



HAL
open science

Effet de la pré-vascularisation organisée par Bioimpression Assistée par Laser sur la régénération osseuse

Olivia Kérourédan

► **To cite this version:**

Olivia Kérourédan. Effet de la pré-vascularisation organisée par Bioimpression Assistée par Laser sur la régénération osseuse. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0028 . tel-02495891v1

HAL Id: tel-02495891

<https://theses.hal.science/tel-02495891v1>

Submitted on 2 Mar 2020 (v1), last revised 3 Mar 2020 (v2)

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par Olivia KEROUREDAN

**Effet de la pré-vascularisation organisée par Bioimpression
Assistée par Laser sur la régénération osseuse**

Sous la direction du Professeur Raphaël Devillard

Soutenue le 11 mars 2019

Membres du jury :

M. HAIKEL Youssef PU-PH Strasbourg
Mme CHAUSSAIN Catherine PU-PH Paris
Mme PEREZ Fabienne PU-PH Nantes
M. CHRAIBI Hamza MCU Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

Effet de la pré-vascularisation organisée par Bioimpression Assistée par Laser sur la régénération osseuse

Afin de résoudre la problématique des substituts osseux faiblement vascularisés, un des challenges majeurs en ingénierie tissulaire osseuse est de favoriser le développement précoce d'une microvascularisation. La reproduction du microenvironnement local et l'organisation cellulaire *in situ* sont des approches innovantes pour optimiser la formation osseuse. En Biofabrication, la Bioimpression Assistée par Laser (LAB) est une technologie émergente permettant l'impression de cellules et de biomatériaux avec une résolution micrométrique. L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet de l'organisation de la pré-vascularisation par LAB sur la régénération osseuse. La station de bioimpression *Novalase* a été utilisée pour imprimer des motifs de cellules endothéliales sur un « biopaper » constitué de collagène et de cellules souches issues de la papille apicale. Les paramètres d'impression, densités cellulaires et conditions de recouvrement ont été optimisés afin de favoriser la formation d'un réseau microvasculaire avec une architecture définie *in vitro*. Ce modèle a ensuite été transposé *in vivo*, grâce à la bioimpression *in situ* de cellules endothéliales au niveau de défauts osseux critiques chez la souris, afin d'évaluer si la prévascularisation organisée par LAB permettait de promouvoir et contrôler spatialement le processus de régénération osseuse. Les résultats ont montré que la bioimpression permettait d'augmenter la densité de vaisseaux dans les défauts osseux et de favoriser la régénération osseuse.

Mots clés : ingénierie tissulaire osseuse, biofabrication, bioimpression assistée par laser, vascularisation, progéniteurs endothéliaux, cellules souches issues de la papille apicale

Effect of prevascularization designed by Laser-Assisted Bioprinting on bone regeneration

In order to solve the issue of poorly vascularized bone substitutes, development of a microvasculature into tissue-engineered bone substitutes represents a current challenge. The reproduction of local microenvironment and *in situ* organization of cells are innovating approaches to optimize bone formation. In Biofabrication, Laser-Assisted Bioprinting (LAB) has emerged as a relevant method to print living cells and biomaterials with micrometric resolution. The aim of this work was to study the effect of prevascularization organized by LAB on bone regeneration. The laser workstation *Novalase* was used to print patterns of endothelial cells onto a « biopaper » of collagen hydrogel seeded with stem cells from the apical papilla. Printing parameters, cell densities and overlay conditions were optimized to enhance the formation of microvascular networks with a defined architecture *in vitro*. This model was then transposed *in vivo*, through *in situ* bioprinting of endothelial cells into mouse calvarial bone defects of critical size, to investigate if prevascularization organized by LAB can promote and spatially control bone regeneration. The results showed that bioprinting allowed to increase blood vessel density in bone defects and promote bone regeneration.

Keywords: bone tissue engineering, biofabrication, laser-assisted bioprinting, vascularization, endothelial progenitors, stem cells from the apical papilla

UMR 1026, BIOTIS, INSERM/Université de Bordeaux
Zone Nord, Bât 4A - case postale 45 ; 146, rue Léo Saignat
33076 Bordeaux cedex France

REMERCIEMENTS

A MON DIRECTEUR. **Raphaël**, au-delà de la direction de cette Thèse, je te remercie sincèrement pour toute l'aide que tu m'as apportée durant ces cinq dernières années. Toujours présent et à l'écoute, malgré ta vie professionnelle très chargée, tu as toujours cru en moi et su m'encourager sans jamais me mettre la pression. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à toi et je te suis entièrement reconnaissante de l'énergie que tu as consacré à la construction de ma carrière hospitalo-universitaire. Nous formons une vraie équipe et je suis heureuse d'avoir la perspective de travailler avec toi encore de longues années. Merci également à Emma et Zoé du temps qu'elles t'ont laissé me consacrer. Je vous souhaite à tous les trois une vie remplie de bonheur(s).

A MES MEMBRES DU JURY. **Monsieur le Professeur Haikel**, je vous remercie infiniment d'avoir accepté de faire partie de mon jury de Thèse. Votre présence aujourd'hui compte beaucoup pour moi. Merci pour votre bienveillance constante à mon égard, pour vos conseils avisés et vos encouragements. Veuillez recevoir l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect. **Madame le Professeur Chaussain**, merci d'avoir accepté si spontanément de siéger parmi les membres du jury. Je vous remercie pour votre sourire et pour la bienveillance dont vous avez fait preuve à chacune de nos rencontres. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde estime. **Madame le Professeur Pérez**, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de Thèse. Merci de l'intérêt que vous avez pu porter à mon parcours, de ma formation initiale à Rennes jusqu'à aujourd'hui. Vous avez toujours su me conseiller, me féliciter et me conforter dans la voie que j'ai décidé de prendre. Permettez-moi de vous témoigner ici toute ma gratitude. **Hamza**, je te remercie beaucoup d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je garde un excellent souvenir de ton passage au laboratoire. Merci de m'avoir fait bénéficier de ton expertise, et merci également pour ta gentillesse et tes bons conseils. Sois assuré de ma profonde reconnaissance.

A MES DIRECTEURS DE LABORATOIRE. **Joëlle**, je te remercie de m'avoir acceptée au sein de l'Unité en 2014 dans le cadre de mon stage de Master 2 Recherche. Merci pour ta gentillesse et ton énergie positive. **Monsieur le Professeur Fricain**, je vous remercie infiniment pour la confiance que vous m'avez accordée en m'ouvrant les portes de BioTis et de l'UFR des Sciences Odontologiques en 2014. Notre première rencontre lors de l'ADF en 2013 restera dans ma mémoire comme le vrai point de départ de ma carrière hospitalo-universitaire.

A MES COLLEGUES DE BIOTIS. **Murielle**, un grand merci à toi pour ta gentillesse, ton expertise, tes qualités de pédagogue qui m'ont permis d'acquérir en peu de temps de larges connaissances et compétences en biologie cellulaire et bioimpression. Je te suis entièrement reconnaissante des heures passées à travailler ensemble sur notre projet, et je te souhaite de t'épanouir pleinement dans ta vie professionnelle à venir. **Laure, Gaëlle, Mathilde**, merci pour ces soirées filles toujours réconfortantes. Vous avez été un soutien psychologique de première classe ! **Mathieu**, merci pour tes bons conseils, ton humour et

surtout ... viva Style Italiano ! **Yoann**, merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme inaltérables. Merci aussi à tous les étudiants anciens et actuels : **Alice, Simon, Camille, Sindhu, Bruno, Véra, Rawen, Agathe, Joanna, Teddy, Emeline, Nicolas...** Un grand merci également à **Noélie**, pour ta bienveillance et tes conseils, **Sylvain**, pour ta gentillesse et ton aide lors de mes débuts « *in vivo* », et à **Adrien**, pour ton humour, ton talent d'illustrateur et pour m'avoir tolérée dans ton bureau durant mes longues discussions avec Raphaël. Merci à toutes les personnes que je côtoie au laboratoire quotidiennement et qui ont toujours su me conseiller lorsque j'en avais besoin : **Nicolas, Claire, Claudine, Olivier, Béatrice, Jean, Robin, Reine, Delphine, Damien, Sylvie, Betty, Victor, Annie, Sophie, Evelyne**. Et enfin, le meilleur pour la fin, un immense merci à **Patrick**, notre technicien et informaticien hors pair : merci pour ton sourire, ta bonne humeur et ta capacité à me faire des images en 300 dpi plus vite que ton ombre. C'est toujours un bonheur de venir te voir, merci pour tout.

A MES COLLEGUES DE L'ART BIOPRINT. Je vous remercie de m'avoir laissé une petite place dans vos locaux au 3^{ème} étage, la cohabitation avec vous est un vrai plaisir. Un grand merci à **Davit**, pour ta capacité à tout relativiser et pour tes sauvetages multiples de *Novalase*. Sans toi, mon projet de Thèse aurait été beaucoup plus compliqué à mettre en œuvre. Je te souhaite plein de bonnes choses pour le futur. Merci aussi à **Nathalie**, pour ta douceur maternelle, ta bienveillance et ton aide en culture cell ; à **Marie-Laure**, ma « colocataire », pour ton sourire et tes petites attentions ; à **Chantal**, pour ta gentillesse, tes taquineries et tes conseils toujours pertinents ; et enfin, merci à toi **Hugo** pour ton humour, ton expertise, ta rigueur et ta sensibilité.

AUX COLLABORATEURS DE CETTE THESE. **Sylvain** et **Émeline** (UMR5536 CRMSB), c'était un pur bonheur de travailler avec vous. Merci pour votre énergie, votre bonne humeur, et votre rigueur aussi. J'espère sincèrement que nous aurons l'occasion de mener d'autres projets ensemble dans le futur. **Sébastien** (Bordeaux Imaging Center), merci pour ta motivation, ton professionnalisme et ta disponibilité dans les cas d'« extrêmes urgences » en imagerie. Nous aurons très certainement de nouvelles opportunités pour travailler ensemble dans l'avenir. **Jonathan** (UMR5255 ISM), merci de t'être intéressé à mon projet de Thèse, ce sera un plaisir pour moi de poursuivre notre collaboration à l'issue de ma Thèse. **Stéphane Petit** et **Eric Cormier** (UMR5107 CELIA), merci pour votre accueil au sein du CELIA, votre gentillesse et les connaissances plus poussées que vous m'avez permis d'acquérir dans le domaine des lasers. Enfin, un grand merci à **Laëticia Medan** (Animalerie Conventiionnelle, Bordeaux), **Benoit Rousseau** et **Julien Izotte** (Animalerie A2, Bordeaux) ainsi que **Franck Couillaud** et **Coralie Genevois** (EA7435 IMOTION) pour votre accessibilité, vos conseils et votre disponibilité.

A MES ETUDIANTS DE MASTER 1 ET MASTER 2 : **Mathilde, JB, Déborah, Julia, Gauthier**, merci d'avoir partagé mon quotidien au laboratoire, j'espère que vous garderez un bon souvenir de ce stage en immersion.

A LA DIRECTRICE DE L'UFR DES SCIENCES ODONTOLOGIQUES DE BORDEAUX. **Caroline**, je te remercie infiniment de la confiance indéfectible que tu m'accordes depuis le début et pour tes encouragements qui me poussent à me surpasser. Merci pour toute l'énergie et la ténacité dont tu as fait preuve pour soutenir mon dossier. Sois assurée de ma profonde reconnaissance.

AU DEPARTEMENT DENTISTERIE RESTAURATRICE – ENDODONTIE. **Jean-François, Eric, Dominique**, merci de m'avoir accueillie au sein du Département en 2014 et merci de la confiance que vous m'accordez quotidiennement. Un grand merci à tous les AHU anciens (**Terence, Guillaume, Alex, Clément**) et actuels (**Mathilde, Séverine, Wallid, Sophia, Hubert**) pour tous ces moments passés ensemble et qui ont rendu ces quatre années d'Assistanat inoubliables. Enfin, un message plein d'émotion pour **Madame le Docteur Oriez** : je tiens à vous remercier infiniment de m'avoir laissé une chance et fait une place au sein de votre Département en 2014, alors que nous ne nous connaissions pas. Je n'arrive toujours pas à réaliser que vous êtes partie, cela a été si soudain. Je garderai toujours en mémoire votre personnalité inimitable et votre sourire lumineux. Vous nous manquez.

A MES COLLEGUES HOSPITALO-UNIVERSITAIRES : Merci à tous les collègues que je côtoie que ce soit à l'Université, à l'Hôpital ou en dehors : **Audrey, Cédric, Mathilde, Camille, Noëlla, Johan, Aude, Elsa, Florian, Emmanuel, Gonzague, Jean-Baptiste, Cyril, Sylvie, Odile, Michel, Bernard** et tant d'autres... Je prends beaucoup de plaisir à travailler avec vous, merci pour tout ce que vous m'apportez au quotidien, tant sur le plan professionnel qu'humain.

AUX MEMBRES DE L'UFR DES SCIENCES ODONTOLOGIQUES DE BORDEAUX. Pascal, Julien et Eric, merci pour votre gentillesse, votre aide et vos dépannages en urgence en cours de TP. Merci à toute l'équipe de la scolarité, et en particulier un grand merci à toi **Martine**, qui a usé de tant de temps et d'énergie pour toujours réussir à trouver LA solution aux problèmes rencontrés. Merci pour ton sourire, ta bienveillance, ta compétence, qui me rendent souvent la vie plus facile.

A L'UNITE ODONTOLOGIE & SANTE BUCCALE DE XAVIER ARNOZAN. Merci à tout le personnel de l'Unité pour les cinq dernières années passées en votre compagnie. Si je m'épanouis autant dans mon exercice hospitalo-universitaire, c'est aussi grâce à vous qui me permettez de travailler dans un environnement de travail agréable.

A MES ETUDIANTS. Merci à tous mes étudiants qui me confortent chaque jour un peu plus dans la voie professionnelle que j'ai choisi de suivre. Ce sont vos mots ou vos gestes qui m'ont souvent redonné le courage et l'énergie nécessaires pour continuer.

A L'UFR ODONTOLOGIE DE RENNES. Un remerciement particulier à **Madame le Professeur Bonnaure-Mallet** pour avoir cru en moi et pour m'avoir guidée vers la voie hospitalo-universitaire. Merci également à toute l'équipe d'OCE de Rennes (en particulier **Matthieu, Justine** et **Yann-Loïg**) pour m'avoir toujours soutenue et encouragée dans ma transition d'étudiante à enseignante. J'espère que nous aurons l'occasion de mener des projets ensemble dans le futur.

A MES AMIS. Merci à tous mes amis qui me soutiennent dans mon parcours, que ce soit les amis d'enfance (**Audrey, Laura**), de lycée (**Pauline, Hélène, Julie**), des facs dentaire & médecine de Rennes (**Capu, Guital, Hélène, Marion, Marie, Ophélie, Marianne** et bien évidemment toute la « **Duckteam** »). Merci aussi à toutes les rencontres formidables faites sur Bordeaux depuis mon arrivée (**Delphine, Emelyne, Elysia, Rozenn, Aude, Imane, Mathilde, Alex & Jamy, Charley & Chris, Dominique & Stéphane, Divad & Morgane**) sans oublier les collègues BioTis & AHU devenus de vrais amis.

A MA BELLE FAMILLE. **Kokoe, Yann, Cécile & Fabrice**, merci de m'avoir accueillie au sein de votre famille et d'avoir toujours été compréhensifs vis-à-vis de la place importante que prend mon travail dans ma vie. C'est la deuxième Thèse à laquelle vous participez... promis, ce sera la dernière ! Merci de votre soutien inconditionnel.

A MA FAMILLE. **Maman, Julie** et **Papa**, merci de m'avoir toujours soutenue et m'avoir donné le courage nécessaire pour arriver à mes fins. C'est un parcours qui est parfois difficile à comprendre, mais vous avez toujours su que c'est cela qui me permettrait de m'épanouir pleinement dans ma vie professionnelle. J'espère que nous pourrions désormais profiter un peu plus souvent de moments en famille et faire en sorte qu'Eva et Chloé restent des cousines unies. Je vous aime fort.

A MA FILLE. **Eva**, presque 3 ans se sont écoulés depuis ta naissance. Sans le savoir, tu as été l'un de mes plus grands soutiens. Grâce à toi j'ai dû m'obliger à trouver un équilibre entre vie personnelle et professionnelle, et je te remercie pour ça. Merci tout simplement d'être toi, une petite fille pleine de vie, attentionnée et tellement drôle à la fois. A l'heure où je soutiens ma Thèse d'Université, il sera bientôt temps pour toi de faire ta rentrée à l'école. Je te souhaite une vie heureuse et pleine de belles rencontres. Je t'aime fort ma puce.

A MON CONJOINT. **Patrick**, merci de m'avoir soutenue dans tout ce que j'ai entrepris durant ces 10 dernières années. Merci d'avoir toujours cru en moi, avoir su relativiser les choses et me remonter le moral lors des moments de découragements. Merci aussi, *a posteriori*, pour tes (rares) coups de gueule, nécessaires pour me faire prendre conscience que la vie ne se résumait pas au travail. Je te remercie également d'être un papa aussi formidable pour Eva... sans ton implication je n'aurais pas pu en arriver là. Tous les moments passés tous les trois sont de vrais moments de bonheur, et je te promets d'y accorder plus de temps désormais. Je t'aime.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
INTRODUCTION GENERALE	13
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1. REGENERATION OSSEUSE ET VASCULARISATION	18
1.1. Structure et physiologie osseuse	18
1.1.2. Architecture de l'os	18
1.1.3. Composition du tissu osseux.....	20
1.1.4. Remodelage osseux	22
1.1.5. Cicatrisation osseuse	24
1.1.6. Rôle de la vascularisation dans l'homéostasie et la réparation osseuse.....	26
1.2. Thérapeutiques actuelles des pertes de substances osseuses	30
1.2.1. Autogreffes.....	30
1.2.2. Allogreffes	30
1.2.3. Xéno-greffes	31
1.2.4. Substituts synthétiques.....	31
2. INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE	32
2.1. Concepts généraux	32
2.2. Composante cellulaire	34
2.2.1. Cellules à potentiel ostéogénique	34
2.2.2. Cellules à potentiel vasculogénique.....	40
2.3. « Scaffold »	43
2.4. Facteurs de croissance	45
2.5. Pré-vascularisation des produits d'ingénierie tissulaire osseuse	47
2.5.1. Mécanismes physiologiques de la néovascularisation	48
2.5.2. Stratégies de pré-vascularisation utilisées en ingénierie tissulaire osseuse.....	51
3. BIOFABRICATION ET BIOIMPRESSION EN INGENIERIE TISSULAIRE	
57	
3.1. La Fabrication additive : de l'Impression 3D à la Biofabrication	58
3.1.1. Définitions, historique et concept	58
3.1.2. L'Impression 3D ou Prototypage rapide	59
3.1.3. La Biofabrication : Bioimpression et Bio-Assemblage.....	62
3.2. La Bioimpression Assistée par laser	65
3.2.1. Histoire du LIFT.....	65
3.2.2. Principes généraux et physiques des technologies LIFT	69
3.2.3. Matériels et Méthodes pour le LAB.....	72
3.2.4. Le LAB en Ingénierie Tissulaire.....	76
OBJECTIFS	83
RESULTATS	86
1. INFLUENCE DES CELLULES MESENCHYMATEUSES SUR LA PRESERVATION DU MOTIF DE CELLULES ENDOTHELIALES OBTENU PAR BIOIMPRESSION ASSISTEE PAR LASER	87
1.1. Introduction.....	87
1.2. Article I.....	88
1.3. Conclusions	96

2. CREATION D'UN RESEAU MICRO-VASCULAIRE ORGANISE PAR BIOIMPRESSION ASSISTEE PAR LASER <i>IN VITRO</i>.....	97
2.1. Introduction.....	97
2.2. Article II.....	98
2.3. Conclusions.....	111
3. EFFET DE LA PRE-VASCULARISATION ORGANISEE <i>IN SITU</i> PAR BIOIMPRESSION ASSISTEE PAR LASER SUR LA REGENERATION OSSEUSE <i>IN VIVO</i>.....	112
3.1. Introduction.....	112
3.2. Projet d'article III.....	113
3.3. Conclusions.....	134
4. UTILISATION DE L'IRM POUR LE SUIVI DE MOTIFS CELLULAIRES ORGANISES PAR BIOIMPRESSION ASSISTEE PAR LASER.....	135
4.1. Introduction.....	135
4.2. Article IV.....	136
4.3. Conclusions.....	147
<i>CONCLUSIONS & PERSPECTIVES</i>.....	148
<i>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES</i>.....	154
1. PUBLICATIONS.....	155
1.1. Articles dans revues internationales.....	155
1.2. Articles dans revues nationales.....	155
1.3. Chapitres d'ouvrage.....	156
2. COMMUNICATIONS ORALES.....	157
2.1. Communications orales internationales.....	157
2.2. Communications orales nationales.....	158
3. COMMUNICATIONS AFFICHEES.....	159
3.1. Communications affichées internationales.....	159
3.2. Communications affichées nationales.....	160
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>.....	161
<i>ANNEXES</i>.....	179
1. CHAPITRE D'OUVRAGE 1.....	180
2. CHAPITRE D'OUVRAGE 2.....	199

LISTE DES ABBREVIATIONS

- **ABMSC** : Alveolar Bone-derived Mesenchymal Stem Cells
- **AFA-LIFT** : Absorbing Film-Assisted Laser-Induced Forward Transfer
- **ALP** : Alkaline Phosphatase
- **ARIF** : Activation, Résorption, Inversion, Formation
- **BioLP** : Biological Laser Printing
- **BMP** : Bone Morphogenetic Protein
- **BMU** : Basic Multicellular Unit
- **CAMI** : Computer-Assisted Medical Interventions
- **Cx43** : Connexin 43
- **CAD-CAM** : Computer-Aided Design / Computer-Aided Manufacturing
- **DFPC** : Dental Follicle Progenitor Cells
- **DPSC** : Dental Pulp Stem Cells
- **DRL-LIFT** : Dynamic-Release Layer Laser-Induced Forward Transfer
- **EPC** : Endothelial Progenitor Cells
- **ESC** : Embryonic Stem Cells
- **FDM** : Fused Deposition Modeling
- **FGF** : Fibroblast Growth Factor
- **GMSC** : Gingival Mesenchymal Stem Cells
- **HA** : Hydroxyapatite
- **HBMSC** : Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
- **HOB** : Human Osteoblasts
- **HSC** : Hematopoietic Stem Cells
- **HUVEC** : Human Umbilical Vein Endothelial Cells
- **IGF** : Insulin Growth Factor
- **IL** : Interleukin
- **iPSC** : Induced Pluripotent Stem Cells
- **IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique
- **LAB** : Laser-Assisted Bioprinting
- **LGDW** : Laser-Guided Direct Writing
- **LIFT** : Laser-Induced Forward Transfer
- **M-CSF** : Macrophage Colony-Stimulating Factor
- **MAPLE** : Matrix-Assisted Pulsed-Laser Evaporation
- **MAPLE-DW** : Matrix-Assisted Pulsed-Laser Evaporation Direct-Writing
- **MEC** : Matrice Extra-Cellulaire
- **MMP** : Matrix Metalloproteinase

- **MSC** : Mesenchymal Stem Cells
- **nHA** : nano Hydroxyapatite
- **PAI** : Plasminogen Activator Inhibitor
- **PCL** : Polycaprolactone
- **PDGF** : Platelet-Derived Growth Factor
- **PDLSC** : Periodontal Ligament Stem Cells
- **PEG** : Polyethylene Glycol
- **PGA** : Polyglycolic Acid
- **PLD** : Pulsed-Laser Deposition
- **PLGA** : Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)
- **PLLA** : Poly (L-Lactic Acid)
- **PTH** : Parathyroid Hormon
- **RANK-L** : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B - Ligand
- **RFP** : Red Fluorescent Protein
- **SCAP** : Stem Cells from the Apical part of the human dental Papilla
- **SHED** : Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth
- **Shh** : Sonic hedgehog
- **SLA** : Stereolithography Apparatus
- **SLS** : Selective Laser Sintering
- **TCP** : Tricalcium Phosphate
- **TGF- β** : Transforming Growth Factor-beta
- **TGPC** : Tooth Germ Progenitor Cells
- **TIMP** : Tissue Inhibitor Metalloproteinase
- **TNF- α** : Tumor Necrosis Factor-alpha
- **TRI** : Time-Resolved Imaging
- **UV** : Ultraviolet
- **VE-Cadherin** : Vascular Endothelial-Cadherin
- **VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor
- **Wnt** : Wingless integration site

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : ORGANISATION DE L'OS CORTICAL.....	19
FIGURE 2 : STRUCTURE ET ORGANISATION DES OS LONGS	20
FIGURE 3 : ROLE DES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES OSSEUSES AU SEIN DU CYCLE DE REMODELAGE OSSEUX.....	21
FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CASCADES DE DIFFERENCIATION IMPLIQUEES DANS LE PROCESSUS DE REMODELAGE OSSEUX	23
FIGURE 5 : CHRONOLOGIE DE LA CICATRISATION OSSEUSE	25
FIGURE 6 : LA VASCULARISATION DU TISSU OSSEUX	27
FIGURE 7 : FACTEURS SOLUBLES IMPLIQUES DANS LA COMMUNICATION ENTRE CELLULES OSTEOBLASTIQUES ET ENDOTHELIALES	29
FIGURE 8 : PRINCIPE GENERAL DE L'INGENIERIE TISSULAIRE	33
FIGURE 9 : UTILISATION DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES POUR LA REGENERATION OSSEUSE IN VIVO	37
FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES SOURCES DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DERIVEES DES TISSUS DENTAIRES	38
FIGURE 11 : DIFFERENCIATION OSTEOBLASTIQUE DES SCAPs EN MILIEU OSTEOINDUCTEUR.....	39
FIGURE 12 : STRUCTURE HISTOLOGIQUE D'UN VAISSEAU	40
FIGURE 13 : MARQUEURS CONSTITUTIFS DES CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES	41
FIGURE 14 : VUE D'ENSEMBLE DE LA STRUCTURE EN TRIPLE HELICE DU COLLAGENE	44
FIGURE 15 : ILLUSTRATION DU CONCEPT DE DISTANCE CRITIQUE DE LA VASCULARISATION AU SEIN DES SUBSTITUTS D'INGENIERIE TISSULAIRE	47
FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VASCULOGENESE ET DE L'ANGIOGENESE	48
FIGURE 17 : ILLUSTRATION DE L'ANGIOGENESE PAR INTUSSUSCEPTION VERSUS ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT.....	49
FIGURE 18 : MOLECULES IMPLIQUEES DANS LES DIFFERENTES ETAPES DE L'ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT.....	50
FIGURE 19 : LES DIFFERENTES STRATEGIES POUR AMELIORER LA VASCULARISATION EN INGENIERIE TISSULAIRE	52
FIGURE 20 : EXPRESSION DE LA CONNEXINE 43 AU SEIN D'UNE COCULTURE HUVEC/HBMSC	54
FIGURE 21 : ILLUSTRATION DES APPROCHES "TOP-DOWN" ET "BOTTOM-UP" EN INGENIERIE TISSULAIRE	59
FIGURE 22 : PLANIFICATION D'UNE CHIRURGIE ORTHOGNATIQUE ET REALISATION DE PLAQUES D'OSTEOSYNTHESE SUR MESURE PAR STEREO LITHOGRAPHIE.....	60

FIGURE 23 : DISPOSITIF DE PROTOTYPAGE RAPIDE PAR IMPRESSION	61
FIGURE 24 : PRODUCTION DE SCAFFOLDS DE DIFFERENTES POROSITES PAR FUSED DEPOSITION MODELING	61
FIGURE 25 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROCEDE DE BIO-ASSEMBLAGE	63
FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES TROIS PRINCIPALES TECHNOLOGIES UTILISEES EN BIOIMPRESSON	64
FIGURE 27 : BIOIMPRESSON D'UN CONDUIT AORTIQUE AVEC VALVE PAR EXTRUSION	65
FIGURE 28 : PREMIERES EXPERIMENTATIONS UTILISANT LA PROCEDURE DE "LIFT"	66
FIGURE 29 : PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES TECHNOLOGIES DE BIOIMPRESSON LASER	68
FIGURE 30 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PRINCIPE GENERAL DES DIFFERENTES TECHNOLOGIES DE BIOIMPRESSON LASER	69
FIGURE 31 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DISPOSITIF LAB ET OBSERVATION MICROSCOPIQUE D'UN MOTIF BIOIMPRIME PAR LAB	70
FIGURE 32 : IMAGES RESOLUES EN TEMPS DE LA FORMATION DU JET PAR LE PROCEDE LIFT	70
FIGURE 33 : REGIMES DE JET EN FONCTION DE L'ENERGIE DU LASER ET DE LA VISCOSITE DE LA BIOENCRE	71
FIGURE 34: ILLUSTRATION DU PROCEDE DE BIOIMPRESSON ASSISTEE PAR LASER.....	72
FIGURE 35 : ÉTALEMENT MANUEL DE LA BIOENCRE A L'AIDE D'UNE PIPETTE	74
FIGURE 36 : STATION DE BIOIMPRESSON NOVALASE - BioTis	75
FIGURE 37 : ENSEMBLE DES PARAMETRES IMPLIQUES DANS LA BIOIMPRESSON ASSISTEE PAR LASER.	76
FIGURE 38 : ORGANISATION D'HUVEC ET HUVSMC PAR BIOIMPRESSON ASSISTEE PAR LASER SELON UN MOTIF DE TYPE « BRANCH/STEM STRUCTURES »	79
FIGURE 39 : PRINCIPE DE LA BIOIMPRESSON IN SITU/IN VIVO.....	81
FIGURE 40 : OBJECTIFS INTERCONNECTES DU TRAVAIL DE THESE	85
FIGURE 41 : SYNTHESE DES RESULTATS DU TRAVAIL DE THESE.....	150

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies induisant des pertes de tissu osseux, comme les ostéosarcomes ou l'ostéoporose, touchent un nombre croissant de personnes dans le monde et constituent un problème de santé publique majeur. A l'échelle mondiale, plus de deux millions de greffes osseuses sont réalisées annuellement afin de combler des défauts osseux en chirurgie orthopédique, neurochirurgie et chirurgie dentaire. Les solutions thérapeutiques actuelles s'articulent essentiellement autour de l'utilisation de greffons d'origine humaine, animale ou synthétique. L'autogreffe reste actuellement le « gold standard » comme matériau de comblement. Si l'os autogène représente le matériau « idéal », il n'est disponible qu'en quantité limitée et cette approche peut être à l'origine d'infections, de douleurs et de comorbidité sur le site donneur. Les risques majeurs relatifs à l'utilisation des allogreffes et des xénogreffes sont le rejet du transplant et la transmission d'agents pathogènes. Enfin, malgré les bons résultats des matériaux synthétiques employés en clinique, leur manque de propriétés biologiques reste un inconvénient majeur à leur utilisation et illustre les limites actuelles de ces substituts pour la régénération osseuse. Une des difficultés majeures est de reproduire l'architecture des tissus, tant au niveau macroscopique (forme générale) que microscopique (organisation tridimensionnelle des cellules et autres composants du tissu). La possibilité de générer de nouveaux substituts osseux implantables, aux propriétés optimisées, est ainsi un enjeu majeur et un besoin clinique réel.

L'une des améliorations à apporter à ces substituts consiste à favoriser leur vascularisation rapide après implantation afin de promouvoir leur intégration et limiter le risque de nécrose. La vascularisation induite des matériaux implantés est un point clé en ingénierie tissulaire osseuse. A ce jour, les produits cliniquement viables obtenus par ingénierie tissulaire sont limités à des tissus de faible épaisseur et peu ou pas vascularisés tels que la peau et le cartilage. Les greffons plus volumineux s'avèrent être insuffisamment vascularisés, aboutissant à un échange réduit de nutriments et d'oxygène, entraînant une nécrose cellulaire et donc un échec de la greffe. Dans le but de pallier ces limitations et de générer des substituts osseux de taille importante et implantables chez les patients, les recherches actuelles s'orientent vers la création *in vitro* de structures vasculaires biomimétiques pour les nouvelles thérapies régénératives.

Afin de mieux contrôler l'assemblage en trois dimensions des différents éléments constitutifs des produits d'ingénierie tissulaire, de nombreuses technologies ont émergé durant ces dernières décennies dans le domaine de la Biofabrication. En parallèle des approches d'ingénierie tissulaire basées sur l'utilisation d'une matrice (« scaffold »), les

avancées technologiques dans les domaines de l'automatisation, la miniaturisation et la conception assistée par ordinateur ont conduit au développement de la Bioimpression. Son principe consiste à organiser les composants du tissu par un dépôt couche-par-couche grâce à l'utilisation d'imprimantes biologiques. L'avantage de ces procédures automatisées est qu'elles permettent un meilleur contrôle de la distribution des cellules dans les structures tridimensionnelles, minimisent les problèmes de contamination et réduisent le temps d'obtention d'une construction fonctionnelle. Parallèlement à l'impression jet d'encre et la microextrusion, la Bioimpression Assistée par Laser (LAB) connaît un essor considérable et présente des atouts majeurs tels qu'une grande vitesse d'écriture, une viabilité des cellules élevée, une haute résolution et la possibilité d'utilisation de fortes densités cellulaires.

La station de bioimpression *Novalase* développée par l'Unité Mixte de Recherche 1026 – INSERM/Université de Bordeaux – BioTis, basée sur un laser nanoseconde, permet l'impression de cellules vivantes *in vitro*, de manière sécurisée et sous le contrôle d'un processus automatisé. Elle permet également d'imprimer des biomatériaux avec une résolution micrométrique. Des expérimentations menées au laboratoire ont aussi démontré la faisabilité de l'impression *in vivo*, et son intérêt dans la régénération osseuse guidée *in situ* par l'impression de cellules associées à des biomatériaux. Les résultats présentaient cependant une grande hétérogénéité et nous avons émis l'hypothèse que cette hétérogénéité était liée à un défaut de vascularisation précoce.

Basé sur les résultats précédemment obtenus, ce travail a été mis au point afin d'évaluer l'effet de l'organisation de la pré-vascularisation sur la régénération osseuse dans un modèle *in vivo*.

Ce manuscrit s'articule en quatre parties :

- La première partie consiste en une revue de la bibliographie portant sur le processus de régénération osseuse et la vascularisation du tissu osseux, avant de décrire les concepts d'ingénierie tissulaire, de biofabrication et de bioimpression.
- La deuxième partie de ce manuscrit expose l'objectif général de cette thèse ainsi que les objectifs secondaires.
- La troisième partie présente les résultats obtenus dans le cadre des travaux de recherche organisés sous forme de publications scientifiques : trois articles publiés et un article soumis. Le premier article (publié) évalue l'effet de la présence de cellules

souches mésenchymateuses sur la préservation du motif de cellules endothéliales organisé par bioimpression assistée par laser. Le second article (publié) détermine les paramètres d'impression, densités cellulaires et conditions de recouvrement optimaux pour la formation des réseaux capillaires organisés *in vitro*. Le troisième article (soumis) expose les résultats obtenus *in vivo* après bioimpression *in situ* de cellules endothéliales au niveau de défauts osseux critiques de calvaria chez la souris. Le dernier article (publié) propose une nouvelle technique pour suivre les motifs cellulaires imprimés *in vivo* chez la souris grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

- La dernière partie correspond à une conclusion générale sur les travaux menés et résultats obtenus. Elle détaille également les nouvelles perspectives de travail envisagées.

Ces travaux ont été soutenus par la « **Fondation de l'Avenir** » (N°AP-RM-17-038) ainsi que la « **Fondation des Gueules Cassées** » (N°54-2017).

Le projet *in vivo*, intitulé « Etude de la régénération osseuse en présence d'un réseau vasculaire organisé *in situ* par bioimpression assistée par laser », a été évalué sur le plan éthique par le Comité d'éthique en expérimentation animale N°050 (Bordeaux) et a reçu un avis favorable, en date du 14 février 2017 (Réf. **APAFIS#8442-201701051243776-v2**). L'autorisation de projet a été notifiée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation en date du 25 septembre 2017.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. REGENERATION OSSEUSE ET VASCULARISATION

La connaissance de l'anatomie et de la physiologie du tissu osseux ainsi qu'une compréhension des mécanismes de formation et de réparation tissulaire permettent la mise en place de stratégies d'ingénierie tissulaire pour la régénération osseuse.

1.1. Structure et physiologie osseuse

1.1.1. Définition et fonctions du tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif hautement spécialisé qui possède trois grandes fonctions :

- Une fonction biomécanique et protectrice des organes : il assure le mouvement et la locomotion (rôle dynamique) ainsi que le soutien de l'organisme et la protection des organes vitaux et du système nerveux (rôle statique)
- Une fonction métabolique : il participe au contrôle et au maintien de l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme, *via* son remodelage permanent qui entraîne le stockage ou la libération de sels minéraux
- Une fonction hématopoïétique : la moelle osseuse hématopoïétique héberge la production des trois lignées des cellules du sang^{1,2}.

Le squelette humain est composé de 206 os, représentant environ 1/5^{ème} du poids du corporel. Ces os présentent des formes et tailles variables selon leur fonction et leur situation. Ils peuvent être classés en quatre catégories : os longs (ex. humérus, tibia), os courts (ex. phalanges, tarse et carpe), os plats (ex. os du crâne, sternum), et os irréguliers (ex. vertèbres, coccyx). Malgré ces caractéristiques et formes diverses, la microarchitecture de l'os reste relativement constante.

1.1.2. Architecture de l'os

L'os est constitué d'une couche externe, correspondant à l'os cortical ou « os compact », et une couche interne, correspondant à l'os trabéculaire ou « os spongieux ».

L'os cortical représente environ 80% du total de la masse osseuse chez l'adulte³. Il est composé principalement d'unités fonctionnelles appelées « ostéons », composés de lamelles cylindriques organisées en cercles concentriques autour des canaux haversiens centraux abritant les nerfs et vaisseaux sanguins⁴. L'os cortical présente une densité extrêmement importante, une faible porosité (20%) ainsi qu'une résistance mécanique élevée (130-190 MPa) en lien avec l'organisation structurée des fibres de collagène au sein de chaque unité fonctionnelle⁵. Entre les lamelles osseuses se situent les ostéocytes. Les canaux haversiens centraux sont reliés entre eux par des canaux transversaux ou obliques, permettant l'irrigation du tissu osseux par les vaisseaux sanguins : les canaux de Volkmann (Figure 1).

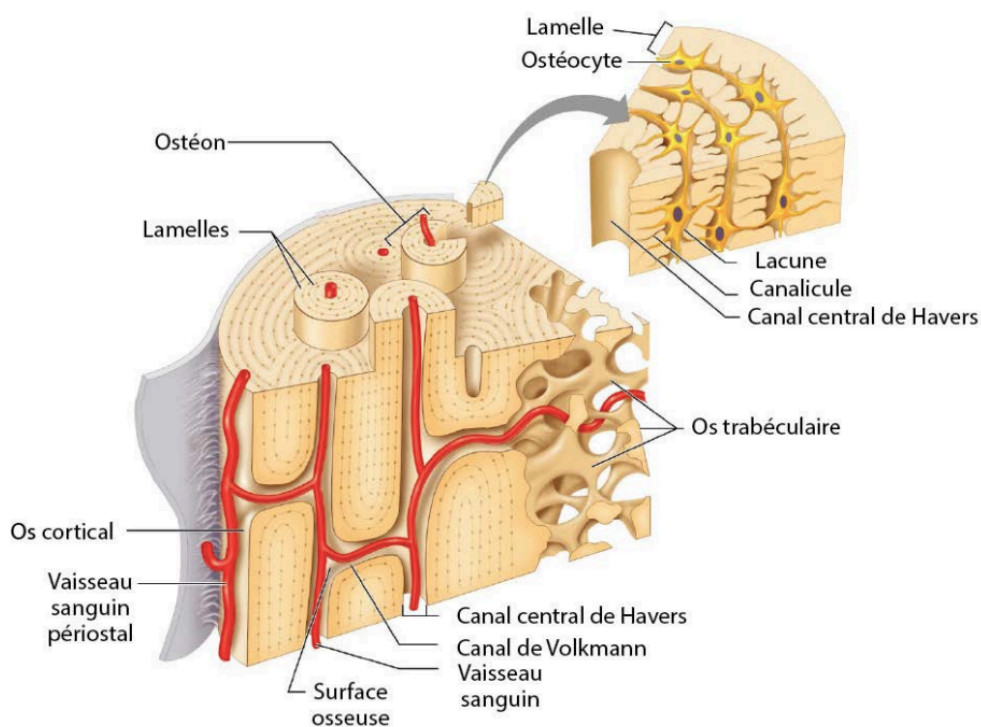


FIGURE 1 : ORGANISATION DE L'OS CORTICAL
D'après Marieb⁶

L'os spongieux constitue les 20% restants de la masse osseuse totale. Constitué d'un enchevêtrement tridimensionnel de trabécules osseuses ramifiées et anastomosées, il est caractérisé par sa haute porosité (50-90%) permettant une meilleure pénétration de la vascularisation⁷ (Figure 2). Sa résistance mécanique est d'environ 10% de celle de l'os cortical³.

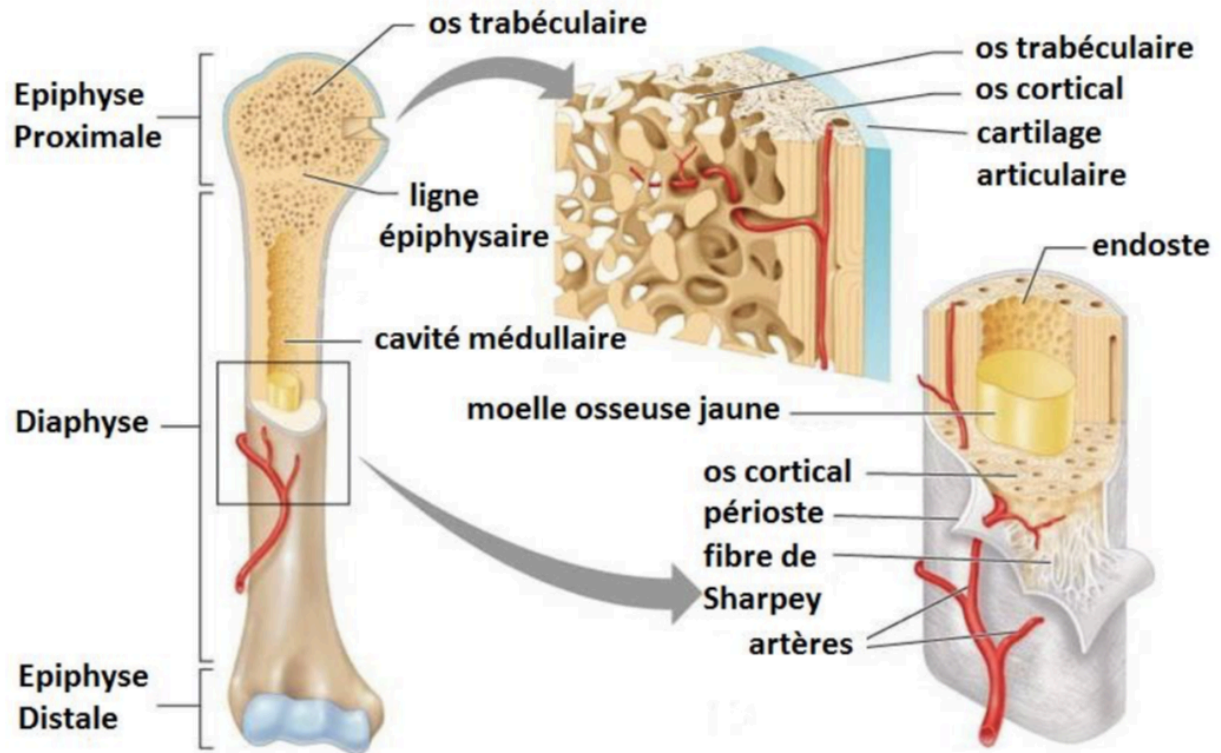


FIGURE 2 : STRUCTURE ET ORGANISATION DES OS LONGS
D'après Marieb ⁶

Malgré les structures très différentes de l'os cortical et spongieux, ces derniers présentent une composition similaire basée sur la présence d'une matrice extracellulaire et de cellules spécifiques. Ces différents éléments permettent la formation du tissu osseux mais aussi son remodelage tout au long de la vie.

1.1.3. Composition du tissu osseux

L'os est un matériau composite constitué à 65% d'une partie minérale, principalement de l'hydroxyapatite [HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], et à 35% d'une matrice organique (collagène de type I et autres protéines non collagéniques, facteurs de croissance, cellules osseuses et eau)⁸.

La matrice extra-cellulaire (MEC) inorganique constitue un réservoir pour l'homéostasie des ions (calcium, phosphate, ...) et confère à l'os sa rigidité et sa résistance mécanique, tandis que la phase organique lui fournit des propriétés mécaniques telles que la ductilité

et la résistance à la fracture. Les facteurs de croissance et cytokines contenus dans la matrice organique sont des éléments essentiels pour le processus de remodelage osseux.

Malgré son apparence inerte, l'os est un tissu dynamique en perpétuel remaniement, caractérisé par l'alternance de phénomènes de résorption et de néoformation. Ce remodelage permanent permet une adaptation et une modification de la structure du tissu osseux en réponse aux contraintes mécaniques et stimuli biochimiques environnants.

L'os contient quatre types cellulaires : les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes et les ostéoclastes^{9,10}. Ces cellules proviennent de cellules progénitrices : les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) et les cellules souches hématopoïétiques (HSCs). Chaque type cellulaire est acteur dans le processus de remodelage osseux et apporte sa contribution à des étapes définies du cycle « ARIF » (Activation, Résorption, Inversion, Formation) (Figure 3).

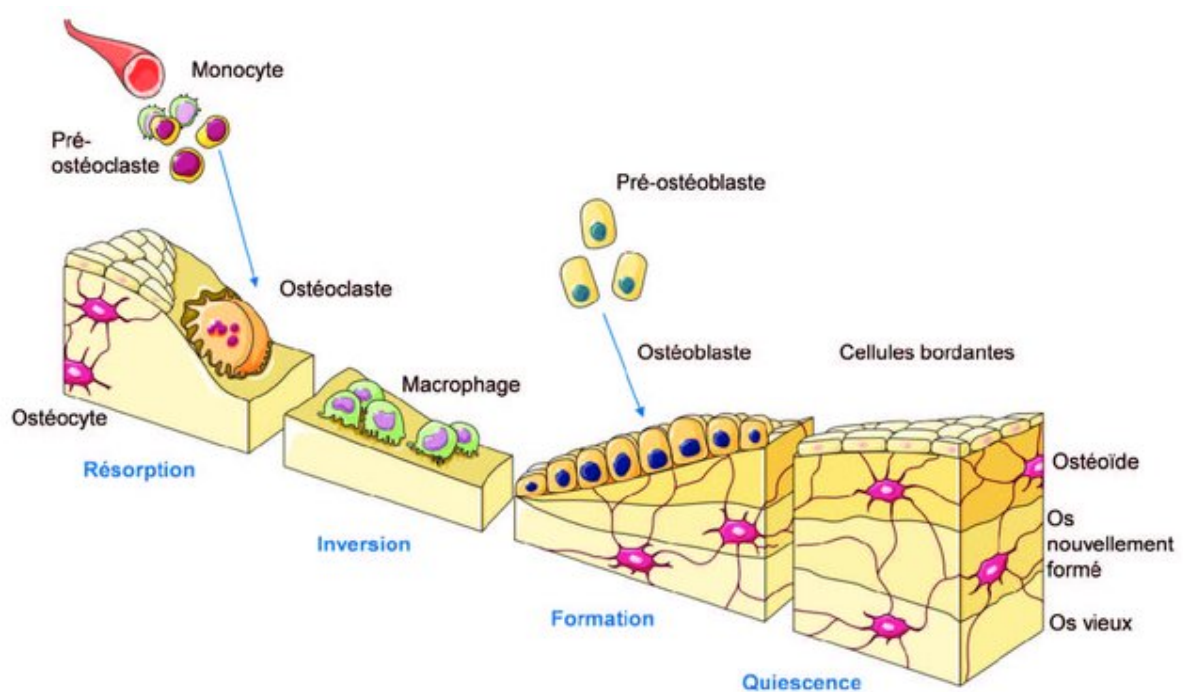


FIGURE 3 : RÔLE DES DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES OSSEUSES AU SEIN DU CYCLE DE REMODELAGE OSSEUX

Courtoisie banque d'images Servier®

Les ostéoblastes sont connus pour être responsables de la synthèse de la nouvelle MEC osseuse, et donc impliqués dans le processus de néoformation osseuse. Les ostéocytes sont des ostéoblastes quiescents. Des études les présentent comme mécano senseurs et

orchestrateurs de ce processus de remodelage osseux¹¹⁻¹³. Les cellules bordantes, qui sont également des ostéoblastes quiescents, jouent un rôle important dans le couplage résorption/formation¹⁴. Ces cellules recouvrent la matrice osseuse, la protégeant ainsi de l'action des ostéoclastes. Lorsqu'elles se rétractent, les ostéoblastes peuvent alors accéder à la matrice et enclencher le processus de résorption. Sous l'action de différents stimuli, comme la parathormone (PTH), les cellules bordantes peuvent aussi exercer le rôle d'ostéoblastes. Les ostéoclastes, eux, sont dérivés de précurseurs mononucléaires apparentés à la lignée monocytaire et sont responsables de la résorption du tissu osseux.

Chacun des composants du tissu osseux joue ainsi un rôle précis dans le phénomène de remodelage osseux.

1.1.4. Remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus dynamique nécessaire pour le maintien de l'architecture de l'os en réponse aux contraintes mécaniques environnantes. C'est aussi un processus indispensable suite à une lésion, puisqu'il permet la réparation du tissu osseux¹⁵. Il permet également de garantir le contrôle de l'homéostasie minérale. Le remodelage osseux repose sur un équilibre dynamique entre les phénomènes de résorption et la formation osseuse^{16,17}.

Le remodelage osseux est une série d'évènements biologiques parfaitement orchestrés qui sont régulés par des interactions complexes entre les différents types cellulaires trouvés dans l'os. Comme décrit précédemment, chaque cellule a un rôle spécifique dans le processus de remodelage osseux. Le processus de remodelage est orchestré par deux types cellulaires principaux : les ostéoclastes, spécialisés pour la résorption osseuse, et les ostéoblastes, responsables de la formation osseuse, qui s'arrangent entre eux au sein d'une structure anatomique appelée « basic multicellular unit » (BMU)¹⁸. Le processus de remodelage osseux se décompose en quatre stades (activation, résorption, inversion, formation) suivis d'une phase de quiescence. Il implique toute une série de cascades de différenciation cellulaire à l'origine des processus de résorption et de formation osseuse (Figure 4).

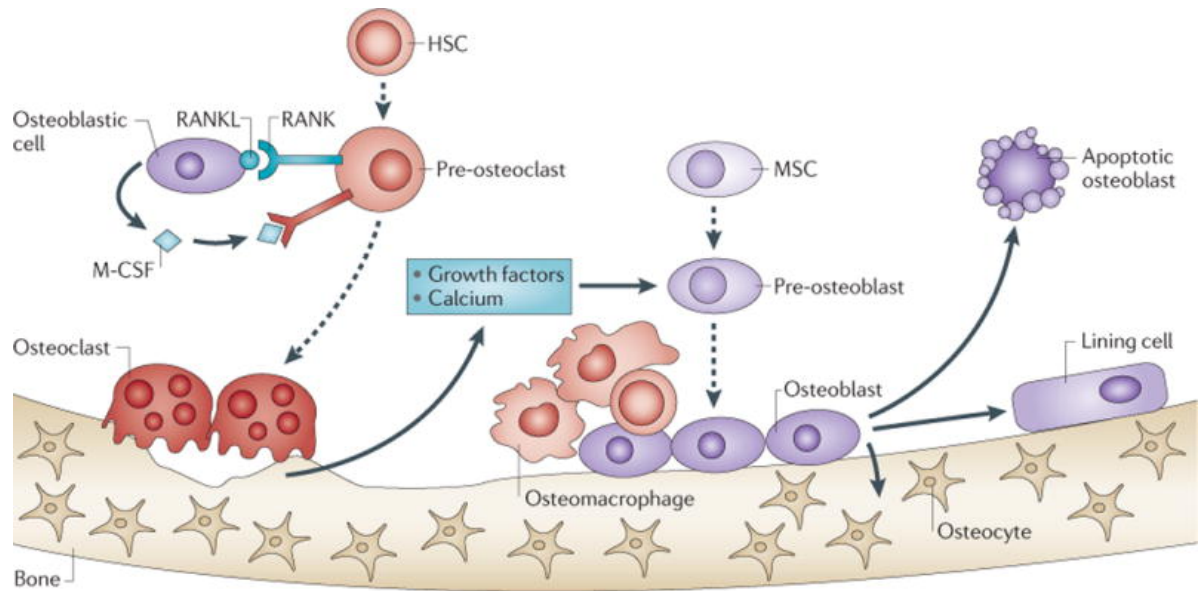


FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CASCADES DE DIFFERENCIATION IMPLIQUEES DANS LE PROCESSUS DE REMODELAGE OSSEUX

D'après Weilbaeher *et al.* ¹⁹

La phase d'activation est la première étape du cycle de remodelage osseux. Des signaux biochimiques ou mécaniques entraînent la libération de cytokines (ex. RANK-L, M-CSF) par les ostéoblastes jusqu'alors quiescents (ostéocytes ou cellules bordantes). Ces facteurs permettent le recrutement et l'activation des précurseurs ostéoclastiques, initiant la phase de résorption osseuse^{20,21}.

Une fois fixés à la surface de l'os, les ostéoclastes secrètent des ions hydrogène et des phosphatases acides entraînant une diminution du pH au sein d'un compartiment appelé « lacune de résorption », responsable de la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite. La libération des minéraux (Calcium et Phosphore) induit la sécrétion d'enzymes telles que les métalloprotéinases matricielles et les cathepsines, à l'origine de la digestion des composants organiques de la matrice osseuse²². Après cette phase, les ostéoclastes reçoivent des signaux inhibiteurs (ex. IGF-1 ou TGF- β) et entrent en apoptose.

S'en suit alors la phase d'inversion ou de réversion, durant laquelle les ostéoclastes sont remplacés par des cellules mononucléées qui se différencient en macrophages et éliminent les débris restants de la matrice osseuse, permettant à la formation osseuse de débuter²³.

Lors de la phase de formation, les pré-ostéoblastes sont recrutés et se différencient en ostéoblastes. Ils comblent progressivement la lacune de résorption en déposant une

matrice collagénique non minéralisée appelée tissu ostéoïde, qui se minéralisera dans un second temps. Les ostéoblastes continuent à déposer du nouvel os jusqu'à reposer sous la forme d'une couche cellulaire unique au-dessus de la matrice minéralisée nouvellement formée. A ce stade, certains ostéoblastes vont entrer en apoptose tandis que d'autres seront englobés dans la matrice nouvellement formée sous forme d'ostéocytes²⁴.

Lorsque le volume d'os formé devient équivalent à celui résorbé, le processus de remodelage s'arrête. Les ostéoblastes et ostéoclastes fonctionnent comme une unité, entraînant un lien étroit entre les processus de résorption et de formation. Ce couplage permet d'assurer que là où l'os est résorbé, le nouvel os sera produit¹⁶.

1.1.5. Cicatrisation osseuse

En cas de lésion tissulaire, un phénomène de cicatrisation osseuse se met en place impliquant des cellules progénitrices, des cellules de l'inflammation, des cellules endothéliales et hématopoïétiques²⁵. Ce processus se déroule en trois phases : la phase inflammatoire initiale (Figure 5A), la phase de réparation (Figure 5B-C) et le remodelage final (Figure 5D)²⁶.

Ces différentes phases sont permises par une intervention organisée des différents types cellulaires, régulée par leur interaction avec des facteurs biochimiques, physiques et mécaniques²⁷. Ces étapes miment les événements à l'origine du développement osseux enchondral tels qu'ils se déroulent lors de l'embryogenèse²⁷.

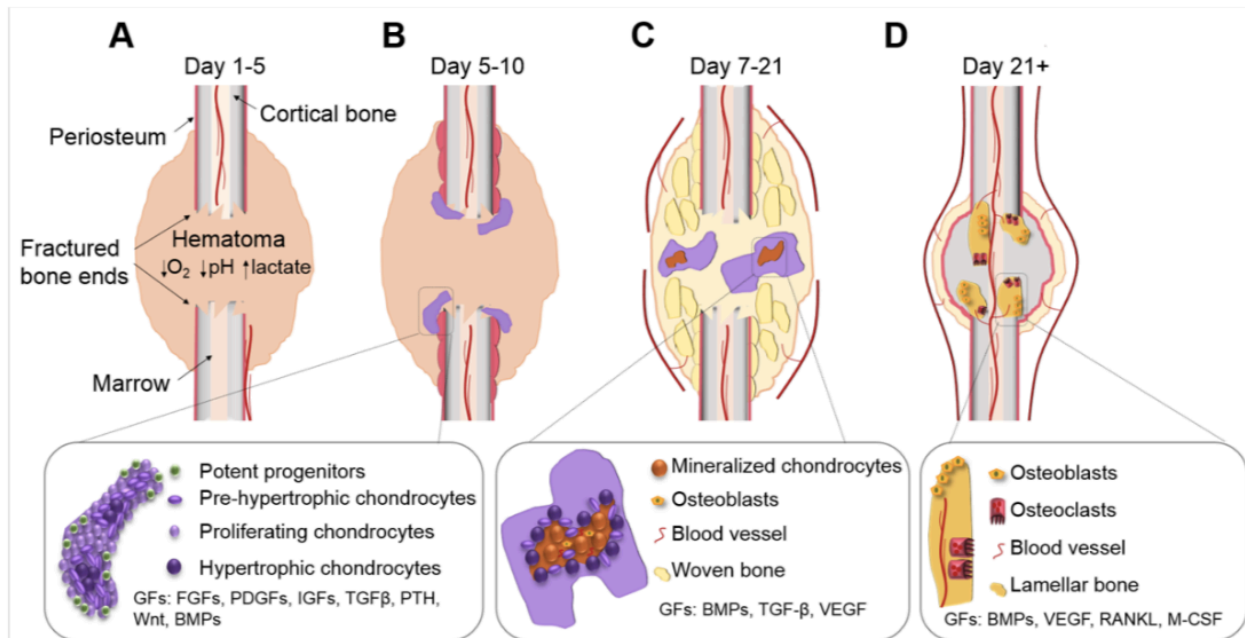


FIGURE 5 : CHRONOLOGIE DE LA CICATRISATION OSSEUSE
 D'après Ho-Shui-Ling *et al.* ²⁵

La phase inflammatoire débute par la formation d'un caillot sanguin (hématome). Cet hématome constitue une source de molécules de signalisation (ex. IGF-1, PDGF), lesquelles ont la capacité d'initier des cascades d'évènements cellulaires critiques pour la cicatrisation osseuse. La libération de facteurs de croissance et cytokines permet le recrutement des macrophages ainsi que des monocytes et lymphocytes. Ensuite, les cellules immunitaires recrutées sécrètent elles-mêmes différentes molécules (FGF, TNF- α , VEGF, TGF- β , IL-1, IL-6) qui stimulent la synthèse de MEC et l'angiogenèse. Ces cytokines présentent également un effet chimiotactique sur les cellules de l'immunité et les cellules mésenchymateuses circulantes. S'en suit alors la formation d'un tissu de granulation, avec un développement de la vascularisation, une activation des macrophages, une élimination des tissus endommagés et une différenciation des cellules mésenchymateuses en fibroblastes, chondroblastes ou ostéoblastes²⁸.

Lors de la phase de réparation, le tissu conjonctivo-vasculaire évolue en une structure plus organisée appelée « cal ». Cette phase correspond ainsi au processus d'ostéogenèse, avec deux types d'ossification possibles. L'ossification endochondrale est caractérisée par la formation d'un cal cartilagineux déposé par les chondroblastes, qui se calcifie et se vascularise dans un second temps, et progressivement remplacé par le nouveau tissu osseux. L'ossification membraneuse correspond à la synthèse directe d'os compact et

trabéculaire, sans phase intermédiaire de cal cartilagineux. Elle se limite principalement aux régions sous-périostées, où le réseau capillaire est resté fonctionnel^{28,29}.

Durant la phase de remodelage, le tissu osseux nouvellement formé (os immature) est remplacé par du tissu osseux « définitif » (os lamellaire) sous l'action des BMU, avec une alternance de phases de résorption par les ostéoclastes et de formation par les ostéoblastes. Cette phase permet également de restaurer un apport vasculaire normal. Ce processus de remodelage peut prendre plusieurs mois²⁵.

1.1.6. Rôle de la vascularisation dans l'homéostasie et la réparation osseuse

La vascularisation osseuse est un élément crucial pour le développement et la croissance de l'os, ainsi que pour permettre les processus de remodelage osseux et de cicatrisation osseuse^{30,31}. Le tissu osseux est extrêmement bien vascularisé, avec un débit sanguin intra-osseux pouvant atteindre 5 à 20 mL par 100g d'os³². Cette vascularisation est permise grâce à la présence d'artères (diaphysaires, métaphysaires et épiphysaires, périostées) et de veines.

Trois types d'artères assurent la vascularisation des os longs :

- L'artère nourricière, qui se ramifie en artère médullaire ascendante et descendante dans la cavité médullaire, et qui assure la quasi-totalité de la vascularisation de la diaphyse ;
- Les artères épiphysio-métaphysaires qui pénètrent dans l'os métaphysaire (entre la diaphyse et la ligne épiphysaire), s'anastomosent au niveau capillaire avec l'artère nourricière, et qui irriguent l'os spongieux ;
- Les artères périostées, qui assurent la nutrition de la partie externe de l'os compact. Elles s'anastomosent également avec les terminaisons des artères médullaires de la partie corticale (Figure 6).

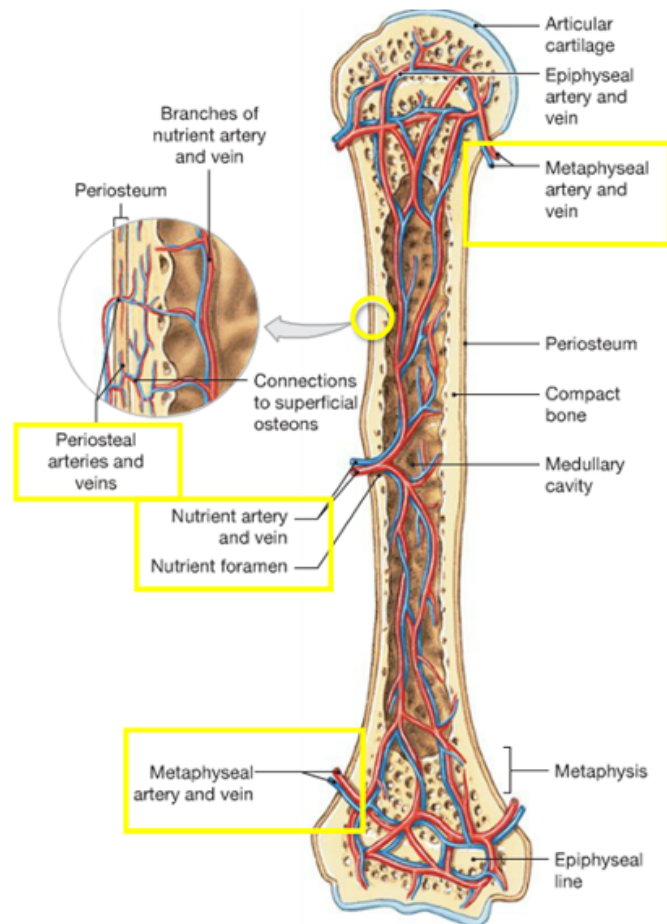


FIGURE 6 : LA VASCULARISATION DU TISSU OSSEUX
D'après le site internet www.easynotecards.com ³³

La vascularisation des autres types d'os, par exemple les os plats et courts, est semblable aux réseaux de type épiphysio-métaphysaire.

En ce qui concerne le système veineux, de nombreuses veines épiphysio-métaphysaires assurent la vascularisation des épiphyses et métaphyses, tandis que le tiers interne de l'os cortical est vascularisé par une veine centro-médullaire. Il existe également de nombreuses veines issues du périoste qui rejoignent les veines musculaires. L'ensemble de ce système est entièrement anastomosé.

Le système capillaire, lui, est composé de vaisseaux de faible diamètre traversant le système haversien de l'os cortical. Le périoste contient lui aussi de nombreux capillaires alimentés par les muscles adjacents.

La vascularisation joue un rôle majeur dans la physiologie du tissu osseux. Elle permet l'apport en nutriments et en oxygène, et également l'élimination des déchets. Les activités

métaboliques et hématopoïétiques de l'os sont étroitement liées à la vascularisation, de même que les processus de remodelage et de néoformation osseuse³². De plus, la teneur en oxygène est cruciale puisqu'elle influe directement sur la différenciation des cellules souches, soit en cellules chondroblastiques si la teneur en oxygène est basse, ou en cellules ostéoblastiques si la teneur est élevée.

Le rôle critique de la vascularisation osseuse est notamment mis en évidence lors de pathologies causées par un défaut ou l'absence de vascularisation, comme l'ostéoporose ou l'ostéonécrose³¹. Au-delà d'une perturbation de la formation et/ou de la croissance du tissu osseux, de sévères perturbations hémodynamiques peuvent être retrouvées (ex. maladie de Paget)³⁴. Le tissu osseux et les vaisseaux sanguins semblent ainsi avoir une relation très étroite. Par ailleurs, dans le cas de pertes de substances, une vascularisation déficiente peut engendrer une absence de cicatrisation³¹. Ce déficit peut être lié au traumatisme initial, lorsqu'il y a eu lésion importante des artères nourricières ou métaphysaires, ou consécutif à une chimiothérapie ou une radiothérapie.

De nombreuses études ont montré que les processus de formation osseuse s'accompagnent d'une augmentation du nombre de vaisseaux, du débit sanguin et de la formation de néo vaisseaux. Lors de l'ostéogénèse ou du remodelage osseux, les cellules du tissu osseux et celles du tissu vasculaire communiquent entre elles *via* la néo-vascularisation. Les cellules ostéoblastiques et endothéliales travaillent en synergie pour permettre la formation d'un tissu osseux fonctionnel et vascularisé. D'une part, les ostéoblastes stimulent la formation de nouveaux vaisseaux, et réciproquement les cellules endothéliales permettent de stimuler la régénération osseuse³⁰.

Cette communication ostéo-endothéliale se fait à plusieurs niveaux :

- Par des contacts indirects de façon paracrine ou autocrine à l'aide de facteurs solubles³⁵, tels que VEGF, TGF- β , BMPs ou encore les prostaglandines (Figure 7).
- Par des contacts directs à l'aide de jonctions communicantes (jonctions « gap ») par le biais de connexines³⁶ ou de jonctions adhérentes *via* l'existence de cadhérines^{35,37}. La connexine 43 (Cx43) est la principale forme de connexine observée à la fois dans les cellules ostéoblastiques et endothéliales. Elle joue un rôle central dans la régulation de l'ostéogénèse par l'établissement de jonctions communicantes entre les cellules endothéliales et ostéoblastiques³⁶.
- Par des interactions avec la MEC *via* l'activité des intégrines^{35,38}.

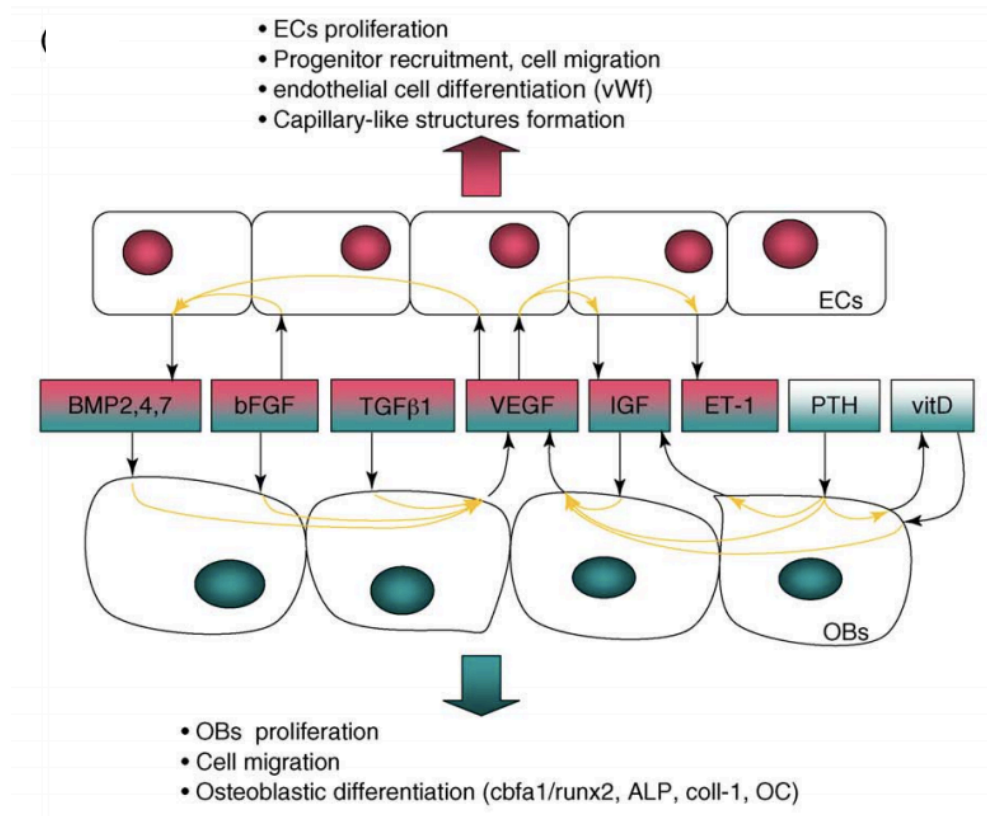


FIGURE 7 : FACTEURS SOLUBLES IMPLIQUES DANS LA COMMUNICATION ENTRE CELLULES OSTEOBLASTIQUES ET ENDOTHELIALES

D'après Grellier *et al.* ³⁵

Il est aussi intéressant de noter que les péricytes présentent à leur surface des marqueurs spécifiques des cellules souches mésenchymateuses (MSCs). Il s'agit de cellules multipotentes pouvant se différencier en cellules adipocytaires, ostéoblastiques ou phagocytaires. Ces cellules sont impliquées dans les processus de régénération osseuse. Elles peuvent notamment participer à la production de la MEC osseuse en synthétisant du collagène, des protéoglycanes et l'ostéonectine par l'intégration du phosphate de calcium³⁹.

Cette étroite relation entre os et vascularisation explique la capacité qu'a le tissu osseux de se régénérer de lui-même dans le cas de lésions de petit volume³⁰. Cependant, dans le cas de pertes de substances plus étendues, des stratégies visant à reconstruire ou combler les défauts osseux doivent être mises en œuvre.

1.2. Thérapeutiques actuelles des pertes de substances osseuses

La régénération des défauts osseux causés par un traumatisme, une infection, une tumeur ou liés à des anomalies du développement du squelette d'origine génétique reste un challenge clinique. La réparation de tels défauts nécessite des matériaux de greffe osseuse⁴⁰. Les thérapeutiques actuelles s'articulent autour des autogreffes, allogreffes ou xélogreffes, ainsi que des substituts synthétiques.

1.2.1. Autogreffes

Les greffons osseux autologues sont considérés comme le « gold standard » pour le traitement des défauts osseux puisqu'ils possèdent des propriétés ostéoconductrices (*capacité passive permettant la colonisation du biomatériau par les cellules de l'hôte, la vascularisation et le dépôt d'un tissu osseux*), ostéogéniques (*propriété du greffon de pouvoir former activement et directement une nouvelle matrice osseuse*) et ostéoinductrices (*propriété active du biomatériau stimulant le recrutement et la différenciation des cellules souches en cellules ostéoblastiques, et favorisant ainsi la néoformation osseuse*)⁴⁰.

Le traitement par autogreffe est limité par le volume osseux pouvant être prélevé du site donneur (problème de disponibilité) et transplanté consécutivement au niveau du défaut osseux (site receveur). Il est donc indiqué pour le traitement de défauts de petits volumes⁴¹. Les complications peuvent inclure la morbidité au niveau du site donneur, la survenue d'un hématome local et des problèmes de remodelage au niveau de l'os implanté⁴². De plus, les autogreffes sont très coûteuses⁴³. Elles entraînent aussi plus de douleurs, et une hospitalisation et une réhabilitation plus longues⁴⁴.

1.2.2. Allogreffes

Une alternative aux greffons osseux autologues est l'utilisation d'allogreffes, où le tissu est issu d'autres humains (cadavres). L'avantage est que cela élimine le problème de morbidité au niveau du site donneur, et que le greffon peut être disponible en quantités suffisantes. Les allogreffes peuvent être utilisées pour des défauts plus larges. Elles présentent une ostéoconductivité, et, utilisées fraîches congelées ou déminéralisées, elles

présentent une ostéoinductivité limitée⁴⁵. Les greffons allogéniques ne procurent pas les signaux ostéoinducteurs nécessaires⁴⁶. L'allogreffe peut se compliquer par manque d'intégration au tissu osseux de l'hôte – intégration plus faible que l'autogreffe – et risque de rejet immunitaire⁴³, entraîner des problèmes de transmission de maladie ou infections bactériennes, et des problèmes de vascularisation⁴⁷. Enfin, même si cela est dans une moindre mesure que les greffes autologues, les allogreffes génèrent un coût substantiel.

1.2.3. Xénogreffes

Les xénogreffes, greffons d'origine animale, sont rarement utilisées car elles présentent les mêmes inconvénients que les allogreffes et leur structure et fonctions ne correspondent pas exactement à celles du tissu humain⁴⁸.

1.2.4. Substituts synthétiques

Les limites associées à l'utilisation des autogreffes et allogreffes ont conduit au développement d'une large gamme de biomatériaux synthétiques ces dernières années. Leur utilisation permet d'éliminer le risque de transmission de maladies, réduire le nombre de procédures chirurgicales, diminuer le risque d'infection ou d'immunogénicité. Il existe de plus une disponibilité importante de ces biomatériaux⁴⁹. Cependant, ces matériaux synthétiques, comme les polymères ou les céramiques, présentent des inconvénients liés à leur ostéoconductivité limitée, leurs propriétés mécaniques inadaptées ou encore leur cinétique de dissolution non maîtrisée⁴⁰. De plus, ces solutions ne reproduisent pas précisément l'architecture du tissu osseux, que ce soit à l'échelle microscopique ou macroscopique.

Les stratégies d'ingénierie tissulaires ont donc été introduites comme des alternatives prometteuses pour résoudre les problèmes associés aux thérapeutiques actuelles et produire des constructions osseuses qui miment la structure et la fonction de l'os natif.

2. INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

2.1. Concepts généraux

La solution la plus communément admise pour remplacer un organe ou tissu défaillant a longtemps été la mise en place d'une prothèse. Cependant, cette prothèse n'est que palliative et ne restitue jamais la fonctionnalité du tissu *ad integrum*. Comme vu précédemment, les greffes et transplantations d'organe constituent elles aussi une solution mais posent problème notamment en termes de quantités disponibles et de morbidité au niveau du site donneur. C'est dans ce contexte que s'est développée l'ingénierie tissulaire⁵⁰.

L'ingénierie tissulaire est définie comme « l'ensemble des techniques et méthodes s'inspirant des principes de l'ingénierie et des sciences de la vie, utilisées pour développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus »⁵¹. Plus récemment, outre la régénération de tissus humains fonctionnels et la création d'organes artificiels, ce concept a été étendu à la création de modèles physiologiques ou physiopathologiques, en deux ou trois dimensions, pour la recherche fondamentale ou appliquée⁵²⁻⁵⁴.

Le principe de l'ingénierie tissulaire « traditionnelle » repose sur les étapes suivantes : le prélèvement des cellules chez le patient, la mise en culture des cellules afin de permettre leur prolifération et/ou leur différenciation en culture *in vitro*, leur ensemencement sur un échafaudage (scaffold), avec éventuellement ajout de facteurs de croissance et/ou mise en bioréacteur, suivi d'une phase de maturation et d'implantation chez le patient (Figure 8). On parle ici d'ingénierie tissulaire « basée sur le scaffold », puisque ce dernier détient une place centrale dans le processus d'élaboration du substitut tissulaire⁵⁵.

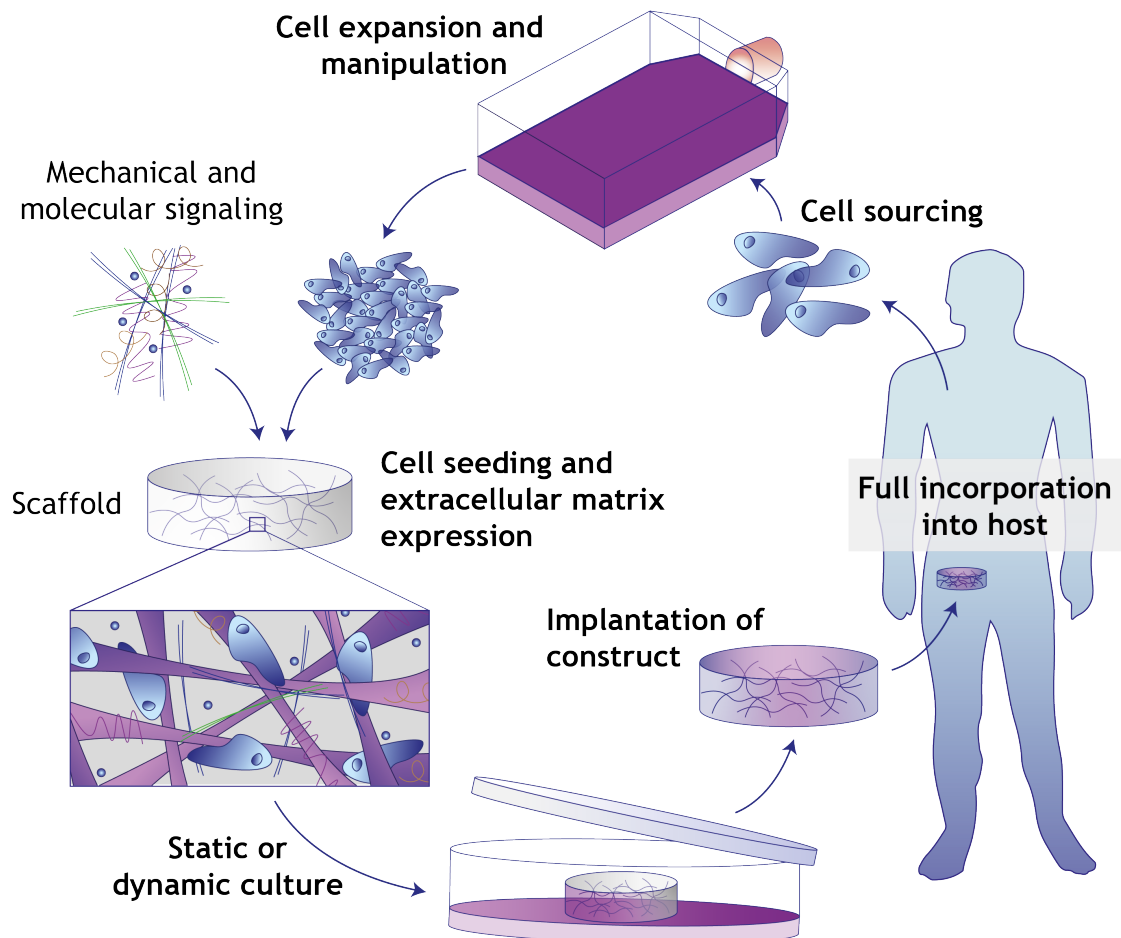


FIGURE 8 : PRINCIPE GENERAL DE L'INGENIERIE TISSULAIRE
Inspiré de van Blitterswijk *et al.* ⁵⁶

L'ingénierie tissulaire osseuse a connu un essor considérable durant ces trente dernières années, avec une augmentation exponentielle du nombre d'études et de revues publiées sur la base de données PubMed depuis le milieu des années 1980⁵⁷. Le but de l'ingénierie tissulaire osseuse est d'induire la régénération d'un os fonctionnel *via* la combinaison de biomatériaux, cellules, facteurs de croissance, palliant ainsi les problématiques liées aux thérapeutiques actuelles décrites dans le chapitre précédent. La vascularisation constitue également un élément crucial au centre des recherches réalisées pour l'optimisation des substituts d'ingénierie tissulaire osseuse. L'un des atouts majeurs de cette approche est que le processus de réparation peut se faire grâce aux propres cellules du patient, améliorant ainsi l'intégration du greffon^{42,58}.

2.2. Composante cellulaire

En ingénierie tissulaire, les cellules tiennent une place majeure puisqu'elles sont responsables de la synthèse et de la stabilisation à long terme de la MEC, essentielle pour la génération d'un nouveau tissu⁵⁹.

L'un des défis majeurs est d'identifier les sources cellulaires pouvant être implantées dans les défauts osseux, se différencier en ostéoblastes et participer à la formation d'une néo-vascularisation⁶⁰. La source cellulaire idéale pour l'ingénierie tissulaire doit répondre aux impératifs suivants : accès facile, quantité disponible suffisante, procédure de prélèvement non- ou minimalement-invasive, faible morbidité au niveau du site donneur, capacité à fournir un nombre de cellules suffisamment important après amplification, processus de différenciation contrôlé et reproductible, transplantation réalisable de manière sécurisée et efficace (absence d'immunogénicité, tumorigénicité et transmission de maladies), et production dans le respect des réglementations de bonnes pratiques de laboratoire⁶¹.

A ce jour, il n'existe aucun consensus sur le type cellulaire idéal pour la régénération osseuse, mais il est admis que l'approche basée sur les cellules est efficace. En ingénierie tissulaire osseuse, trois grands types de cellules sont utilisées : les cellules souches embryonnaires, les cellules génétiquement modifiées, les cellules souches adultes.

2.2.1. Cellules à potentiel ostéogénique

2.2.1.1. Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (ESCs) sont présentes dans l'embryon peu de temps après la fécondation jusqu'au stade de blastocyste où elles constituent la masse cellulaire interne. L'avantage des ESCs est leur pluripotence et leur importante capacité de prolifération⁶². Ces cellules peuvent en effet se différencier en de multiples lignées présentes dans l'os adulte : cellules ostéogéniques, cellules vasculaires, ostéoclastes et cellules nerveuses⁶³.

De nombreuses études ont démontré la possibilité d'utiliser les ESCs en ingénierie tissulaire osseuse en les combinant avec différentes matrices tridimensionnelles, et ont mis en évidence le potentiel ostéogénique de ces cellules^{64,65}.

Malgré leur intérêt, il n'a pas encore été démontré l'absence de tumorigénicité des ESCs. La culture prolongée d'ESCs indifférenciées pourrait entraîner la formation de tératomes *in vivo*⁶⁶. De plus, l'incompatibilité immunologique entre les ESCs du donneur et les cellules de l'hôte doit être résolue⁵⁷. Enfin, les lois éthiques françaises restreignent considérablement leur utilisation en clinique.

2.2.1.2. Cellules souches génétiquement modifiées

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) sont artificiellement dérivées de cellules somatiques *via* l'induction de l'expression « forcée » d'un cocktail de gènes de pluripotence, préalablement identifiés dans les cellules souches embryonnaires murines. Ces cellules ont été produites pour la première fois à partir de fibroblastes de peau de souris par transmission rétrovirale de quatre facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Klf4 et Myc) en 2006⁶⁷.

Les études ont montré que les iPSC humaines possédaient des propriétés similaires à celles des ESC humaines, pas seulement au niveau de leur morphologie, expression génique, antigènes de surface mais aussi au niveau de leur potentiel de différenciation *in vitro* et pluripotence.

Il n'est cependant pas exclu que ces cellules induisent la formation de tumeurs dues aux oncogènes intégrés et aussi liée à un résidu de cellules pluripotentes, tumorigènes, qui échapperaient à la différenciation. De plus, des stratégies non intégratives sont actuellement de plus en plus utilisées afin de sécuriser leur utilisation en ingénierie tissulaire osseuse⁵⁷.

2.2.1.3. Cellules souches adultes

Les cellules souches adultes restent actuellement les cellules les plus utilisées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse. Elles peuvent être réparties en quatre catégories : les cellules souches mésenchymateuses, les cellules souches dérivées du tissu adipeux, les cellules souches dérivées du sang, les cellules souches dérivées du tissu dentaire.

Afin de rester ciblé spécifiquement sur les expérimentations réalisées dans le cadre de cette thèse, seules seront développées les cellules souches mésenchymateuses et les cellules souches dérivées du tissu dentaire pour la composante cellulaire ostéogénique.

- Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sont connues pour leur capacité à se différencier en cellules osseuses, à former de la matrice minéralisée, et leur fort pouvoir prolifératif. Elles ont été caractérisées au travers de l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation (par exemple, négatives pour CD34, CD45, CD14, CD11a, CD19 et HLA-DR ; positives pour STRO-1, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD146 et CD44)⁶⁸. Elles ont été isolées à partir de diverses sources tissulaires adultes comme le cordon ombilical, le placenta, la peau, les reins et le foie, ... la moelle osseuse étant la source la plus étudiée^{69,70}. Une fois le prélèvement effectué, la récupération des MSCs est basée sur la capacité des cellules à adhérer au plastique des boîtes de culture⁷¹. En plus des sources tissulaires adultes, les MSCs ont été également dérivées des ESCs, de même que des iPSCs. Ces MSCs dérivées d'ESCs et iPSCs possèdent les mêmes caractéristiques de multipotence *in vitro* et *in vivo* que les MSCs dérivées des sources adultes. Cependant, contrairement à ces dernières, elles peuvent être amplifiées avec un taux moindre de sénescence⁷¹.

L'utilisation de MSCs incluses au sein de biomatériaux en ingénierie tissulaire osseuse est très répandue pour accélérer la formation osseuse et l'ostéointégration durant les processus de réparation et de régénération osseuses. Dans le cas de fractures osseuses, elle a montré des résultats prometteurs au sein de divers modèles précliniques chez l'animal^{72,73}, ainsi que des résultats cliniques pour le traitement de diverses maladies orthopédiques⁷⁴ (Figure 9).

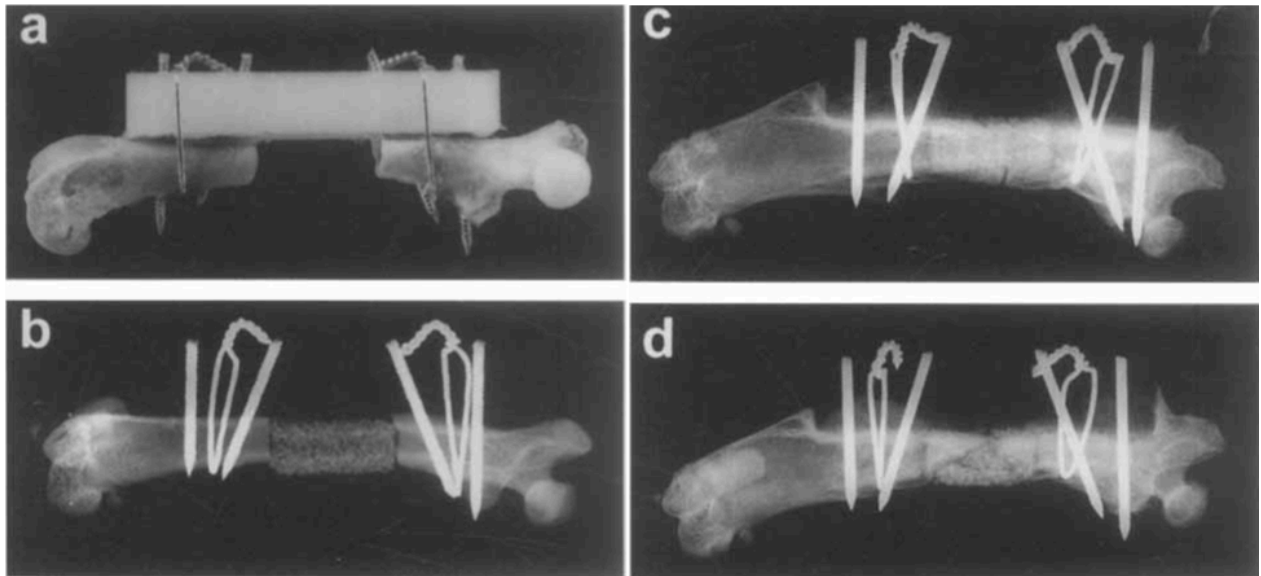


FIGURE 9 : UTILISATION DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES POUR LA REGENERATION OSSEUSE IN VIVO
D'après Bruder *et al.* ⁷²

(a) Réalisation d'un défaut segmentaire, (b) Radiographie post-opératoire immédiate, (c) Radiographie à 12 semaines post-opératoire après implantation d'HA/ β -TCP associé à des MSCs, (d) Radiographie à 12 semaines post-opératoire après implantation d'HA/ β -TCP seul

La régénération est permise à la fois par les MSCs, du fait de leur différenciation ostéogénique et la formation de matrice minéralisée, et par l'augmentation de l'ostéoinductivité du biomatériau *via* le relargage de facteurs de croissance ostéogéniques et la stimulation de la migration et différenciation des ostéoprogéniteurs de l'hôte. De plus, il a été prouvé que les MSCs pré-différenciées dans la lignée ostéogénique avant l'implantation accélèrent davantage la réparation des défauts et l'ostéointégration des constructions *in vivo* en délivrant une population ostéogénique plus mature capable de formation osseuse immédiate. Des essais précliniques portant sur des constructions à base de MSCs ont prouvé leur efficacité pour accélérer la réparation osseuse dans divers scénarios, notamment les défauts fémoraux de taille critique, les déformations cranio-maxillo-faciales et les fusions de la colonne vertébrale⁷⁵. Actuellement, les MSCs dérivées de la moelle osseuse sont considérées comme l'une des sources cellulaires les plus efficaces pour la régénération osseuse, et ont montré qu'elles suivaient une voie de différenciation ostéogénique bien définie^{76,77}.

Néanmoins, plusieurs limites à l'utilisation des MSCs en clinique ont été mises en évidence, comme la nécessité d'une double intervention (prélèvement des cellules puis ré-implantation), la diminution des capacités de prolifération et de différenciation en fonction

de l'âge et de l'état de santé du patient, la quantité limitée de cellules dans les prélèvements effectués, et enfin le temps de prolifération cellulaire qui reste trop important pour pouvoir envisager une translation clinique⁵⁷.

En parallèle, les cellules souches dérivées du tissu dentaire ont elles aussi montré leur intérêt en ingénierie tissulaire osseuse.

- Les cellules souches dérivées du tissu dentaire

L'avantage des cellules souches dérivées des tissus dentaires est qu'elles sont facilement accessibles et présentent d'importantes capacités de prolifération et de différenciation. Elles peuvent être isolées de différents tissus buccaux tels que l'os alvéolaire, la pulpe dentaire, le ligament, le follicule dentaire, le germe dentaire, la papille apicale, la gencive et le périoste⁷⁸ (Figure 10).

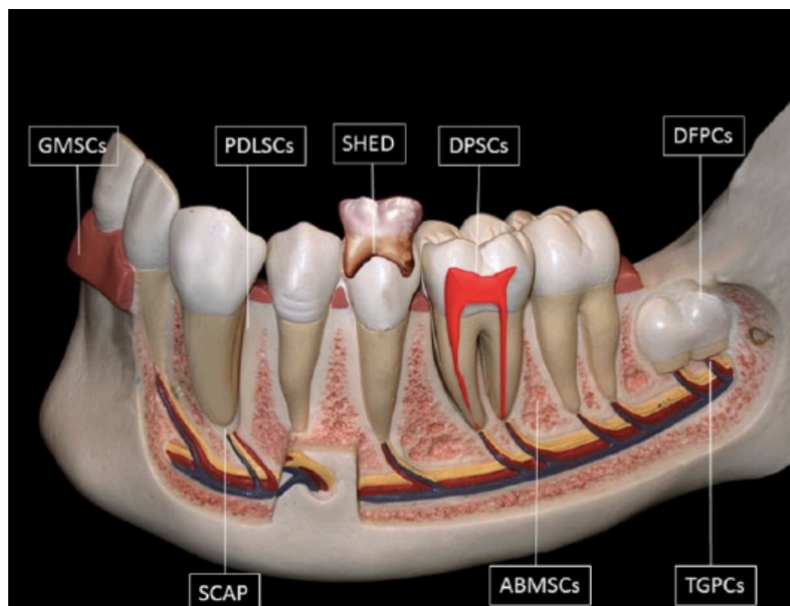


FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES SOURCES DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DERIVEES DES TISSUS DENTAIRES
D'après Chalisserry *et al.*⁷⁹

Parmi elles, les cellules souches issues de la papille apicale (SCAPs) sont isolées préférentiellement à partir des germes de dents de sagesse et présentent des marqueurs de surface précoces mésenchymateux, en particulier CD24, qui pourrait constituer un marqueur unique pour cette population^{80,81}. Ces cellules ont démontré leur capacité à subir

une différenciation ostéogénique, adipogénique, chondrogénique et neurogénique lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu inducteur adapté^{79,82} (Figure 11).

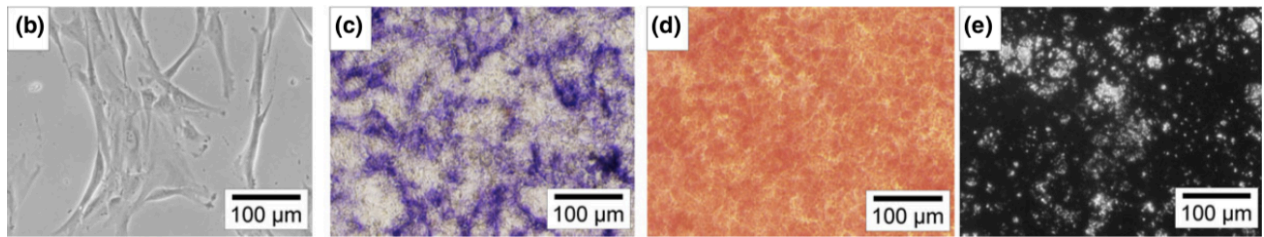


FIGURE 11 : DIFFERENCIATION OSTEOBLASTIQUE DES SCAPs EN MILIEU OSTEOINDUCTEUR

D'après Devillard *et al.*⁸²

Caractérisation des SCAPs en culture : (b) Observation de la morphologie des SCAPs en microscopie à contraste de phase après 10 passages ; (c-e) Différenciation ostéoblastique des SCAPs dans un milieu ostéoinducteur après 21 jours, (c) Phosphatase alcaline, (d) Rouge alizarin, (e) Von Kossa

L'induction ostéo/odontogénique de SCAPs amplifiées *ex vivo* sur des échafaudages en HA ou HA/TCP après greffe chez des souris immunodéprimées a révélé la présence d'un tissu minéralisé assimilable à la formation de dentine^{80,83}. Après 42 jours de culture dans un milieu ostéoinducteur, les SCAPs humaines ont montré une différenciation ostéogénique traduite par la formation de nodules minéralisés et l'expression de marqueurs ostéogéniques⁸⁴. Certaines études ont évalué l'effet de l'ajout de facteurs de croissance sur la formation osseuse par les SCAPs. Il a notamment été démontré un effet de l'IGF-1 sur l'amélioration de la différenciation ostéogénique de ces cellules⁸⁵. D'autres études ont cherché à améliorer l'ostéogenèse par transfection génique. La co-transfection à médiation lentivirale de BMP2 et du gène VEGF dans les SCAPs s'est avérée favoriser leur différenciation ostéogénique. Il a aussi été démontré que la transfection par BMP9 de SCAPs immortalisées induisait une différenciation ostéo/odontogénique^{86,87}.

Ces cellules semblent ainsi constituer une population pertinente pour une utilisation en ingénierie tissulaire osseuse.

Comme vu dans la sous-partie 1.1.6 « Rôle de la vascularisation dans l'homéostasie et la réparation osseuse », la formation d'un tissu osseux fonctionnel est permise par un travail synergique des cellules ostéoblastiques et endothéliales. Outre la composante cellulaire ostéogénique, le processus de régénération osseuse repose donc sur la mise en place d'une

pré-vascularisation pouvant être permise par l'inclusion de cellules à potentiel vasculogénique.

2.2.2. Cellules à potentiel vasculogénique

Différents types de cellules endothéliales ont été utilisés afin d'assurer la formation d'un réseau micro-vasculaire fonctionnel au sein des substituts d'ingénierie tissulaire.

Les cellules endothéliales, constitutives de l'endothélium, tapissent la paroi interne des vaisseaux (Figure 12). Elles présentent des marqueurs, dont certains sont ubiquitaires et exprimés à la fois par les cellules endothéliales et d'autres types cellulaires, et d'autres marqueurs qui ne sont pas exprimés dans tous les types de vaisseaux et tissus (Figure 13).

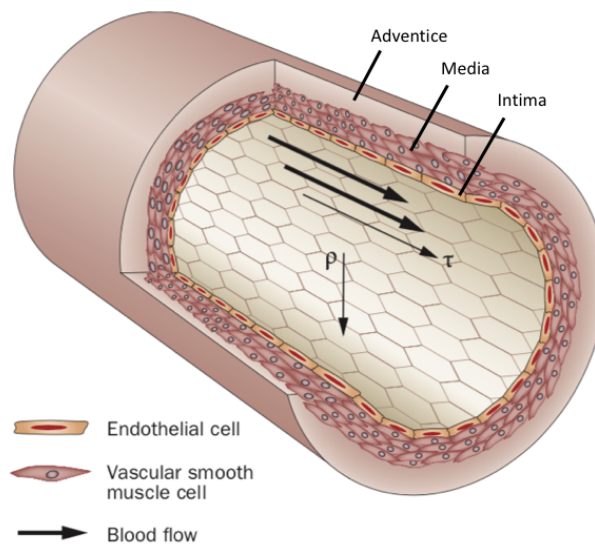


FIGURE 12 : STRUCTURE HISTOLOGIQUE D'UN VAISSEAU
Adapté de Patel et Honoré ⁸⁸

MARKERS	CELL TYPE
Factor VIII-related antigen	ECs (irregularly expressed by capillaries and tumor vessels), platelets, megakaryocytes
CD31/PECAM-1	ECs, platelets, megakaryocytes, B and T lymphocyte subsets, monocytes, neutrophils
Angiotensin-converting enzyme	ECs, epithelial cells, monocyte-macrophages, T lymphocytes
Type I scavenger receptor (acetylated-LDL uptake)	ECs, macrophages, SMCs, pericytes, fibroblasts
<i>Ulex europaeus</i> I agglutinin binding/O(H) blood-type antigen	ECs, erythrocytes
Weibel-Palade bodies	ECs
Vascular endothelial cadherin	ECs, trophoblasts, PLN sinus macrophages
CD34	ECs, hemopoietic precursors
CD102/ICAM-2	ECs, lymphocytes, monocytes, platelets
CD51/61 (vitronectin receptor)	ECs (overexpressed in tumor ECs), platelets, megakaryocytes, osteoclasts, mast cells, B lymphocytes
CD105/endoglin	ECs (overexpressed in tumor ECs), monocyte-macrophages, B lymphocytes, syncytiotrophoblasts
CD36	Microvascular ECs, monocyte-macrophages, erythroid cells, platelets, megakaryocytes
CD73/VAP-2	ECs, T and B lymphocytes, tonsillar epithelium
S-ENDO 1/MUC18	ECs, SMCs, dendritic cells, leukocytes, melanoma cells, carcinoma cells
Thrombomodulin	ECs, SMCs
AAMP	ECs, cytotrophoblasts, mononuclear inflammatory cells, melanoma cells, adenocarcinoma cells

FIGURE 13 : MARQUEURS CONSTITUTIFS DES CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES
D'après Garlanda et Dejana ⁸⁹

Deux types de cellules endothéliales sont principalement utilisées en ingénierie tissulaire vasculaire au sein de notre Unité Mixte de Recherche : les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs) et les cellules endothéliales progénitrices (EPCs).

- *Les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine*

Les HUVECs ont été isolées par Jaffe en 1973 à partir de cordons ombilicaux⁹⁰. L'avantage de ces cellules endothéliales matures est qu'elles sont facilement extraites et ont d'importantes capacités prolifératives.

Elles sont fréquemment utilisées dans les études de l'angiogenèse *in vitro*, car elles ont la capacité de former des structures « capillaires-like » et elles peuvent se connecter facilement à la vascularisation hôte^{91,92}.

De nombreuses études ont montré le rôle des cocultures d'HUVECs/ostéoprogéniteurs dans les processus d'angiogenèse et de différenciation ostéoblastique, montrant leur intérêt potentiel pour les stratégies d'ingénierie de tissu osseux vascularisé. Certaines de ces études sont abordées plus en détails dans la partie 2.5 « Les stratégies de vascularisation des substituts d'ingénierie tissulaire osseuse ».

- *Les cellules endothéliales progénitrices*

Les EPCs ont été isolées par Asahara *et al.* en 1997⁹³. Les deux sources d'EPCs les plus fréquemment explorées sont le sang périphérique et le sang de cordon ombilical. Le sang de cordon permettrait d'obtenir des quantités plus importantes d'EPCs que le sang périphérique adulte⁹⁴.

Il a été montré que ces cellules augmentaient la vascularisation dans des maladies telles que l'ischémie des membres inférieurs⁹⁵, l'infarctus du myocarde⁹⁶ et amélioreraient la néovascularisation dans le cas de fractures osseuses^{97,98}.

En ingénierie tissulaire osseuse, de nombreuses études ont montré la contribution des EPCs lors des processus de régénération. Liu *et al.* ont démontré que les EPCs sécrétaient des facteurs ostéogéniques tels que la BMP-1, 2, 3, 6, 7 et 9 et TGF- β et pouvaient ainsi améliorer la différenciation ostéogénique des MSCs en coculture⁹⁹. Dans le cas de modèles de fractures chez l'animal, plusieurs équipes ont également montré qu'il existait une mobilisation des EPCs de la moelle osseuse au niveau du site de fracture à l'origine d'une néo-vascularisation et réparation osseuse^{100,101}.

Bien que la composante cellulaire ait un rôle primordial en ingénierie tissulaire, il est également indispensable de disposer d'un scaffold approprié dont les propriétés reposent sur des critères bien établis.

2.3. « Scaffold »

Le choix d'un biomatériau adapté est essentiel en ingénierie tissulaire. Cette composante matricielle devra répondre à un cahier des charges spécifique :

- être biocompatible, c'est-à-dire ne pas provoquer de cytotoxicité systémique et locale, ni s'accompagner de réaction inflammatoire chronique
- permettre l'adhésion et la prolifération cellulaires
- favoriser la différenciation cellulaire et la synthèse d'une matrice extracellulaire osseuse minéralisée
- être poreuse pour faciliter la colonisation cellulaire et la mise en place d'une vascularisation
- avoir une structure tridimensionnelle spécifique
- être fabriquée de manière maîtrisée et reproductible
- disposer de propriétés mécaniques, biologiques et physicochimiques (en particulier, résorbabilité) appropriées.

En ingénierie tissulaire osseuse, les matériaux les plus utilisés sont⁴⁶ :

- les céramiques : ex. phosphate tricalcique, hydroxyapatite, céramiques phosphocalciques
- les polymères naturels : ex. collagène, alginate, chitosane
- les polymères synthétiques : ex. acide polyglycolique (PGA), acide polylactique (PLLA), polycaprolactone (PCL), polyéthylène glycol (PEG)
- les polymères composites ou « copolymères » : ex. acide poly(lactique-co-glycolique)(PLGA), copolymère PECE (PEG-PCL-PEG) associé à nHA et collagène
- Les métaux : ex. titane, tantale

Dans cette partie, seul un développement au sujet des polymères naturels, et en particulier le collagène, sera effectué du fait de l'orientation de nos expérimentations autour de ce biomatériau.

Les polymères naturels présentent l'avantage d'être biocompatibles et biodégradables. Leur porosité et résistance mécanique peuvent être modulées en faisant varier les concentrations des polymères, les conditions de polymérisation ou en introduisant différents groupes fonctionnels¹⁰². La bioactivité peut être aussi modulée en ajoutant des produits chimiques, protéines, peptides et cellules¹⁰³. Les polymères naturels les plus

utilisés et étudiés en ingénierie tissulaire osseuse sont la gélatine/collagène, le chitosan¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, la fibrinoïne de soie^{107,108}, l'alginate^{109,110}, l'acide hyaluronique¹¹¹ et les peptides^{112,113}.

Le collagène reste un hydrogel de choix pour l'ingénierie tissulaire osseuse, et notamment pour la création de matrices tridimensionnelles¹¹⁴. Le collagène est la principale protéine composant la matrice organique du tissu osseux. Il s'agit d'une protéine fibrillaire dont la structure de base est composée de trois chaînes polypeptidiques enroulées en hélice d'environ 300 nm de long et 1,5 nm de diamètre, tenues entre elles par des liaisons hydrogène (Figure 14).

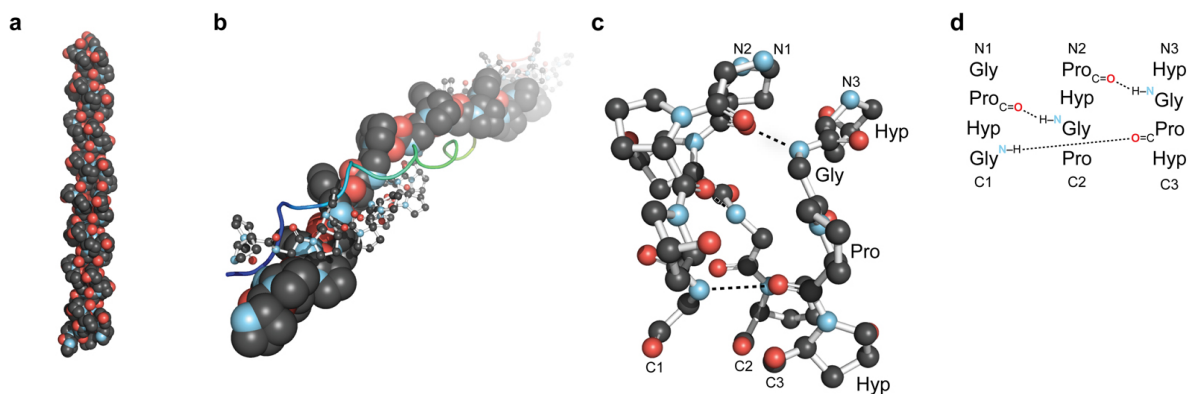


FIGURE 14 : VUE D'ENSEMBLE DE LA STRUCTURE EN TRIPLE HELICE DU COLLAGENE D'après Shoulders et Raines¹¹⁵

Le collagène est synthétisé essentiellement par les cellules se trouvant noyées dans la MEC telles que les fibroblastes, les ostéoblastes ou les chondrocytes. Il possède d'excellentes propriétés biologiques et a été largement utilisé dans le domaine biomédical, comme agents hémostatiques, systèmes à libération contrôlée de médicaments ou encore pour le soin de lésions de type brûlures¹¹⁶. Il est parfaitement biocompatible et biodégradable *via* sa métabolisation par des métalloprotéases, collagénases et sérines protéases. De plus, le collagène possède de très faibles propriétés antigéniques et immunogéniques¹¹⁷, et est disponible facilement¹¹⁸.

En tant que composant naturel de la matrice extracellulaire, il stimule la prolifération et la différenciation cellulaire, par interaction entre le site RGD de la protéine et les intégrines des membranes cellulaires¹¹⁹⁻¹²¹. Cependant, l'un de ses inconvénients majeurs reste ses faibles propriétés mécaniques¹²², qui entraînent des phénomènes de compaction

lorsqu'il est utilisé comme support pour la prolifération cellulaire. C'est pourquoi certaines études utilisent une matrice collagénique modifiée afin d'améliorer ses propriétés^{123,124}.

Associés aux cellules et au scaffold, les facteurs de croissance sont couramment utilisés en ingénierie tissulaire afin favoriser la régénération.

2.4. Facteurs de croissance

Un des buts de l'ingénierie tissulaire osseuse est de promouvoir la cicatrisation en recréant le microenvironnement du tissu osseux. Un élément essentiel de ce microenvironnement sont les facteurs de stimulation qui promeuvent la capacité d'ostéoinduction du substitut osseux et qui incluent les stimuli biochimiques, mécaniques et électromagnétiques⁴⁶.

Dans le cadre de ce travail, nous développerons uniquement les molécules de signalisation, et plus particulièrement les facteurs de croissance.

L'ostéogénèse est dirigée par l'expression coordonnée de plusieurs types de molécules, incluant facteurs de croissance et facteurs de transcription, qui induisent des stimuli cellulaires guidant le recrutement et la différenciation cellulaires. Une des stratégies de l'ingénierie tissulaire est d'intégrer ces facteurs de croissance au sein des matrices pour permettre leur relargage durant le processus de cicatrisation.

Les facteurs de croissance sont des molécules protéiques sécrétées par les cellules qui engendrent une cascade de signalisation au travers de la liaison aux récepteurs de surface des cellules. Cette liaison induit un signal de transduction au niveau du noyau où les facteurs de transcription sont activés, affectant l'expression des gènes qui influencent les fonctions critiques telles que la prolifération, la différenciation, la mobilité, le métabolisme, la synthèse matricielle ou encore le maintien de l'intégrité cellulaire. Ces molécules ont un effet autocrine (effet sur la cellule sécrétrice), paracrine (effet dans le voisinage de la cellule sécrétrice) ou endocrine (sécrétion dans le système sanguin).

Les molécules de signalisation majoritairement retrouvées dans la formation et la réparation osseuses sont le TGF- β ¹²⁵, BMP (2, 4 et 7)¹²⁶, FGF (2, 9 et 18)¹²⁷, IGF-1¹²⁸, PDGF¹²⁹ ainsi que Wnt^{130,131} et Shh¹³². Chacune d'elles exerce des rôles spécifiques tels que

le recrutement, la prolifération des cellules ostéoprogénitrices et la différenciation ostéoblastique à des stades précoces, ou à l'inverse une inhibition de la différenciation et de la minéralisation à des stades plus tardifs.

La concentration locale en signaux chimiques, influençant le comportement des cellules osseuses, augmente de manière conséquente dans le cas d'une lésion. Les lésions du tissu osseux initient une cascade d'évènements conduisant à la migration des neutrophiles, macrophages et fibroblastes, qui expriment et sécrètent alors une variété de cytokines et facteurs de transcription qui dirigent la migration des MSCs, l'adsorption de protéines, l'adhésion cellulaire, la néovascularisation, la fibrose et le remodelage/cicatrisation⁴⁹.

Le VEGF joue aussi un rôle critique durant la formation osseuse *via* l'angiogénèse qu'il induit. Plusieurs études ont montré le rôle essentiel joué par le VEGF endogène pour la formation d'os endochondral¹³³⁻¹³⁵. Par ailleurs, l'inhibition du VEGF au cours de l'ossification endochondrale et intramembraneuse a montré entraîner une diminution de l'angiogénèse, une réduction de la minéralisation du cal et de la formation d'os au niveau de fractures fémorales et de défauts osseux du tibia chez la souris. Inversement, un apport exogène de VEGF semble accélérer la formation d'un pont osseux sur des défauts de taille critique du radius chez le lapin, plaçant le VEGF comme un facteur angiogénique favorisant la cicatrisation osseuse¹³⁵.

La combinaison du VEGF avec d'autres facteurs de croissance, tels que PDGF ou BMP-2, pourrait améliorer la vascularisation des constructions tissulaires osseuses¹³⁶⁻¹³⁸. Cependant, les types de facteurs de croissance à combiner, le dosage et la méthode de délivrance doivent être strictement contrôlés afin de promouvoir la formation osseuse. Le nombre d'études visant à évaluer les paramètres optimaux reste encore actuellement limité.

2.5. Pré-vascularisation des produits d'ingénierie tissulaire osseuse

L'une des principales limitations des stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse est le manque de vascularisation des constructions obtenues, à l'origine d'une faible survie de l'implant et d'une mauvaise intégration.

Les tissus reposent sur la présence de vaisseaux sanguins situés à environ 100-200 μm afin d'assurer un apport suffisant en nutriments et oxygène¹³⁹ (Figure 15). Dans le passé, lors du remplacement de tissus de grand volume, la pénétration lente par la vascularisation de l'hôte conduisait à la nécrose dans la zone centrale des tissus d'ingénierie tissulaire en raison d'un échange inadéquat de nutriments et d'oxygène. C'est pourquoi les nouvelles stratégies cherchent à induire et/ou incorporer des réseaux vasculaires au sein des constructions d'ingénierie tissulaire avant implantation afin d'améliorer le succès d'intégration dans le tissu hôte.

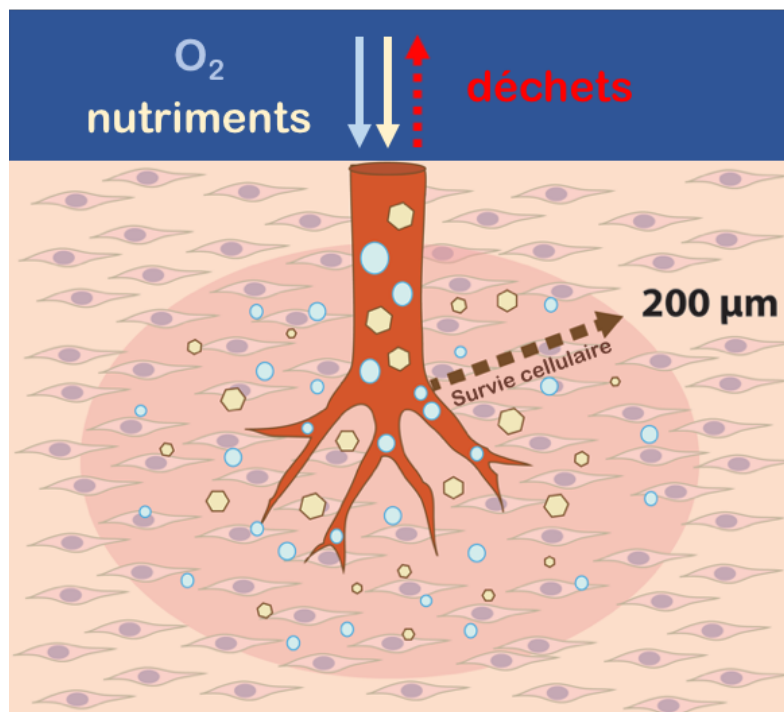


FIGURE 15 : ILLUSTRATION DU CONCEPT DE DISTANCE CRITIQUE DE LA VASCULARISATION AU SEIN DES SUBSTITUTS D'INGENIERIE TISSULAIRE
Courtoisie A. Naveau

Une connaissance des mécanismes de morphogénèse du réseau vasculaire *in vivo* est nécessaire à la mise en place des stratégies de pré-vascularisation des substituts d'ingénierie tissulaire.

2.5.1. Mécanismes physiologiques de la néovascularisation

La néovascularisation joue un rôle majeur à la fois pour la formation et la réparation tissulaires. Elle implique deux processus morphogénétiques distincts : la vasculogénèse et l'angiogénèse. Plusieurs paramètres physiques, chimiques et biologiques rentrent en jeu, comme les facteurs de croissance, les molécules d'adhésion ou encore la composition de la MEC¹⁴⁰ (Figure 16).

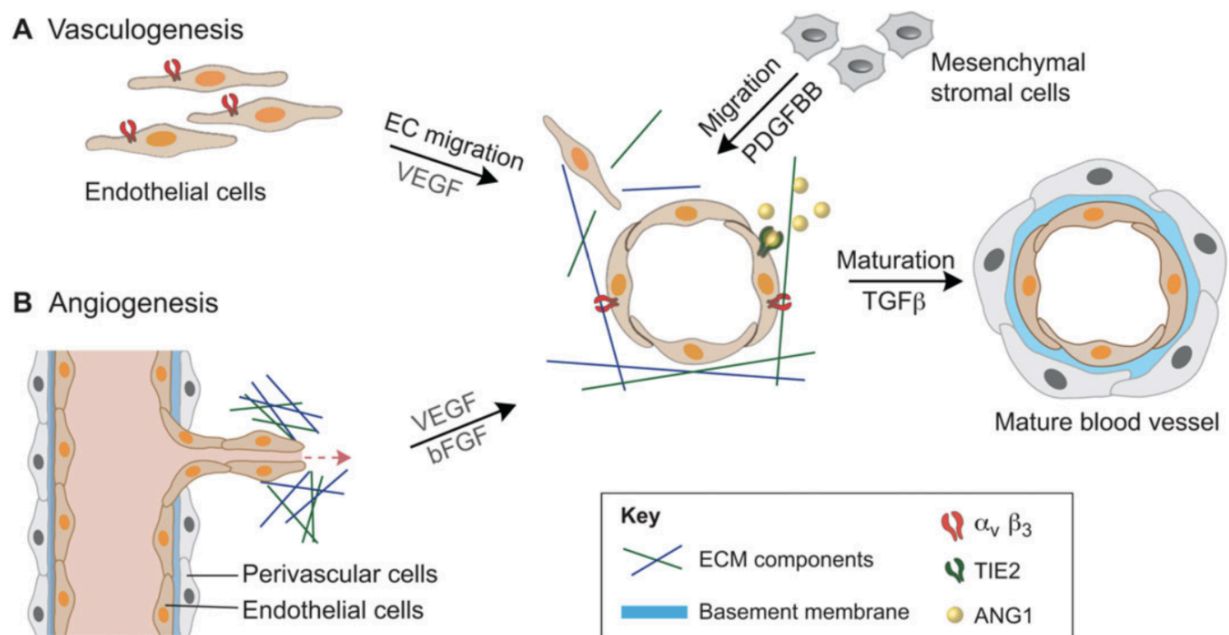


FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VASCULOGENESE ET DE L'ANGIOGENESE
D'après Park et Gerecht ¹⁴⁰

- La vasculogénèse

La vasculogénèse correspond à la formation de vaisseaux *de novo*¹⁴¹. Elle a lieu essentiellement au cours du développement embryonnaire mais est également impliquée dans la néovascularisation chez l'adulte, dans des contextes ischémiques, tumoraux ou inflammatoires^{142,143}. Les EPCs de la moelle osseuse et du sang ont été présentés comme des acteurs majeurs de cette vasculogénèse pré- et post-natale¹⁴⁴.

Ce processus de vasculogénèse se déroule en trois étapes : i/ la différenciation *in situ* de précurseurs mésenchymateux (angioblastes), dérivés des hémangioblastes, en cellules

endothéliales ; ii/ l'assemblage des cellules endothéliales formant un réseau vasculaire primitif ; iii/ l'induction de la transition de la vasculogénèse vers l'angiogénèse¹⁴⁵. Les facteurs de croissance FGF-2, BMP-4 et VEGF-A et TGF- β sont impliqués de manière centrale dans le processus de vasculogénèse¹⁴⁶. Il est également connu que la MEC et les intégrines y jouent un rôle essentiel¹⁴⁷.

- L'angiogénèse

L'angiogénèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants, et permet l'expansion du réseau vasculaire. Il s'agit d'un processus que l'on peut retrouver tout au long de la vie. On distingue l'angiogénèse par bourgeonnement (« sprouting ») de l'angiogénèse par intussusception, durant laquelle les cellules endothéliales s'organisent au centre de la lumière capillaire et génèrent une scission longitudinale du vaisseau¹⁴⁸ (Figure 17).

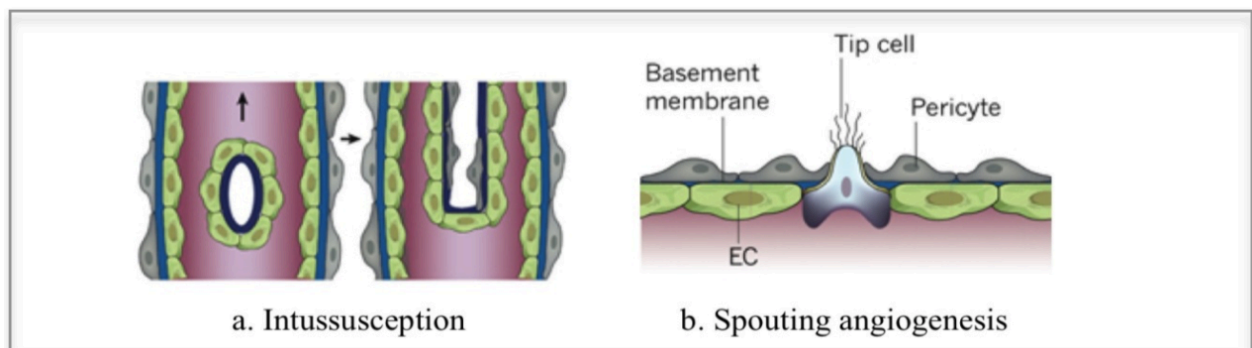


FIGURE 17 : ILLUSTRATION DE L'ANGIOGENESE PAR INTUSSUSCEPTION VERSUS ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT
D'après Carmeliet et Jain ¹⁴⁸

L'angiogénèse par bourgeonnement se déroule en plusieurs étapes bien décrites dans la littérature^{140,148} (Figure 18). Dans un premier temps, le vaisseau quiescent reçoit un signal angiogénique tel que VEGF, FGF, angiopoïétine 2 en lien avec des conditions hypoxiques, inflammatoires ou tumorales. Les péricytes se détachent alors de la paroi vasculaire et s'extraient de la membrane basale *via* une dégradation protéolytique, médiée par les MMP. Les jonctions entre cellules endothéliales se rompent, le VEGF augmente la perméabilité de la couche endothéliale entraînant une extravasation des protéines plasmatiques et l'apposition d'une MEC provisoire. Les protéases libèrent des molécules angiogéniques stockées dans la MEC comme le VEGF et FGF et entraînent un remodelage matriciel. Certaines cellules endothéliales vont acquérir un phénotype de « tip cells » et

vont alors initier le phénomène d'extension du réseau (implication de la voie de signalisation NOTCH et VEGF)¹⁴⁹ (Figure 18a).

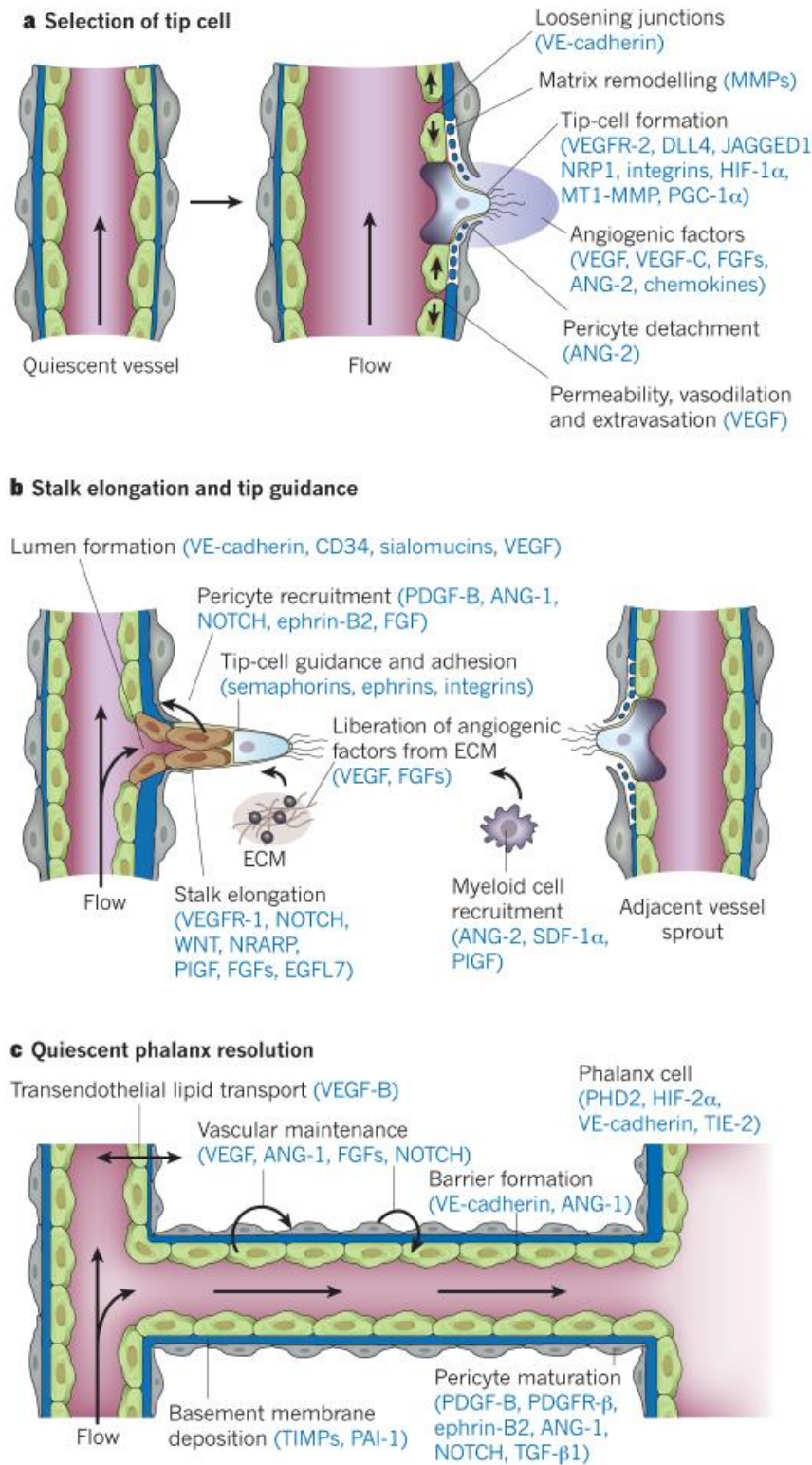


FIGURE 18 : MOLECULES IMPLIQUEES DANS LES DIFFERENTES ETAPES DE L'ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT
 D'après Carmeliet et Jain ¹⁴⁸

Les cellules voisines des « tip cells », appelées « stalk cells » vont proliférer, s'allonger (implication de NOTCH, WNT, placental growth factor, FGF) et former une lumière (VE-cadherine, CD34, sialomucines, VEGF, hedgehog)¹⁴¹ (Figure 18b).

L'étape finale implique le recrutement de cellules périvasculaires (péricytes ou cellules musculaires lisses) dans le tissu conjonctif environnant, qui vont permettre la stabilisation et la maturation du vaisseau. Ce recrutement est médié par la sécrétion de PDGF- β par les cellules endothéliales voisines, ainsi que l'angiopoiétine-1 et le TGF- β ^{150,151}. Des inhibiteurs de protéases, connus sous le nom d'inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs), et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) entraînent le dépôt de la membrane basale, suivi du ré-établissement des jonctions cellulaires afin d'assurer le flux sanguin (Figure 18c).

Les mécanismes de vasculogénèse et d'angiogénèse constituent ainsi des processus bien orchestrés, où les interactions cellulaires au sein du microenvironnement (cellules-cellules, cellules-MEC, facteurs de croissance) jouent un rôle majeur. L'ensemble de ces interactions régule le développement vasculaire *in vivo* et doit être pris en compte dans les approches d'ingénierie vasculaire et de régénération.

2.5.2. Stratégies de pré-vascularisation utilisées en ingénierie tissulaire osseuse

Les précédentes tentatives pour générer des substituts osseux vascularisés par ingénierie tissulaire se sont d'abord focalisées sur l'effet d'un seul composant parmi les trois composants utilisés en ingénierie tissulaire (matrice, cellules ou molécules de signalisation), et n'ont permis d'aboutir qu'à un succès limité¹⁵². Afin d'optimiser ces substituts, les approches d'ingénierie tissulaire sont devenues plus complexes en combinant de multiples stratégies : la délivrance de facteurs de croissance, l'utilisation de systèmes de coculture, l'application d'une stimulation mécanique, l'utilisation de biomatériaux avec des propriétés adaptées et l'apport de techniques de microfabrication (Figure 19).

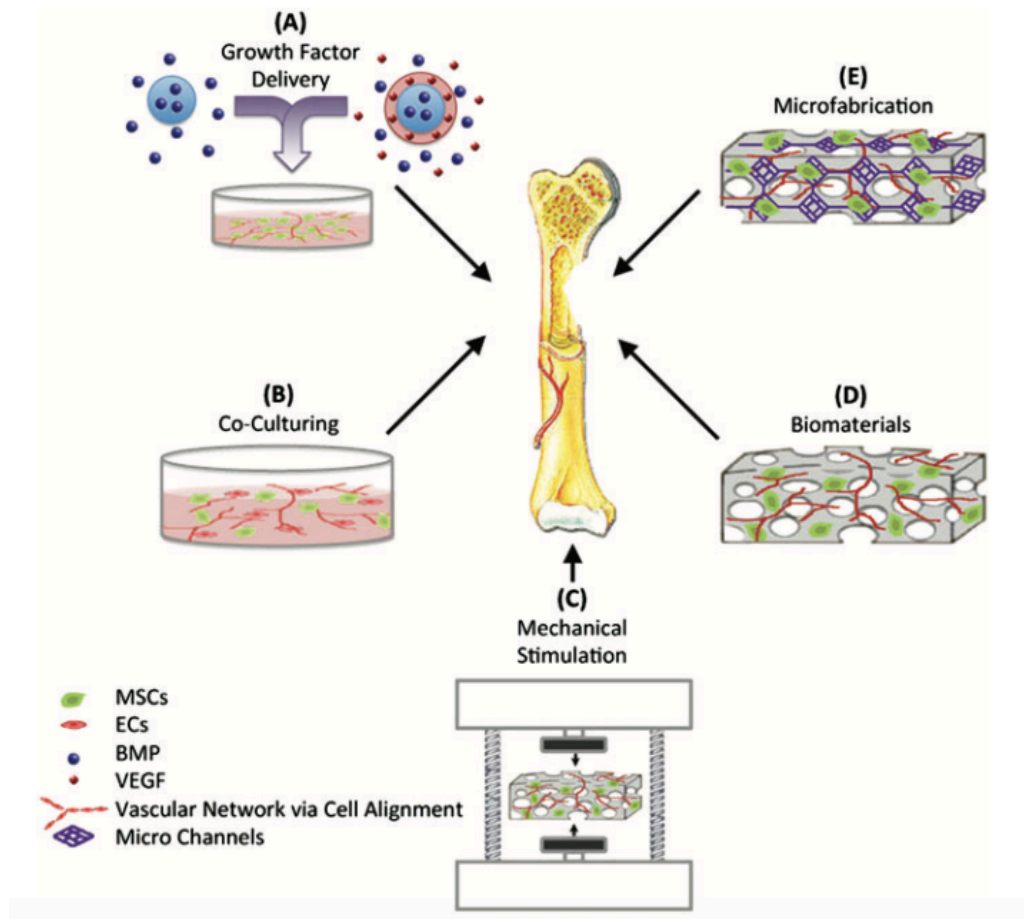


FIGURE 19 : LES DIFFERENTES STRATEGIES POUR AMELIORER LA VASCULARISATION EN INGENIERIE TISSULAIRE

D'après Nguyen *et al.* ¹⁵²

- Les facteurs de croissance

Comme vu précédemment, les facteurs de croissance jouent un rôle important durant la réparation osseuse, puisqu'ils ont une action sur la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire¹⁵³. Plusieurs facteurs de croissance ont montré leur implication dans la formation osseuse, tels que la BMP-2, TGF-beta, FGF, PDGF, IGF, endothéline-1 et VEGF¹⁵⁴.

Certains auteurs ont notamment montré que BMP, PDGF, FGF, et VEGF avaient la capacité d'augmenter la migration des cellules ostéoprogénitrices, tandis que TGF-beta, IGFs et BMPs modulaient la prolifération et la différenciation¹⁵⁵. VEGF et FGF seraient également impliqués dans l'initiation de la vascularisation durant la cicatrisation osseuse¹⁵⁴. Il existe une synergie d'action entre ostéoblastes et cellules endothéliales : d'une part les ostéoblastes relarguent du VEGF, ce qui promeut l'angiogenèse³⁰. En retour,

les cellules endothéliales secrètent de la BMP qui a pour effet d'induire une différenciation ostéoblastique des précurseurs de cellules osseuses¹⁵⁶.

Les approches d'ingénierie tissulaire osseuse ont ainsi exploité ce concept en délivrant des facteurs de croissance *in vitro* et *in vivo*. Les principales difficultés sont liées à un manque de contrôle spatial et temporel de la diffusion des facteurs de croissance entraînant des résultats aléatoires. La délivrance simultanée ou séquentielle de plusieurs facteurs de croissance impliqués dans la régénération osseuse serait à privilégier plutôt que l'usage d'un seul facteur de croissance¹⁵².

Le facteur de croissance angiogénique VEGF a fait l'objet de nombreuses études visant à améliorer l'angiogenèse. Il a été démontré que la délivrance de VEGF par des matrices ou par transfert de gène augmentait la vascularisation locale et améliorait la réparation des fractures, alors que l'inhibition du VEGF altérait la régénération osseuse¹⁵⁷. S'il est clair que le VEGF peut augmenter l'angiogenèse, qui est nécessaire pour la régénération osseuse, il peut également avoir un effet direct sur l'ostéogenèse en recrutant et en stimulant l'activité ostéoblastique et ostéoclastique¹⁵⁸.

Un dosage maîtrisé des facteurs angiogéniques est essentiel pour assurer le succès de la régénération tissulaire. Alors qu'une libération prolongée de VEGF à des niveaux relativement bas par un scaffold en alginate peut favoriser la néovascularisation fonctionnelle¹⁵⁹, des niveaux élevés constants de VEGF peuvent induire des vaisseaux présentant des fuites avec une évolution limitée en réseaux matures¹⁶⁰. L'utilisation de cellules implantées, pour agir en tant que source de ces facteurs de croissance, peut constituer une stratégie alternative aux facteurs de croissance seuls en raison de la capacité des cellules à participer efficacement aux mécanismes de contrôle de rétroaction régulés.

- Les systèmes de coculture

Il est reconnu au niveau de la littérature que l'ostéogenèse et l'angiogenèse sont étroitement connectées durant le processus de formation osseuse *in vivo*. La formation osseuse nécessite un processus d'angiogenèse faisant intervenir une coopération entre cellules ostéoblastiques et cellules endothéliales¹⁶¹.

Wang *et al.* ont illustré l'importance de cette relation entre ostéoblastes et cellules endothéliales en cocultivant des ostéoblastes humains (HOBs) avec des HUVECs¹⁶². La

coculture HOBs/HUVECs résultait en une augmentation de l'activité phosphatase alcaline (PAL) et du nombre de cellules. Du fait de son rôle crucial durant les phénomènes de formation, remodelage et réparation, la coculture de cellules endothéliales et ostéoblastes est présentée comme une alternative prometteuse en ingénierie tissulaire osseuse¹⁶³.

Au sein de notre Unité de Recherche, différents travaux ont montré que la coculture directe entre des cellules endothéliales de type HUVECs et les SCAPs entraînait une régulation du phénotype ostéoblastique avec une augmentation des marqueurs ostéoblastiques : activité PAL et production de collagène de type I^{164,165}. De plus, les HUVECs et les SCAPs en coculture sont capables d'établir des jonctions communicantes entre elles et ceci principalement grâce aux connexines 43, de la même manière qu'avec les HBMSC³⁶ (Figure 20).

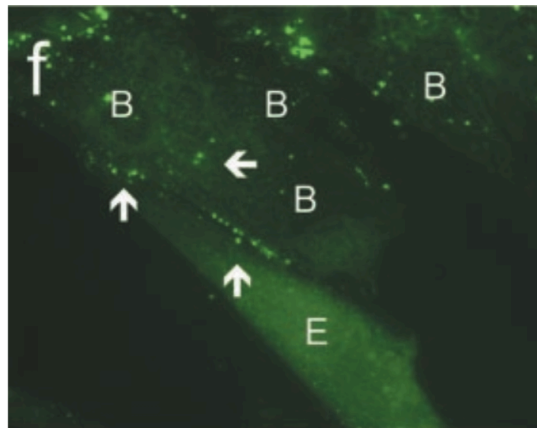


FIGURE 20 : EXPRESSION DE LA CONNEXINE 43 AU SEIN D'UNE COCULTURE HUVEC/HBMSC
D'après Villars *et al.* ³⁶

Les flèches blanches désignent le marquage Cx43 entre cellules voisines ; B, Bone Cell ; E, Endothelial Cell

Des expérimentations *in vitro* menées par Liu *et al.* ont montré que des cellules endothéliales en coculture avec des ostéoblastes étaient capables de former, dans des matrices tridimensionnelles, des structures de type « capillaire-like »⁹⁹. D'autres études ont démontré que les réseaux vasculaires *in vivo* produits par une population en monoculture sont immatures et moins stables que ceux formés par des systèmes de coculture¹⁶⁶. Un des avantages de la coculture est que les deux types cellulaires sont capables de recréer l'environnement physique, chimique et biologique favorable à la formation des structures mimant des capillaires, sans nécessairement ajouter de facteurs angiogènes exogènes¹⁶⁷.

Cette coopération entre cellules endothéliales et ostéogéniques au service de la vascularisation de constructions d'ingénierie tissulaire osseuse a été montrée par des études *in vivo* précliniques¹⁶⁸. De la même manière, des études menées au laboratoire ont suggéré que la coculture de cellules endothéliales et ostéoblastiques pouvait favoriser la prévascularisation du substitut et son ostéointégration³⁵.

Plusieurs questions relatives à la prévascularisation demeurent cependant non résolues. Par exemple, il n'a pas été établi s'il était préférable de maintenir la prévascularisation *in vitro* sur des temps longs afin de permettre l'implantation d'un réseau vasculaire déjà formé, ou d'implanter la construction peu après l'ensemencement des cellules pour permettre à l'environnement *in vivo* d'aider à établir un système vasculaire fonctionnel. De plus, même si les cellules endothéliales ont le potentiel de former de nouveaux vaisseaux au sein des échafaudages qui pourraient s'anastomoser avec le système vasculaire de l'hôte lors de l'implantation *in vivo*, il est important de prendre en compte l'inclusion d'autres types cellulaires (cellules musculaires lisses, péricytes). Pour assurer la formation d'un système vasculaire fonctionnel, il faudrait donc approfondir l'approche pluricellulaire⁵⁷.

- La stimulation mécanique

Les forces mécaniques peuvent elle aussi avoir une influence sur le comportement cellulaire. En ingénierie tissulaire osseuse, il est établi que l'application de stimuli mécaniques externes peuvent augmenter la formation tissulaire osseuse, par exemple par le biais de l'utilisation de systèmes de bioréacteurs et/ou de perfusion^{169,170}. Il a été montré que l'initiation et la progression des processus d'angiogenèse, de même que la fonction des cellules endothéliales, étaient affectées par les forces hémodynamiques qui sont exercées par le flux sanguin (contraintes cycliques et shear stress)^{171,172}.

- L'utilisation de biomatériaux adaptés

En ingénierie tissulaire osseuse, les scaffolds servent de support pour la prolifération des cellules à l'origine de la formation de l'os et l'établissement d'un réseau vasculaire. La vascularisation est formée *via* l'adhésion, la migration et la fonctionnalité des cellules endothéliales ensemencées au sein du scaffold. Le type de biomatériau utilisé et les propriétés du scaffold jouent un rôle important dans la formation du tissu osseux de même que la création de réseaux vasculaires.

L'élaboration d'un scaffold avec des propriétés adaptées est ainsi essentielle pour faciliter la mise en place d'une vascularisation au sein des constructions d'ingénierie tissulaire osseuse. En particulier, son architecture en termes de porosité, taille de pore moyenne et interconnectivité des pores, est cruciale pour la survie cellulaire, la prolifération et la formation de tissu osseux en trois dimensions *in vitro* et *in vivo*, ainsi que sa vascularisation¹⁷³. Les pores sont nécessaires à la formation du tissu osseux car ils permettent la migration et la pénétration des cellules, ainsi que la diffusion des nutriments pour assurer la survie cellulaire. En général, les scaffolds dont la taille des pores est supérieure à 50 µm peuvent permettre la libération de nutriments et d'oxygène, et l'élimination des déchets métaboliques. Ils peuvent également entraîner une diminution de l'attachement cellulaire et de la signalisation intracellulaires, tandis que ceux contenant des pores inférieurs à 10 µm ont l'effet inverse¹⁷⁴. Par conséquent, la fabrication de scaffolds contenant à la fois des macropores et micropores peut être bénéfique pour la formation osseuse et vascularisation¹⁷⁵.

- *Les techniques de microfabrication*

Les techniques précédentes ont été largement utilisées pour améliorer le processus de vascularisation pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Cependant, ces méthodes résultent souvent en la formation de réseaux vasculaires non organisés avec une faible capacité d'intégration au sein de l'organisme de l'hôte. Il est souhaitable d'utiliser d'autres techniques pour pré-organiser les réseaux vasculaires de manière similaire à l'hôte¹⁵². Les techniques de microfabrication semblent particulièrement adaptées pour répondre à ce besoin d'organisation précise des éléments biologiques les uns par rapport aux autres.

3. BIOFABRICATION ET BIOIMPRESSION EN INGENIERIE TISSULAIRE

Les techniques conventionnelles ont montré de nombreuses limites, liées à un mauvais contrôle de l'ensemencement cellulaire, un temps de maturation allongé, des difficultés à maîtriser précisément la position et la densité des cellules dans le matériau, ainsi que l'absence d'une vascularisation suffisante. C'est dans ce contexte que l'impression 3D et la Biofabrication ont émergé dans le domaine de l'Ingénierie Tissulaire.

.....
Les parties destinées aux concepts de Bioimpression et de Bioimpression Assistée par Laser pour l'Ingénierie Tissulaire ont fait l'objet de deux chapitres d'ouvrages internationaux publiés en 2017-2018 :

- **Laser-Assisted Bioprinting for Tissue Engineering**, Kérourédan *et al.*

Livre "*Biomaterials and Nanotechnology for Tissue Engineering*". Edité par S.Swaminathan, K.Uma Maheswary, S.Anuradha. Publié par CRC Press.

- **Laser-Assisted Bioprinting of Cells for Tissue Engineering**, Kérourédan *et al.*

Livre "*Laser Printing of Functional Materials : Fundamentals & Applications in Electronics, 3D Microfabrication and Biomedicine*". Edité par A.Piqué et P.Serra. Publié par Wiley-WCH

Ces deux chapitres de livre sont disponibles respectivement dans les Annexes 1 et 2.

.....

3.1. La Fabrication additive : de l'Impression 3D à la Biofabrication

3.1.1. Définitions, historique et concept

C'est en 1983 que Charles Hull a imprimé pour la première fois un objet en trois dimensions grâce à la technique de la stéréolithographie. Depuis cette date, l'impression tridimensionnelle n'a cessé de se répandre dans de nombreux domaines, comme la fabrication, les produits grand public, la microtechnique, les arts, l'industrie alimentaire et l'aéronautique. La médecine régénérative ne fait pas exception à la règle.

L'association des techniques de conception et de fabrication assistées par ordinateur (CAD-CAM) aux méthodes d'ingénierie tissulaire a conduit au développement de nouvelles technologies dans les domaines de l'Impression 3D (ou « Prototypage rapide ») et de la Biofabrication, regroupés sous le nom de « Fabrication additive ».

Les techniques de CAD -CAM ont initialement été utilisées en ingénierie tissulaire pour l'élaboration de scaffolds par impression 3D, c'est-à-dire en fabrication « couche par couche » contrairement aux méthodes conventionnelles basées traditionnellement sur le moulage ou l'usinage de matériaux¹⁷⁶. Cette méthode avait pour but de reproduire l'architecture des tissus à la fois au niveau macroscopique (forme générale des organes ou tissus) et microscopique (organisation tridimensionnelle des composants du tissu)⁵⁵. L'objectif était ainsi de réaliser un modèle avec une morphologie contrôlée, mais aussi améliorer l'ensemencement cellulaire et la vascularisation au sein de la construction par la maîtrise de l'architecture interne (porosité, interconnexions, travées vasculaires) réalisée sur-mesure.

Cependant, restant une approche « basée sur le scaffold », l'impression 3D ne permettait pas de résoudre entièrement les problématiques de colonisation du matériau par les cellules (prolifération, migration) et de vascularisation.

Pour pallier ces inconvénients, le concept de Biofabrication a émergé comme une approche alternative en ingénierie tissulaire¹⁷⁷. Il recouvre à la fois la Bioimpression et le Bio-Assemblage découlant d'une approche « Bottom-up » contrairement à l'ingénierie tissulaire conventionnelle qui est d'inspiration « Top-Down » (Figure 21). L'approche Bottom-up consiste à élaborer des structures tridimensionnelles couche par couche, tandis

que l'approche Top-Down vise à utiliser des matrices tridimensionnelles qui seront colonisées dans un second temps par les cellules ou facteurs de croissance. La Bioimpression et le Bio-Assemblage diffèrent par le type d'unités fonctionnelles assemblées ainsi que les technologies de biofabrication utilisées.

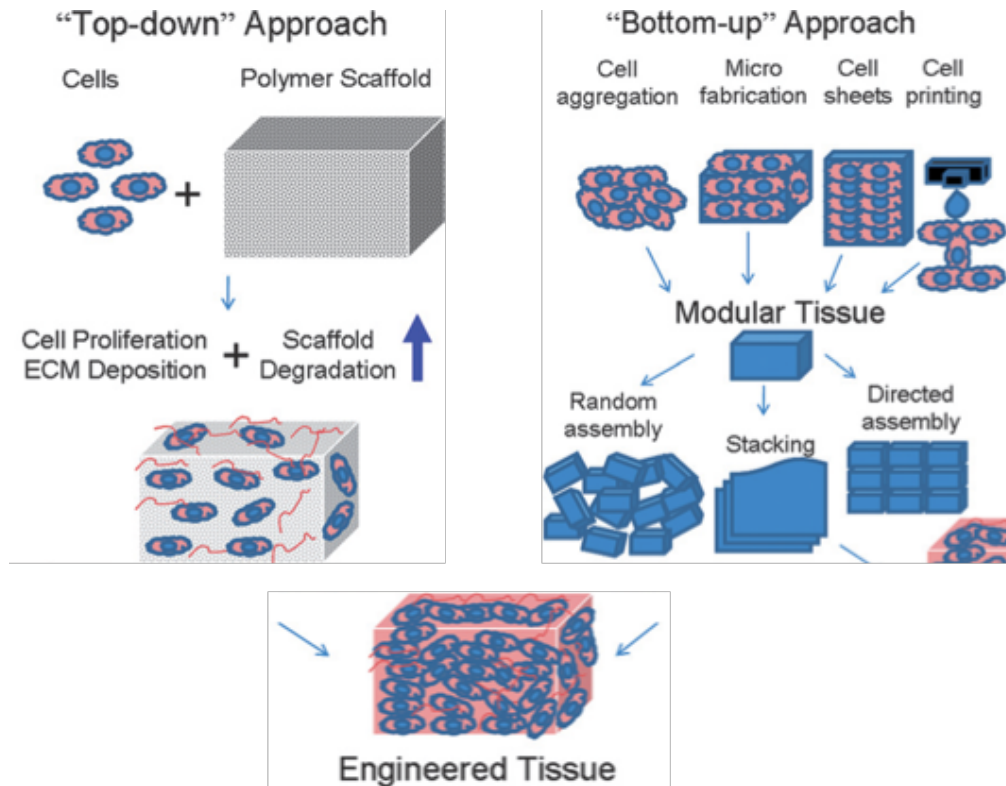


FIGURE 21 : ILLUSTRATION DES APPROCHES "TOP-DOWN" ET "BOTTOM-UP" EN INGENIERIE TISSULAIRE

Adapté de Nichol et Khademhosseini ¹⁷⁸

3.1.2. L'Impression 3D ou Prototypage rapide

L'Impression 3D ou Prototypage rapide permet d'organiser les scaffolds en trois dimensions, en couche par couche, à partir de matériaux inertes ou bioactifs. Le pilotage informatique a pour avantage de pouvoir créer des constructions de formes complexes et adaptées précisément au défaut osseux grâce à l'analyse des images radiologiques¹⁷⁹. L'automatisation de la procédure permet un gain en temps, en précision et en reproductibilité, comparativement aux méthodes non automatisées. Les principales technologies de prototypage rapide reposent sur les méthodes suivantes : la polymérisation laser, l'impression et l'extrusion.

L'une des premières méthodes de prototypage rapide basée sur la polymérisation laser est la stéréolithographie (SLA). Son principe est basé sur la photopolymérisation sélective d'une résine liquide par un laser UV, couche par couche. La polymérisation est ensuite finalisée au sein d'un four à UV^{55,180}. Malgré sa résolution limitée, cette méthode a déjà été largement utilisée pour la modélisation et la planification d'interventions chirurgicales¹⁸¹ (Figure 22). En parallèle, le frittage sélective par Laser (SLS) est basé sur un laser à CO2 qui va « fritter » ou lier une poudre (polymères, céramiques, métaux ou composites) couche par couche¹⁷⁶. Il permet de contrôler parfaitement l'architecture externe et interne du scaffold.

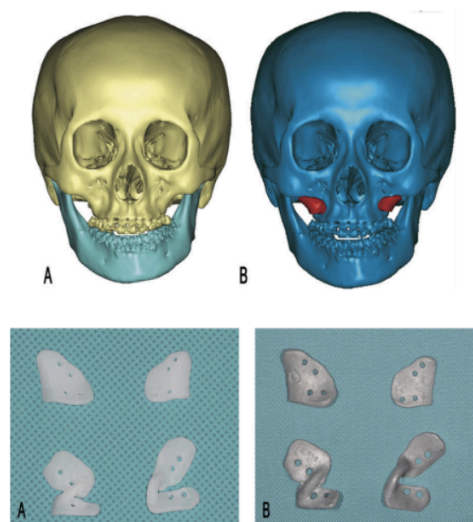


FIGURE 22 : PLANIFICATION D'UNE CHIRURGIE ORTHOGNATIQUE ET REALISATION DE PLAQUES D'OSTEOSYNTHESE SUR MESURE PAR STEREOGRAPHIE

Adapté de Bai *et al.*¹⁸¹

Le prototypage rapide peut également être basé sur l'impression d'une « colle » permettant l'assemblage de particules de poudre (céramiques, métaux, polymères) placées dans un bac receveur, et permettant l'obtention d'une structure tridimensionnelle (Figure 23). L'inconvénient majeur de cette méthode est la poudre résiduelle qu'il convient d'éliminer par brossage une fois le scaffold finalisé¹⁸². Cette technique a été largement utilisée en ingénierie tissulaire¹⁷⁶.

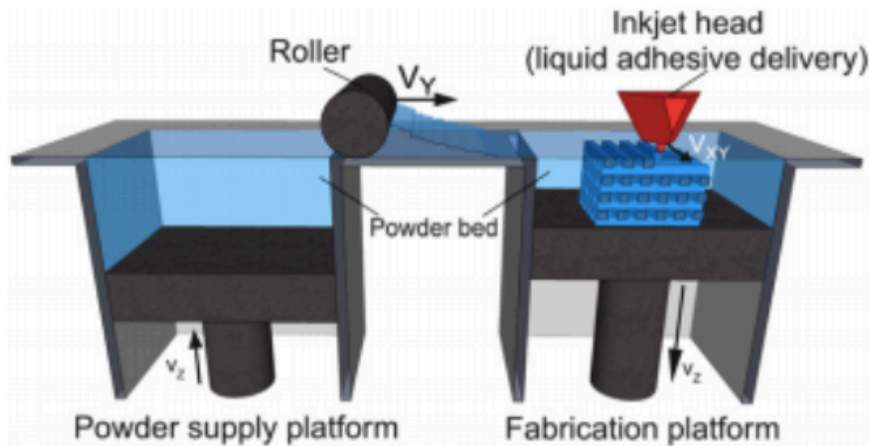


FIGURE 23 : DISPOSITIF DE PROTOTYPAGE RAPIDE PAR IMPRESSION
D'après Billiet *et al.* ¹⁸²

D'autres méthodes sont basées sur l'extrusion de matériaux en phase plastique. Parmi elles, la plus répandue est le Modelage de Matériau en Fusion (FDM) qui consiste à déposer un matériau en fusion sous forme de lignes parallèles sur chaque plan, qui se solidifie ensuite par diminution de la température. Ces structures tridimensionnelles présentent une architecture interne contrôlée (taille des pores, porosité, interconnectivité)¹⁷⁶ (Figure 24). Le principal inconvénient lié à cette méthode est que les cellules ne peuvent pas être incluses d'emblée au sein de la structure du fait des températures élevées et de la toxicité des polymères utilisés.

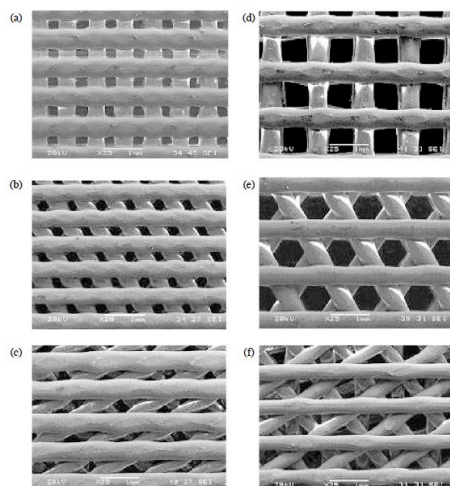


FIGURE 24 : PRODUCTION DE SCAFFOLDS DE DIFFERENTES POROSITES PAR FUSED DEPOSITION MODELING
D'après Leong *et al.* ¹⁷⁶

Bien que le prototypage rapide apporte un bénéfice certain à l'échelle macroscopique en termes d'adaptation du matériau au défaut osseux, le manque de contrôle de la distribution des cellules ou des facteurs de croissance au sein de ces matrices constitue l'une des principales limites. La Biofabrication a ainsi émergé afin de répondre à ces impératifs de résolution à l'échelle microscopique et permettre le contrôle du microenvironnement à l'échelle cellulaire.

3.1.3. La Biofabrication : Bioimpression et Bio-Assemblage

Le terme de Biofabrication a été introduit en 1994 et concernait alors la fabrication des perles plates¹⁸³. Il a ensuite été utilisé en 2003 pour qualifier le processus de formation de l'émail au niveau des dents de mammifères¹⁸⁴. Outre la description de ces phénomènes de biominéralisation, d'autres domaines comme les biotechnologies ou la biologie de synthèse ont fait appel au terme de « Biofabrication » en parlant plus simplement de « mariage entre la biologie et la microfabrication »¹⁸⁵. D'une manière générale, la Biofabrication peut se définir comme « l'utilisation d'un procédé pour engendrer un produit défini présentant une fonction biologique »¹⁸⁶. En ingénierie tissulaire, le domaine de la Biofabrication recouvre la Bioimpression et le Bio-Assemblage.

Le Bio-Assemblage s'appuie sur le développement embryonnaire des tissus et la capacité des différents composants à s'organiser en 3D de façon autonome. Il consiste à élaborer des constructions à partir d'unités multicellulaires sous la forme d'agrégats cellulaires, de fibres, de feuillets, ou de structures plus complexes, comme des organoïdes ou microtissus, comprenant les cellules et leur matrice extra-cellulaire. Ces éléments peuvent être associés par auto-assemblages cellulaires ou par approche modulaire, en utilisant des briques élémentaires composées de cellules associées à des biomatériaux⁵⁰. Ces unités sont générées essentiellement à partir de technologies telles que des moules obtenus par microfabrication ou la microfluidique, suivis d'une fusion et d'une maturation¹⁸⁶ (Figure 25).

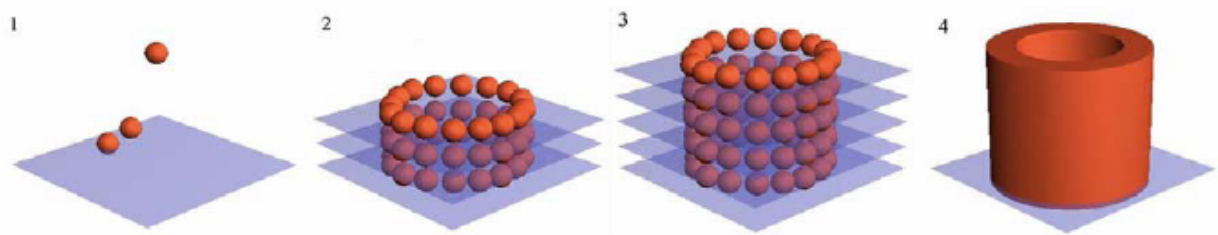


FIGURE 25 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROCEDE DE BIO-ASSEMBLAGE
D'après Mironov *et al.* ¹⁸⁷

De son côté, la Bioimpression est définie comme « un dépôt, transfert et modélisation, couche par couche, de façon automatisée, de matériaux biologiquement pertinents »^{177,188}. En 2010, Fabien Guillemot décrit la Bioimpression comme « l'utilisation de technologies d'impression assistées par ordinateur permettant l'arrangement et l'assemblage de structures vivantes ou non, avec une organisation en deux ou trois dimensions, afin de produire des structures composites qui pourront être utilisées pour des applications en médecine régénératrice, pour des études pharmacocinétiques ou bien pour des travaux fondamentaux de biologie cellulaire »¹⁸⁹. Parmi ces matériaux biologiques, les cellules peuvent être organisées à l'aide de technologies de bioimpression afin de développer un tissu, avec un meilleur contrôle de sa structure et de sa fonction¹⁹⁰. Du fait de cette capacité à reproduire le microenvironnement cellulaire et l'organisation tissulaire, la Bioimpression constitue un changement de paradigme par rapport aux approches traditionnelles de l'ingénierie tissulaire.

Au cours des dernières années, de nombreuses expériences ont été menées dans le domaine de la Biofabrication, avec un essor constant des méthodes de bioimpression cellulaire et des publications correspondantes. Cependant, la bioimpression cellulaire est loin d'être récente.

En 1988, Klebe a décrit pour la première fois une technique appelée « cytoscription » permettant le micro-positionnement de cellules selon des modèles définis¹⁹¹. Suite à cette première étude, un grand nombre de technologies d'impression de cellules ont été développées. Parallèlement aux approches traditionnelles de l'ingénierie tissulaire, telles que l'ensemencement homogène de cellules dans des échafaudages préfabriqués ou des méthodes lithographiques, de nouvelles approches sont apparues basées sur le jet d'encre, la microextrusion et la bioimpression assistée par laser^{192,193} (Figure 26). Ces nouvelles

technologies ont rapidement enthousiasmé les médias, qui utilisaient plus volontiers le terme « impression d'organes » que « impression de cellules », car ils montraient la capacité d'imprimer des cellules viables en trois dimensions¹⁷⁷. En réalité, des progrès importants sont encore nécessaires pour obtenir non seulement une simple construction cellulaire, mais également un tissu ou un organe fonctionnel grâce aux technologies de bioimpression.

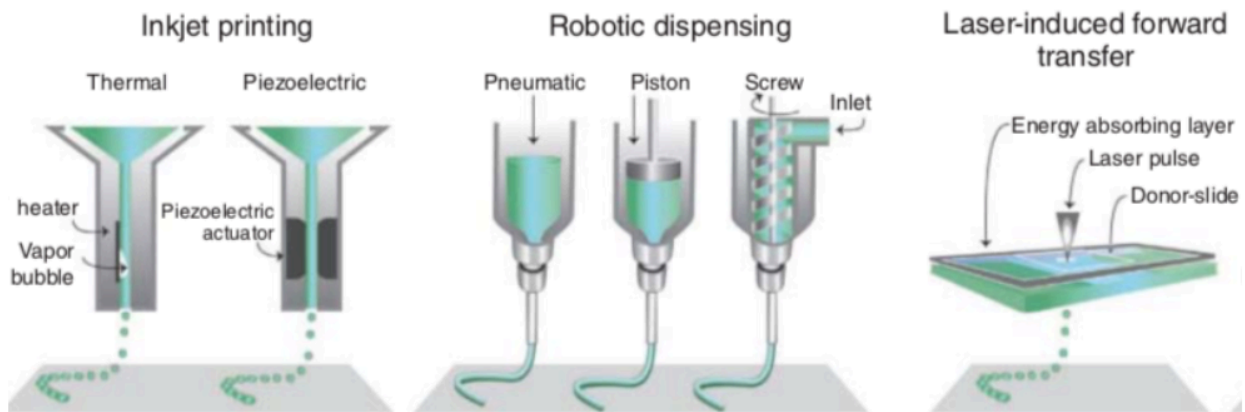


FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES TROIS PRINCIPALES TECHNOLOGIES UTILISEES EN BIOIMPRESSION

Adapté de Malda *et al.*¹⁹³

Les technologies à base de jet d'encre et de micro-extrusion sont dérivées de systèmes existants qui n'étaient initialement pas destinés à des applications biologiques¹⁹⁴. Les premières imprimantes à jet d'encre utilisées pour imprimer des matériaux biologiques ont été obtenues à partir d'imprimantes à jet d'encre modifiées disponibles dans le commerce¹⁹⁵. Initialement limitées aux constructions bidimensionnelles, le développement de nouveaux biomatériaux, tels que les gels thermosensibles, a permis de créer des constructions tridimensionnelles¹⁹⁶. Leur mécanisme est basé sur des forces thermiques ou acoustiques qui permettent l'éjection des gouttes du biomatériau sur un substrat. Cette technologie présente l'avantage d'être simple d'utilisation et de faible coût. Cependant, elle présente plusieurs inconvénients, notamment lorsqu'elle est appliquée à l'impression de cellules, à savoir l'obstruction des buses d'impression, l'exposition des cellules à des contraintes mécaniques au niveau de l'orifice (contraintes de cisaillement), le risque de contamination et la faible directivité des gouttelettes¹⁹⁷. Après le développement des imprimantes à jet d'encre, des techniques basées sur l'extrusion (ex. seringue, micropen, bioplotter,...) mettant en jeu un système pneumatique ou mécanique) ont également été adaptées à la bioimpression cellulaire, permettant la création d'une grande variété de

modèles tissulaires tels que le foie, les valves aortiques, ou encore les réseaux vasculaires¹⁹⁸⁻²⁰² (Figure 27). Bien que cette technologie soit également facile à utiliser et peu coûteuse, elle partage les mêmes inconvénients que l'impression par jet d'encre, liés à la présence d'un orifice.

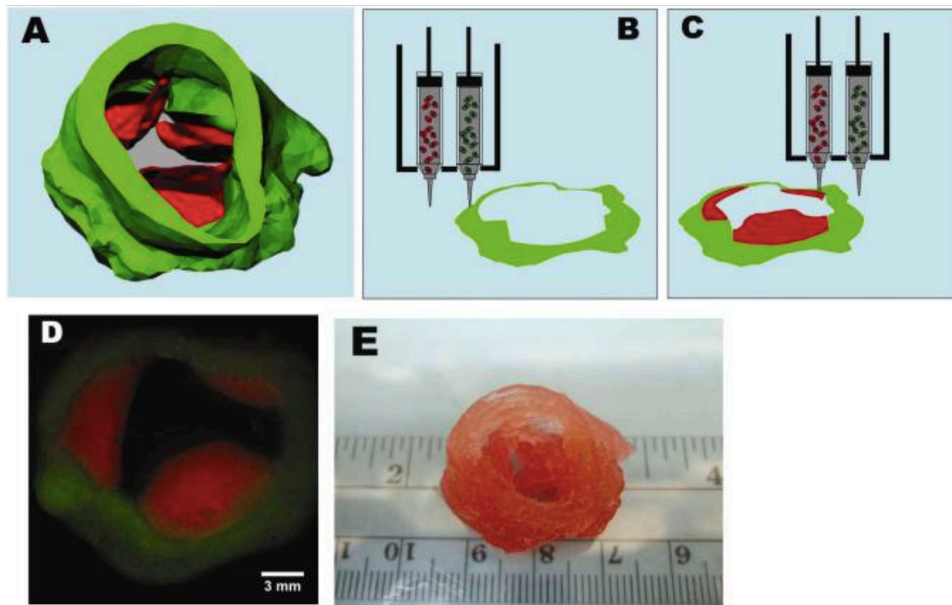


FIGURE 27 : BIOIMPRESSION D'UN CONDUIT AORTIQUE AVEC VALVE PAR EXTRUSION
D'après Duan *et al.*²⁰¹

Outre les techniques de bioimpression basées sur le jet d'encre et l'extrusion, les technologies d'impression au laser impliquent des méthodes de prototypage rapides et résolues permettant l'organisation de biomatériaux dans une conformation définie pour des applications d'ingénierie tissulaire. Le LAB, en particulier, est devenu une méthode pertinente pour l'impression de cellules vivantes par une technique ne nécessitant pas le passage des éléments biologiques dans un orifice.

3.2. La Bioimpression Assistée par laser

3.2.1. Histoire du LIFT

Les premières expérimentations utilisant la procédure de « Laser-Induced Forward Transfer » (LIFT) ont été réalisées par Bohandy *et al.* dans les années 80 pour déposer des particules de Cuivre et d'Argent à l'aide d'un laser excimer ou Nd :YAG²⁰³. L'impulsion

laser était focalisée sur un substrat donneur recouvert du métal d'intérêt et induisait l'évaporation de cette couche. Le matériau se recondensait ensuite sur le substrat receveur (Figure 28).

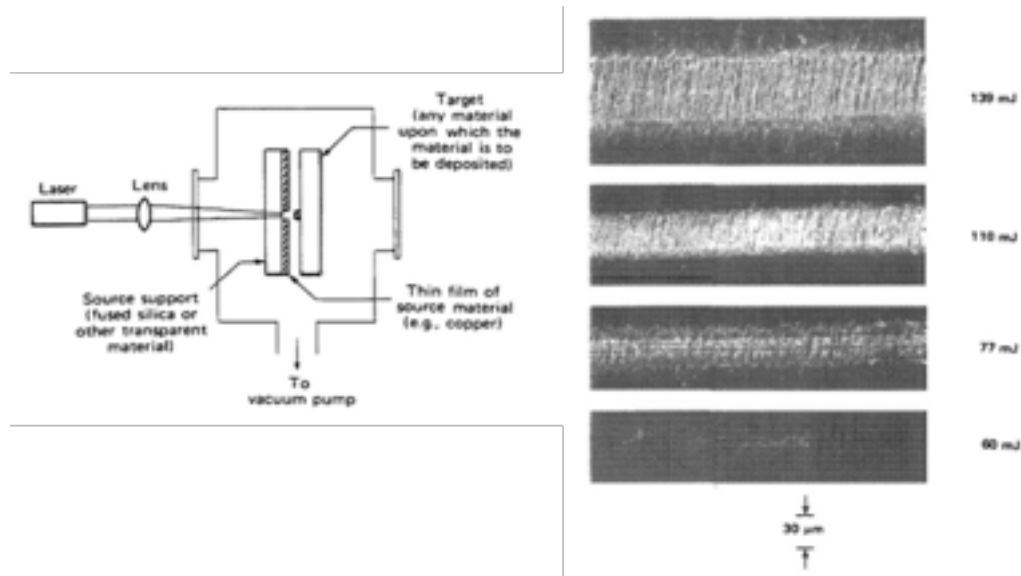


FIGURE 28 : PREMIERES EXPERIMENTATIONS UTILISANT LA PROCEDURE DE "LIFT"
D'après Bohandy *et al.* ²⁰³

Le LIFT a ainsi été utilisé en premier pour transférer des métaux²⁰³, puis a été étendu aux dépôts d'oxydes²⁰⁴. Dans les années 2000, le LIFT a été adapté pour imprimer des biomolécules²⁰⁵, des protéines²⁰⁶, de l'ADN²⁰⁷, des hydrogels²⁰⁸ et des cellules^{206,209-216}.

Suite aux premières expérimentations utilisant le LIFT, plusieurs méthodes ont émergé ; parmi elles le « matrix-assisted pulsed-laser evaporation direct-writing » (MAPLE-DW) et l'« absorbing film-assisted LIFT » (AFA-LIFT) sont les plus populaires.

MAPLE-DW a été développé à partir du LIFT et MAPLE en 1999 par Piqué *et al.*²¹⁷. MAPLE est un procédé inspiré par la méthode « pulsed-laser deposition » (PLD)²¹⁸ et permet de déposer des couches fines de molécules (notamment matériaux organiques et polymères) qui ne peuvent pas être réalisées par PLD. MAPLE implique le dépôt d'un matériau qui a été mélangé ou dissout selon une forme particulière dans un matériau matriciel de type solvant. La solution est appliquée sur un substrat ou congelée (pour contrer la volatilité du solvant) afin de former une cible. Ensuite, la matrice est évaporée par plusieurs impulsions laser et libère la solution d'impression. L'énergie libérée par l'évaporation de la matrice propulse le matériau vers un substrat receveur. Enfin, le matériau donneur est imprimé en couche mince sur le substrat receveur.

MAPLE-DW est une variante de MAPLE avec les capacités d'écriture directe de LIFT. Cette technique repose sur l'utilisation d'une matrice dans le substrat du donneur qui favorise l'absorption et le transfert de l'énergie laser^{211,219,220}. La matrice est mélangée de manière homogène au matériau donneur, formant une solution. Cette solution est appliquée en couche mince sur une lame de donneur. Ensuite, un laser pulsé est concentré à travers ce substrat pour évaporer la matrice et transfère le matériau donneur sur un substrat récepteur, face au substrat donneur. MAPLE-DW a permis l'impression de métaux²²¹, de matériaux organiques²²² et de biomatériaux²²³, parmi lesquels des enzymes, des protéines, des cellules et des tissus²²⁴. Pour la bioimpression cellulaire, la matrice peut être un milieu de culture ou une surface adhérente telle qu'un hydrogel ou de la matrice extracellulaire^{211,214}.

L'acronyme AFA-LIFT a été donné par Hopp *et al.* en 2005²²⁵ et désignait la même technique que l'impression laser biologique (BioLP)²¹⁰ ou couche à libération dynamique LIFT (DRL-LIFT)²²⁶. Le but de cette technique était d'éviter l'exposition directe au laser du matériau donneur, grâce à une couche absorbante, et de rendre la conversion d'énergie plus efficace en limitant les variations d'impulsion à impulsion. Dans la procédure AFA-LIFT, la couche absorbante est généralement une couche métallique mince (50-100 nm) déposée sur le substrat donneur par évaporation sous vide. Les métaux, les céramiques, les polymères et les liquides peuvent être transférés sans dommage avec AFA-LIFT. Cependant, on peut observer une contamination résiduelle du matériau déposé par la couche absorbante si la couche absorbante n'est pas complètement évaporée par le processus²²⁷.

Pour réduire ce problème de contamination, une couche de polymère de triazène a été utilisée comme couche absorbante de laser UV dans une configuration AFA-LIFT^{228,229}. Il a été démontré que cette couche limitait la contamination par les particules sur le substrat récepteur. Cependant, en raison de la faible température de décomposition du polymère de triazène, un nombre limité de matériaux donneurs peut être utilisé avec cette couche absorbante²³⁰. Pour l'impression de biomatériaux, une couche absorbante métallique a ainsi été largement privilégiée^{205,225,231}.

Un résumé des principales caractéristiques des différentes technologies de bioimpression laser est fourni ci-dessous (Figure 29), ainsi qu'un schéma simplifié du principe de chacune des méthodes évoquées (Figure 30).

Technologies	Major characteristics
Laser guided direct writing (LGDW)	Weakly focused continuous laser (800 nm wavelength) Propulsion of individual cells from a liquid cell suspension toward a receiving surface through optical forces
Laser induced forward transfer (LIFT)	High-powered pulsed laser Print ribbon coated with a thin layer of metal
<i>Modified LIFT techniques</i>	
Matrix assisted pulse laser evaporation direct write (MAPLE-DW)	Low-powered pulsed laser (UV, near-UV) Matrix-embedded transfer layer to promote light absorption and energy transfer
Absorbing film assisted-LIFT (AFA-LIFT)	Presence of a thick absorbing layer between the ribbon and the cells (100 nm)
Biological laser printing (BioLP)	Presence of a thick absorbing layer between the ribbon and the cells (75–100 nm) Motorized receiving stages and CCD camera

FIGURE 29 : PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES TECHNOLOGIES DE BIOIMPRESSION LASER
D'après Kérourédan *et al.* ²³²

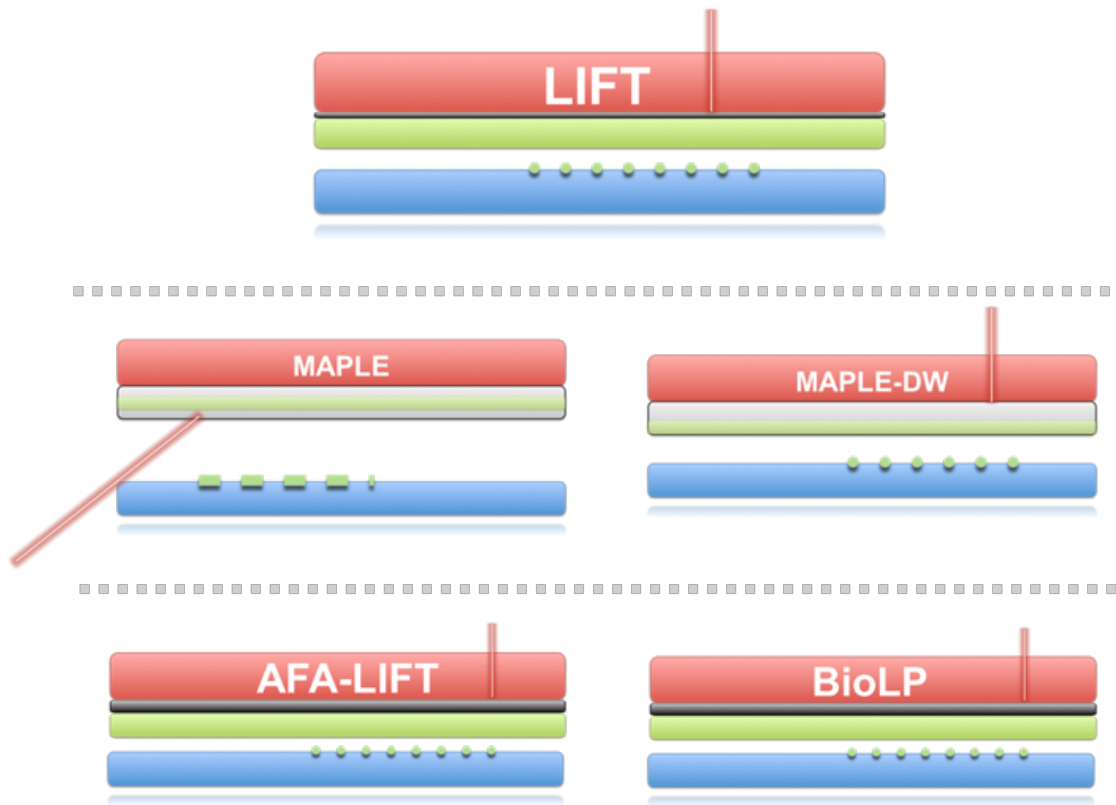


FIGURE 30 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PRINCIPE GENERAL DES DIFFERENTES TECHNOLOGIES DE BIOIMPRESSION LASER

3.2.2. Principes généraux et physiques des technologies LIFT

Comme vu précédemment, le LIFT consiste à transférer un élément de matière d'un substrat donneur vers un substrat receveur, grâce à une impulsion laser. En utilisant une configuration de la bio-impression assistée par laser (LAB), l'élément de matière transféré est sous la forme liquide et s'appelle « bioencres » (Figure 31).

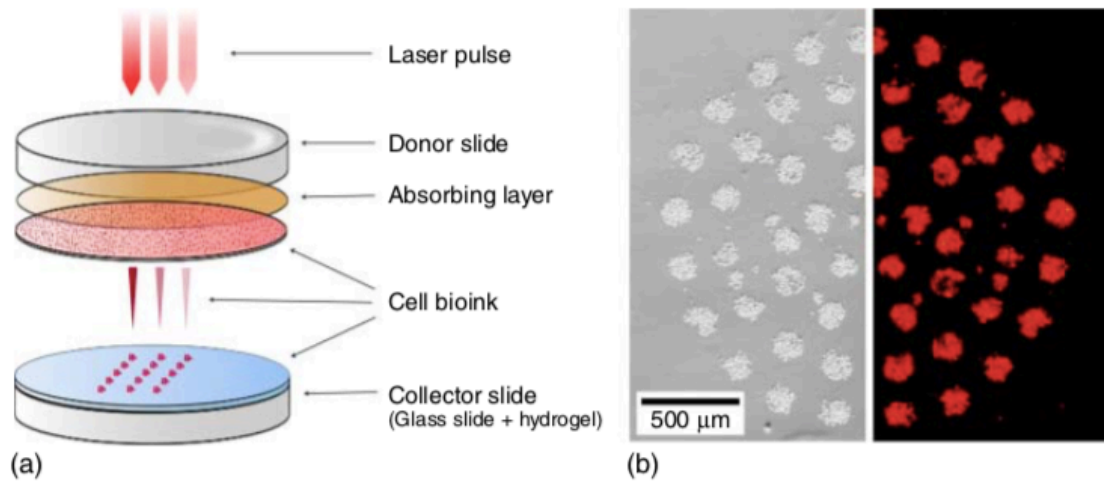


FIGURE 31 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DISPOSITIF LAB ET OBSERVATION MICROSCOPIQUE D'UN MOTIF BIOIMPRIME PAR LAB
D'après K erour edan *et al.* ²³²

L'évolution temporelle du processus d'impression LIFT peut être observée à l'aide de l'imagerie résolue en temps (TRI) (Figure 32). Différentes étapes peuvent être identifiées. Au début du processus, la surface du liquide est déformée par une bulle qui grossit progressivement avec le temps, jusqu'à effondrement et formation d'un jet de liquide. Ensuite, le jet devient plus long et devient plus étroit jusqu'à ce qu'il se divise en plusieurs gouttelettes.

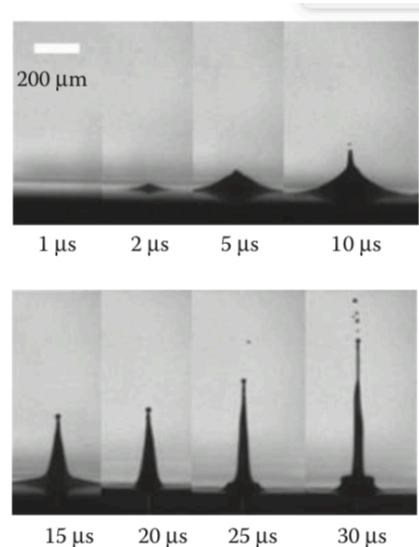


FIGURE 32 : IMAGES RESOLUES EN TEMPS DE LA FORMATION DU JET PAR LE PROCEDE LIFT
D'après Duocastella *et al.* ²³³

Le principe physique a été décrit à plusieurs reprises dans la littérature²³⁴⁻²³⁸. En bref, l'impulsion laser est absorbée par la couche de conversion d'énergie située à l'interface entre le donneur et la bioencres, ce qui conduit à la formation d'une bulle de gaz. Le diamètre de la bulle oscille et augmente jusqu'à atteindre un diamètre maximal, déformant progressivement l'interface liquide. Cette dynamique de bulle dans un volume de liquide est décrite par l'équation de Rayleigh-Plesset²³⁹.

Les forces de pression internes diminuent progressivement avec la dilatation de la bulle. Avec cette expansion, il n'y a plus d'équilibre entre les forces internes et externes, ce qui entraîne l'effondrement de la bulle et la formation du jet. Le jet devient plus haut et plus mince et se brise en gouttelettes ; cette perturbation est causée par l'instabilité de Rayleigh-Plateau.

Trois régimes de jets différents peuvent être identifiés, en fonction de l'énergie du laser et de la viscosité de la bioencres^{238,240} (Figure 33).

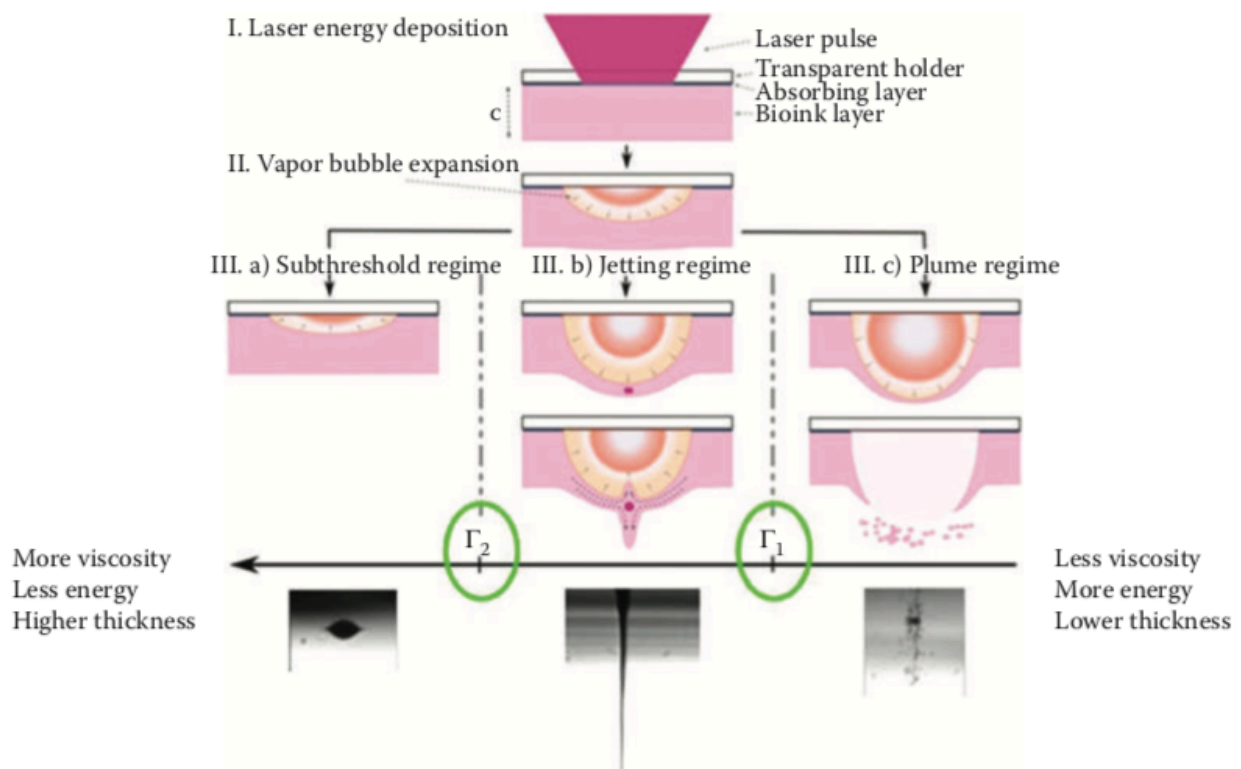


FIGURE 33 : REGIMES DE JET EN FONCTION DE L'ENERGIE DU LASER ET DE LA VISCOSITE DE LA BIOENCRES
D'après Guillemot *et al.* ²³⁶

En régime de sous-seuil (*subthreshold regime*), il n'y a qu'une déformation de surface et aucun jet n'est formé. Ce régime est rencontré pour une faible énergie, une viscosité élevée et une épaisseur de bioencres élevée. Dans le régime de jet (*jetting regime*), le jet est bien défini jusqu'à se briser en gouttelettes. Ce régime peut être observé pour des valeurs intermédiaires d'énergie, de viscosité et d'épaisseur de bioencres. En régime plume (*plume regime*), la bulle de liquide explose. Ce régime peut être observé en cas d'utilisation d'une énergie d'impulsion élevée, d'une viscosité faible de la bioencres et d'une épaisseur faible de bioencres.

3.2.3. Matériels et Méthodes pour le LAB

Le dispositif LAB est basé sur un faisceau laser focalisé sur une lame donneuse (« ribbon ») et un substrat receveur (« substrate ») (Figure 34).

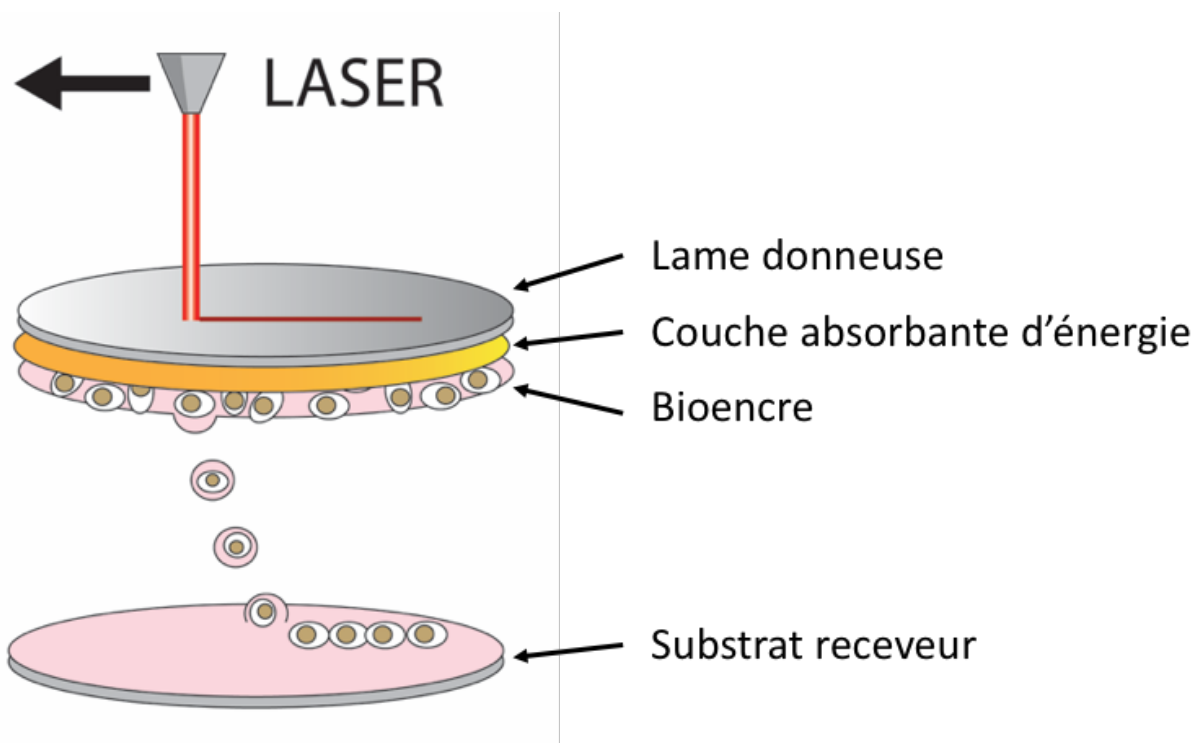


FIGURE 34: ILLUSTRATION DU PROCÉDE DE BIOIMPRESSION ASSISTÉE PAR LASER
D'après Catros *et al.* ²⁴¹

Différentes impulsions laser peuvent être utilisées en fonction du type de procédure. Une couche absorbante doit être utilisée sur le substrat donneur lorsqu'un laser nanoseconde est utilisé dans le dispositif. En effet, la formation d'une bulle de cavitation est nécessaire pour initier le processus de dépôt²⁴² et l'intensité du laser n'est pas suffisante avec une impulsion nanoseconde pour créer la bulle sans couche absorbante²⁴³. Un laser avec une durée d'impulsion femtoseconde peut être utilisé avec ou sans la couche absorbante²⁴⁴. De plus, la nature de la couche absorbante peut orienter le choix de la longueur d'onde du laser, si le matériau est plus absorbant pour une longueur d'onde en particulier²⁴⁰. Les longueurs d'onde dans le proche infrarouge sont souvent préférées aux UV pour éviter toute altération des propriétés biologiques du matériel du donneur, c'est-à-dire une distorsion potentielle de l'ADN sous l'action des UV²³¹. Différents types de lasers ont été utilisés pour la bio-impression: le laser à excimère KrF pour le dépôt de protéines (248 nm, 15 ns)²⁴⁴; lasers à excimère pour le dépôt de cellules de mammifères (193 nm, 30 ns)²¹²; laser à excimère femtoseconde basé sur un laser à colorant pour le dépôt de protéines (500 f, 248 nm)²⁴⁴; Laser Nd: YAG pour le dépôt de cellules endothéliales (CE) (1064 nm, 30 ns)²³¹ ; et un quadruple laser Nd: YAG pour le dépôt de protéines et de cellules (266 nm, 5 ns)²¹⁰.

La lame donneuse est généralement constituée de quartz, car elle doit être transparente à la longueur d'onde du laser pour permettre à la lumière de traverser le substrat. Comme vu précédemment, elle comprend une couche absorbante qui est vaporisée par l'impulsion laser, produisant le jet de bioencres liquide qui est transféré sur le substrat receveur. Cette fine couche absorbante de plusieurs dizaines de nanomètres peut être constituée d'or²⁴⁵, de titane²¹⁵, d'argent²²⁷ ou de polymères de triazène^{228,246}. La couche absorbante métallique est déposée sur la lame donneuse par pulvérisation cathodique sous vide²¹⁴.

Le déplacement du laser sur la lame donneuse est contrôlé par des miroirs galvanométriques (aussi appelés « scanners ») ou par déplacement de la lame donneuse sur la platine.

Le substrat receveur est généralement constitué de quartz également et peut être recouvert d'une fine couche de collagène²²⁴ pour les expériences d'impression cellulaire. Cette couche de collagène amortit l'atterrissage des cellules lors de l'impression et constitue un support pour la prolifération des cellules après l'impression. Le substrat receveur peut également être un tissu vivant tel qu'une plaie ouverte²⁴⁷.

La bioencres peut être constituée de cellules en suspension dans un milieu de culture²¹³, de l'ADN²⁴⁸, des protéines²²³ ou un biomatériau²⁴⁸. Différentes procédures ont été décrites pour déposer la bioencres sur la lame donneuse. Une pipette micrométrique peut être utilisée²³¹, ainsi qu'une enduiseuse à lame micrométrique²³⁸ afin d'étaler une fine couche de plusieurs dixièmes de microns (Figure 35). En outre, un réservoir de plusieurs centaines de microns de profondeur peut être utilisé comme donneur en cas de LAB sans couche absorbante. Dans tous les cas, la bioencres cellulaire est préparée dans des conditions stériles.

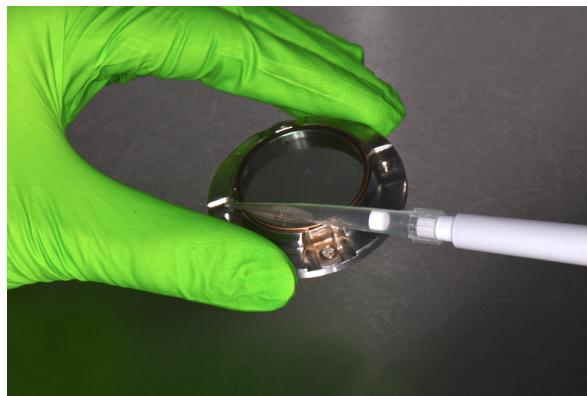


FIGURE 35 : ETALEMENT MANUEL DE LA BIOENCRES A L'AIDE D'UNE PIPETTE

La station de travail dont nous disposons au sein de l'UMR 1026 est composée d'un laser avec miroirs galvanométriques, un système de positionnement pour déplacer le substrat donneur, un logiciel dédié pour imprimer les motifs complexes souhaités et pour contrôler les paramètres d'impression laser²¹⁶. Le laser Nd: YAG (Navigator I, Newport Spectra Physics) a une durée d'impulsion de 30 ns à 1064 nm pour un taux de répétition compris entre 1 et 100 kHz. Le système d'étages motorisés à cinq axes (NovaLase, SA, Canéjan, France) est composé de trois axes dédiés au déplacement du substrat donneur avec une résolution pouvant atteindre 1 μm pour les axes x, y et 5 μm pour l'axe z (axe dans la direction de propagation du laser). Les deux autres axes sont pilotés par un carrousel de donneurs avec une résolution angulaire de 1 °. Ce carrousel, rendant possible l'utilisation de cinq donneurs différents, permet d'obtenir une impression multicolore (Figure 36).

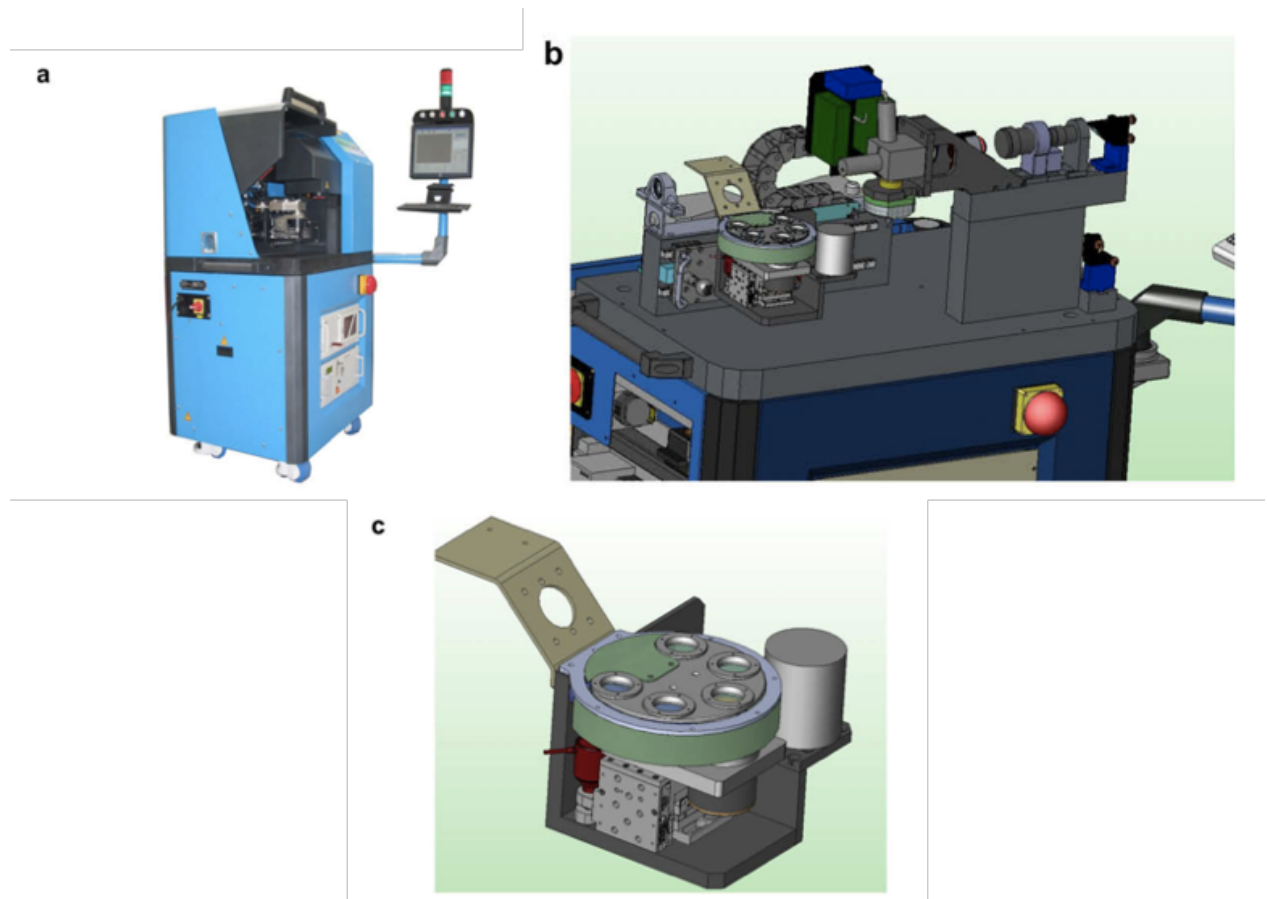


FIGURE 36 : STATION DE BIOIMPRESSION NOVALASE - BIOTIS
Adapté de Guillemot *et al.* ²⁴⁹

(a) Vue d'ensemble de la station de bioimpression, (b) Dispositif optomécanique, (c) Système de positionnement des lames donneuses sur le carrousel.

Il est essentiel pour la bioimpression de contrôler un grand nombre de paramètres, parmi lesquels l'énergie des impulsions laser, la distance entre le donneur et le récepteur, la viscosité de la bio-encre et la position du faisceau laser focalisé par rapport à l'interface air / bio-encre (Figure 37). En effet, le diamètre imprimé, lié au maximum atteint par le jet d'impression, peut varier si ces paramètres sont modifiés²⁴⁴. En outre, la viabilité des cellules imprimées est modifiée en fonction de l'énergie des impulsions²³¹.

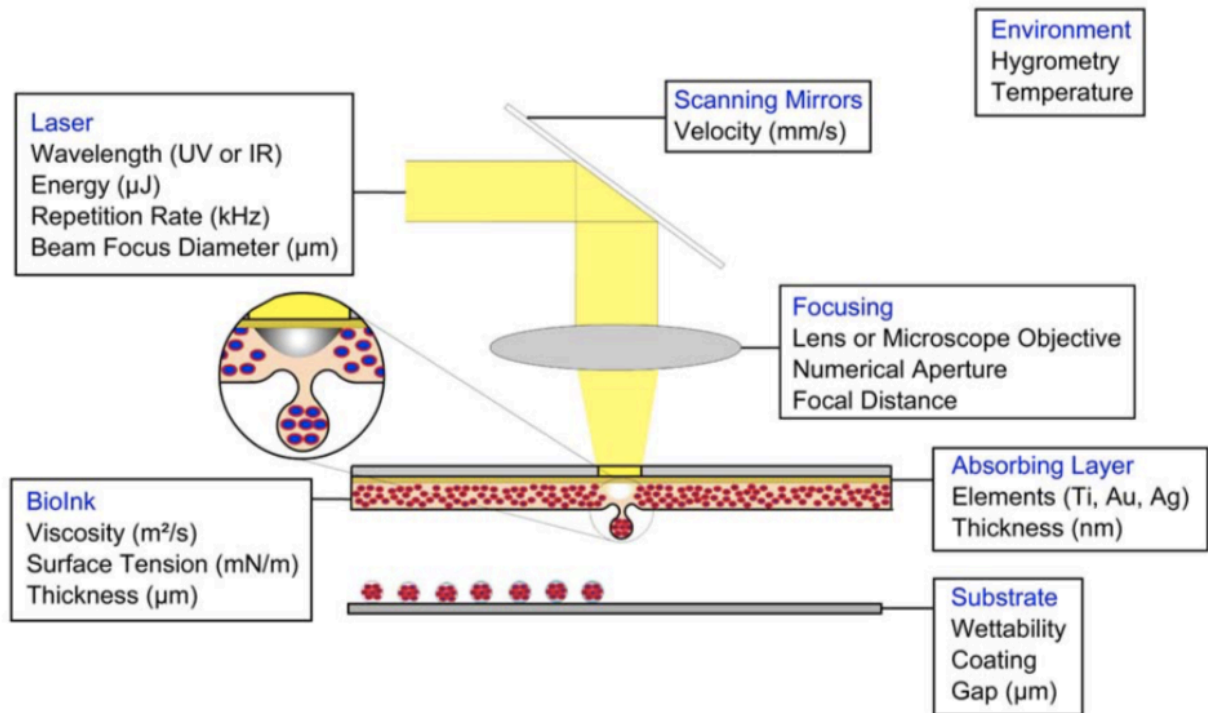


FIGURE 37 : ENSEMBLE DES PARAMETRES IMPLIQUES DANS LA BIOIMPRESSIION ASSISTEE PAR LASER
D'après Ringeisein *et al.* ²⁵⁰

3.2.4. Le LAB en Ingénierie Tissulaire

Les technologies basées sur le laser constituent des approches adaptées aux contraintes de l'ingénierie tissulaire et de la médecine régénérative. Les méthodes de Biofabrication tentent de créer des structures aussi proches que possible des organes et tissus natifs afin de fournir des constructions de tissus biologiques fonctionnels pouvant être utilisées pour des tests pharmacologiques ou des applications en médecine régénérative. Ainsi, le LAB associé à d'autres techniques de bioimpression semble être un outil pertinent pour le remplacement / la régénération de tissus ou d'organes²⁵¹, ou du moins pour une meilleure compréhension du processus de guérison. De nombreuses études utilisant LAB ont été menées en se concentrant sur plusieurs applications cliniques.

3.2.4.1. Importance de l'organisation des éléments biologiques en Ingénierie Tissulaire

Le principe du LAB est d'organiser les différents éléments du tissu au cours de sa fabrication grâce au dépôt couche par couche de cellules et de biomatériaux. Il permet de reproduire l'environnement et crée une structure de forme précise et reproductible. C'est ce contrôle de la densité cellulaire et de l'organisation tridimensionnelle (3D) du tissu qui permettra de contribuer à l'ingénierie d'un organe plus complexe dans une architecture physiologique.

D'un point de vue macro et micro, l'architecture d'un organe est définie par le positionnement des cellules ayant différentes fonctions dans leur matrice extracellulaire. Ces différents composants sont en interaction étroite les uns avec les autres et organisés avec précision en trois dimensions.

L'ingénierie de tissus biologiques *in vitro* nécessite l'utilisation d'une combinaison appropriée de cellules et de biomatériaux afin de reproduire à la fois le micro-environnement cellulaire et la micro-architecture des tissus dans le corps. La miniaturisation des structures de base du tissu permet la fabrication de structures organotypiques ayant une taille physiologiquement pertinente et une fonctionnalité potentielle.

Au cours du développement et du remodelage des tissus, le microenvironnement local des cellules définit leur comportement et leur phénotype. Cet environnement comprend des gradients de facteurs solubles et insolubles ainsi que des forces physiques. La réciprocité dynamique créée entre la forme et la fonction est pertinente pour justifier l'ingénierie d'une architecture multicellulaire reproduisant une histoarchitecture physiologique des organes humains.

Le LAB permet l'impression de différents types de cellules, en utilisant une densité cellulaire élevée et une organisation spatiale très précise. La haute résolution du LAB permet de respecter cette organisation spatiale et d'étudier les interactions cellule-cellule et cellule-matériau. De plus, LAB offre la possibilité de créer des gradients d'impression pour moduler le micro-environnement.

Même si la reproduction du microenvironnement cellulaire local est considérée comme la cible ultime pour obtenir des organes et des tissus artificiels, la structuration des cellules

est également très importante pour les expérimentations *in vitro*. Par exemple, Schiele *et al.* ont démontré le potentiel du LAB pour des applications en ingénierie tissulaire, des études de tumorigenèse, le dépistage du cancer, des études de différenciation cellulaire, des analyses d'interactions entre cellules, médicaments et biomatériaux par exemple^{190,252}.

3.2.4.2. Exemples d'application du LAB en Ingénierie Tissulaire

Les applications du LAB peuvent être envisagées dans de nombreux domaines de l'ingénierie tissulaire : élaboration de substituts cutanés pour la médecine régénérative²⁵³, impression de cellules endothéliales sur des patchs cardiaques afin de favoriser la régénération cardiaque après un infarctus²⁵⁴, organisation de cellules neuronales en trois dimensions pour favoriser la régénération nerveuse²⁵⁵.

Plusieurs études ont également fait appel à cette technologie pour l'ingénierie tissulaire osseuse et vasculaire.

- Os

Doraiswamy *et al.* ont imprimé des motifs de biocéramiques et de cellules analogues à des ostéoblastes MG63 par le biais de la technologie MAPLE-DW. L'ingénierie couche par couche de ces structures composites a permis la conception d'une construction tridimensionnelle à porosité contrôlée et la vascularisation du substitut osseux²⁵⁶. Dans le même but, Catros *et al.* ont imprimé par LAB des particules de nanohydroxyapatite (nHA) et ostéoprogéniteurs humains (isolés à partir de cellules stromales de moelle osseuse humaine) pour créer des structures composites bidimensionnelles et tridimensionnelles, démontrant ainsi la capacité de LAB à préserver la fonctionnalité du nHA et les propriétés de prolifération et de différenciation cellulaires post-impression²¹⁶.

Du point de vue des applications d'ingénierie tissulaire osseuse, Gruene *et al.* ont imprimé des MSCs intégrées dans un biomatériau matriciel (plasma et alginate) et ont démontré la préservation des capacités de différenciation des MSC en lignées ostéogéniques et chondrogéniques. Ils ont fabriqué des constructions tridimensionnelles qui ont conduit à des greffes de tissus osseux et cartilagineux autologues après deux semaines de culture, permettant une transplantation *in vivo*²⁵⁷.

Le LAB pourrait ainsi avoir des applications intéressantes en ingénierie tissulaire orthopédique et dentaire, en permettant à la structure de l'os d'être reproduite aussi

précisément que possible. Des modèles plus élaborés pourraient être produits en ajoutant d'autres types de cellules, telles que les cellules nerveuses, qui jouent un rôle important dans la régénération osseuse.

- Vaisseaux

Plusieurs études ont aussi utilisé le LAB en vue de pouvoir améliorer la perfusion tissulaire.

Nahmias *et al.* ont réussi à organiser les HUVECs sur Matrigel™ grâce à la technologie LGDW, en deux et trois dimensions. Ils ont montré la formation de structures vasculaires correspondant au motif initial²⁵⁸. Wu et Ringeisen ont également démontré la capacité de la technologie BioLP à contrôler l'architecture d'un réseau vasculaire selon un motif défini. Ils ont organisé les HUVEC et les HUVMSC dans des structures mimant les nervures d'une feuille (*branch/stem structures*) afin de promouvoir une organisation en réseau, de manière similaire à la vascularisation *in vivo*²⁵⁹ (Figure 38).

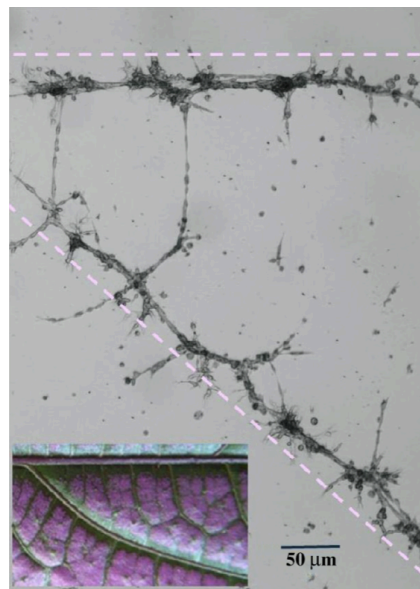


FIGURE 38 : ORGANISATION D'HUVEC ET HUVMSC PAR BIOIMPRESSION ASSISTEE PAR LASER SELON UN MOTIF DE TYPE « BRANCH/STEM STRUCTURES »
D'après Wu et Ringeisen ²⁵⁹

Observation de l'organisation du motif cellulaire en microscopie à contraste de phase, 1 jour post-impression.

En parallèle, Pirlo *et al.* ont utilisé la technologie de BioLP afin d'imprimer des HUVECs sur des biopapiers en PLGA / hydrogel (collagène de type I de la queue de rat ou Matrigel™). Ils ont montré que les cellules s'assemblaient d'elles-mêmes en réseaux, suivant le motif initial, ressemblant à la vascularisation du tissu natif. Le recours à des « biopapiers » rend possible la fabrication de constructions tridimensionnelles pré-vascularisées, en superposant les couches imprimées supportant les réseaux HUVEC²⁶⁰.

Jusqu'à présent, cette technologie a montré la capacité d'orienter la formation de réseaux microvasculaires et, associée à une approche couche par couche, elle peut être utilisée pour obtenir des constructions 3D complètes.

Au vu de ces résultats, l'impression cellulaire assistée par laser semble être une technologie adaptée pour introduire la prévascularisation dans les constructions synthétiques, mais il faut encore progresser pour obtenir des constructions tissulaires entièrement fonctionnelles et perfusables. La connexion à l'hôte des systèmes vasculaire et lymphatique reste un obstacle majeur à surmonter.

Pour résoudre les problématiques de manque de vascularisation au sein des substituts osseux, la reproduction du microenvironnement local et l'organisation des cellules ont un rôle essentiel. Le LAB semble être une technologie d'intérêt pour générer différents modèles de coculture adaptés à la régénération osseuse.

Il pourrait permettre d'améliorer la vascularisation du greffon après la transplantation et favoriser la régénération osseuse *via* une organisation très précise des différents composants tissulaires.

3.2.4.3. Bioimpression *in situ/in vivo*

La Bioimpression *in situ/in vivo* reste une application originale du LAB pouvant conduire à différentes applications dans le domaine médical et à des solutions thérapeutiques innovantes.

Plusieurs auteurs ont utilisé le LAB pour élaborer des substituts *in vitro* (ex. substituts cutanées, patches cardiaques) secondairement implantés *in vivo*. Néanmoins, une autre approche consiste en une bioimpression directe *in situ* per-opératoire.

Au début des années 1980, le développement des interventions médicales assistées par ordinateur (CAMI) a résulté d'évolutions convergentes dans divers domaines, notamment la physique, la médecine, les matériaux, l'électronique, l'informatique et la robotique. Les CAMI fournissent un outil « permettant au clinicien d'utiliser les données multimodales de manière rationnelle et quantitative afin de planifier, simuler et exécuter des interventions médicales mini-invasives avec plus de précision et de sécurité »²⁶¹.

La bioimpression en médecine régénérative permet de contrôler avec précision la structure du scaffold et de guider les cellules au service de la formation d'un tissu fonctionnel. Les technologies de bioimpression ont été appliquées aux CAMI pour l'impression *in vivo*. Les premières études menées au sein de notre Unité Mixte de Recherche visait à combler un défaut osseux de calvaria de taille critique chez la souris en imprimant des particules de nanohydroxyapatite et des cellules mésenchymateuses directement au niveau du crâne^{247,262}. Pour cela, la station de bioimpression *Novalase* a été adaptée et dédiée aux expérimentations de bioimpression *in vivo* (Figure 39).

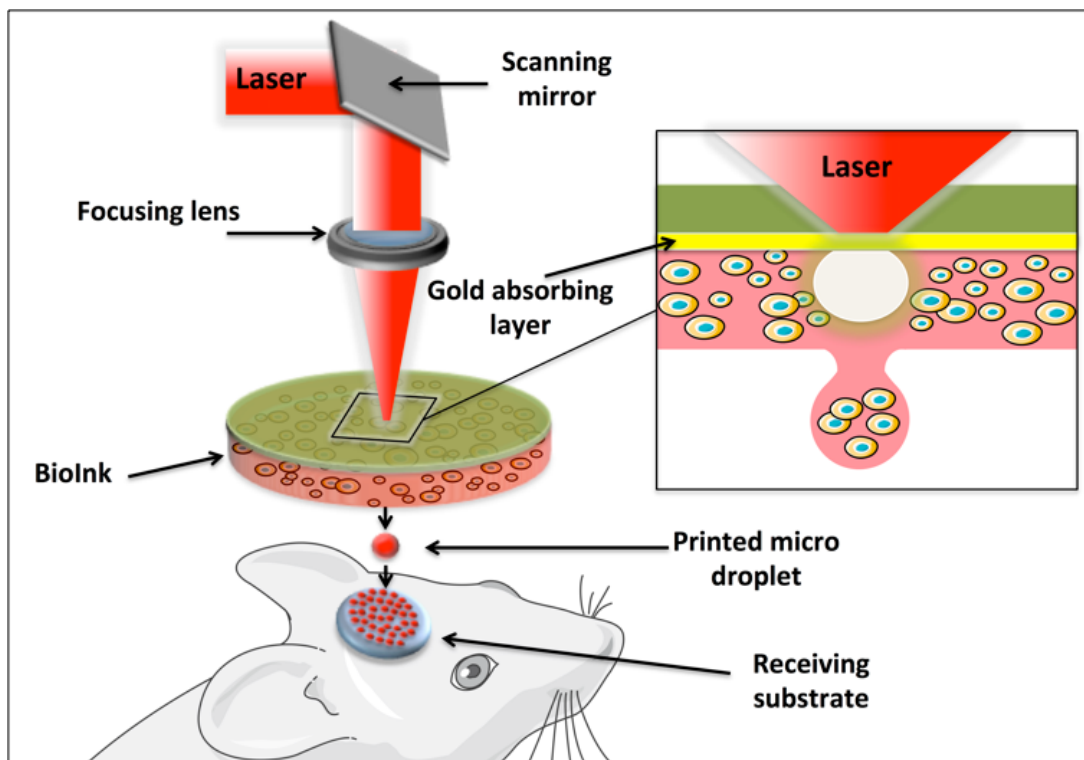


FIGURE 39 : PRINCIPE DE LA BIOIMPRESSION IN SITU/IN VIVO
D'après Kériquel *et al.* ²⁶²

Les résultats ont démontré que l'impression *in vivo* est possible et qu'elle représente un progrès significatif pour les CAMI. Il a également été mis en évidence un impact de la géométrie du motif imprimé sur la régénération osseuse. Suite à ces résultats, notre équipe a décidé de se pencher sur cette nouvelle approche de bioimpression *in vivo* afin de la mettre à profit pour la pré-vascularisation *in situ* des défauts osseux en vue de favoriser la régénération tissulaire.

OBJECTIFS

La revue bibliographique a mis en évidence la relation intime existant entre l'os et la vascularisation, tant lors de la formation osseuse que lors des processus de remodelage et de cicatrisation osseuse. En ingénierie tissulaire osseuse, l'une des problématiques majeures expliquant le retard d'applications thérapeutiques pourrait être l'absence de vascularisation suffisante. La Biofabrication s'est imposée comme une alternative technologique permettant d'organiser une prévascularisation au sein des substituts, pouvant potentiellement favoriser leur ostéointégration.

L'objectif principal de ce travail était d'intégrer un réseau micro-vasculaire organisé *in situ* par Bioimpression Assistée par Laser afin de favoriser la régénération osseuse *in vivo*.

Les objectifs secondaires étaient :

- Pour les expérimentations *in vitro* :
 - ➔ Déterminer les paramètres d'impression, les densités cellulaires et conditions de recouvrement optimaux pour la formation et le maintien du réseau ainsi que la préservation du motif dans le temps
- Pour les expérimentations *in vivo* :
 - ➔ Définir les paramètres de bioimpression adaptés à l'impression *in vivo*
 - ➔ Développer une nouvelle méthode de suivi du motif *in vivo* par IRM
 - ➔ Évaluer les taux de vascularisation et de régénération osseuse obtenus *in vivo*

Un récapitulatif des objectifs de ce travail de Thèse est fourni ci-après (Figure 40).

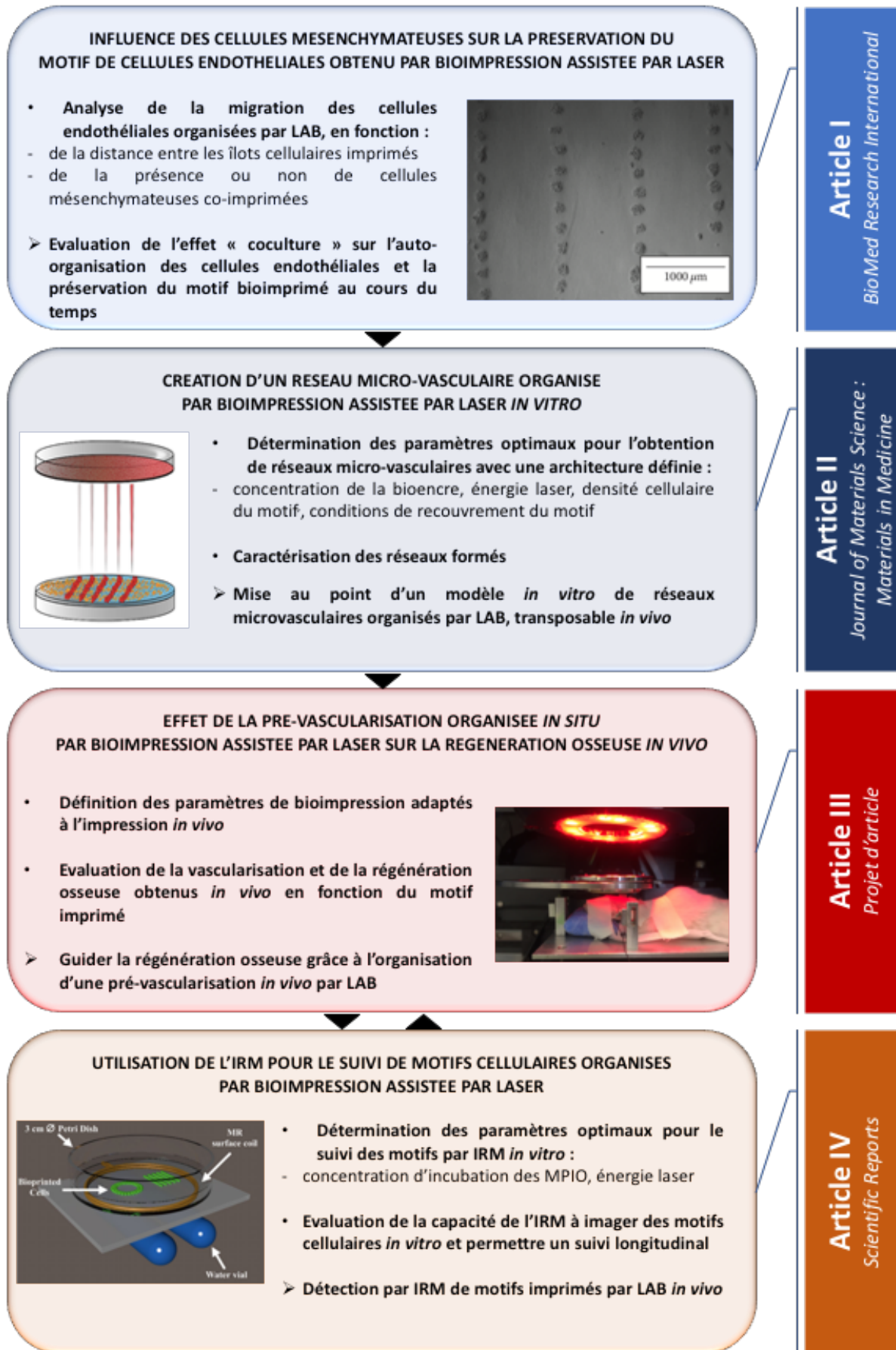


FIGURE 40 : OBJECTIFS INTERCONNECTES DU TRAVAIL DE THESE

RESULTATS

1. INFLUENCE DES CELLULES MESENCHYMATEUSES SUR LA PRESERVATION DU MOTIF DE CELLULES ENDOTHELIALES OBTENU PAR BIOIMPRESSION ASSISTEE PAR LASER

1.1. Introduction

L'une des limites de l'ingénierie tissulaire est le défaut de vascularisation des constructions obtenues, en particulier dans le cas de tissus ou organes de volumes importants, entraînant hypoxie et mort cellulaire après leur implantation. Plusieurs stratégies, mettant en jeu l'utilisation de cellules endothéliales, ont été développées afin de permettre une prévascularisation *in vitro* et ainsi améliorer l'intégration du tissu après la greffe. L'un des atouts majeurs de la bioimpression serait de contrôler l'architecture du réseau et permettre son organisation sous la forme d'une structure complexe, adaptée au tissu concerné.

L'objectif général de ce travail était d'évaluer l'effet de la présence de cellules mésenchymateuses sur la préservation du motif de cellules endothéliales imprimées. Pour cela, nous avons analysé la migration des cellules endothéliales en fonction i/ de la distance entre chaque îlot cellulaire imprimé, ii/la présence ou non d'HBMSCs co-imprimées.

La station de Bioimpression Assistée par Laser a été utilisée pour imprimer des HUVECs (exprimant la protéine fluorescente TdTomato) et des HBMSCs, seules (monoculture) ou ensemble (coculture), sur un biopapier de collagène I. Les lignes d'impression étaient espacées de 500 ou 1000 μm . Au sein de chacune des lignes, les spots étaient espacés de 250 μm .

Pour chacune des conditions, les distances entre les îlots cellulaires ou les lignes d'impression étaient mesurées à l'aide du logiciel ImageJ. Le tropisme cellulaire, soit dans le sens de la formation d'une ligne continue soit dans le sens d'une dispersion par rapport à la ligne d'impression, était ainsi évalué.

1.2. Article I

Patterning of endothelial cells and mesenchymal stem cells by Laser-Assisted Bioprinting to study cell migration

Jean-Michel Bourget^{1,2}, **Olivia Kérouédan**^{1,3,4}, Manuela Medina^{1,3}, Murielle Rémy^{1,3}, Noélie Brunehilde Thébaud^{1,3,4}, Reine Bareille¹, Olivier Chassande^{1,3}, Joëlle Amédée^{1,3}, Sylvain Catros^{1,3,4} and Raphaël Devillard^{1,3,4}

¹*Bioingénierie Tissulaire, INSERM U1026, Bordeaux, France*

²*Département d'Ophtalmologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada*

³*Bioingénierie Tissulaire, Université de Bordeaux, Bordeaux, France*

⁴*Service d'Odontologie et de Santé Buccale, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France*

- Cet article a été publié dans :

Biomed Research International
Volume 2016, Article ID 3569843
DOI : 10.1155/2016/3569843

Research Article

Patterning of Endothelial Cells and Mesenchymal Stem Cells by Laser-Assisted Bioprinting to Study Cell Migration

Jean-Michel Bourget,^{1,2} Olivia Kérouredan,^{1,3,4} Manuela Medina,^{1,3}
Murielle Rémy,^{1,3} Noélie Brunhilde Thébaud,^{1,3,4} Reine Bareille,¹ Olivier Chassande,^{1,3}
Joëlle Amédée,^{1,3} Sylvain Catros,^{1,3} and Raphaël Devillard^{1,3,4}

¹Bioingénierie Tissulaire, INSERM U1026, Bordeaux, France

²Département d'Ophthalmologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

³Bioingénierie Tissulaire, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

⁴Service d'Odontologie et de Santé Buccale, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

Correspondence should be addressed to Raphaël Devillard; raphael.devillard@u-bordeaux.fr

Received 27 July 2016; Accepted 14 September 2016

Academic Editor: Jeroen Rouwkema

Copyright © 2016 Jean-Michel Bourget et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Tissue engineering of large organs is currently limited by the lack of potent vascularization *in vitro*. Tissue-engineered bone grafts can be prevascularized *in vitro* using endothelial cells (ECs). The microvascular network architecture could be controlled by printing ECs following a specific pattern. Using laser-assisted bioprinting, we investigated the effect of distance between printed cell islets and the influence of coprinted mesenchymal cells on migration. When printed alone, ECs spread out evenly on the collagen hydrogel, regardless of the distance between cell islets. However, when printed in coculture with mesenchymal cells by laser-assisted bioprinting, they remained in the printed area. Therefore, the presence of mesenchymal cell is mandatory in order to create a pattern that will be conserved over time. This work describes an interesting approach to study cell migration that could be reproduced to study the effect of trophic factors.

1. Introduction

The *in vitro* reconstruction of large tissues and organs by tissue engineering is currently limited by the lack of an appropriate vascularization of those constructs [1, 2]. The limited diffusion of nutrients and oxygen in connective tissues is influenced by the nature of the extracellular matrix as well as by the cell density and metabolic activity [3]. It has been shown that the lack of vascularization of tissue-engineered bones leads to hypoxia and cell death after implantation [3, 4] and that bone-regenerative capacity of bone marrow stromal cells is improved when those are transplanted into a bone defect model with endothelial cells [5]. Nowadays, several strategies for enhancing vascularization are under investigation [6]. They include scaffold designed to promote angiogenesis [7, 8], *in vitro* prevascularization [9–12], and inclusion of

angiogenic factors [13]. *In vitro* prevascularization has shown to be efficient for improving tissue inosculation after grafting [3, 14]. However, with traditional approaches to create an *in vitro* capillary-like network, there is no control over the architecture of the network. Seeding of endothelial cells (ECs) leads to a random network without possible organization into a complex structure. This drawback could be overcome by using bioprinting [15], allowing controlling the location of cells and built complex organs.

In the present study, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human bone marrow mesenchymal stem/stromal cells (HBMSCs), either alone or together, were patterned on a type I collagen biopaper using laser-assisted bioprinting (LAB). We evaluated the migration of endothelial cells depending on distance with neighbor cell islets and the presence of coprinted HBMSCs, early after bioprinting.

2. Material and Methods

2.1. Ethic Statement. This study was approved by the local institutional review board and follows the tenets of the Declaration of Helsinki. Written information was delivered to the patients (HBMSCs) or the mother (HUVECs) for use of their cells in research.

2.2. Cell Isolation and Culture. HBMSCs were obtained from human bone marrow according to methods described previously [16]. Briefly, bone marrow was aspirated from the femoral diaphysis or iliac bone after obtaining consent from patients undergoing hip prosthesis surgery after trauma. A single-cell suspension was obtained by sequential passages of the aspirate through 16-, 18-, and then 21-gauge needles. After centrifugation, the pellet was cultured in Minimum Essential Medium Alpha Modification (α -MEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Lonza, Verviers, Belgium). Cells were incubated in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C [16].

HUVECs were isolated as described previously [17]. Cells were expanded in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco, Thermo Fisher Scientific) containing 20% FBS, 12 μ g/mL endothelial cell growth supplement, and 90 μ g/mL heparin (ECGS/H 0.4% (v/v); PromoCell, Heidelberg, Germany) in gelatin-coated (0.2%; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) cell-culture flasks. Passage-1 cells were transduced with a lentiviral vector coding for the tdTomato fluorescent protein [18, 19]. Transduced and untransduced cells were used as stated for each experiment. After printing, cells were cultured in a medium containing equal volumes of IMDM 20% FBS with ECGS/H and of α -MEM 10% FBS [20].

2.3. Statistical Analyses. Statistical analyses were performed by unpaired *t*-test, using the GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). * * * = $p < 0.001$, ns = $p > 0.05$.

2.4. Bioprinting Procedure. The bioprinting procedure was performed as described previously in Guillotin et al. [21]. Briefly, two coplanar glass slides, one with the bioink and the other with the biopaper, were facing each other in the bioprinter. In order to transfer the laser energy to the bioink, the donor glass slide was coated with an energy-absorbing gold layer (60 nm) by plasma-enhanced sputter deposition (Emscope SC500; Elexience, Verrières-le-Buisson, France). Cultured HUVECs and HBMSCs were trypsinized and resuspended at 10⁸ cells/mL either alone (1) or together (1:1). 33 μ L of this cell suspension was spread on the glass slide (7 cm²), over the gold layer. The collector glass slide was covered with 141 μ L of a rat tail collagen type I solution (2 mg/mL; BD Biosciences, Bedford, MA), forming a 200 μ m thick layer. Laser pulses were focused on the gold layer and generated a jet that propels the cell suspension toward the collector slide (Figure 1(a)). Laser energy was adjusted regarding the cell type to obtain similar cell densities between mono- and coculture.

HUVECs and HBMSCs were printed, either alone (monoculture) or together (coculture), as lines (1000 μ m long) of cell-ink drops forming cell islets at each 250 μ m. Adjacent lines were either separated by 500 or 1000 μ m (Figures 1(b) and 1(c)). For each condition, distances between adjacent cell islets or lines were measured using ImageJ software (Figure 1(c)). HUVECs, expressing the tdTomato reporter gene, were printed alone at either 500 μ m or 1000 μ m of distance between adjacent lines. Cell tropism, either toward the formation of a continuous line or toward spreading, was monitored.

3. Results

The printing of HBMSCs and HUVECs allowed verifying the precision of the printing procedure. Printing the cells at a laser pulse repetition rate of 1 kHz allowed reaching an appropriate printing precision. The spot diameter was $170 \pm 22 \mu\text{m}$, the interdot distance was $258 \pm 16 \mu\text{m}$, and the interline distance was $520 \pm 18 \mu\text{m}$ or $1007 \pm 28 \mu\text{m}$ (mean \pm SD) for 500 and 1000 μ m distances, respectively (Figure 1(d)). This data allows evaluating the precision of the laser bioprinter and determining that the standard error was $\pm 20 \mu\text{m}$. This error was found to be sufficient for the present study. Therefore, a center-to-center distance of 250 μ m between spots was found to be appropriate to obtain a guided cell migration; a distance of 500 μ m between lines was selected to allow for migration between the lines in monoculture experiments.

When imaged after 24 hours, tdTomato HUVECs printed with an interline distance of 500 μ m had spread homogeneously on the collagen hydrogel (Figure 2). When the distance was increased to 1000 μ m, the pattern was still discernable after 24 hours, despite cells' spreading (Figure 2). Therefore, when printed alone, HUVECs tend to migrate toward spreading on the collagen gel, regardless of the distance between the lines.

Bioprinting with the laser-assisted technology allowed us to easily form a pattern of ECs over a collagen matrix and evaluate if ECs display a preferential migration toward the closest cell islets or toward spreading uniformly. We observed that, in the absence of mesenchymal cells, endothelial cells migrated randomly on the matrix.

When HBMSCs were printed alone with the same parameters (250 μ m \times 500 μ m), they display a negligible migration on the collagen gel and tend to stay in lines for the first 24 hours (Figure 3). Interestingly, when cells were printed together to create a coculture (HUVECs tdTomato and HBMSCs, ratio 1:1), the HUVECs stay in the printing line instead of migrating in every direction (Figure 3).

4. Discussion

Our results indicate that coculture with mesenchymal cells is sufficient to allow for endothelial cells to stay in the printed area and to eventually form capillaries. This effect could be explained by the stabilization effect of MSC on capillaries [22, 23], which plays a role for the formation of a vascular network [24]. Indeed, the presence of mesenchymal cells printed

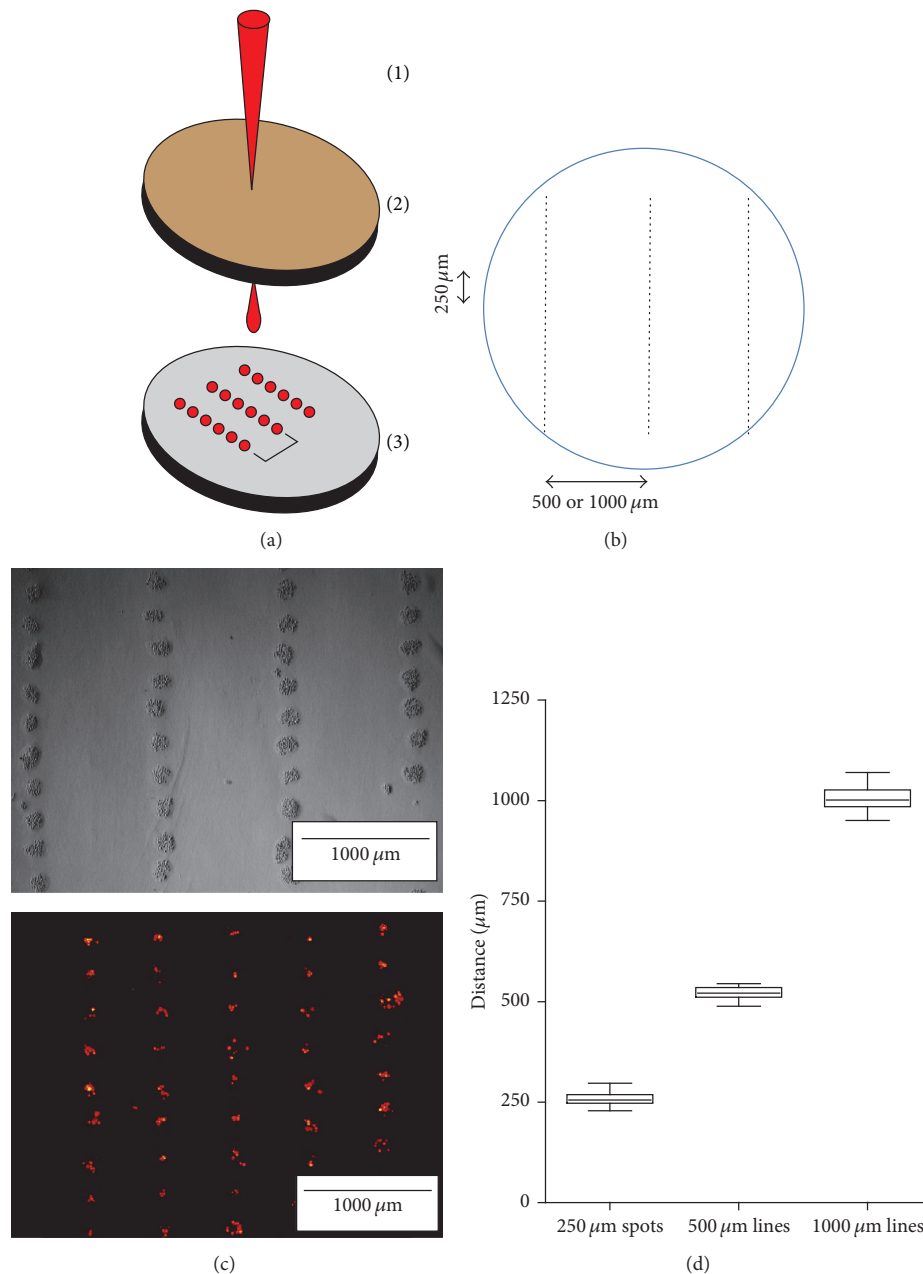


FIGURE 1: LAB setup and cell patterns. (a) The LAB setup: (1) laser beam, (2) donor gold-coated slide to generate the jet (the cell-containing solution is facing (3)), and (3) receptor collagen-coated slide. The red dots in (3) represent the cell islets on the collagen hydrogel postprinting. (b) Cell spots were printed at each 250 μm in a given line segment and consecutive line segments were separated by either 500 μm or 1000 μm. (c) Examples of HBMSCs postprinting visualized by bright field view (laser energy 25 μJ) and tdTomato-expressing HUVECs in epifluorescence (laser energy 20 μJ). (d) Mean distances between spot centers ($n = 60$) and between segments ($n = 30$ for each distance), measured on the collector slide with ImageJ®.

together with endothelial cells allowed reducing endothelial cell migration. The long-term goal of the project presented here is to generate vascularized 3D bone tissue constructs with the ultimate goal of accelerating inosculation of the tissue-engineered graft. Control of the vascular network architecture is very important in the development of more complex bone tissues and being able to concentrate the ECs

where they are needed is a precious advantage over random seeding of endothelial cells. Moreover, the precise positioning of other cell types is also possible with this bioprinting approach.

Canver et al. reported that the migration speed of a confluent monolayer of endothelial cells on collagen gel falls between 300 and 700 μm for the first 24 hours, depending

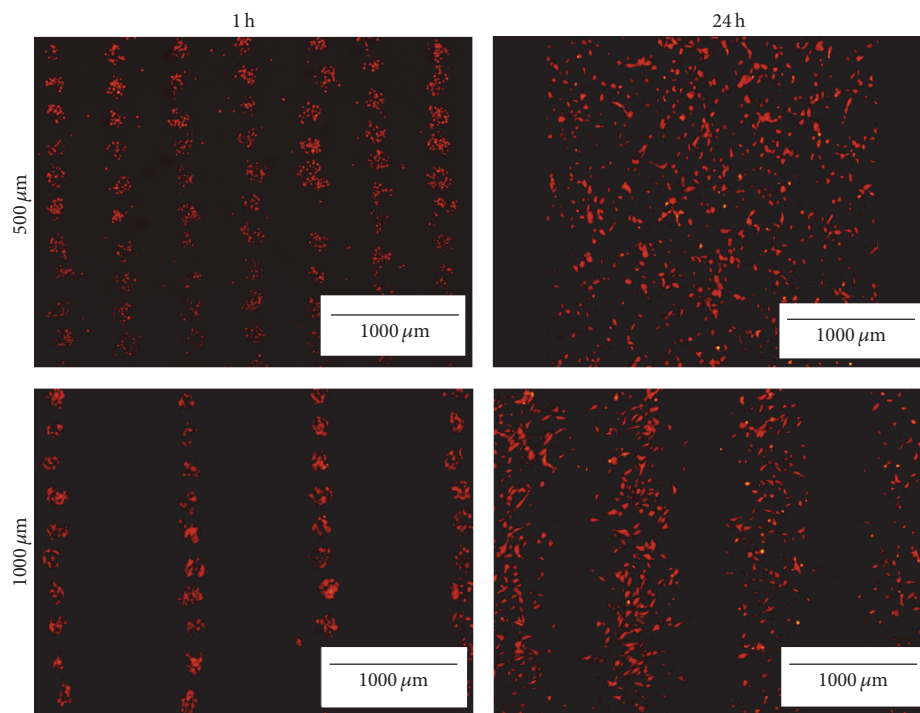


FIGURE 2: HUVECs spreading 24 hours after bioprinting. Comparison of the pattern of printed tdTomato HUVECs at $250\ \mu\text{m}$ between dots and either 500 or $1000\ \mu\text{m}$ between segments at 1 and 24 hours after printing. Images are representative of $n = 3$ experiments. Scale bar: $1000\ \mu\text{m}$.

on the substrate stiffness [25]. In our study, cells migrated approximately $250\ \mu\text{m}$ in the same period. Differences may be attributable to the lower concentration of cells and to the bioprinting procedure.

The potential of endothelial cells to form tubular-like structures *in vitro* when cocultured with HBMSCs was demonstrated in multiple studies [22, 26–28]. However, the use of bioprinting to precisely deposit the cells into lines is scarce. Other groups have printed endothelial cells using laser-assisted bioprinting [29–31]. In Wu and Ringeisen's work, LAB was used to pattern HUVECs and human umbilical smooth muscle cells on Matrigel™ [32]. However, they did not study cell migration. Moreover, they used smooth muscle cells instead of BMSCs and Matrigel instead of collagen. In a recent publication by Takehara et al., ECs were patterned in a mesenchymal cell sheet using selective adhesion on the surface in order to generate a vascularized tissue with a precise architecture [33]. Even if their approach is similar to ours in terms of outcomes, bioprinting of the ECs is a more straightforward approach.

The use of LAB is particularly appropriate in order to create a 2D pattern of endothelial cell or coculture models on a collagenous extracellular matrix. Indeed, it allows precise printing of cells at high concentration without experiencing head-clogging problems. Printing at high cell concentration

is important and allows a rapid formation of pseudocapillaries. Superposition of layers of collagen hydrogel with subsequent printing of endothelial cell patterns should allow the creation of a 3D construct.

This study shows that LAB is an appropriate tool for the deposition of ECs in tissue-engineered constructs and could be used to study cell migration in order to evaluate the influence of factors such as another cell type. It was demonstrated that mesenchymal stem cells have a great influence on ECs fate *in vitro*, by guiding their self-organization. This study sets the basis of ECs bioprinting on a collagenous hydrogel in coculture with mesenchymal cells. Future works will evaluate the behavior of the microvascular network on a longer time frame, including validation of the presence of a lumen in interconnecting capillaries. Furthermore, the capability to form 3D constructs will be evaluated by the superposition of multiple collagen layers with printed HUVECs and HBMSCs. Those studies will allow for the creation of tissue-engineered bone substitutes with precise microvascular-network architecture and therefore allow for a faster inoculation of the substitute following implantation and the reproduction of a physiological histoarchitecture.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

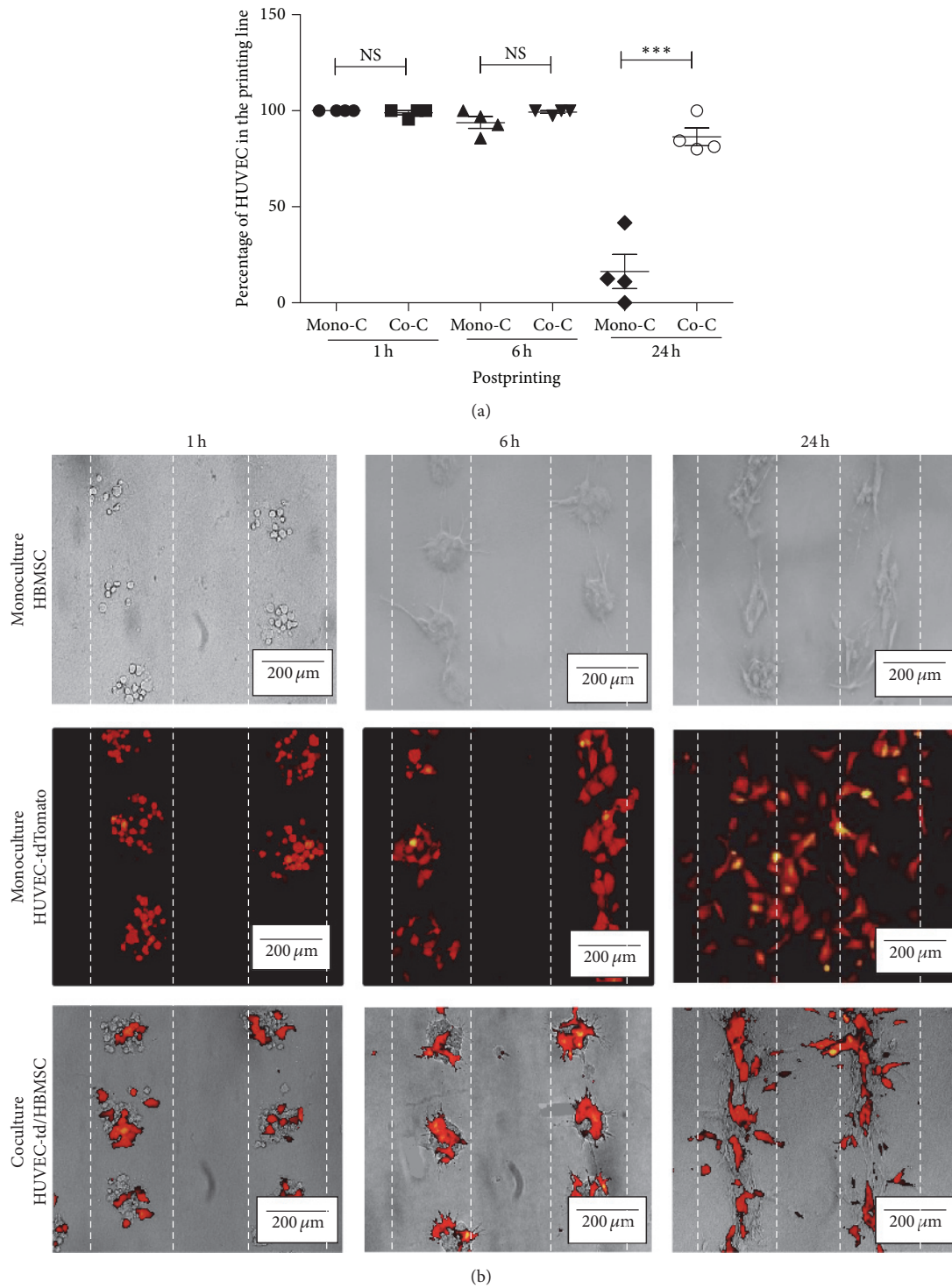


FIGURE 3: Distribution of HBMSCs and tdTomato HUVECs printed in monoculture versus coculture. (a) Percentage of HUVECs in the printing line at 1, 6, and 24 hours after bioprinting depending on the culture condition (mono/coculture) (** $p < 0.001$). (b) Representative images of follow-up over time of HBMSCs (upper line), tdTomato HUVECs (middle line), and tdTomato HUVECs-HBMSCs (lower line) at 1, 6, and 24 hours after printing, using an inverted microscope (Axiovert). In red: HUVECs, expressing tdTomato. Images were representative of $n = 7$ experiments. Distance between segments: 500 μm.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) and by a travel award from the “Réseau de thérapie cellulaire et tissulaire du Fond de Recherche en Santé du Québec” to Jean-Michel Bourget.

References

- [1] E. C. Novosel, C. Kleinhans, and P. J. Kluger, “Vascularization is the key challenge in tissue engineering,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 4, pp. 300–311, 2011.
- [2] M. W. Laschke and M. D. Menger, “Prevascularization in tissue engineering: current concepts and future directions,” *Biotechnology Advances*, vol. 34, no. 2, pp. 112–121, 2016.
- [3] J. Rouwkema, N. C. Rivron, and C. A. van Blitterswijk, “Vascularization in tissue engineering,” *Trends in Biotechnology*, vol. 26, no. 8, pp. 434–441, 2008.
- [4] M. Grellier, L. Bordenave, and J. Amédée, “Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering,” *Trends in Biotechnology*, vol. 27, no. 10, pp. 562–571, 2009.
- [5] D. Kaigler, P. H. Krebsbach, Z. Wang, E. R. West, K. Horger, and D. J. Mooney, “Transplanted endothelial cells enhance orthotopic bone regeneration,” *Journal of Dental Research*, vol. 85, no. 7, pp. 633–637, 2006.
- [6] J. J. Moon and J. L. West, “Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angiogenesis in biomaterials,” *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 4, pp. 300–310, 2008.
- [7] Y. Zhang, L. Xia, D. Zhai et al., “Mesoporous bioactive glass nanolayer-functionalized 3D-printed scaffolds for accelerating osteogenesis and angiogenesis,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 45, pp. 19207–19221, 2015.
- [8] M. Tamplenizza, A. Tocchio, I. Gerges et al., “In vivo imaging study of angiogenesis in a channelized porous scaffold,” *Molecular Imaging*, vol. 14, no. 4, 2015.
- [9] A. F. Black, F. Berthod, N. L’Heureux, L. Germain, and F. A. Auger, “In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent,” *FASEB Journal*, vol. 12, no. 13, pp. 1331–1340, 1998.
- [10] J. Rouwkema, P. E. Westerweel, J. de Boer, M. C. Verhaar, and C. A. Van Blitterswijk, “The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering,” *Tissue Engineering A*, vol. 15, no. 8, pp. 2015–2027, 2009.
- [11] H. Yu, P. J. VandeVord, L. Mao, H. W. Matthew, P. H. Wooley, and S.-Y. Yang, “Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 4, pp. 508–517, 2009.
- [12] L. Wang, H. Fan, Z.-Y. Zhang et al., “Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized β -tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 36, pp. 9452–9461, 2010.
- [13] C. Borselli, O. Oliviero, S. Battista, L. Ambrosio, and P. A. Netti, “Induction of directional sprouting angiogenesis by matrix gradients,” *Journal of Biomedical Materials Research—Part A*, vol. 80, no. 2, pp. 297–305, 2007.
- [14] P.-L. Tremblay, V. Hudon, F. Berthod, L. Germain, and F. A. Auger, “Inoculation of tissue-engineered capillaries with the host’s vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice,” *American Journal of Transplantation*, vol. 5, no. 5, pp. 1002–1010, 2005.
- [15] S. V. Murphy and A. Atala, “3D bioprinting of tissues and organs,” *Nature Biotechnology*, vol. 32, no. 8, pp. 773–785, 2014.
- [16] J. Vilamitjana-Amédée, R. Bareille, F. Rouais, A. I. Caplan, and M.-F. Harmand, “Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture,” *In Vitro Cellular – Developmental Biology—Animal*, vol. 29, no. 9, pp. 699–707, 1993.
- [17] L. Bordenave, C. Baquey, R. Bareille et al., “Endothelial cell compatibility testing of three different Pellethanes,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 27, no. 11, pp. 1367–1381, 1993.
- [18] N. B. Thébaud, A. Aussel, R. Siadous et al., “Labeling and qualification of endothelial progenitor cells for tracking in tissue engineering: an in vitro study,” *The International Journal of Artificial Organs*, vol. 38, no. 4, pp. 224–232, 2015.
- [19] S. Ziane, S. Schlaubitz, S. Miraux et al., “A thermosensitive low molecular weight hydrogel as scaffold for tissue engineering,” *European Cells and Materials*, vol. 23, pp. 147–160, 2012.
- [20] N. B. Thébaud, R. Siadous, R. Bareille et al., “Whatever their differentiation status, human progenitor derived—or mature—endothelial cells induce osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells,” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 6, no. 10, pp. e51–e60, 2012.
- [21] B. Guillotin, A. Souquet, S. Catros et al., “Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 28, pp. 7250–7256, 2010.
- [22] P. Au, J. Tam, D. Fukumura, and R. K. Jain, “Bone marrow derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature,” *Blood*, vol. 111, no. 9, pp. 4551–4558, 2008.
- [23] S. Koob, N. Torio-Padron, G. B. Stark, C. Hannig, Z. Stankovic, and G. Finkenzeller, “Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects,” *Tissue Engineering—Part A*, vol. 17, no. 3-4, pp. 311–321, 2011.
- [24] N. Koike, D. Fukumura, O. Gralla, P. Au, J. S. Schechner, and R. K. Jain, “Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels,” *Nature*, vol. 428, no. 6979, pp. 138–139, 2004.
- [25] A. C. Canver, O. Ngo, R. L. Urbano, and A. M. Clyne, “Endothelial directed collective migration depends on substrate stiffness via localized myosin contractility and cell-matrix interactions,” *Journal of Biomechanics*, vol. 49, no. 8, pp. 1369–1380, 2016.
- [26] S. Güven, A. Mehrkens, F. Saxer et al., “Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 25, pp. 5801–5809, 2011.
- [27] A. Aguirre, J. A. Planell, and E. Engel, “Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 400, no. 2, pp. 284–291, 2010.
- [28] R. E. Unger, A. Sartoris, K. Peters et al., “Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 27, pp. 3965–3976, 2007.
- [29] M. Gruene, M. Pflaum, A. Deiwick et al., “Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells,” *Biofabrication*, vol. 3, no. 1, Article ID 015005, 2011.

- [30] J. A. Barron, P. Wu, H. D. Ladouceur, and B. R. Ringeisen, "Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns," *Biomedical Microdevices*, vol. 6, no. 2, pp. 139–147, 2004.
- [31] R. Gaebel, N. Ma, J. Liu et al., "Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration," *Biomaterials*, vol. 32, no. 35, pp. 9218–9230, 2011.
- [32] P. K. Wu and B. R. Ringeisen, "Development of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human umbilical vein smooth muscle cell (HUVSMC) branch/stem structures on hydrogel layers via biological laser printing (BioLP)," *Biofabrication*, vol. 2, no. 1, Article ID 014111, 2010.
- [33] H. Takehara, K. Sakaguchi, M. Kuroda et al., "Controlling shape and position of vascular formation in engineered tissues by arbitrary assembly of endothelial cells," *Biofabrication*, vol. 7, no. 4, Article ID 045006, 2015.

1.3. Conclusions

Les résultats de ce travail montrent que, lorsqu'elles sont imprimées en monoculture, les cellules endothéliales prolifèrent sur l'hydrogel dans toutes les directions, quelle que soit la distance entre les îlots d'impression. Lorsqu'elles sont imprimées en coculture avec des cellules mésenchymateuses, les cellules maintiennent leur position dans la zone d'impression. La présence de cellules mésenchymateuses semble donc indispensable pour créer un motif de cellules endothéliales qui sera préservé dans le temps, et éventuellement faciliter la formation de structures capillaires.

Les MSCs sont connues pour avoir un effet de stabilisation sur les capillaires, et jouent donc un rôle essentiel dans la formation et le maintien des réseaux vasculaires. Ce rôle stabilisateur est également essentiel dans l'optique de pouvoir contrôler l'architecture du réseau vasculaire au sein des constructions d'ingénierie tissulaire tridimensionnelles.

Cet article constitue une étude préliminaire, basée sur la bioimpression de cellules endothéliales sur un biopaper de collagène en coculture avec des cellules mésenchymateuses. Il introduit l'article suivant qui vise à déterminer les paramètres d'impression et de culture cellulaire permettant la formation d'un réseau micro-vasculaire organisé.

2. CREATION D'UN RESEAU MICRO-VASCULAIRE ORGANISE PAR BIOIMPRESSION ASSISTEE PAR LASER IN VITRO

2.1. Introduction

Basé sur les résultats de l'article précédent mettant en évidence l'intérêt de la coculture pour la préservation du motif cellulaire bioimprimé, il a été choisi de poursuivre les expérimentations en maintenant cette association cellules endothéliales / cellules mésenchymateuses.

L'objectif principal de ce deuxième article était de produire un réseau micro-vasculaire organisé par bioimpression assistée par laser *in vitro*, en vue de transposer par la suite le modèle mis au point pour les expérimentations *in vivo*.

Pour cela, des cellules endothéliales (tdTomato EPCs) ont été imprimées par Bioimpression Assistée par Laser selon un motif défini sur un hydrogel de collagène préalablement ensemencé avec des cellules souches mésenchymateuses (SCAPs). Le motif imprimé consistait en plusieurs lignes de spots, avec un espace de 60 μm entre chaque spot et 1250 μm entre chaque ligne d'impression. La précision des motifs, leur préservation et leur évolution à différents temps post-impression ont été analysées par microscopie à fluorescence. Les réseaux ont ensuite été caractérisés à l'aide d'ImageJ.

Tout d'abord, la concentration des cellules endothéliales dans la bioencres a été optimisée afin de favoriser la formation d'un réseau micro-vasculaire selon le motif choisi. La corrélation entre la densité locale des cellules endothéliales et la formation d'un réseau micro-vasculaire a été évaluée. Puis, une stratégie basée sur le recouvrement de l'échantillon par un second biopaper a été développée afin d'optimiser la formation du réseau et sa stabilité. Enfin, trois motifs adaptés à la taille de défaut osseux critique de calvaria chez la souris ont été testés pour des futures applications *in vivo*.

2.2. Article II

Micropatterning of endothelial cells to create a capillary-like network with defined architecture by Laser-Assisted Bioprinting

Olivia Kérourédan^{1,2,3}, Jean-Michel Bourget¹, Murielle Rémy^{1,2}, Sylvie Crauste-Manciet^{4,5}, Jérôme Kalisky^{1,2}, Sylvain Catros^{1,2,3}, Noélie Brunehilde Thébaud^{1,2,3} and Raphaël Devillard^{1,2,3}

¹*INSERM, Bioingénierie Tissulaire, U1026, Bordeaux, France*

²*Université de Bordeaux, Bioingénierie Tissulaire, U1026, Bordeaux, France*

³*CHU de Bordeaux, Services d'Odontologie et de Santé Buccale, Bordeaux, France*

⁴*Université de Bordeaux, ARNA Laboratory, team ChemBioPharm, U1212 INSERM-UMR 5320 CNRS, Bordeaux, France*

⁵*CHU de Bordeaux, Pharmacie du Groupe Hospitalier Sud, Pessac, France*

- Cet article a été publié dans :

Journal of Materials Science: Materials in Medicine
Special Issue : Biofabrication and bioinks for tissue engineering
2019 Feb 12;30(2):28
DOI: 10.1007/s10856-019-6230-1

Article non inséré par respect des droits d'auteur

Article non inséré par respect des droits d'auteur

Article non inséré par respect des droits d'auteur

Article non inséré par respect des droits d'auteur

Article non inséré par respect des droits d'auteur

Article non inséré par respect des droits d'auteur

Article non inséré par respect des droits d'auteur

Article non inséré par respect des droits d'auteur

Article non inséré par respect des droits d'auteur

Article non inséré par respect des droits d'auteur

Article non inséré par respect des droits d'auteur

Article non inséré par respect des droits d'auteur

2.3. Conclusions

Les expérimentations menées dans le cadre de cet article ont permis de définir les conditions d'impression et de culture optimales pour obtenir un réseau micro-vasculaire organisé *in vitro*. La précision et la reproductibilité du laser ont permis de quantifier la densité cellulaire locale en cellules endothéliales nécessaire pour l'obtention de réseaux (2176 ± 556 cellules/mm²). Cette forte densité cellulaire était obtenue avec une concentration de la bioencres de 70 millions de cellules/mL et une énergie laser de 26 μ J. En cohérence avec la revue de la littérature, l'adjonction d'une matrice collagénique et de facteurs de croissance (VEGF) s'est avérée nécessaire pour le maintien du motif et la préservation du réseau dans le temps. L'originalité réside ici dans le fait que l'on ne parle plus de « ratio » idéal de coculture pour la formation du réseau, mais plutôt de densité locale en cellules endothéliales.

La caractérisation des réseaux n'a pas permis ici de mettre en évidence la présence d'une lumière à un temps précoce (J6), cependant la présence de composants matriciels de la lame basale (collagène IV et laminine) a été démontrée dans les échantillons en coculture. *In vitro*, d'autres cellules et facteurs seraient nécessaires pour permettre la formation d'un réseau fonctionnel et stable (péricytes, FGF2, SDF-1, CSF, IL-3), de même que l'adjonction de stimuli mécaniques (microfluidique). Le but de cet article était de déterminer les paramètres optimaux pour obtenir un réseau vasculaire organisé, afin de le transposer *in vivo*. Dans ce contexte, nous privilégions l'effet de l'environnement (cellules, stimuli chimiques et mécaniques) de l'organisme hôte.

Basés sur la stratégie mise au point dans cet article, des motifs cellulaires adaptés à l'impression *in situ* au niveau de défauts osseux critiques de calvaria ont été imprimés et cultivés dans les mêmes conditions que celles définies précédemment afin de vérifier l'auto-organisation des cellules endothéliales et le maintien de l'organisation du motif au cours du temps. Après validation, ces conditions ont été transposées dans le cadre d'expérimentations *in vivo* afin d'évaluer l'effet de l'organisation de la pré-vascularisation sur la régénération osseuse. Ces expérimentations font l'objet d'un article soumis récemment dans la revue *Biofabrication* (Article III).

3. EFFET DE LA PRE-VASCULARISATION ORGANISEE IN SITU PAR BIOIMPRESSION ASSISTEE PAR LASER SUR LA REGENERATION OSSEUSE IN VIVO

3.1. Introduction

De précédentes expérimentations menées au laboratoire ont montré la possibilité d'utiliser le LAB comme procédure per-opératoire grâce à l'adaptation des paramètres de la station de travail pour la bioimpression *in vivo*. Ces deux premières études, menées par Kériquel *et al.*, visaient à promouvoir la régénération osseuse *via* l'impression *in situ* de particules de nanohydroxyapatite et de cellules souches mésenchymateuses au niveau de défauts osseux de calvaria chez la souris. Il paraissait intéressant de compléter ces recherches et d'utiliser cette nouvelle méthode au service de la pré-vascularisation des substituts osseux, en se basant sur le modèle de coculture *in vitro* précédemment mis au point.

L'objectif général de ce troisième article était d'intégrer un réseau micro-vasculaire organisé *in situ* par Bioimpression Assistée par Laser afin de favoriser la régénération osseuse *in vivo*.

Pour cela, la technologie de Bioimpression Assistée par Laser a été utilisée afin d'imprimer des cellules endothéliales (HUVECs marquées à l'aide de la protéine RFP « Red Fluorescent Protein ») *in situ* au niveau de défauts osseux de calvaria chez la souris, préalablement recouverts de collagène contenant des SCAPs et du VEGF. Quatre conditions ont été étudiées : une condition non imprimée dite « ensemencement aléatoire » et trois conditions imprimées appelées « motif anneau », « motif disque » et « motif anneau barré ».

Dans un premier temps, la précision des motifs *in vivo* ainsi que l'absence d'effet délétère de la procédure de bioimpression *in situ* sur les tissus cérébraux murins ont été vérifiés, respectivement par microscopie à fluorescence et IRM. Ensuite, l'influence de l'organisation des cellules endothéliales sur l'organisation de la vascularisation, la densité de vaisseaux et la régénération osseuse *in vivo* a été évaluée à l'aide d'analyses histologiques et microtomographie aux rayons X (micro-CT).

3.2. Projet d'article III

***In situ* Prevascularization designed
by Laser-Assisted Bioprinting: Effect on Bone
Regeneration**

Olivia Kérourédan^{1,2,3}, Davit Hakobyan⁴, Murielle Rémy^{1,2}, Sophia Ziane^{1,2,3},
Nathalie Dusserre⁴, Jean-Christophe Fricain^{1,2,3,4}, Samantha Delmond⁵,
Noélie Brunehilde Thébaud^{1,2,3} and Raphaël Devillard^{1,2,3}

¹*INSERM, Bioingénierie Tissulaire, U1026, Bordeaux, France*

²*Université de Bordeaux, Bioingénierie Tissulaire, U1026, Bordeaux, France*

³*CHU de Bordeaux, Services d'Odontologie et de Santé Buccale, Bordeaux, France*

⁴*ART BioPrint, INSERM, U1026, Bordeaux, France*

⁵*CHU de Bordeaux, Clinical Research Center-Technological Innovation, Pessac, France*

- Cet article est actuellement soumis dans :

Biofabrication

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31 *Article non inséré par respect des droits d'auteur*
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31 *Article non inséré par respect des droits d'auteur*
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31 *Article non inséré par respect des droits d'auteur*
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Article non inséré par respect des droits d'auteur

3.3. Conclusions

Les expérimentations menées dans le cadre de cet article tendent à montrer que le LAB est un outil pertinent pour organiser une pré-vascularisation *in situ* dans le but de promouvoir la régénération osseuse *in vivo*. Cette technologie a permis une impression précise et non iatrogène des motifs cellulaires directement au niveau des défauts osseux de calvaria chez la souris. Les densités cellulaires et les paramètres d'impression prédéfinis *in vitro* ont permis la formation de réseaux micro-vasculaires *in vivo*. L'impression *in situ* a favorisé le maintien des réseaux formés au niveau du site d'impression au cours du temps, comparativement à la condition « ensemencement aléatoire ». La pré-organisation des cellules endothéliales a permis d'améliorer la vascularisation et la régénération osseuse au sein des défauts. Plus précisément, les taux de vascularisation (*vascularization rate*, vr) et les taux de régénération osseuse (*bone regeneration rate*, br) ont montré des différences statistiquement significatives entre la condition « ensemencement aléatoire » (vr=221.8±39.6%; br=146.4±58.2%) et les motifs « disque » (vr=425.4±77.3%; br=440.5±91.7%) et « anneau barré » (vr=576.8±140.3%; br=748.5±273.5%).

Ces résultats suggèrent que le LAB *in vivo* est une stratégie intéressante pour introduire une pré-vascularisation *in situ* selon une architecture définie et promouvoir la régénération osseuse. Cette technologie offre des perspectives intéressantes pour la pratique clinique, puisqu'elle permet d'envisager de contourner certaines difficultés liées aux étapes *in vitro* de l'ingénierie tissulaire traditionnelle : diminution du risque de contamination, réduction du temps de maturation et des délais d'implantation. Cependant, un des challenges majeurs à relever en vue d'une translation clinique reste le développement d'une méthode de suivi *in vivo*, non invasive, des cellules imprimées.

Dans ce but, une nouvelle stratégie de suivi *in vivo* des motifs bioimprimés *in situ* chez la souris a été développée afin de pallier les limites des méthodes d'imagerie déjà existantes, non adaptées à nos conditions expérimentales. Ces expérimentations ont fait l'objet d'un quatrième article, publié en 2018.

4. UTILISATION DE L'IRM POUR LE SUIVI DE MOTIFS CELLULAIRES ORGANISES PAR BIOIMPRESSION ASSISTEE PAR LASER

4.1. Introduction

L'une des problématiques majeures rencontrée lors des expérimentations de bioimpression *in situ* réalisées dans le cadre de cette Thèse a été le suivi *in vivo* du motif imprimé. La quantité de cellules imprimées au sein du motif *in vivo* était en effet trop faible pour pouvoir permettre leur détection *via* un fluorochrome classique ou *via* la bioluminescence. Il est donc apparu nécessaire de développer parallèlement aux expérimentations *in vivo* des techniques permettant le suivi *in vivo* des cellules imprimées.

L'objectif de ce travail était d'utiliser l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) associée à un marquage des cellules par des microparticules de Fer (MPIO, micron-sized superParamagnetic Iron Oxide) afin de suivre des motifs cellulaires organisés *in situ* par la technologie de Bioimpression Assistée par Laser, *in vitro* puis *in vivo*.

Les expérimentations ont mis en jeu l'utilisation du LAB pour imprimer des SCAPs (GFP- ou TdTomato- SCAPs) marquées au préalable à l'aide de MPIO. Différents motifs ont été imprimés : lignes avec spots espacés de 60 micromètres entre chaque spot et 1250 micromètres entre chaque ligne ; un disque de 2mm de diamètre ; un anneau avec un diamètre externe de 3mm et diamètre interne de 2mm. Ce dernier motif a été utilisé pour les expérimentations de bioimpression *in vivo*.

Les concentrations optimales de particules de Fer ont été déterminées afin de permettre un suivi *in vitro* et *in vivo* des cellules (SCAPs) marquées. La précision de l'imagerie des motifs imprimés, *via* IRM et microscopie confocale, a été comparée. Les densités cellulaires au sein des motifs et les signaux IRM correspondants ont également été évalués. L'IRM a ensuite été utilisée afin de suivre les motifs imprimés *in situ* sur un modèle de défaut osseux critique de calvaria chez la souris.

4.2. Article IV

Magnetic Resonance Imaging for tracking cellular patterns obtained by Laser-Assisted Bioprinting

Olivia Kérourédan^{1,2}, Emeline Ribot³, Jean-Christophe Fricain^{1,2,4}, Raphaël Devillard^{1,2} and Sylvain Miraux³

¹*INSERM, Bioingénierie Tissulaire, U1026, Bordeaux, France*

²*CHU de Bordeaux, Service d'Odontologie et de Santé Buccale, Bordeaux, France*

³*Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR5536, CNRS/Université de Bordeaux, Bordeaux, France*

⁴*ART BioPrint, INSERM, U1026, Bordeaux, France*

- Cet article a été publié dans :

Scientific Reports

2018 Oct 25;8(1):15777

DOI : 10.1038/s41598-018-34226-9

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Magnetic Resonance Imaging for tracking cellular patterns obtained by Laser-Assisted Bioprinting

Olivia Kérouédan^{1,2}, Emeline Ribot³, Jean-Christophe Fricain^{1,2,4}, Raphaël Devillard^{1,2} & Sylvain Miraux³

Received: 2 March 2018

Accepted: 10 October 2018

Published online: 25 October 2018

Recent advances in the field of Tissue Engineering allowed to control the three-dimensional organization of engineered constructs. Cell pattern imaging and *in vivo* follow-up remain a major hurdle in *in situ* bioprinting onto deep tissues. Magnetic Resonance Imaging (MRI) associated with Micron-sized superParamagnetic Iron Oxide (MPIO) particles constitutes a non-invasive method for tracking cells *in vivo*. To date, no studies have utilized Cellular MRI as a tool to follow cell patterns obtained via bioprinting technologies. Laser-Assisted Bioprinting (LAB) has been increasingly recognized as a new and exciting addition to the bioprinting's arsenal, due to its rapidity, precision and ability to print viable cells. This non-contact technology has been successfully used in recent *in vivo* applications. The aim of this study was to assess the methodology of tracking MPIO-labeled stem cells using MRI after organizing them by Laser-Assisted Bioprinting. Optimal MPIO concentrations for tracking bioprinted cells were determined. Accuracy of printed patterns was compared using MRI and confocal microscopy. Cell densities within the patterns and MRI signals were correlated. MRI enabled to detect cell patterns after *in situ* bioprinting onto a mouse calvarial defect. Results demonstrate that MRI combined with MPIO cell labeling is a valuable technique to track bioprinted cells *in vitro* and in animal models.

During the last decades, regenerative medicine has benefited from innovative approaches related to tissue engineering. Among novel technological strategies, cell bioprinting has emerged as a promising tool to develop biological substitutes that allows accurate reproduction of a complex three-dimensional tissue architecture and cell microenvironment, including cell-cell and cell-microenvironment interactions^{1,2}. Bioprinting is currently defined as "computer-aided, automatic, layer-by-layer deposition, transfer and patterning of biologically relevant materials"^{1,3}. One of the main advantages of bioprinting is its ability to control structure and functional properties of fabricated tissue-like structures⁴. Laser-Assisted Bioprinting (LAB) is an exciting new addition to the bioprinting arsenal that traditionally consisted of inkjet and extrusion-based methods. Combined with other additive manufacturing process, LAB has significant potential for applications in Tissue Engineering due to its ability to create two- or three-dimensional constructs with desired resolution and organization⁵. LAB has been successfully used to print a large variety of biological components such as hydrogels, DNA, peptides and live cells⁶⁻⁹. This technology provides significant advantages such as rapidity, reproducibility, precision, high cell viability and density^{4,5,10}. Because it employs a nozzle-free approach, LAB is able to overcome multiple issues related to the orifice clogging, non-reproducibility due to solution viscosity and cross-contamination, which are common among other bioprinting techniques. Moreover, as a non-contact technology, LAB has shown promise for *in vivo* computer-assisted medical interventions and *in situ* tissue engineering applications, where other bioprinting strategies may not work. Indeed, bioprinting is usually reported in the literature for *in vitro* or *ex vivo* experiments^{11,12}, or for *in situ* bioprinting during relatively non-invasive surgical procedures such as skin regeneration¹³. In contrast, LAB has been used, as a proof of concept, to print particles of nanohydroxyapatite, *in situ*, onto a mouse calvaria defect¹⁴. Further, *in situ* bioprinting of biological components and mesenchymal stromal cells has been utilized to assess the impact of different geometric cell patterning, obtained by LAB, on bone regeneration *in vivo*¹⁵. To the best of our knowledge, these studies are the first experiments that demonstrated successful

¹INSERM, Bioingénierie Tissulaire, U1026, F-33076, Bordeaux, France. ²CHU de Bordeaux, Services d'Odontologie et de Santé Buccale, F-33076, Bordeaux, France. ³Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR5536, CNRS/Univ. Bordeaux, F-33076, Bordeaux, France. ⁴ART BioPrint, INSERM, U1026, F-33076, Bordeaux, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.K. (email: olivia.kerouedan@u-bordeaux.fr)

application of any bioprinting technology for *in situ* patterning in a context of bone regeneration. More complex structures like cardiac patches have been designed by LAB; however, that process involved two separate steps: *in vitro* creation of the patch followed by *in vivo* implantation¹⁶.

Combination of bioprinting technologies with stem cell biology has become widespread in regenerative medicine. Among isolated stem cell populations, dental stem cells have many advantages, including their accessibility, capacity for self-renewal, potential for multi-differentiation and possible autologous implantation. Several *in vivo* studies demonstrated regeneration of bone and neural tissue following implantation of dental tissue-derived stem cells^{17–19}. For example, Stem Cells from the Apical Papilla (SCAP) can differentiate into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and neurogenic lineages under inductive conditions *in vitro*²⁰. These stem cells have strong potential for regeneration of several tissues and are becoming increasingly important in both regenerative dentistry and medicine. Therefore, *in situ* bioprinting of dental stem cells is a promising approach in tissue engineering, especially for bone regeneration.

In situ bioprinting onto deeper tissues, such as bone, is associated with difficulties in cell pattern imaging and *in vivo* follow-up. However, for the successful application of this technology it is crucial to track printed cells *in vivo* in a non-invasive manner, in order to check the quality of printed patterns immediately after the bioprinting process, to study their persistence and evolution over time, and to provide insight into cellular proliferation and migration dynamics²¹. To date, no technology has been able to achieve this.

Magnetic Resonance Imaging (MRI) is a non-invasive and non-irradiative imaging technique that allows performing longitudinal studies and repetitive scans without harmful effects. It also enables gathering information over the entire depth of a patient's or an animal's body. In order to specifically detect and track bioprinted cells, Cellular MRI can be employed. Gadolinium ions need to be chelated to decrease their cytotoxicity, limiting their internalization by cells²². Mn-based contrast agents are very powerful T1 contrast agents, but their cytotoxicity restrains their use²³. Fluorine-based contrast agents are highly specific but, due to a low sensitivity, a high amount of Fluorine atoms have to be present within the cell of interest²⁴. Thus, this type of labeling may be incompatible with some cell types that have low labeling abilities. On the contrary, superparamagnetic particles, mostly based on iron oxides, are efficiently internalized by many cell types. Consequently, this labeling is the most commonly used in Cellular MRI. Among the range of commercially available T2 contrast agents, Micron-sized Iron Oxide Particles (MPIO) contain the highest amount of iron oxide cores, which maximizes the sensitivity of detection of the labeled cells on standard T2 and T2*-weighted MR images. These particles have been used in preclinical studies as they are non-biodegradable, enabling a long follow-up of the labeled cells^{25–27}. MPIO have already been used to label mesenchymal stem cells (MSCs). It has been shown that they do not induce any cytotoxicity or differentiation^{28–31}. Nevertheless, to our knowledge, no studies have considered cell labeling with MPIO in order to follow cell patterns organized using bioprinting technologies.

Therefore, the objective of this work was to combine Laser-Assisted Bioprinting with the methodology of tracking MPIO-labeled stem cells using MRI. Optimal MPIO concentrations for tracking *in vitro* and *in vivo* bioprinted cells were determined. The precision of the printed patterns was compared using MRI and confocal microscopy. Cell densities within the patterns and the corresponding MRI signals were also evaluated. MRI was then used to track cell patterns after *in situ* bioprinting onto a mouse calvaria bone defect model.

Results

Determination of the optimal MPIO concentration for tracking bioprinted cell patterns using MRI *in vitro*. In order to determine the optimal conditions to obtain sufficient MRI signal intensity for tracking cell patterns *in vitro*, cells were incubated with different concentrations of MPIO (1:1000, 1:500, 1:200, 1:100 from the stock solution containing 4.5 mg Fe/mL). The bioprinting procedure of the MPIO-labeled cells required a slight increase in the minimal energy (+1 μ J), but otherwise was similar to that for the unlabeled cells. Immediately after printing, cell lines could be identified using T2*-weighted MRI (Fig. 1a). MRI Contrast-to-Noise ratio of the labeled cells significantly decreased when the MPIO dilution was higher than 1:500. A MPIO dilution of 1:200 was chosen as the optimal concentration because it led to a good sensitivity of detection on the MR images and to the most accurate reproduction of printed patterns (Fig. 1b). A higher MPIO concentration (1:100) resulted in less accurate printed patterns with multiple satellites onto the substrate.

Correlation between pattern cell density and MRI signal *in vitro*. Patterns printed with increasing cell densities obtained by varying laser energy were correlated with MRI signal *in vitro* (Fig. 2a). As expected, the thickness of the lines increased with the laser energy. As the density of the bioprinted cells increased from 1562 ± 118 to 1829 ± 209 and 2453 ± 371 cells/mm², the area covered by the MPIO-labeled cells on the MR images increased from 210 ± 32 to 252 ± 29 and 363 ± 53 voxels, respectively. There was a significant linear correlation was found between the area of the hypo-intense signal and the amount of bioprinted cells ($R^2 = 0.9991$) (Fig. 2b).

Visualization of cell patterns using MRI and confocal microscopy *in vitro*. Confocal microscopy imaging of overlapping green (GFP-cells) and red (Flash Red-MPIO) fluorescence showed that MPIO particles were highly internalized within the MSC cells (inserts). In order to determine the optimal cell patterns for use in the subsequent *in vivo* studies, three different printed designs were tracked: a ring, a disk and parallel lines. The accuracy of the printed patterns was determined by comparing MRI and confocal microscopy images (Fig. 3). The results demonstrated that the MR images accurately reproduced the overall shape of the printed patterns, and that the lines of less than 100 micrometers wide were easily detectable using MRI. The Supplementary Fig. 1 shows that even if some MPIO are detectable at the center of the ring by fluorescence, no signal is detected on the corresponding MR image.

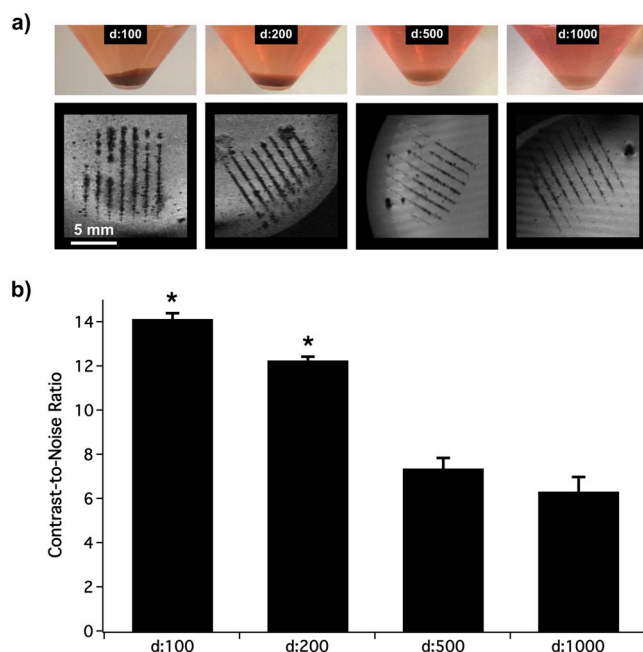


Figure 1. Determination of the optimal MPIO concentration for cell incubation. (a) Pictures of MSC pellets after their incubation with decreasing concentrations of MPIO (d:100, d:200, d:500 and d:1000 from the stock solution at 4.5 mgFe/mL) and the corresponding MR T2*-weighted image (spatial resolution: $137 \times 137 \times 141 \mu\text{m}$) after their bio-printing in a line pattern. (b) Graph showing the Contrast-to-Noise Ratio (CNR) of the lines with background measured on T2*-weighted images in function of the MPIO dilution factor. *means significantly different with d:500 and d:1000.

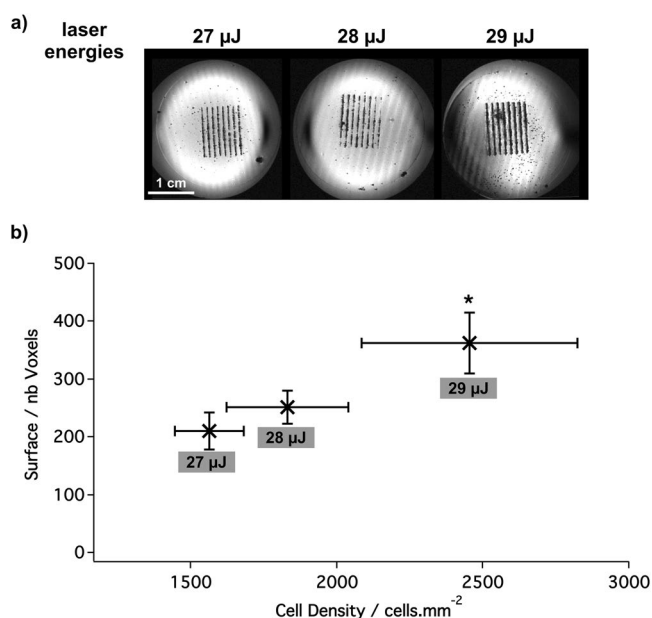


Figure 2. Determination of the optimal cell density. (a) MR T2*-weighted images of the line pattern (spatial resolution: $137 \times 137 \times 52 \mu\text{m}$) after the bioprinting of MPIO-labeled MSC with increasing density (laser energy of 27 μJ, 28 μJ and 29 μJ). (b) Quantification of the above MR images through the measurement of the amount of voxels per line in function of the density.

In vitro follow-up of the cell patterns using MRI. In order to determine if an *in vivo* longitudinal follow-up could be achieved, a 7-day *in vitro* follow-up of live MPIO-labeled MSC was performed (Fig. 4a). During this time period, cells were proliferating (1 doubling per 2 days) and a progressive disorganization of patterns was observed similar to that in monoculture³². The MR images acquired with a short scan time (only

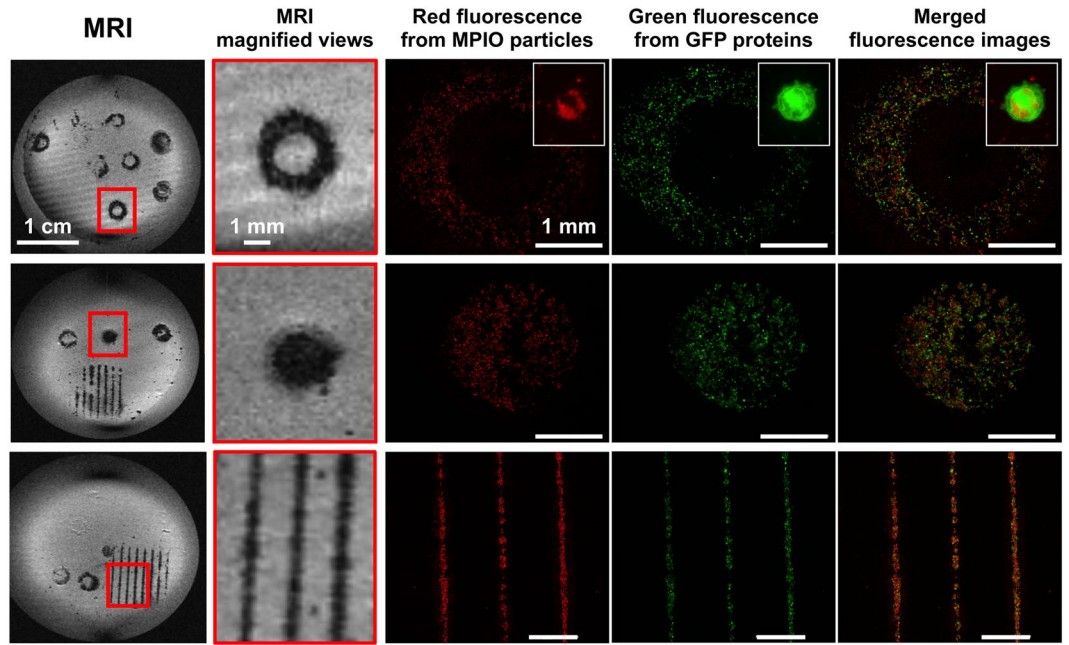


Figure 3. MR and fluorescence detection of three different patterns of MPIO- and GFP-labeled MSC immediately post-printing *in vitro*. The two left columns show MR T2*-weighted images of three different printed patterns and their magnifications (spatial resolution: $137 \times 137 \times 52 \mu\text{m}$). The last three columns show fluorescence microscopy images of the corresponding printed patterns, with respectively FlashRed-MPIO signal, GFP signal, and the merged images. The white inserts show the high magnification view of a GFP- and MPIO-labeled cell.

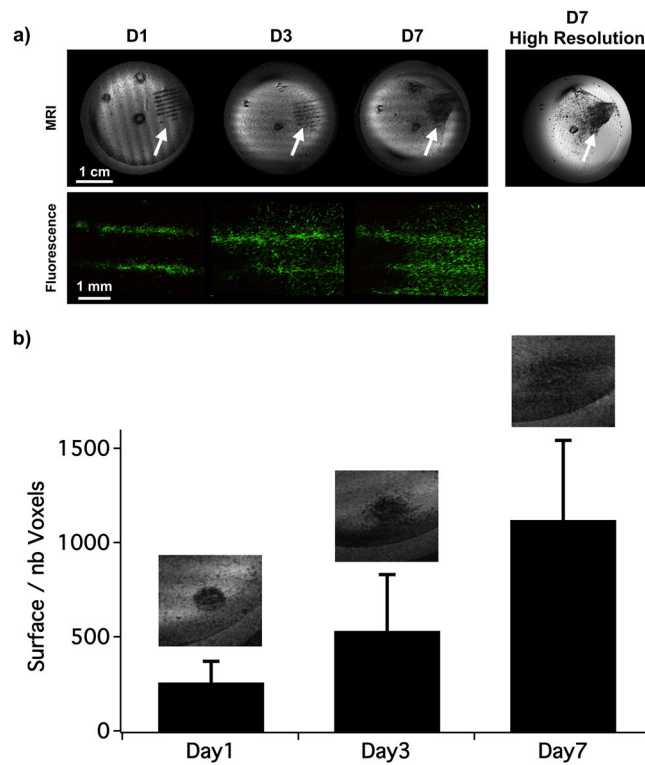


Figure 4. *In vitro* longitudinal MR follow-up of the bioprinted cells. (a) MR T2*-weighted images (spatial resolution: $137 \times 137 \times 52 \mu\text{m}$) acquired at day 1 (D1), 3 (D3) and 7 (D7) of the same live MPIO-labeled MSC bio-printed in a line pattern (arrows). The corresponding magnified GFP-fluorescence images are shown below. The far right MR image was acquired at D7 but with longer acquisition time. (b) Quantification of the surface covered by the labeled MSC over time after their bio-printing in a 2 mm-disk (the corresponding magnified MR T2*-weighted images are shown on the top of each graph bar).

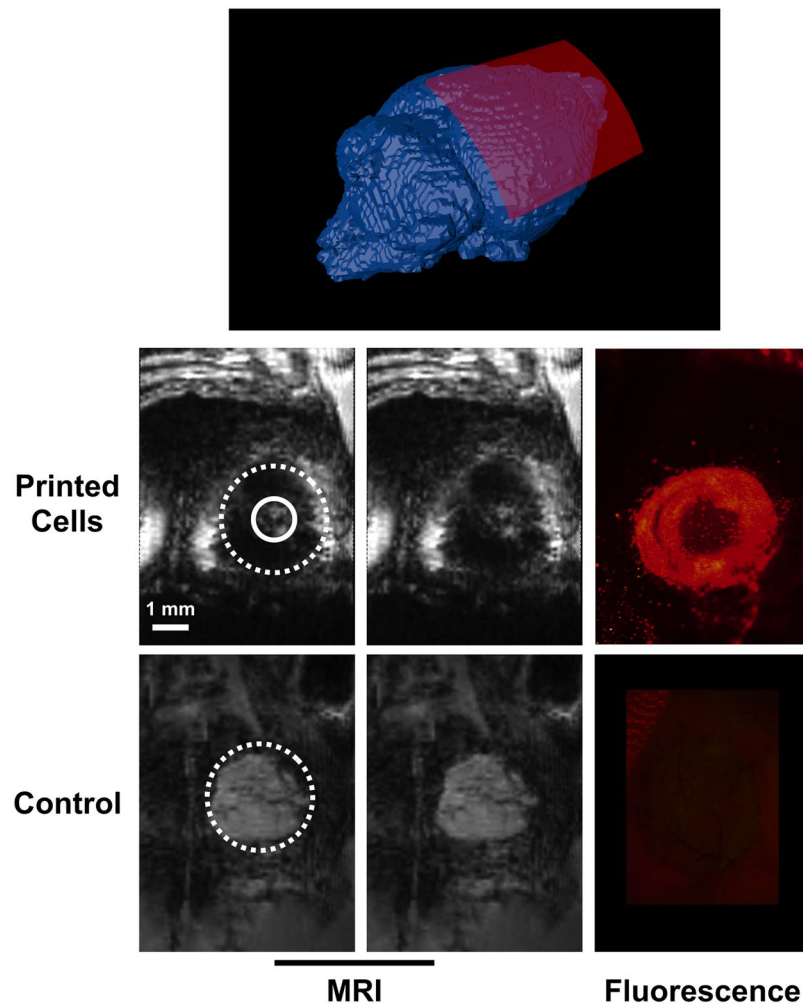


Figure 5. Post-mortem MR and fluorescence images of a mouse calvaria bone defect filled or not with MPIO-labeled cells bio-printed in a ring pattern. A scheme of the position of the reconstructed curved MR slice (red) is shown on top. The left column shows MR curved slice (spatial resolution: $97 \times 94 \times 94 \mu\text{m}$) from mice bioprinted or not (control) with cells. Dashed circles represent the position of the circular bone defect. Labeled cells were bioprinted in a ring pattern between the dashed and plain circles. The middle column is identical to the left one without any indication to better visualize the signal void generated by the labeled cells. The corresponding fluorescence images are also shown on the right column. Scale bar represents 1 mm.

4 min) were nevertheless able to show the spread of the cells within the petri dish. The MPIO-labeled MSC were still easily detectable on the MR images at 7 days in culture. High-resolution MR images were also acquired on fixed cells at different time points after the bioprinting procedure of a disk pattern. For this, identical patterns were bioprinted on multiple petri dishes to enable a longitudinal follow-up with fixed cells. MR imaging of fixed samples at different time points showed that the area covered by the MSC and detected by MRI increased from 262 ± 111 voxels at day 1 to 537 ± 297 voxels at day 3 and 1121 ± 422 voxels at day 7 (Fig. 4b), confirming the spread of the cells over time.

MRI detection of cells organized by Laser-Assisted Bioprinting in a mouse model of bone calvaria defect. The “ring” pattern was used for *in situ* bioprinting onto a bone calvaria defect in mouse, in order to assess the feasibility of using MRI to track a precise pattern *in vivo*. First, a well-defined ring of printed cells was observed within the bone defect by fluorescence microscopy. Then, high-resolution 3D MRI was performed to image the defect *post mortem*. The MR images showed a ring within the defect with a lack of signal that likely corresponded to MPIO-labeled printed cells. In a control mouse, where the defect had not been filled with bioprinted cells, the entire defect appeared as an area with a homogeneous grey signal on the MR images (Fig. 5).

Discussion

This paper reports the first MR images of laser-assisted bioprinted cells labeled with a contrast agent. For this purpose, mesenchymal stem cells were used due to their strong potential for tissue regeneration³³. In addition, labeling of these cells is particularly efficient with MRI contrast agents, and does not alter neither their proliferation nor their differentiation^{34–39}. Nevertheless, it is important to note that the viscosity of

the bio-ink was modified when the cells were iron-labeled. This can be due to the higher granularity of the cells because of the MPIO trapped in multiple vesicles within the cells. Increasing the energy of the laser enabled to efficiently deposit the cells on the biopaper and create different patterns *in vitro*. It appears that a compromise is required between cell signal (increasing with MPIO concentration) and resolution of the pattern (decreasing with MPIO concentration).

After bioprinting, MR imaging was performed using T2*-weighted sequences at 7 T in combination with a device adapted to *in vitro* experiments and a dedicated mouse head coil (4 × 4 array) for imaging the mouse head. The loop coil used for the *in vitro* imaging has a very high sensitivity and it enables to image the whole surface of a petri dish. Nevertheless, due to the low amount of liquid present in the petri dish (3 mL representing 3.5 mm high), reference tubes containing water had to be placed under the coil. With such a set-up, images with very high spatial resolution were acquired. In order to recover a high signal to noise ratio, acquisitions of several hours were performed. Even though acquisition of less than 5 min were enough to detect all the specific patterns that were tested, these specific parameters enabled to detect a very small amount of cells and to easily distinguish the geometric bio-printed patterns. In particular, lines of cells of a thickness of less than 200 μm separated by only 1250 μm were detected with a high contrast *in vitro*. These results were confirmed by fluorescence microscopy through the co-localization of the GFP-expressing cells and the FlashRed-MPIO. MPIO are of great importance for this kind of project. Indeed, due to their high sensitivity of detection and the large signal void that they generate^{40,41}, single labeled cells have been detected *in vivo*^{42,43}. Here, we demonstrated that, a low incubation concentration (4.5 μg/mL) was enough to detect the patterns. Lower concentrations might be considered, but the sequence parameters (especially the TE) would have to be adapted in parallel to increase the sensitivity of detection. Nevertheless, there is a compromise between increasing the T2* sensitivity of the MPIO by lengthening TE and the spatial resolution necessary to detect lines of bio-printed cells. Indeed, in our study, the TE was maintained <7 ms to not generate large signal voids, that could prevent the detection of thin patterns.

In addition, this parameter limited the detection of free MPIO that could have been bioprinted with the labeled cells. As already demonstrated by Dodd *et al.* and Ribot *et al.*, iron particles need to be compartmentalized within cells to be detectable^{44,45}.

The *in vitro* experiments also demonstrated that, through the measurement of the surface of the hypo-intense signal generated by the MPIO, it was possible to follow the spread of the labeled cells over time, even if they are actively dividing.

In a model of mouse calvaria, the bioprinted MPIO-labeled cells were detected with a very strong MR hypo-intense signal. Therefore, in the case of bioprinting in a smaller defect, even if fewer cells will have to be printed, their detection should be achievable. In addition, the ability to detect the MSC *in vitro* 7 days after their printing suggests a possibility for an *in vivo* follow-up. In this paper, the MR scanning was performed *post-mortem* in order to prevent any motion blurring on the high-resolution MR images and thus optimize the cell detection. Our results suggest, however, that a longitudinal study that would focus on cell migration, proliferation and bone regeneration is feasible. In order to improve the *in vivo* vascularization, several types of cells can be bioprinted on the same defect. To specifically track each kind of cells, labeling with different contrast agents (para- and superpara- magnetic ones) can be achieved. In that case, T1 and T2*-weighted MR images could be acquired over time⁴⁶. Other existing models obtained using *in situ* bioprinting technology can also benefit from our MRI protocol, in order to localize printed cells onto deep tissues and to investigate cell dynamics *in vivo*. An elegant *ex vivo* model for studying cancer cell behavior has been designed by Burks *et al.* and allowed optical follow-up. With our method, *in vivo* studies can be performed with similar results quality and a more relevant animal model⁴⁷.

In the perspective of translating this methodology to humans, biodegradable contrast agents will have to be employed. Biodegradable MPIO have already been synthesized⁴⁸. Also, fluorine-based contrast agents have been recently used to detect dendritic cells at 3 T in cancer patients⁴⁹. In parallel, laser-assisted bioprinting workstations could be designed to be used inside a sterile operating room and would constitute a new therapeutic approach, personalized and “tailor-made”, allowing for precise organization of cells or biomaterials to implant at a micron scale. In this work, we chose to analyze patterns created by LAB among other bioprinting technologies in order to demonstrate the accuracy of the method. LAB was the ideal technology because the size of droplets generated by LAB is the lowest possible and the positioning of cells is the most precise, compared to other methods⁵⁰. Therefore, ink-jet and extrusion-based bioprinted pattern would also be compatible with MRI follow-up.

One of the limitations of the study is the long acquisition times. To shorten these durations, the TE of the sequence can be lengthened to increase the sensitivity of detection. A bSSFP sequence has been shown to improve the sensitivity of detection of MPIO trapped within cancer cells in the brain when TE/TR were set long compared to Gradient Echo sequence⁵¹. In addition, using this sequence single labeled macrophage was detected *in vivo* in the mouse brain⁵². This sequence offers the advantage of obtaining 3D images. Nevertheless, the inherent presence of banding artifacts across the images necessitates the acquisition of several images which lengthen the exam duration. Other sequences might be useful to quantify the amount of contrast agents, like a T2 or T2* parametric sequences. Nevertheless, these sequences are usually less sensitive and/or require long scan duration.

In conclusion, the results presented here demonstrate the potential of using MRI and MPIO-labeled cells to track cell patterns organized *in situ* by Laser-Assisted Bioprinting onto mouse calvaria bone defect.

Future work will be focused on *in situ* Laser-Assisted Bioprinting of endothelial progenitor cells in order to assess the role of vascularization on bone regeneration *in vivo*. The results of this study can potentially have an impact on a wide range of applications, such as in wound healing and other conditions where tissue regeneration and the acceleration and enhancement of vascularization are needed. MRI would help achieve a better control of the procedure, monitor the implanted cells and evaluate the healing. Indeed, MRI may be the optimal biomedical imaging technique to visualize specific cells even in deep organs.

Methods

Laser-Assisted bioprinting set-up. The LAB workstation used in this study was previously described⁵³. Briefly, the laser source consisted on a solid Nd:YAG crystal laser (Navigator I, Newport Spectra Physics, 1064 nm, pulse duration of 30 ns). The scanning system comprised two galvanometric mirrors (SCANgine 14, ScanLab), with a scanning speed of 2000 mm/s. The laser beam was focused on a quartz ribbon that was coated with a thin absorbing layer of gold (60 nm) and a 30 μm layer of cell bioink (donor slide). A dedicated software was used to control pattern design and substrate position. All experiments were performed in air, at room temperature (RT), with a distance of 1000 μm between the ribbon and the substrate. The transfer process was performed using a repetition rate of 1 kHz.

Substrate preparation. Rat tail collagen type I (Collagen High concentration; Corning, Bedford, MA, USA) was diluted in DMEM to a final concentration of 2 mg/mL. For *in vitro* experiments, 141 μL of this collagen solution was spread at 4 °C onto the quartz substrate. This receiving layer was allowed to solidify for 1 h in controlled atmosphere (5% CO₂, 95% RH, 37 °C) prior to perform printing experiments. For *in vivo* experiments, collagen was printed directly to the dura mater of the mouse. In the case of the negative control, without cell printing, bone defect was entirely filled with collagen solution.

Cell culture. Stem cells from Apical Papilla (SCAPs) were used throughout this study. Cells were isolated from germs of third molars, obtained from young patients at the Service de Chirurgie Buccale du Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux. All experimental protocols were approved (Ministerial approval “DC-2008-412”; Convention INSERM-CHU de Bordeaux). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Oral informed consent to have their samples be used for research purposes was obtained from all patients or, if patients were under 18, from a parent and/or legal guardian. Samples were treated anonymously. In order to allow the follow-up of cell upon *in vitro* and *in vivo* printing, SCAPs were transduced with GFP-expressing lentiviral vectors for *in vitro* experiments, and TdTomato-expressing lentiviral vectors for *in vivo* experiments. GFP- and TdTomato-labeled SCAPs were cultured separately in plastic dishes in Minimum Essential Medium alpha (α -MEM, Gibco, Paisley, Scotland, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, GE Healthcare, Pasching, Austria), in a controlled atmosphere (5% CO₂, 95% RH, 37 °C). Passage 6 to 12 were used for the bioprinting experiments.

Cell labeling with MPIO. SCAPs were labeled with Micron-sized Superparamagnetic iron oxide particles (SuperParaMagnetic Microspheres, Mean Diameter: 0.90 μm , Color: Flash Red, Bangs Laboratories, Fishers, Indiana, USA). Cells were cultured during 24 hours before printing with different concentrations of MPIO (Stock solution containing 1.278×10^{10} MPIO/mL (≈ 4.5 mgFe/mL); incubation of 100 $\mu\text{L}/10$ mL; 50 $\mu\text{L}/10$ mL; 20 $\mu\text{L}/10$ mL and 10 $\mu\text{L}/10$ mL noted 1:100, 1:200, 1:500 and 1:1000) depending on the experiment. Cells were washed 2–3 times with PBS, harvested using trypsin-EDTA and centrifuged twice at 1000 rpm for 5 min to remove the excess of MPIO that were not internalized by the cells.

Bioink preparation and printing parameters. SCAPs were detached from the plastic dish with a solution of trypsin. Cells were suspended in α -MEM supplemented with 10% fetal bovine serum. Cell bioink concentration was 70×10^6 cells/mL. A 3 cm diameter quartz slide (Société VM, Epinal, France) was coated with a thin absorbing layer of gold (60 nm) using a sputter coater (EMSCOPE SC500, Elexience). Then, 30 μm -thick film of cell bioink (33 μL) was manually spread on the ribbon surface. The laser focused on the gold layer induces the transfer of droplets of cells onto the collagen-coated substrate according to the selected pattern. In the present study, three geometries of pattern were chosen: successive lines with droplets spaced from 60 μm between spots with 1250 μm between each line of spots, a disk with 2 mm diameter and a ring with external and internal diameter of 3 and 2 mm respectively. Depending on the experiment, laser energies from 27 μJ to 29 μJ were used in order to modify cell densities of printed patterns⁵⁴.

***In vitro* labeled cells follow-up.** A 7-day *in vitro* follow-up of live or fixed MPIO-labeled MSC was performed. To do so, four sets of experiments were started in parallel. The first set included the bioprinting of live cells and low resolution MR scanning at Day 1, 3 and 7. The same petri dish was thus imaged for 4 min and then put back in the incubator until the next MRI session (Fig. 4a). The last three sets of experiments included the bioprinting of live cells, their fixation at Day 1, 3 or 7 and high resolution MR scanning (Fig. 4b).

Animal procedures. The procedures and mice handling were based on the principles of Laboratory Animal Care formulated by the National Society for Medical Research and approved by the Animal Care and Experiment Committee of University of Bordeaux, Bordeaux, France (Ref. 201701051243776-V2 APAFIS #8442). Experiments were carried out in accredited animal facilities following European recommendations for laboratory animal care (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments). Two 10-week-old NOG female mice, weighting 25–26 g (Charles Rivers, France), were used in this work to compare MRI imaging between a mouse with and without bioprinting procedure. The surgical procedure used in this study was previously described¹⁵. Briefly, mice were anesthetized with a solution of Ketamin (Imalgen, Merial, France) and Xylazin (Rompun, Bayer, France) through intraperitoneal injection. After performing skin antisepsis (Betadine), an incision was made in skull midline and the scalp was dissected to expose the calvaria. One lateral 3.3 mm diameter circular bone defect was achieved using a 3.3 mm diameter trephine (Praxis l’instrumentiste, France). One mouse was used for laser bioprinting procedure while the other was used as negative control. Surgical site was irrigated with Sodium Chloride Solution (Proamp 0.9%, Laboratoire Aguettant, Lyon, France). Then, the mouse was placed inside the LAB workstation for *in situ* printing experiment. For the “negative control” mouse, only collagen solution was used in order to fill the bone calvaria defect. At the end of the experiment, tissues were repositioned and sutured using

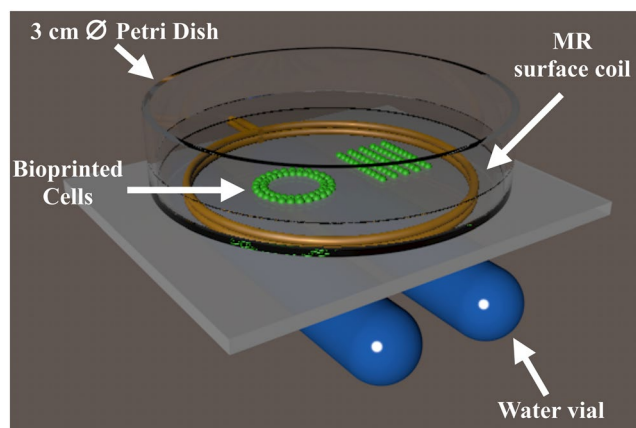


Figure 6. MR setup for the *in vitro* MR imaging of Petri dish containing MPIO-labeled cells bioprinted in different patterns. The coil is represented as the two golden rings, where the petri dish is attached on. Two tubes filled of water are positioned under the coil for the MR adjustments. Bioprinted cells are shown in green and are immersed in cell culture medium.

3/0 vicryl (Johnson and Johnson, USA). Animals were placed in a warm environment before to be taken back to animal facilities. The mice were sacrificed by cervical dislocation, practiced by qualified staff.

Post-printing characterization and image analysis. Accuracy of the patterns was analyzed *in vitro* by confocal microscopy (Leica TCS SPE, DMI 4000B, Mannheim, Germany) and *in vivo* by fluorescence microscopy (Leica MZ10 F, Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Switzerland). Cell Counter plugin of image processing software ImageJ (Open source, Public domain) was used to calculate cell density in patterns post-printing with defined areas.

Magnetic Resonance Imaging

Magnet and gradient system. All experiments were performed on a 4.7 Tesla Bruker Biospec system (Ettlingen, Germany) equipped with a gradient system capable of 660 mT/m maximum strength and 110 μ s rise time. For the *in vitro* experiments, a circular surface coil (20 mm diameter, DotyScientific) was used for signal excitation and reception. Two vials fulfilled with water were placed below the coil for MR system adjustment and a thin plate was placed above to precisely installed a Petri dish containing bio-printed cells (Fig. 6).

For the *post mortem* imaging, the animals were positioned within the magnet with the head placed at the center of a 4-element (2×2) phased array surface coil (dimensions: 26×21 mm²).

MR sequences. All the MR images were acquired using a T2*-weighted gradient echo sequence. For the detection of each pattern (Fig. 3), the following parameters were used: Echo Time/Repetition Time (TE/TR) = 2.3/6 ms; Field of View (FOV) = $35 \times 35 \times 5$ mm; matrix = $256 \times 256 \times 96$; flip angle = 10° ; number of excitations = 64; reception bandwidth = 150 kHz; Acquisition time = 2 h 37 min. For the Density experiment (Fig. 2), the same parameters were used, except: TE/TR = 6.5/13 ms; reception bandwidth = 30 kHz; Acquisition time = 5 h 40 min. For the MPIO incubation concentration dilution experiment (Fig. 1), the following parameters were used: TE/TR = 3.4/7.5 ms; FOV = $35 \times 35 \times 18$ mm; matrix = $256 \times 256 \times 128$; flip angle = 10° ; number of excitations = 1; reception bandwidth = 50 kHz; Acquisition time = 4 min 5 s. These parameters were also used for the *in vitro* follow-up experiment on the live cells (Fig. 4a). For the follow-up realized on fixed cells (Fig. 4b), the same parameters as for the Density experiments were used.

For the *post mortem* experiments (Fig. 5), the following parameters were used: TE/TR = 3.7/8 ms; FOV = $25 \times 18 \times 6$ mm; matrix = $256 \times 192 \times 64$; flip angle = 10° ; number of excitations = 256; reception bandwidth = 50 kHz; Acquisition time = 7 h.

MR image analyses. The images were analyzed using the Amira (TGS, San Diego, CA, USA) and IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) data processing softwares. The mean Contrast-to-Noise ratio (CNR) between 3 lines of labeled cells and background medium was measured for each MPIO concentration used. In addition, the signal areas covered by 3 disks were measured over time and the signal areas covered by at least 7 “line” patterns were measured as a function of the Density. To do so, a semi-automatic segmentation was performed to select pixels containing a signal lower than 3 times the background signal of the culture medium.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA) using a Student t test. Differences were considered to be statistically significant with $p < 0.05$.

Data Availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

References

- Mironov, V. *et al.* Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. *Biofabrication* **1**, 022001 (2009).
- Griffith, L. G. & Naughton, G. Tissue engineering—current challenges and expanding opportunities. *Science* **295**, 1009–1014 (2002).
- Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G. & Markwald, R. R. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **21**, 157–161 (2003).
- Schiele, N. R. *et al.* Laser-based direct-write techniques for cell printing. *Biofabrication* **2**, 032001 (2010).
- Barron, J. A., Wu, P., Ladouceur, H. D. & Ringeisen, B. R. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomed. Microdevices* **6**, 139–147 (2004).
- Colina, M., Serra, P., Fernández-Pradas, J. M., Sevilla, L. & Morenza, J. L. DNA deposition through laser induced forward transfer. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 1638–1642 (2005).
- Dinca, V. *et al.* Development of peptide-based patterns by laser transfer. *Appl. Surf. Sci.* **254**, 1160–1163 (2007).
- Hopp, B. *et al.* Laser-based techniques for living cell pattern formation. *Appl. Phys. Mater. Sci. Process.* **93**, 45–49 (2008).
- Gruene, M. *et al.* Laser Printing of Stem Cells for Biofabrication of Scaffold-Free Autologous Grafts. *Tissue Eng. Part C Methods* **17**, 79–87 (2010).
- Serra, P. *et al.* Laser-induced forward Transfer: a Direct-writing Technique for Biosensors Preparation. *J. Laser MicroNanoengineering* **1**, 236–242 (2006).
- Phamduy, T. B. *et al.* Printing cancer cells into intact microvascular networks: a model for investigating cancer cell dynamics during angiogenesis. *Integr. Biol.* **7**, 1068–1078 (2015).
- Cooper, G. M. *et al.* Inkjet-based biopatterning of bone morphogenetic protein-2 to spatially control calvarial bone formation. *Tissue Eng. Part A* **16**, 1749–1759 (2010).
- Skardal, A. *et al.* Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. *Stem Cells Transl. Med.* **1**, 792–802 (2012).
- Keriquel, V. *et al.* *In vivo* bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice. *Biofabrication* **2**, 014101 (2010).
- Keriquel, V. *et al.* *In situ* printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for *in vivo* bone regeneration applications. *Sci. Rep.* **7**, 1778 (2017).
- Gaebel, R. *et al.* Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Biomaterials* **32**, 9218–9230 (2011).
- Papaccio, G. *et al.* Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J. Cell. Physiol.* **208**, 319–325 (2006).
- Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S. A. & Gronthos, S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells Dayt. Ohio* **26**, 1787–1795 (2008).
- Arthur, A. *et al.* Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**, 2229–2237 (2009).
- Chalisserry, E. P., Nam, S. Y., Park, S. H. & Anil, S. Therapeutic potential of dental stem cells. *J. Tissue Eng.* **8**, 2041731417702531 (2017).
- Kircher, M. F., Gambhir, S. S. & Grimm, J. Noninvasive cell-tracking methods. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 677–688 (2011).
- Terreno, E. *et al.* Effect of the intracellular localization of a Gd-based imaging probe on the relaxation enhancement of water protons. *Magn. Reson. Med.* **55**, 491–497 (2006).
- Silva, A. C., Lee, J. H., Aoki, I. & Koretsky, A. P. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): methodological and practical considerations. *NMR Biomed.* **17**, 532–543 (2004).
- Dekaban, G. A. *et al.* Tracking and evaluation of dendritic cell migration by cellular magnetic resonance imaging. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **5**, 469–483 (2013).
- Tarulli, E. *et al.* Effectiveness of micron-sized superparamagnetic iron oxide particles as markers for detection of migration of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a stroke model. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **37**, 1409–1418 (2013).
- Chen, X. *et al.* Dynamic Tracking of Injected Mesenchymal Stem Cells after Myocardial Infarction in Rats: A Serial 7T MRI Study. *Stem Cells Int.* **2016**, 4656539 (2016).
- Valable, S. *et al.* *In vivo* MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *NeuroImage* **40**, 973–983 (2008).
- Balyasnikova, I. V. *et al.* Intranasal delivery of mesenchymal stem cells significantly extends survival of irradiated mice with experimental brain tumors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **22**, 140–148 (2014).
- Emmert, M. Y. *et al.* Transcatheter based electromechanical mapping guided intramyocardial transplantation and *in vivo* tracking of human stem cell based three dimensional microtissues in the porcine heart. *Biomaterials* **34**, 2428–2441 (2013).
- Chaumeil, M. M. *et al.* Longitudinal evaluation of MPIO-labeled stem cell biodistribution in glioblastoma using high resolution and contrast-enhanced MR imaging at 14.1 tesla. *Neuro-Oncol.* **14**, 1050–1061 (2012).
- Boulland, J.-L. *et al.* Evaluation of intracellular labeling with micron-sized particles of iron oxide (MPIOs) as a general tool for *in vitro* and *in vivo* tracking of human stem and progenitor cells. *Cell Transplant.* **21**, 1743–1759 (2012).
- Bourget, J.-M. *et al.* Patterning of Endothelial Cells and Mesenchymal Stem Cells by Laser-Assisted Bioprinting to Study Cell Migration. *BioMed Res. Int.* **2016** (2016).
- Xiao, L. & Nasu, M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem Cells Cloning Adv. Appl.* **7**, 89–99 (2014).
- McFadden, C., Mallett, C. L. & Foster, P. J. Labeling of multiple cell lines using a new iron oxide agent for cell tracking by MRI. *Contrast Media Mol. Imaging* **6**, 514–522 (2011).
- Lalande, C. *et al.* Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering. *Eur. Cell. Mater.* **21**, 341–354 (2011).
- Nkansah, M. K., Thakral, D. & Shapiro, E. M. Magnetic poly(lactide-co-glycolide) and cellulose particles for MRI-based cell tracking. *Magn. Reson. Med.* **65**, 1776–1785 (2011).
- Bennewitz, M. F., Tang, K. S., Markakis, E. A. & Shapiro, E. M. Specific chemotaxis of magnetically labeled mesenchymal stem cells: implications for MRI of glioma. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* **14**, 676–687 (2012).
- Noad, J. *et al.* MRI tracking of transplanted iron-labeled mesenchymal stromal cells in an immune-compromised mouse model of critical limb ischemia. *NMR Biomed.* **26**, 458–467 (2013).
- Ribot, E. J., Gaudet, J. M., Chen, Y., Gilbert, K. M. & Foster, P. J. *In vivo* MR detection of fluorine-labeled human MSC using the bSSFP sequence. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 1731–1739 (2014).
- Shapiro, E. M. *et al.* MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10901–10906 (2004).
- Shapiro, E. M., Skrtic, S. & Koretsky, A. P. Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. *Magn. Reson. Med.* **53**, 329–338 (2005).
- Heyn, C. *et al.* *In vivo* MRI of cancer cell fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain. *Magn. Reson. Med.* **56**, 1001–1010 (2006).
- Shapiro, E. M., Sharer, K., Skrtic, S. & Koretsky, A. P. *In vivo* detection of single cells by MRI. *Magn. Reson. Med.* **55**, 242–249 (2006).
- Dodd, S. J. *et al.* Detection of single mammalian cells by high-resolution magnetic resonance imaging. *Biophys. J.* **76**, 103–109 (1999).

45. Ribot, E. J. & Foster, P. J. *In vivo* MRI discrimination between live and lysed iron-labelled cells using balanced steady state free precession. *Eur. Radiol.* **22**, 2027–2034 (2012).
46. Di Corato, R. *et al.* High-resolution cellular MRI: gadolinium and iron oxide nanoparticles for in-depth dual-cell imaging of engineered tissue constructs. *ACS Nano* **7**, 7500–7512 (2013).
47. Burks, H. E. *et al.* Laser Direct-Write Onto Live Tissues: A Novel Model for Studying Cancer Cell Migration. *J. Cell. Physiol.* **231**, 2333–2338 (2016).
48. Granot, D. *et al.* Clinically viable magnetic poly (lactide-co-glycolide) particles for MRI-based cell tracking. *Magn. Reson. Med.* **71**, 1238–1250 (2014).
49. Ahrens, E. T., Helfer, B. M., O'Hanlon, C. F. & Schirda, C. Clinical cell therapy imaging using a perfluorocarbon tracer and fluorine-19 MRI. *Magn. Reson. Med.* **72**, 1696–1701 (2014).
50. Sears, N. A., Seshadri, D. R., Dhavalikar, P. S. & Cosgriff-Hernandez, E. A Review of Three-Dimensional Printing in Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* **22**, 298–310 (2016).
51. Ribot, E. J. *et al.* *In vivo* single scan detection of both iron-labeled cells and breast cancer metastases in the mouse brain using balanced steady-state free precession imaging at 1.5 T. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **34**, 231–238 (2011).
52. Heyn, C. *et al.* *In vivo* magnetic resonance imaging of single cells in mouse brain with optical validation. *Magn. Reson. Med.* **55**, 23–29 (2006).
53. Guillemot, F. *et al.* High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomater.* **6**, 2494–2500 (2010).
54. Guillotin, B. *et al.* Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials* **31**, 7250–7256 (2010).

Acknowledgements

The authors would like to thank “Fondation des Gueules Cassées, Paris – France” (N°54–2017) and “Fondation de l’Avenir, Paris – France” (N°AP-RM-17-038) for their financial support, and Dr. Daria Narmoneva for her contribution to this manuscript.

Author Contributions

O.K. and E.R. conceived the idea, carried out the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript with assistance from all the authors. J.C.F. participated to the experiments and revised the manuscript. R.D. and S.M. participated to the experiments, contributed to discussions of results, coordinated and supervised the overall project. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34226-9>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

4.3. Conclusions

Cet article original montre les premières images en IRM de cellules bioimprimées par LAB et marquées par un agent de contraste. L'adaptation du dispositif d'acquisition IRM a permis dans un premier temps d'imager les échantillons de bioimpression *in vitro*.

Les concentrations optimales d'incubation de MPIO ont été déterminées (1 :200) afin de permettre une bonne sensibilité de détection sur les images IRM et une reproduction précise des motifs imprimés. Une corrélation linéaire a été retrouvée entre les signaux IRM et la densité cellulaire des motifs bioimprimés. La comparaison des images obtenues par IRM et par microscopie confocale a permis de mettre en évidence la précision de l'IRM pour imager les motifs d'impression. Un suivi sur 7 jours a également été réalisé permettant de vérifier que les cellules étaient suivies en temps réel (et les particules seules), et que le signal était conservé au cours du temps.

Enfin le motif anneau a été imagé *in vivo*. Les résultats ont ainsi démontré la possibilité d'utiliser l'IRM couplé à un marquage cellulaire par MPIO pour suivre des motifs organisés *in situ* par Bioimpression Assistée par Laser sur un défaut osseux de calvaria chez la souris.

Le développement d'une méthode efficace de suivi *in vivo*, non invasive et non destructive, est une étape primordiale pour pouvoir envisager une application clinique de la Bioimpression Assistée par Laser. L'IRM, associé aux MPIO, pourrait permettre un meilleur contrôle de la procédure de bioimpression, un suivi de l'évolution des cellules implantées et une évaluation de la cicatrisation, et ce même en profondeur.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

La capacité de la Bioimpression Assistée par Laser à reproduire avec précision le microenvironnement des cellules et la microarchitecture des tissus natifs fait de cette technique un outil prometteur pour la recherche fondamentale, l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative. Des modèles *in vitro* peuvent être générés pour des études pharmaceutiques, des recherches sur des maladies, des tests de biomatériaux, des tests de toxicité et des études portant sur les interactions cellulaires. De plus, plusieurs applications cliniques peuvent être envisagées, allant de la pré-vascularisation de substituts transplantables pour la régénération osseuse à la réparation nerveuse, cardiaque et cutanée.

Dans le cadre de ce travail, nous avons pu déterminer les paramètres d'impression et conditions de culture optimaux afin de générer des réseaux micro-vasculaires avec une architecture définie, en s'appuyant sur la précision et la reproductibilité du LAB. L'énergie d'impression, la densité locale en cellules endothéliales du motif bioimprimé et la composante matricielle idéales ont pu être définies. Ce modèle a ensuite été transposé *in vivo* pour étudier l'effet de l'organisation de la pré-vascularisation sur la régénération osseuse. Les résultats ont montré un bénéfice de la pré-organisation des cellules endothéliales sur la vascularisation et la régénération osseuse des défauts critiques, comparativement à l'ensemencement aléatoire des cellules. Plus précisément, les motifs « disque » et « anneau barré » ont montré être les conditions les plus favorables à la promotion de la vascularisation et de la régénération osseuse. En parallèle, une nouvelle méthode pour imager les motifs *in vivo* par IRM a été développée, afin de répondre à la problématique du suivi cellulaire après bioimpression *in situ*.

Une synthèse des différents résultats obtenus dans le cadre de cette Thèse est présentée dans la figure ci-après (Figure 41).

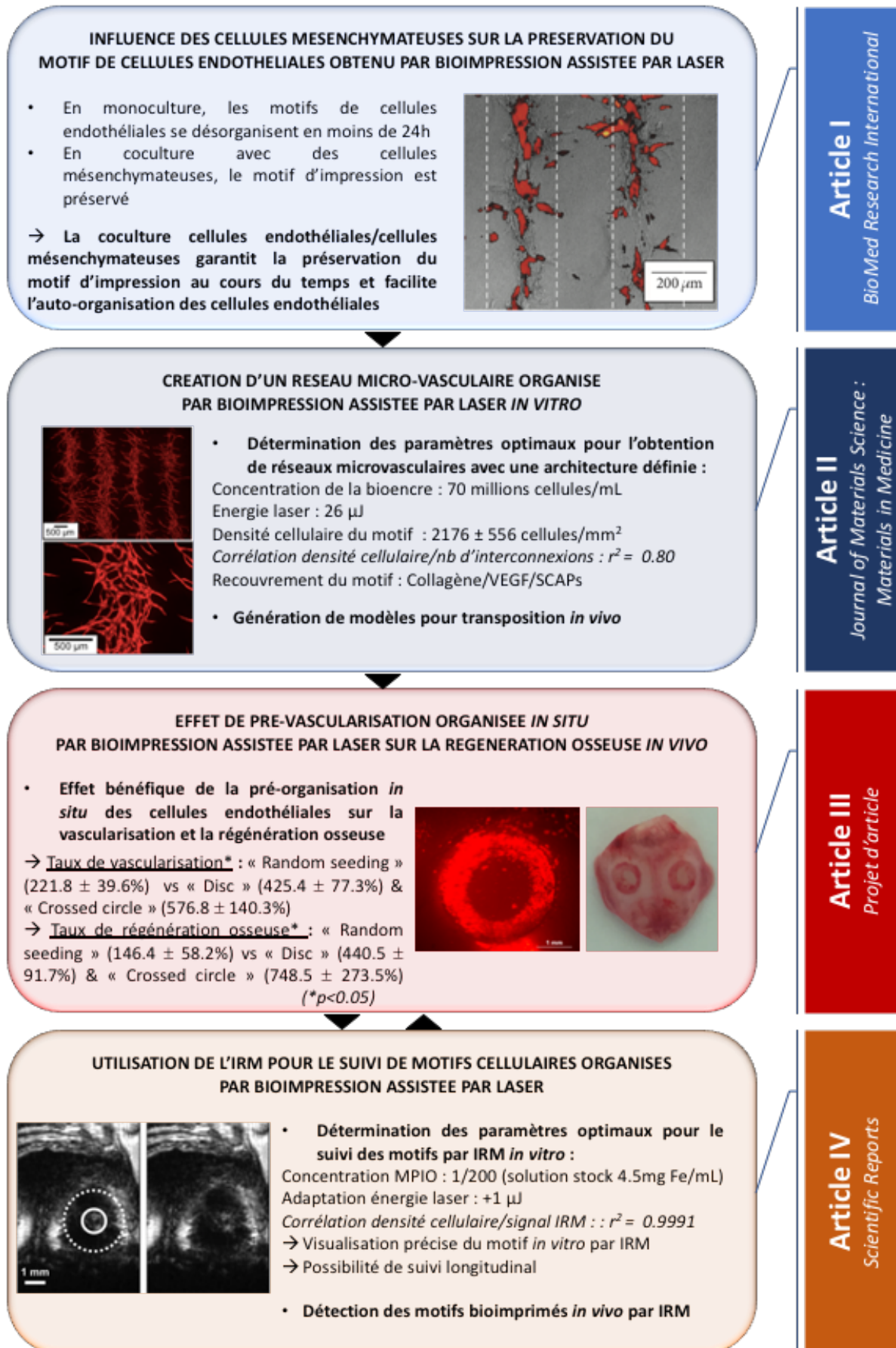


FIGURE 41 : SYNTHÈSE DES RESULTATS DU TRAVAIL DE THESE

Plusieurs perspectives de travail sont envisagées à la suite de cette Thèse :

- *Suivi in vivo des motifs bioimprimés à l'aide de nanoparticules fluorescentes organiques*

Une collaboration a été initiée récemment avec l'UMR 5255 CNRS/Université de Bordeaux (ISM-Institut des Sciences Moléculaires) en vue de développer une nouvelle méthode de suivi des motifs bioimprimés, grâce à des techniques d'imagerie par fluorescence *in vivo*. Outre le contrôle du motif post-impression, l'imagerie par fluorescence nous permettrait d'avoir un suivi plus précis de l'organisation des réseaux micro-vasculaires par les cellules endothéliales au cours du temps. Ces nouvelles expérimentations seront basées sur l'utilisation de nanoparticules fluorescentes organiques (FONs). L'intérêt majeur de ces particules est qu'elles émettent un signal 1000 à 10000 fois plus important que les fluorophores conventionnels, lesquels n'étaient pas adaptés à nos conditions expérimentales du fait de la faible quantité de cellules imprimées. Les premiers essais que nous avons pu mener ont confirmé l'absence de cytotoxicité au niveau des types cellulaires utilisés (HUVECs/EPCs/SCAPs). Des analyses sont actuellement en cours afin de déterminer les concentrations de nanoparticules optimales en vue de leur application à la bioimpression *in vivo*.

- *Optimisation des paramètres d'impression via l'étude des propriétés du substrat receveur*

Pour chacune des études menées au laboratoire en rapport avec la Bioimpression, une optimisation préalable des paramètres d'impression a été menée, en se centrant quasi-exclusivement sur les propriétés du substrat donneur (ex. épaisseur, concentration et viscosité de la bioencre ; épaisseur de la couche absorbante métallique ; épaisseur de la lame donneuse). En effet, depuis les premières études, le collagène est resté le biopaper de choix pour les expérimentations *in vitro* avec des critères d'épaisseur et de composition bien établis. Avec le développement de la Bioimpression *in vivo*, il paraît indispensable de s'intéresser plus précisément au substrat receveur, dont les propriétés seront amenées à varier en fonction du site à régénérer et des biomatériaux utilisés. L'étude de la précision du motif et de la profondeur d'impression en fonction du tissu receveur (par ex. peau, os, muscle, ...) semble indispensable pour maîtriser au mieux le processus d'impression *in vivo*.

- Utilisation de nouveaux biomatériaux pour l'optimisation du modèle *in vivo*

Une des limites du travail mené ici reste le faible taux de régénération osseuse obtenu. En effet, aucune des conditions n'a permis la régénération *ad integrum* des défauts osseux. Deux axes de travail sont envisagés afin d'améliorer le modèle mis au point dans ce projet de Thèse. D'une part, il semblerait intéressant d'avoir recours à un biopaper présentant des propriétés mécaniques plus adaptées : i/ à la promotion de la régénération osseuse, ii/ à l'implantation *in vivo*, pour faciliter le maintien du biomatériau au niveau du site d'implantation. D'autre part, une autre piste envisagée est d'associer à notre modèle de pré-vascularisation l'utilisation d'un matériau bioactif, comme les céramiques phospho-calciques, afin de favoriser la régénération osseuse. Une collaboration est actuellement en cours de discussion.

- Développement d'une nouvelle plateforme multimodale dédiée à la bioimpression *in situ et in vivo*

Le développement de la chirurgie robotique permet d'envisager la possibilité de contourner le processus de construction *in vitro* en imprimant directement sur le patient afin de réduire les risques de contamination et les délais d'implantation. Cependant, les outils nécessaires aux approches d'ingénierie tissulaire ne sont pas encore au point et leur développement constitue un défi technologique très attendu. Parmi ces outils, la Bioimpression tient une place majeure du fait de sa capacité à générer des tissus complexes avec un contrôle précis de l'architecture et de la composition. Un dossier de demande de subvention a été déposé récemment par notre Unité, en collaboration avec l'ART BioPrint, afin de développer une approche de bioimpression 3D intégrative, *in situ* et *in vivo*, pour la réparation osseuse. Ce projet a pour objectif le dépôt contrôlé et automatisé de biomatériau ainsi que de cellules directement *in vivo* et *in situ* afin de modéliser un processus de régénération tissulaire qui pourrait être utilisé au bloc opératoire. L'idée est de développer une plateforme de bioimpression comprenant à la fois la technologie de LAB, mais aussi la technologie de jet d'encre. A plus long terme, une des perspectives serait d'élaborer une station de travail permettant la réalisation consécutive de la procédure chirurgicale, le dépôt matriciel et l'impression cellulaire de manière automatisée.

La thématique de la médecine régénératrice fait actuellement l'objet d'un projet de création d'un Pôle de Médecine Régénératrice au sein de l'Université de Bordeaux, qui regroupera une dizaine d'équipes labellisées par l'INSERM, le CNRS, l'EFS, ainsi que des plateformes technologiques et des industriels aquitains. Il s'agit d'une excellente opportunité permettant de poursuivre le développement de notre axe de recherche autour de la pré-vascularisation des substituts osseux d'ingénierie tissulaire. La Bioimpression représente une innovation et une rupture technologique majeure dans le domaine de la Santé, avec des perspectives intéressantes relatives à la prise en charge personnalisée des patients, avec la fabrication *in situ* et sur-mesure des tissus à régénérer.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

1. PUBLICATIONS

1.1. Articles dans revues internationales

2016	<p>Patterning of endothelial cells and mesenchymal stem cells by Laser-Assisted Bioprinting to study cell migration JM Bourget, <u>O. Kérourédan</u>, M. Médina, M. Rémy, NB Thébaud, R. Bareille, O. Chassande, J. Amédée, S. Catros, R. Devillard Biomed Research International. 2016;2016:3569843.</p>
2017	<p>Femtosecond versus picosecond laser pulses for film-free laser bioprinting S. Petit, <u>O. Kérourédan</u>, R. Devillard, E. Cormier Applied Optics. 2017 Nov 1;56(31):8648-8655.</p>
2018	<p>Novel tracking method for cellular patterns obtained by Laser-Assisted Bioprinting using Magnetic Resonance Imaging <u>O. Kérourédan</u>, E. Ribot, JC Fricain, R. Devillard, S. Miraux Scientific Reports. 2018 Oct 25 ;8(1):15777</p>
2019	<p>Micropatterning of endothelial cells to create a capillary-like network with defined architecture by Laser-Assisted Bioprinting <u>O. Kérourédan</u>, JM Bourget, M. Rémy, J. Kalisky, S. Catros, NB Thébaud, R. Devillard Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2019 Feb 12;30(2):28</p>

1.2. Articles dans revues nationales

2016	<p>Etude de faisabilité d'un greffon biofabriqué pour traiter des récessions parodontales R. Smirani, L. Delattre, <u>O. Kérourédan</u>, JC Fricain, R. Devillard, A. Naveau Médecine Buccale Chirurgie Buccale. 2016 Dec;22(4) :331-335.</p>
2017	<p>Odontologie et Ingénierie Tissulaire : la bioimpression au service de la régénération osseuse <u>O. Kérourédan</u>, V. Guduric, R. Smirani, M. Rémy, H. de Oliveira, JC Fricain, A. Naveau, R. Devillard, S. Catros L'Information Dentaire. 2017 Apr ; 99(16).</p>

1.3. Chapitres d'ouvrage

2017	Laser-Assisted Bioprinting of Cells for Tissue Engineering <u>O. Kérourédan</u> , M. Rémy, H. de Oliveira, F. Guillemot, R. Devillard Livre « Laser Printing of Functional Materials : Fundamentals & Applications in Electronics, 3D Microfabrication and Biomedicine ». Edité par A. Piqué et P. Serra. Publié par Wiley-WCH.
	Laser-Assisted Bioprinting for Tissue Engineering <u>O. Kérourédan</u> , H. Desrus, M. Rémy, J. Kalisky, JM Bourget, J. Amédée-Vilamitjana, JC Fricain, S. Catros, R. Devillard Livre « Biomaterials and Nanotechnology for Tissue Engineering ». Edité par S. Swaminathan, K. Uma Maheswari, S. Anuradha. Publié par CRC Press.
2018	Laser-Assisted Bioprinting for bone repair D. Hakobyan, <u>O. Kérourédan</u> , N. Dusserre, Chantal Medina, R. Devillard, JC Fricain, H. Oliveira Livre « 3-D Bioprinting: Principles & Protocols ». Série « Methods in Molecular Biology ». Edité par J. Crook. Publié par Springer Nature. En cours de publication

2. COMMUNICATIONS ORALES

2.1. Communications orales internationales

2015	<p>In vitro creation of vascular structures by Laser-Assisted Bioprinting <u>O. Kérourédan</u>, M. Rémy, NB Thébaud, J. Kalisky, E. Pagès, J. Amédée, JC Fricain, S. Catros, R. Devillard <i>World Conference on Regenerative Medicine</i> (21-23 octobre 2015 – Leipzig, Allemagne) Abstract publié dans <i>Regenerative Medicine</i>. 2015 Oct;10(7):43.</p>
	<p>Femtosecond versus picosecond pulses for laser-induced transfer of biomaterials R. Devillard, <u>S. Petit</u>, JC Delagne, O. Kérourédan, F. Deloison, E. Cormier <i>Biofabrication</i> (7-9 novembre 2015 – Utrecht, Pays-Bas)</p>
2016	<p>Creation of a capillary-like network with a defined architecture by Laser-Assisted Bioprinting for bone regeneration <u>O. Kérourédan</u>, M. Rémy, J. Kalisky, J. Amédée, JC Fricain, S. Catros, D. Le Nihouannen, NB Thébaud, R. Devillard <i>2nd Workshop on Regenerative Medicine</i> (24-26 octobre 2016 – Bordeaux, France)</p>
2017	<p>Creation of a capillary-like network with a defined architecture by Laser-Assisted Bioprinting for bone regeneration O. Kérourédan, M. Rémy, J. Kalisky, J. Amédée, JC Fricain, <u>S. Catros</u>, D. Le Nihouannen, NB Thébaud, R. Devillard <i>2nd International Conference on 3D Printing in Medicine</i> (19-20 mai 2017 – Mainz, Allemagne)</p>
	<p>Creation of a capillary-like network with a defined architecture by Laser-Assisted Bioprinting for bone regeneration <u>O. Kérourédan</u>, JM Bourget, M. Rémy, J. Kalisky, JC Fricain, S. Catros, NB Thébaud, R. Devillard <i>ESB 2017 : European Society for Biomaterials</i> (4-8 septembre 2017 – Ath��nes, Gr��ce)</p>
2018	<p>Novel tracking method for cellular patterns obtained by Laser-Assisted Bioprinting using Magnetic Resonance Imaging O. Kérourédan, E. Ribot, R. Devillard, <u>S. Miraux</u> <i>ISMRM 2018 : International Society for Magnetic Resonance in Medicine</i> (16-21 juin 2018 – Paris, France)</p>

Behaviour of Stem Cells from the Apical Papilla with BioRoot^{RCS} cement in a Laser-Assisted Bioprinted model
D. Roth, NB Thébaud, D. Hakobyan, N. Dusserre, S. Catros, JC Fricain, R. Devillard, O. Kérourédan
ISBF 2018: Annual Conference of the International Society for Biofabrication (28-31 octobre 2018 – Würzburg, Allemagne)

2.2. Communications orales nationales

2016	<p>Creation of a vascular network with a defined architecture by Laser-Assisted Bioprinting for bone regeneration <u>O. Kérourédan</u>, M. Rémy, NB Thébaud, J. Kalisky, J. Amédée, JC Fricain, S. Catros, D. Le Nihouannen, R. Devillard <i>Séminaire des Jeunes Chercheurs HEADS, session « Communicating about health research »</i> (5 avril 2016 – Bordeaux, France)</p>
	<p>Régénération tissulaire par bioimpression O. Kérourédan, M. Rémy, NB Thébaud, S. Catros, <u>R. Devillard</u> <i>ITMO Physiopathologie – AVESIAN-INSERM; Fondations et Associations pour la recherche sur les rhumatismes et maladies musculosquelettiques; 3^{ème} journée « Ensemble contre les rhumatismes »</i> (12 octobre 2016 – Paris, France)</p>
	<p>Création d'un réseau vasculaire organisé par Bioimpression Assistée par Laser pour la régénération osseuse <u>O. Kérourédan</u>, M. Rémy, NB Thébaud, J. Kalisky, J. Amédée, JC Fricain, S. Catros, D. Le Nihouannen, R. Devillard <i>Congrès ADF 2016, séance « B17: forum des jeunes chercheurs en Odontologie; défi: mon travail de recherche en 360 secondes »</i> (23 novembre 2016 – Paris, France)</p> <p>PRIX DU JEUNE CHERCHEUR ADF 2016</p>
2017	<p>Comment imager et quantifier les réseaux vasculaires obtenus par bioimpression assistée par laser <i>in vitro</i> ? <u>O. Kérourédan</u>, R. Devillard <i>Workshop PEPS, Projets exploratoires pluridisciplinaires</i> (25 janvier 2017 – Bordeaux, France)</p>
	<p>Mise au point d'un modèle d'étude par Bioimpression assistée par laser pour étudier l'effet de l'organisation de la vascularisation sur la régénération osseuse <i>in vivo</i> <u>O. Kérourédan</u>, JM Bourget, M. Rémy, JC Fricain, S. Catros, NB Thébaud, R. Devillard</p>

Journées Scientifiques du CNEOC 2017 (18-20 mai 2017 – Montpellier, France)

PRIX DU CNEOC 2017 – PRIX DU MEILLEUR JEUNE CONFERENCIER

Development of a study model by Laser-Assisted Bioprinting to assess the effect of the organization of vascularization on bone regeneration *in vivo*

O. Kérourédan, JM Bourget, M. Rémy, JC Fricain, S. Catros, NB Thébaud, R. Devillard

Congrès de la SFBD : Société Francophone des Biomatériaux Dentaires (6-7 juillet 2017 – Paris, France)

2018 Etude de l'effet de l'organisation vasculaire sur la régénération osseuse *in vivo* par création de modèle bio-imprimé

O. Kérourédan

WORKSHOP La photonique appliquée à la santé : La bioimpression laser (6 février 2018 – Bordeaux, France)

Etude de la régénération osseuse en présence d'un réseau vasculaire organisé *in situ* par bioimpression assistée par laser

O. Kérourédan

Assemblée générale AFCM/Fondation de l'Avenir (5 juin 2018 – Paris, France)

3. COMMUNICATIONS AFFICHEES

3.1. Communications affichées internationales

2015 Patterning of endothelial cells by Laser-Assisted Bioprinting promotes the creation of capillary-like structures

O. Kérourédan, M. Rémy, NB Thébaud, J. Kalisky, E. Pagès, J. Amédée, JC Fricain, S. Catros, R. Devillard

Biofabrication (7-9 novembre 2015 – Utrecht, Pays-Bas)

Biofabrication technologies for tissue engineering and regenerative medicine

R. Devillard, O. Kérourédan, V. Guduric, S. Catros, H. de Oliveira, N. L'Heureux, M. Rémy, J. Amédée, JC Fricain

ITMO (15-16 décembre 2015 – Montpellier, France)

3.2. Communications affichées nationales

2016	Création d'un réseau vasculaire organisé par Bioimpression Assistée par Laser pour la régénération osseuse <u>O. Kérourédan</u> , M. Rémy, NB Thébaud, J. Kalisky, J. Amédée, JC Fricain, S. Catros, D. Le Nihouannen, R. Devillard <i>Journées des Sciences Odontologiques 2016</i> (15-16 juin 2016 – Bordeaux, France)
2017	Development of a study model by Laser-Assisted Bioprinting to assess the effect of the organization of vascularization on bone regeneration <i>in vivo</i> <u>O. Kérourédan</u> , JM Bourget, M. Rémy, J. Kalisky, S. Catros, R. Devillard <i>Doctoral School Day 2017</i> (12 avril 2017 – Bordeaux, France)
	Development of a study model by Laser-Assisted Bioprinting to assess the effect of the organization of vascularization on bone regeneration <i>in vivo</i> <u>O. Kérourédan</u> , JM Bourget, M. Rémy, J. Kalisky, S. Catros, R. Devillard <i>Journée des Sciences Odontologiques 2017</i> (15-16 juin 2017 – Bordeaux, France)

BIBLIOGRAPHIE

1. Robling, A. G., Castillo, A. B. & Turner, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **8**, 455–498 (2006).
2. Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P. & Varanasi, S. S. The cell biology of bone metabolism. *J. Clin. Pathol.* **61**, 577–587 (2008).
3. Sikavitsas, V. I., Temenoff, J. S. & Mikos, A. G. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* **22**, 2581–2593 (2001).
4. Hillier, M. L. & Bell, L. S. Differentiating human bone from animal bone: a review of histological methods. *J. Forensic Sci.* **52**, 249–263 (2007).
5. Turner, C. H., Wang, T. & Burr, D. B. Shear strength and fatigue properties of human cortical bone determined from pure shear tests. *Calcif. Tissue Int.* **69**, 373–378 (2001).
6. Marieb, E. N. *Essentials of human anatomy & physiology*. (10th ed:San Francisco, CA:Benjamin Cummings, 2012).
7. Rodan, G. A. Introduction to bone biology. *Bone* **13 Suppl 1**, S3-6 (1992).
8. Jee, W. Integrated bone tissue physiology: Anatomy and physiology. in *Bone Mechanics Handbook* 1–68 (2001).
9. Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R. & Recker, R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr. Course Lect.* **45**, 371–386 (1996).
10. Downey, P. A. & Siegel, M. I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys. Ther.* **86**, 77–91 (2006).
11. Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **3 Suppl 3**, S131-139 (2008).
12. Karsenty, G., Kronenberg, H. M. & Settembre, C. Genetic control of bone formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 629–648 (2009).
13. Bonewald, L. F. The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **26**, 229–238 (2011).
14. Everts, V. *et al.* The bone lining cell: its role in cleaning Howship’s lacunae and initiating bone formation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **17**, 77–90 (2002).
15. Kohli, N. *et al.* Bone remodelling in vitro: Where are we headed?: -A review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials in vitro. *Bone* **110**, 38–46 (2018).
16. Seeman, E. Bone modeling and remodeling. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **19**, 219–233 (2009).
17. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res. Int.* **2015**, 421746 (2015).

18. Jilka, R. L. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med. Pediatr. Oncol.* **41**, 182–185 (2003).
19. Weilbaecher, K. N., Guise, T. A. & McCauley, L. K. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 411–425 (2011).
20. Kim, C. H. *et al.* Trabecular bone response to mechanical and parathyroid hormone stimulation: the role of mechanical microenvironment. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **18**, 2116–2125 (2003).
21. Hsu, H. *et al.* Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3540–3545 (1999).
22. Väänänen, K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption—rationale for the design of new therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 959–971 (2005).
23. Rucci, N. Molecular biology of bone remodelling. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **5**, 49–56 (2008).
24. Hadjidakis, D. J. & Androulakis, I. I. Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1092**, 385–396 (2006).
25. Ho-Shui-Ling, A. *et al.* Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials* **180**, 143–162 (2018).
26. Holmes, D. Non-union bone fracture: a quicker fix. *Nature* **550**, S193 (2017).
27. Seeman, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. *J. Bone Miner. Metab.* **26**, 1–8 (2008).
28. Marzona, L. & Pavolini, B. Play and players in bone fracture healing match. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **6**, 159–162 (2009).
29. Marsell, R. & Einhorn, T. A. The biology of fracture healing. *Injury* **42**, 551–555 (2011).
30. Santos, M. I. & Reis, R. L. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol. Biosci.* **10**, 12–27 (2010).
31. Carulli, C., Innocenti, M. & Brandi, M. L. Bone vascularization in normal and disease conditions. *Front. Endocrinol.* **4**, 106 (2013).
32. Laroche, M. Intraosseous circulation from physiology to disease. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **69**, 262–269 (2002).
33. Chapter 6: Osseous Tissue and Bone Structure Flashcards | Easy Notecards. Available at: http://www.easynotecards.com/notecard_set/18419?num=4. (Accessed: 16th November 2018)
34. Tarquini, R., Perfetto, F. & Tarquini, B. Endothelin-1 and Paget's bone disease: is there a link? *Calcif. Tissue Int.* **63**, 118–120 (1998).

35. Grellier, M., Bordenave, L. & Amédée, J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **27**, 562–571 (2009).
36. Villars, F. *et al.* Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, C775–785 (2002).
37. Wallez, Y., Vilgrain, I. & Huber, P. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc. Med.* **16**, 55–59 (2006).
38. Siebers, M. C., ter Brugge, P. J., Walboomers, X. F. & Jansen, J. A. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* **26**, 137–146 (2005).
39. Hirschi, K. K. & D'Amore, P. A. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc. Res.* **32**, 687–698 (1996).
40. García-Gareta, E., Coathup, M. J. & Blunn, G. W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone* **81**, 112–121 (2015).
41. Goulet, J. A., Senunas, L. E., DeSilva, G. L. & Greenfield, M. L. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. *Clin. Orthop.* 76–81 (1997).
42. Laurencin, C., Khan, Y. & El-Amin, S. F. Bone graft substitutes. *Expert Rev. Med. Devices* **3**, 49–57 (2006).
43. Salgado, A. J., Coutinho, O. P. & Reis, R. L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol. Biosci.* **4**, 743–765 (2004).
44. St John, T. A. *et al.* Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. *Am. J. Orthop. Belle Mead NJ* **32**, 18–23 (2003).
45. Delloye, C., Cornu, O., Druetz, V. & Barbier, O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J. Bone Joint Surg. Br.* **89**, 574–579 (2007).
46. Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M. & Ramirez-Vick, J. E. Scaffold design for bone regeneration. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **14**, 15–56 (2014).
47. Einhorn, T. A. & Gerstenfeld, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11**, 45–54 (2015).
48. Goldstein, S. A. Tissue engineering: functional assessment and clinical outcome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **961**, 183–192 (2002).
49. Porter, J. R., Ruckh, T. T. & Popat, K. C. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol. Prog.* **25**, 1539–1560 (2009).
50. Fricain, J.-C. *et al.* Impression 3D en médecine régénératrice et ingénierie tissulaire. *médecine/sciences* **33**, 52–59 (2017).
51. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **260**, 920–926 (1993).
52. Dvash, T., Ben-Yosef, D. & Eiges, R. Human embryonic stem cells as a powerful tool for studying human embryogenesis. *Pediatr. Res.* **60**, 111–117 (2006).

53. Friedrich Ben-Nun, I. & Benvenisty, N. Human embryonic stem cells as a cellular model for human disorders. *Mol. Cell. Endocrinol.* **252**, 154–159 (2006).
54. Yamada, K. M. & Cukierman, E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* **130**, 601–610 (2007).
55. Hutmacher, D. W., Sittinger, M. & Risbud, M. V. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol.* **22**, 354–362 (2004).
56. van Blitterswijk, C. A., Moroni, L., Rouwkema, J., Siddappa, R. & Sohier, J. Tissue engineering – an introduction. in *Tissue Engineering* (eds. Blitterswijk, C. van et al.) xii–xxxvi (Academic Press, 2008).
57. Amini, A. R., Laurencin, C. T. & Nukavarapu, S. P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **40**, 363–408 (2012).
58. Laurencin, C. T., Ambrosio, A. M. A., Borden, M. D. & Cooper, J. A. Tissue Engineering: Orthopedic Applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **1**, 19–46 (1999).
59. Bonassar, L. J. & Vacanti, C. A. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **30–31**, 297–303 (1998).
60. Colnot, C. Cell sources for bone tissue engineering: insights from basic science. *Tissue Eng. Part B Rev.* **17**, 449–457 (2011).
61. Marolt, D. Chapter 40 - Tissue Engineering Craniofacial Bone Products. in *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* (eds. Vishwakarma, A., Sharpe, P., Shi, S. & Ramalingam, M.) 521–539 (Academic Press, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00044-8
62. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
63. Hoffman, L. M. & Carpenter, M. K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 699–708 (2005).
64. Tian, X.-F. *et al.* Comparison of osteogenesis of human embryonic stem cells within 2D and 3D culture systems. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **68**, 58–67 (2008).
65. Kim, S. *et al.* In vivo bone formation from human embryonic stem cell-derived osteogenic cells in poly(d,l-lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials* **29**, 1043–1053 (2008).
66. Fong, C.-Y., Gauthaman, K. & Bongso, A. Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *J. Cell. Biochem.* **111**, 769–781 (2010).
67. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
68. Arvidson, K. *et al.* Bone regeneration and stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 718–746 (2011).

69. Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71–74 (1997).
70. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–147 (1999).
71. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007).
72. Bruder, S. P. *et al.* Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **16**, 155–162 (1998).
73. Bensaïd, W. *et al.* De novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model. *Tissue Eng.* **11**, 814–824 (2005).
74. Zhang, Z.-Y. *et al.* The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application. *Biomaterials* **33**, 2656–2672 (2012).
75. Mauney, J. R., Volloch, V. & Kaplan, D. L. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng.* **11**, 787–802 (2005).
76. Bruder, S. P. & Fox, B. S. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin. Orthop.* S68-83 (1999).
77. Frank, O. *et al.* Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J. Cell. Biochem.* **85**, 737–746 (2002).
78. Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I. & Akiyama, K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J. Prosthodont. Res.* **56**, 151–165 (2012).
79. Chalisserry, E. P., Nam, S. Y., Park, S. H. & Anil, S. Therapeutic potential of dental stem cells. *J. Tissue Eng.* **8**, 2041731417702531 (2017).
80. Sonoyama, W. *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS One* **1**, e79 (2006).
81. Ten Cate, A. R. The development of the periodontium--a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol.* **2000** **13**, 9–19 (1997).
82. Devillard, R. *et al.* In vitro assessment of a collagen/alginate composite scaffold for regenerative endodontics. *Int. Endod. J.* **50**, 48–57 (2017).
83. Abe, S., Yamaguchi, S., Watanabe, A., Hamada, K. & Amagasa, T. Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371**, 90–93 (2008).
84. Park, B.-W. *et al.* In vitro osteogenic differentiation of cultured human dental papilla-derived cells. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **67**, 507–514 (2009).

85. Wang, S. *et al.* Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Res.* **8**, 346–356 (2012).
86. Wang, J. *et al.* Bone morphogenetic protein-9 effectively induces osteo/odontoblastic differentiation of the reversibly immortalized stem cells of dental apical papilla. *Stem Cells Dev.* **23**, 1405–1416 (2014).
87. Zhang, W., Zhang, X., Ling, J., Wei, X. & Jian, Y. Osteo-/odontogenic differentiation of BMP2 and VEGF gene-co-transfected human stem cells from apical papilla. *Mol. Med. Rep.* **13**, 3747–3754 (2016).
88. Patel, A. & Honoré, E. Polycystins and renovascular mechanosensory transduction. *Nat. Rev. Nephrol.* **6**, 530–538 (2010).
89. Garlanda, C. & Dejana, E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1193–1202 (1997).
90. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. & Minick, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**, 2745–2756 (1973).
91. Arnaoutova, I. & Kleinman, H. K. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat. Protoc.* **5**, 628–635 (2010).
92. Tsigkou, O. *et al.* Engineered vascularized bone grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3311–3316 (2010).
93. Asahara, T. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964–967 (1997).
94. Murohara, T. Cord blood-derived early outgrowth endothelial progenitor cells. *Microvasc. Res.* **79**, 174–177 (2010).
95. Tateishi-Yuyama, E. *et al.* Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **360**, 427–435 (2002).
96. Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions. *Cardiology* **113**, 155–160 (2009).
97. Atesok, K., Li, R., Stewart, D. J. & Schemitsch, E. H. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **28**, 1007–1014 (2010).
98. Rozen, N. *et al.* Transplanted blood-derived endothelial progenitor cells (EPC) enhance bridging of sheep tibia critical size defects. *Bone* **45**, 918–924 (2009).
99. Liu, Y. *et al.* Vasculogenic and Osteogenesis-Enhancing Potential of Human Umbilical Cord Blood Endothelial Colony-Forming Cells. *STEM CELLS* **30**, 1911–1924 (2012).
100. Lee, D. Y. *et al.* Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone* **42**, 932–941 (2008).

101. Matsumoto, T. *et al.* Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J. Cell. Physiol.* **215**, 234–242 (2008).
102. Lee, K. Y. & Yuk, S. H. Polymeric protein delivery systems. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 669–697 (2007).
103. Lee, S.-H. & Shin, H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 339–359 (2007).
104. Costa-Pinto, A. R., Reis, R. L. & Neves, N. M. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tissue Eng. Part B Rev.* **17**, 331–347 (2011).
105. Costa-Pinto, A. R. *et al.* Chitosan-poly(butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6**, 21–28 (2012).
106. Lima, P. A. L., Resende, C. X., Soares, G. D. de A., Anselme, K. & Almeida, L. E. Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **33**, 3389–3395 (2013).
107. Vepari, C. & Kaplan, D. L. Silk as a Biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 991–1007 (2007).
108. Bhumiratana, S. *et al.* Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials* **32**, 2812–2820 (2011).
109. Suárez-González, D. *et al.* Controlled nucleation of hydroxyapatite on alginate scaffolds for stem cell-based bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* **95**, 222–234 (2010).
110. Zhou, H. & Xu, H. H. K. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **32**, 7503–7513 (2011).
111. Bae, M. S. *et al.* Photo-cured hyaluronic acid-based hydrogels containing simvastatin as a bone tissue regeneration scaffold. *Biomaterials* **32**, 8161–8171 (2011).
112. Semino, C. E. Self-assembling peptides: from bio-inspired materials to bone regeneration. *J. Dent. Res.* **87**, 606–616 (2008).
113. Mata, A. *et al.* Bone regeneration mediated by biomimetic mineralization of a nanofiber matrix. *Biomaterials* **31**, 6004–6012 (2010).
114. Aravamudhan, A. *et al.* Cellulose and collagen derived micro-nano structured scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Nanotechnol.* **9**, 719–731 (2013).
115. Shoulders, M. D. & Raines, R. T. COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 929–958 (2009).
116. Boccafoschi, F., Habermehl, J., Vesentini, S. & Mantovani, D. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials* **26**, 7410–7417 (2005).

117. Lynn, A. K., Yannas, I. V. & Bonfield, W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **71**, 343–354 (2004).
118. Isobe, Y. *et al.* Oriented Collagen Scaffolds for Tissue Engineering. *Mater. Basel Switz.* **5**, 501–511 (2012).
119. Hiraoka, Y. *et al.* In Situ Regeneration of Adipose Tissue in Rat Fat Pad by Combining a Collagen Scaffold with Gelatin Microspheres Containing Basic Fibroblast Growth Factor. *Tissue Eng.* **12**, 1475–1487 (2006).
120. He, W., Yong, T., Teo, W. E., Ma, Z. & Ramakrishna, S. Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: potential vascular graft for blood vessel tissue engineering. *Tissue Eng.* **11**, 1574–1588 (2005).
121. Stevens, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater. Today* **11**, 18–25 (2008).
122. Harley, B. A., Leung, J. H., Silva, E. C. C. M. & Gibson, L. J. Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Acta Biomater.* **3**, 463–474 (2007).
123. Xu, C. *et al.* Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **32**, 1051–1058 (2011).
124. Hussain, A., Takahashi, K., Sonobe, J., Tabata, Y. & Bessho, K. Bone Regeneration of Rat Calvarial Defect by Magnesium Calcium Phosphate Gelatin Scaffolds with or without Bone Morphogenetic Protein-2. *J. Maxillofac. Oral Surg.* **13**, 29–35 (2014).
125. Centrella, M., Horowitz, M. C., Wozney, J. M. & McCarthy, T. L. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr. Rev.* **15**, 27–39 (1994).
126. Yuasa, T. *et al.* Sonic hedgehog is involved in osteoblast differentiation by cooperating with BMP-2. *J. Cell. Physiol.* **193**, 225–232 (2002).
127. Shimoaka, T. *et al.* Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *J. Biol. Chem.* **277**, 7493–7500 (2002).
128. Simpson, A. H. R. W., Mills, L. & Noble, B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J. Bone Joint Surg. Br.* **88**, 701–705 (2006).
129. Hughes, F. J., Ghuman, M. & Talal, A. Periodontal regeneration: a challenge for the tissue engineer? *Proc. Inst. Mech. Eng. [H]* **224**, 1345–1358 (2010).
130. Gaur, T. *et al.* Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J. Biol. Chem.* **280**, 33132–33140 (2005).
131. Fei, Y., Xiao, L., Doetschman, T., Coffin, D. J. & Hurley, M. M. Fibroblast growth factor 2 stimulation of osteoblast differentiation and bone formation is mediated by modulation of the Wnt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 40575–40583 (2011).

132. Cai, J.-Q. *et al.* Sonic hedgehog enhances the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol. Int.* **36**, 349–355 (2012).
133. Gerber, H. P. *et al.* VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* **5**, 623–628 (1999).
134. Zelzer, E. *et al.* Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **129**, 1893–1904 (2002).
135. Street, J. *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9656–9661 (2002).
136. Richardson, T. P., Peters, M. C., Ennett, A. B. & Mooney, D. J. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat. Biotechnol.* **19**, 1029–1034 (2001).
137. Patel, Z. S. *et al.* Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* **43**, 931–940 (2008).
138. Shah, N. J. *et al.* Tunable dual growth factor delivery from polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* **32**, 6183–6193 (2011).
139. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257 (2000).
140. Park, K. M. & Gerecht, S. Harnessing developmental processes for vascular engineering and regeneration. *Dev. Camb. Engl.* **141**, 2760–2769 (2014).
141. Geudens, I. & Gerhardt, H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 4569–4583 (2011).
142. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* **9**, 653–660 (2003).
143. Sun, X., Altalhi, W. & Nunes, S. S. Vascularization strategies of engineered tissues and their application in cardiac regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **96**, 183–194 (2016).
144. Urbich, C. & Dimmeler, S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ. Res.* **95**, 343–353 (2004).
145. Blache, U. & Ehrbar, M. Inspired by Nature: Hydrogels as Versatile Tools for Vascular Engineering. *Adv. Wound Care* **7**, 232–246 (2018).
146. Marcelo, K. L., Goldie, L. C. & Hirschi, K. K. Regulation of endothelial cell differentiation and specification. *Circ. Res.* **112**, 1272–1287 (2013).
147. Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D. & Hynes, R. O. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* **95**, 507–519 (1998).
148. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307 (2011).
149. Phng, L.-K. & Gerhardt, H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev. Cell* **16**, 196–208 (2009).

150. Foo, S. S. *et al.* Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* **124**, 161–173 (2006).
151. Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A. & Betsholtz, C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 630–638 (2009).
152. Nguyen, L. H. *et al.* Vascularized Bone Tissue Engineering: Approaches for Potential Improvement. *Tissue Eng. Part B Rev.* **18**, 363–382 (2012).
153. Huang, Z., Nelson, E. R., Smith, R. L. & Goodman, S. B. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteroprogenitors] to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng.* **13**, 2311–2320 (2007).
154. Devescovi, V., Leonardi, E., Ciapetti, G. & Cenni, E. Growth factors in bone repair. *Chir. Organi Mov.* **92**, 161–168 (2008).
155. Malizos, K. N. & Papatheodorou, L. K. The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury* **36 Suppl 3**, S13-19 (2005).
156. Kanczler, J. M. & Oreffo, R. O. C. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur. Cell. Mater.* **15**, 100–114 (2008).
157. Hankenson, K. D., Dishowitz, M., Gray, C. & Schenker, M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury* **42**, 556–561 (2011).
158. Dai, J. & Rabie, A. B. M. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J. Dent. Res.* **86**, 937–950 (2007).
159. Lee, K. Y., Peters, M. C. & Mooney, D. J. Comparison of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in SCID mice. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **87**, 49–56 (2003).
160. Lee, R. J. *et al.* VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* **102**, 898–901 (2000).
161. McCarthy, I. The physiology of bone blood flow: a review. *J. Bone Joint Surg. Am.* **88 Suppl 3**, 4–9 (2006).
162. Wang, D. S., Miura, M., Demura, H. & Sato, K. Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* **138**, 2953–2962 (1997).
163. Samee, M. *et al.* Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J. Pharmacol. Sci.* **108**, 18–31 (2008).
164. Guillotin, B. *et al.* Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **14**, 325–332 (2004).

165. Villars, F., Bordenave, L., Bareille, R. & Amédée, J. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J. Cell. Biochem.* **79**, 672–685 (2000).
166. Koike, N. *et al.* Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* **428**, 138–139 (2004).
167. Levenberg, S. *et al.* Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat. Biotechnol.* **23**, 879–884 (2005).
168. Pirraco, R. P. *et al.* Endothelial cells enhance the in vivo bone-forming ability of osteogenic cell sheets. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **94**, 663–673 (2014).
169. Huo, B., Lu, X. L. & Guo, X. E. Intercellular calcium wave propagation in linear and circuit-like bone cell networks. *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 617–633 (2010).
170. Kaneuji, T. *et al.* Mechanisms involved in regulation of osteoclastic differentiation by mechanical stress-loaded osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 103–109 (2011).
171. Von Offenberg Sweeney, N. *et al.* Cyclic strain-mediated regulation of vascular endothelial cell migration and tube formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 573–582 (2005).
172. Li, W. & Sumpio, B. E. Strain-induced vascular endothelial cell proliferation requires PI3K-dependent mTOR-4E-BP1 signal pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H1591–1597 (2005).
173. Roosa, S. M. M., Kemppainen, J. M., Moffitt, E. N., Krebsbach, P. H. & Hollister, S. J. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. *J. Biomed. Mater. Res. A* **92**, 359–368 (2010).
174. Oh, S. H., Park, I. K., Kim, J. M. & Lee, J. H. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials* **28**, 1664–1671 (2007).
175. Karageorgiou, V. & Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474–5491 (2005).
176. Leong, K. F., Cheah, C. M. & Chua, C. K. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* **24**, 2363–2378 (2003).
177. Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G. & Markwald, R. R. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **21**, 157–161 (2003).
178. Nichol, J. W. & Khademhosseini, A. Modular tissue engineering: engineering biological tissues from the bottom up. *Soft Matter* **5**, 1312–1319 (2009).
179. Sachlos, E., Reis, N., Ainsley, C., Derby, B. & Czernuszka, J. T. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. *Biomaterials* **24**, 1487–97 (2003).

180. Chu, T. M. G., Orton, D. G., Hollister, S. J., Feinberg, S. E. & Halloran, J. W. Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials* **23**, 1283–1293 (2002).
181. Bai, S. *et al.* CAD/CAM surface templates as an alternative to the intermediate wafer in orthognathic surgery. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **110**, e1-7 (2010).
182. Billiet, T., Vandenhoute, M., Schelfhout, J., Van Vlierberghe, S. & Dubruel, P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials* **33**, 6020–6041 (2012).
183. Fritz, M. *et al.* Flat pearls from biofabrication of organized composites on inorganic substrates. *Nature* **371**, 49–51 (1994).
184. Fong, H. *et al.* Enamel structure properties controlled by engineered proteins in transgenic mice. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **18**, 2052–2059 (2003).
185. Wu, L.-Q. & Payne, G. F. Biofabrication: using biological materials and biocatalysts to construct nanostructured assemblies. *Trends Biotechnol.* **22**, 593–599 (2004).
186. Groll, J. *et al.* Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication* **8**, 013001 (2016).
187. Mironov, V. *et al.* Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* **30**, 2164–2174 (2009).
188. Mironov, V. *et al.* Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. *Biofabrication* **1**, 022001 (2009).
189. Guillemot, F., Mironov, V. & Nakamura, M. Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09). *Biofabrication* **2**, 010201 (2010).
190. Schiele, N. R. *et al.* Laser-based direct-write techniques for cell printing. *Biofabrication* **2**, 032001 (2010).
191. Klebe, R. J. Cytoscribing: a method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues. *Exp. Cell Res.* **179**, 362–373 (1988).
192. Ringeisen, B. R., Othon, C. M., Barron, J. A., Young, D. & Spargo, B. J. Jet-based methods to print living cells. *Biotechnol. J.* **1**, 930–948 (2006).
193. Malda, J. *et al.* 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication. *Adv. Mater.* **25**, 5011–5028 (2013).
194. Wilson, W. C. & Boland, T. Cell and organ printing 1: protein and cell printers. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **272**, 491–496 (2003).
195. Xu, T., Kincaid, H., Atala, A. & Yoo, J. J. High-Throughput Production of Single-Cell Microparticles Using an Inkjet Printing Technology. *J. Manuf. Sci. Eng.* **130**, 021017–021017 (2008).

196. Boland, T., Mironov, V., Gutowska, A., Roth, E. A. & Markwald, R. R. Cell and organ printing 2: fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **272**, 497–502 (2003).
197. Zhu, W. *et al.* 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **40**, 103–112 (2016).
198. Cohen, D. L., Malone, E., Lipson, H. & Bonassar, L. J. Direct freeform fabrication of seeded hydrogels in arbitrary geometries. *Tissue Eng.* **12**, 1325–1335 (2006).
199. Faulkner-Jones, A. *et al.* Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for the generation of mini-livers in 3D. *Biofabrication* **7**, 044102 (2015).
200. Hsieh, F.-Y. & Hsu, S. 3D bioprinting: A new insight into the therapeutic strategy of neural tissue regeneration. *Organogenesis* **11**, 153–158 (2015).
201. Duan, B., Hockaday, L. A., Kang, K. H. & Butcher, J. T. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. A* **101**, 1255–1264 (2013).
202. Norotte, C., Marga, F. S., Niklason, L. E. & Forgacs, G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* **30**, 5910–5917 (2009).
203. Bohandy, J., Kim, B. F. & Adrian, F. J. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser. *J. Appl. Phys.* **60**, 1538–1539 (1986).
204. Fogarassy, E., Fuchs, C., Kerherve, F., Hauchecorne, G. & Perriere, J. Laser-induced forward transfer of high-Tc YBaCuO and BiSrCaCuO superconducting thin films. *J. Appl. Phys.* **66**, 457–459 (1989).
205. Fernández-Pradas, J. M., Colina, M., Serra, P., Domínguez, J. & Morenza, J. L. Laser-induced forward transfer of biomolecules. *Thin Solid Films* **453–454**, 27–30 (2004).
206. Barron, J. A., Ringeisen, B. R., Kim, H., Spargo, B. J. & Chrisey, D. B. Application of laser printing to mammalian cells. *Thin Solid Films* **453–454**, 383–387 (2004).
207. Colina, M., Serra, P., Fernández-Pradas, J. M., Sevilla, L. & Morenza, J. L. DNA deposition through laser induced forward transfer. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 1638–1642 (2005).
208. Unger, C., Gruene, M., Koch, L., Koch, J. & Chichkov, B. N. Time-resolved imaging of hydrogel printing via laser-induced forward transfer. *Appl. Phys. A* **103**, 271–277 (2011).
209. Auger, F. *et al.* Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Med. Biol. Eng. Comput.* **36**, 801–812 (1998).
210. Barron, J. A., Wu, P., Ladouceur, H. D. & Ringeisen, B. R. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomed. Microdevices* **6**, 139–147 (2004).
211. Ringeisen, B. R. *et al.* Laser Printing of Pluripotent Embryonal Carcinoma Cells. *Tissue Eng.* **10**, 483–491 (2004).

212. Doraiswamy, A. *et al.* Excimer laser forward transfer of mammalian cells using a novel triazene absorbing layer. *Appl. Surf. Sci.* **252**, 4743–4747 (2006).
213. Lin, Y., Huang, G., Huang, Y., Tzeng, T.-R. J. & Chrisey, D. Effect of laser fluence in laser assisted direct writing of human colon cancer cell. *Rapid Prototyp. J.* **16**, 202–208 (2010).
214. Hopp, B. Femtosecond laser printing of living cells using absorbing film-assisted laser-induced forward transfer. *Opt. Eng.* **51**, 014302 (2012).
215. Guillotin, B. *et al.* Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials* **31**, 7250–7256 (2010).
216. Catros, S. *et al.* Laser-assisted bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite. *Biofabrication* **3**, 025001 (2011).
217. Piqué, A. *et al.* A novel laser transfer process for direct writing of electronic and sensor materials. *Appl. Phys. Mater. Sci. Process.* **69**, 279–284 (1999).
218. *Pulsed Laser Deposition of Thin Films: Applications-Led Growth of Functional Materials.* (John Wiley & Sons, Inc., 2006).
219. Chrisey, D. B. *et al.* Laser Deposition of Polymer and Biomaterial Films. *Chem. Rev.* **103**, 553–576 (2003).
220. Young HD, Auyeung R C Y, Chrisley D B & Dlott D D. Jetting behavior in the laser forward transfer of rheological systems. (2004).
221. Modi, R., Wu, H. D., Auyeung, R. C. Y., Gilmore, C. M. & Chrisey, D. B. Direct writing of polymer thick film resistors using a novel laser transfer technique. *J. Mater. Res.* **16**, 3214–3222 (2001).
222. Piqué, A. *et al.* Growth of organic thin films by the matrix assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) technique. *Thin Solid Films* **355–356**, 536–541 (1999).
223. Ringeisen, B. R. *et al.* Picoliter-scale protein microarrays by laser direct write. *Biotechnol. Prog.* **18**, 1126–1129 (2002).
224. Wu, P. K. *et al.* Laser transfer of biomaterials: Matrix-assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) and MAPLE Direct Write. *Rev. Sci. Instrum.* **74**, 2546 (2003).
225. Hopp, B. *et al.* Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. *Tissue Eng.* **11**, 1817–23 (2005).
226. Tolbert, W. A., Sandy Lee, I.-Y., Doxtader, M. M., Ellis, E. W. & Dlott, D. D. High-speed color imaging by laser ablation transfer with a dynamic release layer: fundamental mechanisms. *J. Imaging Sci. Technol.* **37**, 411–421 (1993).
227. Smausz, T., Hopp, B., Kecskeméti, G. & Bor, Z. Study on metal microparticle content of the material transferred with Absorbing Film Assisted Laser Induced Forward Transfer when using silver absorbing layer. *Appl. Surf. Sci.* **252**, 4738–4742 (2006).
228. Fardel, R., Nagel, M., Nüesch, F., Lippert, T. & Wokaun, A. Fabrication of organic light-emitting diode pixels by laser-assisted forward transfer. *Appl. Phys. Lett.* **91**, 061103

(2007).

229. Banks, D. P. *et al.* Triazene photopolymer dynamic release layer-assisted femtosecond laser-induced forward transfer with an active carrier substrate. *EPL Europhys. Lett.* **83**, 38003 (2008).
230. Nagel, M. *et al.* Aryltriazene Photopolymers for UV-Laser Applications: Improved Synthesis and Photodecomposition Study. *Macromol. Chem. Phys.* **208**, 277–286 (2007).
231. Catros, S., Guillotin, B., Bacáková, M., Fricain, J.-C. & Guillemot, F. Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting. *Appl. Surf. Sci.* **257**, 5142–5147 (2011).
232. Kérourédan, O., Rémy, M., Oliveira, H., Guillemot, F. & Devillard, R. Laser-Assisted Bioprinting of Cells for Tissue Engineering. in *Laser Printing of Functional Materials* 349–373 (John Wiley & Sons, Ltd, 2018). doi:10.1002/9783527805105.ch15
233. Duocastella, M., Fernández-Pradas, J. M., Serra, P. & Morenza, J. L. Jet formation in the laser forward transfer of liquids. *Appl. Phys. A* **93**, 453–456 (2008).
234. Young, D., Auyeung, R. C. Y., Piqué, A., Chrisey, D. B. & Dlott, D. D. Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-resolved optical microscopy. *Appl. Surf. Sci.* **197–198**, 181–187 (2002).
235. Duocastella, M., Fernández-Pradas, J. M., Morenza, J. L. & Serra, P. Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids. *J. Appl. Phys.* **106**, 084907 (2009).
236. Guillemot, F., Souquet, A., Catros, S. & Guillotin, B. Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. *Nanomed.* **5**, 507–515 (2010).
237. Petit, J. Déformations et instabilités d'interfaces liquides pilotées par la diffusion d'une onde laser en milieux turbides. (UNIVERSITÉ BORDEAUX 1, 2011).
238. Ali, M., Pages, E., Ducom, A., Fontaine, A. & Guillemot, F. Controlling laser-induced jet formation for bioprinting mesenchymal stem cells with high viability and high resolution. *Biofabrication* **6**, 045001 (2014).
239. Thoroddsen, S. T., Takehara, K., Etoh, T. G. & Ohl, C.-D. Spray and microjets produced by focusing a laser pulse into a hemispherical drop. *Phys. Fluids* **21**, 112101 (2009).
240. Souquet, A. *Etude des processus physiques mis en jeu lors de la microimpression d'éléments biologiques assistée par laser.* (Bordeaux 1, 2011).
241. Catros, S., Devillard, R., Naveau, A. & Fricain, J.-C. Les Bio-imprimantes 3D, de nouveaux outils en Chirurgie Orale et en Ingénierie Tissulaire. *Fil Dent.* 30–32 (2017).
242. Duchemin, L., Popinet, S., Josserand, C. & Zaleski, S. Jet formation in bubbles bursting at a free surface. *Phys. Fluids* **14**, 3000–3008 (2002).
243. Noack, J. & Vogel, A. Laser-induced plasma formation in water at nanosecond to femtosecond time scales: calculation of thresholds, absorption coefficients, and energy density. *IEEE J. Quantum Electron.* **35**, 1156–1167 (1999).

244. Dinca, V. *et al.* Patterning parameters for biomolecules microarrays constructed with nanosecond and femtosecond UV lasers. *Thin Solid Films* **516**, 6504–6511 (2008).
245. Schultze, V. & Wagner, M. Laser-induced forward transfer of aluminium. *Appl. Surf. Sci.* **52**, 303–309 (1991).
246. Dinca, V., Patrascioiu, A., Fernández-Pradas, J. M., Morenza, J. L. & Serra, P. Influence of solution properties in the laser forward transfer of liquids. *Appl. Surf. Sci.* **258**, 9379–9384 (2012).
247. Keriquel, V. *et al.* In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice. *Biofabrication* **2**, 014101 (2010).
248. Zergioti, I. *et al.* Femtosecond laser microprinting of biomaterials. *Appl. Phys. Lett.* **86**, 163902 (2005).
249. Guillemot, F. *et al.* High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomater.* **6**, 2494–2500 (2010).
250. Ringeisen, B. R., Spargo, B. J. & Wu, P. K. *Cell and Organ Printing*. (Springer, 2010).
251. Koch, L., Gruene, M., Unger, C. & Chichkov, B. Laser assisted Cell Printing. *Curr. Pharm. Biotechnol.* (2012).
252. Schiele, N. R., Chrisey, D. B. & Corr, D. T. Gelatin-Based Laser Direct-Write Technique for the Precise Spatial Patterning of Cells. *Tissue Eng. Part C Methods* **17**, 289–98 (2011).
253. Koch, L. *et al.* Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 1855–1863 (2012).
254. Gaebel, R. *et al.* Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Biomaterials* **32**, 9218–9230 (2011).
255. Patz, T. M. *et al.* Three-dimensional direct writing of B35 neuronal cells. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **78B**, 124–130 (2006).
256. Doraiswamy, A. *et al.* Laser microfabrication of hydroxyapatite-osteoblast-like cell composites. *J. Biomed. Mater. Res. A* **80A**, 635–643 (2007).
257. Gruene, M. *et al.* Laser Printing of Stem Cells for Biofabrication of Scaffold-Free Autologous Grafts. *Tissue Eng. Part C Methods* **17**, 79–87 (2010).
258. Nahmias, Y., Schwartz, R. E., Verfaillie, C. M. & Odde, D. J. Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 129–136 (2005).
259. Wu, P. K. & Ringeisen, B. R. Development of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human umbilical vein smooth muscle cell (HUVSMC) branch/stem structures on hydrogel layers via biological laser printing (BioLP). *Biofabrication* **2**, 014111 (2010).

260. Pirlo, R. K., Wu, P., Liu, J. & Ringeisen, B. PLGA/hydrogel biopapers as a stackable substrate for printing HUVEC networks via BioLP. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 262–273 (2012).
261. Nof, S. Y. *Springer Handbook of Automation*. (Springer Science & Business Media, 2009).
262. Keriquel, V. *et al.* In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. *Sci. Rep.* **7**, (2017).

ANNEXES

1. CHAPITRE D'OUVRAGE 1

Laser-Assisted Bioprinting for Tissue Engineering

Olivia Kérourédan, Hélène Desrus, Murielle Rémy, Jérôme Kalisky, Jean-Michel Bourget, Joëlle Amédée-Vilamitjana, Jean-Christophe Fricain, Sylvain Catros, Raphaël Devillard

- Ce chapitre a été publié dans le livre :

“Biomaterials and Nanotechnology for Tissue Engineering”
Edité par S.Swaminathan, K.Uma Maheswary, S.Anuradha
Publié par CRC Press.

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

2. CHAPITRE D'OUVRAGE 2

Laser-Assisted Bioprinting of Cells for Tissue Engineering

Olivia Kérourédan, Murielle Rémy, Hugo Oliveira, Fabien Guillemot, Raphaël Devillard

- Ce chapitre a été publié dans le livre :

“Laser Printing of Functional Materials: Fundamentals & Applications in Electronics, 3D Microfabrication and Biomedicine”

Edité par A.Piqué et P.Serra

Publié par Wiley-WCH

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

Chapitre non inséré par respect des droits d'auteur

