A., Pacione, C., Yanke, A., Rappoport, L., Aigner, T., Rueger,

D.C., and Loeser, R.F. (2007). Synergistic Effect of IGF-1 and OP-1 on Matrix Formation by Normal and OA Chondrocytes Cultured in Alginate Beads. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* *15*, 421–430.

Chung, C., and Burdick, J.A. (2008). Engineering cartilage tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *60*, 243–262.

Clarkin, C.E., Emery, R.J., Pitsillides, A.A., and Wheeler-Jones, C.P.D. (2008). Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* *214*, 537–544.

Cohen, S., Baño, M.C., Cima, L.G., Allcock, H.R., Vacanti, J.P., Vacanti, C.A., and Langer, R. (1993). Design of synthetic polymeric structures for cell transplantation and tissue engineering. *Clin. Mater.* *13*, 3–10.

Cucchiaroni, M., and Madry, H. (2014). Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects in vivo. *Gene Ther.* *21*, 811–819.

Cukierman, E., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 633–639.

Darling, E.M., and Athanasiou, K.A. (2005). Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* *23*, 425–432.

Decher, G. (1997). Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* *277*, 1232–1237.

Dehghan, M.M., Baghaban Eslaminejad, M., Motallebizadeh, N., Ashrafi Halan, J., Tagiyar, L., Soroori, S., Nikmahzar, A., Pedram, M., Shahverdi, A., Kazemi Mehrjerdi, H., et al. (2015). Transplantation of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Platelet-Rich Plasma Accelerate Distraction Osteogenesis in A Canine Model. *Cell J.* *17*, 243–252.

Delcroix, G., Molinari, M., Reiner, T., Temple, T., Valdes, M., Montero, R., Andreopoulos, F., Schiller, P., and D'Ippolito, G. (2016). Multi-Layered Scaffold to Mimic Hyaline Articular Cartilage Architecture. *Curr. Tissue Eng.* *5*, 21–28.

Di Marco, G.S., König, M., Stock, C., Wiesinger, A., Hillebrand, U., Reiermann, S., Reuter, S., Amler, S., Köhler, G., Buck, F., et al. (2013). High phosphate directly affects endothelial function by downregulating annexin II. *Kidney Int.* *83*, 213–222.

Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* *99*, 3838–3843.

Diekman, B.O., Rowland, C.R., Lennon, D.P., Caplan, A.I., and Guilak, F. (2010). Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix. *Tissue Eng. Part A* *16*, 523–533.

Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., and Giannoudis, P.V. (2011). Bone regeneration:

current concepts and future directions. *BMC Med.* 9, 66.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.

Donegan, D.J., Scolaro, J., Matuszewski, P.E., and Mehta, S. (2011). Staged Bone Grafting Following Placement of an Antibiotic Spacer Block for the Management of Segmental Long Bone Defects. *Orthopedics* 34, e730–e735.

Dong, S., Sun, J., Li, Y., Li, J., Cui, W., and Li, B. (2014). Electrospun nanofibrous scaffolds of poly (L-lactic acid)-dicalcium silicate composite via ultrasonic-aging technique for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 35, 426–433.

Dvir, T., Timko, B.P., Kohane, D.S., and Langer, R. (2011). Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat. Nanotechnol.* 6, 13–22.

Eap, S., Keller, L., Ferrand, A., Schiavi, J., Lahiri, D., Lemoine, S., Facca, S., Fioretti, F., Mainard, D., Agarwal, A., et al. (2014a). Nanomechanical Properties of Active Nanofibrous Implants After In Vivo Bone Regeneration. *Nano LIFE* 04, 1450001.

Eap, S., Ferrand, A., Schiavi, J., Keller, L., Kokten, T., Fioretti, F., Mainard, D., Ladam, G., and Benkirane-Jessel, N. (2014b). Collagen implants equipped with ‘fish scale’-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomed.* 9, 1253–1261.

Eap, S., Keller, L., Schiavi, J., Huck, O., Jacomine, L., Fioretti, F., Gauthier, C., Sebastian, V., Schwinté, P., and Benkirane-Jessel, N. (2015a). A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int. J. Nanomedicine* 10, 1061–1075.

Eap, S., Morand, D., Clauss, F., Huck, O., Stoltz, J.-F., Lutz, J.-C., Gottenberg, J.-E., Benkirane-Jessel, N., Keller, L., and Fioretti, F. (2015b). Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce bone. *Biomed. Mater. Eng.* 25, 79–85.

Eggl, P.S., Müller, W., and Schenk, R.K. (1988). Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clin. Orthop.* 127–138.

Eke, P.I., Dye, B.A., Wei, L., Thornton-Evans, G.O., Genco, R.J., and CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck (University of North Carolina, Chapel Hill, USA), Gordon Douglass (Past President, American Academy of Periodontology), Roy Page (University of Washin (2012). Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J. Dent. Res.* 91, 914–920.

Elisseeff, J., Anseth, K., Sims, D., McIntosh, W., Randolph, M., and Langer, R. (1999). Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3104–3107.

Ellman, M.B., An, H.S., Muddasani, P., and Im, H.-J. (2008). Biological impact of the fibroblast growth factor family on articular cartilage and intervertebral disc

homeostasis. *Gene* 420, 82–89.

Eslaminejad, M.B., and Faghihi, F. (2011). Mesenchymal Stem Cell-Based Bone Engineering for Bone Regeneration.

Facca, S., Cortez, C., Mendoza-Palomares, C., Messadeq, N., Dierich, A., Johnston, A.P.R., Mainard, D., Voegel, J.-C., Caruso, F., and Benkirane-Jessel, N. (2010). Active multilayered capsules for in vivo bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 3406–3411.

Facchini, A., Lisignoli, G., Cristino, S., Roseti, L., De Franceschi, L., Marconi, E., and Grigolo, B. (2006). Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold. *Biorheology* 43, 471–480.

Fan, H., Zeng, X., Wang, X., Zhu, R., and Pei, G. (2014). Efficacy of prevascularization for segmental bone defect repair using β -tricalcium phosphate scaffold in rhesus monkey. *Biomaterials* 35, 7407–7415.

Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. (2013). Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* 31, 108–115.

Ferrand, A., Eap, S., Richert, L., Lemoine, S., Kalaskar, D., Demoustier-Champagne, S., Atmani, H., Mély, Y., Fioretti, F., Schlatter, G., et al. (2014). Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol. Biosci.* 14, 45–55.

Finkemeier, C.G. (2002). Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J. Bone Joint Surg. Am.* 84-A, 454–464.

Fischer, C., Doll, J., Tanner, M., Bruckner, T., Zimmermann, G., Helbig, L., Biglari, B., Schmidmaier, G., and Moghaddam, A. (2016). Quantification of TGF- β 1, PDGF and IGF-1 cytokine expression after fracture treatment vs. non-union therapy via masquelet. *Injury* 47, 342–349.

Florczyk, S.J., Leung, M., Li, Z., Huang, J.I., Hopper, R.A., and Zhang, M. (2013). Evaluation of three-dimensional porous chitosan-alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101, 2974–2983.

Fortier, L.A., Barker, J.U., Strauss, E.J., McCarrel, T.M., and Cole, B.J. (2011). The Role of Growth Factors in Cartilage Repair. *Clin. Orthop.* 469, 2706–2715.

Frenkel, S.R., and Di Cesare, P.E. (1999). Degradation and repair of articular cartilage. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 4, D671-685.

Freyria, A.-M., Ronzière, M.-C., Cortial, D., Galois, L., Hartmann, D., Herbage, D., and Mallein-Gerin, F. (2009). Comparative phenotypic analysis of articular chondrocytes cultured within type I or type II collagen scaffolds. *Tissue Eng. Part A* 15, 1233–1245.

García, J.R., Clark, A.Y., and García, A.J. (2016). Integrin-specific hydrogels functionalized with VEGF for vascularization and bone regeneration of critical-size bone defects. *J. Biomed. Mater. Res. A* 104, 889–900.

Genco, R.J., and Borgnakke, W.S. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontol.* 2000 *62*, 59–94.

Geng, H., Song, H., Qi, J., and Cui, D. (2011). Sustained release of VEGF from PLGA nanoparticles embedded thermo-sensitive hydrogel in full-thickness porcine bladder acellular matrix. *Nanoscale Res. Lett.* *6*, 312.

Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., and Hatton, P.V. (2014). An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 3640–3659.

Goldring, M.B. (1999). The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect. Tissue Res.* *40*, 1–11.

Goldring, M.B. (2006). Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* *20*, 1003–1025.

Golyakhovsky, V., and Frankel, V.H. (2010). *Textbook of Ilizarov Surgical Techniques: Bone Correction and Lengthening* (Jaypee Brothers Publishers).

Gothard, D., Smith, E.L., Kanczler, J.M., Rashidi, H., Qutachi, O., Henstock, J., Rotherham, M., El Haj, A., Shakesheff, K.M., and Oreffo, R.O.C. (2014). Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur. Cell. Mater.* *28*, 166-207; discussion 207-208.

Grayson, W.L., Bhumiratana, S., Cannizzaro, C., and Vunjak-Novakovic, G. (2011). Bioreactor cultivation of functional bone grafts. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *698*, 231–241.

Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., Bachar-Lustig, E., Itin, A., Jung, S., Yung, S., Chimenti, S., Landsman, L., Abramovitch, R., et al. (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* *124*, 175–189.

Guerne, P., Blanco, F., Kaelin, A., Desgeorges, A., and Lotz, M. (1995). Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Rheum.* *38*, 960–968.

Guerrero, J., Catros, S., Derkaoui, S.-M., Lalande, C., Siadous, R., Bareille, R., Thébaud, N., Bordenave, L., Chassande, O., Le Visage, C., et al. (2013). Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater.* *9*, 8200–8213.

Guo, J.F., Jourdian, G.W., and MacCallum, D.K. (1989). Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connect. Tissue Res.* *19*, 277–297.

Gusić, N., Ivković, A., VaFaye, J., Vukasović, A., Ivković, J., Hudetz, D., and Janković, S. (2014). Nanobiotechnology and bone regeneration: a mini-review. *Int. Orthop.* *38*, 1877–1884.

Hangody, L., Kish, G., Kárpáti, Z., Szerb, I., and Udvarhelyi, I. (1997). Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular

defects. A preliminary report. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA* 5, 262–267.

Hankenson, K.D., Dishowitz, M., Gray, C., and Schenker, M. (2011). Angiogenesis in bone regeneration. *Injury* 42, 556–561.

Hannink, G., Mulder, D., L.w, E., Tienen, V., G, T., and Buma, P. (2012). Effect of load on the repair of osteochondral defects using a porous polymer scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 100B, 2082–2089.

Heath, C.A. (2000). Cells for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 18, 17–19.

Heir, S., Nerhus, T.K., Røtterud, J.H., Løken, S., Ekeland, A., Engebretsen, L., and Arøen, A. (2010). Focal cartilage defects in the knee impair quality of life as much as severe osteoarthritis: a comparison of knee injury and osteoarthritis outcome score in 4 patient categories scheduled for knee surgery. *Am. J. Sports Med.* 38, 231–237.

Hench, L.L., and Cao, W. (1996). Bioactive materials. *Ceram. Int.* 22, 493–507.

Hench, L.L., Splinter, R.J., Allen, W.C., and Greenlee, T.K. (1971). Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 5, 117–141.

Henkel, J., Woodruff, M.A., Epari, D.R., Steck, R., Glatt, V., Dickinson, I.C., Choong, P.F.M., Schuetz, M.A., and Hutmacher, D.W. (2013). Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. *Bone Res.* 1, 216–248.

Hoemann, C.D., Hurtig, M., Rossomacha, E., Sun, J., Chevrier, A., Shive, M.S., and Buschmann, M.D. (2005). Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J. Bone Joint Surg. Am.* 87, 2671–2686.

Holland, T.A., Bodde, E.W.H., Cuijpers, V.M.J.I., Baggett, L.S., Tabata, Y., Mikos, A.G., and Jansen, J.A. (2007). Degradable hydrogel scaffolds for in vivo delivery of single and dual growth factors in cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 187–197.

Hollinger, J.O., Einhorn, T.A., Doll, B., and Sfeir, C. (2004). *Bone Tissue Engineering* (CRC Press).

Hollister, S.J. (2009). Scaffold engineering: a bridge to where? *Biofabrication* 1, 012001.

Horman, S.R., To, J., Orth, A.P., Slawny, N., Cuddihy, M.J., and Caracino, D. (2013). High-content analysis of three-dimensional tumor spheroids: investigating signaling pathways using small hairpin RNA. *Nat. Methods* 10.

Huang, A.H., Farrell, M.J., and Mauck, R.L. (2010). Mechanics and mechanobiology of mesenchymal stem cell-based engineered cartilage. *J. Biomech.* 43, 128–136.

Huang, Z.-M., Zhang, Y.Z., Ramakrishna, S., and Lim, C.T. (2004). Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer* 45, 5361–5368.

Hubka, K.M., Dahlin, R.L., Meretoja, V.V., Kasper, F.K., and Mikos, A.G. (2014). Enhancing chondrogenic phenotype for cartilage tissue engineering: monoculture and coculture of articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part B Rev.* 20, 641–

654.

Huck, O., Elkaim, R., Davideau, J.-L., and Tenenbaum, H. (2015). Porphyromonas gingivalis-impaired innate immune response via NLRP3 proteolysis in endothelial cells. *Innate Immun.* *21*, 65–72.

Huebsch, N., and Mooney, D.J. (2009). Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature* *462*, 426–432.

Huey, D.J., Hu, J.C., and Athanasiou, K.A. (2012). Unlike Bone, Cartilage Regeneration Remains Elusive. *Science* *338*, 917–921.

Hunziker, E.B. (2002). Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* *10*, 432–463.

Hutmacher, D.W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* *21*, 2529–2543.

Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Lam, C.X.F., Tan, K.C., and Lim, T.C. (2007). State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *1*, 245–260.

Hutton, D.L., and Grayson, W.L. (2014). Stem cell-based approaches to engineering vascularized bone. *Curr. Opin. Chem. Eng.* *3*, 75–82.

Hwang, N.S., Varghese, S., Li, H., and Elisseeff, J. (2011). Regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in PEG-ECM hydrogels. *Cell Tissue Res.* *344*, 499–509.

Ilizarov, G.A., and Lediaev, V.I. (1969). [Replacement of defects of long tubular bones by means of one of their fragments]. *Vestn. Khir. Im. I. I. Grek.* *102*, 77–84.

Isogai, N., Kusuhara, H., Ikada, Y., Ohtani, H., Jacquet, R., Hillyer, J., Lowder, E., and Landis, W.J. (2006). Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng.* *12*, 691–703.

Jansson, L., and Lavstedt, S. (2002). Influence of smoking on marginal bone loss and tooth loss--a prospective study over 20 years. *J. Clin. Periodontol.* *29*, 750–756.

Jeuken, R.M., Roth, A.K., Peters, R.J.R.W., van Donkelaar, C.C., Thies, J.C., van Rhijn, L.W., and Emans, P.J. (2016). Polymers in Cartilage Defect Repair of the Knee: Current Status and Future Prospects. *Polymers* *8*, 219.

Ji, J., Tong, X., Huang, X., Wang, T., Lin, Z., Cao, Y., Zhang, J., Dong, L., Qin, H., and Hu, Q. (2015). Sphere-shaped nano-hydroxyapatite/chitosan/gelatin 3D porous scaffolds increase proliferation and osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells from gingival fibroblasts. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* *10*, 045005.

Jin, H.-H., Kim, D.-H., Kim, T.-W., Shin, K.-K., Jung, J.S., Park, H.-C., and Yoon, S.-Y. (2012). In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* *51*, 1079–1085.

- Jin, R., Moreira Teixeira, L.S., Dijkstra, P.J., Karperien, M., van Blitterswijk, C.A., Zhong, Z.Y., and Feijen, J. (2009). Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 30, 2544–2551.
- Jumahat, A., Soutis, C., Jones, F.R., and Hodzic, A. (2010). Effect of silica nanoparticles on compressive properties of an epoxy polymer. *J. Mater. Sci.* 45, 5973–5983.
- Kaigler, D., Wang, Z., Horger, K., Mooney, D.J., and Krebsbach, P.H. (2006). VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 21, 735–744.
- Kale, S., Biermann, S., Edwards, C., Tarnowski, C., Morris, M., and Long, M.W. (2000). Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone. *Nat. Biotechnol.* 18, 954–958.
- Kanczler, J.M., and Oreffo, R.O.C. (2008). Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur. Cell. Mater.* 15, 100–114.
- Kane, R., and Ma, P.X. (2013). Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone. *Mater. Today Kidlington Engl.* 16, 418–423.
- Kassebaum, N.J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C.J.L., and Marcenes, W. (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J. Dent. Res.* 93, 1045–1053.
- Kattimani, V.S., Kondaka, S., and Lingamaneni, K.P. (2016). Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone Tissue Regen. Insights* 2016, 9–19.
- Kauly, T., Kaufman-Francis, K., Lesman, A., and Levenberg, S. (2009). Vascularization—the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15, 159–169.
- Keeney, M., Lai, J.H., and Yang, F. (2011). Recent progress in cartilage tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 734–740.
- Kelc, R., Naranda, J., Kuhta, M., and Vogrin, M. (2013). Novel Therapies for the Management of Sports Injuries.
- Keramaris, N.C., Calori, G.M., Nikolaou, V.S., Schemitsch, E.H., and Giannoudis, P.V. (2008). Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury* 39 Suppl 2, S45-57.
- Khan, S.N., Cammisa, F.P., Sandhu, H.S., Diwan, A.D., Girardi, F.P., and Lane, J.M. (2005). The biology of bone grafting. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 13, 77–86.
- Kim, B.G., Kang, Y.M., Phi, J.H., Kim, Y.-H., Hwang, D.H., Choi, J.Y., Ryu, S., Elstner, A.-E., Paek, S.H., Wang, K.-C., et al. (2010). Implantation of polymer scaffolds seeded with neural stem cells in a canine spinal cord injury model. *Cytotherapy* 12, 841–845.
- Kim, I.L., Mauck, R.L., and Burdick, J.A. (2011). Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid. *Biomaterials* 32, 8771–8782.
- Kirilak, Y., Pavlos, N.J., Willers, C.R., Han, R., Feng, H., Xu, J., Asokanathan, N., Stewart,

G.A., Henry, P., Wood, D., et al. (2006). Fibrin sealant promotes migration and proliferation of human articular chondrocytes: possible involvement of thrombin and protease-activated receptors. *Int. J. Mol. Med.* *17*, 551–558.

Klaue, K., Knothe, U., Anton, C., Pfluger, D.H., Stoddart, M., Masquelet, A.C., and Perren, S.M. (2009). Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep. *Injury* *40 Suppl 4*, S95-102.

Kleinheinz, J., Stratmann, U., Joos, U., and Wiesmann, H.-P. (2005). VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* *63*, 1310–1316.

Klyushnenkova, E., Mosca, J.D., Zernetkina, V., Majumdar, M.K., Beggs, K.J., Simonetti, D.W., Deans, R.J., and McIntosh, K.R. (2005). T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J. Biomed. Sci.* *12*, 47–57.

Ko, H.C.H., Milthorpe, B.K., and McFarland, C.D. (2007). Engineering thick tissues--the vascularisation problem. *Eur. Cell. Mater.* *14*, 1-18; discussion 18-19.

Kubota, N., Tatsumoto, N., Sano, T., and Toya, K. (2000). A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr. Res.* *324*, 268–274.

Kuhn, L.T., Ou, G., Charles, L., Hurley, M.M., Rodner, C.M., and Gronowicz, G. (2013). Fibroblast Growth Factor-2 and Bone Morphogenetic Protein-2 Have a Synergistic Stimulatory Effect on Bone Formation in Cell Cultures From Elderly Mouse and Human Bone. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* *68*, 1170–1180.

Kurien, T., Pearson, R.G., and Scammell, B.E. (2013). Bone graft substitutes currently available in orthopaedic practice: the evidence for their use. *Bone Jt. J.* *95-B*, 583–597.

Kuroda, T., Matsumoto, T., Mifune, Y., Fukui, T., Kubo, S., Matsushita, T., Asahara, T., Kurosaka, M., and Kuroda, R. (2011). Therapeutic strategy of third-generation autologous chondrocyte implantation for osteoarthritis. *Ups. J. Med. Sci.* *116*, 107–114.

Lam, C.X.F., Hutmacher, D.W., Schantz, J.-T., Woodruff, M.A., and Teoh, S.H. (2009). Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. A* *90A*, 906–919.

Landínez-Parra, N.S., Garzón-Alvarado, D.A., and Vanegas-Acosta, J.C. (2012). Mechanical Behavior of Articular Cartilage.

Landini, A., Confalonieri, N., Bagnoli, G., Penna, G., and Pietrogrande, V. (1984). [Consolidation time in fresh fractures of the leg treated by the Ilizarov method]. *Arch. Putti Chir. Organi Mov.* *34*, 269–273.

Langer, R., and Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science* *260*, 920–926.

Leach, J.K., Kaigler, D., Wang, Z., Krebsbach, P.H., and Mooney, D.J. (2006). Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* *27*, 3249–3255.

- Lee, E.H., and Hui, J.H.P. (2006). The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *Bone Jt. J.* *88-B*, 841–851.
- Lee, Y.H.D., Suzer, F., and Thermann, H. (2014). Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis in the Knee: A Review. *Cartilage* *5*, 145–153.
- Lehmann, M., Martin, F., Mannigel, K., Kaltschmidt, K., Sack, U., and Anderer, U. (2013). Three-Dimensional Scaffold-Free Fusion Culture: the Way to Enhanced Chondrogenesis of in vitro Propagated Human Articular Chondrocytes. *Eur. J. Histochem. E JH* *57*.
- Levengood, S.L., and Zhang, M. (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* *2*, 3161–3184.
- Levingstone, T.J., Matsiko, A., Dickson, G.R., O'Brien, F.J., and Gleeson, J.P. (2014). A biomimetic multi-layered collagen-based scaffold for osteochondral repair. *Acta Biomater.* *10*, 1996–2004.
- Li, F., Bronson, S., and Niyibizi, C. (2010). Derivation of murine induced pluripotent stem cells (iPS) and assessment of their differentiation toward osteogenic lineage. *J. Cell. Biochem.* *109*, 643–652.
- Li, J., Zhang, L., Lv, S., Li, S., Wang, N., and Zhang, Z. (2011). Fabrication of individual scaffolds based on a patient-specific alveolar bone defect model. *J. Biotechnol.* *151*, 87–93.
- Li, K., Sun, H., Sui, H., Zhang, Y., Liang, H., Wu, X., and Zhao, Q. (2015a). Composite mesoporous silica nanoparticle/chitosan nanofibers for bone tissue engineering. *RSC Adv.* *5*, 17541–17549.
- Li, L., Li, G., Jiang, J., Liu, X., Luo, L., and Nan, K. (2012). Electrospun fibrous scaffold of hydroxyapatite/poly (ϵ -caprolactone) for bone regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* *23*, 547–554.
- Li, X., Ding, J., Wang, J., Zhuang, X., and Chen, X. (2015b). Biomimetic biphasic scaffolds for osteochondral defect repair. *Regen. Biomater.* *2*, 221–228.
- Li, Y., Meng, H., Liu, Y., and Lee, B.P. (2015c). Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering. *Sci. World J.*
- Liao, I.-C., Moutos, F.T., Estes, B.T., Zhao, X., and Guilak, F. (2013). Composite three-dimensional woven scaffolds with interpenetrating network hydrogels to create functional synthetic articular cartilage. *Adv. Funct. Mater.* *23*, 5833–5839.
- Lima, E.G., Bian, L., Mauck, R.L., Byers, B.A., Tuan, R.S., Ateshian, G.A., and Hung, C.T. (2006). The effect of applied compressive loading on tissue-engineered cartilage constructs cultured with TGF-beta3. *IEEE* *1*, 779–782.
- Lin, N., and Dufresne, A. (2014). Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *Eur. Polym. J.* *59*, 302–325.
- Liu, H., Kemeny, D.M., Heng, B.C., Ouyang, H.W., Melendez, A.J., and Cao, T. (2006). The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from

mesenchymal stem cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *176*, 2864–2871.

Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., and Chen, J. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb. Cell Factories* *10*, 99.

Loeser, R.F. (2014). Integrins and chondrocyte–matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *39*, 11–16.

Longobardi, L., O’Rear, L., Aakula, S., Johnstone, B., Shimer, K., Chytil, A., Horton, W.A., Moses, H.L., and Spagnoli, A. (2006). Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J. Bone Miner. Res.* *21*, 626–636.

Lysaght, M.J., Jaklenec, A., and Deweerdt, E. (2008). Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics. *Tissue Eng. Part A* *14*, 305–315.

Ma, P.X. (2004). Scaffolds for tissue fabrication. *Mater. Today* *7*, 30–40.

Maehara, H., Sotome, S., Yoshii, T., Torigoe, I., Kawasaki, Y., Sugata, Y., Yuasa, M., Hirano, M., Mochizuki, N., Kikuchi, M., et al. (2010). Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J. Orthop. Res.* *28*, 677–686.

Mahmoudifar, N., and Doran, P.M. (2010). Extent of cell differentiation and capacity for cartilage synthesis in human adult adipose-derived stem cells: comparison with fetal chondrocytes. *Biotechnol. Bioeng.* *107*, 393–401.

Malhotra, A., and Habibovic, P. (2016). Calcium Phosphates and Angiogenesis: Implications and Advances for Bone Regeneration. *Trends Biotechnol.* *34*, 983–992.

Mao, A.S., and Mooney, D.J. (2015). Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 14452–14459.

Marcacci, M., Kon, E., Moukhachev, V., Lavroukov, A., Kutepov, S., Quarto, R., Mastrogiacomo, M., and Cancedda, R. (2007). Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng.* *13*, 947–955.

Masquelet, A.C., Fitoussi, F., Begue, T., and Muller, G.P. (2000). [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Ann. Chir. Plast. Esthet.* *45*, 346–353.

Masturi, M., Aliah, H., Aji, M., Ardian Sagita, A., Bukit, M., Sustini, E., Khairurrijal, K., and Abdullah, M. (2011). Effect of Silica Nanoparticles on Compressive Strength of Leaves-Waste Composite. *AIP Conf. Proc.* *1415*, 90–93.

Matsusue, Y., Yamamuro, T., and Hama, H. (1993). Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* *9*, 318–321.

Mattos, F. de, Leite, N., Pitta, A., and Bento, P.C.B. (2016). Effects of aquatic exercise on

muscle strength and functional performance of individuals with osteoarthritis: a systematic review. *Rev. Bras. Reumatol.* *56*, 530–542.

Mauck, R.L., Soltz, M.A., Wang, C.C., Wong, D.D., Chao, P.H., Valhmu, W.B., Hung, C.T., and Ateshian, G.A. (2000). Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J. Biomech. Eng.* *122*, 252–260.

Mauck, R.L., Byers, B.A., Yuan, X., and Tuan, R.S. (2007). Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading. *Biomech. Model. Mechanobiol.* *6*, 113–125.

Mauffrey, C., Hake, M.E., Chadayammuri, V., and Masquelet, A.-C. (2016). Reconstruction of Long Bone Infections Using the Induced Membrane Technique: Tips and Tricks. *J. Orthop. Trauma* *30*, e188-193.

McCarthy, H.S., and Roberts, S. (2013). A histological comparison of the repair tissue formed when using either Chondroguide® or periosteum during autologous chondrocyte implantation. *Osteoarthritis Cartilage* *21*, 2048–2057.

Mendoza-Palomares, C., Ferrand, A., Facca, S., Fioretti, F., Ladam, G., Kuchler-Bopp, S., Regnier, T., Mainard, D., and Benkirane-Jessel, N. (2012). Smart Hybrid Materials Equipped by Nanoreservoirs of Therapeutics. *ACS Nano* *6*, 483–490.

Mercado-Pagán, Á.E., Stahl, A.M., Shanjani, Y., and Yang, Y. (2015). Vascularization in bone tissue engineering constructs. *Ann. Biomed. Eng.* *43*, 718–729.

Meury, T., Verrier, S., and Alini, M. (2006). Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. *J. Cell. Biochem.* *98*, 992–1006.

Mi, F.-L., Kuan, C.-Y., Shyu, S.-S., Lee, S.-T., and Chang, S.-F. (2000). The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. *Carbohydr. Polym.* *41*, 389–396.

Mikos, A., McIntire, L., Anderson, J., and Babensee, J. (1998). Host response to tissue engineered devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *33*, 111–139.

Mishra, R., Bishop, T., Valerio, I.L., Fisher, J.P., and Dean, D. (2016). The potential impact of bone tissue engineering in the clinic. *Regen. Med.* *11*, 571–587.

Mohandas, A., Anisha, B.S., Chennazhi, K.P., and Jayakumar, R. (2015). Chitosan-hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *127*, 105–113.

Moran, C.J., Pascual-Garrido, C., Chubinskaya, S., Potter, H.G., Warren, R.F., Cole, B.J., and Rodeo, S.A. (2014). Restoration of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* *96*, 336–344.

Motamedian, S.R., Hosseinpour, S., Ahsaie, M.G., and Khojasteh, A. (2015). Smart scaffolds in bone tissue engineering: A systematic review of literature. *World J. Stem Cells* *7*, 657–668.

Mundy, G.R. (1992). Cytokines and local factors which affect osteoclast function. *Int. J. Cell Cloning* 10, 215–222.

Murakami, J., Ishii, M., Suehiro, F., Ishihata, K., Nakamura, N., and Nishimura, M. (2017). Vascular endothelial growth factor-C induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through the ERK and RUNX2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 484, 710–718.

Nehrer, S., Breinan, H.A., Ramappa, A., Shortkroff, S., Young, G., Minas, T., Sledge, C.B., Yannas, I.V., and Spector, M. (1997). Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 38, 95–104.

Neo, M., Nakamura, T., Ohtsuki, C., Kasai, R., Kokubo, T., and Yamamuro, T. (1994). Ultrastructural study of the A-W GC-bone interface after long-term implantation in rat and human bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 28, 365–372.

Nerem, R.M., and Sambanis, A. (1995). Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue Eng.* 1, 3–13.

Ng, S.K.S., and Keung Leung, W. (2006). A community study on the relationship between stress, coping, affective dispositions and periodontal attachment loss. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 34, 252–266.

Nguyen, L.H., Kudva, A.K., Saxena, N.S., and Roy, K. (2011). Engineering articular cartilage with spatially-varying matrix composition and mechanical properties from a single stem cell population using a multi-layered hydrogel. *Biomaterials* 32, 6946–6952.

Noël, D., Gazit, D., Bouquet, C., Apparailly, F., Bony, C., Ponce, P., Millet, V., Turgeman, G., Perricaudet, M., Sany, J., et al. (2004). Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 22, 74–85.

Nuernberger, S., Cyran, N., Albrecht, C., Redl, H., Vécsei, V., and Marlovits, S. (2011). The influence of scaffold architecture on chondrocyte distribution and behavior in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts. *Biomaterials* 32, 1032–1040.

Ogose, A., Kondo, N., Umezu, H., Hotta, T., Kawashima, H., Tokunaga, K., Ito, T., Kudo, N., Hoshino, M., Gu, W., et al. (2006). Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion) in human bones. *Biomaterials* 27, 1542–1549.

Ong, K.L., Villarraga, M.L., Lau, E., Carreon, L.Y., Kurtz, S.M., and Glassman, S.D. (2010). Off-label use of bone morphogenetic proteins in the United States using administrative data. *Spine* 35, 1794–1800.

Oonishi, H., Iwaki, Y., Kin, N., Kushitani, S., Murata, N., Wakitani, S., and Imoto, K. (1997). Hydroxyapatite in Revision of Total Hip Replacements with Massive Acetabular Defects: 4- to 10-Year Clinical Results. *J Bone Jt. Surg Br* 79-B, 87–92.

Orciani, M., Fini, M., Di Primio, R., and Mattioli-Belmonte, M. (2017). Biofabrication and Bone Tissue Regeneration: Cell Source, Approaches, and Challenges. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5, 17.

- Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., and Maffulli, N. (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J. Orthop. Surg.* 9, 18.
- Özmeriç, A., Alemdaroğlu, K.B., and Aydoğan, N.H. (2014). Treatment for cartilage injuries of the knee with a new treatment algorithm. *World J. Orthop.* 5, 677–684.
- Paley, D. (1990). Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. *Clin. Orthop.* 81–104.
- Paley, D., Catagni, M.A., Argnani, F., Villa, A., Benedetti, G.B., and Cattaneo, R. (1989). Ilizarov treatment of tibial nonunions with bone loss. *Clin. Orthop.* 146–165.
- Park, J.B., and Bronzino, J.D. (2002). *Biomaterials: Principles and Applications*.
- Park, K.M., Lee, S.Y., Joung, Y.K., Na, J.S., Lee, M.C., and Park, K.D. (2009). Thermosensitive chitosan-Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. *Acta Biomater.* 5, 1956–1965.
- Peterson, L., Vasiliadis, H.S., Brittberg, M., and Lindahl, A. (2010). Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am. J. Sports Med.* 38, 1117–1124.
- Phelps, E.A., and Garcia, A.J. (2009). Update on therapeutic vascularization strategies. *Regen. Med.* 4, 65–80.
- Pill, K., Hofmann, S., Redl, H., and Holnthoner, W. (2015). Vascularization mediated by mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: a comparison. *Cell Regen. Lond. Engl.* 4, 8.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.
- Pokrywczynska, M., Drewa, T., Jundzill, A., and Lysik, J. (2008). Alginate is not a good material for growth of rapidly proliferating cells. *Transplant. Proc.* 40, 1664–1667.
- Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M., and Ramirez-Vick, J.E. (2014). Scaffold Design for Bone Regeneration. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 15–56.
- Prasad, A., Sankar, M.R., and Katiyar, V. (2017). State of Art on Solvent Casting Particulate Leaching Method for Orthopedic Scaffolds Fabrication. *Mater. Today Proc.* 4, 898–907.
- Quintana, L., zur Nieden, N.I., and Semino, C.E. (2009). Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* 15, 29–41.
- Rajan, N., Habermehl, J., Coté, M.-F., Doillon, C.J., and Mantovani, D. (2006). Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nat. Protoc.* 1, 2753–2758.
- Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B., and Ringdén, O. (2007). Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand. J. Immunol.* 65, 336–343.

- Reddi, A.H., and Reddi, A. (2009). Bone morphogenetic proteins (BMPs): From morphogens to metabologens. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 341–342.
- Redman, S.N., Oldfield, S.F., and Archer, C.W. (2005). Current strategies for articular cartilage repair. *Eur. Cell. Mater.* *9*, 23-32; discussion 23-32.
- Richardson, J.B., Wright, K.T., Wales, J., Kuiper, J.H., McCarthy, H.S., Gallacher, P., Harrison, P.E., and Roberts, S. (2017). Efficacy and safety of autologous cell therapies for knee cartilage defects (autologous stem cells, chondrocytes or the two): randomized controlled trial design. *Regen. Med.* *12*, 493–501.
- Roberts, T.T., and Rosenbaum, A.J. (2012). Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics. *Organogenesis* *8*, 114–124.
- Rosa, R.G., Joazeiro, P.P., Bianco, J., Kunz, M., Weber, J.F., and Waldman, S.D. (2014). Growth Factor Stimulation Improves the Structure and Properties of Scaffold-Free Engineered Auricular Cartilage Constructs. *PLOS ONE* *9*, e105170.
- Sahoo, N.G., Pan, Y.Z., Li, L., and He, C.B. (2013). Nanocomposites for bone tissue regeneration. *Nanomed.* *8*, 639–653.
- Saini, R., Saini, S., and Sugandha, R. (2011). Periodontal disease: The sixth complication of diabetes. *J. Fam. Community Med.* *18*, 31.
- Salmasi, S., Nayyer, L., Seifalian, A.M., and Blunn, G.W. (2016). Nanohydroxyapatite Effect on the Degradation, Osteoconduction and Mechanical Properties of Polymeric Bone Tissue Engineered Scaffolds. *Open Orthop. J.* *10*, 900–919.
- Sander, E.A., Alb, A.M., Nauman, E.A., Reed, W.F., and Dee, K.C. (2004). Solvent effects on the microstructure and properties of 75/25 poly(D,L-lactide-co-glycolide) tissue scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* *70*, 506–513.
- Santo, V.E., Gomes, M.E., Mano, J.F., and Reis, R.L. (2013). Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering--Part II: challenges on the evolution from single to multiple bioactive factor delivery. *Tissue Eng. Part B Rev.* *19*, 327–352.
- Sasaki, J.-I., Hashimoto, M., Yamaguchi, S., Itoh, Y., Yoshimoto, I., Matsumoto, T., and Imazato, S. (2015). Fabrication of Biomimetic Bone Tissue Using Mesenchymal Stem Cell-Derived Three-Dimensional Constructs Incorporating Endothelial Cells. *PloS One* *10*, e0129266.
- Scheer, J.H., and Adolfsson, L.E. (2009). Tricalcium phosphate bone substitute in corrective osteotomy of the distal radius. *Injury* *40*, 262–267.
- Schiavi, J., Keller, L., Morand, D.-N., De Isla, N., Huck, O., Lutz, J.C., Mainard, D., Schwinté, P., and Benkirane-Jessel, N. (2015). Active implant combining human stem cell microtissues and growth factors for bone-regenerative nanomedicine. *Nanomed.* *10*, 753–763.
- Schuetz, H.B., Kraeutler, M.J., and McCarty, E.C. (2017). Matrix-Assisted Autologous Chondrocyte Transplantation in the Knee: A Systematic Review of Mid- to Long-Term Clinical Outcomes. *Orthop. J. Sports Med.* *5*.

- Schwartz, C., and Bordei, R. (2005). Biphasic phospho-calcium ceramics used as bone substitutes are efficient in the management of severe acetabular bone loss in revision total hip arthroplasties. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* *15*, 191–196.
- Schwinté, P., Keller, L., Eap, S., Mainard, D., and Benkirane-Jessel, N. (2014). Osteoarticular Regenerative Nanomedicine: Advances and Drawbacks in Articular Cartilage Regeneration Implants. *Austin J Nanomed Nanotechnol* 1025–1038.
- Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Reger, R.L., and Prockop, D.J. (2005). Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res.* *320*, 269–276.
- Selmi, T. a. S., Verdonk, P., Chambat, P., Dubrana, F., Potel, J.-F., Barnouin, L., and Neyret, P. (2008). Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: outcome at two years. *J. Bone Joint Surg. Br.* *90*, 597–604.
- Seong, J.M., Kim, B.-C., Park, J.-H., Kwon, I.K., Mantalaris, A., and Hwang, Y.-S. (2010). Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* *5*, 062001.
- Shive, M.S., Stanish, W.D., McCormack, R., Forriol, F., Mohtadi, N., Pelet, S., Desnoyers, J., Méthot, S., Vehik, K., and Restrepo, A. (2015). BST-CarGel® Treatment Maintains Cartilage Repair Superiority over Microfracture at 5 Years in a Multicenter Randomized Controlled Trial. *Cartilage* *6*, 62–72.
- Si, J.-W., Wang, X.-D., and Shen, S.G. (2015). Perinatal stem cells: A promising cell resource for tissue engineering of craniofacial bone. *World J. Stem Cells* *7*, 149–159.
- Sophia Fox, A.J., Bedi, A., and Rodeo, S.A. (2009). The Basic Science of Articular Cartilage. *Sports Health* *1*, 461–468.
- Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., Baxevanis, C.N., and Papamichail, M. (2006). Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *24*, 74–85.
- Spiller, K.L., Maher, S.A., and Lowman, A.M. (2011). Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng. Part B Rev.* *17*, 281–299.
- St John, T.A., Vaccaro, A.R., Sah, A.P., Schaefer, M., Berta, S.C., Albert, T., and Hilibrand, A. (2003). Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. *Am. J. Orthop. Belle Mead NJ* *32*, 18–23.
- Stafford, P.R., and Norris, B.L. (2010). Reamer-irrigator-aspirator bone graft and bi Masquelet technique for segmental bone defect nonunions: a review of 25 cases. *Injury* *41 Suppl 2*, S72-77.
- Steadman, J.R., Rodkey, W.G., Briggs, K.K., and Rodrigo, J.J. (1999). The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopade* *28*, 26–32.
- Steele, J. a. M., McCullen, S.D., Callanan, A., Autefage, H., Accardi, M.A., Dini, D., and Stevens, M.M. (2014). Combinatorial scaffold morphologies for zonal articular cartilage engineering. *Acta Biomater.* *10*, 2065–2075.

Stewart, A.A., Byron, C.R., Pondenis, H., and Stewart, M.C. (2007). Effect of fibroblast growth factor-2 on equine mesenchymal stem cell monolayer expansion and chondrogenesis. *Am. J. Vet. Res.* *68*, 941–945.

Suekama, T.C., Hu, J., Kurokawa, T., Gong, J.P., and Gehrke, S.H. (2013). Double-Network Strategy Improves Fracture Properties of Chondroitin Sulfate Networks. *ACS Macro Lett.* *2*, 137–140.

Sun, T., Jackson, S., Haycock, J.W., and MacNeil, S. (2006). Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J. Biotechnol.* *122*, 372–381.

Sunay, O., Can, G., Cakir, Z., Denek, Z., Kozanoglu, I., Erbil, G., Yilmaz, M., and Baran, Y. (2013). Autologous rabbit adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of bone injuries with distraction osteogenesis. *Cytotherapy* *15*, 690–702.

Takafuji, H., Suzuki, T., Okubo, Y., Fujimura, K., and Bessho, K. (2007). Regeneration of articular cartilage defects in the temporomandibular joint of rabbits by fibroblast growth factor-2: a pilot study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* *36*, 934–937.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663–676.

Talebian, S., Mehrali, M., Mohan, S., Raghavendran, H. rao B., Mehrali, M., Khanlou, H.M., Kamarul, T., Afifi, A.M., and Abass, A.A. (2014). Chitosan (PEO)/bioactive glass hybrid nanofibers for bone tissue engineering. *RSC Adv.* *4*, 49144–49152.

Tannoury, C.A., and An, H.S. (2014). Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery. *Spine J.* *14*, 552–559.

Thadavirul, N., Pavasant, P., and Supaphol, P. (2014). Development of polycaprolactone porous scaffolds by combining solvent casting, particulate leaching, and polymer leaching techniques for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* *102*, 3379–3392.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.

Toh, W.S., Lee, E.H., Guo, X.-M., Chan, J.K.Y., Yeow, C.H., Choo, A.B., and Cao, T. (2010). Cartilage repair using hyaluronan hydrogel-encapsulated human embryonic stem cell-derived chondrogenic cells. *Biomaterials* *31*, 6968–6980.

Tong, S., Xu, D.-P., Liu, Z.-M., Du, Y., and Wang, X.-K. (2016). Synthesis of and in vitro and in vivo evaluation of a novel TGF- β 1-SF-CS three-dimensional scaffold for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Med.* *38*, 367–380.

Tonino, A.J., van der Wal, B.C.H., Heyligers, I.C., and Grimm, B. (2009). Bone Remodeling and Hydroxyapatite Resorption in Coated Primary Hip Prostheses. *Clin. Orthop.* *467*, 478–484.

Tsigkou, O., Pomerantseva, I., Spencer, J.A., Redondo, P.A., Hart, A.R., O'Doherty, E., Lin, Y.,

Friedrich, C.C., Daheron, L., Lin, C.P., et al. (2010). Engineered vascularized bone grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3311–3316.

Tsiridis, E., Upadhyay, N., and Giannoudis, P. (2007). Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* *38 Suppl 1*, S11-25.

Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Huang, X., Manner, P.A., Hozack, W.J., Danielson, K.G., Hall, D.J., and Tuan, R.S. (2003). Transforming Growth Factor- β -mediated Chondrogenesis of Human Mesenchymal Progenitor Cells Involves N-cadherin and Mitogen-activated Protein Kinase and Wnt Signaling Cross-talk. *J. Biol. Chem.* *278*, 41227–41236.

Undale, A.H., Westendorf, J.J., Yaszemski, M.J., and Khosla, S. (2009). Mesenchymal Stem Cells for Bone Repair and Metabolic Bone Diseases. *Mayo Clin. Proc.* *84*, 893–902.

Välimäki, V.-V., and Aro, H.T. (2006). Molecular Basis for Action of Bioactive Glasses as Bone Graft Substitute. *Scand. J. Surg.* *95*, 95–102.

Vallet-Regí, M. (2010). Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *Comptes Rendus Chim.* *13*, 174–185.

Varoni, E., Tschon, M., Palazzo, B., Nitti, P., Martini, L., and Rimondini, L. (2012). Agarose gel as biomaterial or scaffold for implantation surgery: characterization, histological and histomorphometric study on soft tissue response. *Connect. Tissue Res.* *53*, 548–554.

Vega, S.L., Kwon, M.Y., and Burdick, J.A. (2017). Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering. *Eur. Cell. Mater.* *33*, 59–75.

Venkatesan, J., and Kim, S.-K. (2014). Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering--a review. *J. Biomed. Nanotechnol.* *10*, 3124–3140.

Venkatrajah, B., Malathy, V.V., Elayarajah, B., Rajendran, R., and Rammohan, R. (2013). Synthesis of carboxymethyl chitosan and coating on wound dressing gauze for wound healing. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS* *16*, 1438–1448.

Vergani, L., Grattarola, M., and Nicolini, C. (2004). Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 1447–1461.

Visser, J., Melchels, F.P.W., Jeon, J.E., Bussel, E.M. van, Kimpton, L.S., Byrne, H.M., Dhert, W.J.A., Dalton, P.D., Hutmacher, D.W., and Malda, J. (2015). Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibres. *Nat. Commun.* *6*, ncomms7933.

Wan, C., Gilbert, S.R., Wang, Y., Cao, X., Shen, X., Ramaswamy, G., Jacobsen, K.A., Alaql, Z.S., Eberhardt, A.W., Gerstenfeld, L.C., et al. (2008). Activation of the hypoxia-inducible factor-1 α pathway accelerates bone regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 686–691.

Wang, W., and Yeung, K.W.K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact. Mater.* 1–24.

Wang, J., Wang, L., Zhou, Z., Lai, H., Xu, P., Liao, L., and Wei, J. (2016). Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers*

8, 115.

Wang, K., Chen, X., Pan, Y., Cui, Y., Zhou, X., Kong, D., and Zhao, Q. (2015). Enhanced vascularization in hybrid PCL/gelatin fibrous scaffolds with sustained release of VEGF. *BioMed Res. Int.* 2015, 865076.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318–324.

Wernike, E., Montjovent, M.-O., Liu, Y., Wismeijer, D., Hunziker, E.B., Siebenrock, K.-A., Hofstetter, W., and Klenke, F.M. (2010). VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo. *Eur. Cell. Mater.* 19, 30–40.

Westacott, C.I., and Sharif, M. (1996). Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin. Arthritis Rheum.* 25, 254–272.

Wolf, F., Candrian, C., Wendt, D., Farhadi, J., Heberer, M., Martin, I., and Barbero, A. (2008). Cartilage tissue engineering using pre-aggregated human articular chondrocytes. *Eur. Cell. Mater.* 16, 92–99.

Woodfield, T.B.F., Miot, S., Martin, I., van Blitterswijk, C.A., and Riesle, J. (2006). The regulation of expanded human nasal chondrocyte re-differentiation capacity by substrate composition and gas plasma surface modification. *Biomaterials* 27, 1043–1053.

Wu, S., Liu, X., Yeung, K.W.K., Liu, C., and Yang, X. (2014). Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* 80, 1–36.

Xiao, X., Wang, W., Liu, D., Zhang, H., Gao, P., Geng, L., Yuan, Y., Lu, J., and Wang, Z. (2015). The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways. *Sci. Rep.* 5, 9409.

Xu, S., Deng, L., Zhang, J., Yin, L., and Dong, A. (2016). Composites of electrospun-fibers and hydrogels: A potential solution to current challenges in biological and biomedical field. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 104, 640–656.

Xu, Y., Yan, M., Gong, Y., Chen, L., Zhao, F., and Zhang, Z. (2014). Response of endothelial cells to decellularized extracellular matrix deposited by bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 4997–5003.

Yamada, K.M., and Cukierman, E. (2007). Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 130, 601–610.

Yamaoka, H., Asato, H., Ogasawara, T., Nishizawa, S., Takahashi, T., Nakatsuka, T., Koshima, I., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Chung, U., et al. (2006). Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J. Biomed. Mater. Res. A* 78, 1–11.

Yan, L.-P., Silva-Correia, J., Oliveira, M.B., Vilela, C., Pereira, H., Sousa, R.A., Mano, J.F.,

Oliveira, A.L., Oliveira, J.M., and Reis, R.L. (2015). Bilayered silk/silk-nanoCaP scaffolds for osteochondral tissue engineering: In vitro and in vivo assessment of biological performance. *Acta Biomater.* 12, 227–241.

Yang, Y.-H., and Barabino, G.A. (2013). Differential Morphology and Homogeneity of Tissue-Engineered Cartilage in Hydrodynamic Cultivation with Transient Exposure to Insulin-Like Growth Factor-1 and Transforming Growth Factor- β 1. *Tissue Eng. Part A* 19, 2349–2360.

Yoon, J.-K., Kim, H.N., Bhang, S.H., Shin, J.-Y., Han, J., La, W.-G., Jeong, G.-J., Kang, S., Lee, J.-R., Oh, J., et al. (2016). Enhanced Bone Repair by Guided Osteoblast Recruitment Using Topographically Defined Implant. *Tissue Eng. Part A* 22, 654–664.

Yu, R., Hofstaetter, J.G., Sullivan, T., Costi, K., Howie, D.W., and Solomon, L.B. (2013). Validity and Reliability of the Paprosky Acetabular Defect Classification. *Clin. Orthop.* 471, 2259–2265.

Yucekul, A., Ozdil, D., Kutlu, N.H., Erdemli, E., Aydin, H.M., and Doral, M.N. (2017). Tri-layered composite plug for the repair of osteochondral defects: in vivo study in sheep. *J. Tissue Eng.* 8, 1–10.

Yunoki, S., Ohyabu, Y., and Hatayama, H. (2013). Temperature-Responsive Gelation of Type I Collagen Solutions Involving Fibril Formation and Genipin Crosslinking as a Potential Injectable Hydrogel. *Int. J. Biomater.*

Zavaglia, C.A.C., and Prado da Silva, M.H. (2016). Feature Article: Biomaterials. In Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, (Elsevier), p.

Zeng, L., Chen, X., Zhang, Q., Yu, F., Li, Y., and Yao, Y. (2015). Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes in a novel three-dimensional microcavitary hydrogel. *J. Biomed. Mater. Res. A* 103, 1693–1702.

Zwingenberger, S., Nich, C., Valladares, R.D., Yao, Z., Stiehler, M., and Goodman, S.B. (2012). Recommendations and Considerations for the Use of Biologics in Orthopedic Surgery. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 26, 245–256.

Liste des publications et présentations

Article 1 : Keller, L., Regiel-Futyra, A., Gimeno, M., Eap, S., Mendoza, G., Andreu, V., Wagner, Q., Kyzioł, A., Sebastian, V., Stochel, G., Arruebo M., Benkirane-Jessel N. (2017). Chitosan-based nanocomposites for the repair of bone defects. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 13, 2231–2240.

Article 2 : Wagner Q., Keller L., Offner D., Eap S., Musset A-M., Arruebo M., Kelm J.M., Schwinté P., Benkirane-Jessel N. (2015). Integrating Microtissues in Nanofiber Scaffolds for Regenerative Nanomedicine. *Materials.* 8, 6863-6867.

Article 3 : Wagner Q., Keller L., Idoux-Gillet Y., Eap S., Brasse D., Schwinté P., Arruebo M., Benkirane-Jessel N. (2017). Nano-engineered implant as a new platform for regenerative nanomedicine using 3D well-organized human cells spheroids. *International Journal of Nanomedicine* 12, 447–457

Article 4 : Wagner Q., Keller L., Schwinté P., Benkirane-Jessel N. (2015). Double Compartmented and Hybrid Implant Outfitted with Well-Organized 3D Stem Cells for Osteochondral Regenerative Nanomedicine. *Nanomedicine (Lond).* 10, 2833-2845

Article 5 : Wagner Q., Keller L., Pugliano M., Breda P., Ehlinger M., Schwinté P. and Benkirane-Jessel N. (2015). Bilayered Nano Active Implant with Hybrid Stem Cell Microtissues for Tuned Cartilage Hypertrophy. *Journal of Stem Cell Research and Therapeutics.* 1(1):00004. DOI:10.15406/jsrt.2015.01.00004

Article 6 : Wagner Q., Offner D., Idoux-Gillet Y., Saleem I., Somavarapu S., Schwinté P., Benkirane-Jessel N., Keller L. Advanced Nanostructured Medical Device Combining Mesenchymal Cells and VEGF Nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization. *Nanomedicine (Lond.)* 11(18):2419-30 (2016)

Annexe 1 : Wagner Q., Offner D., Idoux-Gillet Y., Gegout H., Ferrandon A., Schwinté P., Musset A-M., Benkirane-Jessel N., Keller L. (2017). Hybrid Collagen Sponge and Stem Cells as a New Combined Scaffold Able to Induce the Re-Organization of Endothelial Cells into Clustered Networks. *Biomed. Mater. Eng.* 28, S185–S192

Annexe 2 : Keller L., Offner D., Schwinté P., Morand D., Wagner Q., Gros CI., Bornert F., Bahi S., Musset AM., Benkirane-Jessel N., Fioretti F. Active nanomaterials to meet the challenge of dental pulp regeneration. *Materials.* 8 : 7461-7471 (2015)

Annexe 3 : Richert L., Keller L., Wagner Q., Bornert F., Gros CI., Bahi S., Clauss F., Bacon W., Clézardin P., Benkirane-Jessel N., Fioretti F. Nanoscale Stiffness Distribution in Bone Metastasis. *World J. Nano Sci. Eng.* 05, 219 (2015)

Présentations

Wagner Q., Pugliano M., Schwinté P., Keller L., Benkirane-Jessel N. Compartmented and hybrid implant outfitted with well-organized 3D Stem cells for osteochondral regenerative. **Journée de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Mars 2016**

Wagner Q., Keller L., Eap S., Schiavi, J., Schwinte P., Benkirane-Jessel N. A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. **1^{er} Congrès de la Société Française de Physiologie et de Biologie Intégrative (CPBI), Strasbourg, Mai 2015.**

Distinctions

Lauréat au **Concours du meilleur poster scientifique au 1^{er} Congrès de la Société Française de Physiologie et de Biologie Intégrative, Strasbourg, 2015**

Résumé

Notre équipe a optimisé la formulation de dispositifs médicaux implantables pour l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse. A ces fins, nous nous sommes basés sur des implants nanostructurés d'origine naturelle ou synthétique conçus au sein du laboratoire par la méthode d'électrospinning, pour imiter la matrice extracellulaire du compartiment osseux, et un hydrogel composé d'alginate et d'acide hyaluronique imitant la composition du compartiment cartilagineux.

Dans une première partie de mon travail, pour la régénération osseuse, nous avons optimisé la formulation d'un implant nanostructuré à base de chitosane pour une accélération de cette régénération. Ceci a été possible en rendant actif ce dispositif médical implantable par incorporation de nanoparticules de silice, conférant à la construction nanocomposite des propriétés mécaniques accrues, et une excellente biocompatibilité avec le tissu hôte. Une autre étude pour la même visée a permis d'élaborer une nouvelle stratégie d'ensemencement de dispositif implantable synthétique et nanostructuré par des microtissus cellulaires, remplaçant un ensemencement de cellules isolées et permettant des performances de minéralisation accrues à l'intérieur de l'implant.

Dans un deuxième temps, pour la régénération de l'unité ostéoarticulaire, nous avons proposé deux implants bi-compartimentés et hybrides comportant des microtissus de cellules souches mésenchymateuses. Ces implants sont composés d'un hydrogel contenant les cellules souches permettant la régénération du cartilage, et d'une membrane collagénique naturelle (Bio-Gide®) ou synthétique (membrane de polycaprolactone), dotée de nanoréservoirs (technologie brevetée par le laboratoire) de facteur de croissance osseux (BMP-7) pour une régénération du socle osseux (os sous-chondral) de l'unité os-cartilage.

La troisième partie de mon travail a concerné la vascularisation des implants osseux et particulièrement l'accélération du recrutement vasculaire. Dans ce cadre plus vasculaire, nous avons proposé une stratégie qui vise à doter un implant synthétique nanostructuré de facteur de croissance angiogénique (VEGF), puis à lui appliquer un ensemencement séquentiel de cellules mésenchymateuses adultes « ostéoblastes humains » et de cellules endothéliales humaines (HUVECs). Cette stratégie a permis un recrutement et une hiérarchisation accrue des cellules endothéliales dans l'implant.

En conclusion, l'optimisation des implants développés au laboratoire permettra sans nul doute de proposer dans un futur proche de nouveaux dispositifs médicaux implantables (DMI) thérapeutique combinés de type DMI-MTI (Médicaments de Thérapie Innovante) pour l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse en particulier en médecine régénérative ostéo-articulaire.

Mots clés : nanomédecine régénérative, ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse, biomatériau, nanocomposite, électrospinning, microtissus, nanoréservoirs, facteur de croissance osseux, BMP, implant bicompartimenté, facteur de croissance endothélial, VEGF, cellules souches mésenchymateuses, ostéoblastes, cellules endothéliales, vascularisation, DMI (dispositifs médicaux implantables), MTI (Médicaments de Thérapie Innovante)

Abstract

Our team optimized the formulation of implantable medical devices for bone and cartilage tissue engineering. To that end, we based our work on nanostructured implants, either natural or synthetic, made in the laboratory by electrospinning process, to mimic bone extracellular matrix, and hydrogel of alginate/hyaluronic acid to mimic cartilage extracellular matrix.

First, concerning bone regeneration, we optimized the formulation of a nanostructured scaffold composed of natural chitosan to enhance bone regeneration. This was made possible by doping this implantable medical device with silica nanoparticles, offering this nanocomposite better mechanical properties, and excellent biocompatibility with host tissue. Another study with the same aim allowed elaborating a new cell seeding strategy, to seed these implantable medical devices with cell microtissues instead of single cells, offering higher mineralisation efficiencies within the implant.

Consequently, for the regeneration of the osteochondral unit, we proposed two compartmented and hybrid implants comprising mesenchymal stem cells microtissues. Those implants are made of a hydrogel containing the stem cells, allowing the regeneration of cartilage, and a membrane, either natural (collagenic Bio-Gide[®]) or synthetic (electrospun polycaprolactone) equipped with nanoreservoirs (technology patented by the laboratory) of bone growth factor (BMP-7) for the regeneration of osseous stand (the subchondral bone) of the bone-cartilage unit.

Finally, to study the improvement in vascular recruitment, we proposed a new strategy combining the modification of an implantable device with angiogenic growth factor (VEGF), prior to its sequential seeding with mesenchymal cells “human osteoblasts” and human endothelial cells (HUVECs). This strategy allowed higher recruitment and structuration of endothelial cells within the implant.

To conclude, the implant optimisation strategies developed in the laboratory will certainly allow proposing in the near future new combined Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) and Implantable Medical Device for bone and cartilage regeneration, in particular in the field of osteoarticular regenerative nanomedicine.

Keywords: nanomedicine, bone and cartilage tissue engineering, biomaterial, nanocomposite, electrospinning, cell microtissues, nanoreservoirs, bone morphogenetic growth factor, BMP, double compartmented implant, endothelial growth factor, VEGF, mesenchymal stem cells, osteoblasts, endothelial cells, vascularisation, ATMPs, Implantable Medical devices

Quentin WAGNER

Optimisation de dispositifs médicaux thérapeutiques implantables pour l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse

Résumé

Notre équipe a optimisé la formulation de dispositifs médicaux implantables pour l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse. A ces fins, nous nous sommes basés sur des implants nanostructurés d'origine naturelle ou synthétique conçus au sein du laboratoire par la méthode d'électrospinning, pour imiter la matrice extracellulaire du compartiment osseux, et un hydrogel composé d'alginate et d'acide hyaluronique imitant la composition du compartiment cartilagineux.

Dans une première partie de mon travail, pour la régénération osseuse, nous avons optimisé la formulation d'un implant nanostructuré à base de chitosane pour une accélération de cette régénération. Ceci a été possible en rendant actif ce dispositif médical implantable par incorporation de nanoparticules de silice, conférant à la construction nanocomposite des propriétés mécaniques accrues, et une excellente biocompatibilité avec le tissu hôte. Une autre étude pour la même visée a permis d'élaborer une nouvelle stratégie d'ensemencement de dispositif implantable synthétique et nanostructuré par des microtissus cellulaires, remplaçant un ensemencement de cellules isolées et permettant des performances de minéralisation accrues à l'intérieur de l'implant. Dans un deuxième temps, pour la régénération de l'unité ostéoarticulaire, nous avons proposé deux implants bicompartimentés et hybrides comportant des microtissus de cellules souches mésenchymateuses. Ces implants sont composés d'un hydrogel contenant les cellules souches permettant la régénération du cartilage, et d'une membrane collagénique naturelle (Bio-Gide®) ou synthétique (membrane de polycaprolactone), dotée de nanoréservoirs (technologie brevetée par le laboratoire) de facteur de croissance ostéogénique (BMP-7) pour une régénération du socle osseux (os sous-chondral) de l'unité os-cartilage. La troisième partie de mon travail a concerné la vascularisation des implants osseux et particulièrement l'accélération du recrutement vasculaire. Dans ce cadre plus vasculaire, nous avons proposé une stratégie qui vise à doter un implant synthétique nanostructuré de facteur de croissance angiogénique (VEGF), puis à lui appliquer un ensemencement séquentiel de cellules mésenchymateuses adultes « ostéoblastes humains » et de cellules endothéliales humaines (HUVECs). Cette stratégie a permis un recrutement et une hiérarchisation accrue des cellules endothéliales dans l'implant.

En conclusion, l'optimisation des implants développés au laboratoire permettra sans nul doute de proposer dans un futur proche de nouveaux dispositifs médicaux implantables (DMI) thérapeutique combinés de type DMI-MTI (Médicaments de Thérapie Innovante) pour l'ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse en particulier en médecine régénérative ostéo-articulaire.

Mots clés : nanomédecine régénérative, ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse, biomatériau, nanocomposite, électrospinning, microtissus, nanoréservoirs, facteur de croissance osseux, BMP, implant bicompartimenté, facteur de croissance endothélial, VEGF, cellules souches mésenchymateuses, ostéoblastes, cellules endothéliales, vascularisation, DMI (dispositifs médicaux implantables), MTI (Médicaments de Thérapie Innovante)

Abstract

Our team optimized the formulation of implantable medical devices for bone and cartilage tissue engineering. To that end, we based our work on nanostructured implants, either natural or synthetic, made in the laboratory by electrospinning process, to mimic bone extracellular matrix, and hydrogel of alginate/hyaluronic acid to mimic cartilage extracellular matrix.

First, concerning bone regeneration, we optimized the formulation of a nanostructured scaffold composed of natural chitosan to enhance bone regeneration. This was made possible by doping this implantable medical device with silica nanoparticles, offering this nanocomposite better mechanical properties, and excellent biocompatibility with host tissue. Another study with the same aim allowed elaborating a new cell seeding strategy, to seed these implantable medical devices with cell microtissues instead of single cells, offering higher mineralisation efficiencies within the implant. Consequently, for the regeneration of the osteochondral unit, we proposed two compartmented and hybrid implants comprising mesenchymal stem cells microtissues. Those implants are made of a hydrogel containing the stem cells, allowing the regeneration of cartilage, and a membrane, either natural (collagenic Bio-Gide®) or synthetic (electrospun polycaprolactone) equipped with nanoreservoirs (technology patented by the laboratory) of osteogenic growth factor (BMP-7) for the regeneration of osseous stand (the subchondral bone) of the bone-cartilage unit. Finally, to study the improvement in vascular recruitment, we proposed a new strategy combining the modification of an implantable device with angiogenic growth factor (VEGF), prior to its sequential seeding with mesenchymal cells "human osteoblasts" and human endothelial cells (HUVECs). This strategy allowed higher recruitment and structuration of endothelial cells within the implant.

To conclude, the implant optimisation strategies developed in the laboratory will certainly allow proposing in the near future new combined Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) and Implantable Medical Device for bone and cartilage regeneration, in particular in the field of osteoarticular regenerative nanomedicine.

Keywords: nanomedicine, bone and cartilage tissue engineering, biomaterial, nanocomposite, electrospinning, cell microtissues, nanoreservoirs, bone morphogenetic growth factor, BMP, double compartmented implant, endothelial growth factor, VEGF, mesenchymal stem cells, osteoblasts, endothelial cells, vascularisation, ATMPs, Implantable Medical devices