



**HAL**  
open science

# BioFabrication par assemblage couche par couche pour l'ingénierie du Tissu Osseux

Joanna Babilotte

► **To cite this version:**

Joanna Babilotte. BioFabrication par assemblage couche par couche pour l'ingénierie du Tissu Osseux. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0048 . tel-03218188

**HAL Id: tel-03218188**

**<https://theses.hal.science/tel-03218188>**

Submitted on 5 May 2021

**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

INTERFACE CHIMIE BIOLOGIE

Par Joanna BABILOTTE

**Biofabrication par assemblage couche par couche pour  
l'ingénierie du tissu osseux**

Sous la direction du Pr. Sylvain CATROS

Soutenue le 23 février 2021

Membres du jury :

M. MASSERA, Jonathan

Mme ANSELME, Karine

M. CHEVALIER, Jérôme

Mme CHAUSSAIN, Catherine

Tampere University - Finlande

Institut de Science des Matériaux de Mulhouse

MATEIS – Lyon

Faculté de chirurgie dentaire Université de Paris

Président

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice



# Titre : Biofabrication par assemblage couche par couche pour l'ingénierie du tissu osseux

## Résumé

Dans différentes situations cliniques, la mise en place d'implants dentaires est parfois impossible du fait d'un volume osseux limité. Les méthodes actuelles de régénération de l'os alvéolaire ne sont pas toujours satisfaisantes et la mise au point de méthodes alternatives est nécessaire pour les cas les plus complexes. De nombreux matériaux de substitution osseuse sont disponibles. Cependant ils ne possèdent pas toutes les propriétés nécessaires pour une régénération osseuse complète, du fait de leur faible potentiel ostéoinducteur et ostéogénique.

L'ingénierie tissulaire peut apporter des solutions aux problèmes actuellement rencontrés en reconstruction osseuse. Ces stratégies de régénération tissulaire reposent sur la combinaison d'un biomatériau macroporeux (scaffold) avec des cellules et des biomolécules utilisées pour stimuler la formation tissulaire. Pour fabriquer le scaffold plusieurs techniques existent. Ces dernières années les technologies de prototypage rapide ont gagné en intérêt, car elles offrent une bonne reproductibilité et une grande résolution. Il subsiste la problématique du « chargement » des cellules dans le scaffold macroporeux. L'approche conventionnelle implique de déposer les cellules sur le scaffold et d'espérer sa colonisation par les cellules pour former une construction tissulaire. Plusieurs limites ont été observées dans ce modèle : une faible vascularisation, une diffusion limitée des nutriments et une densité cellulaire faible et inhomogène.

L'objectif de ce projet de thèse est de résoudre une partie des limites des biomatériaux macroporeux, en organisant l'ensemencement de cellules ostéoprogénitrices au sein du biomatériau. Basé sur de précédents résultats, nous avons choisi d'adopter une approche d'assemblage couche par couche également appelée « sandwich ». Cette approche devrait permettre de favoriser les interactions entre cellules et de faciliter la maturation des constructions tissulaires. Finalement la qualité et la quantité des tissus produits devraient être améliorées.

La première partie du projet a consisté à fabriquer des membranes poreuses. Nous avons développé un nouveau matériau imprimable, fait d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) mixé avec des nanoparticules d'hydroxyapatite (nHA). Le matériau fabriqué sous forme de filament a pu être utilisé pour l'impression 3D par extrusion à chaud (Fused Deposition Modeling = FDM). Le PLGA a été choisi pour son temps de dégradation adapté à la reconstruction osseuse et ses propriétés mécaniques qui sont proches de celles de l'os humain cortical. Les nanoparticules d'HA ont été incluses afin d'améliorer la bioactivité du matériau pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse. Ensuite, ces matériaux ont été caractérisés d'un point de vue mécanique et physicochimique, avant les études *in vitro* et *in vivo*. Pour ces parties, nous avons travaillé avec la fraction vasculaire stromale issue du tissu

adipeux, pour se rapprocher d'une potentielle application clinique. La survie, la prolifération et la différenciation des cellules a été évaluée. Enfin, la régénération osseuse a été observée après implantation des scaffolds dans un défaut de calvaria chez le rat.

**Mot clés** : *Bioassemblages, Impression 3D, Composite, Ingénierie tissulaire osseuse*

## Title: Layer-by-layer biofabrication for bone tissue engineering

### Abstract

In several clinical cases, dental implant placement can be hindered if alveolar bone volume is limited. Current surgical methods for alveolar bone regeneration are not fully satisfying, and more reliable methods to regenerate bone are needed. Several biomaterials for bone substitution are available. However, they do not possess all the necessary properties for complete bone regeneration, as they lack osteoinductive and osteogenic potential.

Tissue engineering can provide solutions for current issues in bone reconstruction. Tissue engineering strategies combine engineered scaffold with cells and suitable biochemical soluble factors. To produce the scaffold several techniques are available. These last years rapid prototyping technologies gained a huge interest, as they offer reproducibility and important resolution. The current issues remaining to produce living tissue constructs by bone tissue engineering techniques is related to cell seeding inside the macroporous scaffold. The conventional approach involves seeding cells onto a macroporous scaffold and expect cell colonization to form composite tissue constructs. Many limitations have been observed using this approach, due to slow vascularization, limited diffusion of nutrients, low cell density and non-uniform cell distribution.

This project aims to address the limitations of scaffold-based bone tissue engineering, by organizing osteoprogenitor cells inside the scaffold. Based on previous results, we choose to use a layer-by-layer approach. This layer-by-layer fabrication method, also called “sandwich” in this work, should favor cell material interaction and facilitate the maturation of these constructs. Finally, the amount and quality of tissue regenerated should be enhanced.

The first part of the project consisted in the fabrication of scaffolds membranes. We have developed a new material, made of medical grade poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) mixed with hydroxyapatite nanoparticles (nHA), in the shape of a filament for 3D printing by Fused Deposition Modelling (FDM). PLGA was chosen for its biodegradation rate and its mechanical properties close to human cortical bone. Nanoparticles of HA were included to improve the bioactivity of the material for bone tissue engineering applications. Then, these materials were characterized for mechanical and physico-chemical properties before in vitro and in vivo studies. In these parts, we used the stromal vascular fraction of adipose tissue, to be closer from a potential clinical translation. The survival, proliferation and differentiation of the cells were evaluated. Finally, bone regeneration was observed after implantation of the constructs in a rat bone calvaria defect model.

**Keywords:** *Bioassembly, 3D printing, Composite, Bone tissue engineering*

---

**UMR 1026, BIOTIS, INSERM/Université de Bordeaux**

146 rue Léo Saignat - 33076 Bordeaux cedex France



*"If you ever think about giving up, remember why you held on for so long"*

*Hayley Williams*





## Remerciements

La thèse est une expérience enrichissante tant professionnellement, culturellement que personnellement. On m'avait dit que ces années feraient partie des plus belles de ma vie et je ne le constate que maintenant qu'elle se termine. Alors oui la thèse est un voyage long et tortueux. Mais ce voyage a été parsemé de belles rencontres, de petites et grandes réussites, de moments forts et je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui y ont contribué.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse dans des conditions si particulières. Merci d'avance pour vos analyses et discussions autour de mes travaux.

Cette histoire a commencé il y a environ 8 ans, à mon arrivée à l'université de Cergy-Pontoise. Je me souviendrais toujours de cette conférence donnée par le Pr. Véronique Larreta-Garde. Elle a contribué à développer chez moi cette curiosité pour les biomatériaux qui a orienté toute la suite de mes choix professionnels. Je tiens à vous remercier de m'avoir transmis cette passion. Je souhaite également remercier le Pr. Emmanuel Pauthe, ou Manu pour les intimes. Merci pour ton soutien sans faille encore aujourd'hui. Merci de pousser tes étudiants toujours plus loin. Et surtout, merci d'avoir planté la graine en me recommandant de faire une thèse.

Je souhaite également remercier mon directeur de thèse, Sylvain. Il y a presque 4 ans tu as décidé de me faire confiance pour te lancer dans cette belle aventure. Merci pour tout ce que tu m'as appris, tes nombreux retards m'ont appris la patience et la persévérance ! Ta bonne humeur et ton optimisme sans faille ont toujours su m'apaiser. Travailler avec toi a été un réel bonheur et j'espère que le futur nous donneras l'occasion de renouveler cette expérience.

Je remercie également Damien, mon encadrant de thèse non officiel. Merci d'avoir pris le relais quand Sylvain n'était pas disponible. Je te souhaite d'obtenir ton HDR afin d'avoir la chance d'encadrer tes propres étudiants.

Je souhaite ensuite remercier mes deux « coachs de thèse » : Vera et Bruno. Vera merci de m'avoir appris à murmurer aux oreilles des imprimantes 3D et de m'avoir expliqué comment fonctionne un Sylvain. Merci d'être encore là quand j'en ai besoin même à des milliers de kilomètres. Mon Brunito ! Merci pour ... tellement de choses ! Les gâteaux, les pauses café-

potins, les câlins, le tiroir toujours rempli de chocolats, ... Merci futur Pr. Paiva pour tout ce que tu m'as appris. Je sais que tu es fier de moi, mais moi je suis très très très fière de toi !

Un énorme merci à tous mes collègues de BioTis qui ont participé de près ou de loin à enrichir ses travaux. Merci pour tous ces bons moments studieux ou non. Tout d'abord un énorme merci à Reine. Merci de t'investir autant pour tes « petits » et merci de m'avoir tant appris (surtout la recette du punch de Noël !). Un grand merci à Mathilde F. d'avoir été ma conseillère personnelle en expérimentation animale. Merci à Sylvie et Martine pour les centaines de coupes en histo ! Merci à Jérôme pour les kilos d'HA synthétisés ! Merci à Robin de toujours répondre à mes questions avec un soupir ;) Merci à nos mamans du labo : Nathalie, Marie Laure, Chantal, de prendre soin de nous. J'en profite également pour remercier ceux que l'on oublie trop souvent ! Betty, merci de prendre soin de nous, on oublie trop vite à quel point tu es indispensable ! Merci à Patrick pour les dépannages en tout genre, qu'est-ce qu'on ferait sans toi ? Merci à Evelyne de te démener avec les fournisseurs pour nos commandes (et désolé pour mes commandes incomplètes).

Je souhaite également remercier les différents chercheurs du labo (ou les vieux comme diraient certains) qui ont contribué à former la jeune chercheuse que je suis aujourd'hui. Tout d'abord un grand merci à Olivier, tu es officiellement le tout premier à m'avoir accueilli au laboratoire pour mon stage de L3 en 2014. J'ai toujours apprécié nos discussions scientifiques et je te suis reconnaissante pour tous tes conseils. Merci à Joëlle de t'investir tant pour la valorisation des jeunes chercheurs au laboratoire. Et surtout merci pour les souvenirs mémorables en congrès. Enfin un grand merci à Hugo, King of ART, pour tous tes conseils, ton humour et ta patience.

Et parce qu'un travail de thèse est un travail collaboratif, je souhaite également adresser un immense merci aux différentes structures avec qui j'ai pu collaborer : ERRMECe, Rescoll, IUT Bordeaux, LCPO, ICMCB, ISM, BIC, ... et j'en oublie sûrement. Je voudrais tout particulièrement remercier les personnes avec qui j'ai pu y travailler : Michel, Rémy et Amel (ERRMECe), Matthieu et Joffrey (IUT Bordeaux), Sylvain et Amélie (LCPO), Pr. Manuel Gaudon (ICMCB), Pr. Marc Dussauze (ISM). Je souhaite également remercier l'animalerie conventionnelle de Bordeaux. Un merci particulier à Laetitia Médan d'avoir sauvé mes résultats pendant ce premier confinement.

Un énorme merci aux jeunes du labo ! Un grand merci pour tout ce soutien qu'il y a entre nous. Merci pour les journées plages, les petits week-ends, le Barberousse et autres soirées mémorables ... Merci à Yoann pour ta bonne humeur et n'oublie pas que si la recherche ne marche pas une carrière de danseur est toute tracée pour toi. Ta fièvre du samedi soir va me manquer ! Merci aussi à ceux qui étaient de passage mais qui sont « restés », je pense à mon petit crew (Tristan, Pierre et Marco) et à ma petite (grande ?) Amandine. Une mention

spéciale pour le bureau des Légendes. Merci d'avoir entretenu mon espace et d'avoir respecté les règles de cohabitation ! Non sans rire, merci d'avoir supporté mes doutes, mes moments râleurs et d'avoir apporté de la bonne humeur dans chacune de mes journées.

Merci à mes nombreux stagiaires pour votre curiosité et votre implication : François, Lauryne, Lucy, Léopoldine. Travailler à vos côtés a été très enrichissant pour moi et j'espère que vous garderez un bon souvenir de votre expérience au laboratoire. Un merci tout particulier à Benoit, ma deuxième année n'aurait pas été la même sans toi. Merci pour ton aide immense mais aussi pour ta bonne humeur quotidienne. Tu m'as beaucoup manqué pendant cette dernière année.

Merci à mes amis ! La Rhumerie, le Girl Squad, la confrérie des geeks gastronomes, les Victoiriennes et j'en oublie sûrement. Merci d'avoir toujours veillé à ma santé mentale pendant ces trois années. Merci à ceux qui ont fait le chemin jusqu'à Bordeaux pour profiter de l'Atlantique, du bon vin et des canelés. Enfin et surtout, merci à vous de me supporter depuis si longtemps.

Merci à Clovis, qui partage ma vie depuis peu, mais qui a subi plus que les autres la rédaction de cette thèse. Merci d'avoir été si compréhensif et d'avoir toujours veillé à ce que je décroche de temps en temps.

Enfin mes derniers remerciements vont à ma famille. Un merci particulier à mes parents pour tout ce que vous m'avez donné. Merci de m'avoir toujours offert un havre de paix à la campagne pour me vider la tête. Merci Maman d'avoir toujours cru que j'étais capable de faire de grandes choses, ça a été un moteur quotidien pour moi.



## Table des matières

Résumé.....	1
Abstract .....	3
Remerciements .....	7
Liste des abréviations.....	14
Table des illustrations .....	15
1 LE TISSU OSSEUX : STRUCTURE ET PHYSIOLOGIE.....	19
1.1 La structure de l'os .....	19
1.2 Cellules osseuses .....	20
1.3 Remodelage osseux.....	21
1.4 Cicatrisation osseuse .....	22
1.5 Cicatrisation osseuse en présence d'un biomatériau .....	24
2 L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE.....	26
2.1 Les stratégies de reconstruction osseuse en chirurgie orale .....	27
2.1.1 Les greffes osseuses .....	27
2.1.2 Les matériaux pour l'ingénierie du tissu osseux .....	28
2.1.2.1 Les polymères .....	28
2.1.2.2 Les céramiques phosphocalciques.....	29
2.1.2.3 Les bioverres .....	30
2.1.2.4 Les métaux .....	31
2.1.2.5 Les hydrogels.....	31
2.1.2.6 Les composites.....	31
2.2 Les cellules dans les stratégies de reconstruction osseuse en chirurgie orale .....	32
2.2.1 Les cellules souches embryonnaires (ESCs) .....	32
2.2.2 Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) .....	33
2.2.3 Les cellules souches adultes.....	33
2.2.3.1 Cellules souches mésenchymateuses (MSCs).....	33
2.2.3.2 Cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSCs) .....	34
2.2.3.3 Cellules souches dérivées du tissu dentaire .....	35
3 IMPRESSION 3D POUR L'INGENIERIE DU TISSU OSSEUX .....	35
3.1 L'impression par jet de liant ou <i>Binder Jetting</i> .....	36
3.2 Le frittage sélectif par laser (SLS) .....	37
3.3 La stéréolithographie (SLA).....	38

3.4	L'impression par dépôt de fil fondu (FDM) .....	39
3.5	La micro-extrusion ou <i>3D plotting</i> .....	40
3.6	<i>Electrospinning</i> .....	41
3.7	Bioimpression 3D .....	42
4	REVIEW OF LITERATURE: 3D printed polymer–mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: fabrication and characterization (Article 1).....	43
5	BIOASSEMBLAGE, UNE NOUVELLE APPROCHE POUR LA CELLULARISATION DU SCAFFOLD ? .....	67
6	OBJECTIFS DE LA THESE.....	71
6.1	Développement du matériau et caractérisation .....	71
6.1.1	Création du matériau et fabrication des scaffolds.....	71
6.1.2	Propriétés physicochimiques .....	72
6.1.3	Etude <i>in vitro</i> « 2D » .....	72
6.2	Bioassemblages vs. Approche conventionnelle .....	73
6.2.1	Bioassemblages <i>in vitro</i> .....	73
6.2.2	Bioassemblages <i>in vivo</i> .....	73
7	TRAVAIL EXPERIMENTAL : Biofabrication par assemblage couche par couche pour l'ingénierie du tissu osseux .....	75
7.1	Partie I : Développement et caractérisation d'un matériau composite PLGA-HA pour la fabrication d'un scaffold pour l'ingénierie du tissu osseux (Article 2).....	75
7.1.1	Introduction.....	75
7.1.2	Conclusions.....	97
7.2	Partie II : Développement d'un sandwich cellularisé pour l'ingénierie du tissu osseux	99
7.2.1	Introduction.....	99
7.2.2	Matériel et Méthodes .....	102
7.2.2.1	Production des matériaux et fabrication des scaffolds .....	102
7.2.2.2	Isolement des cellules.....	103
7.2.2.3	Culture cellulaire et ensemencement.....	104
7.2.2.4	Comportement cellulaire .....	104
7.2.2.5	Evaluation de la différenciation cellulaire .....	105
7.2.2.6	Implantation dans un modèle de défaut osseux de calvaria.....	106
7.2.2.7	Evaluation de la régénération osseuse par microscanner.....	108
7.2.2.8	Evaluation histologique de la régénération osseuse .....	108
7.2.2.9	Analyses statistiques.....	108

7.2.3	Résultats .....	110
7.2.3.1	Comportement cellulaire .....	110
7.2.3.2	Evaluation de la différenciation cellulaire .....	115
7.2.3.3	Evaluation de la régénération osseuse .....	116
7.2.4	Discussion des résultats de la partie II .....	119
8	Discussion générale et perspectives .....	125
8.1	Choix des matériaux .....	125
8.2	Choix de la technologie : La FDM est-elle une technique adaptée ? .....	126
8.3	Développement de Bioassemblages .....	129
8.3.1	Stabilisation des sandwichs.....	129
8.3.2	Cellularisation des scaffolds .....	131
8.3.2.1	Choix des cellules .....	131
8.3.2.2	Optimisation de la distribution cellulaire dans scaffold macroporeux ....	133
8.4	Potentiel de régénération osseuse.....	135
9	Conclusion générale .....	139
10	Communications scientifiques .....	143
11	Bibliographie .....	149



## Liste des abréviations

**$\beta$ -TCP** :  $\beta$ -Tricalcium de Phosphate

**Micro-CT** : *Micro-Computed Tomography*

**ADSCs** : Cellules souches issues du tissu adipeux

**BCP** : Bi-Calcium Phosphate

**BMU** : *Basic multicellular units*

**BMSCs** : Cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse

**BSP** : *Bone Sialoprotein*

**Col1A1** : collagène de type 1 alpha-1

**DMEM** : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DPSCs** : Cellules souches issues de la pulpe dentaire

**ESCs** : Cellules souches embryonnaires

**FDM** : *Fused Deposition Modeling*

**FVS** : Fraction Vasculaire Stromale

**HA** : Hydroxyapatite

**HBSS** : *Hank's Balanced Salt Solution*

**IGF-1** : *Insulin-like Growth Factor*

**iPS** : Cellules souches pluripotentes induites

**MEB** : Microscopie électronique à balayage

**MSCs** : Cellules souches mésenchymateuses

**OCN** : Ostéocalcine

**OPN** : Ostéopontine

**PAL** : Phosphatase Alcaline

**PCL** : Polycaprolactone

**PDLSCs** : cellules souches extraites du ligament parodontal

**PEG** : Polyéthylène glycol

**PGA** : Acide Polyglycolique

**PLA** : Acide Polylactique

**PLGA** : Acide Poly(lactique-co-glycolique)

**Runx2/Cbfa1** : *Runt-related transcription factor 2 / Core-binding factor subunit alpha-1*

**RN** : Rouge Neutre

**SEC** : *Size Exclusion Chromatography*

**SCAPs** : Cellules souches issues de la papille apicale

**SLA** : Stéréolithographie

**SLS** : Frittage sélectif par laser

**SVF** : Sérum de Veau Foetal

**TGA** : *Thermogravimetric analysis*

**TGF- $\beta$**  : *Transforming Growth Factor-  $\beta$*

**XRD** : *X-Ray Diffraction*

## Table des illustrations

<i>Figure 1. Les ostéons, l'unité structurale de la couche corticale</i> .....	20
<i>Figure 2. Les différents types cellulaires au sein du cycle de remodelage osseux</i> .....	22
<i>Figure 3. Chronologie de la cicatrisation d'une fracture osseuse</i> .....	23
<i>Figure 4. Etapes des approches d'ingénierie tissulaire en système autologue</i> .....	25
<i>Figure 5. Schéma illustrant l'impression 3D par jet de liant</i> .....	37
<i>Figure 6. Schéma illustrant le frittage sélectif par laser (SLS)</i> .....	37
<i>Figure 7. Schéma illustrant l'impression 3D par stéréolithographie (SLA)</i> .....	38
<i>Figure 8. Schéma illustrant l'impression 3D par dépôt de fil fondu (FDM)</i> .....	39
<i>Figure 9. Schéma illustrant l'impression 3D par micro-extrusion</i> .....	40
<i>Figure 10. Photos comparant le dépôt de fibres par electrospinning et melt electrospinning</i> .....	41
<i>Figure 11. Les principales techniques de bioimpression</i> .....	42
<i>Figure 12. Illustration des concepts « Top-down » et « Bottom-up »</i> .....	67
<i>Figure 13. Représentation schématique de la procédure de fabrication d'un assemblage couche par couche cellularisé par Wan et al. 2015</i> .....	69
<i>Figure 14. Modèle de la membrane poreuse pour l'étude "2D" développée sur le logiciel de modélisation Rhino 6®</i> .....	75
<i>Figure 15. Photos illustrant les modèles Sandwich et Bloc</i> .....	100
<i>Figure 16. Structures des différentes unités de l'assemblage sandwich</i> .....	102
<i>Figure 17. Illustration des étapes du prélèvement du tissu gras pour les études in vivo</i> .....	103
<i>Figure 18. Illustration des étapes pour la création d'un défaut osseux de calvaria chez le rat</i> .....	107
<i>Figure 19. Activité métabolique des cellules mesurée par un test Alamar blue</i> .....	110
<i>Figure 20. Evaluation de la viabilité cellulaire après 7 jours de culture</i> .....	111
<i>Figure 21. Evaluation de la viabilité cellulaire après 14 jours de culture</i> .....	112
<i>Figure 22. Evaluation de la viabilité cellulaire après 28 jours de culture</i> .....	113
<i>Figure 23. Observation de l'activité phosphatase alcaline (PAL)</i> .....	114
<i>Figure 24. Evaluation de la synthèse de matrice minérale</i> .....	115
<i>Figure 25. Quantification de la synthèse de matrice minérale</i> .....	116
<i>Figure 26. Evaluation de la régénération osseuse</i> .....	117
<i>Figure 27. Détails concernant les coupes histologiques</i> .....	118

<i>Figure 28. Analyses histologiques de la régénération osseuse dans des défauts de calvaria .....</i>	<i>118</i>
<i>Figure 29. Quantité de cellules isolées dans un milligramme de tissu adipeux .....</i>	<i>120</i>
<i>Figure 30. Photos post-explantation d'un assemblage instable de membranes cellularisées au sein de notre modèle sandwich .....</i>	<i>121</i>
<i>Figure 31. Différentes structures imprimées par FDM en PLGA .....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 32. Autres approches d'assemblages envisagées .....</i>	<i>130</i>
<i>Figure 33. Approches d'assemblages testées au laboratoire .....</i>	<i>130</i>
<i>Figure 34. Représentation du procédé de Ouyang et al. pour créer un réseau interconnecté dans un scaffold .....</i>	<i>134</i>
<i>Figure 35. Système de stabilisation pour un défaut de fémur .....</i>	<i>136</i>





# 1 LE TISSU OSSEUX : STRUCTURE ET PHYSIOLOGIE

Il est important de connaître l'anatomie et la physiologie du tissu osseux ainsi que les mécanismes de formation et de réparation tissulaire. Ces connaissances permettent une meilleure réflexion pour la mise en place de stratégies d'ingénierie tissulaire pour la régénération osseuse.

## 1.1 La structure de l'os

L'os est un tissu conjonctif fortement minéralisé ce qui lui confère une certaine rigidité (1). Il compose le squelette qui assure différents rôles. Un premier rôle mécanique, en assurant le support des structures corporelles ainsi que la motricité. Un second rôle, en participant également à la protection des organes internes avec les muscles. Enfin, les os contrôlent et maintiennent l'homéostasie du calcium par le stockage et la libération des minéraux lors du remodelage.

On peut décrire l'os comme un matériau composite, constitué à 65% d'une partie minérale et à 35% d'une matrice organique (2). La partie minérale, majoritairement composée d'hydroxyapatite (HA), est responsable de sa rigidité et sa résistance mécanique. La partie organique, composée majoritairement de collagène de type I et de quelques autres protéines non collagéniques (1), apporte une flexibilité jouant un rôle dans la résistance à la fracture. Parmi les protéines non collagéniques, on retrouve l'ostéocalcine, l'ostéonectine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse. L'ostéocalcine (OCN) est exprimée par les ostéoblastes/ostéoclastes lors du processus de minéralisation. Elle a donc une fonction dans les étapes tardives de remodelage et formation osseuse (1). L'ostéonectine (ON) est synthétisée par les ostéoblastes et joue un rôle dans la minéralisation par son affinité pour le collagène I et le calcium. L'ostéopontine (OPN), également synthétisée par les ostéoblastes, intervient dans la régulation de la minéralisation et dans la liaison de l'HA aux cellules osseuses. La *bone sialoprotein* (BSP) agit comme un noyau de nucléation d'hydroxyapatite, elle est donc présente dans les étapes précoces de minéralisation (1).

Ce tissu est constitué d'une double structure : corticale et trabéculaire (Figure 1). La couche externe, l'os cortical, présente une structure dense avec une porosité de 3 à 12% (3). La couche interne, l'os trabéculaire, présente une structure spongieuse avec une porosité comprise entre 50 et 90%. Ces différences de structure vont leur conférer des propriétés mécaniques différentes.

A l'échelle microscopique, l'os cortical est composé de lamelles cylindriques organisées en cercles concentriques autour de canaux centraux (canaux de Havers) abritant les nerfs et vaisseaux sanguins (2,4). Ces structures, appelées ostéons, constituent l'unité structurale de la couche corticale (Figure 1). Ils sont constitués principalement de fibres de collagène orientées dans le même sens au sein d'un ostéon. Toutefois, leur sens diffère entre chaque unité structurale. Cette organisation particulière confère à l'os cortical une forte résistance aux contraintes mécaniques. Les canaux de Volkmann relient entre eux les canaux de Havers.

Ce sont ces canaux qui permettent aux vaisseaux sanguins d'irriguer le tissu osseux et ainsi d'apporter nutriments et oxygène.

L'os trabéculaire se présente sous la forme d'un réseau de trabécules osseuses. Les nombreuses travées sont traversées par des structures vasculaires et abritent la moelle osseuse. Le tissu osseux trabéculaire ne représente que 20% du squelette, il se trouve essentiellement dans les os courts, les os plats, ainsi que dans les épiphyses des os longs (2). L'os trabéculaire abrite une activité cellulaire importante liée à la présence des cellules de la niche vasculaire et de celles de la niche hématopoïétique.

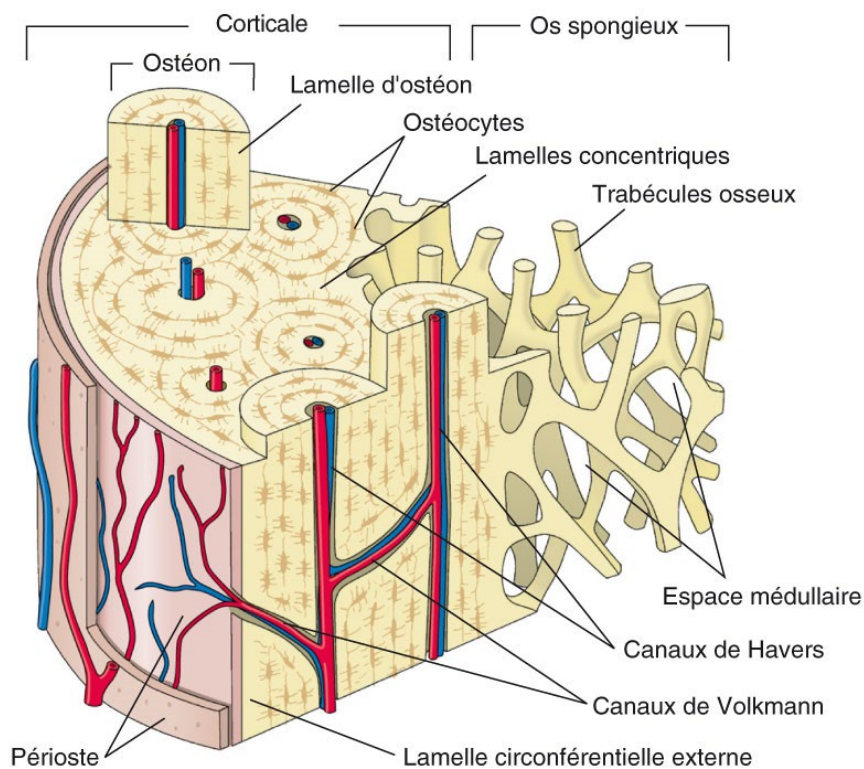


Figure 1. Les ostéons, l'unité structurale de la couche corticale  
Extrait de Anatomie et physiopathologie en soins infirmiers (© 2018, Elsevier Masson SAS)

## 1.2 Cellules osseuses

L'os contient quatre types cellulaires : les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes et les ostéoclastes (2).

Les ostéoclastes, issus de précurseurs hématopoïétiques, sont des cellules multinucléés responsables de la résorption du tissu osseux. Les cellules bordantes recouvrent la matrice osseuse, la protégeant ainsi de l'action des ostéoclastes. Elles jouent donc un rôle important dans la régulation de la résorption osseuse.

Les ostéocytes, ostéoblastes quiescents, sont des "mécanorécepteurs" sensibles aux variations de pression qui s'exercent sur la matrice osseuse (5,6). On les retrouve dans les lacunes (ostéoplastes). Leurs fins prolongements cellulaires créent un réseau entre eux et les autres cellules osseuses. Ce réseau leur permet de percevoir les variations des stimulations mécaniques et biochimiques qui influencent leur métabolisme. L'ostéocyte est reconnu comme étant le « chef d'orchestre » de la production de matrice osseuse (6).

Les ostéoblastes sont issus de cellules souches mésenchymateuses et sont responsables de la sécrétion et de la minéralisation de la matrice osseuse. Ils ont un rôle essentiel dans le processus de néoformation osseuse. Leur différenciation est sous la dépendance du facteur Runt-related transcription factor 2 / Core-binding factor subunit alpha-1 (Runx2/Cbfa1) (2,7). Ce facteur de transcription contrôle l'expression des gènes spécifiques du tissu osseux, comme le collagène de type 1 alpha-1 (Col1A1), l'ostéocalcine (OCN) ou encore la *bone sialoprotein* (BSP) (2).

### 1.3 Remodelage osseux

Tout au long de la vie, l'os subit un remodelage caractérisé par l'alternance de phénomènes de résorption et de néoformation, permettant d'assurer la conservation de ses propriétés mécaniques ainsi que de maintenir l'homéostasie minérale (5). Ce processus repose sur un équilibre entre activité ostéoblastique et ostéoclastique. Ces cellules « travaillent » de concert dans les *basic multicellular units* (BMU), où se déroulent les différentes phases de remodelage (8,9). Ce remodelage se découpe en 5 phases : activation, résorption, inversion, formation, quiescence (Figure 2).

Pendant la première étape, un stimulus biochimique ou mécanique va activer les ostéocytes et les cellules bordantes qui vont alors libérer des cytokines. La libération de ces facteurs entraîne le recrutement des ostéoclastes et permet ainsi d'initier la phase de résorption (2,10).

Lors de la seconde phase les ostéoclastes s'attachent à la surface osseuse grâce à une couronne d'hémidesmosomes et vont délimiter un microenvironnement propice à la résorption (10). Des ions hydrogènes et des phosphatases acides sont sécrétées, entraînant une acidification locale. Cette acidification favorise la dissolution de l'hydroxyapatite et permet la libération de calcium et phosphore. La sécrétion d'enzymes telles que les métalloprotéinases matricielles et les cathepsines, participent à la digestion des composants organiques de la matrice osseuse (11). Enfin, les ostéoclastes entrent en apoptose après la réception de signaux inhibiteurs (ex. IGF-1 ou TGF- $\beta$ ) (10,11).

Commence alors la phase d'inversion où de cellules mononuclées sont recrutées puis différenciées en macrophages. Ces derniers vont éliminer les débris restants de la matrice et ainsi préparer la surface de l'os pour la phase suivante (8).



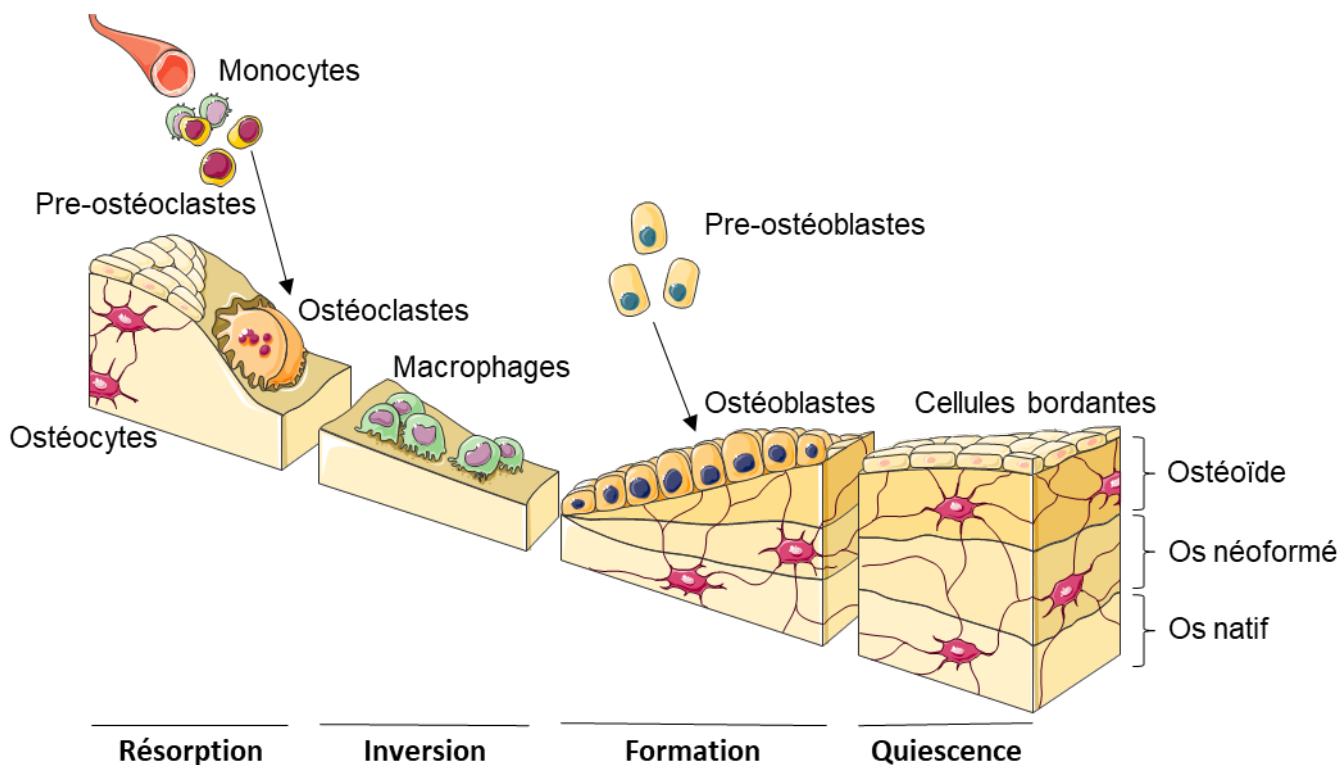


Figure 2. Les différents types cellulaires au sein du cycle de remodelage osseux  
 Courtoisie banque d'images Servier®

La phase de formation commence par le recrutement de pré-ostéoblastes. Ils vont se différencier et coloniser la lacune de résorption. Dans un premier temps ils vont synthétiser une matrice collagénique non minéralisée appelée tissu ostéoïde (12). Cette matrice sera progressivement minéralisée. Une fois la synthèse terminée, une partie des ostéoblastes va se retrouver au-dessus de la nouvelle matrice minéralisée. Ces cellules vont soit se transformer en cellules bordantes ou bien entrer en apoptose. Les ostéoblastes englobés dans la matrice nouvellement formée se transformeront en ostéocytes (12).

Une fois que le volume d'os formé est équivalent à celui résorbé, le processus de remodelage s'arrête. C'est la phase de quiescence, qui est une phase de repos avant une nouvelle activation de la cascade d'évènements du remodelage osseux.

#### 1.4 Cicatrisation osseuse

En cas de lésion tissulaire, un phénomène de cicatrisation osseuse se met en place, impliquant des conditions biologiques et mécaniques spécifiques. Le processus implique des cellules progénitrices, des cellules de l'inflammation, des cellules endothéliales et hématopoïétiques, et il est régulé par leur interaction avec des facteurs biochimiques, physiques et mécaniques (13). Ce processus se divise en trois phases : la phase inflammatoire, la phase de réparation et le remodelage final (Figure 3). La durée de ce processus va dépendre de l'âge du patient, de son état de santé, du site de fracture, ainsi que de l'étendue de la lésion.

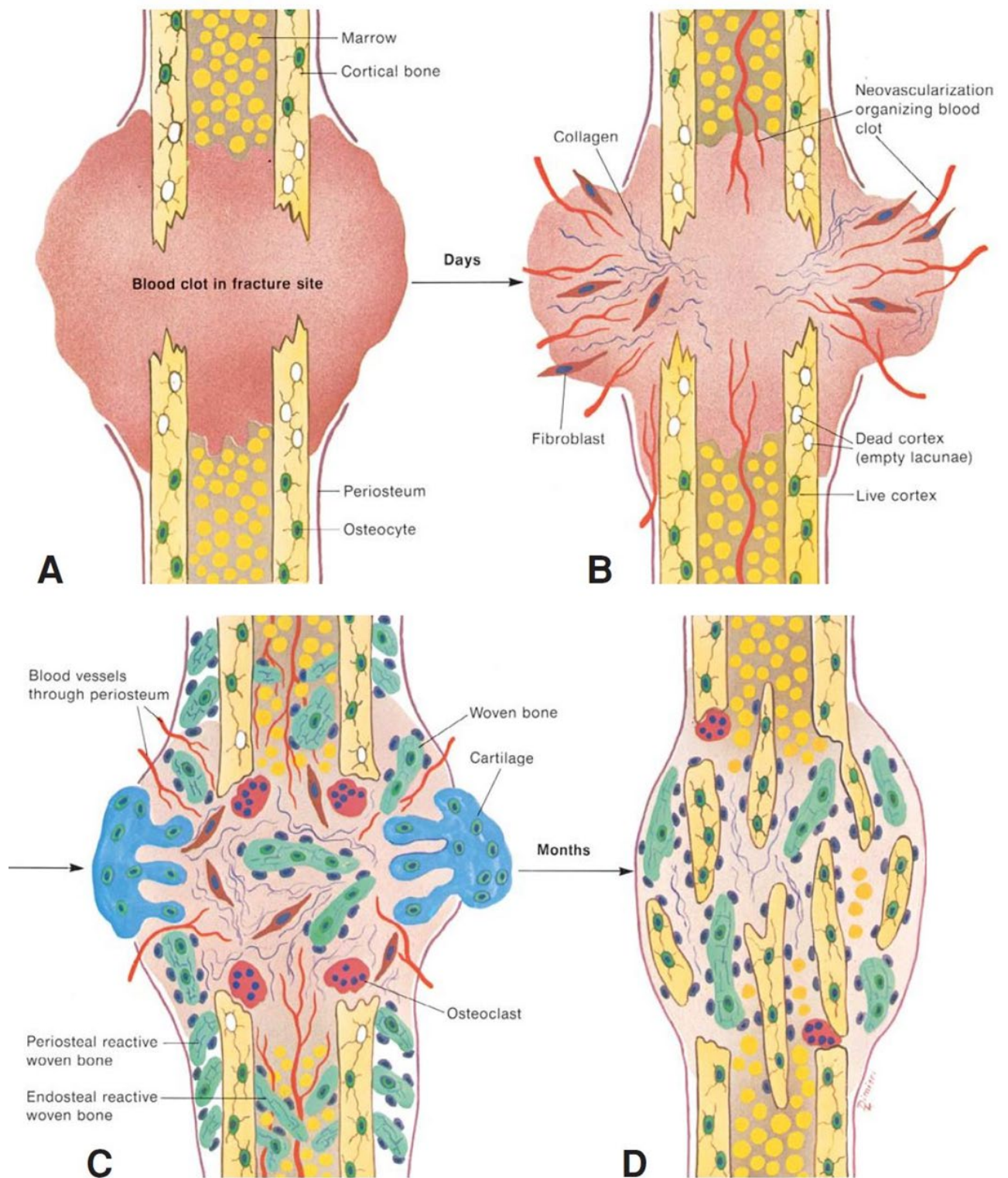


Figure 3. Chronologie de la cicatrisation d'une fracture osseuse (D'après Strayer et al. 2015 (14)). (A) Formation d'un caillot sanguin. (B) Phase inflammatoire associée à une néovascularisation. (C) Phase de réparation et formation du cartilage. (D) Phase de remodelage avec formation de nouveaux tissus osseux.

Au début de la phase inflammatoire un hématome se forme. Cet hématome contient des molécules de signalisation qui vont initier les cascades d'évènements cellulaires pour la cicatrisation osseuse. D'une part, un réseau de fibrine se forme grâce à l'activation de la cascade de coagulation et l'exposition des plaquettes, créant une matrice provisoire. D'autre part, une première vague de recrutement de cellules inflammatoires se met en place. Les polynucléaires neutrophiles recrutés vont sécréter des facteurs inflammatoires et recruter des macrophages ainsi que des monocytes et lymphocytes (15,16). Différentes molécules (TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1, IL-6, VEGF) vont également être sécrétées par les cellules immunitaires recrutées pour stimuler le remodelage de la matrice et l'angiogenèse.

Durant la phase de réparation, les macrophages vont permettre le recrutement de cellules progénitrices (16). S'en suit alors un développement de la vascularisation, une élimination des tissus endommagés et une différenciation des cellules progénitrices en fibroblastes, chondroblastes ou ostéoblastes (17). La matrice provisoire évolue alors en un tissu de granulation riche en fibrine. Cet ensemble va évoluer en une structure plus organisée appelée « cal ». La structure se calcifie et se vascularise dans un second temps. Elle sera progressivement remplacée par le nouveau tissu osseux.

Enfin, la phase de remodelage au cours de laquelle le tissu osseux nouvellement formé est remplacé par du tissu osseux « définitif », appelé os lamellaire. Tout comme le processus de remodelage naturel on observe une alternance de phases de résorption par les ostéoclastes et de formation par les ostéoblastes. Cette phase finale peut prendre plusieurs mois (13).

## 1.5 Cicatrisation osseuse en présence d'un biomatériau

Dans certains cas cliniques, il est nécessaire d'apporter un biomatériau pour aider le processus naturel de réparation osseuse. Différents biomatériaux peuvent être utilisés pour aider et favoriser la réparation osseuse. Ces matériaux seront plus amplement décrits en [2.1. Les stratégies de reconstruction osseuse en chirurgie orale](#).

Ces matériaux devront répondre à plusieurs critères afin d'aider la cicatrisation osseuse. Dans un premier temps le matériau doit se comporter comme un échafaudage (scaffold), pouvant être colonisé par les cellules et envahi par les tissus hôtes. L'objectif étant le recrutement de cellules qui vont participer à la régénération du tissu, comme les cellules osseuses ou endothéliales. Plusieurs paramètres sont impliqués :

- La biocompatibilité

Le matériau ne doit pas induire de réponse, systémique ou locale, indésirable. De plus, il doit contribuer de façon active et contrôlable à la biologie et la fonction de la structure (18). On pourra également y ajouter la notion du biomimétisme, qui joue un rôle essentiel dans la biocompatibilité. La composition du matériau et sa structure doivent avoir un effet positif sur l'attachement, la migration, la prolifération et la fonction des cellules, qu'elles soient apportées ou non avec le matériau.

- La porosité

La porosité ainsi que la taille des pores auront un impact sur la colonisation cellulaire et la capacité de l'implant à se vasculariser (19). La littérature reporte que des pores de 100-600  $\mu\text{m}$  sont recommandés pour une bonne intégration en site osseux (19). L'interconnexion des pores est essentielle pour permettre la migration, la prolifération cellulaire et la colonisation totale de la matrice, de la périphérie au centre de l'implant. Elle participe également à la meilleure diffusion des nutriments et de l'oxygène, permettant ainsi une meilleure survie et colonisation cellulaire.

- La surface de contact biomatériau/os

La surface de contact est importante car elle va permettre une bonne intégration du matériau (20). Cette surface de contact permettra également de faciliter la colonisation par les cellules hôtes. Ce point démontre l'intérêt de la fabrication sur mesure, facilité par les outils de fabrication additive.

- Les propriétés mécaniques

En fonction du site d'implantation le matériau va être soumis à des contraintes mécaniques auxquelles il devra s'adapter. Les matériaux doivent être choisis en prenant en compte les propriétés mécaniques attendues du scaffold. Ces propriétés vont également être conditionnées par sa structure et sa porosité (19). Elles sont d'autant plus importantes qu'il a été montré que des phénomènes de mécano-régulation étaient impliqués dans la formation d'os (21). Idéalement, le scaffold doit présenter une résistance à la compression de l'ordre de 100–230 MPa, un module de Young proche de 7–30 GPa et une résistance à la traction de 50–151 MPa (valeur de l'os cortical selon (22)).

- La bioactivité

La bioactivité décrit la capacité d'un matériau à induire une réponse biologique spécifique. On attend de ce matériau qu'il facilite la formation osseuse, pour cela 4 propriétés importantes : l'ostéoconduction, l'ostéoinduction, l'ostéointégration et l'ostéogénicité. L'ostéoconduction, correspond à la capacité d'un matériau à faciliter la néoformation osseuse à son contact. L'ostéoinduction signifie que le matériau induit la formation osseuse, le plus souvent en recrutant les cellules indifférenciées et en les orientant vers un lignage osseux. L'ostéointégration désigne la capacité à développer un ancrage stable entre le matériau et l'os. L'ostéogénicité décrit un matériau capable par lui-même de former le tissu osseux.

Dans un second temps, le biomatériau implanté doit se résorber pour laisser place à l'os nouvellement formé. La dégradation du matériau doit être connue et contrôlée. Elle doit se faire de façon concomitante à la néoformation osseuse. En effet, dans un premier temps le matériau doit servir de support aux cellules et au tissu néoformé, pour ensuite laisser la place au tissu mature. Là encore différents paramètres sont impliqués :

- Le choix du matériau ou de la combinaison de matériaux

La composition du matériau va diriger sa vitesse de résorption/dégradation. Chaque matériau a une vitesse de dégradation connue, qui doit être adaptée à l'application souhaitée. Cette vitesse de dégradation peut être modulée par des modifications chimiques ou des associations de matériaux.

- La porosité

Comme expliqué précédemment, la porosité doit permettre la colonisation par les cellules permettant la formation du nouveau tissu. Il doit également pouvoir être colonisé par les macrophages qui vont contribuer à son élimination.

## 2 L'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE

L'ingénierie tissulaire a été définie comme « l'ensemble des techniques et des 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 » (23).

En mêlant les progrès des connaissances dans les différents domaines, l'objectif est de repousser les limites des méthodes conventionnelles de régénération osseuse. Les approches d'ingénierie tissulaire osseuses actuelles reposent sur la combinaison d'une matrice ou échafaudage (= scaffold), de cellules et de facteurs de croissance (Figure 4). Le tout devant former un environnement favorable pour la prolifération et la différenciation cellulaire. On attend de ce substitut osseux qu'il réponde aux propriétés essentielles de la reconstruction osseuse : il doit favoriser la croissance osseuse (ostéoconduction), permettre une fixation stable au tissu hôte (ostéointégration), voire être capable de stimuler l'ostéogenèse (ostéoinduction).

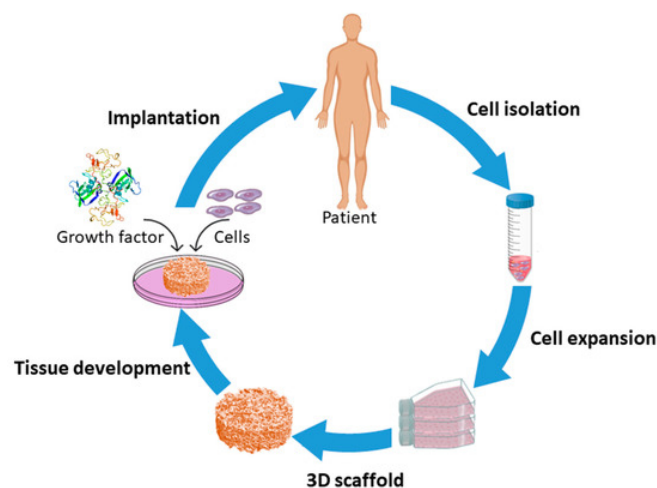


Figure 4. Etapes des approches d'ingénierie tissulaire en système autologue (Extrait de Asadian et al. 2020 (24))

Ces stratégies impliquent 2 aspects : l'utilisation d'un matériau sous la forme d'une matrice (scaffold = échafaudage) couplée à une partie biologique. Cette partie biologique peut être représentée par l'utilisation de cellules et/ou de facteurs de croissance. Les cellules seront préférentiellement prélevées chez le patient, puis mise en culture avec éventuellement une étape de différenciation. Ensuite les cellules sontensemencées sur la matrice/scaffold choisi en fonction du tissu à reconstruire. A cette étape, des facteurs de croissance et de différenciation peuvent être ajoutés pour favoriser la croissance tissulaire. Enfin, un temps de maturation peut être nécessaire pour permettre la formation d'un tissu vivant néoformé pouvant être implanté sur le patient.

Ces approches sont également considérées pour le développement de modèles *in vitro*. En effet, il est possible de développer des modèles biologiques de tissus physiologiques ou pathologiques. Ces modèles peuvent permettre de réduire le recours à l'expérimentation animale mais également d'étudier le comportement des cellules sous l'action de nouveaux médicaments dans un environnement plus représentatif.

## 2.1 Les stratégies de reconstruction osseuse en chirurgie orale

Dans le cas d'une perte osseuse trop importante ou dans des situations cliniques particulières (cancer, accident, ...), le processus de réparation naturel ne peut se mettre en place. Des stratégies de reconstruction sont nécessaires pour assurer la réparation de l'os. Les stratégies thérapeutiques actuelles s'appuient sur l'utilisation des greffes osseuses ou de substituts synthétiques.

### 2.1.1 Les greffes osseuses

Les greffes autologues ou autogreffes représentent le traitement de référence pour la régénération du tissu osseux. Elles sont réalisées à partir d'os du patient ce qui leur confère une compatibilité immunologique. C'est la seule greffe capable de fournir à la fois des facteurs de croissance ostéoinducteurs, des cellules ostéogéniques et un « échafaudage » ostéoconducteur. Cependant, la quantité d'os disponible est souvent limitée et la morbidité du site donneur est alors augmentée du fait de la multiplicité des sites opératoires (25,26).

Les greffes allogéniques ou allogreffes impliquent la transplantation de l'os d'un donneur chez le patient. Ces greffes sont aujourd'hui principalement issues de donneurs vivants lors de chirurgies de mise en place de prothèse totale de hanche (tête fémorale). Elles possèdent une capacité ostéoconductrice et peuvent conserver une capacité ostéoinductrice limitée si elles sont conservées congelées ou sous forme déminéralisées (27). Le principal défaut de ces greffes est la différence entre les techniques de préparation qui donnent des résultats contradictoires. Elles induisent parfois une réponse immunitaire mais également des problèmes d'intégration due aux différences de la qualité de l'os entre les donneurs (28,29). Enfin, on peut rajouter le risque de transmission virale, infection bactérienne et des risques de rejet en dépit des traitements et des procédures de préparation des allogreffes (27,28).

Les greffes xénogéniques ou xéno greffes proviennent d'une espèce différente de celle du receveur. Elles doivent également subir une série de traitements afin de prévenir une potentielle immunogénicité ou une transmission d'agent infectieux. Ces traitements ont tendance à altérer les propriétés ostéoinductrices des greffons (29). Néanmoins, les xéno greffes présentent des propriétés ostéoconductrices, de plus elles sont disponibles en grande quantité et à plus faible coût que les allogreffes (26,29).

### 2.1.2 Les matériaux pour l'ingénierie du tissu osseux

Les limites associées à l'utilisation des greffes ont mené au développement d'un large panel de matériaux pouvant servir de substituts. Ces substituts, d'origine synthétique ou naturelle, sont disponibles en grande quantité. De plus, ils permettent d'éliminer le risque de transmission de maladies, réduire le nombre de procédures chirurgicales et diminuer le risque d'infection ou d'immunogénicité.

Plusieurs familles de matériaux sont compatibles avec une utilisation en ingénierie tissulaire osseuse.

#### 2.1.2.1 Les polymères

Les polymères sont des macromolécules constituées par la répétition d'un motif (monomère). On distingue 2 catégories de polymères : les polymères naturels et les polymères synthétiques. Ici nous décrivons seulement les polymères connus pour être résorbables, car ce sont les plus utilisées dans les applications envisagées dans le cadre de ce travail.

##### Polymères naturels

Par polymères naturels on entend naturellement présents dans la nature. Par exemple le collagène est un polymère retrouvé dans les différentes matrices extracellulaires des tissus tels que les os, la peau, ... Ces polymères offrent une excellente biocompatibilité et sont biodégradables par action enzymatique ou hydrolyse. On peut distinguer 2 familles : les polysaccharides et les protéines.

Les protéines sont des polymères d'acides-amino à haut poids moléculaire. On retrouve généralement des protéines majoritaires du corps humain comme le collagène et la gélatine (30). Le collagène est la protéine la plus abondante dans le corps, ce qui en fait un matériau de choix. Cependant, le collagène pur possède de faibles propriétés mécaniques, bien en dessous de celles attendues en ingénierie osseuse. De plus, lorsqu'il est d'origine animale il peut entraîner une forte immunogénicité (31). La gélatine, forme dénaturée du collagène, présente une immunogénicité plus faible (32).

Les polysaccharides sont des polymères formés par la condensation d'unités de sucres (monosaccharides). Ces polymères hydrosolubles sont disponibles en grandes quantités, à faible coût avec une grande variabilité de propriétés et de structures. En effet, la présence de

groupes réactionnels le long de leur chaîne permet de les modifier facilement (33). Parmi eux : la cellulose, l'alginate, l'acide hyaluronique, l'agarose et le chitosan (34–38).

Néanmoins les polymères naturels ont tendance à présenter des propriétés mécaniques trop faibles pour une application osseuse. De plus, la reproductibilité entre les lots peut également être un facteur limitant (39).

### Polymères synthétiques.

Les polymères synthétiques sont produits chimiquement et offrent donc de nombreuses possibilités de modulation de leurs propriétés (40). Les polymères les plus utilisés sont issus de la famille des polyesters aliphatiques : le polycaprolactone (PCL), l'acide polyglycolique (PGA), l'acide polylactique (PLA), ainsi que leur condensé l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA).

Ces polymères ont démontré leur biocompatibilité et leur absence de toxicité, ils sont également biodégradables et les produits issus de cette dégradation peuvent être éliminés (40). Néanmoins lors de leur dégradation il est connu qu'ils relarguent des produits acides qui peuvent contribuer à l'initiation d'une inflammation locale. De plus, ils possèdent une nature hydrophobe qui peut freiner l'attachement cellulaire et diminuer la bioactivité du matériau. Le polyéthylène glycol (PEG), un polymère hydrophile, peut être couplé à ces derniers pour améliorer cet aspect (41).

Une des principales différences entre ces polymères est en rapport avec leurs propriétés mécaniques. Néanmoins, ils présentent tous des propriétés mécaniques proches ou supérieures à l'os cortical (42). Un second élément de distinction va être leur vitesse de dégradation. La dégradation du PCL et du PLA (> 24 mois) est assez lente comparé à celle du PLGA (1-12 mois), qui peut être contrôlée en modifiant le ratio acide lactique/glycolique (42,43).

#### 2.1.2.2 Les céramiques phosphocalciques

L'avantage majeur des céramiques phosphocalciques est leur ressemblance chimique à la structure minérale de l'os (44,45). Il en découle un caractère biocompatible et non toxique. Elles sont capables d'être remodelées par le processus naturel de remodelage osseux ce qui permet leur bonne intégration au tissu hôte (46). Il a également été démontré qu'elles possédaient une capacité ostéoconductive et permettaient l'adhésion et la prolifération des ostéoblastes (47,48). La limitation majeure de ces matériaux est liée à leurs propriétés mécaniques car elles sont fragiles et possèdent une faible résistance à la fatigue (48). De ce fait, elles sont plutôt utilisées comme matériaux de comblement pour de petits défaut osseux ou comme revêtement de prothèses métalliques pour la chirurgie orthopédique et orale/maxillo-faciale (49).

On retrouve dans cette famille des matériaux d'origines synthétiques, comme l'hydroxyapatite (HA), le Tri-Calcium Phosphate (TCP) et le Bi-Calcium Phosphate (BCP), un



mélange de HA et TCP. Il existe également des matériaux d'origine naturelle comme l'HA corallienne.

L'HA est le composant majoritaire de la phase minérale osseuse. Elle est biocompatible et possède des propriétés ostéoconductrices. On la retrouve sous différentes formes en reconstruction maxillo-faciale : sous forme de bloc poreux ou de poudre. L'HA présente une résorption lente, jusqu'à 3 ans sous forme dense (26). Sous forme de particules elle est plus facilement résorbable voire soluble.

Le TCP existe sous différentes formes cristallines, la bêta étant la plus connue. Le  $\beta$ -TCP possède une composition chimique proche de l'HA. Il est également biocompatible et son ostéoconductivité a été prouvée (50). Il présente une vitesse de résorption plus rapide que l'HA, en moyenne 13-20 semaines (26). Il est donc facilement et rapidement incorporé à l'os hôte.

Le BCP est un mélange d'HA et de  $\beta$ -TCP, dont le ratio est variable. Cette association permet de combiner les avantages des deux composants et de compenser leurs faiblesses. La variation de ce ratio va permettre de faire varier la vitesse de résorption du matériau. En effet, le  $\beta$ -TCP va se résorber plus vite que l'HA. De plus, l'HA présente des propriétés mécaniques légèrement supérieures au  $\beta$ -TCP (26). Néanmoins, cette association présente encore des propriétés mécaniques inférieures à celle de l'os cortical (26).

### 2.1.2.3 Les bioverres

Les bioverres sont des matériaux généralement à base de silice, additionnés de phosphore et calcium (51). On retrouve également des bioverres à base de phosphate ou borate (51). Ils sont connus pour réagir aux liquides physiologiques et former une couche d'hydroxyapatite carbonatée (26,52). Elle permet de stimuler la prolifération cellulaire et la différenciation de cellules souches vers un phénotype ostéoblastique (53,54). Cette couche va également être utile pour la minéralisation par les cellules osseuses et va permettre de créer un lien fort avec l'os.

Les bioverres à base de borates présentent une résorption plus rapide que ceux à base de silice. La vitesse de résorption peut être facilement contrôlée en modifiant la composition. Leur biocompatibilité est controversée à cause du relargage d'ions bore qui peut avoir des effets cytotoxiques (51).

Les bioverres à base de phosphate possèdent une composition qui se rapproche de celle de la phase minérale des os humains. Ils sont solubles et cette solubilité peut être modifiée par leur composition (51).

Enfin, bien que les différents bio-verres ont des capacités ostéoconductrices, ils présentent de faibles propriétés mécaniques avec une faible résistance à la fracture (26). Cet aspect limite leur utilisation seule pour des applications avec des contraintes mécaniques importantes.

#### 2.1.2.4 Les métaux

Les alliages métalliques, tel que le chrome-cobalt, le zirconium, le titane ou encore l'acier inoxydable sont biocompatibles et présentent d'excellentes propriétés mécaniques. Ces dernières font qu'on les retrouve dans beaucoup d'applications orthopédiques (21).

Un des défauts des métaux est la probabilité de relargage de particules de corrosion toxiques, ce qui pourrait mener à des réactions inflammatoires importantes. De plus, leur manque de biodégradabilité fait qu'ils sont moins privilégiés pour des applications où une résorption est attendue, comme en chirurgie orale et maxillofaciale. Par ailleurs, leur module élastique est également très supérieur à celui de l'os cortical, ce qui à terme peut entraîner une résorption osseuse anormale (55).

#### 2.1.2.5 Les hydrogels

Les hydrogels sont des matériaux composés à 90% d'eau, dégradables par hydrolyse ou sous l'action d'une enzyme. Leur forte teneur en eau leur confère un caractère hydrophile et les rends plus attractifs pour les cellules. Ils ont une structure et des propriétés assez similaires à celles de nombreux tissus et matrices extracellulaires (56). Ils sont également plus perméables au passage de l'oxygène et des nutriments (21). Enfin ils peuvent facilement être utilisés comme système de délivrance de cellules ou molécules.

Ils peuvent être composés de polymères synthétiques ou naturels, parmi ceux cités précédemment. Les hydrogels synthétiques ont une chimie et des propriétés contrôlables et reproductibles. Les hydrogels naturels présentent l'avantage d'être composés de polymères naturellement présents dans le corps, ils sont donc facilement dégradables par des enzymes/cellules.

En général, les hydrogels présentent des propriétés mécaniques faibles qui peuvent être améliorées par une réticulation de l'hydrogel (21). Une des approches les plus utilisées est la photo-réticulation. Elle nécessite l'incorporation de photo-initiateurs dans l'hydrogel. Il est également possible de jouer sur des caractéristiques physiques comme la température, le pH ou la concentration ionique.

#### 2.1.2.6 Les composites

Les matériaux décrits présentent tous des limites. La création de matériaux composites peut permettre de contrebalancer ces limites (57). Pour cela, on retrouve différents types d'associations :

- Les polymères naturels avec les biocéramiques.

On retrouve par exemple de nombreuses associations du collagène avec de l'HA (Cérapatite-Collagène®) ou du TCP (Calci-résorb-Collagène®) dans le commerce. L'ajout des céramiques permet d'augmenter le potentiel ostéoconducteur (51). De plus, l'association collagène-HA

mime la composition naturelle de l'os et plusieurs exemples montrent qu'elle participe à améliorer la formation osseuse (58).

- Les polymères synthétiques avec les biocéramiques ou bio-verres.

Les polymères synthétiques présentent une faible bioactivité, un couplage avec une biocéramique ou un bioverre permet d'apporter des propriétés ostéoconductrices (51). Le polymère quant à lui va améliorer les propriétés mécaniques de la céramique ou du bioverre (51,57).

- Les polymères synthétiques et les polymères naturels.

Les polymères naturels possèdent une cinétique de dégradation plus instable et des propriétés mécaniques faibles. Les coupler avec des polymères synthétiques permet de modifier et améliorer ces 2 paramètres (58).

- Les métaux avec les biocéramiques.

Les métaux sont des matériaux assez inertes, un couplage avec une biocéramique peut leur conférer un caractère ostéoconducteur. On retrouve de nombreux exemples de revêtements de ces matériaux par de l'HA pour des application en orthopédie (49,59).

Une discussion complémentaire sur les avantages et inconvénients des matériaux composites est discutée en [4. REVIEW OF LITERATURE: 3D PRINTED POLYMER-MINERAL COMPOSITE BIOMATERIALS FOR BONE TISSUE ENGINEERING: FABRICATION AND CHARACTERIZATION](#)

## 2.2 Les cellules dans les stratégies de reconstruction osseuse en chirurgie orale

Bien que l'intégration de cellules dans les stratégies d'ingénierie osseuse démontre un intérêt, il n'existe actuellement pas de consensus sur le meilleur type cellulaire à utiliser. Nous allons décrire ici les principaux types retrouvés ainsi que leur intérêts et limites.

### 2.2.1 Les cellules souches embryonnaires (ESCs)

Les cellules souches embryonnaires (ESCs) sont des cellules indifférenciées, présentes aux stades embryonnaires précoces. Elles sont pluripotentes, ce qui signifie qu'elles peuvent se différencier en n'importe quel type cellulaire (60). Les ESCs peuvent donc se différencier en de multiples lignées présentes dans l'os adulte : cellules ostéogéniques, cellules vasculaires, ostéoclastes et cellules nerveuses (61).

Néanmoins, l'accès à ces cellules est soumis à une réglementation stricte aussi bien en clinique qu'en recherche. En effet, malgré leur intérêt il n'a pas encore été démontré l'absence de tumorigénicité de ces cellules. Il a été démontré que leur culture prolongée pouvait entraîner la formation de tératome après implantation (62). De plus, un risque de rejet est présent en raison de l'incompatibilité immunologique entre le donneur et le receveur (63).

### 2.2.2 Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs)

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) sont artificiellement dérivées de fibroblastes de peau. Ces cellules ont été reprogrammées par transmission rétrovirale de quatre facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Klf4 et Myc). Cette technique a été mise au point en 2006 à partir de cellules de souris (64). Le modèle a été par la suite adapté pour des cellules humaines. Les études ont montré que les iPSC humaines possédaient des propriétés similaires à celles des ESC humaines. En effet, en plus de posséder des propriétés identiques, elles ont également la capacité de se différencier vers tous les types cellulaires.

Néanmoins, tout comme les ESCs, le risque de tumorigénicité n'est pas écarté dues aux oncogènes intégrés. Il y a également un risque lié à un résidu de cellules pluripotentes, tumorigènes, qui échapperaient à la différenciation. Des études sur des stratégies non intégratives sont en cours afin de sécuriser leur utilisation en ingénierie tissulaire osseuse (63).

### 2.2.3 Les cellules souches adultes

On retrouve des cellules souches adultes dans de nombreux tissus tel que la moelle osseuse, le périoste, les muscles, le tissu adipeux, la peau, le sang du cordon ombilical, le placenta, ou encore le cerveau. Ce sont des cellules multipotentes, qui permettent de renouveler les cellules d'un tissu spécifique, elles peuvent se différencier en un nombre limité de lignées cellulaires. Les cellules souches adultes restent actuellement les cellules les plus utilisées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse.

#### 2.2.3.1 Cellules souches mésenchymateuses (MSCs)

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sont probablement les plus connues et les plus utilisées dans les stratégies actuelles. On peut les isoler à partir de diverses sources tissulaires adultes comme le cordon ombilical, le placenta, la peau, les reins et le foie, mais la moelle osseuse reste la source privilégiée. Elles sont impliquées dans le processus de développement des os, elles démontrent une forte capacité à se différencier en cellules osseuses et à former de la matrice minéralisée.

Leur utilisation au sein de biomatériaux a montré des résultats prometteurs. Elles sont capables de stimuler la migration et différenciation des ostéoprogéniteurs de l'hôte grâce au relargage de facteurs de croissance ostéogéniques. On retrouve des exemples de divers modèles précliniques chez l'animal (65,66), ainsi que des résultats cliniques pour le traitement

de diverses maladies orthopédiques notamment les défauts fémoraux de taille critique, les déformations craniomaxillo-faciales et les fusions de la colonne vertébrale (67,68). De plus, l'utilisation de MSCs prédifférenciées permettrait d'accélérer la réparation des défauts et d'améliorer l'ostéointégration des scaffolds *in vivo*. Ces cellules plus matures permettraient une formation osseuse immédiate.

Cependant, plusieurs limites à l'utilisation des MSCs en clinique ont été mises en évidence. Premièrement leur obtention crée un risque de morbidité au niveau de la zone de collection, notamment pour la moelle osseuse. De plus, leur potentiel de prolifération et différenciation diminue avec l'âge et peut être impacté par l'état de santé du patient (69). Enfin, la quantité de cellules reste faible dans les prélèvements effectués et le temps de prolifération cellulaire reste important ce qui complique une translation clinique (63). Néanmoins, les MSCs, dérivées de la moelle osseuse (BMSCs), restent actuellement considérées comme l'une des sources cellulaires les plus efficaces pour la régénération osseuse.

#### 2.2.3.2 Cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSCs)

Les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSCs) sont des cellules plus facilement accessibles et amplifiables. Le tissu adipeux est considéré comme une source riche en cellules souches mésenchymateuses, il en contiendrait 500 fois plus que la moelle osseuse (70). Les ADSCs ont la capacité de se différencier en cellules ostéogéniques, chondrogéniques, endothéliales, adipogéniques ou encore neurales (70). Son intérêt pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse a déjà été démontré de nombreuses fois (71–73). Il existe 2 approches possibles lorsque l'on souhaite travailler avec les cellules extraites du tissu adipeux :

- Travailler avec la fraction vasculaire stromale (FVS)
- Travailler avec les ADSCs isolées

La fraction vasculaire stromale (FVS), obtenue après digestion enzymatique de tissu adipeux, offre des perspectives intéressantes en clinique. Elle contient une population cellulaire hétérogène, dont les ADSCs, mais aussi des pré-adipocytes, des progéniteurs de cellules endothéliales, des péricytes, des lymphocytes T et des macrophages M2 (74). De plus, différents exemples montrent la possibilité de l'utiliser lors d'une chirurgie en une étape (72,73). La FVS peut être collectée et directement utilisée pour ensemercer un matériau. Le matériau cellularisé peut être implanté au cours de la même chirurgie, supprimant de multiples étapes intermédiaires.

Les ADSCs prédifférenciées ont démontré leur capacité à former de l'os lorsqu'elles sont couplées avec différents scaffolds *in vitro*, mais aussi *in vivo* (75–78). Elles ont également démontré leurs compétences ostéogéniques en sites ectopiques (63).

L'abondance en cellules souches dans la FVS comparé à la moelle osseuse, la facilité à s'en procurer, son potentiel pour la reconstruction osseuse, la quantité de tissu adipeux disponible et la rapidité avec laquelle les cellules peuvent être obtenues font de la FVS une alternative intéressante à la moelle osseuse.

### 2.2.3.3 Cellules souches dérivées du tissu dentaire

Les cellules souches dérivées du tissu dentaire 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 périoste (79,80). Ces cellules peuvent se différencier en différents types cellulaires d'intérêt pour la régénération osseuse.

Parmi elles, les cellules souches issues de la papille apicale (SCAPs) sont isolées préférentiellement à partir des germes de dents de sagesse. Les cellules souches issues de la pulpe dentaire (DPSCs), peuvent être prélevées lors de l'extraction de dents de sagesse. Ce sont des cellules relativement stables, qui peuvent subir de nombreux passages et qui présentent un temps de doublement assez élevé (80). Les cellules souches extraites du ligament parodontal (PDLSCs) peuvent être récupérées lors d'une extraction dentaire. Le ligament parodontal est un tissu mou retrouvé entre le ciment et la poche alvéolaire. La prolifération et la différenciation des PDLSCs diminue avec l'augmentation de l'âge du donneur (80).

De récentes études montrent le potentiel de coupler des SCAPs à un scaffold dans des stratégies d'ingénierie tissulaire osseuse. Elles permettent la formation d'un tissu hautement minéralisé (81,82).

## 3 IMPRESSION 3D POUR L'INGENIERIE DU TISSU OSSEUX

Les technologies d'impression 3D, également désignées par les termes technologies de fabrication additives ou prototypage rapide, ont fait leur apparition dans les années 80. Charles Hull est l'un des premiers à déposer un brevet pour la technologie de stéréolithographie (SLA) (83). Cette technologie est très vite suivie par l'apparition du Frittage Sélectif par laser (SLS) et le dépôt de fil fondu (FDM). Les années 90 marqueront les premières applications de l'impression 3D dans la médecine, ouvrant la voie à de nombreuses applications.

L'impression 3D a pris une ampleur considérable ces dernières années, appuyée par une quantité croissante de publications. Ces technologies de prototypage rapide ont modifié les approches en ingénierie tissulaire, d'une part au niveau de la fabrication des scaffolds, d'autre part pour l'assemblage des différents composants d'un matériau cellularisé. En effet, elles possèdent de nombreux avantages comparés aux techniques conventionnelles comme le *salt leaching*, *freeze-drying* et *gas-foaming*. Avec ces techniques, la reproductibilité est moindre et il est difficile de contrôler précisément la porosité et l'interconnectivité des scaffolds obtenus (21). De plus, les scaffolds obtenus présentent de faibles propriétés mécaniques et une dégradation rapide. L'attachement cellulaire est donc faible et la réparation osseuse irrégulière. Le processus de fabrication par impression 3D implique la modélisation d'objet sur ordinateur avec des paramètres contrôlés. Cela permet d'ouvrir une multitude de possibilités de structures, de porosités et d'interconnectivité, afin de moduler les propriétés mécaniques, l'ensemencement cellulaire et le transport de nutriments et métabolites. L'impression 3D

offre la possibilité de reproduire la complexité d'un tissu de façon plus avancée que les techniques de médecines régénératrices actuelles (84).

La fabrication d'objet par impression 3D nécessite plusieurs étapes. Premièrement, l'objet doit être modélisé à l'aide d'un logiciel adapté, tout en prenant en compte les caractéristiques de l'imprimante. Après modélisation, l'objet doit être traité par un logiciel permettant de le découper en différentes couches nécessaires à sa fabrication. En effet, le processus d'impression 3D, quelle que soit la technique utilisée, fabrique couche par couche l'objet voulu. Il est d'ailleurs important d'assurer une cohésion entre les couches pour maintenir l'intégrité de l'objet final.

Enfin, ce sont des outils permettant une fabrication sur mesure. Les stratégies de reconstruction actuelles amènent le chirurgien à adapter manuellement le scaffold (greffon ou substitut) au patient. Cette phase d'ajustage opérateur-dépendant est chronophage et augmente le risque infectieux post-opératoire. De plus, un ajustement précis du scaffold au site d'implantation permet une bonne stabilité et par la suite une meilleure intégration à l'hôte (85,86).

Il existe plusieurs techniques de fabrication additives utilisables en ingénierie tissulaire. Elles diffèrent par le procédé de mise en forme de la matière mais également par la nature des matériaux utilisables.

### 3.1 L'impression par jet de liant ou *Binder Jetting*

Comme son nom l'indique un jet de liant est projeté sur un lit de poudre selon un motif prédéfini pour former une structure en 2D (Figure 5). Ensuite, une deuxième couche de poudre est déposée, puis le liant est à nouveau projeté pour former le motif de la couche suivante. Les cycles sont répétés jusqu'à obtention de la structure en 3D puis les excès de poudre sont éliminés à la fin de la procédure (84,87). La poudre non liée sert de support pour la structure de la couche suivante, ce qui permet de développer des structures plus complexes et creuses (84,87,88).

Les matériaux compatibles avec cette méthode d'impression sont les métaux, les céramiques, les polymères et leurs composites. Néanmoins, l'étape de frittage nécessaire pour la bonne cohésion du scaffold entraîne l'impossibilité d'inclure des facteurs biologiques, qui seraient dégradés en étant exposé à d'aussi fortes températures.

Les systèmes actuels permettent de proposer une résolution de l'ordre de 300  $\mu\text{m}$  (84). La taille des particules a son importance. En effet, en présence de petites particules ( $< 5 \mu\text{m}$ ) un phénomène d'agglomération est observé, des marbrures peuvent apparaître en surfaces du matériau final (87,89). Au contraire, si les particules sont trop grosses leur liaison est plus difficile, résultant en des instabilités entre les couches. La littérature montre que des particules de l'ordre de 10-50  $\mu\text{m}$  fournissent les meilleurs résultats (89).

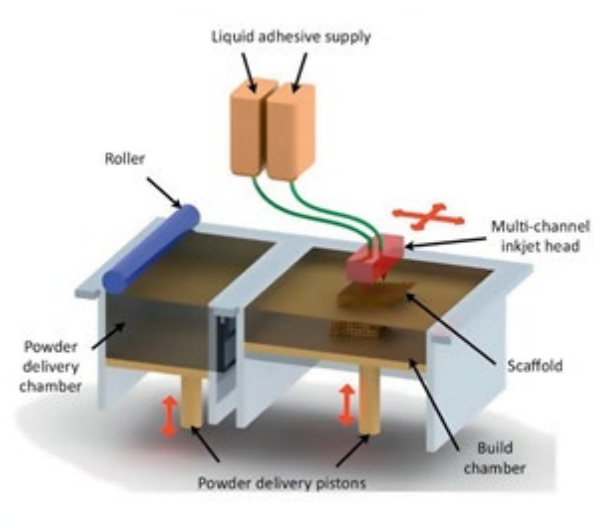


Figure 5. Schéma illustrant l'impression 3D par jet de liant (extrait de Moroni et al. 2018 (84))

### 3.2 Le frittage sélectif par laser (SLS)

Le Frittage sélectif par laser (*Selective laser sintering*, SLS) utilise un laser pour lier des particules. Le faisceau laser est dirigé sur un lit de poudre pour dessiner un motif fusionné et solidifié par échauffement point par point du laser (Figure 6). Le scaffold final repose dans la poudre non frittée et il faut alors éliminer les excès de poudre. Ce procédé s'effectue dans un environnement contrôlé (Azote, Argon...) pour éviter une oxydation possible à haute température.

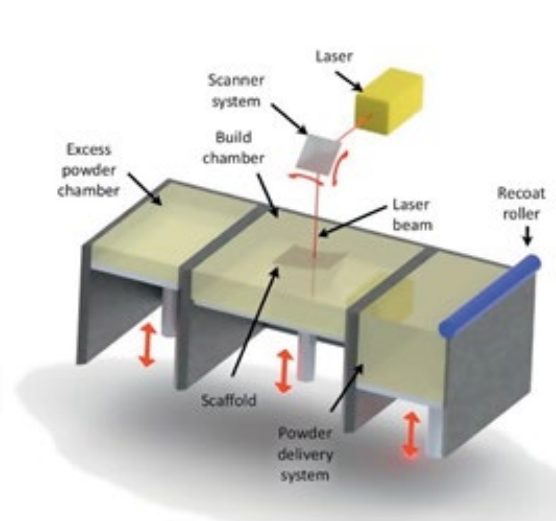


Figure 6. Schéma illustrant le frittage sélectif par laser (SLS) (extrait de Moroni et al. 2018 (84))

Les matériaux compatibles avec cette technique sont variés : métaux, polymères thermoplastiques, céramiques, ainsi que l'association de polymères et céramiques (90,91). Les



matériaux doivent être résistants aux hautes températures générées par le laser. Ici encore, il n'est pas possible d'inclure d'éléments biologiques lors de l'impression (84,89).

L'avantage du frittage sélectif par laser est la possibilité de fabriquer des matériaux complexes, poreux et avec une résistance mécanique élevée. La résolution est dépendante de nombreux paramètres : la taille du spot laser, la taille des particules, la capacité d'absorption du matériau choisi ainsi que la conduction thermique (84). La conduction thermique fait que la résolution est inévitablement plus large que le spot laser.

### 3.3 La stéréolithographie (SLA)

La stéréolithographie (SLA) est basée sur l'utilisation de résines photo-polymérisantes. Un faisceau laser balaie la surface de résine liquide en fonction de la forme de la tranche définie informatiquement (Figure 7). Sous l'effet de la lumière le photoinitiateur forme un radicalaire et les monomères sont instantanément pontés entre eux, formant un polymère solide. On peut facilement adapter la rigidité du matériau aux applications en contrôlant le degré de réticulation du polymère. La résolution de l'impression est de l'ordre de 20-40  $\mu\text{m}$ , soit l'une des plus précises (84).

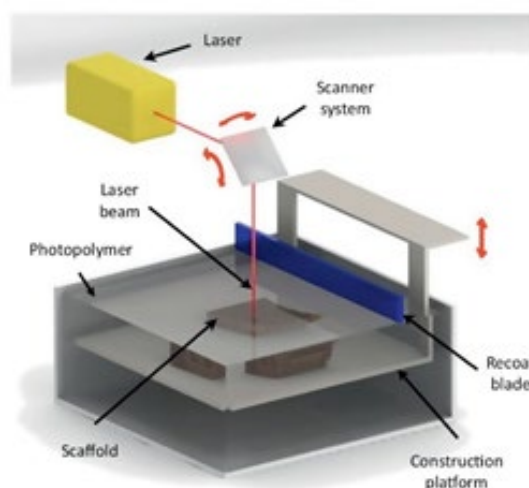


Figure 7. Schéma illustrant l'impression 3D par stéréolithographie (SLA)  
(extrait de Moroni et al. 2018 (84))

Les matériaux utilisables doivent pouvoir être polymérisés sous l'action du laser. Le nombre de résines photo-polymérisables et utilisables dans le domaine biomédical est limité. Il est toutefois possible de modifier chimiquement les polymères cités précédemment (PEG, PLA, gélatine, ...) pour les rendre utilisables avec la SLA (92,93). Il est également possible d'inclure des céramiques sous forme de poudre dans la résine. Cependant, la présence de particules aura tendance à augmenter drastiquement la viscosité, pouvant rendre l'impression plus complexe (93).

Cette technologie est très utilisée par les cliniciens pour développer des modèles leur permettant de mieux étudier un cas clinique. Ces dernières années, la SLA a également été envisagée pour développer des matériaux implantables. Soit de façon indirecte, par la fabrication de moules (94,95), soit de façon directe, notamment depuis le développement de résine contenant des phosphates (96).

Les récents progrès concernant cette technologie ont permis dans certains cas l'utilisation d'un faisceau de lumière à la place du laser (97). Cela s'applique à certains hydrogels ce qui permet d'envisager l'inclusion de cellules dans le cas où ces dernières ne seraient pas sensibles à la source lumineuse utilisée (92).

### 3.4 L'impression par dépôt de fil fondu (FDM)

L'impression par dépôt de fil fondu ou *Fused Deposition Modeling* (FDM) repose sur l'extrusion d'un polymère thermoplastique sous forme de fil ou de granules. L'extrusion est un procédé de fabrication thermomécanique, la tête d'extrusion chauffe la matière qui est ensuite compressée et contrainte de traverser la tête d'extrusion. Le matériau fondu est déposé couche après couche sur un plateau (chauffant ou non), afin de construire l'objet voulu (98) (Figure 8).

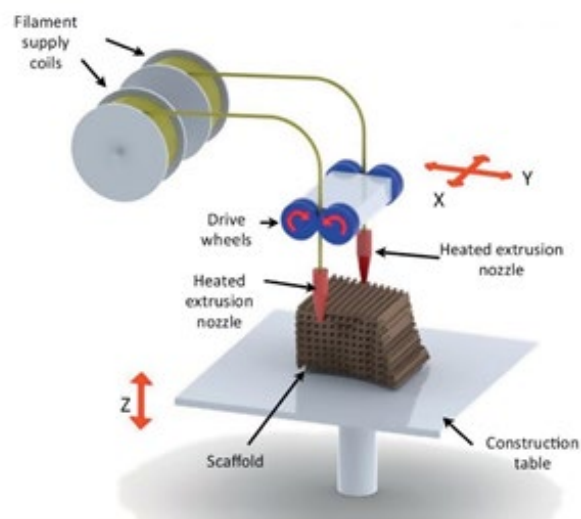


Figure 8. Schéma illustrant l'impression 3D par dépôt de fil fondu (FDM)  
(extrait de Moroni et al. 2018 (84))

En FDM, la gamme de matériaux utilisables est assez restreinte puisque l'on doit utiliser des matériaux thermoplastiques avec une viscosité adaptée pour permettre leur impression. Il peut s'agir de polymères seuls (PCL, PLA, ...) ou de polymères associés à des céramiques (TCP, HA). Toutefois l'ajout de particules de céramique peut impacter la qualité d'impression. Il faut donc travailler avec des chargements peu importants, en général inférieurs à 20% (57).

C'est la qualité de la tête d'extrusion qui va déterminer la finesse et la précision d'impression (89). Il est possible d'imprimer deux matériaux simultanément en utilisant 2 têtes d'extrusion

distinctes. Ceci va permettre de jouer sur les paramètres physiques et chimiques de la structure imprimée. Le principal inconvénient de cette méthode est que les cellules ne peuvent pas être incorporées dans la structure au moment de la fabrication du scaffold du fait des conditions de température utilisées. De plus, les hautes températures utilisées peuvent entraîner une dégradation du polymère.

### 3.5 La micro-extrusion ou 3D plotting

Le 3D plotting désigne l'impression de matériaux sous forme de solution ou de pâte, souvent un hydrogel. Le matériau est distribué sous la forme d'un filament par extrusion, qui est actionnée soit par un système mécanique (vis sans fin) ou pression pneumatique (Figure 9).

Ce procédé d'impression est compatible avec la majorité des matériaux précédemment décrits. Néanmoins, la méthode d'impression requiert des matériaux avec des caractéristiques d'impression particulières et la viscosité en sera un des paramètres clés (88). Dans ce cas, l'inclusion de particules de céramique ou de bioverre est possible dans le matériau sous forme de solution ou de pâte. La quantité de particules aura une influence sur les paramètres et la qualité d'impression.

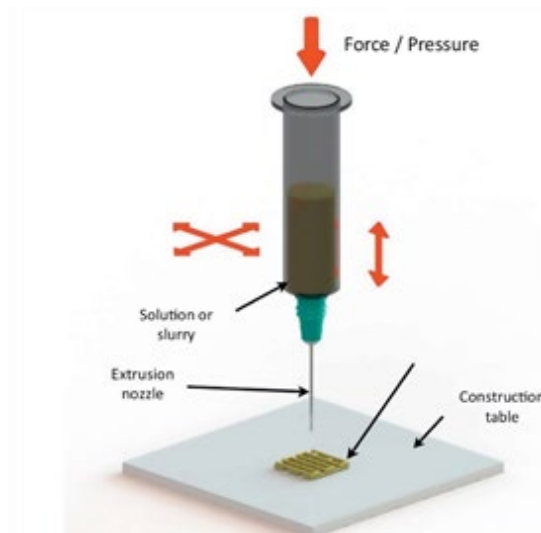


Figure 9. Schéma illustrant l'impression 3D par micro-extrusion (extrait de Moroni et al. 2018 (84))

Les deux problèmes majeurs de ce type d'impression sont liés au maintien et à la solidification de la structure imprimée (99). L'impression de structures complexes peut nécessiter l'utilisation d'un support sacrificiel. Concernant la solidification, les approches sont souvent chimiques ou liées à une photo-activation. L'approche la plus commune est la photo-réticulation qui nécessite l'incorporation de photo-initiateurs dans le biomatériau. La structure peut également être stabilisée par changement de température, de pH ou de la concentration ionique. Il est également possible d'imprimer des matériaux avec une viscosité suffisante pour s'auto-supporter.

### 3.6 Electrospinning

L'*electrospinning* permet de produire des maillages de fibres en faisant passer une solution de polymère chargés dans un champs électrique à haut voltage. Le diamètre des fibres déposées peut varier d'une centaine de nanomètre à une dizaine de microns (100,101). Ces fibres sont déposées sur un collecteur, la forme de ce dernier va conditionner la forme du scaffold. Avec un collecteur cylindrique par exemple on peut obtenir un tube. L'*electrospinning* permet un dépôt chaotique des fibres (Figure 10A,C). Toutefois, de récentes études montrent la possibilité d'imprimer des fibres alignées (102). Une technique dérivée, le *melt electrospinning* permet de réaliser des structures plus élaborées (Figure 10B,D). De récentes publications ont montré la possibilité d'imprimer des cellules avec ces techniques (103,104).

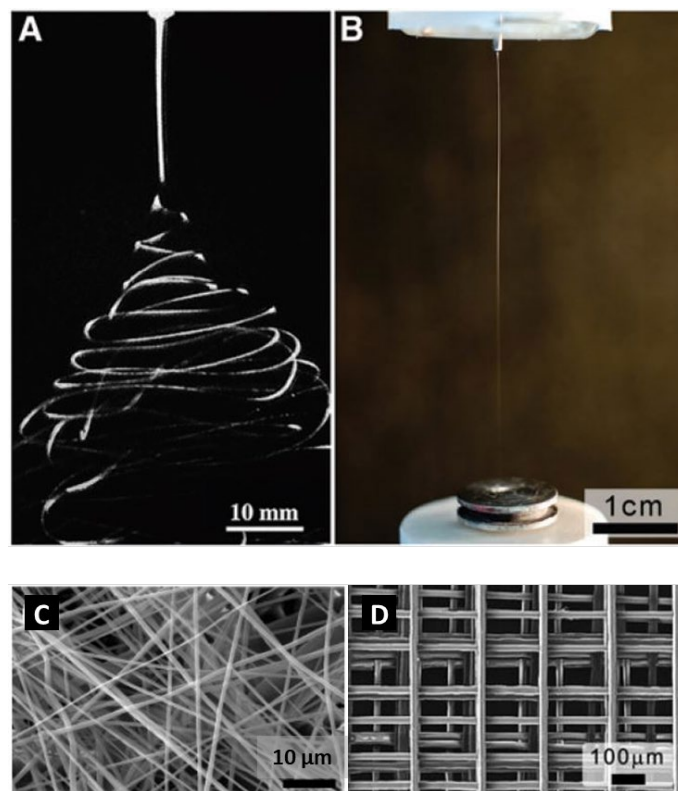


Figure 10. Photos comparant le dépôt de fibres par *electrospinning* (A) et *melt electrospinning* (B). Photos des motifs obtenus par *electrospinning* (C) et *melt electrospinning* (D) (Extrait de Muerza-Cascante et al. (105) et de Pham et al. (106)).

Ces techniques nécessitent l'utilisation de polymères chargés, comme le PCL, PEG, PLA et PLGA. Ces dernières années des articles ont également présenté la possibilité d'utiliser des polymères naturels comme le collagène (107,108). Il est également possible de coupler ces polymères avec des particules de biocéramiques dans des approches d'ingénierie tissulaire osseuse (109).

Ces techniques nécessitent l'utilisation de solvants organiques qui peut engendrer une toxicité pour les cellules. De plus, le temps de production d'un scaffold de taille importante (plusieurs centimètres) peut être relativement long et les scaffolds obtenus présentent de faibles propriétés mécaniques.

### 3.7 Bioimpression 3D

On retrouve également diverses techniques dédiées à l'impression de cellules que l'on peut regrouper sous l'appellation « Bioimpression ». Parmi elles : l'impression par jet d'encre (Figure 11A), la micro-extrusion (Figure 11B) ou encore l'impression assistée par laser (Figure 11C). Elles permettent une impression avec plus ou moins de précision de cellules incluses dans ce qu'on appelle une bioencre. Cette bioencre est un hydrogel couplé à des cellules, il est possible de contrôler très finement le nombre de cellules déposées. L'hydrogel peut être composé de polymères, naturels ou synthétiques, qui peuvent éventuellement être couplés avec des céramiques ou des bio-verres. Le détail de ces techniques ne sera pas présenté ici car trop éloignées de notre sujet.

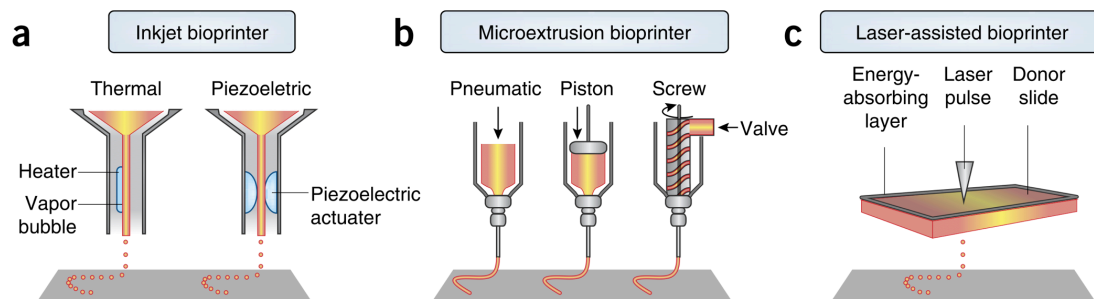


Figure 11. Les principales techniques de bioimpression. L'impression par jet d'encre (A), la micro-extrusion (B) et l'impression assistée par laser (C) (Extrait de Murphy, S.V., et Atala, A., 2014 (110)).

## 4 REVIEW OF LITERATURE: 3D printed polymer–mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: fabrication and characterization (Article 1)

Les éléments précédemment discutés révèlent la diversité des approches actuelles en ingénierie tissulaire osseuse. Les technologies de fabrication 3D se démarquent ces dernières années dans la médecine. Ces techniques démontrent une grande adaptabilité dans différents domaines et peuvent notamment s'appliquer pour la fabrication de substituts osseux. Elles diffèrent par leur procédé mais aussi par la nature des matériaux utilisables, chacune possédant des atouts et des points faibles. Différents paramètres peuvent être considérés pour orienter le choix de la technique : choix du matériaux, complexité du scaffold ou encore la résolution souhaitée.

Une grande variété de matériaux sont compatibles avec ces techniques de fabrications additives. Cette variété rend le choix d'autant plus difficile qu'ils présentent tous un intérêt pour une application en ingénierie osseuse. Nous avons également montré que les stratégies basées sur l'utilisation d'un seul matériau avaient leurs limites. Il est donc possible de créer des matériaux composites pour contrebalancer les limites respectives de chaque matériau. Les associations de matériaux retrouvées dans la littérature sont diverses et les améliorations apportées sont variées. En fonction des associations réalisées on peut augmenter les propriétés mécaniques, l'ostéoconductivité mais aussi l'attachement cellulaire.

Les polymères sont les bases de matériaux les plus utilisées dans ces approches (58,111), notamment pour leurs propriétés mécaniques. Ce sont également des matériaux faciles à façonner par impression 3D en des formes complexes et précises. Néanmoins, il a été démontré qu'utilisés seuls ils aboutissent rarement à une réparation complète. Les céramiques phosphocalciques et les bioverres sont des matériaux reconnus pour leur propriétés ostéoconductrices et leur capacité à établir un lien avec l'os hôte. Leur potentiel dans les stratégies de régénération osseuse a été largement décrit dans la littérature (47,48). L'intérêt de réaliser une association polymère-céramique est d'améliorer les propriétés mécaniques des céramiques et d'augmenter le pouvoir ostéoconducteur du polymère.

Différents paramètres doivent être considérés pour la fabrication d'un scaffold 3D pour la réparation du tissu osseux : la méthode d'impression utilisée, le type d'association polymère-minéral ainsi que le ratio utilisé. Tous ces choix vont affecter les propriétés finales du scaffold développé. L'objectif de cette revue de littérature a été d'évaluer quels étaient les composites polymère-céramiques utilisables en impression 3D pour l'ingénierie du tissu osseux.

Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement aux technologies d'impression 3D compatibles avec des composites polymère-céramique. Il en ressort que la technologie d'impression 3D par FDM était la plus utilisée. Ce n'est pas étonnant, car c'est une technique accessible qui a démontré des résultats intéressants pour l'ingénierie tissulaire osseuse (98,112).

Nous avons également présenté les matériaux compatibles avec ces technologies, en nous focalisant sur les matériaux composites polymère-céramique développés. Nous avons aussi fait un bilan des avantages et inconvénients de chaque matériau.

Concernant les polymères, il en ressort que le PCL était le matériau le plus utilisé. C'était un des premiers polymères sur le marché applicable au domaine médical (113). On retrouve énormément de publications documentant ces propriétés et applications. Le PLA et le PLGA étaient les deuxièmes polymères les plus utilisés, notamment pour leur dégradation plus rapide qui permet des applications différentes. Le PLGA est un copolymère dont les propriétés sont facilement modulables en faisant varier le ratio PLA-PGA.

Concernant les céramiques, le TCP et l'HA étaient les plus retrouvés en association avec un polymère. Ces phosphates de calcium sont fréquemment utilisés car ils ont une composition chimique proche de la phase minérale de l'os humain. En moyenne la quantité en masse de minéral associé était inférieure à 40%. Le ratio le plus retrouvé dans la littérature étant 80-20% polymère-céramique.

Enfin, il nous a semblé important de finir par un point sur les différentes méthodes de caractérisation. En effet, différents paramètres doivent être pris en compte pour l'élaboration d'un matériau pour la réparation osseuse. On retrouve 2 types de caractérisations : physicochimique et biologique. La majorité des articles inclus dans cette revue présentaient les 2 aspects de caractérisation.

D'un point de vue physicochimique, les caractéristiques importantes étudiées étaient : la caractérisation de la structure obtenue (régularité, topographie, ...), la composition et la structure chimique, l'hydrophobie, les propriétés thermiques et mécaniques. Dans certaines études le vieillissement du matériau était également étudié. Il en est ressorti une grande diversité de techniques utilisées, rendant complexe la comparaison entre les différentes études.

Pour la caractérisation biologique, elle se divisait en étude *in vitro* et étude *in vivo*. Pour la caractérisation *in vitro* différentes sources de cellules étaient utilisées : cellules primaires humaines ou animales, ou cellules issues de lignées. En général l'objectif de cette partie était de prouver la biocompatibilité en étudiant différents critères : attachement cellulaire, viabilité et prolifération. Une étude du potentiel ostéogénique était aussi souvent réalisée. L'ajout d'une céramique n'a pas toujours semblé améliorer la biocompatibilité, en comparaison du polymère seul. Néanmoins la présence d'une céramique permettait d'augmenter le potentiel ostéogénique dans la majorité des cas. La comparaison des résultats s'est avérée complexe car beaucoup d'études n'utilisaient pas le polymère seul comme contrôle. Il était donc difficile de statuer sur la valeur ajoutée du couplage polymère-céramique.

Pour la partie *in vivo*, différents modèles étaient utilisés pour prouver le potentiel ostéoconducteur. La majorité des études étaient réalisées sur des petits animaux, le lapin étant le plus retrouvé, et différents modèles de défauts osseux étaient utilisés. Néanmoins, comme pour la partie *in vitro*, certaines études ne présentaient pas assez de conditions contrôles

(polymère seul, défaut vide) pour statuer sur les résultats. Toutefois, la majorité des études utilisant un composite montraient une amélioration de la réparation.

Cette revue de littérature a permis d'imbriquer les différents éléments de réflexion du projet afin de poser les grandes lignes directrices. Nous avons pu confirmer l'intérêt des matériaux choisis et réfléchir à leur caractérisation d'un point de vu physicochimique, avant de passer aux études *in vitro* et *in vivo*. Aussi au vu des observations réalisées, il nous a semblé important d'inclure des contrôles adéquats à chaque étape de caractérisation pour mieux estimer la valeur ajoutée de notre composite.





# ARTICLE 1

---

## 3D printed polymer–mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: Fabrication and characterization (Review)

Joanna Babilotte<sup>1</sup>, Vera Guduric<sup>1</sup>, Damien Le Nihouannen<sup>1</sup>, Adrien Naveau<sup>1,2</sup>,  
Jean-Christophe Fricain<sup>1,2</sup>, Sylvain Catros<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Tissue Bioengineering, University of Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>2</sup>Faculty of Dentistry, University of Bordeaux, Bordeaux, France

---

*Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*

2019 Nov;107(8):2579-2595. DOI: 10.1002/jbm.b.34348



## Review Article

# 3D printed polymer–mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: Fabrication and characterization

Joanna Babilotte,<sup>1</sup> Vera Guduric,<sup>1</sup> Damien Le Nihouannen,<sup>1</sup> Adrien Naveau,<sup>1,2</sup> Jean-Christophe Fricain,<sup>1,2</sup> Sylvain Catros<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Tissue Bioengineering, University of Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>2</sup>Faculty of Dentistry, University of Bordeaux, Bordeaux, France

Received 7 September 2018; revised 23 December 2018; accepted 10 February 2019

Published online 00 Month 2019 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.b.34348

**Abstract:** Applications in additive manufacturing technologies for bone tissue engineering applications requires the development of new biomaterials formulations. Different three-dimensional (3D) printing technologies can be used and polymers are commonly employed to fabricate 3D printed bone scaffolds. However, these materials used alone do not possess an effective osteopromotive potential for bone regeneration. A growing number of studies report the combination of polymers with minerals in order to improve their bioactivity. This review exposes the state-of-the-art of existing 3D printed composite biomaterials combining polymers and minerals for bone tissue engineering. Characterization techniques to assess scaffold properties are also discussed.

Several parameters must be considered to fabricate a 3D printed material for bone repair (3D printing method, type of polymer/mineral combination and ratio) because all of them affect final properties of the material. Each polymer and mineral has its own advantages and drawbacks and numerous composites are described in the literature. Each component of these composite materials brings specific properties and their combination can improve the biological integration of the 3D printed scaffold. © 2019 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: 00B: 000–000*, 2019.

**Key Words:** 3D printing, bone regeneration, polymer, calcium phosphate(s), ceramic

---

**How to cite this article:** Babilotte J, Guduric V, Le Nihouannen D, Naveau A, Fricain J-C, Catros S. 2019. 3D printed polymer–mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: Fabrication and characterization. *J Biomed Mater Res Part B*. 2019;00B:1–17.

---

## INTRODUCTION

Different pathological situations such as trauma, cancer, or infection can lead to large bone defects. In that case, natural bone healing process might be insufficient and the treatment of these defects requires a specific bone regenerative strategy using custom-made biomaterials. Most of bone tissue engineering strategies are based on porous and biocompatible scaffolds seeded with tissue-specific cells. Several conventional methods exist to fabricate bone scaffolds using polymers, ceramics as well as their composites, such as solvent-casting, particle leaching, freeze drying, thermally-induced phase separation, and gas foaming.<sup>1</sup> The major limitations of these methods are the presence of cytotoxic solvents and the limited control of internal micro-architecture, leading to an inhomogeneous distribution of porosities and uncontrolled pore size.<sup>2</sup> The manufacturing of custom-made three-dimensional (3D) scaffolds with high resolution and the control on internal micro-architecture are facilitated using 3D printing technologies.

Several 3D printing techniques are used to produce scaffolds for bone tissue engineering, each of them having advantages and drawbacks. Fused deposition modeling (FDM) is a common technique for scaffold fabrication based on material extrusion: a heated extrusion head forces out a thermoplastic filament material and deposit the semi-molten polymer onto a heated platform in a layer-by-layer process. FDM fabricated scaffolds possess good structural integrity and mechanical properties due to a fusion between material layers. Low-temperature deposition manufacturing (LDM) uses a similar technology at low temperature. In this case, the raw material is prepared in a solution and the scaffold is built layer-by-layer on a platform in a low-temperature chamber, maintained below 0°C. Selective laser sintering (SLS) uses a CO<sub>2</sub> laser beam to sinter a single polymer or a composite polymer powder to build the scaffold layer-by-layer. SLS can be used to produce scaffolds with irregular shapes, including structures containing channels. Stereolithography (SLA) uses an UV laser to solidify a resin by

**Correspondence to:** J. Babilotte; e-mail: joanna.babilotte@inserm.fr

Contract grant sponsor: Agence Nationale de la Recherche; contract grant number: ANR-16-CE18-0009-01

photo-polymerization. A computer-controlled laser beam or a digital light projector designs a pattern on the surface of the resin. The resin solidification induces its adhesion to the platform, which is moved down to deposit the next layer.<sup>3</sup>

A wide range of polymers can be used with these 3D printing technologies, and the most frequently used for bone tissue engineering applications are polycaprolactone (PCL), polylactic acid (PLA), and poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA). These polymers are currently approved by the Food and Drug Administration (FDA) for implantation or contact with biologic tissues.<sup>4</sup> Polymers can be osteoconductive but used alone they are usually not sufficient to obtain a complete bone regeneration. These materials have revealed some disadvantages for bone tissue engineering applications, such as a low bioactivity, a hydrophobic surface and a low degradation rate, not always adapted to the final application.<sup>5,6</sup> To increase their bioactivity, polymer scaffolds can be combined with calcium phosphates-based biomaterials. Minerals are interesting candidates for bone repair because of their osteopromotive ability. Calcium phosphates, in the form of hydroxyapatite (HA) or tricalcium phosphate (TCP), are frequently used because their chemical composition is close to the mineral component of human bone. In general, they improve the bioactivity of the scaffold and they can bring osteoinductive properties. The literature showed that one of the limits associated with bioceramics, like HA and TCP, is their fragility.<sup>7</sup> Previous studies have shown that polymer association with a mineral charge could lead to higher mechanical resistance by improving resistance to compression and elasticity.<sup>8-11</sup>

The addition of calcium phosphate (CaP) has also an impact on material roughness. Furthermore, it has been shown that CaP incorporation into a polymer can increase wettability of the scaffold.<sup>12,13</sup> Increasing wettability leads to more hydrophilic material surface. Increasing roughness and wettability of a material can lead to increased cell adhesion and proliferation.<sup>14</sup>

The aim of this review was to evaluate the existing composite biomaterials combining polymers and minerals that can be employed for the fabrication of bone scaffolds by 3D printing. We also discussed the physicochemical and biological techniques employed to characterize these composite materials and the results of the current *in vivo* applications.

## METHODS

A literature review was conducted on PubMed and Scopus using following combination of terms: "(3D printing OR rapid prototyping OR 3D printed) AND (bone tissue engineering OR bone repair) AND (bioceramic OR ceramic OR calcium phosphate)". Some additional references were identified in the articles selected and could be included if they matched inclusion criteria.

The inclusion criteria were:

- Scaffold designed for bone tissue engineering applications.
- Use of additive manufacturing technologies to fabricate the scaffold.
- Presence of a mineral charge loaded within a printable polymer.

All of these three criteria had to be present for publication selection.

The exclusion criteria were:

- Gel/hydrogel printing.
- Cartilage and musculoskeletal regeneration.
- Use of 3D printing to fabricate molds for injection molding.
- Polymer used as glue or binder.
- Systematic reviews and single case reports.

The presence of one of these criteria was sufficient to exclude an article from the review.

For the science mapping analysis, subject domains were examined by using keyword co-occurrence networking with VOSviewer (free software, version 1.6.6, Centre for Science and Technology Studies, Leiden University, The Netherlands, 2017). This software generated a network analysis of the Pubmed Mesh keywords from the matrix of retrieved papers (threshold value at 10).<sup>15</sup> The document similarities between clusters of topics were measured via the Mesh term-document matrix.

## RESULTS

PubMed and Scopus search with specific keywords retrieved 144 and 148 articles respectively. Sixty-two articles matched the defined inclusion criteria and were included in the study. The articles included were published between 2002 and 2018.

An increasing number of articles were published during the last 10 years [Figure 1(A)]. With the algorithm in Pubmed, the first retrieved paper on bone tissue 3D printing was published in 2004. The development of bone scaffolds fabricated by 3D printing seemed to grow slower than the overall bone tissue engineering literature. The science map displayed in Figure 1(B) is a spatial representation of the relationships between the keywords. Surprisingly, these graphic references do not show any MESH keywords regarding the 3D printing technologies nor the mineral materials.

First, 3D printing technologies and material used will be presented (Table I) and then the results of characterization (physicochemical and biological) will be detailed (Table II).

### 3D printing technologies

Different printing technologies were used to develop 3D scaffolds for bone tissue engineering applications (Table I). Fused Deposition Modeling was the most frequently used printing technology as it was employed in 38 studies (Figure 2).<sup>8,10-14,18-23,28,31-34,36,38,40,42,45-48,51-53,56,58,59,61,62,64-67</sup>

Low-temperature deposition manufacturing was used in 11 studies,<sup>16,17,35,39,41,43,50,57,68-70</sup> selective laser sintering in seven studies,<sup>24-26,29,30,44,63</sup> Stereolithography in three studies.<sup>27,37,55</sup>

### Materials used for scaffold fabrication

**Polymers.** PCL, PLA, and PLGA were the most used polymers. PCL was the most used polymer as it was found in 29 articles.<sup>9,13,14,18,22,24,28,31,32,34,36,38,40,42,44-48,51-53,58-62,65,66</sup> PLA was used in 13 studies<sup>8,10,16,20,21,23,29,49,54,56,67,69</sup> and PLGA in 14 studies.<sup>10-12,17,19,31,35,39,41,43,50,63,68,70</sup> Polyethylene glycol



**TABLE I. 3D Printing Technologies and Material Used**

Reference	Printing Method	Printed Materials	Polymer/Material Ratio
16	LDM	PLA nHA	PLA/nHA: 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 wt %
17	LDM	PLGA TCP Mg	PLGA/TCP: 80/20 wt % PLGA/TCP/Mg: 76/19/5, 72/18/10, 69/17/15 wt %
18	FDM	PCL Collagen Apatite	PCL Collagen coating Apatite deposition
19	FDM	PLGA $\beta$ -TCP HA	PLGA / $\beta$ -TCP: 75/25 wt % Coating HA
20	FDM	PLA PEG BG	PLA/PEG: 95/5 wt % PLA/PEG/BG: 47.5/2.5/50 wt %
21	FDM	PLA PEG BG	PLA/PEG: 95/5, 90/10, 80/20 wt % PLA/BG: 50/50 wt % PLA/PEG/BG: 47.5/2.5/50 wt %
22	FDM	PCL DCB	PCL/DCB: 95/5, 70/30, 30/70, 15/85 wt %
8	FDM	PLA HA	PLA/HA: 85/15 wt %
23	FDM	[PLA-PEG-PLA] HA	[PLA-PEG-PLA]/HA: 100/0, 75/25 wt %
24	SLS	PCL $\beta$ -TCP Col I	PCL/ $\beta$ -TCP: 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 wt % % + Col I coating
25	SLS	PHBV CaP Gelatin Heparin	PHBV/CaP: 85/15 wt % Gelatin and heparin coating
26	SLS	PVA HA	1. Spray dried of PVA/HA (30/70 wt %) 2. PVA/HA polymer blend with 10/20/30 wt % HA
27	SLA	PPF $\beta$ -TCMP SBM BCP rhBMP-2	$\beta$ -TCMP/SBM/BCP coating rhBMP-2 loading
10	FDM	PLGA + HA/ $\beta$ -TCP PLA + HA/ $\beta$ -TCP	Polymer/Mineral: 90/10, 80/20, 70/30 wt %
28	FDM	PCL Medical grade PCL (mPCL) TCP	PCL/TCP: 80/20 wt % mPCL /TCP: 80/20 wt %
29	SLS	PHBV/Ca-P PLA/CHA	PHBV/Ca-P: 85/15 wt % PLA/CHA: 90/10 wt %
30	SLS	PHBV Ca-P	PHBV/Ca-P: 87.1/12.9 wt %
31	FDM	PCL TCP PLGA	PCL/PLGA/TCP: 95/0/5, 90/5/5, 80/15/5, 70/25/5 wt %
32	FDM	PCL Hyaluronic acid $\beta$ -TCP	Coating of hyaluronic acid and $\beta$ -TCP
33	FDM	PP Wax Plasticizer TCP	PP/Wax/Plasticizer/TCP: 51.7/13.4/14.4/20.5 vol %
34	FDM	PCL Bioactive glass (BAG)	PCL/BAG: 90/10 wt %
35	LDM	PLGA $\beta$ -TCP	PLGA/TCP/Icariin: 80/20/0, 80/20/0.16, 80/20/0.32, 80/20/0.64 wt %

*(Continues)*

TABLE I. Continued

Reference	Printing Method	Printed Materials	Polymer/Material Ratio
36	FDM	Icariin PCL	PCL / $\beta$ -TCP: 80/20 wt %
37	SLA	$\beta$ -TCP PPF DEF HA	PPF/DEF/HA: 70/30/0, 65/28/7 wt%
38	FDM	[mPEG-PCL-mPEG] HA	mPEG-PCL-mPEG/HA: 50/50 wt %
9	FDM	PCL HA	PCL/HA: 70/30 wt %
39	LDM	PLGA $\beta$ -TCP Col I Apatite	PLGA/ $\beta$ -TCP: 70/30 wt % Col I coating Apatite deposition
40	FDM	PCL TCP	PCL/TCP: 80/20 wt %
41	LDM	PLGA TCP rhBMP2	PLGA/TCP: 50/50 wt %
12	FDM	PLGA nHA $\beta$ -TCP	PLGA/nHA/ $\beta$ -TCP: 80/10/10 wt %
13	FDM	PCL HA	PCL/HA: 75/25 wt %
11	FDM	PLGA CaCO <sub>3</sub> HA BG	PLGA/mineral: 75/25 (v/v %)
14	FDM	PCL $\beta$ -TCP HA Bio-Oss (BO) DCB	PCL/mineral: 70/30 wt %
42	FDM	PCL TCP	PCL/TCP: 80/20 wt %
43	LDM	PLGA TCP Icariin (ICT)/BMP2	PLGA/TCP: 80/20 wt % Incorporation of BMP2: 8 mg per 10 g PLGA/TCP or ICT: 8 mg, 32 mg and 80 mg per 10 g PLGA/TCP Or BMP2/ICT coating
44	SLS	PCL nHA rhBMP2	PCL/nHA: 95/5, 90/10, 85/15 wt %
45	FDM	PCL $\beta$ -TCP rhBMP-7	PCL/ $\beta$ -TCP: 80/20 wt % rhBMP-7 loading
46	FDM	PCL HA	PCL/HA: 60/40 wt %
47	FDM	PCL TCP	PCL/TCP: 80/20 wt %
48	FDM	PCL HA	PCL/HA: 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 wt %
49	Mini-deposition system (MDS)	PLA HA	PLA/HA: 85/15 wt %
50	LDM	PLLA, PDLLA, and PLGA TCP	n/a
51	FDM	PCL HA	PCL/HA: 60/40 wt %
52	FDM	PCL TCP	PCL/TCP: 80/20 wt%
53	FDM	PCL	PCL/HA: 75/25 wt %

*(Continues)*



TABLE I. Continued

Reference	Printing Method	Printed Materials	Polymer/Material Ratio
54	Mini-deposition system (MDS)	HA PLA	PLA/HA: 85/15 wt %
55	SLA	HA PTMC	n/a
56	FDM	HA PLA PEG nHA Dexamethasone	PLA/PEG/nHA: 90/8/2, 92/6/2, 94/4/2, 91/6/3, 93/6/1 wt % PLA/PEG/nHA/Dexamethasone: 89/6/2/3, 90/6/2/2, 91/6/2/1 wt %
57	LDM	PVA BCP PRF	n/a
58	FDM	PCL β-TCP HA	PCL/β-TCP: 90/10, 80/20 wt % PCL/HA: 90/10, 80/20 wt %
59	FDM	PCL β-TCP dECM	n/a
60	n/a	PCL β-TCP	PCL/β-TCP: 50/50 wt %
61	FDM	PCL TCP	PCL/TCP: 80/20 wt %
39	LDM	PLGA β-TCP Col I Apatite	PLGA/β-TCP: Col I coating Apatite deposition
62	FDM	PCL TCP CHA Gelatin	PCL/TCP: 80/20 wt % CHA + Gelatin coating
63	SLS	PLGA sHA	PLGA/HA: 95/5, 90/10, 75/25 vol %
64	FDM + electrospinning	PEG/PEOT/PBT CaP	CaP coating
65	FDM	PCL β-TCP	PCL/β-TCP: 100/0, 80/20, 60/40, 40/60 wt %
66	FDM	PCL β-TCP	PCL/β-TCP: 100/0, 90/10, 70/30 wt %
67	FDM	PLA β-TCP	PLA/β-TCP: 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 wt %
68	LDM	PLGA TCP Col I	PLGA/TCP: 2:1 wt % Col I coating
69	LDM	PLA TCP	PLA/TCP: 50/50 wt %

FDM: fused deposition modeling; LDM: low-temperature deposition modeling; SLS: selective laser sintering; SLA: stereolithography; mPolymer: medical grade polymer; PLA: polylactic acid; PLGA: poly(lactic-co-glycolic) acid; PCL: polycaprolactone; PEG: polyethylene glycol; PHBV: poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate); PPF: poly(propylene fumarate); PP: polypropylene; DEF: diethyl fumarate; PTMC: poly(trimethylene carbonate); PVA: polyvinyl alcohol; POET: polyoxyethylene terephthalate; PBT: polybutylene terephthalate; (n/s)HA: (nanoparticles of/sintered) hydroxyapatite; CHA: carbonated hydroxyapatite; BG: bioglass; TCP: tri-calcium phosphate; β-TCP: magnesium-substituted β-tricalcium phosphate; DCB: decellularized bone; SBM: synthetic bone mineral; BCP: biphasic calcium phosphate (rh)BMP2: (recombinant human) bone morphogenetic protein 2; Col I: collagen type I; dECM: bone decellularized extracellular matrix; PRF: platelet-rich fibrin.

using a binocular microscope, scanning electron microscopy (SEM) or micro-computed tomography (Micro-CT). It helped to assess print quality and porosity.

Chemical composition of the material was evaluated in 15 studies with different techniques. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used in five studies,<sup>18,19,62,64,66</sup> Raman spectroscopy in two studies,<sup>14,22</sup> X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was used in two studies,<sup>12,62</sup> and Carbon 13 nuclear

resonance (<sup>13</sup>C-NMR) in one study.<sup>34</sup> X-ray diffraction (XRD) was used in three studies<sup>12,18,26</sup> and was also used to collect information about crystallinity.<sup>12</sup> Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) was found in eight studies.<sup>12,23,24,27,59,64,66,70</sup> Kutikov et al. also used EDX to map elemental composition on surface.<sup>23</sup> Generally, several techniques were combined to evaluate chemical composition and to confirm the results obtained with each technique.

**TABLE II. Applications and Characterization of Material Developed**

References	Physicochemical Characterization	Biological Model
16	Mechanical properties: tensile and flexural tests Porosity test: absolute ethanol Microstructure observation: SEM <i>In vitro</i> aging: 2 months in PBS	<i>In vitro</i> : Primary Rat osteoblastic cells
17	n/a	<i>In vitro</i> : MC3T3-E1 (murine osteoblastic precursor)
18	Surface morphology: SEM Apatite deposition: Micro-CT/TGA Chemical composition and structure: XRD, FTIR Porosity: Equation Hydrophobicity: Water contact angle and water absorption Mechanical properties: Compression tests Porosity: Mass and volumes of the scaffold	<i>In vitro</i> : Rabbit BMSCs <i>In vivo</i> : Radius defect in rabbits
19	Surface morphology: SEM	<i>In vivo</i> : Femoral defect in rabbits
20	Chemical structure: FTIR Thermal properties: DSC Surface morphology: SEM Porosity: Equation and Micro-CT Mechanical properties: compression tests	<i>In vitro</i> : Rat BMSCs
21	Topography: Optical interferometry Hydrophobicity: Water contact angle Surface morphology: SEM Mechanical properties: Compression tests Topography: Optical interferometry Surface mechanical properties: AFM Hydrophobicity: Water contact angle <i>In vitro</i> aging: 8 weeks in PBS, DSC, SEM, Weight loss	n/a
22	Porosity: Equation Molecular content: Raman spectroscopy Roughness: AFM Mechanical properties: Compression tests	<i>In vitro</i> : hASCs <i>In vivo</i> : Calvaria defect in mice
8	Surface morphology: SEM Thermal properties: DSC Mechanical properties: compression tests	n/a
23	Chemical degradation: GPC Surface morphology: SEM Elemental composition: EDX Swelling behavior: Weight and volume Mechanical properties: Compression test	<i>In vitro</i> : NIH3T3 murine fibroblasts, rat BMSCs
24	Porosity: Equation Surface morphology: SEM Elemental composition: EDX TCP dispersion: Micro-CT Porosity: Immersion in ethanol (Archimedes principle) Mechanical properties: Compression test	<i>In vitro</i> : Porcine ASCs <i>In vivo</i> : Implantation in the gluteal muscle pockets of mice

*(Continues)*

TABLE II. Continued

References	Physicochemical Characterization	Biological Model
25	Hydrophobicity: Water contact angle and swelling ratios Surface morphology: SEM Scaffold morphology: Micro-CT Porosity: density kit (Archimedes principle)	<i>In vitro</i> : SaOS-2 (Human osteoblast-like cell line), C3H10T1/2 (murine pluripotent mesenchymal cell line)
26	Hydrophobicity: Water contact angle Surface morphology: SEM Chemical composition: XRD	n/a
27	Surface morphology: SEM Elemental composition: EDX Thermal properties: TGA Porosity: Micro-CT	<i>In vitro</i> : Rabbit BMSCs <i>In vivo</i> : Calvaria defect in rabbits
10	Thermal properties: DSC, TGA Viscosity Mechanical properties: Flexural strength and modulus of elasticity	n/a
28	Morphology of fracture surface: SEM <i>In vitro</i> aging: 6 weeks in NaOH or 60 months in PBS, weight loss evaluation Porosity: gas pycnometer Surface morphology: SEM Mechanical properties: Compression test Thermal properties: DSC	n/a
29	Chemical degradation: GPC Quantify mineral content: TGA & Micro-CT Surface morphology: SEM Porosity: density kit (Archimedes principle)	<i>In vitro</i> : SaOS-2
30	Mechanical properties: Compression test on dry and wet sample Mechanical properties: Compression test	n/a
31	Surface morphology: SEM Mechanical properties: Tensile test Thermal properties: DSC <i>In vitro</i> aging: 12 weeks in PBS, weight loss evaluation Chemical degradation: GPC	<i>In vitro</i> : hBMSCs
32	Hydrophobicity: Water contact angle Roughness: optical profilometer	n/a
33	n/a	<i>In vitro</i> : Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) <i>In vitro</i> : Human osteoprecursor cells (OPC1)
34	Thermal properties: DSC Chemical degradation: GPC Molar composition: Carbon-13 nuclear magnetic resonance Mechanical properties: Compression test	n/a
35	Morphology and structure: SEM, Micro-CT Porosity: Immersion in ethanol in gravity bottle (Archimedes principle) <i>In vitro</i> aging: 15 weeks in $\alpha$ -MEM, evaluation of weight loss and	<i>In vitro</i> : MC3T3-E1 <i>In vivo</i> : SAON model in rabbits followed by a femoral defect

(Continues)

TABLE II. Continued

References	Physicochemical Characterization	Biological Model
36	<p>volume change, mechanical properties, Lactic acid, Ca<sup>2+</sup>, and icariin release</p> <p>Porosity: Micro-CT</p> <p>Surface morphology: SEM</p> <p>Hydrophobicity: Water absorption</p> <p><i>In vitro</i> aging: 48 h in alkaline medium or NaOH, weight loss evaluation</p> <p>Mechanical properties: Compression and flexural test</p>	<i>In vivo</i> : Femoral defect in rabbits
37	n/a	<i>In vitro</i> : MC3T3-E1
38	n/a	<i>In vitro</i> : Porcine BMSCs
9	<p>Porosity: Immersion in ethanol (Archimedes principle)</p> <p>Mechanical properties: Compression test</p>	<p><i>In vivo</i>: Temporal defect in pigs</p> <p><i>In vitro</i>: MC3T3-E1</p> <p><i>In vivo</i>: Femoral defect in goats</p>
39	n/a	<i>In vivo</i> : Radius defect in rabbits
40	n/a	<i>In vitro</i> : hBMSCs
41	n/a	<i>In vivo</i> : Femoral defect in rats
12	<p>Hydrophobicity: Water contact angle</p> <p>Surface morphology: SEM</p> <p>Roughness: AFM</p> <p>Phase composition and crystallinity: XRD</p> <p>Elemental composition: X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)</p> <p>Elemental composition: EDX</p>	<p><i>In vivo</i>: Calvaria defects in goats</p> <p><i>In vitro</i>: MC3T3-E1</p>
13	<p>Morphology and distribution of the CaP: Micro-CT</p> <p><i>In vitro</i> aging: 18 days in NaOH, evaluation of mass loss, diameter change and GPC</p>	<i>In vitro</i> : hBMSCs
11	<p>Thermal properties: TGA, DSC</p> <p>Chemical degradation: GPC</p> <p>Mechanical properties: Compression test, Dynamic mechanical analysis (DMA)</p> <p>Aging: 21 days in simulated body fluid (SBF)</p>	n/a
14	<p>Thermal properties: DSC</p> <p>Print quality: ImageJ plugin Orientation J</p> <p>Mechanical properties: Compression test</p> <p>Molecular composition: Raman spectroscopy</p>	<i>In vitro</i> : hASCs
42	<p>Surface morphology: SEM</p> <p>Surface morphology: SEM</p> <p>Mechanical properties: Compression test</p>	<i>In vivo</i> : Calvaria defect in rabbits
43	<p>Surface morphology and porosity: Micro-CT</p> <p><i>In vitro</i> aging: 16 weeks in Milli-Q water, evaluation of mass loss, calcium release, mechanical properties</p>	<i>In vitro</i> : Rabbits BMSCs

(Continues)

TABLE II. Continued

References	Physicochemical Characterization	Biological Model
44	Porosity: Archimedes principle Mechanical properties: Compression test Surface morphology: SEM	<i>In vitro</i> : hBMSCs <i>In vivo</i> : Femoral defect in rabbits
45	n/a	<i>In vivo</i> : Tibial defect in sheeps
46	n/a	<i>In vivo</i> : Sternal defect on dogs
47	Morphology and structure: SEM, Micro-CT Hydrophobicity: Water contact angle	<i>In vivo</i> : Calvaria defect in rabbits
48	n/a	<i>In vitro</i> : Chondrocytes and BMSCs from goat <i>In vivo</i> : Subcutaneous implantation in mice
49	n/a	<i>In vitro</i> : Rat BMSCs <i>In vivo</i> : Calvaria defect in rats
50	Porosity: Calculation, apparent density method, volume method Mechanical properties: Compression test	n/a
51	Surface morphology: SEM	<i>In vitro</i> : Rabbit BMSCs
52	Surface morphology: SEM Porosity and morphology: Micro-CT Hydrophobicity: Water absorption Chemical degradation: GPC Mechanical properties: Compression test <i>In vitro</i> aging: 108 h in 3 M NaOH solution	n/a
53	Porosity: Measure and calculation Surface morphology: SEM Mechanical properties: Compression test	<i>In vitro</i> : Primary foetal bovine osteoblast cells
54	n/a	<i>In vivo</i> : Fix on saphenous arteriovenous in rabbits
55	Morphology and structure: SEM, Micro-CT Porosity: Micro-CT Hydrophobicity: Water contact angle and water absorption	<i>In vitro</i> : hBMSCs <i>In vivo</i> : Calvaria defect in rabbits
56	Thermal properties: TGA, DSC Hydrophobicity: Water contact angle Surface morphology: SEM <i>In vitro</i> aging: 6 weeks in PBS, evaluation of mechanical properties evaluation (Tensile test) and DSC	<i>In vitro</i> : MC3T3-E1 <i>In vivo</i> : Calvaria defect in rats
57	Surface morphology: SEM Hydrophobicity: Water contact angle Porosity: Micro-CT Roughness: Surface roughness tester Mechanical properties: Compression test	<i>In vitro</i> : Rabbit BMSCs <i>In vivo</i> : Radius bone defect in rabbit
58	Surface morphology: SEM Thermal properties: TGA Hydrophobicity: Water contact angle Mechanical properties: Compression test	<i>In vitro</i> : hADSCs
59	Surface morphology: SEM Chemical composition: EDX Hydrophobicity: Water absorption	<i>In vitro</i> : MC3T3-E1 <i>In vivo</i> : Calvaria defect in rabbits
60	n/a	<i>In vivo</i> : Mandibular defect in pigs

(Continues)

TABLE II. Continued

References	Physicochemical Characterization	Biological Model
61	n/a	<i>In vivo</i> : Mandibular defect in pigs
39	Surface morphology: SEM Chemical composition: EDX Hydrophobicity: Water absorption	<i>In vitro</i> : Rabbit BMSCs
62	Surface morphology: SEM Chemical structure: FTIR, XPS Hydrophobicity: Water contact angle Mechanical properties: Compression test	<i>In vitro</i> : Porcine BMSCs
63	Surface morphology: SEM Chemical degradation: GPC Mechanical properties: Compression test	n/a
64	Surface morphology: SEM Chemical structure: FTIR Chemical composition: EDX	<i>In vitro</i> : hMSCs
65	Quantify mineral content: TGA Hydrophobicity: Water contact angle Surface morphology: SEM Roughness: profilometer <i>In vitro</i> aging: 54 h in 5 M NaOH solution, evaluation of mass loss Porosity: Micro-CT Mechanical properties: Tensile and compression test	<i>In vitro</i> : C3H10T1/2
66	Surface morphology: SEM Chemical composition: EDX Crystallinity: FTIR Porosity: Liquid displacement method Mechanical properties: Compression test	<i>In vitro</i> : hMSCs
67	Mechanical properties: Tensile and compression test	<i>In vitro</i> : Porcine BMSCs
68	Surface morphology: SEM	<i>In vitro</i> : Rabbit BMSCs
69	Surface morphology: SEM Porosity: Liquid displacement method Mechanical properties: Compression test	<i>In vivo</i> : Radius defect in dogs

BTE: bone tissue engineering; (h)BMSCs: (human) bone marrow stromal cells; (h)ASCs: (human) adipose stem cells; SEM: scanning electron microscopy; Micro-CT: micro computed tomography; PBS: phosphate buffer saline; BMP2: bone morphogenetic protein 2; TGA: thermogravimetric analysis; DSC: differential scanning calorimetry; GPC: gel permeation chromatography; XRD: X-ray diffraction; AFM: atomic force microscopy; Micro-CT: micro computed tomography; FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy; EDX: energy-dispersive X-ray spectroscopy

Thermogravimetric analysis (TGA) was generally used to estimate mineral content or deposition.<sup>10,11,18,27,29,58,65</sup> In two studies, TGA was used to quantify coating proportion.<sup>18,27</sup> Wang et al. used TGA to optimize the apatite coating protocol of their material.<sup>18</sup> In four other studies, TGA helped to compare real mineral charge to the expected one.<sup>10,29,58,65</sup> Depending on the study, real mineral charge was inferior or superior to the expected charge. In three studies, TGA was used to evaluate variation of degradation temperature of the material, in order to assess thermal stability.<sup>11,56,58</sup> The degradation temperature was usually not impacted by inclusion of minerals in polymer, except in one study where bioglass was used.<sup>11</sup>

Gel permeation chromatography (GPC) was used to study molar mass modifications, which is correlated with potential chemical degradation.<sup>11,13,23,28,31,34,52,63</sup> This technique was

used in two cases: to evaluate the impact of processing on the material or to evaluate the changes during aging. In three studies, it was used to evaluate the impact of extrusion using

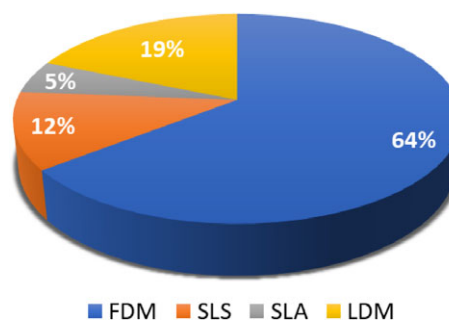


FIGURE 2. 3D printing technologies used for bone tissue engineering (in articles included).

FDM.<sup>11,23,34</sup> The extrusion always decreased the molar mass. Nevertheless, the impact seemed different depending on the polymer, on the polymer/mineral ratio or on the 3D printing method. In four studies GPC was used during aging studies.<sup>13,28,31,52</sup> Decreased molar mass was observed over time in two studies. A third study has shown that PCL-HA scaffold molar mass was stable during 18 days.<sup>13</sup> In all studies, a decrease of molar mass was noticed after inclusion of a mineral inside polymer.

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to assess thermal properties.<sup>8,10,11,14,20,21,28,31,34,56</sup> This technique was found only in studies using FDM, certainly to evaluate the heat impact on the polymer. DSC gives access to glass transition temperature ( $T_g$ ), melting temperature ( $T_m$ ), and also crystallinity of a material, but all parameters were not always investigated. In six studies they have looked for  $T_g$ <sup>10,11,14,20,21,56</sup> in five studies for  $T_m$ .<sup>10,11,14,31,34</sup> In all studies, mineral addition had no impact on  $T_g$  but had different impact on  $T_m$ . Damadzadeh et al. have shown a decrease of  $T_m$  with HA addition in PLGA but no significant decrease when HA was added in PLA.<sup>10</sup> Nevertheless, Simpson et al. have shown that HA addition in PLGA had no impact on  $T_m$ .<sup>11</sup> Material crystallinity was studied in seven studies.<sup>10,14,20,21,28,31,56</sup> Results were clearly different from one study to another.

Mechanical properties of the materials are some of the most important parameters to evaluate. Usually, these characteristics were evaluated by compression tests in 27 studies,<sup>8,9,11,14,18,20-24,29,30,34-36,42,43,52,53,57-59,63,65-67,69</sup> but also by tensile and flexural tests, in five<sup>11,16,56,65,67</sup> and three studies,<sup>10,16,36</sup> respectively. In one article, mechanical properties were studied by atomic force microscopy (AFM).<sup>21</sup> Mechanical properties can be used to determine optimal mineral charge<sup>16,58,65</sup> but also to study impact of porosity,<sup>14,22,36,53,65</sup> structure,<sup>20,34</sup> used mineral<sup>10,11,14,58</sup> or polymer,<sup>10,50</sup> mineral particles size,<sup>10</sup> and aging.<sup>28,29,35,43,52,56</sup> The most studied mechanical parameters were compressive modulus and strength. These parameters were found in 23 studies. Other mechanical parameters were studied like tensile strength, Young modulus, flexural modulus, flexural strength, bending strength, elastic modulus, yield strength, stiffness, maximum stress. These parameters were present in few studies making comparisons difficult. Results have shown that mineral inclusion generally increased these compressive parameters, except in two cases.<sup>11,22</sup> Hung et al. have observed a decrease of compressive modulus with 70% of DCB included in PCL. No impact was observed with 30% of DCB.<sup>22</sup> Mechanical properties could also be affected by mineral or polymer. Nyberg et al. have shown that inclusion of HA in PCL lead to higher compressive modulus than TCP or DCB.<sup>14</sup> Simpson et al. have shown that depending on the bioglass type included in PLGA (45S5 or ICIE4) the compressive strength was significantly modified.<sup>11</sup> In four studies, it was shown that increasing porosity lead to a decrease of compressive modulus.<sup>14,22,36,53</sup> During degradation studies, a decrease of compressive properties was always observed.<sup>28,29,35,43,52</sup>

Some groups evaluated surface characteristics of scaffolds. In three studies, they only quantified scaffold roughness by

AFM<sup>12,22</sup> or profilometer.<sup>31,65</sup> Serra et al. used optical interferometry<sup>20,21</sup> to evaluate the topography with different parameters such as surface roughness. Here again different parameters were used to evaluate roughness: root-mean-square roughness (Rq or RMS), average roughness (Ra or Sa), skewness, asymmetry of the surface around the mean plane (Ssk) and kurtosis, peakedness of the surface around the mean plane (Sku). Ra was measured in four studies, Rq in two studies, Ssk and Sku were studied in one study. Mineral inclusion had different effects on Ra and Rq in these experiments. Serra et al. studied Ssk and Sku and observed a decrease of these parameters when bioglass was added in PLA or PLA/PEG material.<sup>20</sup>

Different techniques can assess the hydrophilicity of a material. In 14 studies, the evaluation of the water contact angle was used.<sup>12,18,20,21,24,25,31,47,55-58,62</sup> In eight studies, evaluation of swelling ratio or water absorbability was done.<sup>18,23,24,36,52,55,59,70</sup> The hydrophilic behavior of a material can be improved with the inclusion of a mineral. Usually inclusion of a mineral in polymer matrix increased hydrophilicity of the material, except in two studies.<sup>24,65</sup> Liao et al. has showed that TCP inclusion in PCL decrease swelling ratio.<sup>24</sup>

***In vitro and in vivo studies.*** An *in vitro* characterization of the scaffolds was performed in 39 articles. A large variety of cells (Table II) was used from different sources: human,<sup>13,14,22,25,29,31-33,40,44,55,58,64,71</sup> mouse,<sup>9,12,17,23,25,35,37,56,65</sup> rabbit,<sup>18,27,43,51,57,68,70</sup> rat,<sup>16,20,23,49</sup> pig,<sup>24,38,67</sup> goat,<sup>48</sup> and bovine.<sup>53</sup> Conventional *in vitro* tests were usually performed to assess biocompatibility and osteogenic potential. *In vitro* cell biocompatibility of scaffolds was assessed by studying cell attachment, viability and proliferation. Cell attachment was evaluated in nine studies: in four studies, the combination of polymer with mineral increased cell attachment.<sup>16,22-24</sup> In one study, inclusion of bioglass in PLA/PEG had no impact on cell attachment.<sup>20</sup> In three studies, no control experiment was performed using scaffold with polymer alone.<sup>17,43,49</sup> In another study, TCP was combined with collagen so it was not possible to conclude if cell attachment behavior was due to mineral or collagen.<sup>18</sup> Cell viability was evaluated in 12 studies. Only three studies have shown enhanced cell viability with mineral inclusion,<sup>12,23,24</sup> and in one study the viability was increased after the inclusion of mineral combined with a mineral coating.<sup>62</sup> Four studies showed no significant differences of cell viability<sup>29,38,58,66</sup> and in four studies, no control was used.<sup>18,56,57,67</sup> In 31 studies, cell proliferation was evaluated, in 11 studies, proliferation increased with the addition of mineral<sup>9,14,16,25,32,37,44,55,58,59,65</sup> and in seven studies no significant differences were observed.<sup>12,29,31,38,53,64,66</sup> However, in 12 studies, no control was used to show that mineral inclusion led to increased cell proliferation. Arafat et al. have shown that TCP inclusion did not increase cell proliferation, but using a carbonated HA cell proliferation was higher.<sup>62</sup> It was difficult to compare all the results because several studies did not use a control made of a non-loaded polymer.

Osteogenic potential was assessed *in vitro* in 29 studies using alkaline phosphatase (ALP) activity, quantification of mineralization and quantification of osteogenic markers genes

expression. Here again, the results were hardly comparable, because in 11 studies no control samples were used.<sup>13,25,28,35,40,43,44,49,51,56,57,70</sup> In three studies, the results were not significant.<sup>31,38,66</sup> In general, the inclusion of minerals into the polymers led to higher ALP activity, increased mineralization and enhanced expression of osteoblastic genes markers.

An *in vivo* characterization was done in 27 studies with different animal models described in Table II. For *in vivo* studies, rabbit was the most used animal, with a femoral defect,<sup>19,35,36,44</sup> but also calvaria defect,<sup>27,42,47,55</sup> radius defect,<sup>18,39,57</sup> and once for subcutaneous implantation.<sup>68</sup> Mice were used in three studies, for a calvaria bone defect,<sup>22</sup> for a subcutaneous implantation,<sup>48</sup> or for an implantation in gluteal muscle.<sup>24</sup> Rats were used in three studies with a calvaria defect<sup>49,56</sup> or a femoral defect.<sup>40</sup> Pig was used in three studies, with a mandibular defect<sup>60,61</sup> or a temporal defect.<sup>38</sup> Goat were used in two publications, with a femoral defect<sup>9</sup> and once with a calvaria defect.<sup>41</sup> Dog was used with a sternal defect in one study<sup>46</sup> and with a radius defect in another study.<sup>69</sup> Sheep was used with a tibia defect.<sup>45</sup> Femoral defect and calvaria defect were the most frequently used. In the different cases the objective was to study bone regeneration by evaluating quantity and quality of newly formed tissue.

Similarly to *in vitro* results, it was difficult to conclude whether the results were obtained due to composite material. Indeed, several studies did not use the polymer alone as a control. Moreover, several studies with bone defect did not include empty defect control to evaluate scaffold properties. In seven studies, composite materials were compared using an empty defect as control and composite scaffold samples always showed better results.<sup>9,18,22,24,44,55,59</sup> In one study, they compared defects filled with polymer or composite scaffold and the mineralization was enhanced with composite scaffold.<sup>38</sup>

## DISCUSSION

The emergence of new methods for scaffold fabrication by additive manufacturing requires the development of new biomaterials adapted to 3D printing. The biological properties of polymers commonly used for 3D printing are not always adapted for bone tissue engineering applications. Several groups have recently developed different composite materials made of polymer and minerals to improve scaffold properties. Many different 3D printing technologies and composite materials were employed and the biological properties were usually improved compared to polymer alone.

### 3D printing technologies

This review showed that four different main 3D printing technologies were used to fabricate scaffolds for bone tissue engineering and the most frequent was FDM. FDM is widely used in bone tissue engineering, because of its easy use and low cost. FDM enables the creation of controlled and regular structure.<sup>21,72</sup> It allows to control porosity of printed material, an important parameter for efficient cell seeding<sup>32,73,74</sup> or biomolecules loading.<sup>75</sup> Scaffold porosity is important

because it impacts cell penetration, fluid flow and vascularization: these properties are essential for the bio-integration of the biomaterial. One limitation of FDM is the potential thermal degradation of the polymer during scaffold fabrication due to high temperatures used for printing.

LDM is another 3D printing extrusion technique and the material bioactivity might be preserved by using a low temperature for printing. The use of low temperature requires the use of a liquid material, so usually polymers must be mixed with solvents.<sup>76</sup> A lyophilization/drying step is necessary to remove the solvent.<sup>76</sup> This technique allows a precise control of pore size and porosity.

SLA offers the possibilities of multi-material fabrication.<sup>77</sup> This technique possesses a high resolution, it is possible to design complex structures from submicron size to decimeter size. The limited number of commercially available biocompatible resins is the main limitation of the technique.<sup>78</sup> Manufacturing of polymer-ceramic composite scaffold using SLA is difficult because the viscosity of the resin can significantly increase after addition of the powder.<sup>78</sup> However, ceramic contents in resin have been reported up to 53 wt %.<sup>79</sup>

With SLS, small particles are fused together using a high-power laser. This technology requires an appropriate particle size and should have a good flowability for spreading on the powder bed of the machine.<sup>26,63</sup> Using SLS for scaffold fabrication, the pores size depends on the powder particle size and the compaction pressure applied onto the powder bed while depositing the powder layers. Plus, this technique involves high processing temperatures, so the use of thermally stable polymers is required.<sup>78</sup>

### Materials used for scaffold fabrication

**Polymers.** PCL is a thermoplastic polymer with excellent biocompatibility.<sup>73,80</sup> Its melting point is low (Figure 3) and its decomposition point is high (350°C), making it an ideal thermoplastic material for hot extrusion techniques.<sup>72</sup> *In vivo* degradation of PCL is slow, so it is attractive for long-life implants manufacture or control delivery systems design.<sup>5</sup> It is completely resorbed after 2 years.<sup>4</sup> Its mechanical properties are suitable for bone and cartilage repair.<sup>73</sup> The main limitation of PCL is the acidic products released during degradation, which can lead to low cell proliferation. Xu et al. have discussed the positive role of HA to reduce acidity in the environment thanks to its weak alkaline nature.<sup>9</sup>

PLA is a clear thermoplastic polymer used to manufacture bone tissue engineering scaffolds due to its high elastic modulus. However, there are some limitations due to its hydrophobicity that can inhibit cell adhesion and tissue regeneration, and it was observed that the degradation products are cytotoxic because of their acidity.<sup>81</sup> Huang et al.<sup>16</sup> have proposed that the addition of HA could reduce the acidity created by degradation products of PLA. However, it possesses a high melting point (Figure 3) and its degradation is longer than other usual polymers.<sup>4</sup>

PLGA is used in numerous bone tissue engineering applications because its degradation rate and mechanical properties are suitable for this application. PLGA is a biodegradable



	PCL	PLGA	PLA
Glass transition temperature (°C)	-60	45-50	162-167
Melting temperature (°C)	>60	>120	>160
Molecular Weight (g.mol-1)	65 000	50 000-75 000	10 000
Degradation time	<2years	<6months	>3years

**FIGURE 3.** Properties of polymers used in bone tissue engineering for 3D printing (According to Ref. <sup>19</sup>).

polymer with properties close to PLA. PLGA is a hydrophobic polymer and its degradation products are not toxic per se but they can release acidic products and induce a local inflammation, in a similar way than PLA. Moreover, its high melting point complicates the printing process (Figure 3). But these disadvantages can be counterbalanced by mixing polymer with other materials, like bioceramics, to improve bioactivity and biocompatibility.

**Minerals.** In general, we have observed that the amount of included mineral phase did not exceed 40% of its weight. A high ratio of mineral content could lead to a reduced printability of the materials.<sup>14</sup> With FDM techniques, clogging can occur inside the printing heads for the composite polymers loaded with an important ratio of mineral. Moreover, a higher printing temperature is usually required to print these materials.<sup>14</sup> The mineral phase was usually directly included in polymer matrix, but a coating can also be added after printing the scaffold. However, this coating can reduce the pore size of the final scaffold.

TCP is one of the most used bioceramic for bone tissue regeneration applications because of its high biodegradability and biocompatibility.<sup>82</sup> Its dissolution releases calcium ions, which support osteogenic differentiation.<sup>40</sup> Moreover, the literature reveals that  $\beta$ -TCP-based materials possess mechanical properties close to trabecular bone.<sup>82</sup>

HA is also widely used to prepare polymer composites, especially because its mineral structure is closed to human bone.<sup>83</sup> It is usually mixed with others compounds to modify its degradation rate and bioactivity. It is a biocompatible and osteoconductive material. Damadzadeh et al.<sup>10</sup> have shown that the amount and size of HA nanoparticles can impact the properties of the polymer-HA material. Nevertheless, its effect depends on the material. Per example, increased hydroxyapatite concentration led to reduced melting temperature of PLGA but had no impact on PLA melting temperature.<sup>10</sup> For both materials quantity and size of particles impacted mechanical properties: larger size and higher concentration of particles led to a stiffer and more elastic material.<sup>10</sup>

DCB was used in two studies in combination with a polymer.<sup>14,22</sup> Hung et al. have shown that its incorporation into a polymer matrix can increase material roughness.<sup>22</sup> However its incorporation reduced printing quality and the printing temperature should be increased.<sup>14,22</sup> Nyberg et al.<sup>14</sup> showed that DCB can increase the osteoinductive properties of the final product, compared to hydroxyapatite or  $\beta$ -TCP. They

hypothesized that collagen remnants in the material could stimulate osteoinduction.

In some studies, bioglasses were used in combination with polymers to fabricate scaffolds. Bioglasses are osteoconductive materials and they can release  $\text{Si}^{4+}$  ions to activate osteogenesis of cells. Incorporation of bioglasses in polymer filaments can impact 3D printing by changing polymer viscosity, leading to increased printing temperature.<sup>34</sup> Korpela et al.<sup>34</sup> showed that bioglasses addition in a PCL filament increased its viscosity and reduced cohesion between scaffold layers in comparison to a PCL scaffold. In general, literature has shown that bioglasses addition led to increasing scaffold stiffness.<sup>11,21,34</sup> Serra et al. have observed that bioglasses incorporation increased material roughness.<sup>20,21</sup>

### Characterization and scaffolds properties

**Physicochemical characterization methods.** In the case of bone tissue engineering applications, one of the expected qualities is the biodegradability of the material. The degradation rate of the material must match the pace of new tissue formation without inhibition. The degradation can be evaluated by studying mass loss, volume change and/or structural changes. Material composition affects the degradation time and the degradation rate of a scaffold. For example, lactic acid polymers release acidic products, which decreases local pH leading to an increased hydrolysis of the polymer. One study has shown that the inclusion of HA can counterbalance the acidity.<sup>9</sup>

Scaffold inner structure has an impact on rigidity<sup>34,72,84</sup> and also on the degradation rate.<sup>19</sup> Kim et al. have observed that a complex architecture, with varying deposition angles of the molten composite can modify the degradation time.<sup>19</sup> The porosity has also an impact, and a higher porosity reduces the mechanical resistance of a material.<sup>9,22,34</sup> Naghieh et al.<sup>84</sup> showed that the struts diameter of a PLA scaffold impacted the mechanical resistance: a thicker diameter led to higher resistance. This can be explained because increased struts diameter reduces pore size. The same authors showed that the strongest materials were obtained by reducing the diameter and increasing the number of struts.

Scaffolds should possess homogeneously distributed, interconnected pores and should display a high porosity in order to ensure cell penetration, vascular ingrowth and nutrient diffusion. Different techniques can evaluate the porosity of the scaffolds: micro-CT, Brunauer–Emmett–Teller theory, mercury porosimetry. Specific equations can be used

to estimate this porosity. This parameter influences cell colonization. Pore size between 300 and 500  $\mu\text{m}$  are required for cell penetration in the biomaterial used in bone tissue engineering.<sup>1</sup> The porosity also affects mechanical properties and degradation rate of the material.

Mechanical properties of scaffolds are essential for load-bearing clinical applications. Depending of the final application, a scaffold should meet mechanical properties of the target tissue. Biomaterial composition and polymer/mineral ratio have an important effect on mechanical properties of the final scaffold. In general, the inclusion of HA or TCP lead to increased compressive modulus of the material.<sup>10,24,44,48</sup> Damadzadeh et al. showed a concentration effect on mechanical properties: an increase in mineral concentration lead to a decrease of flexural strength but slightly increases elastic modulus.<sup>10</sup> However, it is difficult to compare mechanical properties between different materials in different studies because the shape of the materials and the measured parameters can vary. Moreover, mechanical properties may change with the degradation of material.

The inclusion of mineral phase generally increases roughness and this parameter can impact hydrophilicity. These surface parameters are important for cell adhesion and proliferation. However, it is not usually studied probably because of the lack of comparability. In three different articles, it was observed that the addition of mineral phases with the polymer increased the roughness of the final scaffold,<sup>12,13,28</sup> contributing to cell adhesion.

***In vitro and in vivo studies.*** An important prerequisite of any biomaterial designed for tissue regeneration is its biocompatibility and non-toxicity. In addition, even degradation products should be non-toxic and able to be excreted with negligible effect on the organism. The material should provide a structural support for cells which must adhere, function normally and proliferate.

Cells used for *in vitro* bone tissue studies were either cell lines or primary cells isolated from humans or preclinical models. The use of composite material did not always show a significant increase in cell adhesion, proliferation and viability. However, composite scaffolds never lead to a decrease of these three parameters and usually we have observed an improvement in presence of ceramics. These observations support their biocompatibility.

The scaffold should be bioactive and should stimulate osteogenesis. Observations tend to support that composite scaffolds have an osteopromotive effect. The follow-up of cell differentiation *in vitro* can give an idea about bone regenerative potential, but *in vivo* characterization is more reliable.

Different animal models are used to evaluate a material. One study performed subcutaneous implantation and another study performed a gluteal muscle implantation, but most of them used a bone defect model. In both cases, the bone regenerative potential of the material was assessed. The literature review showed that femoral defect<sup>9,19,35,36,40,44</sup> and calvaria defect<sup>22,27,41,42,47,49,55,56,59</sup> were used in most of the studies. We have also identified other models like osteoperiosteal defect, radius defect, tibial defect, temporal defect, and a

sternal defect. Composite scaffolds clearly showed their value-added in bone regeneration when compared to polymer scaffolds alone. Most of the studies have shown better osteointegration, but also enhanced bone formation using polymer-mineral composite scaffolds.

## CONCLUSION

Nowadays, 3D printing technologies are increasingly used to fabricate scaffolds having a specific 3D architecture and suitable mechanical properties to support bone formation. These technologies can be used to produce custom-based biomaterials for clinical applications.<sup>85</sup> Several 3D printing methods exist but FDM is used most frequently. Also, several polymers can be used for printing, and they are frequently combined with a mineral material to enhance the osteopromotive properties of the scaffolds. Even if it was difficult to compare the properties of the materials because a large variety of composition and methods exist, the addition of a mineral to the polymer allows to print scaffold with specific shape and porosities and to enhance the biological properties of the material. Current challenges are to tune the most adequate balance between the 3D printing method employed and composite materials to optimize their properties. More studies are needed to evaluate the real biological benefits of adding minerals into polymer for bone integration.

## REFERENCES

1. Thavornnyutikarn B, Chantarapanich N, Sittthiseripratip K, Thous GA, Chen Q. Bone tissue engineering scaffolding: Computer-aided scaffolding techniques. *Prog Biomater* 2014;3(2-4):61-102.
2. Bajaj P, Schweller RM, Khademhosseini A, West JL, Bashir R. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng* 2014;16:247-276.
3. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials* 2010;31(24):6121-6130.
4. Kim BS, Jang J, Chae S, Gao G, Kong J-S, Ahn M, Cho D-W. Three-dimensional bioprinting of cell-laden constructs with polycaprolactone protective layers for using various thermoplastic polymers. *Biofabrication* 2016;8(3):035013.
5. Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater Today* 2004;7(5):30-40.
6. Shrivats AR, McDermott MC, Hollinger JO. Bone tissue engineering: State of the union. *Drug Discov Today* 2014;19(6):781-786.
7. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 2010;31(7):1465-1485.
8. Senatov FS, Niaza KV, Zadorozhnyy MY, Maksimkin AV, Kaloshkin SD, Estrin YZ. Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016;57:139-148.
9. Xu N, Ye X, Wei D, Zhong J, Chen Y, Xu G, He D. 3D artificial bones for bone repair prepared by computed tomography-guided fused deposition modeling for bone repair. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014;6(17):14952-14963.
10. Damadzadeh B, Jabari H, Skrifvars M, Airola K, Moritz N, Vallittu PK. Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-L-lactic acid and poly-L-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21(9):2523-2531.
11. Simpson RL, Nazhat SN, Blaker JJ, Bismarck A, Hill R, Boccaccini AR, Hansen UN, Amis AA. A comparative study of the effects of different bioactive fillers in PLGA matrix composites and their suitability as bone substitute materials: A thermo-mechanical and *in vitro* investigation. *J Mech Behav Biomed Mater* 2015;50:277-289.
12. Roh H-S, Jung S-C, Kook M-S, Kim B-H. *In vitro* study of 3D PLGA/n-HAP/ $\beta$ -TCP composite scaffolds with etched oxygen plasma

- surface modification in bone tissue engineering. *Appl Surface Sci* 2016;388:321–330.
13. Schantz J-T, Brandwood A, Huttmacher DW, Khor HL, Bittner K. Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymer-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition modeling. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16(9): 807–819.
  14. Nyberg E, Rindone A, Dorafshar A, Grayson WL. Comparison of 3D-printed poly- $\epsilon$ -caprolactone scaffolds functionalized with tricalcium phosphate, hydroxyapatite, bio-oss, or decellularized bone matrix. *Tissue Eng A* 2016;23:503–514.
  15. Waltman L, van Eck NJ, Noyons ECM. A unified approach to mapping and clustering of bibliometric networks. *J Informet* 2010;4(4): 629–635.
  16. Huang J, Xiong J, Liu J, Zhu W, Chen J, Duan L, Zhang J, Wang D. Evaluation of the novel three-dimensional porous poly (L-lactic acid)/nano-hydroxyapatite composite scaffold. *Biomed Mater Eng* 2015;26(Suppl 1):S197–S205.
  17. Ma R, Lai Y, Li L, Tan H, Wang J, Li Y, Tang T, Qin L. Bacterial inhibition potential of 3D rapid-prototyped magnesium-based porous composite scaffolds—an *in vitro* efficacy study. *Sci Rep* 2015;5:13775.
  18. Wang J, Wu D, Zhang Z, Li J, Shen Y, Wang Z, Li Y, Zhang Z-Y, Sun J. Biomimetically ornamented rapid prototyping fabrication of an apatite–collagen–Polycaprolactone composite construct with Nano–micro–macro hierarchical structure for large bone defect treatment. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7(47):26244–26256.
  19. Kim J, McBride S, Tellis B, Alvarez-Urena P, Song Y-H, Dean DD, Sylvia VL, Elgandy H, Ong J, Hollinger JO. Rapid-prototyped PLGA/ $\beta$ -TCP/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds in a rabbit femoral defect model. *Biofabrication* 2012;4(2):025003.
  20. Serra T, Planell JA, Navarro M. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. *Acta Biomater* 2013;9(3): 5521–5530.
  21. Serra T, Ortiz-Hernandez M, Engel E, Planell JA, Navarro M. Relevance of PEG in PLA-based blends for tissue engineering 3D-printed scaffolds. *Mater Sci Eng C* 2014;38:55–62.
  22. Hung BP, Naved BA, Nyberg EL, Dias M, Holmes CA, Elisseeff JH, Dorafshar AH, Grayson WL. Three-dimensional printing of bone extracellular matrix for craniofacial regeneration. *ACS Biomater Sci Eng* 2016;2(10):1806–1816.
  23. Kutikov AB, Gurijala A, Song J. Rapid prototyping amphiphilic polymer/hydroxyapatite composite scaffolds with hydration-induced self-fixation behavior. *Tissue Eng C Methods* 2014;21(3): 229–241.
  24. Liao H-T, Lee M-Y, Wen-Wei T, Wang H-C, Lu W-C. Osteogenesis of adipose-derived stem cells on polycaprolactone- $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold fabricated via selective laser sintering and surface coating with collagen type I. *J Tissue Eng Regen Med* 2013;10(10): E337–E353.
  25. Duan B, Wang M. Customized ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: Design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor. *J R Soc Interface* 2010; 7(Suppl 5):S615–S629.
  26. Chua CK, Leong KF, Tan KH, Wiria FE, Cheah CM. Development of tissue scaffolds using selective laser sintering of polyvinyl alcohol/hydroxyapatite biocomposite for craniofacial and joint defects. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15(10):1113–1121.
  27. Dadsetan M, Guda T, Runge MB, Mijares D, LeGeros RZ, LeGeros JP, Silliman DT, Lu L, Wenke JC, Brown Baer PR, Yaszemski MJ. Effect of calcium phosphate coating and rhBMP-2 on bone regeneration in rabbit calvaria using poly(propylene fumarate) scaffolds. *Acta Biomater* 2015;18:9–20.
  28. Lam CXF, Savalani MM, Teoh S-H, Huttmacher DW. Dynamics of *in vitro* polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: Accelerated versus simulated physiological conditions. *Biomed Mater* 2008;3(3):034108.
  29. Duan B, Wang M, Zhou WY, Cheung WL, Li ZY, Lu WW. Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2010;6(12): 4495–4505.
  30. Duan B, Cheung WL, Wang M. Optimized fabrication of Ca–P/PHBV nanocomposite scaffolds via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Biofabrication* 2011;3(1):015001.
  31. Idaszek J, Bruinink A, Świąszkowski W. Ternary composite scaffolds with tailorable degradation rate and highly improved colonization by human bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103(7):2394–2404.
  32. Jensen J, Kraft DCE, Lysdahl H, Foldager CB, Chen M, Kristiansen AA, Røifing JHD, Bünger CE. Functionalization of Polycaprolactone scaffolds with hyaluronic acid and  $\beta$ -TCP facilitates migration and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro*. *Tissue Eng A* 2015;21(3–4):729–739.
  33. Kalita SJ, Bose S, Hosick HL, Bandyopadhyay A. Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling. *Mater Sci Eng C* 2003;23(5):611–620.
  34. Korpela J, Kokkari A, Korhonen H, Malin M, Närhi T, Seppälä J. Biodegradable and bioactive porous scaffold structures prepared using fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013;101B(4):610–619.
  35. Lai Y, Cao H, Wang X, Chen S, Zhang M, Wang N, Yao Z, Dai Y, Xie X, Zhang P, Yao X, Qin L. Porous composite scaffold incorporating osteogenic phytomolecule icariin for promoting skeletal regeneration in challenging osteonecrotic bone in rabbits. *Biomaterials* 2018;153:1–13.
  36. Kawai T, Shanjani Y, Fazeli S, Behn AW, Okuzu Y, Goodman SB, Yang YP. Customized, degradable, functionally graded scaffold for potential treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Res* 2017;36(3):1002–1011.
  37. Lee JW, Ahn G, Kim DS, Cho D-W. Development of nano- and microscale composite 3D scaffolds using PPF/DEF-HA and microstereolithography. *Microelectron Eng* 2009;86(4):1465–1467.
  38. Liao H-T, Chen Y-Y, Lai Y-T, Hsieh M-F, Jiang C-P. The osteogenesis of bone marrow stem cells on mPEG-PCL-mPEG/hydroxyapatite composite scaffold via solid freeform fabrication. *BioMed Res Int* 2014; 2014:1–13.
  39. Pang L, Hao W, Jiang M, Huang J, Yan Y, Hu Y. Bony defect repair in rabbit using hybrid rapid prototyping polylactic-co-glycolic acid/ $\beta$ -tricalciumphosphate collagen I/apatite scaffold and bone marrow mesenchymal stem cells. *Indian J Orthopaed* 2013;47(4):388–394.
  40. Rai B, Lin JL, Lim ZXH, Guldberg RE, Huttmacher DW, Cool SM. Differences between *in vitro* viability and differentiation and *in vivo* bone-forming efficacy of human mesenchymal stem cells cultured on PCL–TCP scaffolds. *Biomaterials* 2010;31(31):7960–7970.
  41. Yu D, Li Q, Mu X, Chang T, Xiong Z. Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low-temperature rapid-prototyping technology. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37(10):929–934.
  42. Yeo A, Wong WJ, Teoh S-H. Surface modification of PCL–TCP scaffolds in rabbit calvaria defects: Evaluation of scaffold degradation profile, biomechanical properties and bone healing patterns. *J Biomed Mater Res A* 2010;93A(4):1358–1367.
  43. Chen S-H, Wang X-L, Xie X-H, Zheng L-Z, Yao D, Wang D-P, Leng Y, Zhang G, Qin L. Comparative study of osteogenic potential of a composite scaffold incorporating either endogenous bone morphogenetic protein-2 or exogenous phytomolecule icariin: An *in vitro* efficacy study. *Acta Biomater* 2012;8(8):3128–3137.
  44. Xia Y, Zhou P, Cheng X, Xie Y, Liang C, Li C, Xu S. Selective laser sintering fabrication of nano-hydroxyapatite/poly- $\epsilon$ -caprolactone scaffolds for bone tissue engineering applications. *Int J Nanomed* 2013;8:4197–4213.
  45. Reichert JC, Cipitria A, Epari DR, Saifzadeh S, Krishnakanth P, Berner A, Woodruff MA, Schell H, Mehta M, Schuetz MA, Duda GN, Huttmacher DW. A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones. *Sci Transl Med* 2012;4(141):141ra93–141ra93.
  46. Xuan Y, Tang H, Wu B, Ding X, Lu Z, Li W, Xu Z. A specific groove design for individualized healing in a canine partial sternal defect model by a polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold coated with bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* 2014;102(10):3401–3408.
  47. Yeo A, Wong WJ, Khoo HH, Teoh SH. Surface modification of PCL–TCP scaffolds improve interfacial mechanical interlock and enhance early bone formation: An *in vitro* and *in vivo* characterization. *J Biomed Mater Res A* 2010;92A(1):311–321.
  48. Ding C, Qiao Z, Jiang W, Li H, Wei J, Zhou G, Dai K. Regeneration of a goat femoral head using a tissue-specific, biphasic scaffold fabricated with CAD/CAM technology. *Biomaterials* 2013;34(28):6706–6716.

49. Zhang H, Mao X, Du Z, Jiang W, Han X, Zhao D, Han D, Li Q. Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *Sci Technol Adv Mater* 2016;17(1):136–148.
50. Liu L, Xiong Z, Yan Y, Hu Y, Zhang R, Wang S. Porous morphology, porosity, mechanical properties of poly( $\alpha$ -hydroxy acid)-tricalcium phosphate composite scaffolds fabricated by low-temperature deposition. *J Biomed Mater Res A* 2007;82A(3):618–629.
51. Zheng P, Yao Q, Mao F, Liu N, Xu Y, Wei B, Wang L. Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 3D printed poly- $\epsilon$ -caprolactone/hydroxyapatite scaffolds combined with bone marrow clots. *Mol Med Rep* 2017;16(4):5078–5084.
52. Yeo A, Sju E, Rai B, Teoh SH. Customizing the degradation and load-bearing profile of 3D polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds under enzymatic and hydrolytic conditions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;87B(2):562–569.
53. Shor L, Güçeri S, Wen X, Gandhi M, Sun W. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials* 2007;28(35):5291–5297.
54. Zhang H, Mao X, Zhao D, Jiang W, Du Z, Li Q, Jiang C, Han D. Three dimensional printed polylactic acid-hydroxyapatite composite scaffolds for prefabricating vascularized tissue engineered bone: An in vivo bioreactor model. *Sci Rep* 2017;7(1):15255.
55. Guillaume O, Geven MA, Sprecher CM, Stadelmann VA, Grijpma DW, Tang TT, Qin L, Lai Y, Alini M, de Bruijn JD, Yuan H, Richards RG, Eglin D. Surface-enrichment with hydroxyapatite nanoparticles in stereolithography-fabricated composite polymer scaffolds promotes bone repair. *Acta Biomater* 2017;54:386–398.
56. Li X, Wang Y, Wang Z, Qi Y, Li L, Zhang P, Chen X, Huang Y. Composite PLA/PEG/nHA/dexamethasone scaffold prepared by 3D printing for bone regeneration. *Macromol Biosci* 2018;18(6):1800068.
57. Song Y, Lin K, He S, Wang C, Zhang S, Li D, Wang J, Cao T, Bi L, Pei G. Nano-biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol composites with enhanced bioactivity for bone repair via low-temperature three-dimensional printing and loading with platelet-rich fibrin. *Int J Nanomed* 2018;13:505–523.
58. Huang B, Caetano G, Vyas C, Blaker JJ, Diver C, Bártolo P. Polymer-ceramic composite scaffolds: The effect of hydroxyapatite and  $\beta$ -tri-calcium phosphate. *Materials* 2018;11(1):1–13.
59. Kim J-Y, Ahn G, Kim C, Lee J-S, Lee I-G, An S-H, Yun W-S, Kim S-Y, Shim J-H. Synergistic effects of Beta tri-calcium phosphate and porcine-derived Decellularized bone extracellular matrix in 3D-printed Polycaprolactone scaffold on bone regeneration. *Macromol Biosci* 2018;18(6):1800025.
60. Konopnicki S, Sharaf B, Resnick C, Patenaude A, Pogal-Sussman T, Hwang K-G, Abukawa H, Troulis MJ. Tissue-engineered bone with 3-dimensionally printed  $\beta$ -tricalcium phosphate and polycaprolactone scaffolds and early implantation: An in vivo pilot study in a porcine mandible model. *J Oral Maxillofac Surg* 2015;73(5):1016.e1–1016.e11.
61. Yeo A, Cheok C, Teoh SH, Zhang ZY, Buser D, Bosshardt DD. Lateral ridge augmentation using a PCL-TCP scaffold in a clinically relevant but challenging micropig model. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(12):1322–1332.
62. Arafat MT, Lam CXF, Ekaputra AK, Wong SY, Li X, Gibson I. Biomimetic composite coating on rapid prototyped scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2011;7(2):809–820.
63. Simpson RL, Wiria FE, Amis AA, Chua CK, Leong KF, Hansen UN, Chandrasekaran M, Lee MW. Development of a 95/5 poly(L-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold as bone replacement material via selective laser sintering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;84B(1):17–25.
64. Nandakumar A, Barradas A, de Boer J, Moroni L, van Blitterswijk C, Habibovic P. Combining technologies to create bioactive hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomater* 2013;3(2):e23705-1–e23705-13.
65. Bruyas A, Lou F, Stahl AM, Gardner M, Maloney W, Goodman S, Yang YP. Systematic characterization of 3D-printed PCL/ $\beta$ -TCP scaffolds for biomedical devices and bone tissue engineering: Influence of composition and porosity. *J Mater Res* 2018;33:1–12.
66. Park SH, Park SA, Kang YG, Shin JW, Park YS, Gu SR, Wu YR, Wei J, Shin J-W. PCL/ $\beta$ -TCP composite scaffolds exhibit positive osteogenic differentiation with mechanical stimulation. *Tissue Eng Regen Med* 2017;14(4):349–358.
67. Lam CXF, Olkowski R, Swieszkowski W, Tan KC, Gibson I, Hutmacher DW. Mechanical and in vitro evaluations of composite PLDLA/TCP scaffolds for bone engineering. *Virtual Phys Prototyp* 2008;3(4):193–197.
68. Ma X, Hu YY, Wu XM, Liu J, Xiong Z, Yan YN, Lv R, Wang J. Fabrication of a RP-based biomimetic grafting material for bone tissue engineering. *Mater Sci Forum* 2009;627:553–558.
69. Xiong Z, Yan Y, Wang S, Zhang R, Zhang C. Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering via low-temperature deposition. *Scr Mater* 2002;46(11):771–776.
70. Pang L, Hu Y, Yan Y, Liu L, Xiong Z, Wei Y, Bai J. Surface modification of PLGA/ $\beta$ -TCP scaffold for bone tissue engineering: Hybridization with collagen and apatite. *Surf Coat Technol* 2007;201(24):9549–9557.
71. Park SA, Lee SH, Kim WD. Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering. *Bioprocess Biosyst Eng* 2011;34(4):505–513.
72. Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002;23(4):1169–1185.
73. Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH, Tan KC. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res* 2001;55(2):203–216.
74. Temple JP, Hutton DL, Hung BP, Huri PY, Cook CA, Kondragunta R, Jia X, Grayson WL. Engineering anatomically shaped vascularized bone grafts with hASCs and 3D-printed PCL scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2014;102(12):4317–4325.
75. Costa PF, Puga AM, Díaz-Gomez L, Concheiro A, Busch DH, Alvarez-Lorenzo C. Additive manufacturing of scaffolds with dexamethasone controlled release for enhanced bone regeneration. *Int J Pharm* 2015;496(2):541–550.
76. Liu W, Wang D, Huang J, Wei Y, Xiong J, Zhu W, Duan L, Chen J, Sun R, Wang D. Low-temperature deposition manufacturing: A novel and promising rapid prototyping technology for the fabrication of tissue-engineered scaffold. *Mater Sci Eng C* 2017;70:976–982.
77. Bajaj P, Chan V, Jeong JH, Zorlutuna P, Kong H, Bashir R. 3-D bio-fabrication using stereolithography for biology and medicine. In: 2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 2012. p. 6805–6808.
78. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B. Scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C* 2017;78:1246–1262.
79. Hinczewski C, Corbel S, Chartier T. Ceramic suspensions suitable for stereolithography. *J Eur Ceram Soc* 1998;18(6):583–590.
80. Corden TJ, Jones IA, Rudd CD, Christian P, Downes S, McDougall KE. Physical and biocompatibility properties of poly- $\epsilon$ -caprolactone produced using in situ polymerisation: A novel manufacturing technique for long-fibre composite materials. *Biomaterials* 2000;21(7):713–724.
81. Rasal RM, Janorkar AV, Hirt DE. Poly(lactic acid) modifications. *Prog Polym Sci* 2010;35(3):338–356.
82. Santos CFL, Silva AP, Lopes L, Pires I, Correia IJ. Design and production of sintered  $\beta$ -tricalcium phosphate 3D scaffolds for bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C* 2012;32(5):1293–1298.
83. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury* 2005;36(Suppl 3):S20–S27.
84. Naghieh S, Karamooz Ravari MR, Badrossamay M, Foroomezeh E, Kadkhodaei M. Numerical investigation of the mechanical properties of the additive manufactured bone scaffolds fabricated by FDM: The effect of layer penetration and post-heating. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016;59:241–250.
85. Rasperini G, Pilipchuk SP, Flanagan CL, Park CH, Pagni G, Hollister SJ, Giannobile WV. 3D-printed bioresorbable scaffold for periodontal repair. *J Dental Res* 2015;94(9\_suppl):153S–157S.



## 5 BIOASSEMBLAGE, UNE NOUVELLE APPROCHE POUR LA CELLULARISATION DU SCAFFOLD ?

L'un des défis actuels de l'ingénierie tissulaire est lié à la pénétration cellulaire dans les parties internes des biomatériaux macroporeux. En effet, bien souvent cette pénétration est limitée et les cellules restent en périphérie à cause d'une vascularisation insuffisante de ces biomatériaux. De plus, une faible diffusion en oxygène et nutriments ainsi qu'une élimination des déchets cellulaires limitée sont observées. Ces limites conduisent à une intégration peu satisfaisante de ces greffes à long terme (114).

L'approche traditionnelle pour la préparation de scaffold cellularisé implique le chargement de cellules sur la surface du matériau macroporeux (Figure 12). Dans cette approche, également désigné par « Top-down », on attend une colonisation spontanée du matériau par les cellules lors d'une étape de maturation. Cependant, la difficulté à vasculariser la construction 3D entraîne une diffusion limitée d'oxygène et de nutriments. Il en résulte une distribution cellulaire inhomogène et une viabilité cellulaire faible au cœur du scaffold (115). Malgré les avancées en termes de fonctionnalisation de surfaces et de biomimétisme ces approches aboutissent difficilement à la récréation du microenvironnement complexe, favorable et caractéristique du tissu à réparer (116).

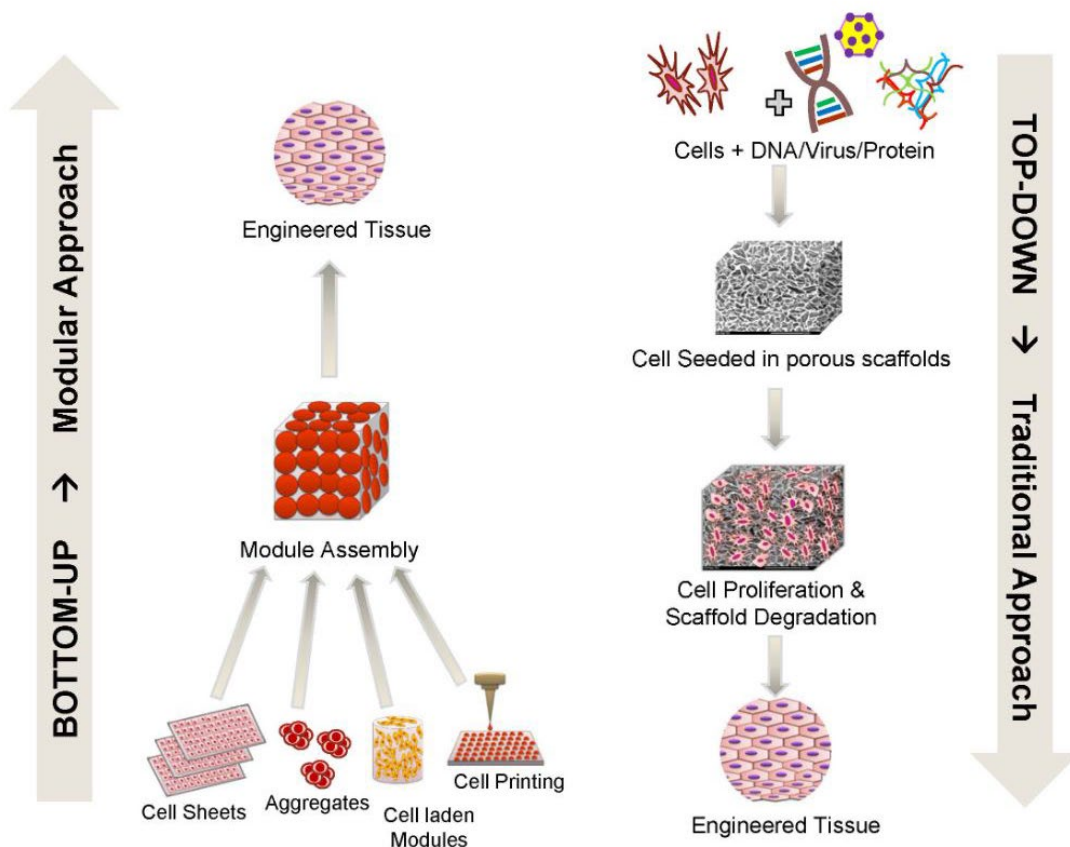


Figure 12. Illustration des concepts « Top-down » et « Bottom-up » (D'après Tiruvannamalai-Annamalai et al. (117))

L'approche de fabrication couche par couche ou « Bottom-up » vise à résoudre les problématiques rencontrées avec l'approche traditionnelle. Cette approche est basée sur l'assemblage de petits composants cellularisés permettant une distribution cellulaire homogène et une vascularisation plus efficace. Différentes approches d'assemblages sont décrites dans la littérature : l'empilage de feuillet cellulaire (118), l'assemblage de microgels (119), l'assemblage de micro-tissus ou encore l'empilement de matériaux cellularisés (120).

Les propriétés d'autoassemblage des cellules peuvent être utilisées pour former des structures uniquement composées de cellules. On obtient des structures organisées, parfois hiérarchisée, plus proche de la structure d'un tissu ou organe physiologique. La littérature montre que sous certaines conditions de culture les cellules peuvent former des agrégats. Une culture adaptée de ces agrégats peut former ce que l'on appelle des micro-tissus ou des organoïdes par autoassemblages cellulaires (121,122). Toutefois, les structures obtenues sont majoritairement utilisées comme modèles d'études *in vitro*. Il est également possible d'utiliser la capacité de certaines cellules à synthétiser et assembler leur propre matrice et ainsi de former des feuillets cellulaires (118). Ces feuillets peuvent ensuite être empilés pour former des structures plus épaisses.

D'autres approches basées sur l'utilisation de matériaux sont également possibles et plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature. Ces approches couche par couche impliquent l'empilement de matériaux microporeux cultivés dans des conditions spécifiques pour assurer la maturation du biomatériau assemblé et cellularisé. Cette approche permet de contrôler la distribution des cellules de chaque couche, aboutissant à une répartition cellulaire plus homogène et une prolifération cellulaire plus efficace (120,123). Cet empilement de matériaux cellularisés permet également un contrôle de la colonisation cellulaire, ce qui favorise la prolifération (100,124) et permet une meilleure vascularisation au cœur du scaffold (120).

L'une des difficultés est de maintenir la cohésion des unités du scaffold. En effet, la stabilisation de ces assemblages est cruciale pour éviter d'endommager les cellules, mais aussi pour faciliter leur manipulation et éviter leur mouvement après implantation. Différentes approches sont développées dans la littérature. Wan et al. utilisent un maillage en acier inoxydable pour aider au maintien de leur assemblage multicouches en culture (124) (Figure 13). Une autre étude a exploré l'utilisation du Matrigel® comme colle pour maintenir les couches entre elles, mais la stabilisation n'était pas suffisante (125).

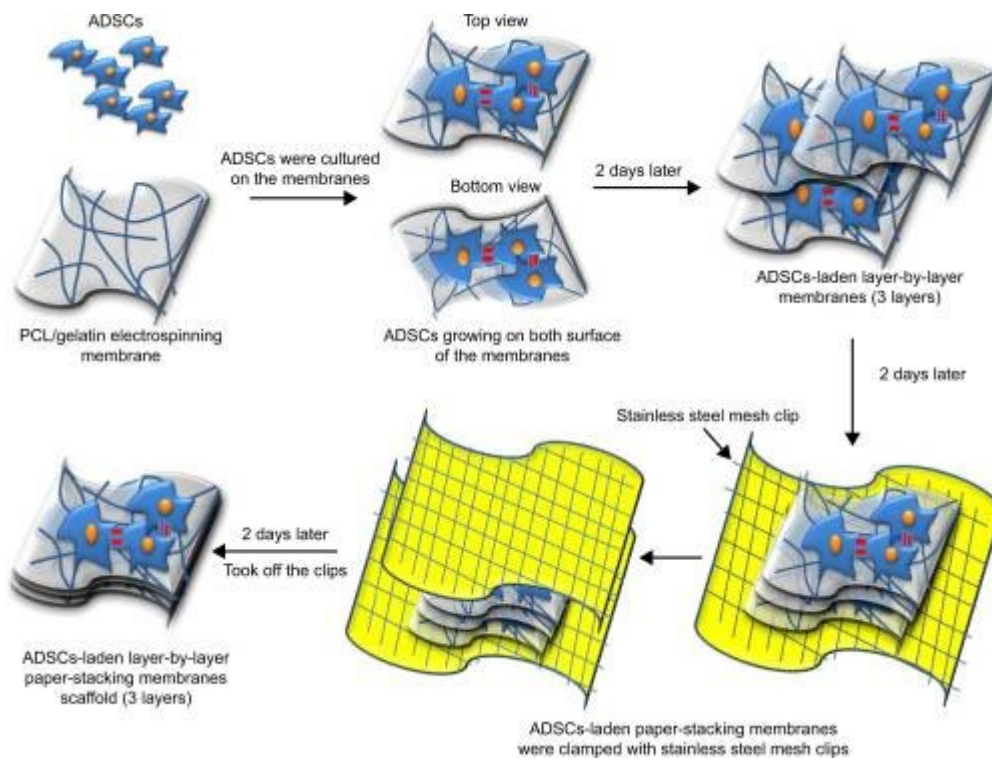


Figure 13. Représentation schématique de la procédure de fabrication d'un assemblage couche par couche cellularisé par Wan et al. 2015 (124).





## 6 OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'étudier les potentiels bénéfiques de la fabrication couche par couche d'un scaffold cellularisé, pour la régénération osseuse en chirurgie orale.

Pour arriver à cette finalité ce travail s'est découpé en 2 grandes parties qui sont détaillées ci-après.

### 6.1 Développement du matériau et caractérisation

#### 6.1.1 Création du matériau et fabrication des scaffolds

Plusieurs techniques de fabrication étaient compatibles avec l'application visée. Nous avons choisi de nous tourner vers la FDM, une technique simple et accessible. De nombreux exemples dans la littérature montraient la possibilité d'un contrôle précis de l'architecture du scaffold. De plus, nous avons développé, en collaboration avec l'IUT de Bordeaux, une imprimante sur mesure (MicroPrint) avec des paramètres optimisés pour les structures que nous souhaitons développer.

Comme montré par notre revue de littérature, différents matériaux étaient envisageables pour notre étude. Nous avons également mis en évidence l'intérêt de l'association polymère-céramique (57). Nous nous sommes tournés vers le PLGA, qui présente un temps de dégradation en accord avec les applications souhaitées. De plus, il démontre une bonne biocompatibilité et son association avec différentes céramiques montre des résultats positifs. En ce qui concerne les céramiques, nous avons choisi l'HA car c'est un matériau déjà produit et utilisé au laboratoire.

Il nous a également semblé important d'envisager très tôt une potentielle translation clinique. C'est pourquoi nous avons fait le choix de travailler avec un PLGA de grade médical (PURASORB® PLG 8218, Corbion). En effet, aujourd'hui beaucoup d'études utilisent des polymères contenant des impuretés limitant ensuite la translation clinique.

Enfin concernant le design du matériau nous nous sommes tournés vers différents types de structures adaptées aux différentes étapes de notre étude. Un premier modèle a été optimisé pour la culture cellulaire en 2D. Ensuite, 2 modèles ont été développés pour la partie 3D, afin de comparer notre approche couche par couche à une approche conventionnelle. La porosité optimale pour la colonisation cellulaire avait été évaluée dans une précédente étude (126).

### 6.1.2 Propriétés physicochimiques

Il était important dans un premier temps de caractériser les matériaux d'un point de vue physicochimique. De notre revue de littérature nous avons dégagé plusieurs caractéristiques qu'ils nous semblaient important d'étudier :

- La qualité d'impression

Il était important d'avoir une bonne résolution d'impression et de s'assurer de la reproductibilité. La qualité de l'impression est impactée par les matériaux utilisés mais aussi par l'imprimante. C'était donc un double contrôle qualité qui nous a permis de nous assurer que les matériaux et l'imprimante développés étaient compatibles pour notre approche.

- L'impact des différentes étapes de fabrication

Le choix de l'impression 3D par FDM nous a contraints à développer des matériaux sous la forme de filaments. Les étapes nécessitant cette mise en forme pouvaient avoir un impact sur la structure chimique du polymère et affecter ses propriétés.

- Le chargement en nHA

Différents chargements de nHA dans le PLGA ont été réalisés pour notre étude. Il était important de s'assurer que l'approche utilisée pour développer nos filaments permettait d'obtenir un taux de chargement en nHA réel et cohérent avec le taux de chargement espéré. De plus, nous attendions une distribution homogène des nanoparticules dans le matériau.

- La dégradation du matériau

Le polymère sélectionné présente un temps de dégradation assez court ( $\approx 6$  mois). Il semblait donc essentiel d'évaluer l'évolution de nos matériaux dans le temps.

- Les propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques d'un matériau utilisé pour la reconstruction osseuse sont cruciales. L'évolution de ces propriétés dans le temps (dégradation du matériau) peuvent avoir un impact sur la réparation de l'os.

### 6.1.3 Etude *in vitro* « 2D »

Ensuite une première étude biologique de notre matériau a été réalisée sur un modèle simplifié, dit « 2D ». Cette première étude avait pour but d'évaluer la biocompatibilité et la pertinence des matériaux choisis pour servir de support ostéoconducteur.

Concernant la source de cellule souche nous avons choisi d'utiliser le tissu adipeux humain. Pour cette première approche *in vitro*, nous avons choisi de travailler avec les cellules souches humaines isolées, les hADSCs. Afin de démontrer leur intérêt par rapport aux cellules souches mésenchymateuses de référence en ingénierie tissulaire osseuse (les hBMSCs), nous avons choisis de les comparer dans cette partie. L'objectif était de montrer que les ADSCs avaient un potentiel égal voire supérieur au hBMSCs.

Ces premiers éléments du travail expérimental ont fait l'objet d'un article publié, présenté en Partie I du travail expérimental.

## 6.2 Bioassemblages vs. Approche conventionnelle

Enfin, une fois la pertinence de nos choix validés dans le modèle « 2D » nous avons pu passer à notre modèle 3D. Ce modèle plus complexe, que nous avons désigné par le terme « sandwich », a été comparé à l'approche traditionnelle, désignée par le terme « bloc », pour montrer la pertinence et la plus-value de notre approche.

### 6.2.1 Bioassemblages *in vitro*

Dans cette dernière partie nous avons changé notre approche de cellularisation. Nous avons choisi d'utiliser des cellules de rats afin de pouvoir développer ensuite un modèle autologue *in vivo*. Nous avons également fait le choix de travailler avec la fraction vasculaire stromale (FVS) fraîchement isolée du tissu adipeux. Ces 2 choix ont permis de réaliser une étude plus proche de la réalité clinique, où la FVS peut être utilisée (72,73).

Une étude *in vitro* a été initiée afin d'évaluer le comportement des cellules dans notre approche sandwich comparée à l'approche conventionnelle. Nous avons souhaité explorer différents aspects comme la prolifération des cellules et leur viabilité dans les 2 approches. Nous nous sommes également intéressés au potentiel ostéogénique et nous avons cherché à développer des protocoles pour une caractérisation plus poussée que celle présentée en « 2D ». Cette étude étant toujours en cours, seulement une partie des résultats seront présentés dans ce manuscrit.

### 6.2.2 Bioassemblages *in vivo*

Enfin une étude *in vivo* a été réalisée pour évaluer le potentiel de réparation osseuse des assemblages développés. Nous avons choisi de réaliser un défaut osseux sur la calvaria de rat pour notre étude. C'est un défaut bien connu et maîtrisé au laboratoire, qui nous a permis d'effectuer une première évaluation des capacités de notre matériau. Comme évoqué précédemment, nous avons été en mesure de développer un modèle autologue qui nous a permis d'appréhender la complexité de la translation clinique.

Cette étude nous a permis dans un premier temps d'évaluer la compatibilité de notre approche sandwich dans un cadre plus proche de la réalité clinique. Elle a permis d'appréhender les avantages et les inconvénients de notre approche et d'établir les perspectives de travail. Cette étude étant toujours en cours, seulement une partie des résultats seront présentés dans ce manuscrit.



## 7 TRAVAIL EXPERIMENTAL : Biofabrication par assemblage couche par couche pour l'ingénierie du tissu osseux

### 7.1 Partie I : Développement et caractérisation d'un matériau composite PLGA-HA pour la fabrication d'un scaffold pour l'ingénierie du tissu osseux (Article 2)

#### 7.1.1 Introduction

Les technologies d'impression 3D démontrent un intérêt certain pour diverses applications d'ingénierie tissulaire. Nous l'avons évoqué précédemment, ces techniques offrent une grande liberté et reproductibilité de fabrication avec une haute résolution. Néanmoins, elles nécessitent le développement de matériaux adaptés, d'une part à la technologie utilisée, et d'autre part à l'application souhaitée.

Notre revue de littérature précédente (4. REVIEW OF LITERATURE : 3D printed polymer–mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: fabrication and characterization (Article 1)) a fait ressortir l'intérêt d'utiliser des matériaux composites pour plusieurs raisons. Dans notre cas, le choix de l'impression 3D par FDM nous a contraint à utiliser un matériau de base thermoplastique. Ces matériaux présentent de bonnes propriétés mécaniques mais sont en général assez inertes. L'ajout d'un composé, comme une céramique ou un bioverre, permet d'apporter des propriétés supplémentaires et notamment d'augmenter l'ostéoconductivité du matériau.

Dans cette première partie d'étude nous nous sommes intéressés à la mise au point d'un composite PLGA-HA imprimable par FDM. Nous avons choisi de travailler sur des matériaux simplifiés pour cette première partie. Le modèle utilisé (Figure 14) correspondait à une membrane poreuse simple, désignée comme notre approche « 2D ».

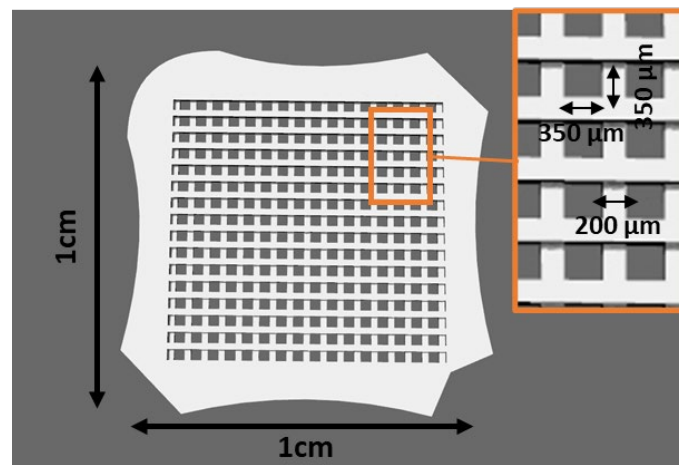


Figure 14. Modèle de la membrane poreuse pour l'étude "2D" développée sur le logiciel de modélisation Rhino 6®. Les membranes présentait une surface de 1 cm<sup>2</sup> comprenant une grille. Cette grille possédait des pores de 350\*350 µm et des lignes de 200 µm de diamètre.

La première étape a consisté à fabriquer un matériau utilisable par FDM. Cette technologie repose sur l'extrusion d'un filament de polymère fondu. Il nous fallait donc mettre en forme nos matériaux sous la forme d'un filament adapté pour l'imprimante. Pour cette partie nous avons fait appel à un partenaire, RESCOLL (Pessac), une entreprise spécialisée dans les prestations de services technologiques dans le domaine des matériaux. Plusieurs critères étaient à prendre en compte :

- Le diamètre du filament

Nous cherchions à obtenir un diamètre de  $1.75 \pm 0.05$  mm, qui correspond aux spécifications générales pour ce type de machine. L'homogénéité du diamètre était importante pour permettre une impression régulière et reproductible des scaffolds.

- La résistance du filament aux contraintes mécaniques.

En effet, le filament devait être assez souple pour éviter sa fracture lors du déroulement mécanique de la bobine au cours de l'impression. Il devait également résister aux contraintes imposées lors de son cheminement dans la gaine qui l'amenait dans la tête d'extrusion. Si le filament cassait pendant ces étapes intermédiaires cela compliquait l'impression et pouvait notamment bloquer l'avancée du filament.

Cette dernière condition a contribué à notre choix pour le taux de chargement en nHA dans le filament de PLGA. Nous avons choisi des chargements à 5% et 10% en masse de nHA qui ont été comparés à un matériau de PLGA pur. En effet, après un chargement avec 10% en masse de nHA on obtenait un filament beaucoup plus rigide et donc plus susceptible de casser. Le procédé de production de ces filaments étant coûteux nous avons choisi de ne pas tester de chargements plus importants de nHA.

Il y a ensuite eu une longue étape d'optimisation des paramètres d'impression pour obtenir une impression régulière et précise de nos différents matériaux. Cette étape n'est pas décrite dans l'article. Elle a principalement consisté à jouer sur les paramètres suivants :

- Température d'impression
- Vitesse d'impression
- Vitesse d'extrusion

Nous présentons d'ailleurs dans cet article une évaluation de la qualité d'impression avec les paramètres optimaux que nous avons définis.

Il nous a ensuite semblé important de caractériser nos matériaux d'un point de vue physicochimique. Nous avons porté notre attention sur différents points :

- L'impact des étapes de fabrication sur nos matériaux.

Nous nous sommes notamment intéressés à l'impact sur la structure des chaînes de polymères. Pour cela nous avons utilisé la chromatographie par exclusion stérique (SEC) qui nous a permis d'avoir accès au poids moléculaire de nos chaînes. Cette analyse a été réalisée sur les matériaux bruts, puis sur les matériaux avant et après impression. Ces analyses ont été

réalisées grâce à la mise en place d'une collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO, Pessac).

- Evaluation de la phase cristalline

L'analyse par diffraction aux rayons X (XRD) est une analyse structurale qui permet la reconnaissance de structures cristallines (mailles), donnant des informations sur les composés chimiques présents. Ces analyses ont été réalisées à l'ICMCB (Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux, Pessac) pour identifier le type d'HA synthétisée et vérifier sa présence dans les matériaux.

- La comparaison des propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques d'un matériau pour l'ingénierie du tissu osseux sont essentielles. L'inclusion de nHA peut potentiellement impacter les propriétés mécaniques originales comme discuté dans notre revue de littérature.

- L'évaluation du chargement et de la distribution en nHA

La première technique utilisée, l'analyse thermogravimétrique (TGA), nous a permis de vérifier si le procédé de fabrication des filaments permettait d'obtenir le chargement escompté de nHA.

Nous avons également utilisé la micro-spectroscopie de Raman et un microscanner pour évaluer la distribution de la nHA en surface et à l'intérieur de nos matériaux. Ces analyses ont été réalisées sur les matériaux avant et après impression pour s'assurer que l'homogénéité de la distribution était conservée.

L'évaluation de la distribution des nHA par micro-spectroscopie de Raman a pu être réalisée grâce à une collaboration avec l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM, Talence).

Comme précédemment expliqué dans les objectifs de la thèse, le PLGA a été choisi pour sa dégradation rapide, comparé aux autres polymères usuels. Le PLGA est également connu pour relarguer des produits acides lors de sa dégradation pouvant donner lieu à une inflammation locale. Il a donc semblé important d'étudier l'évolution de nos matériaux dans le temps en évaluant différents critères : changement de structure, évolution de la masse, structure des chaînes de polymères, variation de pH et relargage de calcium.

L'évaluation des changements structuraux par microscopie électronique à balayage (MEB) a été réalisée avec la collaboration de la plateforme Microscopies & Analyses (CY Cergy Paris Université).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la biocompatibilité des matériaux développés. Pour l'évaluation *in vitro*, nous avons choisis de travailler avec des cellules souches humaines dérivées du tissu adipeux (hADSCs) ou de la moelle osseuse (hBMSCs). Les hADSCs ont été comparées aux hBMSCs, cellules de référence en ingénierie tissulaire osseuse. Les différents



paramètres que nous avons choisis d'évaluer étaient : la cytotoxicité des matériaux vis-à-vis des cellules, ainsi que la survie des cellules sur ces matériaux. Cette biocompatibilité a également été évalué *in vivo*, en utilisant un modèle d'implantation sous-cutané chez le rat.

Enfin, la différenciation des cellules sur ces matériaux a été évaluée. Cette étape a permis de mettre en évidence l'intérêt de l'ajout des particules de nHA. Néanmoins ces résultats demandent à être complétés par des analyses plus poussées.





# ARTICLE 2

---

## Development and characterization of a PLGA-HA composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering

Joanna Babilotte<sup>a</sup>, Benoit Martin<sup>a</sup>, Vera Guduric<sup>a</sup>, Reine Bareille<sup>a</sup>, Rémy Agniel<sup>b</sup>,  
Samantha Roques<sup>c</sup>, Valérie Héroguez<sup>d</sup>, Marc Dussauze<sup>e</sup>, Manuel Gaudon<sup>f</sup>,  
Damien Le Nihouannen<sup>a</sup>, Sylvain Catros<sup>g</sup>

<sup>a</sup> Univ. Bordeaux, INSERM, BioTis U1026, 33076 Bordeaux, France

<sup>b</sup> CY Cergy Paris Université, Maison Internationale de la Recherche, Lab. ERRMECe, 95031  
Neuville-Oise, France

<sup>c</sup> Univ. Bordeaux, CIC1401, CHU Bordeaux, INSERM, 33076 Bordeaux, France

<sup>d</sup> Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, CNRS, Bordeaux INP, UMR5629, 33607  
Pessac, France

<sup>e</sup> Univ. Bordeaux, Institut des Sciences Moléculaires, UMR 5255 CNRS, 33405 Talence,  
France

<sup>f</sup> CNRS, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, ICMCB, UMR5026, 33608 Pessac, France

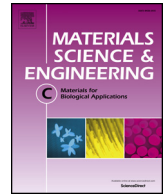
<sup>g</sup> Univ. Bordeaux, INSERM, BioTis U1026, CHU Bordeaux, Dentistry and Oral Health  
Department, 33076 Bordeaux, France

---

*Materials Science & Engineering C*

Volume 118, January 2021, 111334. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111334





## Development and characterization of a PLGA-HA composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering

Joanna Babilotte<sup>a</sup>, Benoit Martin<sup>a</sup>, Vera Guduric<sup>a</sup>, Reine Bareille<sup>a</sup>, Rémy Agniel<sup>b</sup>, Samantha Roques<sup>c</sup>, Valérie Héroguez<sup>d</sup>, Marc Dussauze<sup>e</sup>, Manuel Gaudon<sup>f</sup>, Damien Le Nihouannen<sup>a</sup>, Sylvain Catros<sup>g,\*</sup>

<sup>a</sup> Univ. Bordeaux, INSERM, BioTis U1026, 33076 Bordeaux, France

<sup>b</sup> CY Cergy Paris Université, Maison Internationale de la Recherche, Lab. ERRMECe, 95031 Neuville-Oise, France

<sup>c</sup> Univ. Bordeaux, CIC1401, CHU Bordeaux, INSERM, 33076 Bordeaux, France

<sup>d</sup> Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, CNRS, Bordeaux INP, UMR5629, 33607 Pessac, France

<sup>e</sup> Univ. Bordeaux, Institut des Sciences Moléculaires, UMR 5255 CNRS, 33405 Talence, France

<sup>f</sup> CNRS, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, ICMCB, UMR5026, 33608 Pessac, France

<sup>g</sup> Univ. Bordeaux, INSERM, BioTis U1026, CHU Bordeaux, Dentistry and Oral Health Department, 33076 Bordeaux, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Fused deposition modeling  
Bone tissue engineering  
Composite  
Polymer  
Hydroxyapatite

### ABSTRACT

Additive manufacturing is a rising field in bone tissue engineering. Additive fabrication offers reproducibility, high precision and rapid manufacture of custom patient-specific scaffolds. The development of appropriate composite materials for biomedical applications is critical to reach clinical application of these novel biomaterials. In this work, medical grade poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) was mixed with hydroxyapatite nanoparticles (nHA) to fabricate 3D porous scaffolds by Fused Deposition Modeling. We have first confirmed that the composite material could be printed in a reproductive manner. Physical characterization demonstrated a low degradation of the material during manufacturing steps and an expected loading and homogeneous distribution of nHA. *In vitro* biodegradation of the scaffolds showed modifications of morphological and physicochemical properties over time. The composite scaffolds were biocompatible and high cell viability was observed *in vitro*, as well as a maintain of cell proliferation. As expected, the addition of nHA displayed a positive impact on osteodifferentiation *in vitro*. Furthermore, a limited inflammatory reaction was observed after subcutaneous implantation of the materials in the rat. Overall, this study suggests that this composite material is suitable for bone tissue engineering applications.

### 1. Introduction

Oral and maxillofacial bone loss can occur in the cases of trauma, infection or tumor removal. Even if autologous bone can be used in several clinical situations, it shows some drawbacks due to the induced donor site morbidity and limited bone availability. A variety of natural and synthetic biomaterials have been developed to promote bone regeneration as alternatives to autologous bone grafts [1,2]. Biomaterials are expected to restore function and esthetics, especially in the case of dental implant rehabilitations [2]. The ideal biomaterial should be biocompatible, bioresorbable, osteoconductive and if possible osteoinductive and osteogenic. It means that it should provide a cell-friendly structure and be resorbed in order to leave space for the newly formed bone.

One of major limitations of current bone materials used in clinics is the difficulty to produce complex anatomical shapes, which leads to poor adaptation to the defect margins, especially in the oral and maxillofacial area. A long and complex procedure might be needed to shape biomaterials during surgery, which inherently extends surgical time, and may eventually increase the risk of post-operative complications [3]. Additive manufacturing technologies have garnered enormous attention, thus offering a new and promising approach for bone repair and regeneration. Indeed, they offer the possibility to fabricate precise complex microporous architecture, with reproducible size, shape and interconnectivity of pores to mimic the natural microarchitecture of bone. Moreover, these technologies are used to fabricate custom-made scaffolds that meet the specific clinical needs of patients with bone defects [4,5].

\* Corresponding author at: Université de Bordeaux, INSERM, BioTis U1026, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

E-mail address: [sylvain.catros@inserm.fr](mailto:sylvain.catros@inserm.fr) (S. Catros).

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111334>

Received 8 May 2020; Received in revised form 30 July 2020; Accepted 2 August 2020

Available online 08 August 2020

0928-4931/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Several fabrication technologies have been applied in regenerative medicine to process scaffolds with a defined architecture. According to Moroni et al., the current additive manufacturing methods can be described as “Light-based” technologies (selective laser sintering, stereolithography, two-photon polymerization), 3D printing, fused deposition modeling, ink-jet printing, 3D plotting, and solution and melt electrospinning [6]. In this study, we used Fused Deposition Modeling (FDM) to fabricate composite scaffolds. FDM is a common technique for scaffold fabrication based on material extrusion: a heated extrusion head forces out a thermoplastic filament material and deposits the semi-molten polymer onto a platform, heated or not, in a layer-by-layer process. FDM enables the fabrication of controlled and regular structure scaffolds with good structural integrity and mechanical properties, due to a fusion between material layers [7,8].

A wide range of materials show interesting properties for the development of bone scaffolds: mostly natural or synthetic polymers and ceramics [9]. However, due to the technical specifications of 3D printers, all of the conventional bone biomaterials cannot be printed in their original composition. For example, Fused Deposition Modeling printers require thermoplastic biomaterials in the shape of filament with specific diameter [6].

Biocompatible and biodegradable polymers are commonly used for tissue engineering scaffolding. Numerous degradable polymers such as polycaprolactone (PCL), polylactic acid (PLA), poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA), are compatible with FDM technology. They offer a good support for cell attachment, anchorage and proliferation [10]. However, they are usually not sufficient to assure a complete bone repair due to their lack of osteo-promotive ability [10,11].

For bone tissue regeneration, mineral-based materials play a major role. Hydroxyapatite (HA) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) are the most extensively studied minerals for bone scaffolds [12]. They are frequently used because of their similarities in structure and composition with the inorganic elements of human bone. Their compressive strength [13–16] and potential for osteoconductivity [17] make them the materials of choice for bone tissue engineering strategies. However, these calcium phosphates could be difficult to print and they might require a post-printing step [1,11].

The development of 3D-printed scaffolds for bone regeneration includes to go beyond the limitations related to each type of material. Hence, it was proposed to develop combinations of biomaterials to obtain composite materials. Recent literature reviews reported that the combination of a synthetic polymer material with a ceramic material could be used to counterbalance their respective limitations [10,12]. It was reported that such composite scaffolds displayed increased osseointegration and bone formation, compared to raw biomaterials [10,12].

The aim of this work was to synthesize and characterize a composite biomaterial made of medical grade poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) mixed with 5% or 10% (w/w) hydroxyapatite nanoparticles (nHA): this biomaterial was designed to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering. Initially, the printing quality obtained with PLGA, PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10%, was evaluated. Then the materials were characterized using various physical characterization techniques. The chemical degradation of the polymer during the different fabrication steps was evaluated, the real mineral charge was verified, the type of nHA was identified and nHA distribution was observed. Further, *in vitro* biodegradation of the scaffolds was evaluated: morphological and physicochemical properties modifications were observed. Then the biocompatibility was tested *in vitro* and *in vivo*. Two cell types were used *in vitro*: human bone marrow stromal cells (hBMSCs) and human adipose-derived stem cells (hADSCs). Preliminary assays to evaluate cell differentiation were performed to validate potential applications of this composite material for future bone grafts applications.

## 2. Material and methods

### 2.1. Fabrication and design of PLGA-HA materials

Nano-hydroxyapatite (nHA) was prepared by wet chemical precipitation as described by Afshar et al. [18] at room temperature by the addition of an orthophosphoric acid solution ( $H_3PO_4$ ) into a calcium hydroxide solution ( $Ca(OH)_2$ ). Solid pellets of PLGA (PURASORB® PLG 8218, Corbion) were mixed with different filler percentage of nHA powder. The filler content was 5% or 10% wt of nHA. The different mix were melted at 195 °C and extruded into a filament of 1.75 mm diameter using a twin-screw extruder (Pharma 11 HME Thermofisher).

Rhino 6® and Clump generator software® were used to design porous 400  $\mu$ m thick scaffolds with 350\*350  $\mu$ m (0.122 mm<sup>2</sup>) squared pores and threads of 200  $\mu$ m width. Scaffolds were manufactured using a custom-made 3D FDM printer (MicroPrint, IUT de Bordeaux, France) with a nozzle of 400  $\mu$ m [19]. The printing temperature was set to 165–170 °C, 170–175 °C and 175–180 °C to print respectively PLGA-HA 10%, PLGA-HA 5% and PLGA. Prior to evaluations, printed scaffolds were sterilized by gamma irradiation (25 kGy, room temperature; Nordion®, GC 3000).

PLGA, PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10% porous scaffolds were printed, then the macro- and micro-structure of scaffolds were observed using binocular (Leica®, MZ10F) and scanning electron microscope (GeminiSEM300, Zeiss). To confirm the reliability of the printing technique, expected pore size was compared with the actual pore dimensions of printed scaffolds. For each material, six scaffolds were printed and images were taken using binocular microscopy. After thresholding the images with ImageJ® software (NIH), DiameterJ® plug-in was used to automatically calculate pores dimensions.

### 2.2. Physicochemical analysis of scaffolds

To evaluate chemical degradation during manufacturing steps and *in vitro* degradation, the average molecular weight ( $M_w$ ) and polydispersity index (PDI) of PLGA in composites was determined by Size Exclusion Chromatography (SEC) using tetrahydrofuran (THF) as the eluent. The samples of PLGA, PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10% were dissolved in THF on a shaker for 1 day and filtered with a 0.45  $\mu$ m polyamide membrane. Measurements in THF were performed on an Ultimate 3000 system (Thermoscientific) equipped with a diode array detector. The system also included a multi-angles light scattering detector and a differential refractive index detector (Wyatt technology). Polymers were separated on three G2000, G3000 and G4000 TOSOH HXL gel columns (300  $\times$  7.8 mm, exclusion limits from 1000 Da to 400,000 Da) at a flowrate of 1 mL/min. Columns temperature was held at 40 °C. Easivial kit® of polystyrene from Agilent was used as standard.

The thermal degradation of the polymer and the mineral content (nHA) within the scaffolds were assessed by thermogravimetric analysis, using a TA instrument TG50. The analysis was performed according to MO093 and ISO 11358 norms. The analysis was carried out on PLGA pellets (raw material) and materials before and after FDM printing. The samples were warmed from 25 °C to 900 °C (sequential increase of 10 °C/min) then an isotherm was performed during 60 min at 900 °C.

Structural properties were explored by X-ray diffraction (XRD) using a diffractometer (Bragg Brentano Theta-Theta geometry), with a copper anticathode (CuK $\alpha$ ,  $\lambda$  = 0.154 nm) source. The working tension and intensity were 40 kV and 40 mA, respectively, with collection of a spectrum on  $2\theta$  = 10°–60° range and a step of 0.017°.

The mechanical properties were investigated with a uniaxial tensile test using an Autograph AGS-X (Shimadzu®). Tests were conducted on porous material described before at 10 mm/min until failure to evaluate tensile strength.

### 2.3. Nano-hydroxyapatite distribution

The molecular constituents of the composite material and the nHA distribution in the materials were evaluated by Raman spectroscopy (Xplora, Horiba Scientific). Briefly, a 532 nm laser was used for excitation and spectra of printed and non-printed of PLGA with nHA were recorded. Spectra of the pure nHA, as well as printed and non-printed PLGA were recorded as controls. Phosphate peak ( $960\text{ cm}^{-1}$ ), specific for nHA, was used on samples for cartography of nHA distribution.

nHA spatial distribution in the materials was evaluated with X-ray microtomography (SkyScan 1276 micro-CT system, Bruker). The X-ray source was set at 50 kV and 120  $\mu\text{A}$ . Samples of PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10% before (filaments) and after printing (scaffolds) were imaged with a 3D isotropic voxel size of 8  $\mu\text{m}$ . The 3D reconstructions were performed using CT Analyzer v. 1.17.7.2 + software.

### 2.4. *In vitro* degradation of the materials

The *in vitro* degradation of materials was performed according to the norm ASTM-F1635. Porous scaffolds of PLGA and PLGA-HA 10% were immersed in PBS (DPBS 1  $\times$ , without Ca and Mg) and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  incubator for 15 weeks. Each week, pH was measured with a pHmeter (Fisher Scientific accumet<sup>®</sup> AE150 with PerpHecT<sup>®</sup> ROSS<sup>®</sup> Micro pH Electrode). The PBS solution was changed and collected every week during degradation. At different time points (2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 weeks), the scaffolds were weighed and day 0 was defined as the baseline. The chemical degradation was evaluated by SEC at week 0, 2, 6, 10, 12, 15 using the protocol described above. The  $\text{Ca}^{2+}$  release during degradation was measured in the PBS collected, using a fluorometric assay kit (Calcium Quantification Kit (ab11215)). Finally, the scaffolds were observed by Scanning Electron Microscopy (Zeiss GeminiSEM300) after Ni coating, to evaluate the surface structural changes at weeks 0, 6 and 15.

### 2.5. Cell culture and cell seeding

All human samples were collected in accordance with the French Ministry of Higher Education and Research and National Institute for Health and Medical Research (agreement DC-2008–412). Human adipose-derived stem cells (hADSCs) were isolated from subcutaneous fatty tissue from human skin biopsies during plastic surgeries [20]. Fatty tissue was separated from the skin and minced with a scalpel. Afterwards, the fatty tissue was digested with type I collagenase (Worthington, CLSO1, 1 mg/mL in PBS 1  $\times$  BSA 2%) for 1 h30 at 37  $^{\circ}\text{C}$  under agitation (250 rpm). After centrifugation, the pellet was resuspended in ELB buffer ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.7 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.3) and sequentially filtered through a 100  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$  nylon cell strainer (BD Falcon<sup>™</sup>). The filtrate was centrifuged and the pellet was resuspended in DMEM/F-12 GlutaMAX (Gibco<sup>®</sup>, Cat No. 31331-028) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Biowest<sup>®</sup>) and 0.1% antibiotics (Pen Strep, Gibco<sup>®</sup>). Human bone marrow stromal cells (hBMSCs) were isolated from bone marrow samples, which were collected during orthopedic surgeries according to Vilamitjana-Amédée et al. [21], with some modifications [22]. Briefly, a single-cell suspension was obtained by sequential passages of aspiration through 16-, 18-, and then 21-gauge needles. After centrifugation the pellet was resuspended in Alpha-MEM (Gibco<sup>®</sup>, Cat No. A10400-02), supplemented with 10% FBS and 0.1% antibiotics (Pen Strep, Gibco<sup>®</sup>).

Cells from mixed donors at early passages (3 or 4) were used for the different experiments. Cell culture on porous scaffolds was performed in 24-well plates. Each well was coated with agarose (2% (w/v) in 1  $\times$  PBS; Sigma-Aldrich Co, A9539) before adding scaffolds, to avoid cell adhesion on the tissue culture plastic. Cells were seeded at a density of 75000 cells/ $\text{cm}^2$  on materials and 5000 cells/ $\text{cm}^2$  on plastic wells and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  in air.

### 2.6. *In vitro* biocompatibility

The cytotoxicity of potential release compounds was evaluated, according to the norm NF EN 30993-5 ISO 10993-5. Cell viability was evaluated by neutral red and metabolic activity was evaluated by MTT. Neutral red assay is based on the accumulation of neutral red dye in the lysosomes of viable cells. The MTT assay is based on the activity of NADPH-dependent cellular oxidoreductase enzymes. For both assays, medium extracts were prepared by incubating scaffolds in cell culture media with a specific ratio between the immersed surface of the scaffold and the volume of the medium (from 3 to 6  $\text{cm}^2/\text{mL}$ ). Five scaffolds of each material were incubated in appropriate cell medium for 3 days at 37  $^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  in air. Medium extracts were collected after 1 (E1), 2 (E2), and 3 days (E3) and stored at 4  $^{\circ}\text{C}$ . For both assays, hADSCs and hBMSCs were plated at 15000 cells/ $\text{cm}^2$  in 96-well plates and cultured during 72 h to reach subconfluence (80%). After removal of culture media, medium extracts (E1, E2, and E3) supplemented with 10% FBS (v/v) were added. Triton 100  $\times$  (0.1%) was used as positive control and cell culture medium alone was used as negative control (5 wells for each condition). Plates were incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  incubator for 24 h. The MTT stock solution (5 mg/mL in 0.1 M PBS, pH = 7.4; Sigma-Aldrich, Cat No M2128) was diluted (20% in IMDM without phenol red, Gibco<sup>®</sup>, Cat No. 21056-023) and this solution was added in each well. After 3 h of incubation at 37  $^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  in air, the solution was removed, and formed formazan crystals were dissolved by adding dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, Cat No. D5879-1L). Staining intensity was quantified by measuring the absorbance at 540 nm using a spectrophotometer (Perkin Elmer<sup>®</sup>, 2030 Multilabel Reader Victor<sup>™</sup> X3). The Neutral Red (Sigma-Aldrich, N4638) was diluted (1.25% w/v) in IMDM supplemented with 10% FBS and this solution was added in each well. After 3 h of incubation at 37  $^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  in air, the solution was removed, and cells were lysed with a solution made of 1% acetic acid in 50% ethanol. Staining intensity was quantified by measuring the absorbance at 540 nm using a spectrophotometer (Perkin Elmer<sup>®</sup>, 2030 Multilabel Reader Victor<sup>™</sup> X3).

Cell viability was also tested by Live-Dead staining (Invitrogen<sup>®</sup>, Cat No L3224), which was based on acetoxymethyl ester of calcein (Calcein-AM) and ethidium homodimer-1 (EthD-1). Calcein-AM is cleaved in the cytoplasm by esterase and thus indicated live cells showing a green fluorescence. EthD-1 enters cells with damaged membranes and binds to nucleic acids, producing a red fluorescence of dead cells. Both cell types were seeded on PLGA and PLGA-HA 10% porous scaffolds as described before. After 7, 14 and 21 days of culture, the samples were incubated with the solution of Calcein-AM and EthD-1. After incubating for 15 min in the dark in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$  at 37  $^{\circ}\text{C}$ ., images were acquired using a confocal laser scanning microscope (Leica, TSC SPE DMI 4000B).

### 2.7. *In vitro* cell differentiation

To assess the osteogenic capacity of hADSCs and hBMSCs seeded on the different scaffolds, the Alkaline Phosphatase (ALP) activity was evaluated through semiquantitative staining. ALP kit (Sigma, 85L3R) was used following the manufacturer's instructions. At designated time-points (3, 7 and 14 days), the cells were fixed for 30 s in citrate (15 mM) acetone mix (2:3 v/v) and the samples were incubated for 30 min with ALP stain. After staining, images of the scaffolds were taken with a binocular microscope (Leica<sup>®</sup>, MZ10F).

Secondly, the synthesis of mineralized matrix was evaluated by Red Alizarin staining. On day 21, cells were washed three times with PBS, fixed in PFA 4% for 10 min, washed twice with distilled deionized (DD) water, and stained with Alizarin Red solution (2%, pH 4.2) for 10 min at room temperature. Then, they were washed several times with DD water to remove excess stain. Finally, images of the samples were taken



using binocular microscope (Leica®, MZ10F). Quantification of the staining was performed by extraction with cetylpyridinium chloride solution (100 mM). The supernatant was collected for absorbance measurements at 570 nm (Victor X3 2030 Perkin Elmer).

## 2.8. *In vivo* biocompatibility

The present study was approved by the French Ethics Committee (agreement APAFIS n° 4375-2016030408537165v8). The biocompatibility of PLGA and PLGA-HA 10% were assessed using a rat subcutaneous implant model. Sixteen 8 weeks old male Wistar rats were used. Surgery was carried out under aseptic conditions. Short-term anesthesia was induced by inhalation of 4% isoflurane (air: 1.5 L/min) and maintained using isoflurane 2% (air: 0.4 L/min). Analgesia was performed by intraperitoneal injection of 0.1 mg/kg buprenorphine (Buprecare®, 0.3 mg/mL). The back of rats was shaved, the surgical site was aseptically prepared, and a midsagittal incision was made in the back area. Two conditions were implanted on both sides of the mid-dorsal line (4 materials per rat). In addition, a sham-operated control with no biomaterial implantation was performed for this study. After surgery, food and water were supplied *ad libitum*. Euthanasia was performed one week and 4 weeks after implantation using CO<sub>2</sub> inhalation (n = 16 rats; 8 rats per time point). After shaving, the samples were carefully harvested and rinsed with PBS 1×, then placed in 4% paraformaldehyde (Antigenfix, Microm Microtech, France) overnight. Then, the explanted samples were rinsed in PBS 1× and processed for histology. Samples were dehydrated and processed for conventional embedding in paraffin. Ten-μm-thick serial sections were made. Sections were stained with hematoxylin-eosin-safran (HES). Images were acquired with a slide scanner (Hamamatsu Nanozoomer 2.0HT). According to the NF-EN-ISO 10993-6 standard, a blinded independent trained investigator scored the inflammatory reaction around the implants semi-quantitatively. The following biological response parameters were assessed and recorded: cellular infiltration and inflammatory cell type (polymorphonuclear, lymphocytes, macrophages, plasma cells and giant cells), vascularization, fatty infiltration and extent of fibrosis. The scoring system was as follows: the test sample was considered as non-irritant (N: 0.0 up to 2.9), slightly irritant (S: 3.0 up to 8.9), moderately irritant (M: 9.0 up to 15.0) or severely irritant (I > 15) to the tissue as compared to the sham-operated control sample.

## 2.9. Statistical analysis

The results were expressed as mean ± standard deviation, with n indicating the number of samples tested per conditions. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® Software (La Jolla/CA, USA). First, a normality test was performed using a D'Agostino and Pearson omnibus normality test. If data assumed Gaussian distribution, differences were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post-test, whereas statistical significance for independent samples was evaluated with the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. In both cases, statistical significances are marked by stars with \* indicating a two-tailed p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001.

## 3. Results

### 3.1. Fabrication and design of PLGA-HA materials

All scaffolds (PLGA, PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10%) were printed in the shape of a mesh with square pores, inside a solid frame (Fig. 1.A). These three different composite materials were used for the physico-chemical evaluation. After this first part, 2 materials (PLGA and PLGA-HA 10%) were selected for *in vitro* and *in vivo* tests.

First, we observed that the addition of nHA particles decreased the

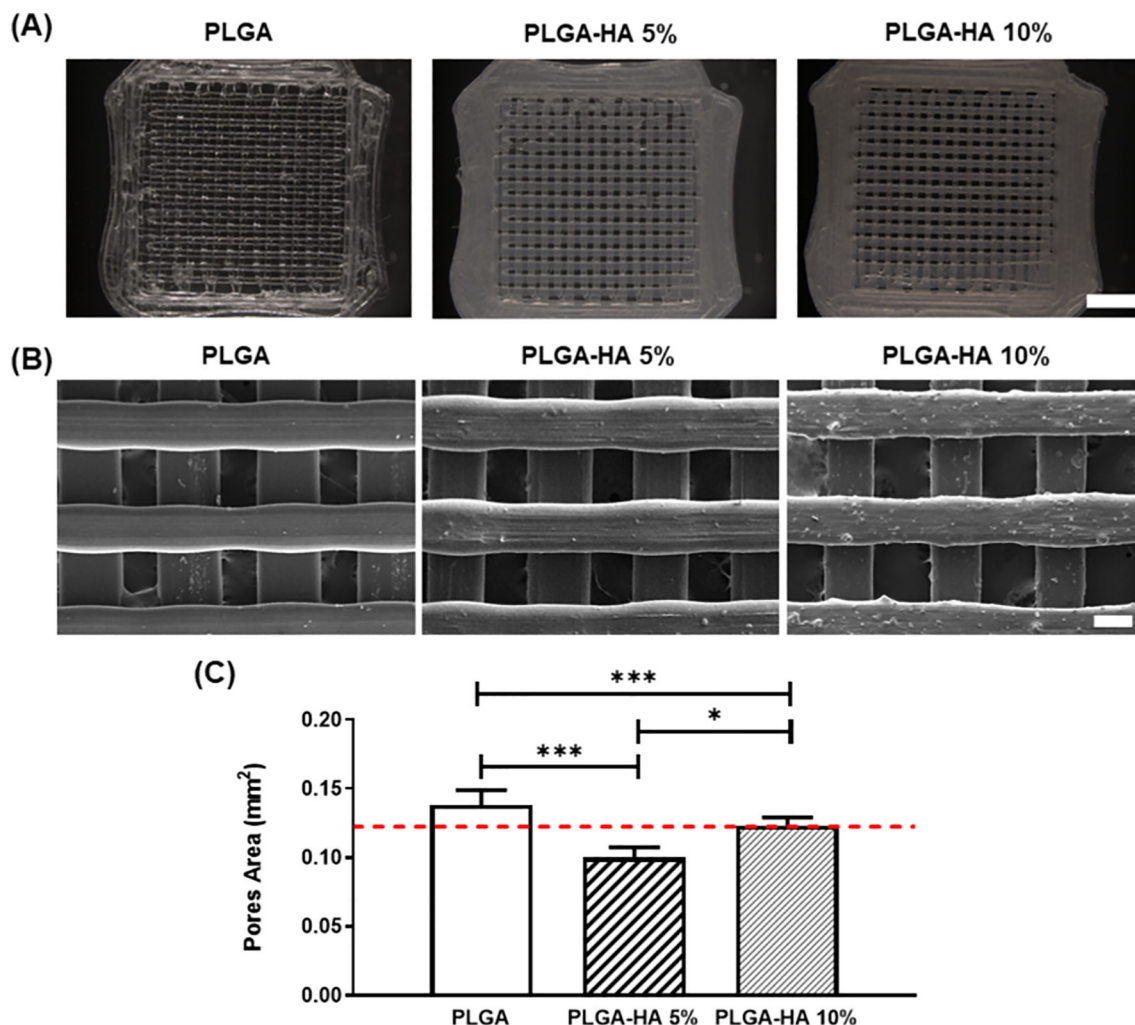
printing temperature of materials. PLGA was printed at 175–180 °C whereas PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10% were printed at 170–175 °C and 165–170 °C respectively. Macroscopic and microscopic observations using binocular (Fig. 1.A) and scanning electron microscopy (SEM, Fig. 1.B) of the scaffolds showed regular straight threads printed layer-by-layer in both horizontal and vertical directions with perpendicular crossings. SEM was used to evaluate the surface features of the porous scaffolds (Fig. 1.B.): PLGA scaffolds displayed a smooth surface, while PLGA-HA scaffolds surface displayed a rough and irregular appearance. This irregular surface corresponded to the loaded materials and was most likely nHA particles, as they were more numerous with increasing nHA concentration. PLGA thread appeared thinner (Fig. 1.A/B) and to study whether the printing technology was precise and reproducible, we quantified the pore size of printed scaffolds (Fig. 1.C). Image analysis showed that pore sizes of PLGA scaffolds were statistically higher than the predicted value (0.122 mm<sup>2</sup>) by 13 ± 8% (0.137 ± 0.013 mm<sup>2</sup>). Pore sizes of PLGA-HA 5% scaffolds were statistically lower by 18 ± 6% (0.100 ± 0.007 mm<sup>2</sup>). PLGA-HA 10% scaffolds showed the highest reliability with pore size 99 ± 5% (0.122 ± 0.006 mm<sup>2</sup>) of the predicted value. Thus, while the printing process was reproducible (with SDs < 10% of measured values), printed scaffolds exhibited expected pore size dimension only for PLGA-HA 10% scaffolds (Fig. 1.C).

### 3.2. Physicochemical analysis of scaffolds

SEC was used to determine the effect of filament shaping and 3D printing by FDM on the average molecular weight ( $\bar{M}_w$ ) and polydispersity index (PDI) of PLGA (Fig. 2.A). SEC has shown a reduced variation of the  $\bar{M}_w$  after shaping PLGA in a filament. But there was a difference between materials loaded or not with nHA. The printing process did not affect significantly  $\bar{M}_w$  and PDI for the different loaded materials. However, a decrease of PDI was observed with PLGA after printing. TGA was used to control nHA loading after shaping the materials in filaments (Fig. 2.B). The PLGA dissipation occurred on a short temperature range between 300 °C and 400 °C; the degradation was poorly impacted by the nHA dispersion. Nonetheless, the addition of nHA led to a slight increase of the temperature degradation of 21.6 °C and 18.9 °C with 5% and 10% of nHA respectively (Fig. 2.B). This effect tends to show that chemical bonds (at least Van Der Waals interactions) take place between the PLGA and the hydroxyapatite particle surfaces. Whatever, the temperature of PLGA material degradation was significantly higher than the printing temperature. TGA analysis revealed that nHA contents were 3.99% and 8.95% for PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10% respectively, showing that the efficient weight concentration of nHA in PLGA was close to the target concentration. Fig. 2.C shows the XRD patterns of the PLGA-HA 10% printed material. Spectrums of PLGA and PLGA loaded with HA were distinct. No diffraction peaks were observed for the PLGA sample, showing the PLGA was amorphous, whereas characteristic peaks of nHA appeared for PLGA-HA 5% (data not shown) and PLGA-HA 10% (Fig. 2.C). nHA was identified, thanks to peak positions (cell parameters) and peak intensity ratios (relative to atomic content) as Ca<sub>9</sub>HPO<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>5</sub>OH (JCPDS 46-0905), a calcium deficient nHA, but with hydroxyapatite structure. Finally, mechanical properties of our material were evaluated with tensile tests (Fig. 2.D). Addition of nHA did not lead to a statistical change of tensile strength compared to pure PLGA materials. PLGA-HA 10% scaffolds showed lower tensile strength compared to PLGA-HA 5%.

### 3.3. Nano-hydroxyapatite distribution

MicroRaman spectroscopy was done on material with and without nHA, before (filaments) and after printing (scaffolds) to evaluate nHA distribution (Fig. 3.A/B). Spectra of material after printing (data not shown) were similar to spectra before printing (Fig. 3.A). Distinct profiles between material with and without nHA were obtained with



**Fig. 1.** Morphological evaluation of printed scaffolds. Scaffolds of PLGA, PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10% were imaged using binocular microscope (Scale bar = 2 mm) (A) and scanning electron microscope (Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ ) (B). Printing accuracy was analyzed by quantification of pore sizes on printed scaffolds. DiameterJ plug-in was used to calculate pore dimensions on pictures acquired by binocular microscope. Dotted red line indicates the predicted value. Data are mean  $\pm$  SD (n = 6, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001) (C). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

MicroRaman spectroscopy (Fig. 3.A). Raman spectra of nHA showed characteristics peaks: A phosphate peak ( $\text{PO}_4^{3-}$ :  $960\text{ cm}^{-1}$ ) and a hydroxide peak ( $\text{OH}$ :  $3600\text{ cm}^{-1}$ ) (Fig. 3.A). The phosphate peak was used to map nHA distribution (Fig. 3B). nHA was well distributed in PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10% materials before and after printing. Spatial distribution of nHA was also observed after MicroCT imaging (Fig. 3.C). 3D reconstruction confirmed previous observations, nHA was well dispersed in PLGA-HA 5% or PLGA-HA 10% materials before and after printing (Fig. 3.C). Observations have shown that nHA particle size was heterogeneous inside the composite materials.

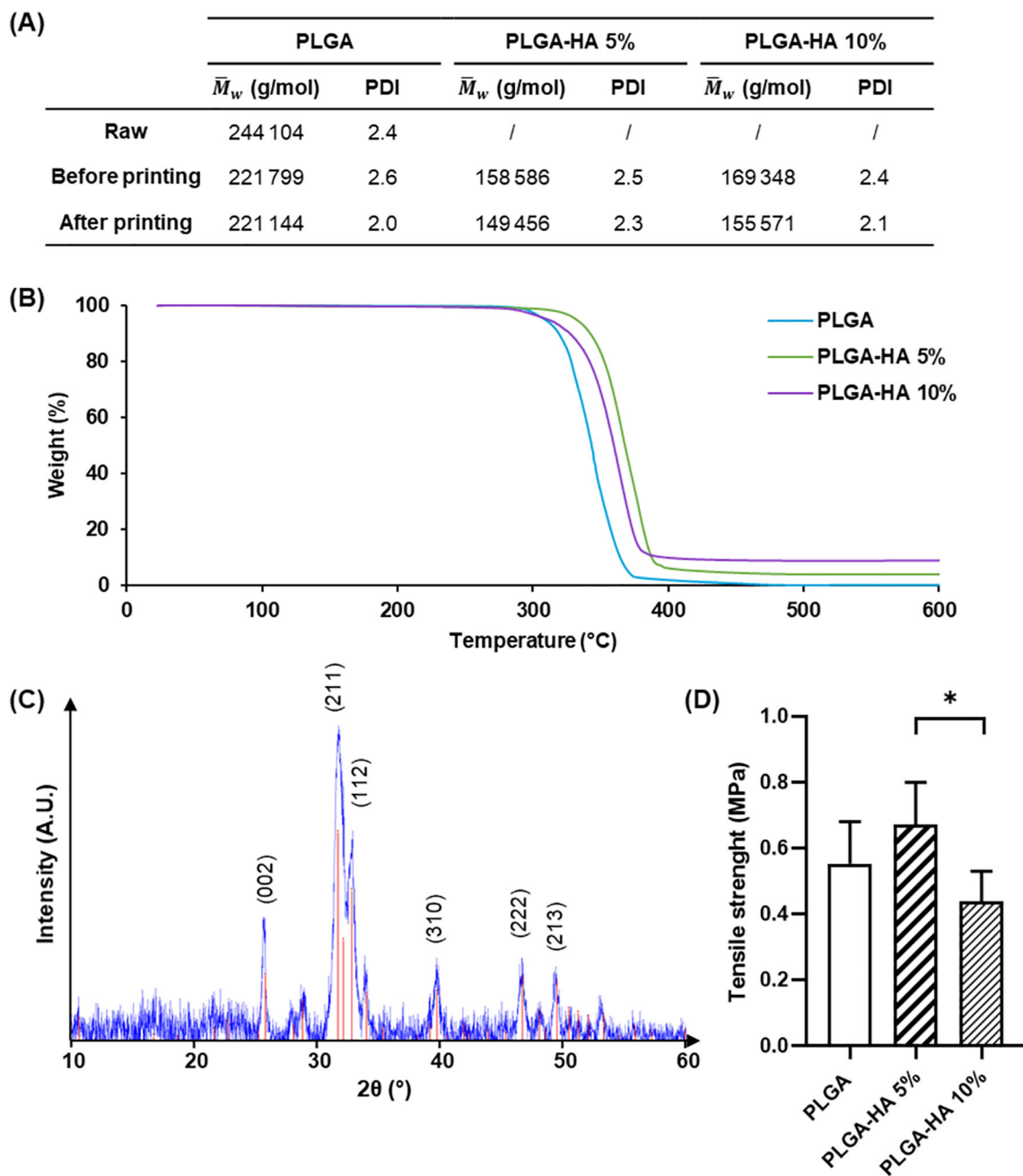
### 3.4. *In vitro* degradation of the materials

PLGA is known to be a biodegradable polymer, which releases acidic products during degradation. We studied its degradation *in vitro* for 15 weeks. After 10 weeks of degradation, PLGA and PLGA-HA 10% scaffolds became easily breakable during handling. The observation of the structure by SEM showed that PLGA scaffolds remained intact with a smooth surface, but they tended to twist (Fig. 4.A). PLGA-HA 10% scaffolds revealed an eroded surface and the threads appeared thinner every week (Fig. 4.A). A furrow appeared in the middle of the threads and small pores arose on the whole surface (Fig. 4.A). During the first 2 weeks, a weight loss of  $8.9 \pm 1.5\%$  and  $7.2 \pm 1.9\%$ , was observed

for PLGA and PLGA-HA 10% materials, respectively (Fig. 4.B). During the following weeks, the mass remained stable, no significant mass loss was observed (Fig. 4.B). We assumed that observed degradation could be due to polymer chains degradation, the average molecular weight ( $\bar{M}_w$ ) being a good indicator.  $\bar{M}_w$  decreased for both materials throughout the experiment (Fig. 4.D). At the beginning, the  $\bar{M}_w$  was  $1.02 \times 10^5 \pm 3.15 \times 10^4\text{ g/mol}$ ,  $6.45 \times 10^4 \pm 7.83 \times 10^3\text{ g/mol}$ , for PLGA and PLGA-HA 10%, respectively (Fig. 4.D). After 15 weeks, the  $\bar{M}_w$  was  $1.46 \times 10^4 \pm 2.94 \times 10^3\text{ g/mol}$ ,  $1.50 \times 10^4 \pm 1.07 \times 10^3\text{ g/mol}$ , for PLGA and PLGA-HA 10%, respectively (Fig. 4.C). These observations revealed a chemical degradation of the materials. The pH remained stable during the entire experiment and it was similar to the control at each time point (Fig. 4.C). An important calcium release was observed during the first 3 weeks (Fig. 4.E). The average calcium release was  $27.39 \pm 6.74\text{ }\mu\text{mol}$ ,  $25.22 \pm 5.44\text{ }\mu\text{mol}$ ,  $20.58 \pm 10.40\text{ }\mu\text{mol}$ , for the week 1, 2 and 3 respectively (Fig. 4.E). From week 4 to 15, the average calcium release decreased. The average calcium release was  $3.37 \pm 1.94\text{ }\mu\text{mol}$  for the week 15 and it was significantly lower compared to week 1 (Fig. 4.E).

### 3.5. *In vitro* biocompatibility

We assessed the cytotoxicity of products released from scaffolds in



**Fig. 2.** Physicochemical characterization of material. PLGA, PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10% samples (before and after printing) were dissolved in THF and filtered. Mass average molecular weight ( $\bar{M}_w$ ) and polydispersity index (PDI) were evaluated by SEC to show potential chemical degradation during manufacturing steps. Measurements in THF were performed on an Ultimate 3000 system (ThermoScientific) equipped with a diode array detector. Polystyrene was used as standard (A). PLGA pellets (raw material) and materials before and after printing were analyzed by thermogravimetric analysis. The samples were warmed from 25 °C to 900 °C by 10 °C/min then an isotherm was performed during 60 min at 900 °C (B). The XRD patterns of PLGA-HA 10% scaffold was obtained with Cu-K $\alpha$  beam conditions of 40 kV and 40 mA with collection of a spectrum at  $2\theta = 10^\circ\text{--}60^\circ$  and a step size of 0.1° (C). An uniaxial tensile test was conducted at 10 mm/min until failure to evaluate tensile strength. Data are mean  $\pm$  SD (n = 6, \* p < 0.05) (D). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

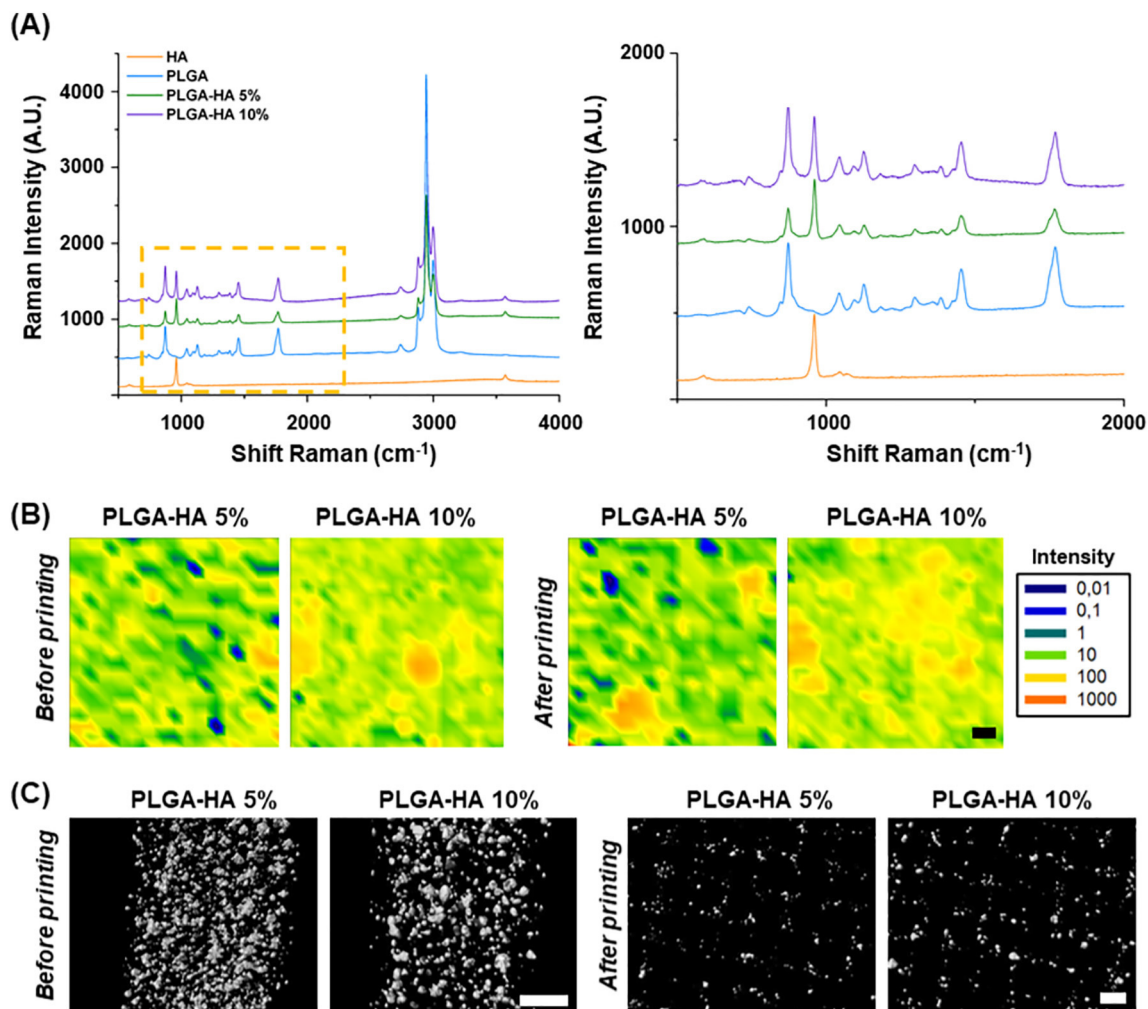
cell culture medium over time (Fig. 5.A/B). The rinse extracts were prepared by soaking the scaffolds in media during 24 h (E1), 48 h (E2) and 72 h (E3) (Fig. 5). Both cell types were in contact with rinse extracts of material during 24 h. Cell viability and metabolic activity were not affected by media extracts of the printed scaffolds (Fig. 5.A/B). Both parameters remained significantly higher than 70% of the control.

According to ISO 10993-5, these results confirmed the absence of cytotoxic effect of the different materials evaluated. Then, we have examined the cell viability of both cell types onto printed scaffolds (Fig. 5.C). After 7, 14 and 21 days, both cell types were present on

porous materials and a majority of living cells (green fluorescence) was observed, with only rare dead cells (red fluorescence). Cell proliferated on the scaffolds, especially hADSCs that appeared more numerous compared to hBMSCs, on both scaffolds. At day 14 hADSCs started to form a bridge-like structure and colonized the pores (Fig. 5.C).

### 3.6. In vitro cell differentiation

ALP is an early marker of osteoblastic differentiation. The first detected activity was around day 14 for both cell types (Fig. 6.A). The



**Fig. 3.** HA distribution before and after printing in HA charged materials. Spectrum of different printed materials was recorded by MicroRaman using a 532 nm laser for excitation. Graphic on the right correspond to the area delimited by yellow dotted line on left graphic. Spectra of HA showed characteristics peaks ( $\text{PO}_4^{3-}$ :  $960\text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{OH}$ :  $3600\text{ cm}^{-1}$ ) (A). Phosphate peak was used to show HA distribution in PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10% before and after printing (Scale bar =  $10\text{ }\mu\text{m}$ ) (B). PLGA-HA 5% and PLGA-HA 10% materials were scanned before and after printing by Micro-CT to observe spatial distribution of HA (Scale bar =  $500\text{ }\mu\text{m}$ ) (C). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

staining appeared more intense with PLGA-HA 10% scaffolds relative to PLGA for both cell types. Addition of osteoinductive media increased ALP activity of both cell types on PLGA and PLGA-HA 10% scaffolds.

Alizarin red reacts with calcium, thereby helping in the diagnosis of calcium deposits. We observed and quantified the staining after 21 days (Fig. 6.B/C). As control, cells were seeded on plastic wells and the amount of detected calcium was low. When cells were seeded on PLGA scaffolds, we observed that mineralization was similar to control. When cells were seeded on nHA-loaded scaffolds, the staining was stronger using both cell types. The use of osteoinductive media increased mineralization for both cell types. Using PLGA-HA 10% scaffolds led to a significantly higher calcium deposit by hADSCs compared to PLGA scaffolds. No significant difference was noted with hBMSCs seeded on the two different scaffolds.

### 3.7. *In vivo* biocompatibility

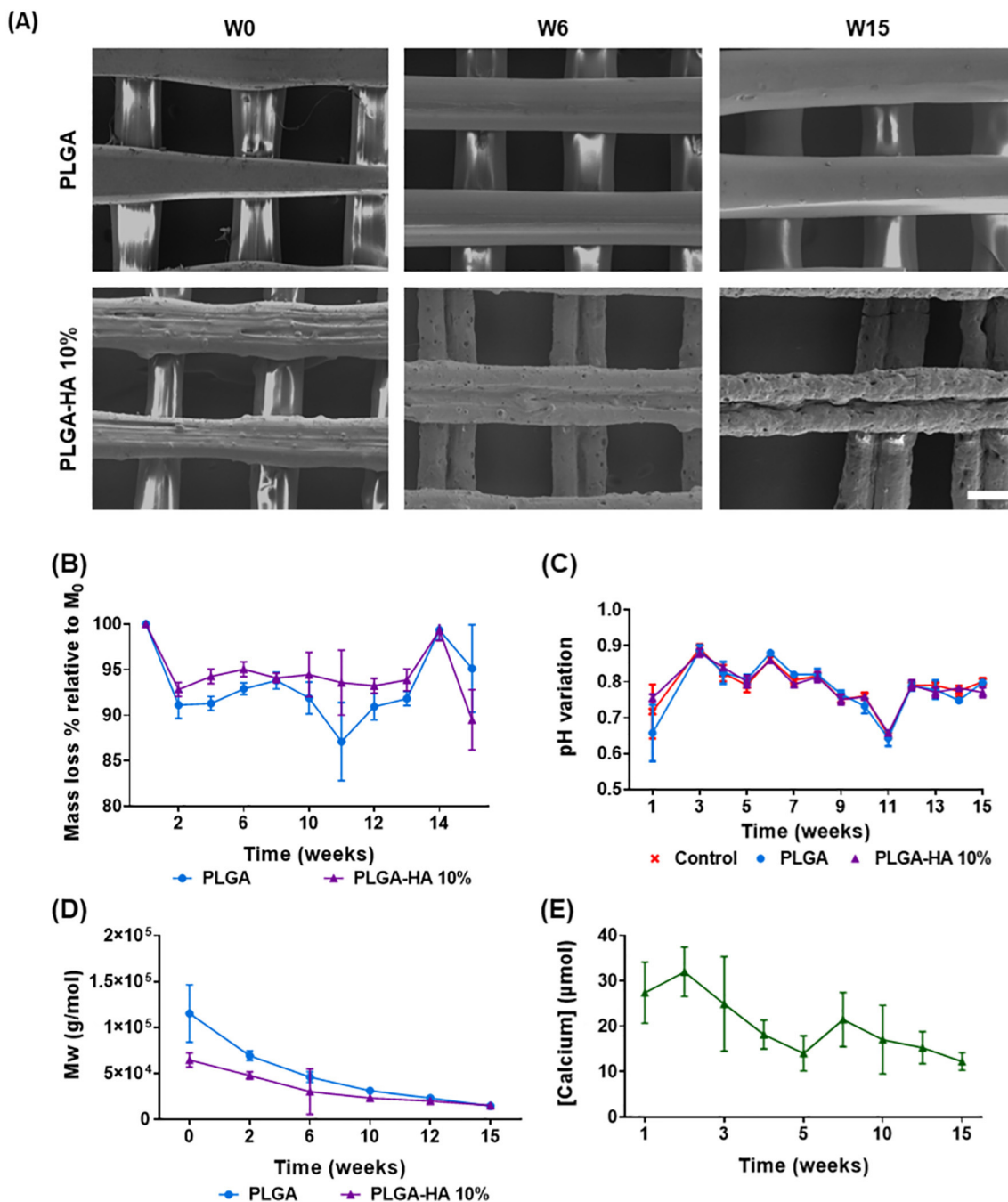
To evaluate the host response, a blinded independent trained investigator scored the inflammatory reaction around the implants semi quantitatively on histological sections stained with HES (Fig. 7.A). Values were expressed as the difference between the test sample (PLGA and PLGA-HA 10% scaffolds) and the sham-operated control (Fig. 7.B). One week after surgery a slight inflammatory reaction was observed

around the different scaffolds. The size of fibrosis infiltrate was different, depending on the material: a moderately thick band was present around PLGA scaffolds but with PLGA-HA 10%, a narrow band was present. An important cell infiltration was noticed. After 4 weeks, the fibrosis evolved to a thick band for PLGA scaffolds and to moderately thick for PLGA-HA 10% scaffolds. An important cell infiltration was still observed. Based on ISO 10993-6:2007 scoring, both materials were considered slightly irritant to the tissue when compared to the sham-operated control (Fig. 7).

## 4. Discussion

New methods for scaffold fabrication by additive manufacturing require a development of specific biomaterials. We selected PLGA for its medically-approved status and its limited degradation time, compared to other usual polymers [23]. PLGA presents a relatively low osteoconductive potential, but it was reported that the addition of HA could solve this issue [24]. For that reason, we have added HA nanoparticles to PLGA to improve its overall bioactivity for applications in bone tissue engineering. The osteoconductive properties of HA were demonstrated before in the literature [17]. To our knowledge, this composite biomaterial (PLGA + nHA) was never used before with FDM.

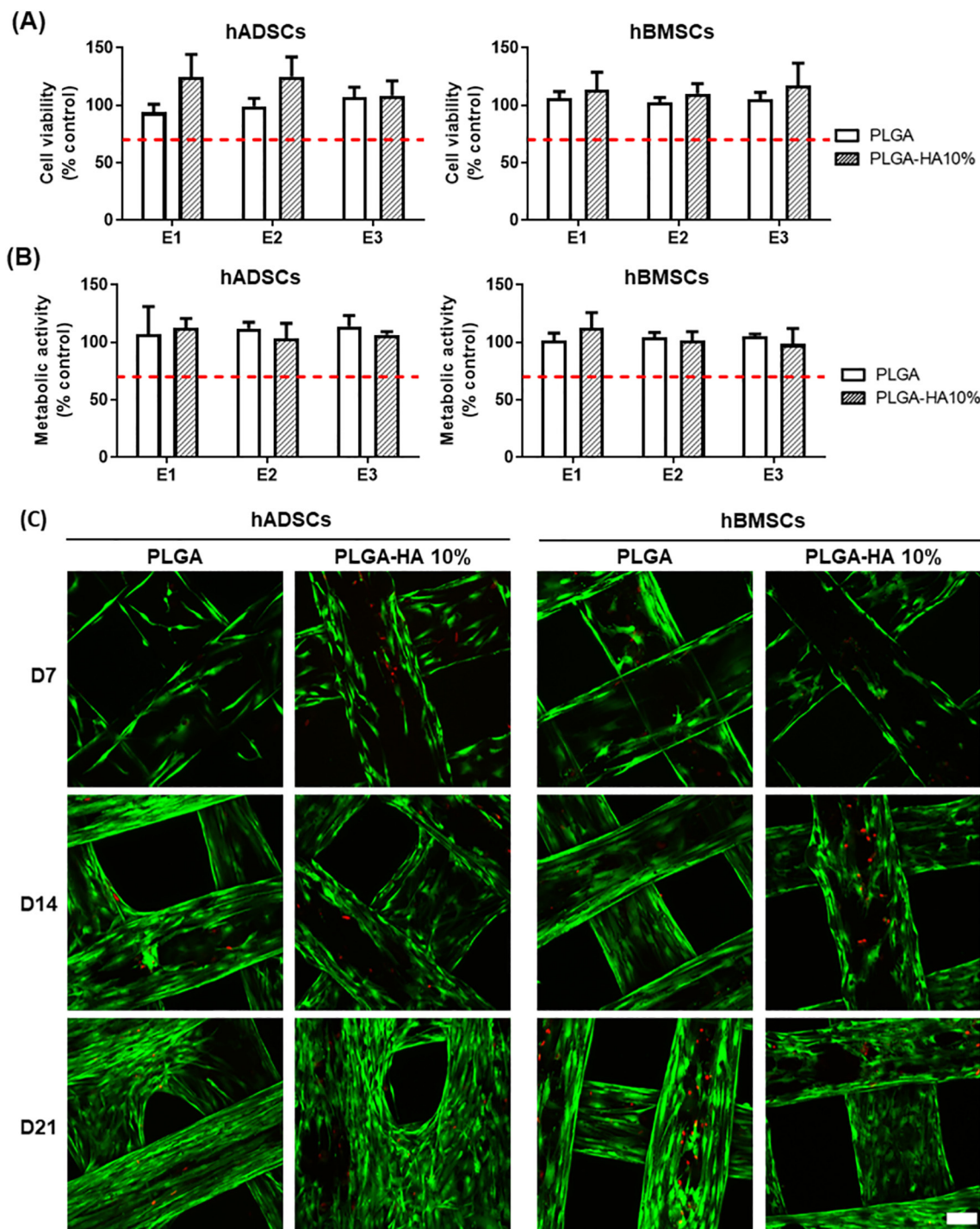
FDM is widely used in bone tissue engineering, because of its easy



**Fig. 4.** Degradation *in vitro*. According to the ASTM-F1635 norm, PLGA and PLGA-HA 10% scaffolds were immersed in PBS and incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for 15 weeks. Membranes were observed by SEM, after Ni coating, to evaluate structural changes at weeks 0, 6, 15 (Scale bar = 200 µm) (A). At different time points (2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 weeks) scaffolds were weighed and we defined week 0 as the baseline. Data are mean ± SD, n = 4. (B). Each week pH variation was measured with a pHmeter. Data are mean ± SD, n = 4. (C). Chemical degradation was evaluated by SEC (0, 2, 6, 10, 12, 15 weeks) to observe evolution of the mass average molecular weight ( $M_w$ ). Data are mean ± SD, n = 3. (D). The released Ca<sup>2+</sup> was measured in collected PBS collected with a fluorometric assay kit. Data are mean ± SD, n = 4. (E). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

use and low cost. FDM enables creation of controlled and regular 3D-structure in a reproductive manner (Fig. 1) [7,25]. The molten polymer leaves the extruder in a liquid shape and should solidify immediately on the receiving platform to minimize the flow and maintain the expected printed pattern. We used a custom Fused Deposition Modeling 3D printer with high resolution, allowing to precisely control architecture of our scaffolds [19]. In this study, we observed that depending on the materials, dimensions of the printed structure could vary, in comparison with the initial files. PLGA-HA 10% composite biomaterial offered

the most accurate final pattern compared to the other tested materials (Fig. 1). Indeed, the expansion of PLGA materials were lower and it led to an increased pore area in the final scaffold (Fig. 1). Nyberg et al. already observed a similar phenomenon when they compared the printing quality of PCL mixed with different minerals [26]. When PCL was mixed with HA, they obtained a more accurate final structure than PCL alone or PCL with other mineral dopants. This phenomenon could be explained by a variation of material viscosity, the difference of viscosity will impact material expansion on platform after printing.



**Fig. 5.** *In vitro* evaluation of materials biocompatibility. Potential cytotoxicity of materials toward hADSCs or hBMSC was evaluated using both MTT assay (A) and Neutral Red (NR) assay (B) and according to the NF-EN-ISO 10993-5 standard. Confluent cells were cultured during 24 h with medium previously incubated during 24 h (E1), 48 h (E2), and 72 h (E3) with scaffolds. Confluent cells cultured during 24 h with regular medium or with 0.1% Triton 100× were used as negative and positive control, respectively. Results were expressed in percentage compared to the negative control. On each graph, the dotted line indicates the limit (70%) of cytotoxicity according to NF-EN-ISO 10993-5 standard. Data are mean ± SD, n = 5. hADSCs and hBMSCs were seeded on PLGA and PLGA-HA 10% scaffolds and cell viability was evaluated after 7, 14 and 21 days of culture using fluorescent microscopy after live/dead staining (green/red) (n = 3) (Scale bar = 100 μm) (C). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Previous experiments have shown that a high ratio of mineral content could lead to a reduced printability of the materials [26,27]. Using FDM technique, a clogging of the printing head can occur when composite polymers loaded with high content of mineral are used [27]. Moreover, a higher printing temperature is usually required to print polymer-mineral composite materials with high percentage of mineral

[26]. Regarding these observations, we chose a low nHA concentration in order to obtain a good printing quality and reproducibility. In our case, when nHA concentration was increased, the printing temperature was decreased. Damadzadeh et al. already observed a similar phenomenon with micro and nanoparticles of HA [15]. They demonstrated that an increased hydroxyapatite concentration led to a reduced

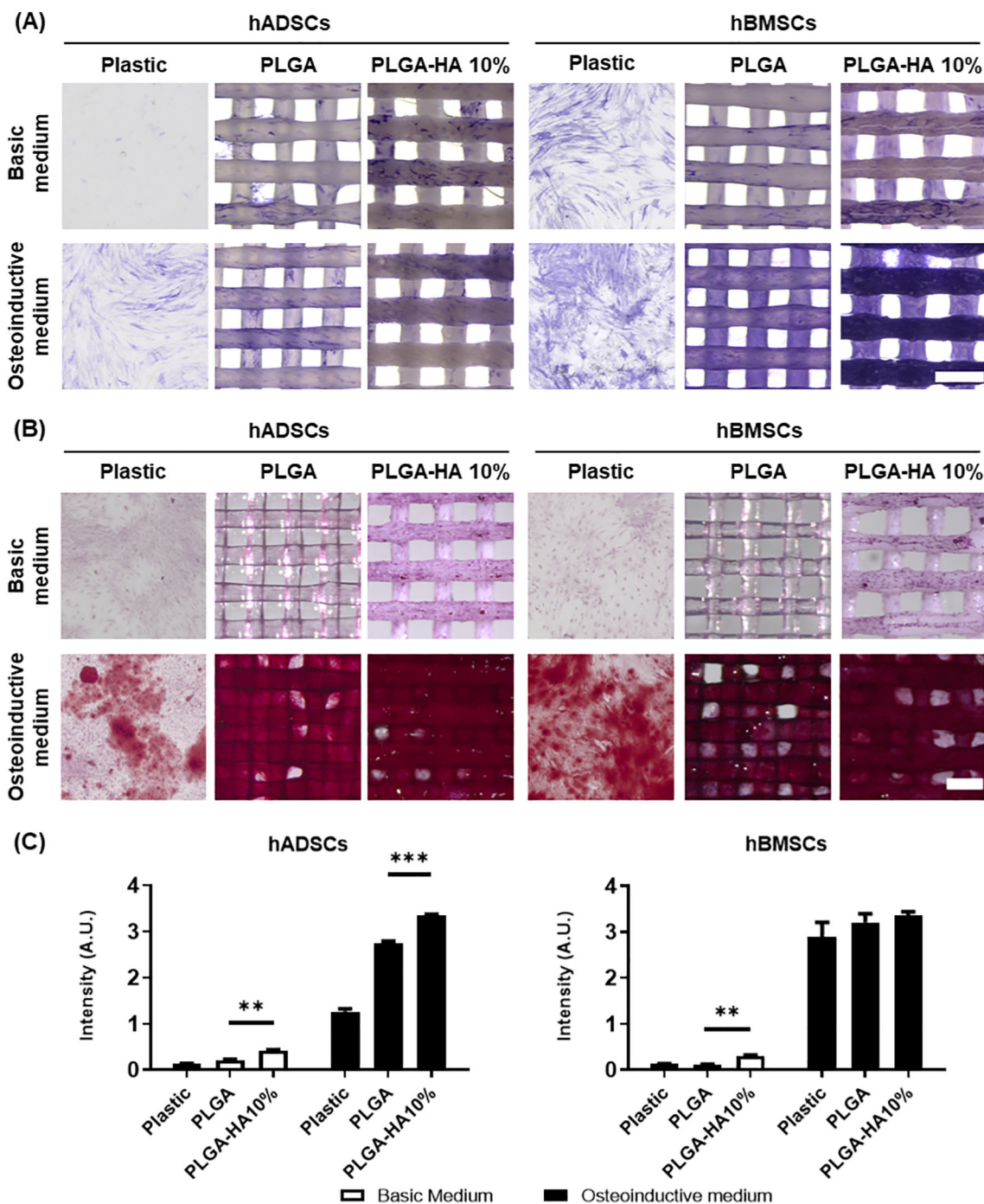
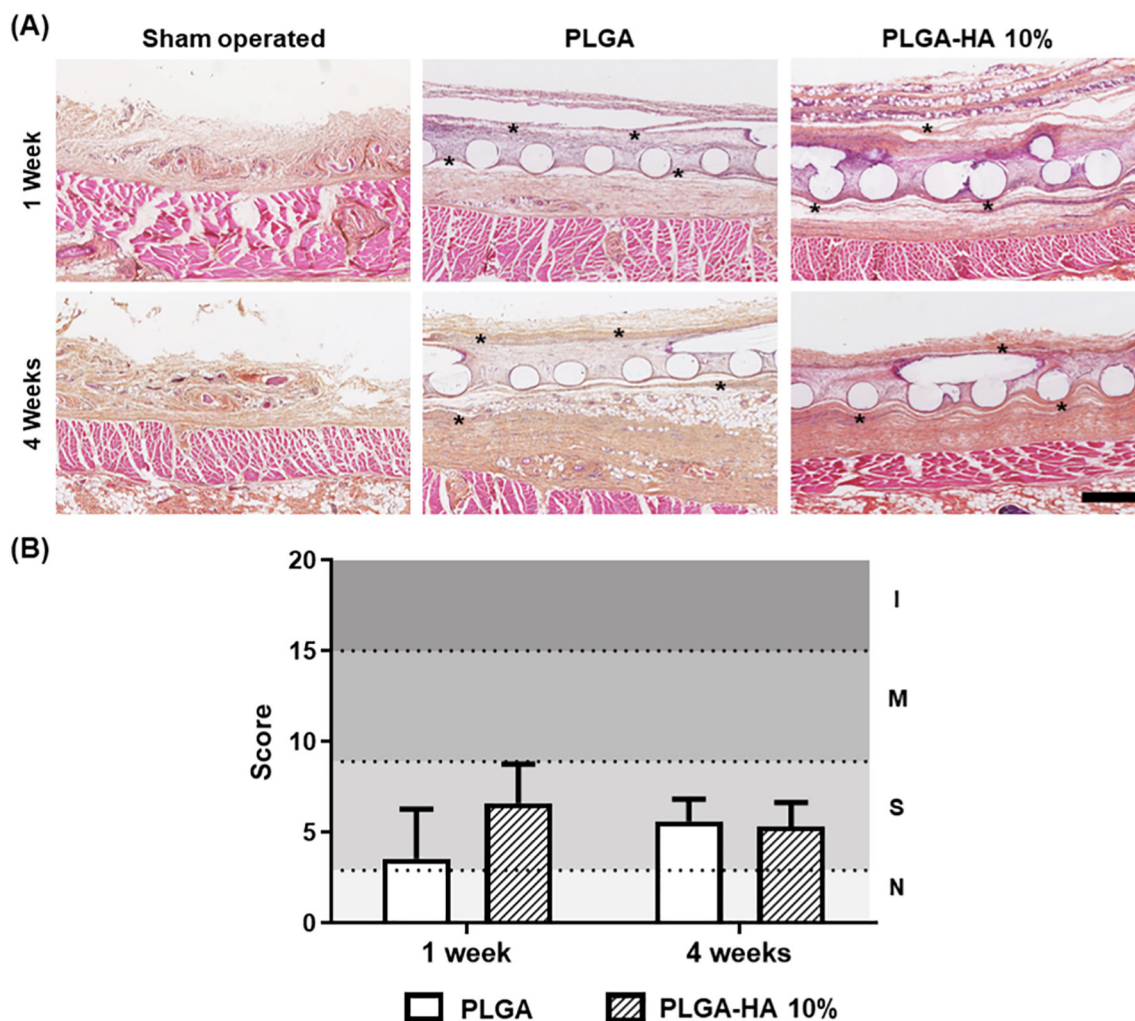


Fig. 6. Evaluation of material osteodifferentiation potential. hADSCs and hBMSCs were seeded on PLGA, PLGA-HA 10% scaffolds or plastic well as control. After 14 days of culture, with or without osteoinductive media, ALP activity was evaluated by cells staining (Scale bar = 500  $\mu$ m, n = 3) (A). After 21 days of cell culture, with or without osteoinductive media, mineralization was evaluated by Red Alizarin staining (Scale bar = 500  $\mu$ m) (B). The staining was extracted from materials and the supernatant was collected for absorbance measurements at 570 nm to quantify the mineralization. Data are mean  $\pm$  SD (n = 5, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001) (C). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

melting temperature of PLGA-HA composite [15] and this was probably due to a decreasing viscosity in presence of nHA. As the printing temperature of a polymer is directly linked to its melting temperature, the addition of calcium phosphates could be used to tune printing properties of composite materials.

Physicochemical properties of different components of our composite material were characterized before and after printing. First, chemical degradation of the polymer occurring during the different fabrication steps was evaluated by the molar mass changes. Three different printed materials (PLGA, PLGA-HA 5%, PLGA-HA 10%) were compared

to the raw PLGA and filament materials (before printing) of the same type.  $\bar{M}_w$  decreased after nHA addition (Fig. 2), this effect was already observed when minerals were added to a polymer [16,28]. It was hypothesized that the varying viscosity resulted in different shear stress during fabrication of the filament by extrusion. In our experiments, the printing process did not affect significantly the  $\bar{M}_w$  of the materials. Previous reports have shown that the heating process always resulted in a decrease of molar mass [12]. Nevertheless, it was also noticed that the effect of heating on a polymer can differ from one material to another and it can vary depending on the polymer/mineral ratio [12]. TGA was



**Fig. 7.** *In vivo* biocompatibility. PLGA and PLGA-HA 10% porous scaffolds were implanted subcutaneously in rats for 1 or 4 weeks. A sham-operated control was performed, with no biomaterial implantation. Histological sections were stained with HES for observation. A fibrosis band (indicated by \*) was observable around scaffold as a high cell infiltration (Scale bar = 500  $\mu$ m) (A). Histological sections were evaluated and scored according to NF-ENISO 10993-6 standard. The test samples were considered as non-irritant (N: up to 2.9), slightly (S: 3.0 up to 8.9) to moderately irritant (M: 9.0 up to 15.0) and severely irritant (I > 15) to tissue as compared to sham-operated control sample (n = 8 samples per condition at one week, n = 12 samples at 4 weeks) (B). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

used to compare real mineral charge to the expected one. Fig. 2B reveals that the nHA loading was slightly lower than expected. It was observed elsewhere that the use of HA nanoparticles is more efficient than bigger particles to obtain expected mineral loading [15]. TGA can also be used to evaluate variation of materials degradation temperature, in order to assess their thermal stability. The addition of nHA helped to increase thermal stability by increasing degradation temperature (Fig. 2.B). This observation confirmed that the printing temperature, far below degradation temperature, should not lead to a degradation of the materials. Lastly, crystallographic analyses by XRD showed a pattern compatible with calcium-deficient HA. Natural bone is generally constituted of nanocrystalline, non-stoichiometric, calcium-deficient apatites [29]. Calcium-deficient hydroxyapatite showed higher dissolution and better bioactivity compared to stoichiometric HA [30,31]. Mechanical tests were performed to evaluate potential changes due to nHA presence. No significant changes were observed in tensile strength when nHA was added, compared to pure PLGA (Fig. 2.D). This result was expected considering the low nHA concentration used. However, PLGA-HA 10% scaffold showed a lower tensile strength than PLGA-HA 5%. The addition of mineral has been described to decrease mechanical properties depending on its concentration [15].

SEM images revealed a uniform distribution of the particles (likely

nHA) along the surface of 3D-printed threads (Fig. 1.B). The presence of nHA on the surface is crucial to increase cell contact and cell signaling, in order to improve cell adhesion, proliferation and osteodifferentiation. nHA distribution was evaluated by Raman microscopy and Micro-CT. Both techniques showed a homogenous distribution of nHA inside the composite materials before and after printing (Fig. 3.B/C). Micro-CT observations showed that nHA was homogeneously distributed in the entire filaments and printed scaffolds (Fig. 3.C). The presence of nHA inside the materials threads may be advantageous for long-term accessibility of the particles, as they will be more exposed when the PLGA degrades. Observations of nHA distribution also showed that particle size was different inside materials before and after printing (Fig. 1). The nHA particles might clump during the filament fabrication process.

One of the qualities expected for a material applied in bone tissue engineering is the biodegradability. The material resorption should follow bone regeneration. First place, the material should be a support for bone ingrowth. Then, the material should be degraded, before it is replaced by newly-formed bone [32]. During first weeks of *in vitro* degradation, the morphology of the scaffolds remained stable. However, slight changes of PLGA-HA 10% began after 6 weeks of incubation in PBS: the scaffolds revealed an eroded surface, a furrow appeared in the middle of the threads as well as small pores (Fig. 4.A). These



changes were more visible every week. After 10 weeks, the texture of PLGA and PLGA-HA 10% scaffolds began to become more fragile. Moreover, PLGA scaffolds started to deform. Liu et al. observed the same phenomenon with PLGA scaffolds after 10 weeks [33]. After 15 weeks, the mass loss was limited for the different scaffolds, inferior to 15% of the initial mass. One study showed a relative limited mass loss of PLGA scaffolds, even after 10 weeks of *in vitro* degradation following similar protocol [33]. It was observed elsewhere that the mass loss occurred if molecular chains were reduced to a size that allowed their free diffusion out of the polymer matrix [34,35]. Usually, PLGA-like polymers undergo bulk degradation [36,37]. Molecular weight of a polymer is rapidly affected upon placement in an aqueous media [38]. This is exactly what we observed during the degradation of both scaffold types: the degradation was fast during the first 6 weeks and then it slowed down (Fig. 4.D). During *in vitro* degradation, the pH was not affected by degradation of PLGA or PLGA-HA 10% (Fig. 4.C). PLGA degradation is generally followed by a release of acidic by-products, as described Hasirci et al. [37]. *In vivo*, release of acidic products could result in important inflammatory reactions, which was not observed in our study. It is known that HA produce basic products during resorption [39–41] and in our case, it might have buffered the acidic products of PLGA; thereby, it may help to reduce the formation of an acidic environment that would be deleterious for surrounding tissues [39–41]. Regarding HA, we observed different phases of calcium release (Fig. 4.E). An important calcium release was observed during the first 3 weeks, followed by a decrease of the release from week 4 to 15. These variations in calcium release could be explained by the different phases of PLGA degradation. First, a surface erosion was observed, leading to the formation of pores observed by SEM (Fig. 4.A), probably related to nHA particles release. Then, the rate of calcium release slowed down because PLGA degradation was limited and did not leave access to inner nHA particles.

An ideal biomaterial should provide a biocompatible structural support for cells, which must adhere and proliferate. Biocompatibility of the composite materials was also evaluated *in vitro* using two cell types: hBMSCs and hADSCs. These cells were chosen because of their relevance in bone tissue engineering applications as they have already been used in clinics [42]. According to the NF EN 30993-5 ISO 10993-5 both materials revealed no cytotoxic effects (Fig. 5.A/B). A good cell viability as well as stable metabolic activity were observed. Moreover, high cell colonization and cell viability were observed on both scaffolds from the first to the third week of cell culture (Fig. 5.C). No differences of cell colonization were observed between the materials, showing that nHA did not impair cell colonization.

PLGA degradation products are described as non-toxic, but the release of acidic products, such as lactate, can induce local inflammation. We assessed the inflammation potential of our materials using subcutaneous implantation in rats. After 4 weeks, materials were not resorbed (Fig. 7.A). We observed that PLGA and PLGA-HA 10% induced a slight inflammatory reaction as compared to the sham-operated control samples (Fig. 7.B). *In vitro* degradation results showed that pH was not affected, even after 15 weeks, which could explain the relatively slight reaction. The *in vivo* study showed important cell infiltration, probably macrophages, after 1 week (Fig. 7.A). This infiltration was still observable after 4 weeks (Fig. 7.A). Xia et al. also demonstrated that macrophages actively responded to PLGA materials and degrade the surface of the materials [43]. PLGA is described as a biodegradable polymer in literature, making it useful in many short-term medical applications. These observations led us to conclude that the composite materials were biocompatible and induced their own biodegradation. PLGA, HA and their combinations have already been proven as biocompatible [41,44].

Several studies have shown the added value of minerals incorporation into a polymer matrix [10,12] for bone tissue engineering applications, because this generally promotes development of an osteoblastic phenotype of the implanted cells [10,12]. In the presence of

nHA, the ALP activity was higher and the production of mineralized matrix was significantly increased (Fig. 6). The first detected ALP activity was late, around day 14 for both cell types (Fig. 6.A). The ALP activity appeared higher with PLGA-HA 10% materials relative to PLGA for both cell types and it increased over time. Regarding mineral deposition, we observed that mineralization on PLGA was similar as with cells seeded on plastic (Fig. 6.B/C). Interestingly, when cells were seeded on nHA-loaded materials, mineralization was higher using both cell types. With osteoinductive media (positive controls), the calcium deposition was significantly increased as well. With hADSCs we observed a potentiated effect with PLGA-HA 10% using osteoinductive media. Finally, it appeared that the amount of nHA used in the study was sufficient to enhance osteoblastic differentiation and matrix mineralization. In this study, the presence of nHA seemed to offer favorable characteristics for bone tissue engineering applications.

## 5. Conclusion

In this study, we have developed a PLGA-HA composite material for the fabrication by FDM of 3D scaffolds for bone tissue engineering. These composite biomaterials were printable with good reproducibility. Our manufacturing process did not induce significant chemical degradation of the materials and the nHA loading was maintained. The nHA distribution was homogeneous on the surface as well as inside the material threads. The biocompatibility was broadly confirmed through *in vitro* and *in vivo* experiments, and *in vitro* results revealed osteopromotive potential of this composite material. To conclude, our data demonstrate that we developed a biomaterial with favorable properties and relevant cellular response for bone tissue engineering applications.

## CRediT authorship contribution statement

**Joanna Babilotte:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – Original Draft, Writing – Review & Editing, Visualization **Benoit Martin:** Validation, Formal analysis, Investigation **Vera Guduric:** Conceptualization, Formal analysis, Writing – Review & Editing **Reine Bareille:** Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – Review & Editing **Rémy Agniel:** Validation, Formal analysis, Investigation **Samantha Roques:** Validation, Investigation **Valérie Héroguez:** Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – Review & Editing **Marc Dussauze:** Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – Review & Editing **Manuel Gaudon:** Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – Review & Editing **Damien Le Nihouannen:** Conceptualization, Writing – Review & Editing, Supervision **Sylvain Catros:** Conceptualization, Writing – Review & Editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Emmanuel Pauthe, Michel Boissière, Sylvain Bourrasseau and Amélie Vax for their technical help and support. We are thankful for the access to Micro-CT by IHU-Lyric and for the precious advices of Richard Walton. SEM micrographs were realized at Microscopies & Analyses core facility (CY Cergy Paris Université) supported by Région Ile de France through the SESAME project. All Raman experiments have been performed at the platform SIV at University of Bordeaux, funded by the FEDER and the Region Aquitaine. This work was supported by the Agence Nationale de la

Recherche (ANR-16-CE18-0009-01).

## References

- [1] A. Wubneh, E.K. Tsekoura, C. Ayranci, H. Uludağ, Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering, *Acta Biomater.* 80 (2018) 1–30, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.031>.
- [2] M. Wang, C. Laurencin, X. Yu, *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, Elsevier, 2018.
- [3] A. D'Agostino, L. Trevisiol, V. Favero, M. Gunson, F. Pedica, P.F. Nocini, G.W. Arnett, Hydroxyapatite/collagen composite is a reliable material for malar augmentation, *ScienceDirect, J Oral Maxillofac Surg.* 74 (2016) (1238.e1-1238.e15).
- [4] G. Staffa, A. Barbanera, A. Faiola, M. Fricia, P. Limoni, R. Mottaran, B. Zanotti, R. Stefini, Custom made bioceramic implants in complex and large cranial reconstruction: a two-year follow-up, *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* 40 (2012) e65–e70, <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2011.04.014>.
- [5] J.P. Temple, D.L. Hutton, B.P. Hung, P.Y. Huri, C.A. Cook, R. Kondragunta, X. Jia, W.L. Grayson, Engineering anatomically shaped vascularized bone grafts with hASCs and 3D-printed PCL scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. A* 102 (2014) 4317–4325, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35107>.
- [6] L. Moroni, T. Boland, J.A. Burdick, C. De Maria, B. Derby, G. Forgacs, J. Groll, Q. Li, J. Malda, V.A. Mironov, C. Mota, M. Nakamura, W. Shu, S. Takeuchi, T.B.F. Woodfield, T. Xu, J.J. Yoo, G. Vozzi, *Biofabrication: a guide to technology and terminology*, *Trends Biotechnol.* 36 (2018) 384–402, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.015>.
- [7] I. Zein, D.W. Hutmacher, K.C. Tan, S.H. Teoh, Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications, *Biomaterials.* 23 (2002) 1169–1185, [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00232-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00232-0).
- [8] S.J. Kalita, S. Bose, H.L. Hosick, A. Bandyopadhyay, Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling, *Mater. Sci. Eng. C* 23 (2003) 611–620, [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(03\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(03)00052-3).
- [9] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo, Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives, *Mater. Sci. Eng. C* 78 (2017) 1246–1262, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.
- [10] B. Lei, B. Guo, K.J. Rambhia, P.X. Ma, Hybrid polymer biomaterials for bone tissue regeneration, *Front. Med.* 13 (2019) 189–201, <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0664-6>.
- [11] C. Wang, W. Huang, Y. Zhou, L. He, Z. He, Z. Chen, X. He, S. Tian, J. Liao, B. Lu, Y. Wei, M. Wang, 3D printing of bone tissue engineering scaffolds, *Bioact. Mater.* 5 (2020) 82–91, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.004>.
- [12] J. Babilotte, V. Guduric, D.L. Nihouannen, A. Naveau, J.-C. Fricain, S. Catros, 3D printed polymer–mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: fabrication and characterization, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 107 (2019) 2579–2595, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34348>.
- [13] F.S. Senatov, K.V. Niaza, M.Yu. Zadorozhnyy, A.V. Maksimkin, S.D. Kaloshkin, Y.Z. Estrin, Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 57 (2016) 139–148, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.11.036>.
- [14] N. Xu, X. Ye, D. Wei, J. Zhong, Y. Chen, G. Xu, D. He, 3D artificial bones for bone repair prepared by computed tomography-guided fused deposition modeling for bone repair, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 14952–14963, <https://doi.org/10.1021/am502716t>.
- [15] B. Damadzadeh, H. Jabari, M. Skrifvars, K. Airola, N. Moritz, P.K. Vallittu, Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 2523–2531, <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4110-9>.
- [16] R.L. Simpson, S.N. Nazhat, J.J. Blaker, A. Bismarck, R. Hill, A.R. Boccaccini, U.N. Hansen, A.A. Amis, A comparative study of the effects of different bioactive fillers in PLGA matrix composites and their suitability as bone substitute materials: a thermo-mechanical and in vitro investigation, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 50 (2015) 277–289, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.06.008>.
- [17] S.V. Dorozhkin, Bioceramics of calcium orthophosphates, *Biomaterials.* 31 (2010) 1465–1485, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.050>.
- [18] A. Afshar, M. Ghorbani, N. Ehsani, M.R. Saeri, C.C. Sorrell, Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite, *Mater. Des.* 24 (2003) 197–202, [https://doi.org/10.1016/S0261-3069\(03\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S0261-3069(03)00003-7).
- [19] A. Grémare, V. Guduric, R. Bareille, V. Heroguez, S. Latour, N. L'heureux, J.-C. Fricain, S. Catros, D.L. Nihouannen, Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. A* 106 (2018) 887–894, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36289>.
- [20] J.M. Seong, B.-C. Kim, J.-H. Park, I.K. Kwon, A. Mantalaris, Y.-S. Hwang, Stem cells in bone tissue engineering, *Biomed. Mater. Bristol Engl.* 5 (2010) 062001, <https://doi.org/10.1088/1748-6041/5/6/062001>.
- [21] J. Vilamitjana-Amedee, R. Bareille, F. Rouais, A.I. Caplan, M.F. Harmand, Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 29A (1993) 699–707.
- [22] F. Villars, B. Guillotin, T. Amédée, S. Dutoya, L. Bordenave, R. Bareille, J. Amédée, Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication, *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 282 (2002) C775–C785, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00310.2001>.
- [23] B.S. Kim, J. Jang, S. Chae, G. Gao, J.-S. Kong, M. Ahn, D.-W. Cho, Three-dimensional bioprinting of cell-laden constructs with polycaprolactone protective layers for using various thermoplastic polymers, *Biofabrication* 8 (2016), <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/035013>.
- [24] P. Gentile, V. Chiono, I. Carmagnola, P.V. Hattton, An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 3640–3659, <https://doi.org/10.3390/ijms15033640>.
- [25] T. Serra, M. Ortiz-Hernandez, E. Engel, J.A. Planell, M. Navarro, Relevance of PEG in PLA-based blends for tissue engineering 3D-printed scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C* 38 (2014) 55–62, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.003>.
- [26] E. Nyberg, A. Rindone, A. Dorafshar, W.L. Grayson, Comparison of 3D-printed poly-ε-caprolactone scaffolds functionalized with tricalcium phosphate, hydroxyapatite, Bio-Oss, or decellularized bone matrix, *Tissue Eng. Part A* 23 (2016) 503–514, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0418>.
- [27] B.P. Hung, B.A. Naved, E.L. Nyberg, M. Dias, C.A. Holmes, J.H. Elisseeff, A.H. Dorafshar, W.L. Grayson, Three-dimensional printing of bone extracellular matrix for craniofacial regeneration, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2 (2016) 1806–1816, <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.6b00101>.
- [28] J. Idaszek, A. Bruinink, W. Świączkowski, Ternary composite scaffolds with tailorable degradation rate and highly improved colonization by human bone marrow stromal cells, *J. Biomed. Mater. Res. A* 103 (2015) 2394–2404, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35377>.
- [29] C. Drouet, Apatite formation: why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013) e490946, <https://doi.org/10.1155/2013/490946>.
- [30] H. Li, M. Gong, A. Yang, J. Ma, X. Li, Y. Yan, Degradable biocomposite of nano calcium-deficient hydroxyapatite-multi(amino acid) copolymer, *Int. J. Nanomedicine* 7 (2012) 1287–1295, <https://doi.org/10.2147/IJN.S28978>.
- [31] J.H.C. Lin, K.H. Kuo, S.J. Ding, C.P. Ju, Surface reaction of stoichiometric and calcium-deficient hydroxyapatite in simulated body fluid, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12 (2001) 731–741, <https://doi.org/10.1023/A:1011280828663>.
- [32] C. Zizelmann, R. Schoen, M.C. Metzger, R. Schmelzeisen, A. Schramm, B. Dott, K.-H. Bormann, N.C. Gellrich, Bone formation after sinus augmentation with engineered bone, *Clin. Oral Implants Res.* 18 (2007) 69–73, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01295.x>.
- [33] C.-G. Liu, Y.-T. Zeng, R.K. Kankala, S.-S. Zhang, A.-Z. Chen, S.-B. Wang, Characterization and preliminary biological evaluation of 3D-printed porous scaffolds for engineering bone tissues, *Materials* 11 (2018), <https://doi.org/10.3390/ma11101832>.
- [34] R.L. Kronenthal, Biodegradable polymers in medicine and surgery, in: R.L. Kronenthal, Z. Oser, E. Martin (Eds.), *Polym. Med. Surg*, Springer US, Boston, MA, 1975, pp. 119–137, [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7744-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7744-3_9).
- [35] S.M. Li, H. Garreau, M. Vert, Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α-hydroxy acids) in aqueous media, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1 (1990) 131–139, <https://doi.org/10.1007/BF00700872>.
- [36] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762–798, <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>.
- [37] V. Hasrcı, K. Lewandrowski, J.D. Gresser, D.L. Wise, D.J. Trantolo, Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application, *J. Biotechnol.* 86 (2001) 135–150, [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00409-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00409-0).
- [38] W.H. Wong, D.J. Mooney, Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering, in: A. Atala, D.J. Mooney (Eds.), *Synth. Biodegrad. Polym. Scaffolds*, 1997, pp. 51–82, [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4154-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4154-6_4).
- [39] C.M. Agrawal, K.A. Athanasiou, Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants, *J. Biomed. Mater. Res.* 38 (1997) 105–114, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199722\)38:2<105::aid-jbm.a>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199722)38:2<105::aid-jbm.a>3.0.co;2-u).
- [40] A. Tiwari, A. Tiwari, *Bioengineered Nanomaterials*, CRC Press, 2013.
- [41] N. Zhang, H.L. Nichols, S. Tylor, X. Wen, Fabrication of nanocrystalline hydroxyapatite doped degradable composite hollow fiber for guided and biomimetic bone tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C* 27 (2007) 599–606, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.024>.
- [42] C. Colnot, Cell sources for bone tissue engineering: insights from basic science, *Tissue Eng. Part B Rev.* 17 (2011) 449–457, <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0243>.
- [43] Z. Xia, Y. Huang, I.E. Adamopoulos, A. Walpole, J.T. Triffitt, Z. Cui, Macrophage-mediated biodegradation of poly(DL-lactide-co-glycolide) in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. A* 79A (2006) 582–590, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30853>.
- [44] S.-S. Kim, M. Sun Park, O. Jeon, C. Yong Choi, B.-S. Kim, Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials.* 27 (2006) 1399–1409, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.08.016>.



### 7.1.2 Conclusions

La combinaison de l'ingénierie tissulaire aux technologies d'impression 3D requiert le développement de matériaux avec des propriétés adaptées. Dans cette première partie d'étude nous avons proposé de développer un matériau composite de PLGA-HA. Les résultats de cette étude ont démontré que les matériaux choisis pouvaient répondre à nos attentes.

Tout d'abord nous avons montré la possibilité de développer des matériaux composites, en PLGA-HA, compatibles pour une impression 3D par dépôt de fil fondu. Des structures précises avec une bonne reproductibilité ont été obtenus. Par ailleurs, les membranes en PLGA-HA 10% présentaient une meilleure résolution comparée aux autres matériaux.

Notre étude a également mis en évidence que les différentes étapes de fabrication n'ont pas eu d'impact significatif sur les propriétés de nos matériaux. Le procédé de fabrication a également permis d'obtenir un chargement en nHA proche de celui attendu. De plus, une bonne distribution de nHA, maintenue tout le long des étapes de production, a pu être observé. Enfin la présence de nHA n'a pas semblé affecter les propriétés mécaniques du PLGA.

Concernant la dégradation de nos matériaux des changements structuraux et mécaniques ont pu être observés. L'érosion de la surface des matériaux chargés en nHA a permis la libération des particules. De plus, la dégradation n'a pas semblé acidifier le milieu car le pH est resté similaire au contrôle.

La biocompatibilité, critère essentiel pour un matériau implantable, a été largement démontrée par les expérimentations *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, aucune cytotoxicité n'a été révélé et les cellules ont été capables de coloniser et de proliférer sur les membranes avec ou sans nHA. Les résultats *in vivo* ont montré que nos membranes étaient légèrement irritantes, selon la norme utilisée pour l'évaluation.

Le potentiel de stimulation de la différenciation ostéoblastique a également été montré *in vitro* avec les matériaux chargés en nHA. Cet effet pouvait être potentialisé en présence de milieu ostéoinducteur. Néanmoins ces résultats ont besoin d'être plus approfondis par des études plus poussées. Il est envisagé de réaliser une étude de l'expression des gènes marqueurs de la différenciation ostéoblastique.

Nos résultats ont montré que les matériaux développés possèdent des propriétés pertinentes pour une application en ingénierie tissulaire osseuse.



## 7.2 Partie II : Développement d'un sandwich cellularisé pour l'ingénierie du tissu osseux

### 7.2.1 Introduction

Les biomatériaux disponibles pour la réparation osseuse sont nombreux et variés, mais ils ne possèdent pas toutes les propriétés nécessaires pour une régénération osseuse complète. Souvent, ils manquent de potentiel ostéoinducteur et ostéogénique. Seules les autogreffes sont en mesure d'apporter ces propriétés, mais leurs limites poussent à trouver des alternatives. De nouvelles approches cliniques d'ingénierie tissulaire osseuse ont émergé en clinique : l'utilisation de cellules souches autologues combinées à un matériau pour améliorer la production de matrice extracellulaire et la maturation du tissu avant implantation (67,72,73).

Différentes sources de cellules peuvent être envisagées, les plus retrouvées étant la moelle osseuse, les tissus dentaires, le tissu adipeux (127). Deux approches sont possibles, les cellules isolées peuvent être amplifiées *in vitro* ou directement réimplantées. La première approche est chronophage et souvent coûteuse ce qui complexifie une translation clinique.

La moelle osseuse est la source de tissu la plus retrouvée et montre des résultats positifs pour la régénération osseuse maxillo-faciale (127). Néanmoins, la collecte de moelle osseuse est une procédure invasive et douloureuse pour le patient. De plus, la fraction fraîchement isolée de moelle osseuse contient une trop faible quantité de cellules souches pour avoir un effet ostéogénique (128). Une utilisation optimale de cette source nécessite donc des étapes d'amplification *in vitro*.

Le tissu adipeux est une source de cellules prometteuse, notamment car son prélèvement est facile et l'isolement de cellules rapide. Les cellules souches isolées, les ADSCs, présentent de fortes similitudes avec les cellules souches issues de la moelle osseuse. Il est également possible d'utiliser la fraction fraîchement collectée, la FVS. La FVS est décrite comme une source de cellules hétérogènes, avec une forte teneur en cellules souches (70,74,127). La littérature montre plusieurs exemples prometteurs pour une application en régénération osseuse (72,73). Prins et al. ont présenté une approche combinant un scaffold commercial avec la FVS dans un contexte d'élévation du sinus maxillaire. Leurs résultats ont montré une meilleure régénération osseuse en présence de la FVS (73).

Cette nouvelle approche montre plusieurs avantages cliniques mais il reste quelques difficultés techniques à résoudre. Une de ces problématiques est liée à la pénétration limitée des cellules dans le scaffold. Ce phénomène est lié à une faible vascularisation qui entraîne des conditions ischémiques à l'intérieur du scaffold (manque d'oxygène et de nutriments). Les nouveaux tissus formés dans ces produits d'ingénierie tissulaire ne sont pas efficaces et la plupart des cellules meurent après implantation.

Dans cette étape du projet, l'objectif était de répondre à cette problématique en organisant la distribution cellulaire au sein du scaffold. Pour cela, nous avons proposé une approche couche par couche, désignée également par le terme « sandwich ». Cette approche a pour but de favoriser l'interaction entre biomatériau et cellules et de faciliter la maturation du produit d'ingénierie tissulaire, pour finalement améliorer la quantité et la qualité du tissu produit. Pour montrer l'intérêt de notre approche « sandwich », nos résultats ont été comparés à une approche conventionnelle désignée par le terme « bloc » (Figure 15). Il faut noter que le volume global des deux matériaux est très similaire (bloc et sandwich assemblé).

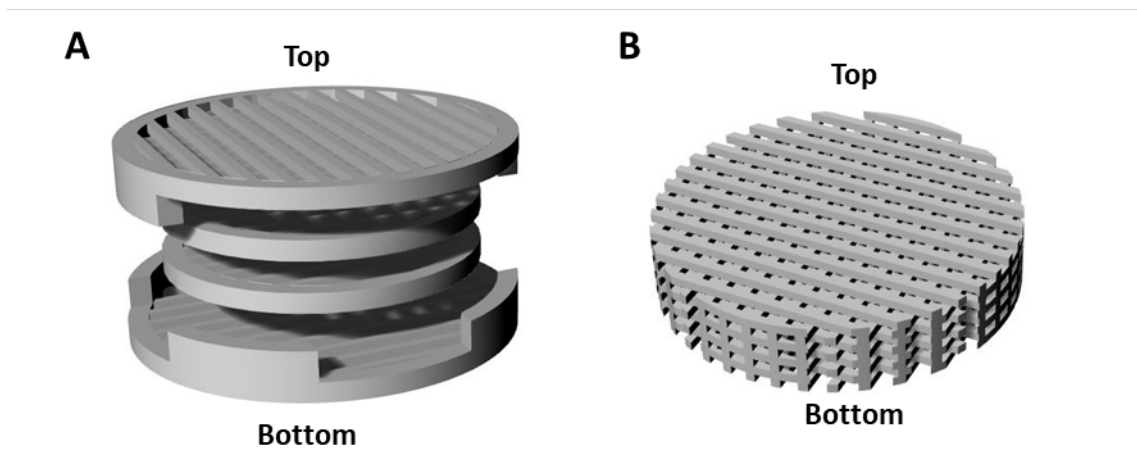


Figure 15. Photos illustrant les modèles Sandwich (A) et Bloc (B). Les structures ont été développées sur le logiciel de modélisation Rhino 6®. Les structures présentaient un diamètre de 7.8mm avec une hauteur de 1.6mm. Elles possédaient des pores de 350\*350  $\mu\text{m}$  et des lignes de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre.

De précédentes études ont montrés plusieurs bénéfices à l'approche de cellularisation couche par couche. La distribution cellulaire était mieux contrôlée et donc plus homogène dans les scaffold (100,120,123). Une meilleure prolifération des cellules était également observée, même après implantation *in vivo* (100). La combinaison de hBMSCs et de cellules endothéliales dans ce type d'approche a également montré une amélioration de la vascularisation au cœur du scaffold (120).

Les précédents résultats ont démontré une bonne biocompatibilité des matériaux composites développés. De plus, la présence d'HA semble avoir un effet positif sur la différenciation des cellules. Dans cette partie, nous avons choisi d'utiliser la FVS du tissu adipeux, afin de se rapprocher d'une situation clinique. La survie, la prolifération et la différenciation des cellules ont été comparées dans l'approche sandwich et l'approche conventionnelle (bloc). Enfin, les propriétés ostéogéniques de nos approches cellularisées ont été vérifiées par implantation dans un modèle de défaut osseux de calvaria.

L'objectif de cette étude était de présenter une approche différente de l'approche conventionnelle pour la cellularisation du scaffold, en utilisant une fabrication en sandwich. Pour évaluer la pertinence de cette approche nous avons comparé le comportement cellulaire (prolifération, différenciation, ...) dans ce type de modèle avec un modèle conventionnel de cellularisation. Nous avons également évalué les bénéfices d'une approche sandwich pour la réparation osseuse. L'intérêt et les limites d'utiliser une source cellulaire comme la FVS ont été présentées et discutées.



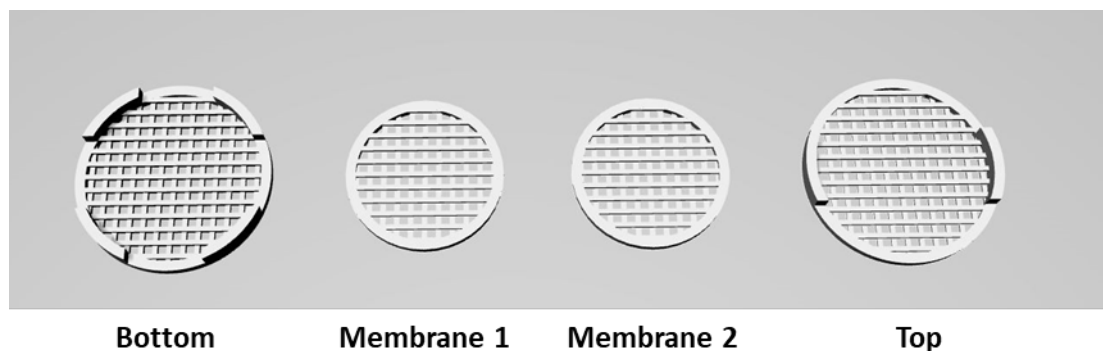
## 7.2.2 Matériel et Méthodes

### 7.2.2.1 Production des matériaux et fabrication des scaffolds

Les nanoparticules d'hydroxyapatite (nHA) ont été synthétisées par précipitation humide selon la méthode décrite par Afshar et al. (129). Une solution d'acide orthophosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) à 0,6 M a été ajoutée goutte par goutte dans une solution d'hydroxyde de calcium ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) à 1 M sous agitation constante et à température ambiante. A la fin de la réaction le pH a été ajusté à 10. Ensuite l'agitation a été poursuivie pendant 1h. Le précipité (nHA) obtenu a été rincé plusieurs fois avant d'être congelé à  $-80^\circ\text{C}$ . Enfin, la nHA a été lyophilisée pendant 12 heures (HETO Power Dry LL1500).

La fabrication des filaments à partir des matières premières a été réalisée par la société RESCOLL (Pessac). Les granules de PLGA (PURASORB® PLG 8218, Corbion) ont été mixés avec la poudre de nHA, pour obtenir un filament chargé à 10% en masse de nHA. Le mélange était ensuite fondu à  $195^\circ\text{C}$  avant d'être extrudé sous la forme d'un filament de 1.75 mm de diamètre (extrusion bi-vis, Pharma 11 HME Thermofisher).

Les différents scaffolds ont été modélisés à l'aide des logiciels Rhino 6® et Clump generator software®. Pour cette partie de l'étude nous avons modélisé des scaffolds comme présenté dans la Figure 16. Les sandwichs étaient constitués d'un assemblage de 4 membranes de  $400\ \mu\text{m}$  d'épaisseur avec des pores de  $350*350\ \mu\text{m}$  ( $0.122\ \text{mm}^2$ ) et des lignes of  $200\ \mu\text{m}$  d'épaisseur. La membrane inférieure, désignée par Bottom, et la membrane supérieure, désignée par Top, avaient un diamètre de 7.8 mm. Les membranes intermédiaires, membrane 1 et 2, avait un diamètre de 7.6 mm. Les blocs macroporeux étaient des cylindres de 1.6 mm d'épaisseur ( $4*400\ \mu\text{m}$ ) avec des pores de  $350*350\ \mu\text{m}$  ( $0.122\ \text{mm}^2$ ) et des lignes of  $200\ \mu\text{m}$  d'épaisseur.



*Figure 16. Structures des différentes unités de l'assemblage sandwich. Les structures ont été développées sur le logiciel de modélisation Rhino 6®. Les structures possédaient des pores de  $350*350\ \mu\text{m}$  et des lignes de  $200\ \mu\text{m}$  de diamètre. L'assemblage formait un cylindre de 7.8 mm de diamètre et de 1.6 mm de hauteur.*

Les scaffolds ont été fabriqués en utilisant notre imprimante 3D FDM sur mesure (MicroPrint, IUT de Bordeaux, France) avec une buse de  $400\ \mu\text{m}$ . Les températures utilisées pour

l'extrusion des filaments étaient de 165-170°C et 175-180°C pour l'impression respective du PLGA-HA 10% et du PLGA. Avant toutes expérimentations les scaffolds ont été stérilisés par irradiation aux rayons gamma (25 kGy, Nordion®, GC 3000).

#### 7.2.2.2 Isolement des cellules

La fraction vasculaire stromale (FVS) a été collectée sur des rats femelles Wistar âgées de 12 semaines.

Pour les études *in vitro*, les rats ont été euthanasiés au préalable par induction au CO<sub>2</sub>. La zone d'incision cutanée a été désinfectée par application d'éthanol. Une incision abdominale longitudinale a été réalisée pour accéder au péritoine, puis une seconde pour accéder au tissu adipeux abdominal.

Pour les études *in vivo*, nous avons utilisé un modèle autologue. Les rats n'étaient donc pas sacrifiés pour le prélèvement. La chirurgie a été réalisée en conditions stériles. Les rats ont été anesthésiés par inhalation de 4% d'isoflurane (Air :1.5 L/min) et maintenue à 2% d'isoflurane (Air : 0.4 L/min). L'analgésie a été effectuée par une injection péritonéale de 0.1 mg/kg de buprénorphine (Buprecare®, 0.3 mg/ ml). Le site chirurgical a été rasé et aseptisé (Figure 17A). Une incision d'environ 1 cm a été réalisée en bas de l'abdomen pour accéder au péritoine (Figure 17B). Une seconde incision a permis d'accéder à la graisse abdominale (Figure 17C). Une fois le prélèvement effectué, la plaie a été suturée par un fil résorbable (Vicryl Ethicon, 4/0) (Figure 17D).

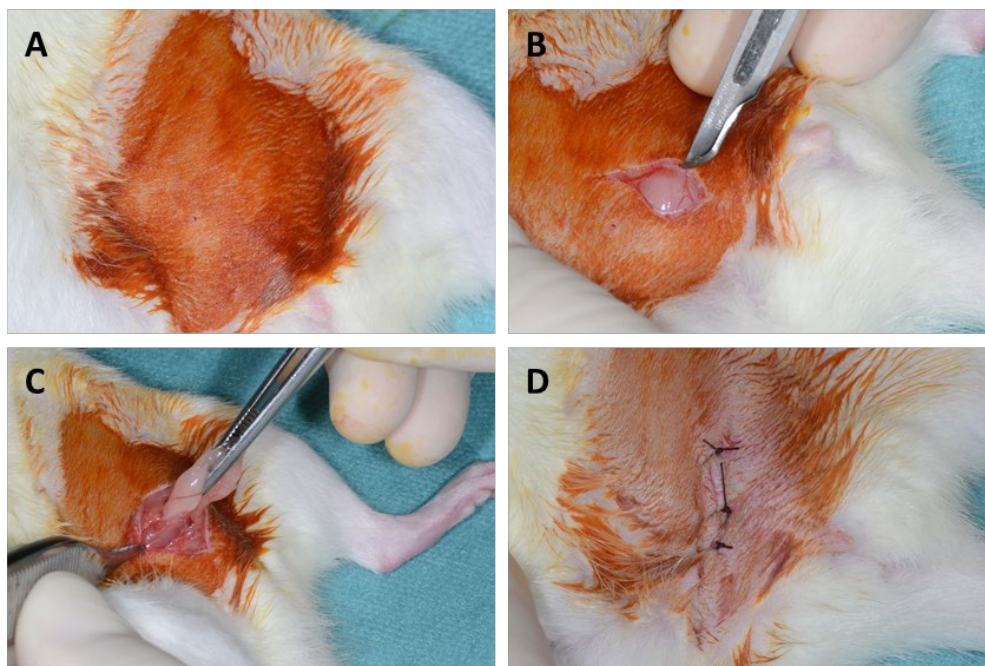


Figure 17. Illustration des étapes du prélèvement du tissu gras pour les études *in vivo*. (A) Le site chirurgical a été désinfecté. (B) Une première incision a permis d'accéder au péritoine. (C) Après incision du péritoine le tissu adipeux était accessible pour réaliser le prélèvement. (D) La plaie a été suturée par des points séparés.

Les prélèvements ont été placés dans une solution de PBS 1X avec 1% d'antibiotiques (Pen Strep, Gibco®). Une première digestion mécanique a été effectuée, par découpe des tissus à l'aide de ciseaux stériles. Les tissus ont ensuite été digérés par une solution enzymatique de Collagénase de type I pendant 30 mn à 37°C (GIBCO™, 250 U/mL dans du DMEM Low Glucose (LG) + GlutaMax™).

L'action de la collagénase a été arrêtée par ajout de milieu complet (DMEM LG + GlutaMax™ + 10% SVF). Une centrifugation à 200G pendant 5 mn a permis de culoter les cellules isolées. Le culot a ensuite été re-suspendu avec du milieu complet avant d'être de nouveau centrifugé à 200G pendant 5 mn. Cette deuxième centrifugation permet de s'assurer de l'élimination des adipocytes qui flottent en surface. Le culot obtenu correspond à la fraction vasculaire stromale (FVS).

### 7.2.2.3 Culture cellulaire et ensemencement

Les scaffolds (bloc et sandwich) ont été ensemencés selon le même protocole pour les études *in vitro* et *in vivo*.

Le comptage des cellules était très complexe car l'isolat contenait beaucoup d'impuretés. Nous avons donc choisi de raisonner en quantité de tissu adipeux (mg)/matériaux pour nos ensemencements. Du fait de la quantité de tissu adipeux récupéré habituellement, les matériaux ont été ensemencés avec 200 mg de tissu adipeux chacun.

Les matériaux ensemencés étaient conservés dans des plaques 24 puits, dont les puits étaient revêtus d'agarose 2%. Ce revêtement avait deux fonctions :

- Empêcher les cellules d'adhérer préférentiellement au puit plastique
- Permettre la mise en place d'agrafes pour maintenir les scaffolds

Les sandwiches étaient cultivés pendant 7 jours avant assemblage, pour permettre une bonne adhésion des cellules.

Selon les expérimentations, les matériaux cellularisés étaient maintenus en conditions de culture « classiques » (DMEM LG + GlutaMax™ + 10% SVF) ou en condition d'ostéodifférenciation (DMEM LG + GlutaMax™ + 10% SVF +  $1 \times 10^{-9}$  M dexaméthasone, 10 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 50  $\mu$ g/mL acide ascorbique). Le milieu d'ostéodifférenciation était ajouté après 7 jours de culture en milieu « classique ».

### 7.2.2.4 Comportement cellulaire

Le comportement cellulaire a été étudié après différents temps de culture dans les conditions suivantes : puit plastique, bloc de PLGA ou PLGA-HA 10%, sandwich de PLGA ou PLGA-HA 10%.

L'activité métabolique cellulaire a été étudiée par un test Alamar Blue pendant 35 jours de culture dans les différents scaffolds. Ce test est basé sur la mesure de la dégradation de la

molécule de résazurine : réactif de couleur bleu non fluorescent qui se transforme en un réactif rose fluorescent lorsqu'il est réduit. Cette dégradation est le reflet du métabolisme cellulaire puisqu'elle est assurée par des réductases mitochondriales et cytoplasmiques. Les données obtenues sont souvent utilisées pour estimer une prolifération cellulaire.

Pour la mesure le milieu était retiré et remplacé par du milieu supplémenté en Alamar Blue (10 µg/mL). Après 2h d'incubation à 37°C, le milieu est prélevé pour une lecture de l'absorbance à 550 nm avec un lecteur de plaque (Victor X3 2030 Perkin Elmer).

La viabilité cellulaire dans les différents scaffolds a été évaluée par un test Live/Dead® (Invitrogen). Dans les cellules vivantes, le colorant non fluorescent l'acétoxyméthyl calcéine (AM) est transformé par l'activité estérase intracellulaire en calcéine fluorescente (verte). L'homodimère-1 d'éthidium 12 (EthD-1) rouge fluorescent pénètre dans les cellules dont les membranes plasmiques sont lysées (cellules mortes) et se lie à l'ADN double brin.

La solution de Live/Dead® a été préparée selon les recommandations du fabricant. L'activation de la solution Live/Dead® a été réalisée à 37°C pendant 15 mn à l'abri de la lumière. Les matériaux cellularisés et les cellules sur plastique ont été incubés avec la solution de Live/Dead® pendant 15 mn à 37°C. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SPE 5 DMI 4000B).

#### 7.2.2.5 Evaluation de la différenciation cellulaire

- **Activité phosphatase alcaline**

L'activité phosphatase alcaline (PAL) est un marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique. Cette activité a été évaluée qualitativement par un marquage réalisé à l'aide d'un kit (Sigma-Aldrich). Le marquage a été réalisé en suivant les recommandations du fournisseur, après 7 et 14 jours de culture pour les conditions suivantes : puit plastique, bloc de PLGA ou PLGA-HA 10%, sandwich de PLGA ou PLGA-HA 10%.

Les puits de cultures ont été rincés au PBS 1X avant d'être fixées 30 sec dans un mélange citrate (18 mM acide citrique, 9 mM citrate de sodium, 12 mM chlorure de sodium), d'acétone et de formaldéhyde. Les puits ont été une nouvelle fois rincés avant d'ajouter la solution de coloration réalisée par un mélange de Nitrate de sodium (0.1 M), Fast Red violet (5mg/mL), et de Naphtol (4mg/mL, pH 9,5). L'incubation a duré 30 mn à température ambiante. Les puits ont été une nouvelle fois rincés.

Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'une loupe binoculaire (Leica®, MZ10F).

- **Rouge Alizarine**

Le rouge alizarine est utilisé pour mettre en évidence les dépôts calciques en se fixant au calcium par un processus de chélation. Cette réaction permet la formation de complexes rouge alizarine-Calcium, composé biréfringent dont les dépôts apparaissent en rouge.

La synthèse de matrice minérale a été évaluée après 4 semaines de culture pour les conditions suivantes : puit plastique, bloc de PLGA ou PLGA-HA 10%, sandwich de PLGA ou PLGA-HA 10%.

Les cellules ont d'abord été fixées au PFA 4% pendant 10 mn. Une fois rincé, la solution de Rouge Alizarine (2%, pH 4.2) était ajoutée puis incubée 10 mn à TA. Pour éliminer l'excédent de colorant les matériaux ainsi que les cellules sur plastique ont été rincés au PBS jusqu'à obtenir une solution incolore. Les acquisitions des images ont été réalisées à l'aide d'une loupe binoculaire (Leica®, MZ10F).

La quantification de la coloration a été réalisée par extraction au chlorure de cétypyridinium (100 mM) pendant 1h à température ambiante. Le surnageant a ensuite été prélevé pour réaliser une mesure d'absorbance à 570 nm (Victor X3 2030 Perkin Elmer).

#### 7.2.2.6 Implantation dans un modèle de défaut osseux de calvaria

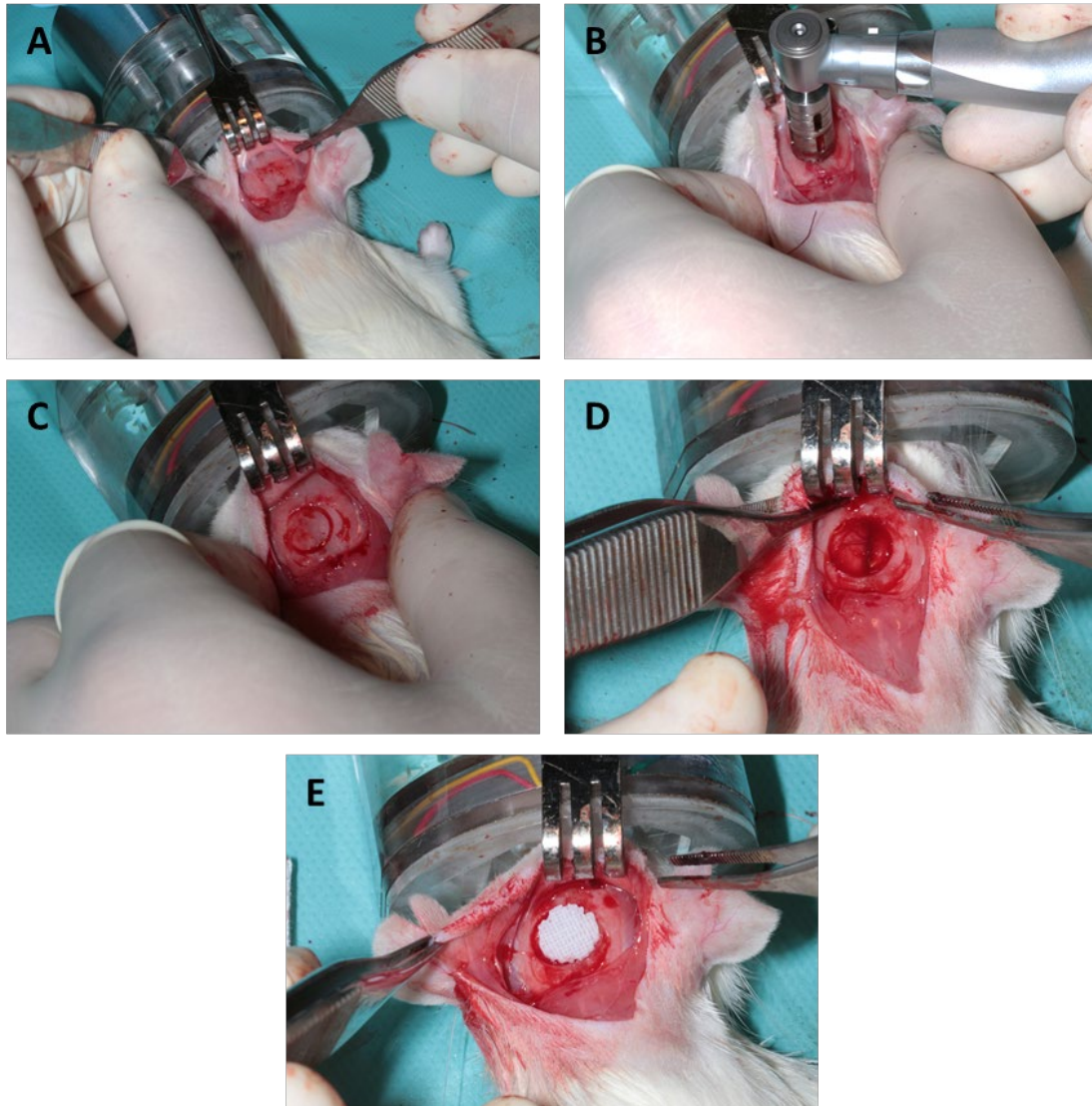
Les procédures chirurgicales ont été basées sur les principes *Laboratory Animal Care* formulés par la *National Society for Medical Research* et ont été approuvées par le Comité d'éthique sur l'expérimentation animale de l'Université de Bordeaux (Réf. DAP 18957 -V9-2019013010124885). Les expériences ont été réalisées dans une animalerie accréditée, suivant les recommandations européennes pour le soin des animaux de laboratoire (EU Directive 2010/63/EU). Des rats femelle Wistar âgées de 12 semaines (Charles Rivers, France) ont été utilisés pour ces expériences.

La procédure chirurgicale est basée sur l'article de Spicer et al. (130). Les rats ont été anesthésiés par une inhalation de 4% d'isoflurane (Air :1.5 L/min), maintenue à 2% d'isoflurane (Air : 0.4 L/min) pendant l'opération. L'analgésie a été réalisée par une injection péritonéale de 0.1 mg/kg de buprénorphine (Buprecare®, 0.3 mg/ ml). Le site chirurgical a été rasé et désinfecté (Bétadine). Une incision médiane a été réalisée sur le crâne et l'os de la calvaria a été exposée (Figure 18A). Un défaut circulaire central de 8 mm a été créé à l'aide d'un trépan adapté sur contre-angle chirurgical (Henry Schein) (Figure 18B-D). Le site chirurgical était irrigué avec du sérum physiologique pendant toute la durée de l'opération

Différentes conditions ont été testées :

- Défaut vide, condition contrôle permettant de s'assurer de la taille critique du défaut.
- Défaut comblé par un Sandwich PLGA-HA 10%
- Défaut comblé par un Bloc PLGA-HA 10%
- Défaut comblé par un Sandwich PLGA-HA 10% cellularisé avec la FVS
- Défaut comblé par un Bloc PLGA-HA 10% cellularisé avec la FVS

A la fin de la procédure les tissus ont été repositionnés et suturés à l'aide d'un fil résorbable (Vicryl Ethicon, 4/0). Les animaux ont été placés dans un environnement chaud jusqu'à leur réveil, avant leur retour à l'animalerie. Une nouvelle analgésie a été réalisée 24h après l'opération par une injection péritonéale de 0.1 mg/kg de buprénorphine (Buprecare®, 0.3 mg/ml).



*Figure 18. Illustration des étapes pour la création d'un défaut osseux de calvaria chez le rat. (A) Une première incision a permis d'exposer la calvaria. (B-D) Un défaut central a été réalisé dans la calvaria à l'aide d'un trépan de 8 mm. (E) Mise en place du matériau dans le défaut osseux.*

Après 2 mois, les animaux ont été sacrifiés par asphyxie au CO<sub>2</sub>. Les calvaria ont été explantées et fixées dans de l'ANTIGENFIX (MM France) pendant 24h à 4°C afin de les conserver pour les analyses.

#### 7.2.2.7 Evaluation de la régénération osseuse par microscanner

Les explants de calvaria ont été analysés au microscanner pour évaluer la réparation osseuse dans les différentes conditions. Ces acquisitions ont été réalisées à la plateforme « Imageries du Vivant » de l'Université Paris Descartes avec un microscanner à rayons X (Quantum FX Caliper, Life Sciences, Perkin Elmer, Waltham, MA). La source de rayons X était calibrée à 90 kV et 160  $\mu$ A. Les images tridimensionnelles ont été acquises avec un champ de vision de 20 mm et une taille de pixels isotropes de 40  $\mu$ m. Une haute résolution 3D des données brutes a été permise par la rotation de la source et du détecteur à panneau plat de 360° autour de l'échantillon. Les reconstructions 3D et l'analyse des données a été réalisée sur le logiciel Microview © (GE Healthcare).

#### 7.2.2.8 Evaluation histologique de la régénération osseuse

Les calvarias ont été décalcifiées pendant 1 semaine sous agitation et à température ambiante. La solution de décalcification (Microdec DIAPATH, MM France) était changée tous les 2 jours.

Ensuite, les échantillons ont été déshydratés dans des bains successifs à concentration d'éthanol croissante. Puis, les échantillons ont été plongés dans des bains d'OTTIX PLUS (MM France) pour parfaire la déshydratation. Les échantillons ont ensuite été inclus en paraffine en 2 étapes. Une première imprégnation était réalisée dans un bain de paraffine à 60°C pendant 24h. Enfin, les échantillons ont été inclus en paraffine. Les coupes (10  $\mu$ m) réalisées ont été colorées au Trichrome de Masson selon la procédure suivante. Avant de commencer la coloration, les lames ont été déparaffinées par 3 bains d'OTTIX. Les échantillons ont ensuite été réhydratés par des bains successifs d'éthanol à concentration décroissante. Ensuite les lames ont été colorées par trois solutions différentes pour mettre en évidence les différents tissus : l'Hémalun, un mélange Fushine – Ponceau et le Vert Lumière. La procédure colore en rouge les fibres musculaires, en bleu/vert le collagène et l'os, en rouge-clair ou rose les cytoplasmes, et en noir les noyaux de cellules.

Ensuite, les échantillons ont été déshydratés par des bains successifs d'éthanol à concentration croissante, suivis de 3 bains d'OTTIX, pour la conservation des échantillons. Enfin, un montage entre lame et lamelle était réalisé à l'aide d'un milieu de montage (Diamount, MM France). Des acquisitions ont ensuite été réalisées avec un scanner de lames (Hamamatsu Nanozoomer 2.0 HT).

#### 7.2.2.9 Analyses statistiques

Les données ont été exprimées comme la moyenne des différentes valeurs obtenues avec la déviation standard et n indiquant le nombre d'échantillons testés par conditions. Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism® (La Jolla/CA, USA). Premièrement, un test de normalité était effectué en utilisant le test de Shapiro-Wilk. Après avoir vérifié que les données présentaient une distribution Gaussienne, les différences entre les conditions étaient testées par une analyse de la variance à 1 facteur (ANOVA) suivi d'un test post-hoc de

Tukey. Les différences significatives ont été marquées par des étoiles, avec \* indiquant  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .



## 7.2.3 Résultats

### 7.2.3.1 Comportement cellulaire

L'activité métabolique des cellules a été suivie pendant 35 jours à l'aide d'un test Alamar Blue (Figure 19). Dans la condition contrôle, où les cellules sontensemencées sur un simple puit plastique (Plastic), une augmentation de l'activité a été observée jusqu'au 21<sup>e</sup> jour en condition de culture basique ou d'ostéodifférenciation (Figure 19). L'apparition d'un pic d'activité au 24<sup>e</sup> jour, a ensuite été suivi par une chute drastique au 28<sup>e</sup> jour (Figure 19B). Ce pic d'activité a semblé plus important en présence de milieu ostéoinducteur. L'évolution de l'activité métabolique était similaire entre les conditions Sandwich (S) et Bloc (B), que ce soit avec le PLGA (P) ou le PLGA-HA 10% (H). Cette évolution n'a pas semblé être affectée par les conditions de culture, avec ou sans milieu ostéoinducteur. Pour les différents scaffolds, une augmentation de l'activité a été observée jusqu'au 24<sup>e</sup> jour, puis l'activité a été stable jusqu'au 35<sup>e</sup> jour (Figure 19).

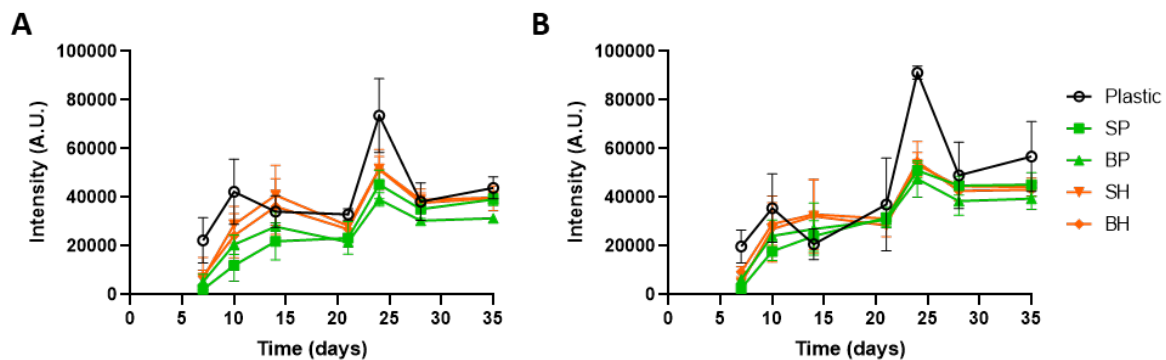


Figure 19. Activité métabolique des cellules mesurée par un test Alamar blue. Les cellules (FVS) ont été ensemencées sur simple puit plastique (Plastic), sur un sandwich en PLGA (SP) ou en PLGA-HA 10% (SH) et sur un bloc en PLGA (BP) ou en PLGA-HA 10% (BH). Les scaffolds ont été placés dans des conditions de culture « classiques » (A) ou en conditions de différenciation (B). Données = moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

La viabilité des cellules dans les différents approches, sandwich et bloc, a été étudiée par un test Live-Dead. Après 7 jours de culture, une bonne viabilité cellulaire a été observée (Figure 20). Toutefois la quantité de cellules présentes sur les matériaux était relativement faible et la répartition était hétérogène (Figure 20). Aucune différence n'a été observée entre les sandwichs en PLGA et en PLGA-HA 10%. Pour les blocs, quel que soit le matériau, les cellules ont généralement semblé plus nombreuses sur la face « Top » que sur la face « Bottom » (Figure 20). Après 14 jours de culture, les cellules présentaient toujours une bonne viabilité et apparaissaient plus nombreuses sur les scaffolds (Figure 21). Les cellules semblaient encore plus nombreuses sur la face « Top » que la face « Bottom » pour les blocs de PLGA et PLGA-HA 10% (Figure 21). Après 28 jours de culture, la viabilité cellulaire était toujours très importante et les scaffolds étaient complètement recouverts de cellules (Figure 22). Aucune différence n'a été observée entre les matériaux en PLGA et ceux en PLGA-HA 10%. La densité de cellules a semblé plus importante sur les blocs que sur les sandwichs (Figure 22). Les blocs étaient mieux colonisés par les cellules sur les faces « Top » et « Bottom » qu'aux précédents temps d'observation (Figure 22).

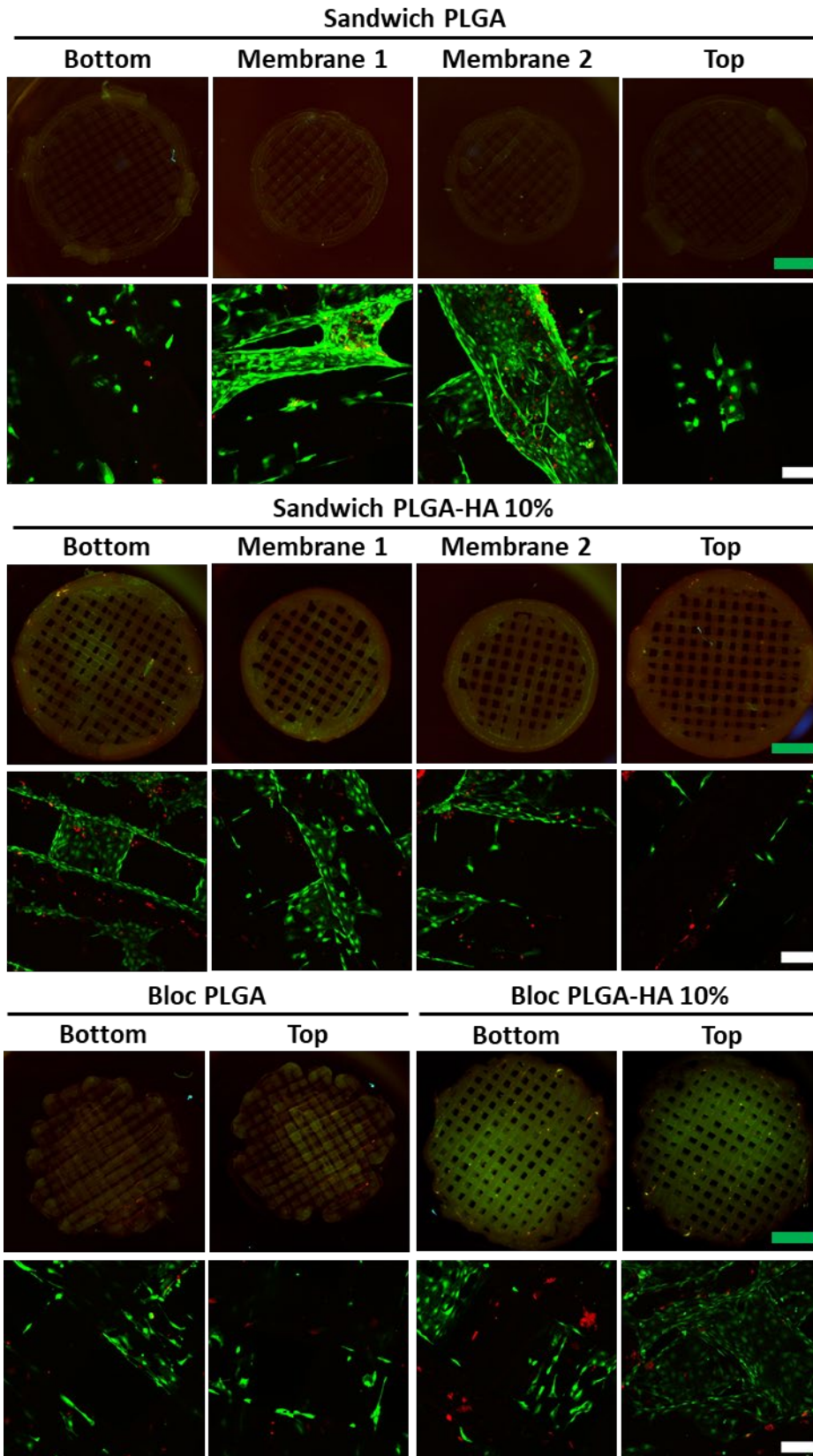


Figure 20. Evaluation de la viabilité cellulaire après 7 jours de culture. Les cellules ont étéensemencées sur des blocs ou des sandwiches en PLGA ou PLGA-HA 10%. La viabilité a été évaluée après 7 jours de culture en conditions « classiques » par un test Live-Dead. Des acquisitions ont été réalisées à la loupe binoculaire (Echelle verte = 2 mm) et au microscope confocal (Echelle blanche = 100  $\mu$ m)

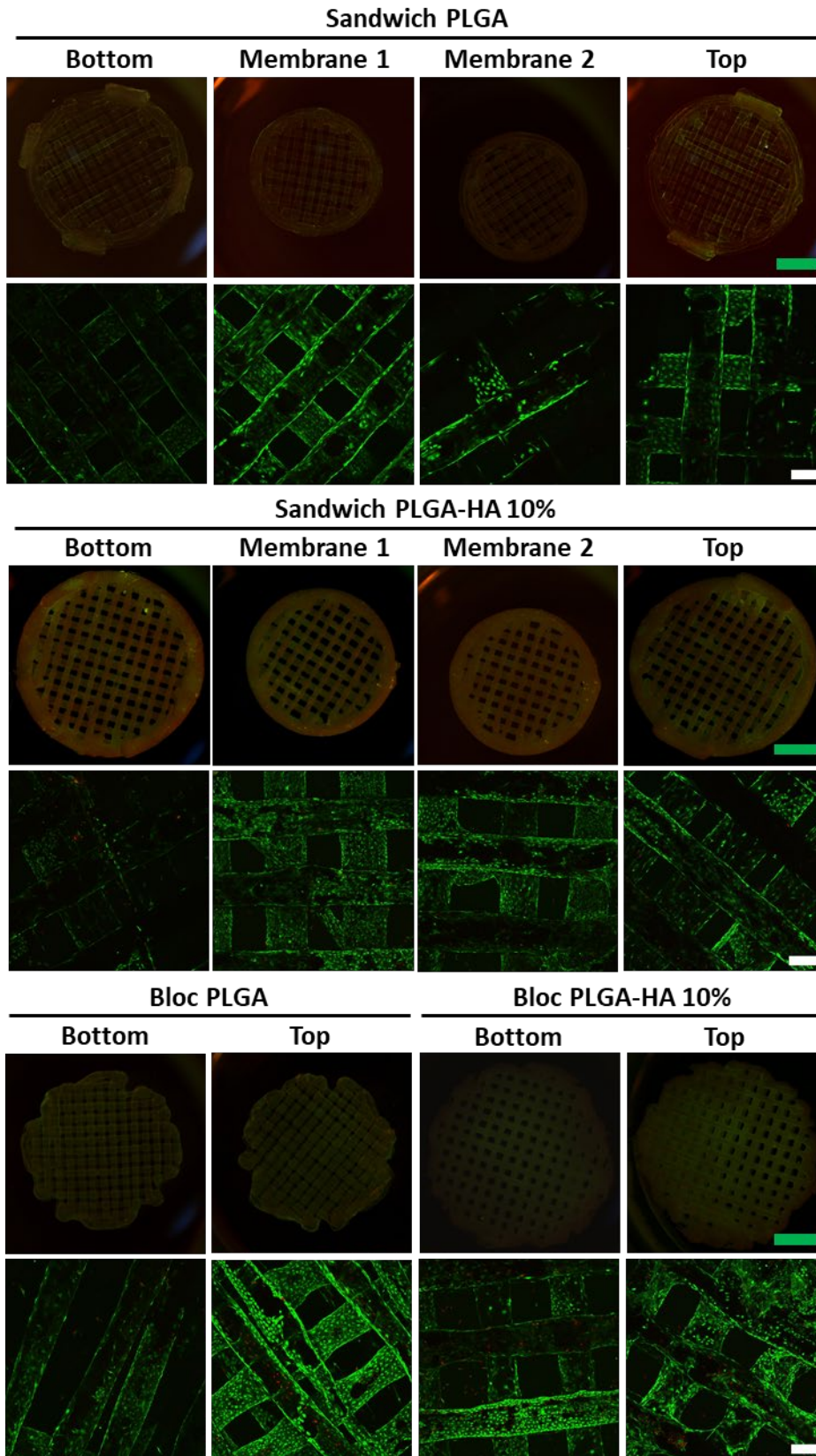


Figure 21. Evaluation de la viabilité cellulaire après 14 jours de culture. Les cellules ont étéensemencées sur des blocs ou des sandwiches en PLGA ou PLGA-HA 10%. La viabilité a été évaluée après 7 jours de culture en conditions « classiques » par un test Live-Dead. Des acquisitions ont été réalisées à la loupe binoculaire (Echelle verte = 2 mm) et au microscope confocal (Echelle blanche = 200  $\mu$ m)

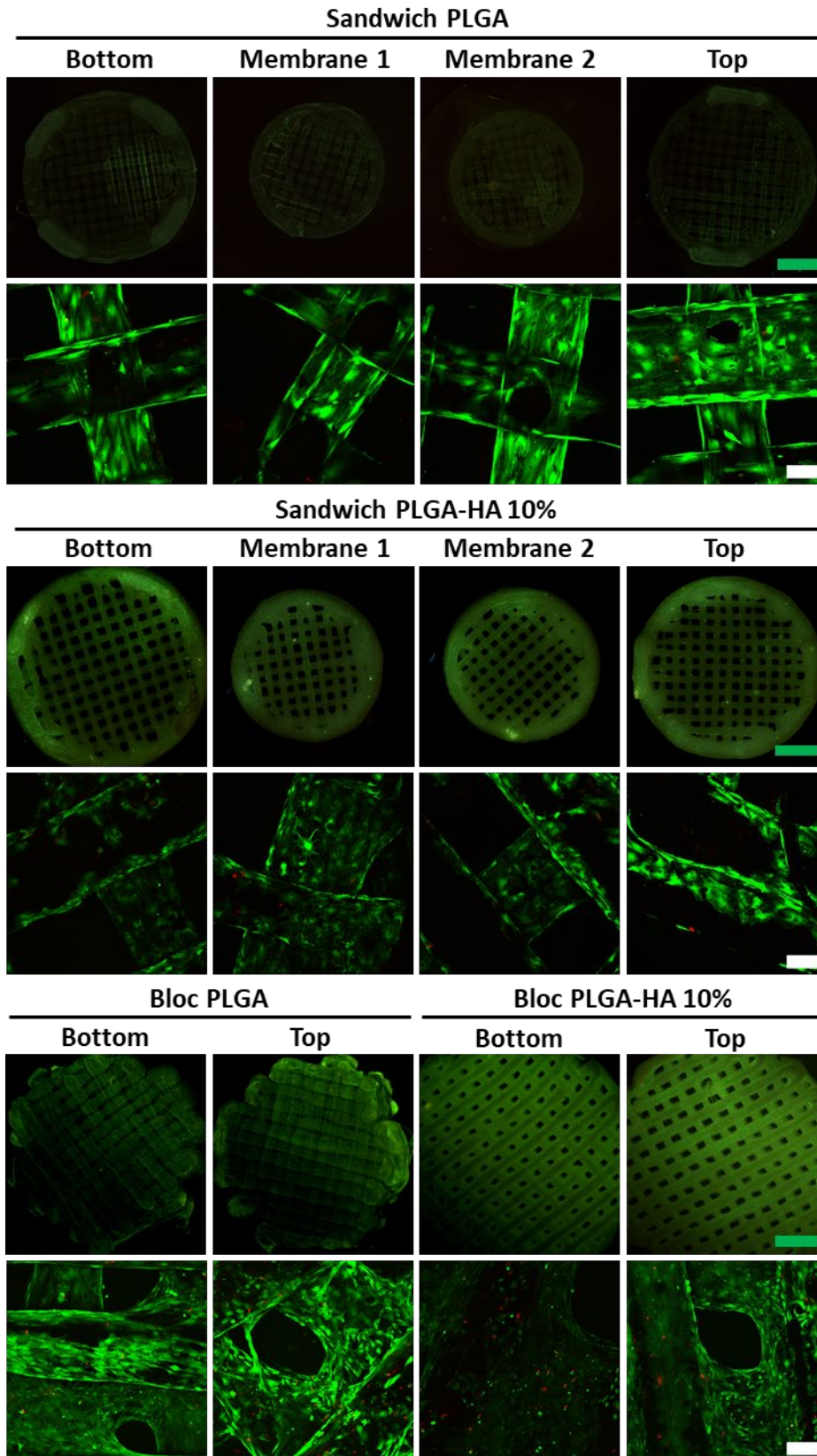


Figure 22. Evaluation de la viabilité cellulaire après 28 jours de culture. Les cellules ont étéensemencées sur des blocs ou des sandwiches en PLGA ou PLGA-HA 10%. La viabilité a été évaluée après 7 jours de culture en conditions « classiques » par un test Live-Dead. Des acquisitions ont été réalisées à la loupe binoculaire (Echelle verte = 2 mm) et au microscope confocal (Echelle blanche = 100  $\mu$ m).

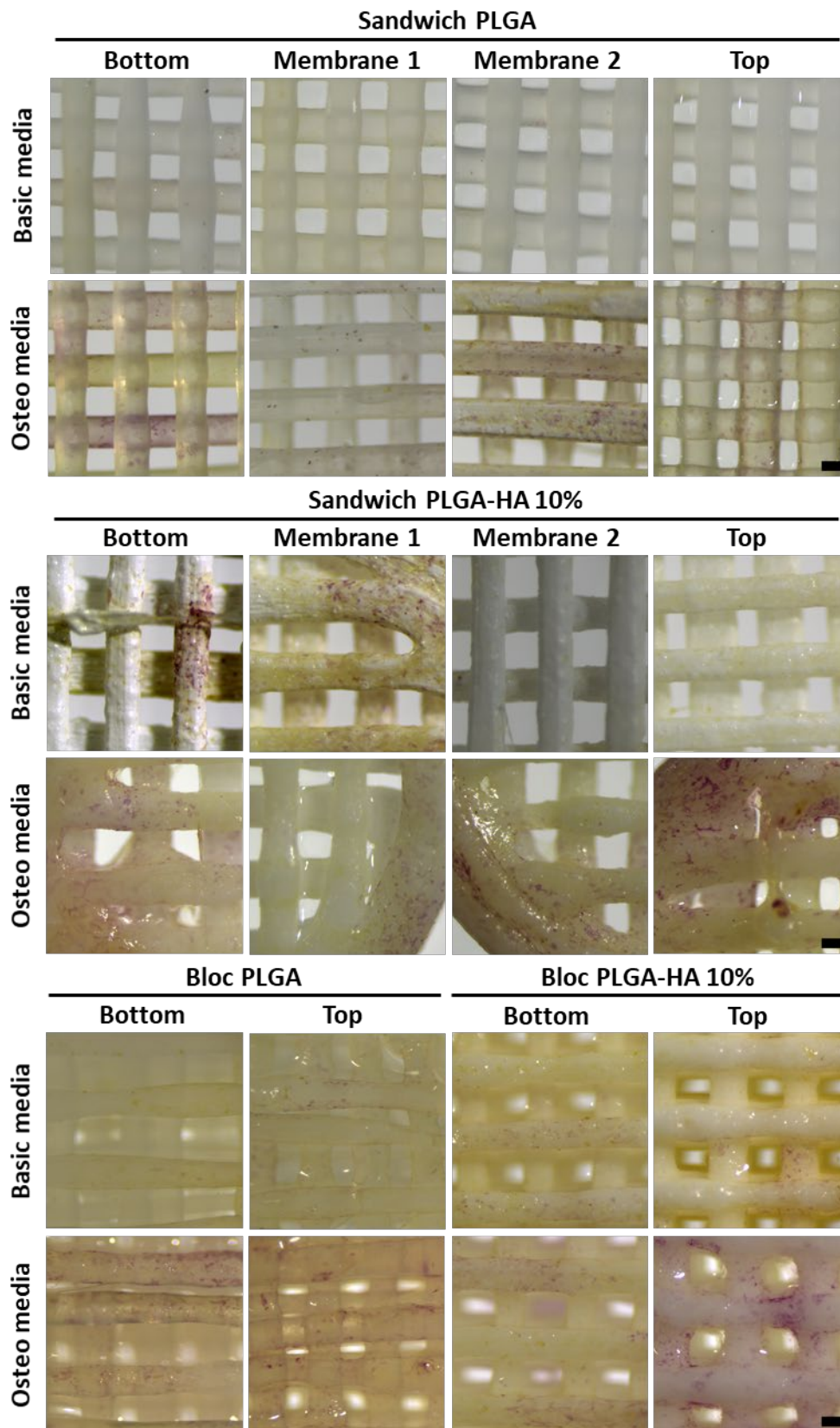


Figure 23. Observation de l'activité phosphatase alcaline (PAL). Les cellules ont étéensemencées sur des blocs ou des sandwiches en PLGA ou PLGA-HA 10%. L'activité PAL a été évaluée après 14 jours de culture en conditions « classiques » ou d'ostéodifférenciation par un marquage spécifique. Les acquisitions ont été réalisées à la loupe binoculaire (Echelle = 200  $\mu$ m).

### 7.2.3.2 Evaluation de la différenciation cellulaire

La différenciation cellulaire a été évaluée par un marquage qualitatif de l'activité phosphatase alcaline (Figure 22). L'activité phosphatase alcaline est connue pour être un marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique. Cette évaluation a été réalisée à différents temps en présence ou non de milieu ostéoinducteur. Le milieu ostéoinducteur était ajouté après 7 jours de culture en milieu « classique ».

Après 7 jours de culture en conditions « classiques », aucun marquage n'était observé dans les différentes conditions. Après 14 jours de culture en conditions « classiques », aucun marquage n'a été observé sur les matériaux en PLGA (Figure 23). Les matériaux en PLGA-HA 10% présentaient quelques rares marquages localisés (Figure 23). Après 14 jours de culture en condition de différenciation (7 jours milieu « classique » + 7 jours milieu ostéoinducteur) un marquage plus prononcé a été observé sur les scaffolds en PLGA et PLGA-HA 10% (Figure 23). Aucune différence n'a été observé entre les différents matériaux, ni entre les conditions bloc et sandwich.

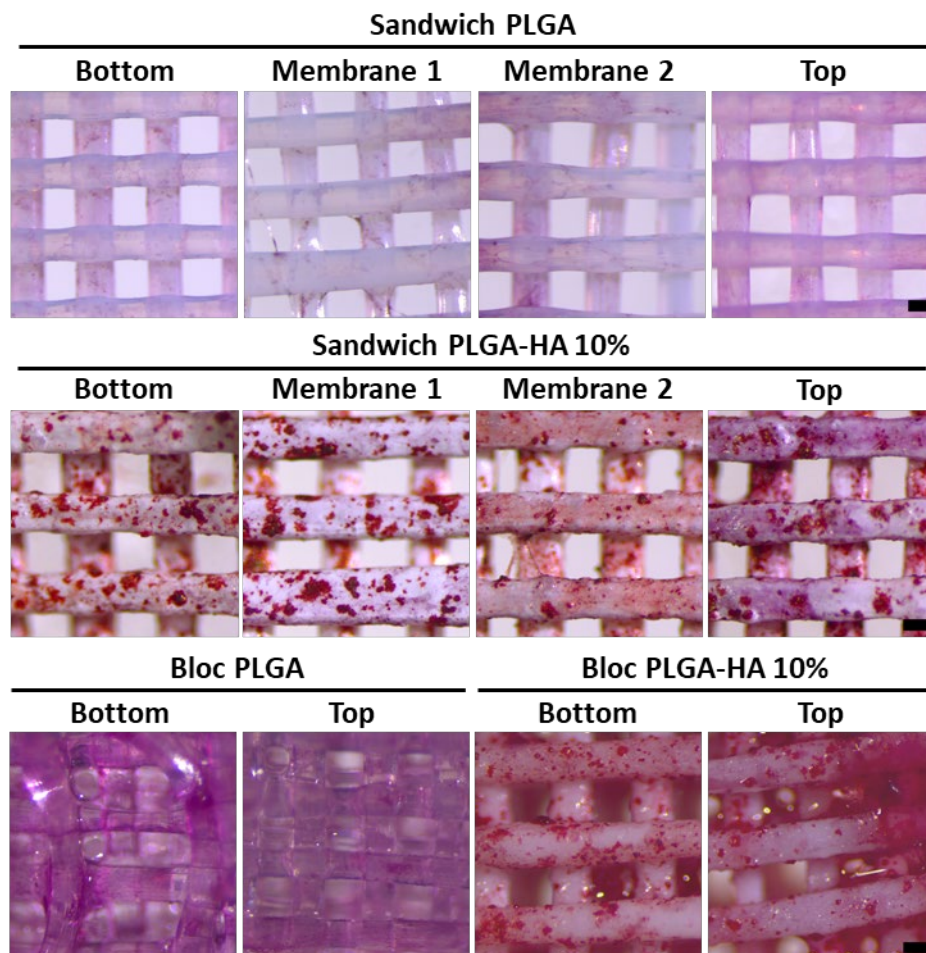


Figure 24. Evaluation de la synthèse de matrice minérale. Les cellules ont étéensemencées sur des blocs ou des sandwiches en PLGA ou PLGA-HA 10%. La synthèse de matrice minérale a été évaluée après un mois de culture par une coloration au rouge Alizarine (Echelle = 200µm).

La synthèse de matrice minérale a été évaluée après un mois de culture en conditions de culture « classiques » (Figure 24). Pour les matériaux en PLGA, dans les conditions bloc ou sandwich, une légère coloration rosée a été observée signifiant que la minéralisation était assez faible (Figure 24). Pour les matériaux en PLGA-HA 10%, des tâches rouges ont été observées (Figure 24). La minéralisation était significativement supérieure à la condition contrôle et aux conditions avec les matériaux en PLGA. Ces observations ont été validées par la quantification de la coloration extraite des scaffolds (Figure 25). Les données ont montré que les matériaux en PLGA-HA 10% permettaient d'obtenir une minéralisation statistiquement plus importante que les matériaux en PLGA. Pour les matériaux en PLGA, la minéralisation observée était similaire à la condition contrôle (cellules sur plastique).

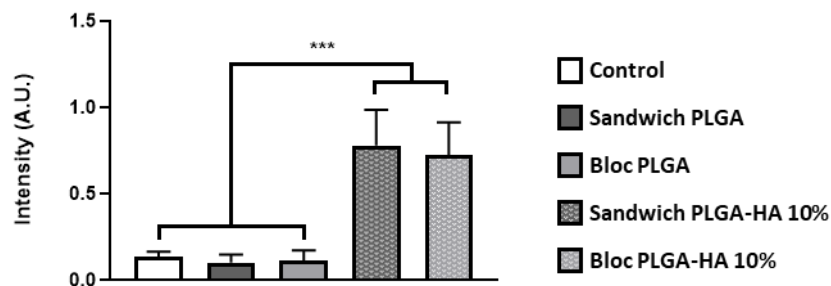


Figure 25. Quantification de la synthèse de matrice minérale. L'intensité de coloration a été quantifiée, après extraction au CPC, par une lecture d'absorbance à 570 nm. Données = moyenne  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). Les différences significatives ont été marquées par des étoiles, avec \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 7.2.3.3 Evaluation de la régénération osseuse

Les différents scaffolds, cellularisés ou non, ont été implantés dans des défauts osseux de calvaria de rat. Après deux mois, les animaux ont été sacrifiés et les calvarias ont été prélevées pour analyser le potentiel de régénération osseuse des différentes approches. L'observation des calvaria a montré une bonne intégration des matériaux dans la majorité des cas (Figure 26A). Nous avons observé que 2 scaffolds ne semblaient pas du tout inclus, un sandwich cellularisé et un bloc cellularisé, car ils semblaient mobiles. Trois sandwichs étaient également « démontés », deux cellularisés et un non cellularisé.

Les explants de calvaria ont été analysés par microscanner pour évaluer la formation osseuse (Figure 26). L'observation des reconstructions 3D a montré que la réparation avait majoritairement eu lieu en périphérie du défaut (Figure 26B). Les données obtenues ont permis de quantifier le volume osseux formé (BV/TV) et la densité minérale (BMD). Le volume d'os formé entre la condition contrôle (témoin négatif) et les scaffolds non cellularisés n'était pas significativement différent (Figure 26C). L'ajout de cellules dans les conditions bloc et sandwich n'a pas amélioré la formation osseuse. La formation d'os observée pour la condition sandwich cellularisé était même significativement inférieur à la condition contrôle (Figure 26C). Des écart types importants ont été observés, ce qui signifie qu'il y a une variation importante dans la réparation osseuse au sein d'une même condition. La densité minérale était similaire dans les différentes conditions (Figure 26D). Ce résultat signifie que la qualité de l'os formé dans les différentes conditions était similaire.

Des coupes transversales ont été réalisées dans les explants de calvaria (Figure 27). Les coupes obtenues ont été colorées au trichrome de Masson. Les pores observés sur les coupes correspondent aux structures des scaffolds qui ont été éliminés lors des étapes de coloration. De l'os néoformé a été observé en périphérie du défaut dans les différentes conditions (Figure 28). Nous avons également noté la présence d'os néoformé au cœur des blocs et des sandwiches, indépendamment de la présence de cellules (Figure 28). Cette observation montre que, bien que la présence des scaffolds n'a pas semblé contribuer à la formation osseuse, elle n'a néanmoins pas été un frein.

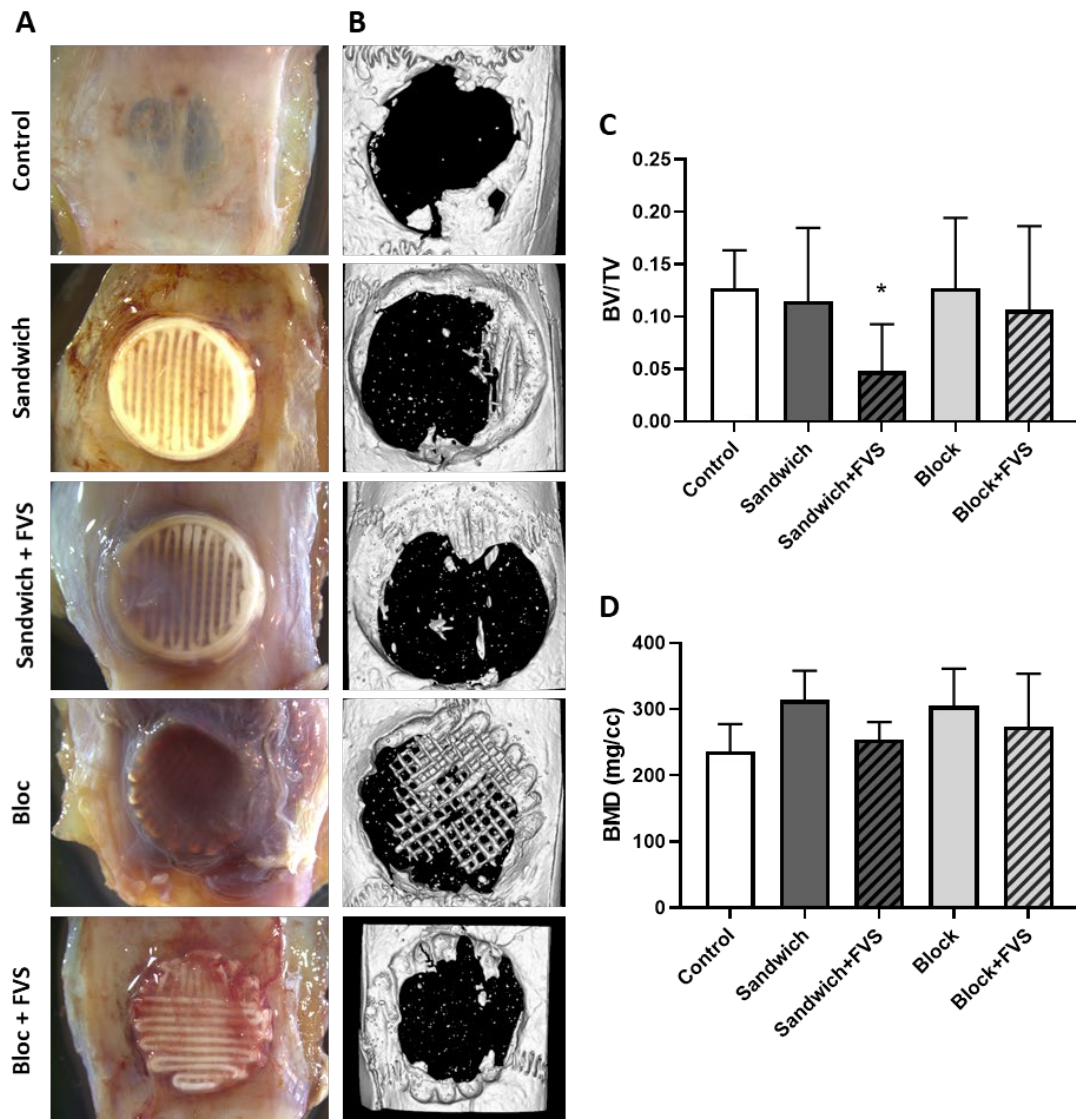


Figure 26. Evaluation de la régénération osseuse. Les scaffolds, bloc et sandwich, cellularisés (FVS) ou non ont été implantés dans des défauts de calvaria de rats. Après 2 mois les rats ont été sacrifiés et les calvaria ont été explantées (A). Les explants de calvaria ont été analysés au micro-scanner pour évaluer la réparation osseuse dans les différentes conditions (B). Les données obtenues ont permis d'évaluer le BV/TV (C) et la densité minérale (BMD) (D). Données = moyenne  $\pm$  SD (Control n = 9, Sandwich n = 6, Bloc n = 9, Sandwich + SVF n = 12, Bloc + SVF n = 10). Les différences significatives par rapport au contrôle ont été marquées par des étoiles, avec \* indiquant  $p < 0.05$ .



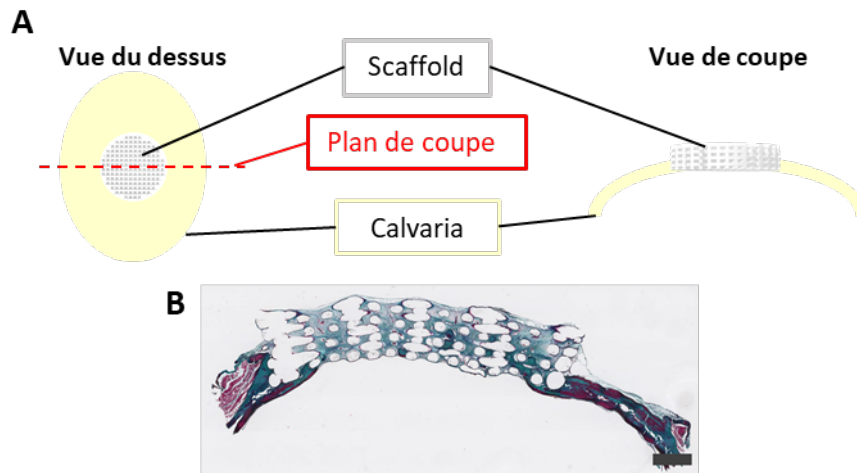


Figure 27. Détails concernant les coupes histologiques. (A) Schéma explicatif de la coupe transversale réalisée. (B) Photo complète d'un bloc PLGA-HA 10% dans un défaut de calvaria.

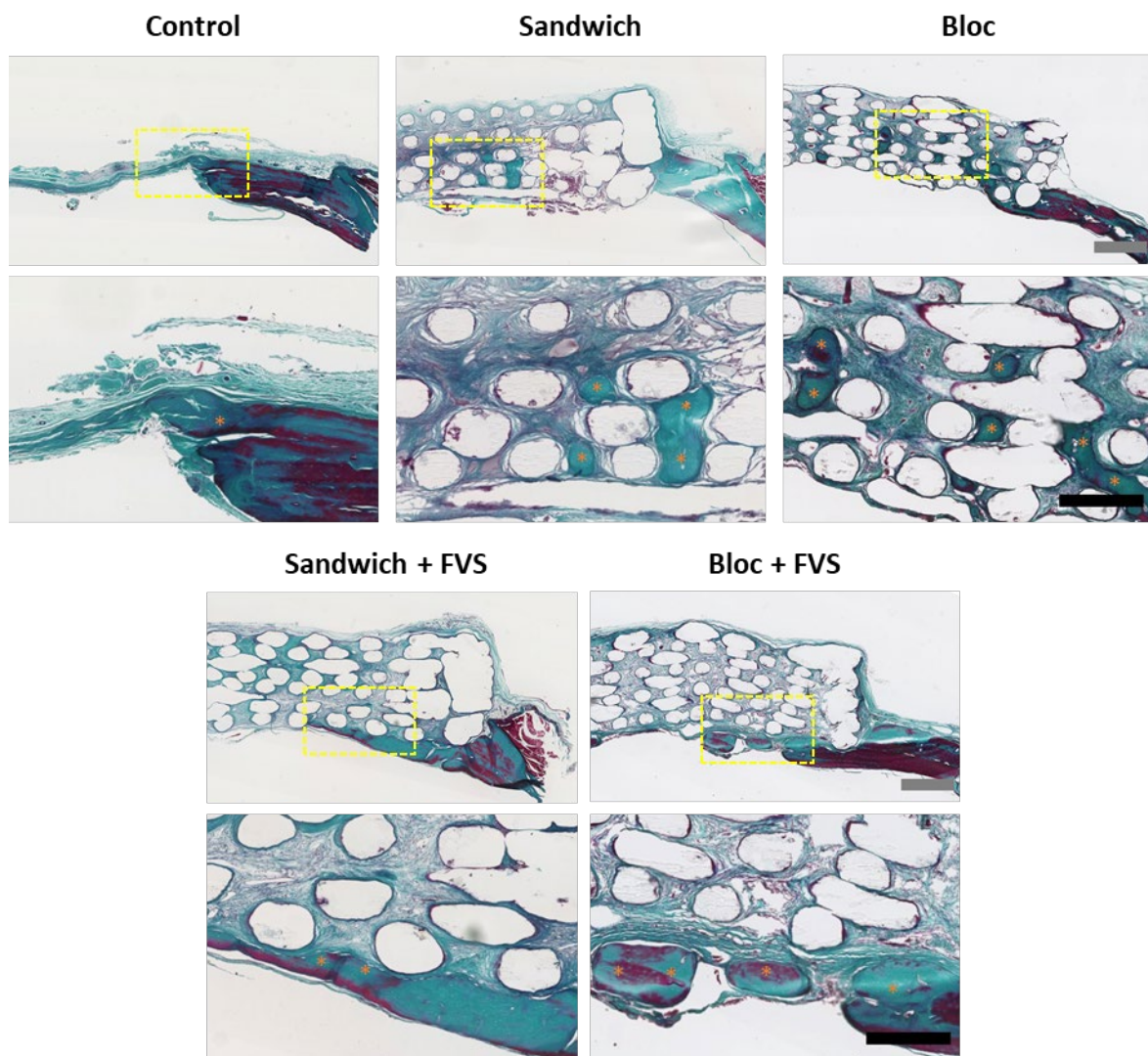


Figure 28. Analyses histologiques de la régénération osseuse dans des défauts de calvaria. Les explants de calvaria ont été fixés et décalcifiés, puis préparés afin de réaliser des coupes en paraffine. Ces coupes ont été colorées au Trichrome de Masson afin de mettre évidence l'os néoformé indiqué par des \* (Echelle grise = 1000  $\mu$ m, échelle noire = 500  $\mu$ m).

#### 7.2.4 Discussion des résultats de la partie II

Les approches d'ingénierie tissulaire osseuse ont pour objectif de palier aux limites des matériaux et stratégies actuelles. Ces approches reposent sur la combinaison d'un scaffold ostéoconducteur avec des cellules permettant d'apporter un potentiel ostéogénique. La difficulté majeure est de d'obtenir une distribution cellulaire homogène pour garantir ce potentiel. L'approche conventionnelle (« Top-Down ») pour ensemercer les cellules compte sur une colonisation spontanée du scaffold macroporeux après avoir déposé les cellules sur sa surface. Avec cette approche on observe une pénétration limitée des cellules dans le scaffold. L'objectif ici était de proposer une approche alternative à l'approche conventionnelle pour la cellularisation des scaffolds : une approche couche par couche ou « sandwich ». Pour montrer l'intérêt d'une telle approche nous l'avons comparé à l'approche conventionnelle.

Tout d'abord nous avons évalué la survie, la colonisation et la prolifération de nos cellules dans les scaffolds. Les résultats obtenus ont montré que les cellules étaient capables de s'attacher et de proliférer sur les deux types de scaffolds (Figure 19-22). Par ailleurs l'augmentation de l'activité métabolique était cohérente avec l'augmentation de la quantité de cellules observées en Live-Dead. L'augmentation de l'activité métabolique était donc sûrement associée à la prolifération des cellules implantées. Par ailleurs, la stabilisation de l'activité après 24 jours de culture sur les scaffolds s'explique probablement par le fait que les cellules étaient arrivées à confluence. Il serait d'ailleurs intéressant de réaliser des observations en Live-Dead à ces temps clés pour observer la viabilité et colonisation cellulaire et les comparer aux données obtenues. Une seconde approche permettant de quantifier la prolifération réelle serait également intéressante. Néanmoins, la majorité de ces techniques nécessitent le « sacrifice » du matériau cellularisé, nécessitant de multiplier le nombre d'échantillons.

Les observations concordent avec nos précédentes conclusions discutées dans la partie I (131). Toutefois, la colonisation des scaffolds par les cellules a semblé plus lente. Un facteur pouvant expliquer cette différence est la quantité de cellules ensemercée qui pouvait varier d'un individu à l'autre. En effet, compte tenu de la difficulté à compter les cellules fraîchement isolées, les matériaux ont été ensemercés en raisonnant en quantité de tissu adipeux par scaffold. Or une étude complémentaire a montré que le contenu en cellules variait d'un individu à l'autre pour une même quantité de tissu adipeux (Figure 29). Ce résultat pourrait provenir d'un défaut de la reproductibilité de notre protocole d'isolement. Toutefois, Prins et al. ont utilisé une technique d'isolement commerciale et ont montré des résultats similaires chez l'humain : la quantité de cellules isolées variait d'un patient à un autre (73). Il semble donc essentiel de développer une méthode de comptage de cellules efficace afin d'assurer une meilleure reproductibilité des ensemencements.

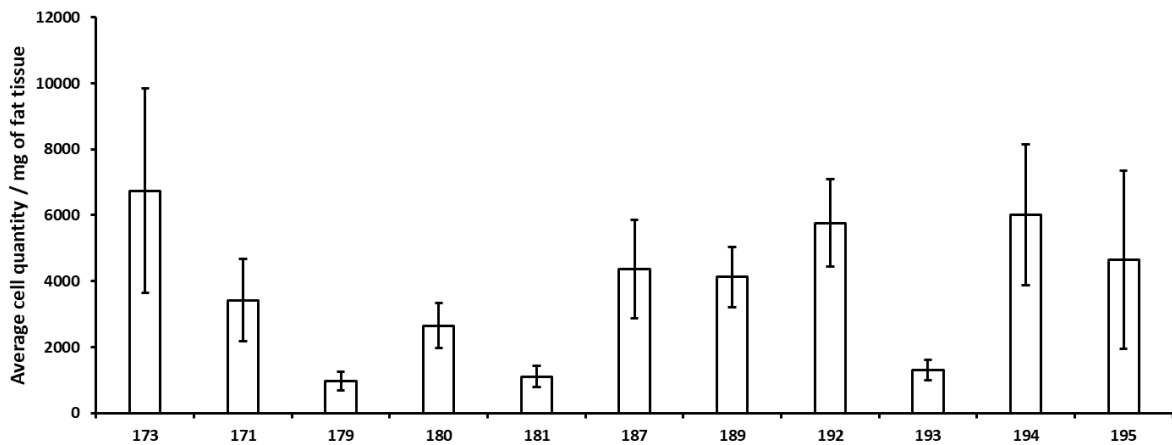


Figure 29. Quantité de cellules isolées dans un milligramme de tissu adipeux. La FVS a été isolée selon le protocole décrit précédemment. Le comptage ( $n = 3$ ) était effectué 24h après avoir ensemencé la FVS sur un puit plastique. Chaque numéro représente un individu différent.

Un autre facteur pouvant influencer la colonisation des scaffolds est leur stabilité. *In vitro*, les scaffolds étaient en général bien maintenus. Dans certains cas une mobilité a été observée et elle était souvent associée à une faible colonisation cellulaire. Les travaux de thèse de Vera Guduric, ont également montré qu'une mobilité trop importante dans ce type d'assemblages pouvait engendrer une mort cellulaire (123). Par ailleurs on observe qu'à long terme les blocs semblaient mieux colonisés, au moins en surface, probablement grâce à la meilleure stabilité qu'ils offraient en comparaison des sandwiches. Cette mobilité peut s'expliquer par la qualité d'impression de nos scaffolds. Bien que nous ayons précédemment montré avoir une bonne reproductibilité de nos impressions, cette analyse a été réalisée sur des scaffolds avec une forme plus simple et possédant une plus grande surface (131). En effet, il est plus facile d'obtenir une bonne résolution lors de l'impression 3D d'un objet de grande taille avec des formes simples. Dans notre cas les structures imprimées sont des cylindres poreux de 8 mm avec de petites structures (200  $\mu\text{m}$  de large) stabilisatrices permettant l'empilement des couches. Ces structures plus complexes à fabriquer semblaient avoir au final une moins bonne résolution. Nous avons donc probablement obtenu des matériaux qui s'assemblaient plus ou moins bien en fonction de ces défauts.

Ensuite, nous avons étudié la différenciation des cellules dans les différents scaffolds et dans différentes conditions de culture. La différenciation des cellules sur les scaffolds a semblé tardive. En effet, après 14 jours de culture, même en présence de milieu de différenciation, seulement une faible activité phosphatase alcaline a été observée (Figure 23). Dans notre précédente étude, une forte activité PAL était détectée après 14 jours de culture (131). Toutefois, une forte minéralisation a été observée après un mois de culture sans milieu ostéoinducteur (Figure 24-25).

Cette différence semble donc imputable au passage d'un modèle bi-dimensionnel (2D) à un modèle tridimensionnel (3D). Cette différence peut s'expliquer par la colonisation cellulaire

qui était plus lente. Dans la partie précédente on observait une activité PAL plus intense car les cellules étaient plus nombreuses sur les membranes. Il serait donc intéressant d'évaluer l'activité PAL après des temps de culture plus tardifs. De plus, différentes études montrent que les cellules mésenchymateuses sont des cellules sensibles à leur environnement, notamment elles présentent des comportements différents en 2D et en 3D (132,133).

Il semble important de réaliser une étude plus poussée concernant la différenciation des cellules. Différents protocoles sont en train d'être mis au point pour étudier la présence de gènes caractéristiques de la différenciation ostéoblastique (RunX2, PAL, OCN, ...). La principale difficulté de cette évaluation étant d'extraire l'ARN produit par des cellulesensemencées dans les assemblages tridimensionnels ou les blocs macroporeux. Nous travaillons essentiellement à la mise au point d'un protocole permettant d'extraire un ARN de qualité et en quantité suffisante.

Enfin, l'étude *in vivo* a permis d'évaluer le potentiel de régénération osseuse de notre approche sandwich comparée à l'approche conventionnelle. Les résultats n'ont pas démontré de différence significative entre les conditions. De plus, l'ajout de cellules n'a pas semblé contribuer à la régénération osseuse. L'exploitation des résultats est toujours en cours et une expérience complémentaire a été mise en place. Toutefois, nous souhaitons apporter des premiers éléments de réponses concernant les résultats actuels.

Nos expériences préliminaires pour préparer cette expérimentation avaient montré que les sandwiches restaient stables après implantation. Néanmoins, ces expériences ont été réalisées sur un petit nombre d'individus. L'expérimentation complète a finalement montré que dans certain cas les sandwiches étaient mobiles et pouvaient se désassembler (Figure 30). La mobilité de certains sandwiches pourrait freiner la réparation. Cette mobilité peut s'expliquer par différentes hypothèses.

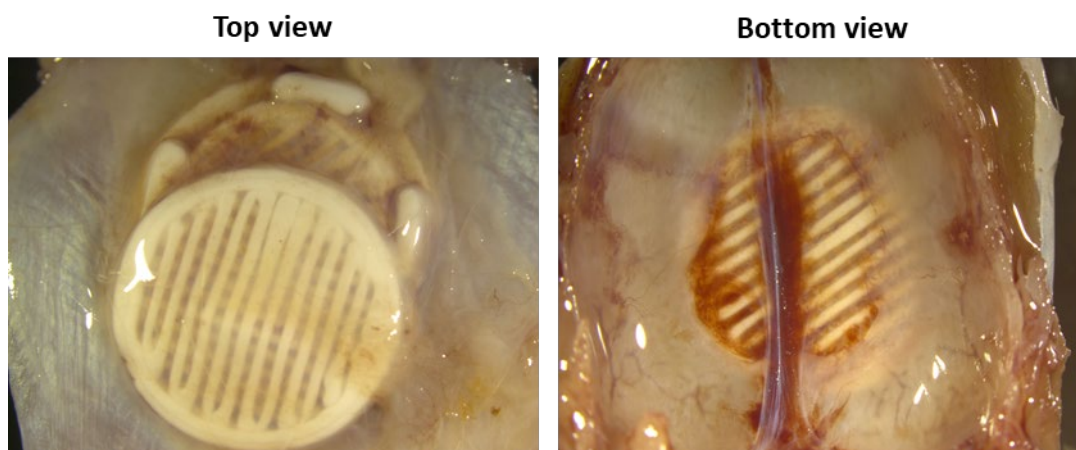


Figure 30. Photos post-explantation d'un assemblage instable de membranes cellularisées au sein de notre modèle sandwich.

Premièrement, la reproductibilité des défauts créés chirurgicalement n'était pas optimale. Malgré la facilité d'accès à la calvaria, il s'est avéré difficile de réaliser des défauts complètement reproductibles d'un individu à l'autre. En comparaison avec la calvaria de souris ( $250 \pm 100 \mu\text{m}$ ), la calvaria de rat est plus épaisse ( $\approx 1 \text{ mm} \pm 100 \mu\text{m}$ ) ce qui allonge et complique la procédure chirurgicale. Parfois des fragments résiduels pouvaient être présents en bordure du défaut. Pour certains animaux, une hémorragie a été observée, dû à une lésion du sinus veineux sagittal (Figure 30). La littérature montre que cette hémorragie peut influencer la régénération osseuse, créant des résultats inconstants (130). Il semble que certains sandwiches étaient mieux insérés que d'autres, favorisant leur intégration dans le défaut et la réparation osseuse.

Ensuite, comme discuté précédemment, la proportion en cellules souches mésenchymateuses, gage d'un potentiel ostéogénique, reste à évaluer. Les scaffolds étaient implantés après 7 jours de culture en présence de la FVS. Or, nous avons pu observer *in vitro* qu'après 7 jours de culture la quantité de cellules présentes sur les scaffold était relativement faible (Figure 20). Il serait possible d'augmenter la quantité de cellules de 3 façons :

- Réaliser une étape de culture plus longue avant implantation.

Nous avons montré que la colonisation cellulaire après 28 jours de culture était beaucoup plus importante et que la surface des scaffolds étaient recouverte de cellules (Figure 22). Une quantité plus importante de cellules pourrait augmenter la bioactivité des scaffolds.

- Augmenter la quantité de cellules initiale.

En effet, si la quantité de cellules initialementensemencée était plus importante, cela permettrait d'éviter une longue étape de culture intermédiaire. Toutefois, dans notre cas la quantité de cellules est limitée par l'anatomie du rat ( $\approx 1 \text{ g}$  de tissu adipeux collecté par rat).

- Changer de modèle animal.

Pour notre étude nous avons utilisé des rats Wistar qui pesaient entre 250 à 350g. Un modèle animal plus gros (ex. rat Sprague-Dawley, lapin) aurait potentiellement plus de tissu adipeux. Cependant, ce choix demanderait de reprendre l'optimisation des divers protocoles déjà élaborés.

Bien que l'on puisse espérer que ces cellules soient en mesure de continuer à proliférer après l'implantation nous n'en avons pas la preuve. Il serait intéressant de réfléchir à une stratégie permettant le suivi de nos cellules une fois implantées. Une des techniques les plus utilisées est la transfection de cellules avec une molécule qui permettra un suivi par bioluminescence, comme la luciférase (100). Néanmoins cette approche nécessite des étapes d'amplification et de sélection *in vitro*, non compatibles avec l'utilisation de la FVS.

Enfin, il est également possible d'envisager une pré-différenciation des cellules avant implantation, certaines études utilisent cette approche (134–136). Kim et al. ont comparé l'utilisation de la FVS avec et sans pré-différenciation, couplé à un scaffold en PLGA (136). Les scaffolds ont été implantés dans des défauts segmentaires dans la diaphyse du cubitus chez

des lapins. Après 8 semaines, la condition avec les cellules pré-différenciées a montré une formation osseuse plus importante (136). Toutefois, dans ce cas les cellules étaient pré-différenciées sur plastique avant d'êtreensemencées sur le scaffold. Güven et al. ont également étudié l'intérêt de combiner des scaffolds avec la FVS ou des hADSCs ou des hBMSCs en présence de facteur de différenciation (134). Les scaffolds combinés à la FVS étaient davantage colonisés par le tissu hôte et une meilleure formation osseuse était observée (134). Dans cette étude, une condition contrôle sans facteurs de différenciation aurait permis de prouver l'intérêt de la différenciation.

Les résultats obtenus pour cette partie sont encourageants mais demandent à être complétés et approfondis. Trois points importants ont été relevés. Le premier est la nécessité d'améliorer la reproductibilité de nos ensemencements en mettant au point une méthode de comptage optimale. Le second est lié à la caractérisation des cellules utilisées. Il semble notamment essentiel de quantifier la part de cellules souches mésenchymateuses dans la FVS. Le dernier concerne la stabilisation des assemblages après implantation, nécessaire pour améliorer et garantir la formation osseuse.



## 8 Discussion générale et perspectives

### 8.1 Choix des matériaux

Le choix d'un matériau est généralement guidé par le tissu que l'on cherche à restaurer. L'objectif est de trouver un bon compromis, entre une fabrication facile et reproductible, des propriétés adaptées, tout en étant biocompatible. Dans l'ingénierie tissulaire osseuse, le scaffold réalisé doit servir d'échafaudage (= scaffold) en fournissant aux cellules une surface colonisable, bioactive et un environnement mécanique adéquat.

Les polymères et les céramiques sont les 2 familles de matériaux les plus utilisées en ingénierie tissulaire osseuse. Les polymères synthétiques, bien que biocompatibles, présentent une faible bioactivité et sont hydrophobes. Les céramiques présentent un caractère ostéoconducteur mais sont fragiles (48). De plus leur mise en forme peut s'avérer complexe (88). Néanmoins, la littérature montre que l'association de ces 2 familles permet de contrebalancer leurs défauts respectifs (57,58,111). En effet, on obtient des matériaux avec une plus grande bioactivité et des propriétés mécaniques intéressantes.

De notre revue de littérature, présentée en 4., il en ressort que le PCL est le polymère le plus utilisé en ingénierie du tissu osseux (57). Cependant ce n'est pas celui que nous avons choisi de sélectionner pour notre étude. La principale cause étant son temps de dégradation beaucoup trop long pour les applications envisagées. Le PLGA répondait mieux à notre besoin avec son temps de dégradation plus court (1-12 mois). De plus, ce temps de dégradation est relativement facile à ajuster en faisant varier le ratio lactique/glycolique.

Enfin, nous avons choisi le PLGA pour sa vitesse de dégradation compatible avec les applications souhaitées. L'étude de sa dégradation a montré d'importants changements structuraux après 3 mois de dégradation. Une dégradation chimique des chaînes de polymères a également été mise en évidence avec la SEC. Les matériaux étaient également plus fragiles à la manipulation. Néanmoins après 3 mois les matériaux étaient toujours entiers.

Ces changements ainsi que les fragilités observées peuvent apparaître comme un frein. Toutefois, il ne faut pas oublier que *in vivo*, lorsque le scaffold est rapidement colonisé, un nouveau tissu est produit et permet d'apporter un support mécanique. En ce sens, il serait intéressant d'étudier l'évolution des propriétés mécaniques au cours du temps. Cette étude n'a pas pu être réalisée dans notre cas car les matériaux utilisés pour la dégradation n'étaient pas adaptés pour réaliser des tests mécaniques (nécessité d'utilisation de modèle aux dimensions spécifiques). Il est important de s'assurer que les matériaux peuvent assurer un soutien mécanique au moins le temps d'être colonisé par la nouvelle matrice osseuse. Il serait donc pertinent de réaliser cette étude de dégradation pour des temps plus longs. De même, des temps d'observations plus longs pourraient être envisagés *in vivo* pour étudier la résorption du matériau dans des conditions réelles.



Concernant les céramiques, les plus utilisées sont le TCP et l'HA. L'HA a été choisie pour son ratio minéral proche de l'os humain. La littérature démontre également ses capacités ostéoconductrices. De plus, la nHA est très utilisée au laboratoire et nous la synthétisons en routine pour diverses applications (137–139).

Nous avons choisi d'utiliser l'HA sous forme de nanoparticules afin de favoriser une distribution homogène dans le PLGA. Cette distribution homogène permet notamment de distribuer le renforcement apporté par les nanoparticules de céramique dans le matériau (140–142). En effet, bien que les céramiques soient des matériaux fragiles, elles apportent néanmoins des propriétés mécaniques intéressantes. Leur présence a tendance à diminuer la résistance à la contrainte des matériaux mais améliore le module élastique (141). La distribution homogène contribue également à améliorer le caractère hydrophile, ainsi que l'attachement et la prolifération de cellules (140,142,143). De plus, l'HA sous forme de nanoparticules démontre une meilleure bioactivité que l'HA sous forme de microparticules.

L'ajout de nHA avait pour but d'augmenter l'ostéoconductivité du matériau. Toutefois si *in vitro* les résultats suggèrent que la présence d'HA aiderait la différenciation des cellules souches (Figure 23-25), *in vivo* les résultats sont moins encourageants.

L'un des facteurs responsables pourrait être la quantité de nHA utilisée. En effet, dans beaucoup d'études une quantité de HA plus importante est utilisée. Dans notre cas, l'augmentation de la quantité de nHA aurait pu diminuer la qualité d'impression. En effet, l'un des défauts de l'impression 3D par FDM est qu'avec l'utilisation de particules, les buses d'impression peuvent se boucher fréquemment.

Nous aurions également pu envisager de coupler le PLGA avec d'autres phosphates de calcium. On retrouve différents exemples dans la littérature montrant le PLGA combiné avec du TCP (141,144), des bioverres (145–147), mais aussi des associations HA/TCP (148,149). Toutefois, à ce jour il n'existe pas de consensus s'accordant sur le fait qu'une céramique soit plus efficace qu'une autre.

En conclusion, les matériaux développés ont semblé adaptés à nos objectifs, même si une optimisation du caractère ostéoconducteur pourrait être envisagée.

## 8.2 Choix de la technologie : La FDM est-elle une technique adaptée ?

Ces dernières années de nombreuses études se sont intéressées à la FDM pour fabriquer des matériaux composites pour l'ingénierie du tissu osseux (147,148,150–152).

Nous avons développé une imprimante sur mesure afin d'accroître la résolution obtenue avec ce type d'imprimante. En effet, dans la littérature on retrouve souvent des structures avec des architectures moins résolues, avec notamment des pores supérieurs à 500  $\mu\text{m}$  (147,153). Dans une précédente étude, nous avons montré que cette imprimante nous permettait d'imprimer des structures avec des pores de 150  $\mu\text{m}$  (126).

La FDM nous a permis d'obtenir une bonne qualité d'impression. Néanmoins cette qualité peut être affecté par les matériaux utilisés et les variations du diamètre du filament. C'est un phénomène que nous avons observé mais qui est également décrit dans littérature (147). La variation du diamètre du filament peut entraîner la création de défauts lors de l'impression.

Les techniques d'impression directes, comme la micro-extrusion, permettent de s'affranchir de ce désavantage. Cependant ces approches requièrent de nombreux ajustements en amont pour permettre une impression de qualité. Des solvants ou des plastifiants sont souvent utilisés pour améliorer la viscosité du polymère et faciliter l'impression (99).

La FDM est une technique adaptée à l'impression de matériaux composites polymère-céramique. Plusieurs études montrent la possibilité d'obtenir des structures précises et reproductibles avec différents matériaux composite (147,152,154). On retrouve dans la littérature différents ratio polymères/céramiques (57). L'impression 3D par FDM nécessite de travailler avec des chargements en particules peu importants pour éviter de boucher la buse d'extrusion et permettre une haute résolution d'impression. Dans certaines études, les chercheurs ont fait le choix de travailler avec des chargements plus importants (148,155–158). Ce choix nécessitait souvent de travailler avec des buses d'impression plus grandes, ce qui diminuait la résolution possible (pores plus grand, lignes plus large). Au vu de ces observations, nous avons donc choisi de travailler avec des matériaux de PLGA chargés à 5% et à 10% en masse de nHA.

Si la stratégie future est d'augmenter le chargement en nHA, il faudra probablement envisager une technique d'impression 3D différente.

Les impressions 3D par jet de liant ou par SLS sont des impressions basées sur l'usage de poudres. Elles permettent de travailler avec des hautes teneurs en céramiques et bioverres et de former des structures complexes. Pour l'impression par jet de liant, une longue étape d'optimisation peut être requise pour obtenir des scaffolds avec une bonne résolution. La sélection du liant est importante ainsi que les étapes post-impression qui permettent de renforcer les structures imprimées (88). La SLS est une technique plus complexe, car la résolution va dépendre de l'interaction entre le faisceau laser, les particules et le liant à des échelles micrométriques. Les propriétés du scaffold final vont plutôt dépendre de la puissance du laser, du temps d'exposition et de la capacité de conduction thermique et de diffusion de la lumière du matériau choisi (84,88). L'impression par jet de liant produit des scaffolds qui présentent souvent une faible résolution en comparaison des autres techniques. La SLS est une des méthodes proposant la meilleure résolution, mais le processus d'impression est long. De plus, avec ces 2 méthodes les scaffolds finaux présentent une surface rugueuse et de faibles propriétés mécaniques (88).

La SLA est également une technique qui peut être envisagée pour travailler avec de plus hauts chargements en particules. Cependant, l'ajout de particules entraîne plusieurs complexités pour l'impression. La viscosité de la résine est impactée par la présence des particules, ce qui

complicque l'impression (88,93). Il faut éviter qu'elles s'agglomèrent et sédimentent en utilisant des agents dispersants (88). De plus, les particules de céramiques ont tendance à disperser la lumière, ce qui limite une réticulation efficace en profondeur, surtout avec des hautes concentrations en particules (88).

La micro-extrusion est également une technique adaptée pour l'impression de composite polymère-céramique. Les polymères doivent être dissous dans un solvant pour obtenir un matériau fluide. La difficulté est alors de développer une pâte suffisamment fluide pour être imprimées, mais qui est également capable de maintenir sa forme après impression. La teneur en particules peut être très élevée (> 50% vol.), mais l'agglomération de particules peut entraîner le bouchage de la buse d'extrusion (88). Des composants peuvent être ajoutés pour aider à moduler la viscosité (comme un rhéofluidifiant) ou pour limiter l'agglomération des particules (comme un agent dispersant) (88). Néanmoins ces modifications rendent encore plus complexe l'optimisation de l'impression.

L'avantage de la FDM sur ces différentes techniques, c'est qu'elle semble plus facile à mettre en place. En effet, moins de paramètres sont à optimiser et dans notre cas nous sommes capables de fabriquer des scaffolds avec une très bonne résolution. De plus, la matrice polymérique, majoritaire par rapport à la part céramique, permet d'apporter des bonnes propriétés de soutien mécaniques. Ce dernier point est indispensable dans le cas d'applications avec d'importantes charges mécaniques.

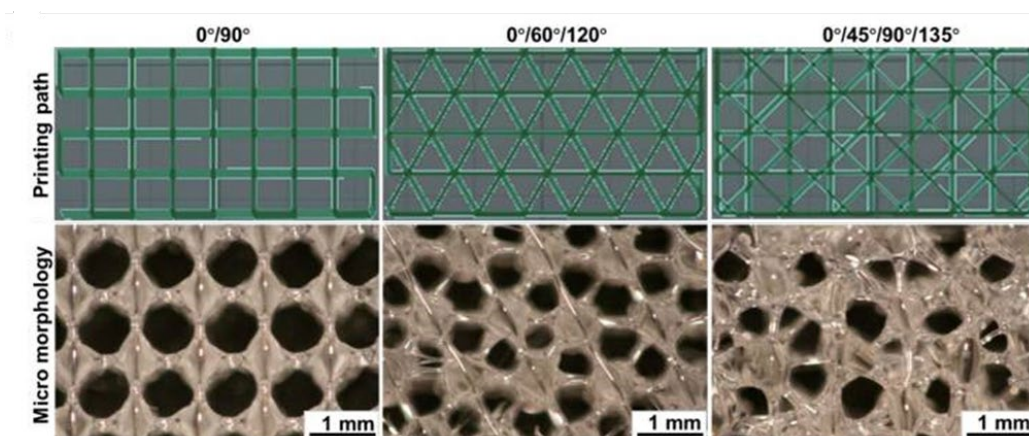


Figure 31. Différentes structures imprimées par FDM en PLGA.  
(Extrait de Liu et al. 2018 (154))

Pour aller plus loin, il aurait également été intéressant de développer des structures différentes. Concernant les différents modèles développés pour notre étude, nous avons choisi de travailler avec des structures relativement simples. Les scaffolds de forme carrée ou circulaire possédaient des pores carrés. Il aurait été intéressant de tester des formes de pores différentes (Figure 31) et d'étudier les effets sur la viabilité, la prolifération et la différenciation cellulaire. De plus, une structure différente pourrait aider à moduler les propriétés mécaniques. Liu et al. ont montrés que des modifications de porosité, de forme des pores et

de l'épaisseur des lignes d'un scaffold en PLGA imprimé par FDM permettaient d'améliorer les propriétés mécaniques (154). Ils ont pu obtenir des propriétés mécaniques similaires à l'os trabéculaire avec une porosité de 66%, des lignes de 200  $\mu\text{m}$  et des pores carrées (154). Dans le prolongement de notre étude, une évaluation plus approfondie des propriétés mécaniques en fonction de la morphologie des scaffolds pourra être réalisée.

## 8.3 Développement de Bioassemblages

### 8.3.1 Stabilisation des sandwichs

La stabilisation de nos assemblages est une étape clé puisqu'elle a une influence sur différents aspects. Les mouvements entre les différentes couches peuvent créer un stress pour les cellules et contribuer à leur détachement. Cette mobilité peut également être un frein à la formation d'un nouveau tissu osseux *in vivo*. De plus, une bonne stabilisation est nécessaire pour permettre une manipulation aisée, ce qui est crucial pour les manipulateurs et notamment le chirurgien.

Dans le descriptif du projet initial, plusieurs approches avaient été envisagées pour développer une structure assemblée stable. La première approche envisagée était le développement d'un support permettant d'empiler et de maintenir les membranes (Figure 32A). Une approche assez facile à mettre en œuvre pour des matériaux de plusieurs centimètres. Néanmoins, pour des matériaux avec une surface inférieure à  $1\text{cm}^2$  il est plus difficile de développer un support adapté. Une deuxième méthode d'assemblage envisagée était le maintien des différentes couches grâce à de la colle de fibrine. Cette approche a été abandonnée car l'emprisonnement des cellules dans la fibrine rendait leur suivi plus difficile. Enfin une approche de stabilisation avec des vis a été considérée, comme présenté Figure 32B. Cette approche n'a finalement pas été testée car coûteuse et compliquée à mettre en place dans le modèle choisi *in vivo*.

Différentes stratégies ont également été testées au laboratoire. Dans une première étude, des membranes poreuses étaient stabilisées par l'apposition d'un anneau en verre (123) (Figure 33A). Cette approche a rapidement montré ces limites car elle endommageait les couches cellulaires en contact avec la bague en verre et l'instabilité des anneaux rendait la manipulation difficile.

Dans une précédente étude, une méthode originale de stabilisation a été développée (120). Des « clips » de maintien ont été élaborés pour maintenir les membranes assemblées (Figure 33B). Ces clips étaient imprimés par FDM avec le même matériau utilisé pour les membranes (PLA). Cette approche a démontré une bonne stabilité des assemblages dans le temps (120). Cependant, nous souhaitons élaborer un design transposable *in vivo* et la présence des clips en périphérie du matériau compromettrait une implantation en site osseux.

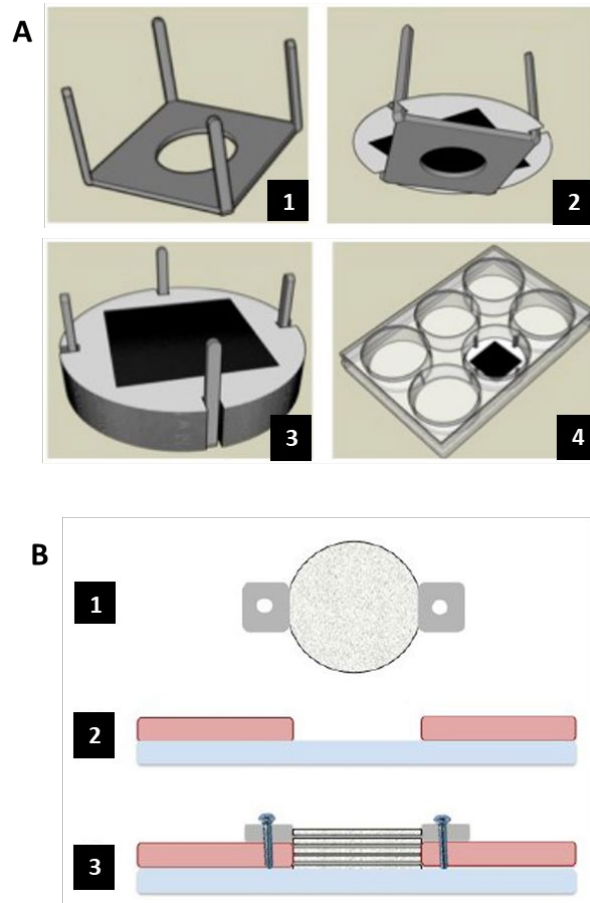


Figure 32. Autres approches d'assemblages envisagées. (A) Développement d'un support usiné permettant d'empiler et maintenir les membranes (B) Stabilisation de l'empilement de membranes poreuses à l'aide de vis.

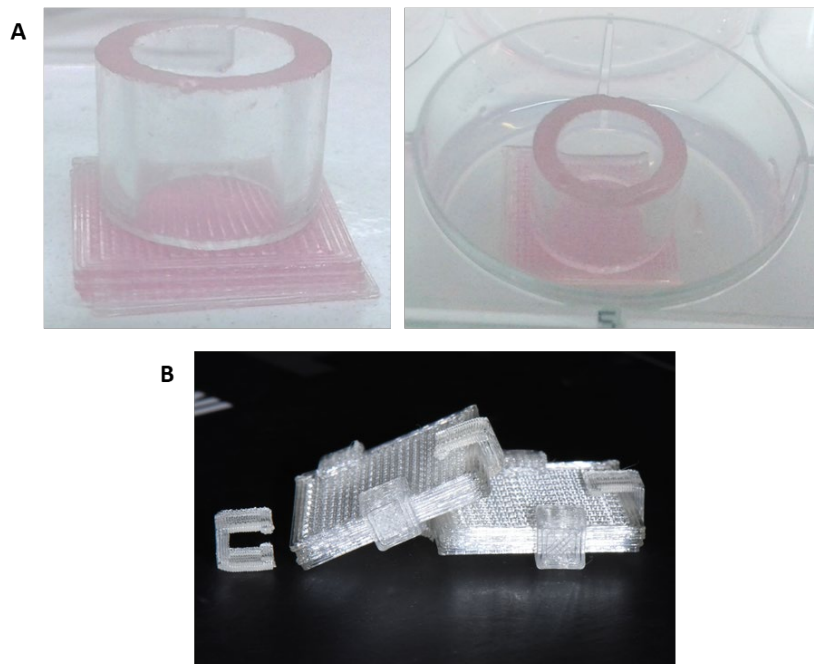


Figure 33. Approches d'assemblages testées au laboratoire. (A) Maintien de l'empilage de membrane par apposition d'une bague en verre. (B) Utilisation de « clips » pour maintenir l'assemblage de membranes.

Les travaux de thèse de Vera Guduric ont également montré la possibilité d'une stabilisation grâce à l'action des cellules. En effet, ses résultats ont montré qu'après 14 jours de culture en conditions « classique », il était plus compliqué de démonter les assemblages cellularisés (120). Ce phénomène serait lié à une importante synthèse de matrice extracellulaire par les cellules. Néanmoins, ce phénomène nécessite qu'une quantité de cellules importante soit présente dans les assemblages.

L'approche retenue, celle présentée dans ces travaux, est une approche de type « Lego ». Les membranes sont emboîtées entre elles afin de former la structure finale. *In vitro*, ces structures sont maintenues grâce à des agrafes. *In vivo*, les structures sont bloquées mécaniquement dans le défaut osseux et elles sont également maintenues par la peau suturée. Pendant les expériences *in vitro* et *in vivo* des mobilités entre les membranes ont été observées. *In vitro* lorsqu'une mobilité était observée elle était souvent associée à une faible colonisation cellulaire. *In vivo*, nous avons observé après explantation que certains scaffolds avaient bougés ce qui pourrait avoir impacté la réparation osseuse. Il semble donc nécessaire d'améliorer la méthode d'assemblage élaborée.

### 8.3.2 Cellularisation des scaffolds

#### 8.3.2.1 Choix des cellules

L'utilisation d'un matériau cellularisé a démontré un intérêt certain dans plusieurs applications. Cette approche permet d'apporter un matériau avec un potentiel ostéogénique. Pour cela une méthode efficace doit être développée pour assurer une distribution cellulaire homogène au sein du matériau. L'objectif de notre approche était de favoriser la pénétration de cellules dans le scaffold. Nous avons fait le choix d'utiliser le tissu adipeux comme source de cellules.

Dans un premier temps, pour la partie *in vitro* en « 2D » nous avons travaillé avec des ADSCs humaines (hADSCs). Ces cellules, issues de la banque de cellules du laboratoire, sont bien connues et caractérisées. Leur utilisation a notamment permis de démontrer la biocompatibilité des matériaux développés (131). Nous avons aussi pu obtenir des résultats préliminaires démontrant une tendance de nos cellules à se différencier sur les matériaux (131).

Dans un deuxième temps, il a fallu réfléchir à notre approche de cellularisation pour nos études *in vivo*. Continuer à travailler avec les cellules humaines impliquait une difficulté, la nécessité de travailler avec des rats immunodéprimés. Ce sont des rats plus fragiles, ce qui aurait complexifié notre procédure chirurgicale. Ce sont aussi des animaux plus coûteux, ce qui aurait nécessité de limiter le nombre de conditions testées. Ces inconvénients nous ont mené à finalement utiliser des cellules issues du tissu adipeux de rat. Ce changement nous a permis de pouvoir développer un modèle autologue, plus proche de la réalité clinique.

En effet, notre source de cellules devenant plus régulière nous avons pu envisager de travailler avec la FVS. De plus, la FVS a un fort potentiel clinique puisqu'elle permet de s'abstraire des étapes multiples et chronophages pour la cellularisation du scaffold, qui sont un frein à une future translation clinique. Cette approche ne pouvait être envisagée avec les cellules humaines à cause de l'irrégularité des prélèvements hospitaliers. En effet, la FVS implique de travailler avec des cellules fraîchement isolées qui sont directementensemencées sur les matériaux, sans étapes de culture classique intermédiaire. Une étude a par ailleurs montré la possibilité de réaliser une chirurgie en une étape (one-step) où la FVS était isolée etensemencée sur le scaffold, puis le scaffold était implanté au cours de la même chirurgie (72).

L'ajout de la FVS n'a pas semblé avoir amélioré la régénération osseuse dans la partie II. Dans la littérature la combinaison de la FVS avec un scaffold semble pourtant contribuer à une meilleure régénération osseuse (72,73,134,136,159,160). Plusieurs facteurs peuvent expliquer nos observations.

D'après les données de littérature, la FVS est riche en cellules souches. Toutefois il serait bon de s'assurer que notre méthode d'extraction permet de conserver cette teneur. De plus, une méthode de comptage cellulaire après isolement doit être mise au point pour assurer la reproductibilité de l'ensemencement.

Pour comprendre les différences observées entre notre étude 2D (Partie I) et notre étude 3D (Partie II) il serait également intéressant d'approfondir la caractérisation des cellules. Cette étude est actuellement en cours. Nous souhaitons améliorer et optimiser les protocoles utilisés, mais aussi intégrer un plus grand nombre de marqueurs pour mieux caractériser la population de notre FVS.

Les résultats préliminaires ont montré que les ADSCs, cellules qui ont subi au moins un passage, présentaient certains marqueurs caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses (CD90 et CD73). Ces marqueurs étaient moins présents dans la FVS, ce qui semble concorder avec la littérature (134). Ces expériences doivent être répétées et approfondies. Pour compléter cette étude, nous souhaiterions ajouter des marqueurs hématopoïétiques comme le CD45 et des marqueurs de progéniteurs endothéliaux comme le CD34.

Enfin, pour aller plus loin il pourrait également être intéressant d'explorer les capacités de la FVS à produire des cellules de type endothéliales. Du et al. ont proposé d'induire des ADSCs vers une différenciation endothéliale et ostéogénique séparément (75). Ces cellules étaient ensuite co-cultivées dans un même scaffold afin d'obtenir un scaffold « pré-vascularisé » avec un potentiel ostéogénique. Après implantation dans un défaut osseux de fémur chez le rat, leurs résultats ont montré une meilleure vascularisation des scaffolds et une meilleure formation osseuse comparé aux scaffolds non « pré-vascularisé » (75). Güven et al. ont montré que la perfusion d'un scaffoldensemencé avec la FVS permettait de conserver la part

de cellules endothéliales de la FVS (134). Un réseau de type vasculaire a été observé *in vitro* dans les scaffolds.

### 8.3.2.2 Optimisation de la distribution cellulaire dans les scaffolds macroporeux

Nos résultats en « 2D » montraient une bonne colonisation des matériaux. Malgré ces résultats positifs, la translation en 3D n'a pas été aisée pour différentes raisons.

Premièrement, le protocole d'ensemencement utilisé en 2D était très simple. En effet, les cellules étaient cultivées en amont et il suffisait de les détacher et de les ensemercer. L'ensemencement est apparu plus complexe pour nos approches 3D. Notamment à cause de la multiplication des étapes et de la nécessité de travailler rapidement pour conserver la fraîcheur de la FVS. De plus, nous avons remarqué que si nous assemblions nos sandwichs trop tôt, une forte mort cellulaire était observée. Notre hypothèse était que les cellules avaient besoin de temps pour adhérer et proliférer.

Deuxièmement, la quantité de cellules obtenues dans le tissu adipeux de rat était bien moins importante que dans les prélèvements humains. Ceci nous a obligé à travailler avec de petites quantités cellulaires. De plus, nous avons également remarqué que la quantité de cellules extraites d'un individu à un autre différait (Figure 29). Ceci a entraîné des différences pour la colonisation cellulaire.

D'autres approches sont également décrites dans la littérature pour favoriser la pénétration des cellules dans un scaffold macroporeux.

Certains chercheurs, ont proposé d'utiliser des bioréacteurs de culture afin d'améliorer la pénétration, la prolifération et la différenciation cellulaire. L'objectif de cette approche est de forcer la circulation des fluides et cellules au sein d'un macro-matériau. Différentes études ont montré le potentiel de ce type de culture, avec une amélioration de la survie et de la prolifération cellulaire, mais aussi une meilleure vascularisation (75,161,162). Néanmoins l'utilisation d'un bioréacteur nécessite un contrôle précis sur de nombreux paramètres pour obtenir un environnement de culture « physiologique », d'autant plus qu'ils doivent être évolutifs avec le temps.

Certaines études ont également proposé de développer un scaffold pré-vascularisé. Du et al. ont proposés d'utiliser des ADSCs pré-différenciées vers un phénotype endothélial (75). Une fois le scaffold pré-vascularisé, il était couplé à des ADSCs pré-différenciées vers un phénotype ostéogénique. Cette approche a montré une meilleure vascularisation et une meilleure déposition minérale *in vivo* (75).



Les technologies de bioimpression 3D sont de nouveaux outils prometteurs pour l'ingénierie tissulaire. Elles permettent d'imprimer des scaffolds directement cellularisés en utilisant des bioencres. Nous discuterons ici de la micro-extrusion, qui est actuellement la plus exploitée car la plus adaptée pour développer des macro-matériaux.

Avec cette technique, l'optimisation des paramètres d'impression est primordiale pour garantir une haute viabilité cellulaire. En effet, les forces imposées pendant le procédé d'impression sont souvent responsables d'une importante mortalité cellulaire. L'un des défis actuels est de développer des bioencres avec des composants et des procédés de solidifications qui ne sont pas toxiques pour les cellules et n'altèrent pas leurs fonctions. Les scaffolds obtenus doivent également être en mesure de favoriser la prolifération des cellules et d'offrir des propriétés mécaniques suffisantes.

Un autre intérêt de l'impression 3D par micro-extrusion est la possibilité de développer des scaffolds cellularisés et perfusés (163). En effet, l'utilisation d'une encre sacrificielle (templating ink), éliminée après l'impression permet de créer un réseau interconnecté dans un scaffold (Figure 34). Ce réseau peut ensuite être perfusé pour permettre un apport en nutriments et oxygène constant. Ouyang et al. ont utilisé cette technique pour pré-vasculariser leurs scaffolds (164) (Figure 34). Pour cela des cellules endothéliales étaient intégrées à l'encre sacrificielle. L'élimination de l'encre sacrificielle permettait une distribution homogène des cellules endothéliales dans le réseau créé. Les structures obtenues étaient perfusables, mimant ainsi un réseau vasculaire (164) (Figure 34).

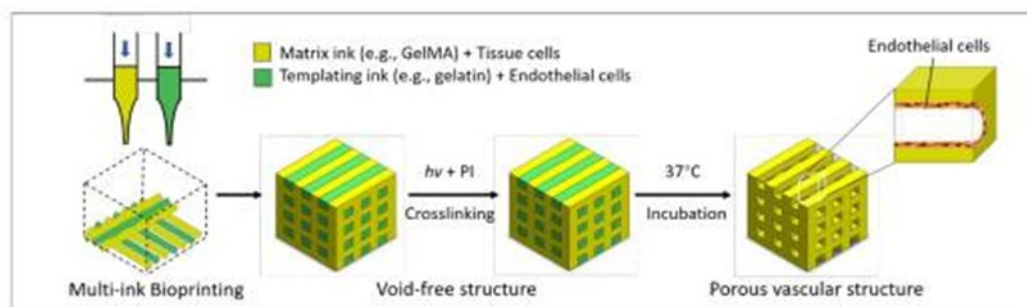


Figure 34. Représentation du procédé de Ouyang et al. (164) pour créer un réseau interconnecté dans un scaffold. Une encre sacrificielle (verte) est co-imprimée avec l'encre qui va servir de matrice (jaune). L'encre matrice est ensuite photo-réticulée avant l'élimination de l'encre sacrificielle par incubation à 37°C.

Néanmoins il faut souligner que la résolution de cette technique est limitée comparée aux autres techniques d'impression 3D (165). Une approche prometteuse qui demande néanmoins à être encore améliorée.

## 8.4 Potentiel de régénération osseuse

Le potentiel de régénération osseuse des nouveaux matériaux est un point clé pour se démarquer des matériaux préexistants sur le marché. Malgré les préoccupations éthiques, les modèles animaux restent une étape essentielle pour démontrer les propriétés d'un matériau. Il existe de nombreux modèles adaptés à l'évaluation d'une nouvelle stratégie de régénération osseuse. Le choix de ce modèle se fait suivant différents critères :

- Il doit être reproductible
- Il doit pouvoir être utilisé pour les tests de différents types de matériaux ou stratégies envisagées
- Il doit être pertinent en regard de la situation clinique d'intérêt
- Il doit permettre différents types d'analyses
- Il doit démontrer une faible morbidité et mortalité de l'animal

D'autres points qui peuvent être considérés pour ce choix sont :

- Les compétences dans ce modèle et le traitement des données associées
- Les coûts associés

L'objectif étant de sélectionner le modèle le plus pertinent pour une évaluation préclinique de biomatériau.

Plusieurs espèces peuvent être utilisées comme modèle : souris, rat, lapin, chien, cochon, mouton et brebis. On retrouve majoritairement des études chez les rongeurs, pour des questions de reproductibilité et de coût (57). Différents sites peuvent être envisagés pour la création d'un défaut chez le rongeur : fémur, calvaria, mandibule, colonne.

Pour évaluer le potentiel de régénération osseuse nous avons choisi un défaut critique de calvaria chez le rat. Il a été décidé de réaliser un défaut central de 8 mm, démontré comme étant un défaut critique dans la littérature (166). Dans notre cas les résultats *in vivo* ne démontrent pas une amélioration significative de la réparation osseuse avec les différentes approches testées. L'ajout de cellules n'a pas non plus amélioré la réparation. Les hypothèses que nous avons posées pour expliquer ces résultats sont :

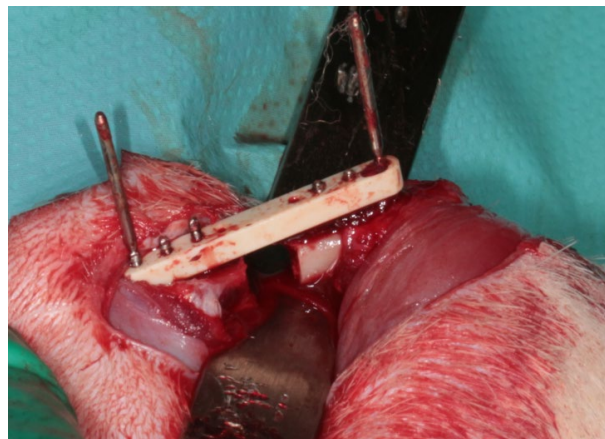
- La stabilisation des scaffolds qui n'était pas optimale. La mobilité des membranes entre elles qui a pu être observée peut expliquer des différences de réparation.
- La reproductibilité de la cellularisation. Une meilleure caractérisation des cellules semble essentielle.

Toutefois, il faut noter qu'avec l'approche sandwich ou bloc, les scaffolds ne semblent pas non plus inhiber la croissance osseuse.

Le défaut de calvaria chez le rongeur est un modèle de référence pour étudier la réparation osseuse. La calvaria est facilement accessible et permet donc une réalisation rapide et facile du défaut. Cependant, ce modèle ne permet pas de prendre en compte les contraintes mécaniques auxquelles le matériau sera soumis dans le site d'implantation visé, ici la

mâchoire. De plus, l'os de calvaria est un os d'origine membranaire qui va avoir un processus de réparation différente de l'os d'origine endochondrale. Enfin, dans notre cas seulement une petite portion du matériau était en contact avec l'os, ce qui limite sa colonisation par le tissu de l'hôte.

Nous aurions pu envisager d'utiliser un modèle de défaut osseux différents. Le défaut osseux fémoral est très retrouvé dans la littérature (57). Néanmoins ce sont des défauts complexes à réaliser chirurgicalement. Ce type de défaut requiert l'utilisation d'un système de fixation ou de stabilisation (Figure 35) pour permettre une stabilisation. De plus, chez le rat ce type de défaut nécessite l'utilisation de petits matériaux (diamètre fémur de rat  $\approx$  3-4 mm) plus complexe à imprimer et à manipuler. Dans ce cas, nous aurions pu utiliser un modèle animal plus gros, comme le lapin. Ce sont des modèles plus couteux et qui auraient nécessité une longue étape de mise en place.



*Figure 35. Système de stabilisation pour un défaut de fémur (Travaux de Thèse de Mathilde Fénélon)*

Le temps d'observation choisi pour notre étude a son importance quant aux résultats observés. Il aurait été intéressant d'avoir différents temps d'observations, notamment des temps plus longs pour observer l'évolution de la réparation lors de la dégradation du matériau. Ici après 2 mois le matériau est toujours présent. Cependant, un grand nombre d'animaux aurait été requis pour ces analyses. Il aurait également pu être intéressant de pouvoir réaliser un suivi longitudinal de la réparation afin de mettre en évidence des différences entre les groupes. Ce suivi longitudinal nous aurait permis d'estimer le moment opportun pour le sacrifice de nos animaux. C'est une procédure qui est sur le point d'être mise en place grâce à l'acquisition récente d'un microscanner adapté sur une plateforme de Bordeaux (LYRIC, Pessac).

Une étude chez un animal plus gros aurait également permis de réaliser des défauts plus proches de l'application souhaitée. L'utilisation d'un modèle de défaut osseux mandibulaire chez le cochon est prévue dans la suite du projet. Les observations pourront être réalisées sur des temps courts et des temps plus longs. Ce type d'expérimentations sont coûteuses et longues à mettre en place. Elles seront explorées dans le futur de ce projet, après avoir amélioré les différents points discutés ici.



## 9 Conclusion générale

Pour résumer, ce travail de thèse s'est découpé en 2 grande parties.

Une première grande étape qui a porté sur le développement et la caractérisation d'un matériau composite en PLGA-HA. Ce matériau se devait d'être compatible avec une impression 3D par FDM, ce que nous avons démontré. Nous nous sommes également assuré que notre procédé de fabrication avait un faible impact sur les propriétés des matériaux et permettait une distribution homogène des nanoparticules d'HA. La biocompatibilité de nos matériaux a également été largement démontré par nos expérimentations *in vitro* et *in vivo*.

La deuxième partie a consisté à développer avec ces matériaux des assemblages cellularisés. Notre approche de cellularisation couche par couche, ou sandwich, avait pour objectif de pallier aux problèmes rencontrés avec l'approche conventionnelle. *In vitro*, nous n'avons pas observé de différences entre notre approche et l'approche conventionnelle. La prolifération, la viabilité et la différenciation cellulaire étaient similaires. Nous avons également étudié l'intérêt de notre approche sandwich pour la régénération du tissu osseux *in vivo*. Les premiers résultats de cette partie sont encourageants mais demandent à être approfondis.

Beaucoup d'hypothèses restent à explorer pour ce travail et des questions restent en suspens. Nos résultats montrent la nécessité d'optimiser nos bioassemblages sur différents points, ouvrant sur plusieurs perspectives de travail :

- Améliorer la reproductibilité des ensemencements

Il est important de mettre au point une méthode de comptage efficace pour s'assurer de la reproductibilité des ensemencements. L'utilisation d'un compteur de cellules ou d'un cytomètre sont les méthodes les plus retrouvées dans la littérature. Elles nécessitent néanmoins quelques étapes de calibration.

- Caractériser de façon plus approfondie les cellules isolées.

Certaines inconstances observées dans nos résultats sont liées aux cellules, il semble donc évident de devoir approfondir cet aspect. La part en cellules souches mésenchymateuses dans les prélèvements de FVS devra être plus amplement étudié. Pour cela, une étude des marqueurs de différenciation est en cours. Une étude de l'intérêt d'une prédifférenciation des cellules avant implantation est également envisagée.

- Améliorer la stabilisation

Cette stabilisation est cruciale puisqu'elle peut impacter la colonisation cellulaire mais aussi la formation d'un nouveau tissu osseux après implantation. Pour améliorer cette stabilisation la structure des assemblages peut être revue et modifiée. Il est également possible d'envisager d'ajouter un élément stabilisateur qui reste à définir.

Enfin pour aller plus loin, il serait également intéressant de développer les aspects suivants :

- Développer des structures différentes.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, une structure différente peut permettre de moduler les propriétés mécaniques. Elle peut également permettre de favoriser et d'améliorer la prolifération et la colonisation cellulaire.

- Utiliser la capacité de la FVS à fournir des progéniteurs endothéliaux.

Plusieurs études ont montré l'intérêt d'utiliser un matériaux pré-vascularisé. Cette approche permet d'optimiser la survie et la colonisation cellulaire. Dans différentes études, la FVS a démontré être une source cellulaire adaptée pour ces approches.

- Evaluer la régénération osseuse dans un modèle plus proche de l'application souhaitée.

L'étude du potentiel de régénération osseuse chez le petit animal est une première approche intéressante. Toutefois ce modèle montre des limites que nous avons décrites. Le cochon est un modèle très utilisé pour la réalisation de défauts dans la sphère orale. Une étude avec ce type de modèle permettrait d'étudier le potentiel de nos assemblages dans une situation plus proche de la réalité clinique.







## 10 Communications scientifiques

### **Publications**

*Development and Characterization of a PLGA-HA Composite Material to Fabricate 3D-printed Scaffolds for Bone Tissue Engineering.*

**Babilotte J**, Martin B, Guduric V, Bareille R, Agniel R, Roques S, Héroguez V, Dussauze M, Gaudon M, Le Nihouannen D, Catros S

Mater Sci Eng C. 2021; 118. doi: 10.1016/j.msec.2020.111334

*3D printed polymer–mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: Fabrication and characterization.*

**Babilotte J**, Guduric V, Le Nihouannen D, Naveau A, Fricain JC, Catros S

J Biomed Mater Res Part B 2019 00B:1–17. doi : 10.1002/jbm.b.34348

*Layer-by-layer BioAssembly of poly(lactic) acid membranes loaded with co-culture of HBMSCs and EPCs improves vascularization in vivo.*

Guduric V, Siadous R, **Babilotte J**, Seimbille M, Bareille R, Rey S, Thébaud NB, Le Nihouannen D, Fricain JC, Devillard R, Luzanin O, Catros S.

J Biomed Mater Res A. 2019;107(12):2629-2642. doi:10.1002/jbm.a.36769

### **Communications orales dans des congrès nationaux et internationaux**

---

*Development and characterization of a poly(lactic-co-glycolic) acid - hydroxyapatite composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering.*

**2017**

Babilotte J, Guduric V, Bareille R, Le Nihouannen D, Cardinal T, Gaudon M, Fricain JC, Catros S.

Biofabrication, Pékin (Chine)

---

---

*Development and characterization of a poly(lactic-co-glycolic) acid - hydroxyapatite composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering.*

**2018** Babilotte J, Guduric V, Bareille R, Le Nihouannen D, Cardinal T, Gaudon M, Fricain JC, Catros S.

Young Scientist Symposium, Bordeaux (France)

---

*In vitro characterization of a poly(lactic-co-glycolic) acid - hydroxyapatite 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering*

**2019** Babilotte J, Guduric V, Bareille R, Le Nihouannen D, Fricain JC, Catros S.

BIOMAT-MatSan, La Grande Motte (France)

---

*Fabrication of a Bone Substitute for Oral Surgery through Layer-by-Layer Assembly of Cellularized Scaffold Membranes*

Web'BIOMAT (online)

**Invité**

**2020**

*Development of a poly(lactic-co-glycolic) acid - hydroxyapatite 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering*

ECTS (online)

**Invité**

---

### **Communications affichées dans des congrès nationaux et internationaux**

---

Development of a PLGA-HA composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering

**2017** Babilotte J, Guduric V, Bareille R, Le Nihouannen D, Cardinal T, Gaudon M, Fricain JC, Catros S.

Bioceramics, Toulouse (France)

**Best Poster Award**

---

---

*Development and characterization of a poly(lactic-co-glycolic) acid - hydroxyapatite composite material to fabricate 3d-printed scaffolds for bone tissue engineering*

Babilotte J, Guduric V, Bareille R, Le Nihouannen D, Cardinal T, Gaudon M, Fricain JC, Catros S.

JFBTM, Monaco

**Best Poster Award**

**2018**

*Development and characterization of a poly(lactic-co-glycolic) acid - hydroxyapatite composite material to fabricate 3d-printed scaffolds for bone tissue engineering*

Babilotte J, Guduric V, Bareille R, Le Nihouannen D, Cardinal T, Gaudon M, Fricain JC, Catros S.

ESB, Maastricht (Pays-Bas)

*In vitro characterization of a poly(lactic-co-glycolic) acid - hydroxyapatite 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering*

Babilotte J, Guduric V, Bareille R, Le Nihouannen D, Fricain JC, Catros S.

Biofabrication, Würzburg (Allemagne)

---

*Characterization of a poly(lactic-co-glycolic) acid - hydroxyapatite 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering*

Babilotte J, Guduric V, Bareille R, Le Nihouannen D, Fricain JC, Catros S.

ESB, Dresde (Allemagne)

**Flash poster**

**2019**

*Characterization of a Poly(lactic-co-glycolic) Acid - Hydroxyapatite 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering*

Babilotte J, Guduric V, Bareille R, Le Nihouannen D, Fricain JC, Catros S.

Journée du département STS, Bordeaux (France)

**Flash poster**

---

*Characterization of a Poly(lactic-co-glycolic) Acid - Hydroxyapatite 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering*

Babilotte J, Guduric V, Bareille R, Le Nihouannen D, Fricain JC, Catros S.

Biofabrication, Columbus (USA)

**Travel Award**

---

*Poly(lactic-co-glycolic) acid - hydroxyapatite 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering*

**2020**

Babilotte J, Martin B, Chassande O, Le Nihouannen D, Fricain JC, Catros S.

WBC (online)

---





## 11 Bibliographie

1. Gokhale JA, Boskey AL, Gheron Robey P. The Biochemistry of Bone. In: Osteoporosis (Second Edition). Academic Press; 2001. p. 107–88.
2. Jee W. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. In: Bone Mechanics Handbook, Second Edition. 2001. p. 1.1-1.68.
3. Cooper DML, Matyas JR, Katzenberg MA, Hallgrímsson B. Comparison of Microcomputed Tomographic and Microradiographic Measurements of Cortical Bone Porosity. *Calcified Tissue International*. 2004 May;74(5):437–47.
4. Hillier ML, Bell LS. Differentiating human bone from animal bone: A review of histological methods. Vol. 52, *Journal of Forensic Sciences*. 2007. p. 249–63.
5. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Vol. 3 Suppl 3, *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. American Society of Nephrology; 2008. p. S131.
6. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2011 Feb;26(2):229–38.
7. Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development [Internet]. Vol. 13, *Frontiers in Bioscience*. *Front Biosci*; 2008 [cited 2021 Jan 10]. p. 2001–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/17981687/>
8. Kohli N, Ho S, Brown SJ, Sawadkar P, Sharma V, Snow M, 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. Vol. 110, *Bone*. Elsevier Inc.; 2018. p. 38–46.
9. Jilka RL. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Medical and Pediatric Oncology* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2020 Jun 18];41(3):182–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mpo.10334>
10. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Vol. 289, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2000. p. 1504–8.
11. Väänänen K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption - Rationale for the design of new therapeutics. Vol. 57, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier; 2005. p. 959–71.
12. Florencio-Silva R, Rodrigues Da G, Sasso S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. 2015 [cited 2020 Jun 18]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/421746>
13. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells



- current stage and future perspectives. Vol. 180, *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2018. p. 143–62.
14. David S. Strayer, Emanuel Rubin, Jeffrey E. Saffitz, Alan L. Schiller. *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine* [Internet]. 7th edition. David S. Strayer, Emanuel Rubin, Jeffrey E. Saffitz, Alan L. Schiller, editors. Lippincott Williams & Wilkins; 2015 [cited 2020 Nov 15]. Available from: [https://books.google.fr/books/about/Rubin\\_s\\_Pathology.html?id=jS2MAwAAQBAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.fr/books/about/Rubin_s_Pathology.html?id=jS2MAwAAQBAJ&redir_esc=y)
  15. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. Vol. 8, *Nature Reviews Rheumatology*. 2012. p. 133–43.
  16. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003 Apr 1;88(5):873–84.
  17. Marzona L, Pavolini B. Play and Players in Bone Fracture Healing Match. *Clinical Cases in Mineral Bone Metabolism*. 2009;6(2):159–62.
  18. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(20):2941–53.
  19. Abbasi N, Hamlet S, Love RM, Nguyen NT. Porous scaffolds for bone regeneration. Vol. 5, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. Elsevier B.V.; 2020. p. 1–9.
  20. Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. Vol. 36, *Micron*. 2005. p. 630–44.
  21. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. Vol. 3, *Bioactive Materials*. KeAi Communications Co.; 2018. p. 278–314.
  22. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2007 Jul;1(4):245–60.
  23. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* [Internet]. 1993 [cited 2020 Sep 22];260(5110):920–6. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/8493529/>
  24. Asadian M, Chan KV, Norouzi M, Grande S, Cools P, Morent R, et al. Fabrication and plasma modification of nanofibrous tissue engineering scaffolds [Internet]. Vol. 10, *Nanomaterials*. MDPI AG; 2020 [cited 2021 Jan 10]. p. 119. Available from: [www.mdpi.com/journal/nanomaterials](http://www.mdpi.com/journal/nanomaterials)
  25. Goulet JA, Senunas LE, Desilva GL, Lou M, Greenfield KH. Autogenous Iliac Crest Bone Graft Complications and Functional Assessment [Internet]. Vol. 339, *Clinical orthopaedics and related research*. 1997. Available from: <https://journals.lww.com/clinorthop>

26. Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset A-M, Benkirane-Jessel N, et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *Journal of tissue engineering* [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2020 Sep 13];9:2041731418776819. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29899969>
27. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. Vol. 81, *Bone*. Elsevier Inc.; 2015. p. 112–21.
28. Delloye C, Cornu O, Druetz V, Barbier O. Bone allografts : What they can offer and what they cannot. *The Journal of Bone and Joint Surgery [Br]*. 2007;89-B:574–9.
29. Shibuya N, Jupiter DC. Bone Graft Substitute: Allograft and Xenograft. Vol. 32, *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*. W.B. Saunders; 2015. p. 21–34.
30. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials and applications [Internet]. Vol. 63, *Pediatric Research*. Nature Publishing Group; 2008 [cited 2021 Jan 10]. p. 492–6. Available from: <https://www-nature-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/articles/pr2008100>
31. Lynn AK, Yannas I v., Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen [Internet]. Vol. 71, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. John Wiley & Sons, Ltd; 2004 [cited 2020 Jun 28]. p. 343–54. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/full/10.1002/jbm.b.30096>
32. Yunus Basha R, Sampath SK, Doble M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. Vol. 57, *Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd; 2015. p. 452–63.
33. Nair LS, Laurencin CT. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. Vol. 102, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2006. p. 47–90.
34. Goncalves Boeckel D, Sesterheim P, Rodrigues Peres T, Herbert Augustin A, Minéia Wartchow K, Cantarelli Machado D, et al. Adipogenic mesenchymal stem cells and hyaluronic acid as a cellular compound for bone tissue engineering. *Journal of Craniofacial Surgery* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 Jan 10];30(3):777–83. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/30865107/>
35. Kazimierczak P, Benko A, Nocun M, Przekora A. Novel chitosan/agarose/hydroxyapatite nanocomposite scaffold for bone tissue engineering applications: Comprehensive evaluation of biocompatibility and osteoinductivity with the use of osteoblasts and mesenchymal stem cells. *International Journal of Nanomedicine* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jan 10];14:6615–30. Available from: </pmc/articles/PMC6707379/?report=abstract>
36. Granja PL, de Jéso B, Bareille R, Rouais F, Baquey C, Barbosa MA. Mineralization of regenerated cellulose hydrogels induced by human bone marrow stromal cells.

- European Cells and Materials [Internet]. 2005 [cited 2021 Jan 10];10:31–9. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/16217723/>
37. Venkatesan J, Kim SK. Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview [Internet]. Vol. 8, Marine Drugs. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2010 [cited 2021 Jan 10]. p. 2252–66. Available from: [/pmc/articles/PMC2953403/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2953403/)
  38. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience* [Internet]. 2006 Aug 7 [cited 2021 Jan 10];6(8):623–33. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/full/10.1002/mabi.200600069>
  39. Shrivats AR, McDermott MC, Hollinger JO. Bone tissue engineering: State of the union. Vol. 19, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2014. p. 781–6.
  40. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. Vol. 32, *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2007. p. 762–98.
  41. Serra T, Planell JA, Navarro M. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. *Acta Biomaterialia*. 2013 Mar;9(3):5521–30.
  42. Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z, Verma V, Rashid H, Glogauer M. Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. Vol. 8, *Materials*. MDPI AG; 2015. p. 5744–94.
  43. Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*. 2004;7(5):30–40.
  44. Weiner S, Wagner HD. The Material Bone: Structure-Mechanical Function Relations [Internet]. Vol. 28, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998 [cited 2020 Jun 28]. Available from: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
  45. Dorozhkin S v. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine [Internet]. Vol. 2, *Materials*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2009 [cited 2020 Jun 28]. p. 399–498. Available from: [/pmc/articles/PMC5445702/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2953403/)
  46. Legeros RZ, Craig RG. Strategies to affect bone remodeling: Osteointegration. *Journal of Bone and Mineral Research* [Internet]. 2009 Dec 3 [cited 2020 Jun 28];8(S2):S583–96. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbmr.5650081328>
  47. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. Vol. 21, *Biomaterials*. 2000.
  48. Dorozhkin S v. Bioceramics of calcium orthophosphates. Vol. 31, *Biomaterials*. 2010. p. 1465–85.
  49. Lu RJ, Wang X, He HX, Ling-Ling E, Li Y, Zhang GL, et al. Tantalum-incorporated hydroxyapatite coating on titanium implants: its mechanical and in vitro osteogenic properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2021 Jan 10];30(10). Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/31583537/>

50. Guillaume B. Comblement osseux par  $\beta$ -TCP en chirurgie maxillofaciale: revue des indications. Vol. 101, Morphologie. Elsevier Masson SAS; 2017. p. 113–9.
51. Dziadek M, Stodolak-Zych E, Cholewa-Kowalska K. Biodegradable ceramic-polymer composites for biomedical applications: A review. Vol. 71, Materials Science and Engineering C. Elsevier Ltd; 2017. p. 1175–91.
52. Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*. 2010;3(7):3867–910.
53. San Miguel B, Kriauciunas R, Tosatti S, Ehrbar M, Ghayor C, Textor M, et al. Enhanced osteoblastic activity and bone regeneration using surface-modified porous bioactive glass scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* [Internet]. 2010 Sep 15 [cited 2021 Jan 10];94(4):1023–33. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/20694969/>
54. Silva ARP, Paula ACC, Martins TMM, Goes AM, Pereria MM. Synergistic effect between bioactive glass foam and a perfusion bioreactor on osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* [Internet]. 2014 Mar [cited 2021 Jan 10];102(3):818–27. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/23625853/>
55. Matassi F, Botti A, Sirleo L, Carulli C, Innocenti M. Porous metal for orthopedics implants [Internet]. Vol. 10, *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. CIC Edizioni Internazionali; 2013 [cited 2020 Jun 30]. p. 111–5. Available from: </pmc/articles/PMC3796997/?report=abstract>
56. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. Vol. 24, *Biomaterials*. Elsevier BV; 2003. p. 4337–51.
57. Babilotte J, Guduric V, le Nihouannen D, Naveau A, Fricain JC, Catros S. 3D printed polymer–mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: Fabrication and characterization. Vol. 107, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 2579–95.
58. Yunus Basha R, Sampath SK, Doble M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. Vol. 57, *Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd; 2015. p. 452–63.
59. Carradò A, Perrin-Schmitt F, Le Q v., Giraudel M, Fischer C, Koenig G, et al. Nanoporous hydroxyapatite/sodium titanate bilayer on titanium implants for improved osteointegration. *Dental Materials*. 2017 Mar 1;33(3):321–32.
60. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* [Internet]. 1998 Nov 6 [cited 2020 Oct 4];282(5391):1145–7. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
61. Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells [Internet]. Vol. 23, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group; 2005 [cited

- 2020 Oct 4]. p. 699–708. Available from: <https://www-nature-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/articles/nbt1102>
62. Fong CY, Gauthaman K, Bongso A. Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *Journal of Cellular Biochemistry* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2020 Oct 4];111(4):769–81. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/full/10.1002/jcb.22775>
  63. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* [Internet]. 2012 [cited 2020 Oct 4];40(5):363–408. Available from: </pmc/articles/PMC3766369/?report=abstract>
  64. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663–76.
  65. Bensaïd W, Oudina K, Viateau V, Potier E, Bousson V, Blanchat C, et al. De Novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model. *Tissue Engineering* [Internet]. 2005 Jul 5 [cited 2020 Oct 4];11(5–6):814–24. Available from: <https://www-liebertpub-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/abs/10.1089/ten.2005.11.814>
  66. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* [Internet]. 1998 Mar 1 [cited 2020 Oct 4];16(2):155–62. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/full/10.1002/jor.1100160202>
  67. Zhang ZY, Teoh SH, Hui JHP, Fisk NM, Choolani M, Chan JKY. The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application. Vol. 33, *Biomaterials*. Elsevier; 2012. p. 2656–72.
  68. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue-engineering applications: Current status and future prospects [Internet]. Vol. 11, *Tissue Engineering*. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA ; 2005 [cited 2020 Oct 4]. p. 787–802. Available from: <https://www-liebertpub-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/abs/10.1089/ten.2005.11.787>
  69. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2008 Mar 1;129(3):163–73.
  70. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2006 Apr 1;24(4):150–4.
  71. Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, Wuisman PIJM. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. Vol. 13, *Tissue Engineering*. 2007. p. 1799–808.

72. Farré-Guasch E, Bravenboer N, Helder MN, Schulten EAJM, ten Bruggenkate CM, Klein-Nulend J. Blood vessel formation and bone regeneration potential of the stromal vascular fraction seeded on a calcium phosphate scaffold in the human maxillary sinus floor elevation model. *Materials*. 2018 Jan 20;11(1).
73. Prins H-J, Schulten EAJM, ten Bruggenkate CM, Klein-Nulend J, Helder MN. Bone Regeneration Using the Freshly Isolated Autologous Stromal Vascular Fraction of Adipose Tissue in Combination With Calcium Phosphate Ceramics. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2016 Oct;5(10):1362–74.
74. Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, et al. “In vitro” and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine* [Internet]. 2007 Oct 31 [cited 2020 Oct 4];5:55. Available from: /pmc/articles/PMC2198906/?report=abstract
75. Du J, Xie P, Lin S, Wu Y, Zeng D, Li Y, et al. Time-Phase Sequential Utilization of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Mesoporous Bioactive Glass for Restoration of Critical Size Bone Defects. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2018 Aug 29;10(34):28340–50.
76. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature Biotechnology*. 2004 May;22(5):560–7.
77. Semyari H, Rajipour M, Sabetkish S, Sabetkish N, Abbas FM, Kajbafzadeh AM. Evaluating the bone regeneration in calvarial defect using osteoblasts differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells on three different scaffolds: an animal study. *Cell and Tissue Banking*. 2016 Mar 1;17(1):69–83.
78. Shirakata Y, Nakamura T, Shinohara Y, Taniyama K, Sakoda K, Yoshimoto T, et al. An exploratory study on the efficacy of rat dedifferentiated fat cells (rDFATs) with a poly lactic-co-glycolic acid/hydroxylapatite (PLGA/HA) composite for bone formation in a rat calvarial defect model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014;25(3):899–908.
79. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry - Part I: Stem cell sources [Internet]. Vol. 56, *Journal of Prosthodontic Research*. J Prosthodont Res; 2012 [cited 2020 Oct 4]. p. 151–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/22796367/>
80. Dave JR, Tomar GB. Dental tissue-derived mesenchymal stem cells: Applications in tissue engineering. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* [Internet]. 2018 [cited 2020 Dec 28];46(5):429–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/30806262/>
81. Wongsupa N, Nuntanaranont T, Kamolmattayakul S, Thuaksuban N. Assessment of bone regeneration of a tissue-engineered bone complex using human dental pulp stem

- cells/poly( $\epsilon$ -caprolactone)-biphasic calcium phosphate scaffold constructs in rabbit calvarial defects. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2020 Oct 4];28(5):1–14. Available from: <https://link-springer-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/article/10.1007/s10856-017-5883-x>
82. El-Backly RM, Massoud AG, El-Badry AM, Sherif RA, Marei MK. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Australian Endodontic Journal* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2020 Oct 4];34(2):52–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1747-4477.2008.00139.x>
  83. Hull CW, Arcadia C. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. US Patent; # 4,575,330, 1986.
  84. Moroni L, Boland T, Burdick JA, de Maria C, Derby B, Forgacs G, et al. *Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology*. Vol. 36, *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 384–402.
  85. Yeo A, Cheok C, Teoh SH, Zhang ZY, Buser D, Bosshardt DD. Lateral ridge augmentation using a PCL-TCP scaffold in a clinically relevant but challenging micropig model. *Clinical Oral Implants Research*. 2012 Dec;23(12):1322–32.
  86. Saijo H, Igawa K, Kanno Y, Mori Y, Kondo K, Shimizu K, et al. Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by inkjet printing technology. *Journal of Artificial Organs*. 2009 Sep;12(3):200–5.
  87. Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludağ H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. Vol. 80, *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc; 2018. p. 1–30.
  88. Lin K, Sheikh R, Romanazzo S, Roohani I. 3D printing of bioceramic scaffolds-barriers to the clinical translation: From promise to reality, and future perspectives [Internet]. Vol. 12, *Materials*. MDPI AG; 2019 [cited 2020 Dec 31]. Available from: </pmc/articles/PMC6747602/?report=abstract>
  89. Trombetta R, Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. 3D Printing of Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery. *Annals of Biomedical Engineering*. 2017 Jan 1;45(1):23–44.
  90. Simpson RL, Wiria FE, Amis AA, Chua CK, Leong KF, Hansen UN, et al. Development of a 95/5 poly(L-lactide-co-glycolide)/hydroxylapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold as bone replacement material via selective laser sintering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2008;84(1):17–25.
  91. Zhou WY, Lee SH, Wang M, Cheung WL, Ip WY. Selective laser sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(L-lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008. p. 2535–40.

92. Wang Z, Abdulla R, Parker B, Samanipour R, Ghosh S, Kim K. A simple and high-resolution stereolithography-based 3D bioprinting system using visible light crosslinkable bioinks. *Biofabrication*. 2015 Dec 22;7(4).
93. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A poly(d,l-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Biomaterials*. 2009 Aug;30(23–24):3801–9.
94. Chu T-MG, Orton DG, Hollister SJ, Feinberg SE, Halloran JW. Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. Vol. 23, *Biomaterials*. 2002.
95. Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud M v. Scaffold-based tissue engineering: Rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. Vol. 22, *Trends in Biotechnology*. 2004. p. 354–62.
96. Kim K, Yeatts A, Dean D, Fisher JP. Stereolithographic bone scaffold design parameters: Osteogenic differentiation and signal expression. Vol. 16, *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. 2010. p. 523–39.
97. Gauvin R, Chen YC, Lee JW, Soman P, Zorlutuna P, Nichol JW, et al. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials*. 2012 May;33(15):3824–34.
98. Zein I, Hutmacher DW, Cheng Tan K, Hin Teoh S. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. Vol. 23, *Biomaterials*. 2002.
99. Placone JK, Engler AJ. Recent Advances in Extrusion-Based 3D Printing for Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials* [Internet]. 2018 Apr 25 [cited 2020 Dec 22];7(8):e1701161. Available from: /pmc/articles/PMC5954828/?report=abstract
100. Catros S, Guillemot F, Nandakumar A, Ziane S, Moroni L, Habibovic P, et al. Layer-by-layer tissue microfabrication supports cell proliferation in vitro and in vivo. *Tissue Engineering - Part C: Methods*. 2012 Jan 1;18(1):62–70.
101. Motamedi AS, Mirzadeh H, Hajiesmaeilbaigi F, Bagheri-Khoulenjani S, Shokrgozar M. Effect of electrospinning parameters on morphological properties of PVDF nanofibrous scaffolds. *Progress in Biomaterials* [Internet]. 2017 Sep [cited 2020 Nov 5];6(3):113–23. Available from: /pmc/articles/PMC5597567/?report=abstract
102. Wieringa P, Truckenmuller R, Micera S, van Wezel R, Moroni L. Tandem electrospinning for heterogeneous nanofiber patterns. *Biofabrication*. 2020;12(2).
103. Sampson SL, Saraiva L, Gustafsson K, Jayasinghe SN, Robertson BD. Cell Electrospinning: An In Vitro and In Vivo Study. *Small* [Internet]. 2014 Jan 15 [cited 2020 Nov 5];10(1):78–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/smll.201300804>
104. Jayasinghe SN, Qureshi AN, Eagles PAM. Electrohydrodynamic jet processing: An advanced electric-field-driven jetting phenomenon for processing living cells. *Small*



- [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2020 Nov 5];2(2):216–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/sml.200500291>
105. Muerza-Cascante ML, Haylock D, Hutmacher DW, Dalton PD. Melt electrospinning and its technologization in tissue engineering. Vol. 21, *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. Mary Ann Liebert Inc.; 2015. p. 187–202.
  106. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules*. 2006 Oct;7(10):2796–805.
  107. Powell HM, Supp DM, Boyce ST. Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. *Biomaterials*. 2008 Mar 1;29(7):834–43.
  108. Alexander FA, Johnson L, Williams K, Packer K. A parameter study for 3D-printing organized nanofibrous collagen scaffolds using direct-write electrospinning. *Materials* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2020 Dec 30];12(24). Available from: </pmc/articles/PMC6947327/?report=abstract>
  109. Deng L, Li Y, Zhang A, Zhang H. Nano-hydroxyapatite incorporated gelatin/zein nanofibrous membranes: Fabrication, characterization and copper adsorption. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020 Jul 1;154:1478–89.
  110. Murphy S v., Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. Vol. 32, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 773–85.
  111. Lei B, Guo B, Rambhia KJ, Ma PX. Hybrid polymer biomaterials for bone tissue regeneration. Vol. 13, *Frontiers of Medicine*. Higher Education Press; 2019. p. 189–201.
  112. Serra T, Ortiz-Hernandez M, Engel E, Planell JA, Navarro M. Relevance of PEG in PLA-based blends for tissue engineering 3D-printed scaffolds. *Materials Science and Engineering C*. 2014 May 1;38(1):55–62.
  113. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. Vol. 35, *Progress in Polymer Science (Oxford)*. Elsevier Ltd; 2010. p. 1217–56.
  114. Jaklenec A, Stamp A, Deweerd E, Sherwin A, Langer R. Progress in the tissue engineering and stem cell industry “are we there yet?” [Internet]. Vol. 18, *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA ; 2012 [cited 2020 Nov 26]. p. 155–66. Available from: <https://www.liebertpub-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/abs/10.1089/ten.teb.2011.0553>
  115. Radisic M, Malda J, Epping E, Geng W, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue. *Biotechnology and Bioengineering* [Internet]. 2006 Feb 5 [cited 2020 Dec 1];93(2):332–43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bit.20722>

116. Nichol JW, Khademhosseini A. Modular tissue engineering: Engineering biological tissues from the bottom up. *Soft Matter* [Internet]. 2009 [cited 2020 Nov 3];5(7):1312–9. Available from: [/pmc/articles/PMC2826124/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC2826124/?report=abstract)
117. Tiruvannamalai-Annamalai R, Armant DR, Matthew HWT. A glycosaminoglycan based, modular tissue scaffold system for rapid assembly of perfusable, high cell density, engineered tissues. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Jan 20 [cited 2020 Nov 3];9(1):84287. Available from: [/pmc/articles/PMC3896358/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3896358/?report=abstract)
118. Kawecki F, Clafshenkel WP, Fortin M, Auger FA, Fradette J. Biomimetic Tissue-Engineered Bone Substitutes for Maxillofacial and Craniofacial Repair: The Potential of Cell Sheet Technologies. *Advanced Healthcare Materials* [Internet]. 2018 Mar 21 [cited 2020 Dec 1];7(6):1700919. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/adhm.201700919>
119. Leferink AM, Tibbe MP, Bossink EGBM, de Heus LE, van Vossen H, van den Berg A, et al. Shape-defined solid micro-objects from poly(D,L-lactic acid) as cell-supportive counterparts in bottom-up tissue engineering. *Materials Today Bio*. 2019 Sep 1;4.
120. Guduric V, Siadous R, Babilotte J, Seimbille M, Bareille R, Rey S, et al. Layer-by-layer bioassembly of poly(lactic) acid membranes loaded with coculture of HBMSCs and EPCs improves vascularization in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2019;107(12).
121. Rago AP, Dean DM, Morgan JR. Controlling cell position in complex heterotypic 3D microtissues by tissue fusion. *Biotechnology and Bioengineering* [Internet]. 2009 Mar 1 [cited 2020 Nov 15];102(4):1231–41. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.22162>
122. Jakab K, Norotte C, Marga F, Murphy K, Vunjak-Novakovic G, Forgacs G. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication* [Internet]. 2010 Jun 2 [cited 2020 Nov 15];2(2):022001. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1758-5082/2/2/022001>
123. Guduric V, Metz C, Siadous R, Bareille R, Levato R, Engel E, et al. Layer-by-layer bioassembly of cellularized polylactic acid porous membranes for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2017 May 1;28(5).
124. Wan W, Zhang S, Ge L, Li Q, Fang X, Yuan Q, et al. Layer-by-layer paper-stacking nanofibrous membranes to deliver adipose-derived stem cells for bone regeneration. *International Journal of Nanomedicine* [Internet]. 2015 Feb 12 [cited 2020 Dec 13];10:1273–90. Available from: [/pmc/articles/PMC4334347/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4334347/?report=abstract)
125. Kim MS, Lee B, Kim HN, Bang S, Yang HS, Kang SM, et al. 3D tissue formation by stacking detachable cell sheets formed on nanofiber mesh. *Biofabrication* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2020 Dec 1];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28332479/>

126. Grémare A, Guduric V, Bareille R, Heroguez V, Latour S, L'heureux N, et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2018 Apr 1;106(4):887–94.
127. Wu V, Helder MN, Bravenboer N, ten Bruggenkate CM, Jin J, Klein-Nulend J, et al. Bone Tissue Regeneration in the Oral and Maxillofacial Region: A Review on the Application of Stem Cells and New Strategies to Improve Vascularization. *Stem Cells International* [Internet]. 2019 [cited 2020 Dec 28];2019. Available from: /pmc/articles/PMC7012224/?report=abstract
128. Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting for Nonunions: Surgical Technique. *JBJS Essential Surgical Techniques* [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 2020 Dec 28];os-88(1\_suppl\_2):322–7. Available from: <http://jbjs.org/cgi/doi/10.2106/JBJS.F.00203>
129. Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Saeri MR, Sorrell CC. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. *Materials and Design*. 2003;24(3):197–202.
130. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature Protocols*. 2012 Sep 6;7(10):1918–29.
131. Babilotte J, Martin B, Guduric V, Bareille R, Agniel R, Roques S, et al. Development and characterization of a PLGA-HA composite material to fabricate 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*. 2021 Jan 1;118.
132. Zonderland J, Moroni L. Steering cell behavior through mechanobiology in 3D: a regenerative medicine perspective. *Biomaterials*. 2020 Nov;120572.
133. Lin X, Shi Y, Cao Y, Liu W. Recent progress in stem cell differentiation directed by material and mechanical cues. *Biomedical Materials (Bristol)*. 2016 Feb 2;11(1).
134. Güven S, Mehrkens A, Saxer F, Schaefer DJ, Martinetti R, Martin I, et al. Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue. *Biomaterials*. 2011 Sep;32(25):5801–9.
135. Roato I, Belisario DC, Compagno M, Verderio L, Sighinolfi A, Mussano F, et al. Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction/Xenohybrid Bone Scaffold: An Alternative Source for Bone Regeneration. *Stem Cells International*. 2018;2018.
136. Kim A, Kim DH, Song HR, Kang WH, Kim HJ, Lim HC, et al. Repair of rabbit ulna segmental bone defect using freshly isolated adipose-derived stromal vascular fraction. *Cytotherapy*. 2012;14(3):296–305.
137. Catros S, Guillemot F, Lebraud E, Chanseau C, Perez S, Bareille R, et al. Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature. *IRBM*. 2010 Sep;31(4):226–33.

138. Catros S, Fricain JC, Guillotin B, Pippenger B, Bareille R, Remy M, et al. Laser-assisted bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite. *Biofabrication* [Internet]. 2011 Jun 28 [cited 2021 Jan 7];3(2):025001. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1758-5082/3/2/025001>
139. Fricain JC, Aid R, Lanouar S, Maurel DB, le Nihouannen D, Delmond S, et al. In-vitro and in-vivo design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. *Dental Materials*. 2018 Jul 1;34(7):1024–35.
140. Heo S-J, Kim S-E, Wei J, Hyun Y-T, Yun H-S, Kim D-H, et al. Fabrication and characterization of novel nano- and micro-HA/PCL composite scaffolds using a modified rapid prototyping process. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2021 Jan 9];9999A(1):NA-NA. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.31726>
141. Damadzadeh B, Jabari H, Skrifvars M, Airola K, Moritz N, Vallittu PK. Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-L-lactic acid and poly-L-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010 Sep;21(9):2523–31.
142. Zakaria SM, Sharif Zein SH, Othman MR, Yang F, Jansen JA. Nanophase Hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: A review. Vol. 19, *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. 2013. p. 431–41.
143. Dorozhkin S v. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. Vol. 6, *Acta Biomaterialia*. Elsevier; 2010. p. 715–34.
144. Yu D, Li Q, Mu X, Chang T, Xiong Z. Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low-temperature rapid-prototyping technology. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2008 Oct;37(10):929–34.
145. Simpson RL, Nazhat SN, Blaker JJ, Bismarck A, Hill R, Boccaccini AR, et al. A comparative study of the effects of different bioactive fillers in PLGA matrix composites and their suitability as bone substitute materials: A thermo-mechanical and in vitro investigation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2015 Oct 1;50:277–89.
146. Magri AMP, Fernandes KR, Kido HW, Fernandes GS, Fermino S de S, Gabbai-Armelin PR, et al. Bioglass/PLGA associated to photobiomodulation: effects on the healing process in an experimental model of calvarial bone defect. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 Jan 7];30(9):1–14. Available from: <https://link-springer-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/article/10.1007/s10856-019-6307-x>
147. Distler T, Fournier N, Grünwald A, Polley C, Seitz H, Detsch R, et al. Polymer-Bioactive Glass Composite Filaments for 3D Scaffold Manufacturing by Fused Deposition

- Modeling: Fabrication and Characterization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020 Jun 24;8.
148. Kim J, McBride S, Tellis B, Alvarez-Urena P, Song YH, Dean DD, et al. Rapid-prototyped PLGA/ $\beta$ -TCP/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds in a rabbit femoral defect model. *Biofabrication*. 2012 Jun;4(2).
  149. Simpson RL, Wiria FE, Amis AA, Chua CK, Leong KF, Hansen UN, et al. Development of a 95/5 poly(L-lactide-co-glycolide)/hydroxylapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold as bone replacement material via selective laser sintering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2008;84(1):17–25.
  150. Korpela J, Kokkari A, Korhonen H, Malin M, Narhi T, Seppalea J. Biodegradable and bioactive porous scaffold structures prepared using fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2013 May;101(4):610–9.
  151. Xu N, Ye X, Wei D, Zhong J, Chen Y, Xu G, et al. 3D artificial bones for bone repair prepared by computed tomography-guided fused deposition modeling for bone repair. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2014 Sep 10;6(17):14952–63.
  152. Wu D, Spanou A, Diez-Escudero A, Persson C. 3D-printed PLA/HA composite structures as synthetic trabecular bone: A feasibility study using fused deposition modeling. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2020 Mar 1;103.
  153. Senatov FS, Niaza K v., Zadorozhnyy MY, Maksimkin A v., Kaloshkin SD, Estrin YZ. Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2016 Apr 1;57:139–48.
  154. Liu CG, Zeng YT, Kankala RK, Zhang SS, Chen AZ, Wang S bin. Characterization and preliminary biological evaluation of 3D-printed porous scaffolds for engineering bone tissues. *Materials* [Internet]. 2018 Sep 26 [cited 2020 Dec 29];11(10). Available from: /pmc/articles/PMC6213437/?report=abstract
  155. Nyberg E, Rindone A, Dorafshar A, Grayson WL. Comparison of 3D-Printed Poly- $\epsilon$ -Caprolactone Scaffolds Functionalized with Tricalcium Phosphate, Hydroxyapatite, Bio-Oss, or Decellularized Bone Matrix. *Tissue Engineering - Part A*. 2017 Jun 1;23(11–12):503–14.
  156. Zheng P, Yao Q, Mao F, Liu N, Xu Y, Wei B, et al. Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 3D printed poly- $\epsilon$ -caprolactone/hydroxyapatite scaffolds combined with bone marrow clots. *Molecular Medicine Reports*. 2017 Oct 1;16(4):5078–84.
  157. Hung BP, Naved BA, Nyberg EL, Dias M, Holmes CA, Elisseeff JH, et al. Three-Dimensional Printing of Bone Extracellular Matrix for Craniofacial Regeneration. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 2016 Oct 10;2(10):1806–16.

158. Ding C, Qiao Z, Jiang W, Li H, Wei J, Zhou G, et al. Regeneration of a goat femoral head using a tissue-specific, biphasic scaffold fabricated with CAD/CAM technology. *Biomaterials*. 2013 Sep;34(28):6706–16.
159. Rhee SC, Ji Y-H, Gharibjanian NA, Dhong ES, Park SH, Yoon E-S. In Vivo Evaluation of Mixtures of Uncultured Freshly Isolated Adipose-Derived Stem Cells and Demineralized Bone Matrix for Bone Regeneration in a Rat Critically Sized Calvarial Defect Model [Internet]. Available from: [www.aperio.com=download-imagescope-viewer.asp#](http://www.aperio.com=download-imagescope-viewer.asp#)
160. Nyberg E, Farris A, O’Sullivan A, Rodriguez R, Grayson W. Comparison of stromal vascular fraction and passaged adipose-derived stromal/stem cells as point-of-care agents for bone regeneration. *Tissue Engineering - Part A*. 2019 Nov 1;25(21–22):1459–69.
161. Papadimitropoulos A, Piccinini E, Brachat S, Braccini A, Wendt D, Barbero A, et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells from fresh bone marrow in a 3D scaffold-based system under direct perfusion. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Jul 14 [cited 2020 Dec 29];9(7):102359. Available from: [/pmc/articles/PMC4096512/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4096512/?report=abstract)
162. Scherberich A, Galli R, Jaquier C, Farhadi J, Martin I. Three-Dimensional Perfusion Culture of Human Adipose Tissue-Derived Endothelial and Osteoblastic Progenitors Generates Osteogenic Constructs with Intrinsic Vascularization Capacity. *Stem Cells*. 2007 Jul;25(7):1823–9.
163. Nie M, Takeuchi S. Bottom-up biofabrication using microfluidic techniques. *Biofabrication*. 2018 Sep 17;10(4).
164. Ouyang L, Armstrong JPK, Chen Q, Lin Y, Stevens MM. Void-Free 3D Bioprinting for In Situ Endothelialization and Microfluidic Perfusion. *Advanced Functional Materials*. 2020 Jan 1;30(1).
165. Ozbolat IT, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. Vol. 76, *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2016. p. 321–43.
166. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clinical Oral Implants Research*. 2014;25(8):879–93.