



HAL
open science

Conception et optimisation d'un implant thérapeutique combiné à des organoïdes de cellules souches pour la nanomédecine régénérative ostéoarticulaire

Marion Pugliano

► **To cite this version:**

Marion Pugliano. Conception et optimisation d'un implant thérapeutique combiné à des organoïdes de cellules souches pour la nanomédecine régénérative ostéoarticulaire. Ingénierie biomédicale. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ111 . tel-03738098

HAL Id: tel-03738098

<https://theses.hal.science/tel-03738098>

Submitted on 25 Jul 2022

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.

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Unité de recherche Inserm-Unistra UMR 1260 « Nanomédecine Régénérative »

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le **15 février 2019** par

Marion PUGLIANO

Pour obtenir le grade de **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : **Sciences du Vivant / Nanomédecine Régénérative et
Ingénierie Tissulaire Ostéoarticulaire**

**Conception et optimisation d'un implant thérapeutique
combiné à des organoïdes de cellules souches pour la
nanomédecine régénérative ostéoarticulaire**

Directrice de Thèse

Mme Nadia Benkirane-Jessel

Directrice de recherche, Inserm UMR 1260, Strasbourg

Rapporteurs Externes

Mme Natalia de Isla

Maître de conférences, Université de Lorraine, Nancy

M. Xiong Wang

Professeur des Universités, Université de Lorraine, Nancy

Examineur Interne

M. Thierry Vandamme

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

À vaincre sans péril, on triomphe sans gloire.

Pierre Corneille

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité de recherche Inserm UMR 1260 « Nanomédecine Régénérative ». Je remercie le Dr Nadia Benkirane-Jessel, de m'avoir accueillie au sein de son unité, et de m'avoir permis d'y évoluer durant ces années de thèse effectuée sous sa direction. J'aimerais également la remercier pour son enseignement, sa disponibilité et sa confiance.

Je tenais à adresser mes remerciements et ma reconnaissance aux Pr Natalia de Isla, Xiong Wang et Thierry Vandamme, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et de participer à mon jury de thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ces travaux.

Je tenais ensuite à remercier tout particulièrement le Dr Laetitia Keller, pour son encadrement, son immense sympathie, et son soutien de tous les instants. Merci d'avoir toujours cru en moi. Je te souhaite sincèrement le meilleur pour la suite.

Je souhaitais également remercier chaleureusement l'ensemble des membres du laboratoire, que j'ai pu côtoyer tout au long de ma thèse, et qui ont tous, à leur manière, participé à mon épanouissement.

Un grand merci à mes colocataires de bureau, sans qui les journées n'auraient pas été aussi agréables : merci à Laetitia et Pascale, dont l'absence se ressent encore aujourd'hui ; merci à Ysia pour ta bonne humeur, et pour tous tes petits bruitages qui auront rythmé mes journées passées devant l'ordinateur ; merci à Sara pour tes précieux conseils, et pour toute l'aide que tu as pu m'apporter dernièrement. Merci les filles pour votre sympathie, votre gentillesse et votre écoute sans faille. Cela a été un réel plaisir pour moi de travailler à vos côtés.

Merci Arielle et Sabine pour votre vive sympathie, votre disponibilité et votre aide en toutes circonstances.

Merci Hervé pour ta patience et ton aide très précieuse en histologie.

Merci Olivier pour ta bonne humeur, et ton humour parfois douteux.

Merci Florence et Mr Lesot pour votre présence et votre sympathie.

Merci Luc et Joseph pour votre sympathie et votre bonne humeur.

Merci Henri pour ta disponibilité et ton aide très précieuse en expérimentation animale.

Enfin, merci à Max, Quentin, ma baji Fareeha, Hassan, Catherine, Marion S et Damien, d'avoir partagé les joies (et les peines) du doctorat avec moi.

J'adresse un merci tout particulier à mes parents, qui ont toujours cru en moi. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté, pour votre soutien sans faille, et votre amour infini.

Je tiens également à remercier le plus chaleureusement possible « les vrais » : Lola, Max, Marie, Emma, Samira, Florent, Anthony et Elena. Ceux qui ont toujours, et seront toujours là pour moi. J'ai une pensée spéciale pour chacun de vous, car je vous dois beaucoup à toutes et à tous. Merci infiniment à vous.

Je souhaiterais enfin remercier tous mes proches qui, de près ou de loin, m'ont épaulée tout au long de ma thèse.

Table des matières

Liste des abréviations.....	8
Liste des figures et tableaux.....	10
I. État de l’art.....	11
1. L’unité ostéocondrale dans l’environnement articulaire.....	12
1.1. Le cartilage articulaire.....	12
1.1.1. Composition.....	12
1.1.2. Architecture.....	14
1.1.3. Fonction au sein de l’articulation.....	15
1.2. L’os sous-chondral.....	15
1.2.1. Composition.....	15
1.2.2. Architecture.....	16
1.2.3. Fonction au sein de l’articulation.....	17
1.3. Les lésions ostéocondrales.....	17
1.4. Les pathologies articulaires.....	18
2. Les stratégies thérapeutiques actuelles et leurs limites.....	19
2.1. Traitements non-chirurgicaux.....	19
2.1.1. Traitements par les molécules thérapeutiques.....	20
2.1.2. Thérapie cellulaire.....	21
2.2. Traitements chirurgicaux.....	21
2.2.1. La technique de microfracture.....	21
2.2.2. La mosaïcplastie.....	22
2.2.3. L’implantation de chondrocytes autologues.....	23
2.2.4. L’implantation de chondrocytes autologues assistée par une matrice.....	24
2.2.5. Arthroplastie partielle ou totale de l’articulation.....	24
3. La médecine régénérative ostéoarticulaire.....	25
3.1. Définition et principe de l’ingénierie tissulaire.....	25
3.2. Les cellules dans l’ingénierie tissulaire ostéoarticulaire.....	26
3.2.1. Les chondrocytes.....	27
3.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses.....	27
3.2.3. Les cellules souches pluripotentes induites.....	30

3.3. Les biomatériaux dans l'ingénierie tissulaire ostéoarticulaire.....	31
3.3.1. Les différentes générations de biomatériaux.....	31
3.3.2. Cahier des charges du biomatériau idéal.....	33
3.3.3. Exemples de produits commerciaux.....	34
3.4. Les molécules thérapeutiques dans l'ingénierie tissulaire ostéoarticulaire.....	36
3.4.1. Les facteurs de croissance pour la régénération cartilagineuse et osseuse.....	36
3.4.2. Les méthodes de fonctionnalisation des biomatériaux.....	37
4. Les médicaments de thérapie innovante.....	39
4.1. Règlementation européenne sur les thérapies innovantes.....	39
4.2. Les différentes catégories de produits.....	40
4.3. Cadre européen applicable aux médicaments de thérapie innovante.....	42
4.3.1. Les différents types de médicaments de thérapie innovante.....	42
4.3.2. Essais cliniques et mise sur le marché d'un médicament de thérapie innovante.....	43
4.3.3. Élaboration d'un médicament de thérapie innovante.....	44
II. Objectifs de la thèse.....	45
III. Résultats et discussion.....	49
Chapitre 1 - Élaboration d'un modèle d'implant thérapeutique de collagène II issu des méduses, activé par des nanoréservoirs de TGF-β3 et équipé de cellules souches mésenchymateuses humaines.....	50
1.1. Contexte et objectifs.....	51
1.2. Résultats et discussion.....	52
1.2.1. Fonctionnalisation et caractérisation de l'implant thérapeutique de collagène II.....	52
1.2.2. Potentiel chondrogénique de l'implant thérapeutique de collagène II fonctionnalisé.....	53
1.3. Conclusion.....	54
Chapitre 2 - Développement d'un implant thérapeutique nano-actif à deux compartiments, doté de nanoréservoirs de BMP-7 et équipé d'organoïdes hybrides à des fins de médecine régénérative ostéoarticulaire.....	55
2.1. Contexte et objectifs.....	56
2.2. Résultats et discussion.....	57
2.2.1. Compartiment 1 : régénération de l'os sous-chondral.....	57
2.2.2. Compartiment 2 : régénération du cartilage articulaire.....	58

2.2.3. Combinaison des compartiments 1 et 2 : régénération de l'unité ostéochondrale.....	58
2.3. Conclusion.....	59
Chapitre 3 - Évaluation de l'efficacité d'un implant thérapeutique biphasique et nano-actif, équipé d'organoïdes de cellules souches mésenchymateuses, pour la régénération ostéoarticulaire dans le modèle de brebis.....	60
3.1. Contexte et objectifs.....	61
3.2. Résultats et discussion.....	61
3.2.1. Isolation et confirmation du caractère souche des CSMs dérivées de moelle osseuse de brebis.....	61
3.2.2. Évaluation de la régénération du cartilage articulaire par des approches cliniques pertinentes.....	62
3.2.3. Évaluation de la régénération cartilagineuse à travers le dépôt de glycosaminoglycanes sulfatés.....	64
3.3. Conclusion.....	64
IV. Conclusion générale et perspectives.....	66
V. Annexes.....	70
Annexe 1.....	71
Annexe 2.....	72
VI. Références.....	73
Résumé.....	83
Abstract.....	84

Liste des abréviations

- **ACAN** : aggrécane
- **ACI** : « autologous chondrocyte implantation » ou implantation de chondrocytes autologues
- **AINS** : anti-inflammatoires non-stéroïdiens
- **AMM** : autorisation de mise sur le marché
- **Ansm** : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
- **ATMPs** : « Advanced therapy medicinal products » ou médicament thérapie innovante

- **BMPs** : « *Bone Morphogenetic Proteins* » ou protéines de morphogenèse osseuse
- **BPC** : bonnes pratiques cliniques
- **BPF** : bonnes pratiques de fabrication
- **Bsp II** : « *Bone sialoprotein II* » ou sialoprotéine osseuse II

- **CAT** : « *Committee for Advanced Therapies* » ou comité d'experts en charge de l'évaluation de la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments de thérapie innovante
- **CD** : cluster de différenciation
- **CE** : conformité européenne
- **CHMP** : Comité des Médicaments à Usage Humain
- **CMH II** : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
- **COLL2** : collagène de type II
- **CSEs** : cellules souches embryonnaires
- **CSMs** : cellules souches mésenchymateuses

- **EESS** : exigences essentielles de sécurité et de santé
- **EMA** : Agence Européenne des Médicaments
- **ESB** : encéphalopathie spongiforme bovine

- **F** : fonctionnalisé
- **FDA** : « *Food and Drug Administration* » aux Etats-Unis, équivalent à l'EMA en Europe
- **FGFs** : « *Fibroblast Growth Factors* » ou facteurs de croissance des fibroblastes

- **GAGs** : glycosaminoglycanes
- **GCP** : « *good clinical practices* » ou bonnes pratiques cliniques
- **GMP** : « *good manufacturing practices* » ou bonnes pratiques de fabrication

- **hCSMs** : cellules souches mésenchymateuses humaines
- **HLA-DR** : locus DR des antigènes de leucocytes humains

- **ICRS** : « *International Cartilage Repair Society* » ou Société Internationale de Réparation du Cartilage
- **ICST** : « *International Society for Cellular Therapy* » ou Société Internationale de Thérapie Cellulaire
- **IGF-1** : « *Insulin-like Growth Factor - 1* » ou facteur de croissance analogue à l'insuline 1
- **iPSCs** : « *induced pluripotent stem cells* » ou cellules souches pluripotentes induites
- **IRM** : imagerie par résonance magnétique
- **LbL** : « *Layer by Layer* » ou dépôt de multicouches de polyélectrolytes
- **leem** : les entreprises du médicament
- **MACI** : « *matrix-assisted autologous chondrocyte implantation* » ou implantation de chondrocytes autologues assistée par une matrice
- **MEB** : microscopie électronique à balayage
- **MEC** : matrice extracellulaire
- **micro-CT** : microtomographie à rayons X assistée par ordinateur
- **MTI** : médicament de thérapie innovante
- **MTI-PP** : médicament de thérapie innovante préparé ponctuellement
- **NF** : non-fonctionnalisé
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **PCL** : poly-ε-caprolactone
- **PGA** : acide polyglycolique
- **PLA** : acide polylactique
- **PLGA** : copolymère d'acide polylactique et d'acide polyglycolique
- **PMEs** : petites et moyennes entreprises
- **PRP** : plasma riche en plaquettes
- **qRT-PCR** : réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel
- **Runx2** : « Runt-related transcription factor 2 »
- **Sox9** : « Sex determining region Y – box 9 »
- **TGF-β** : « *Transforming Growth Factor beta* » ou facteur de croissance transformant bêta
- **TPEs** : très petites entreprises
- **VEGF** : « *Vascular Endothelial Growth Factor* » ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Représentation schématique d'une articulation synoviale et détail de l'unité ostéochondrale.....	12
Figure 2 : Les différentes zones structurales du cartilage articulaire mature.....	14
Figure 3 : Illustration simplifiée des 4 grades de sévérité des lésions ostéochondrales selon le système d'évaluation développé par l'ICRS.....	18
Figure 4 : Les techniques de réparation des lésions ostéochondrales actuellement utilisées en clinique.....	22
Figure 5 : L'autogreffe ostéochondrale par mosaïcplastie.....	23
Figure 6 : Le triangle d'or de l'ingénierie tissulaire représentant les éléments requis pour la conception <i>in vitro</i> d'un substitut biologique implantable.....	25
Figure 7 : Les solutions thérapeutiques envisagées en fonction du stade d'avancement des lésions à traiter.....	33
Figure 8 : La technique du « <i>Layer by Layer</i> » (LbL) et la technologie des nanoréservoirs de molécules thérapeutiques.....	38
Tableau 1 : Exemples de produits commerciaux développés pour la régénération du cartilage articulaire.....	35

I. État de l'art

1. L'unité ostéochondrale dans l'environnement articulaire

Les articulations correspondent aux jonctions liant les différents os du squelette. Ces dernières sont plus ou moins mobiles en fonction de leur localisation, de leur composition et de leur complexité. L'articulation synoviale, caractérisée par une grande mobilité, est le type d'articulation le plus connu (genou par exemple). Celle-ci est maintenue et stabilisée par des ligaments délimitant la capsule articulaire, tapissée d'une membrane synoviale interne vascularisée, sécrétant le liquide synovial, lubrifiant de l'articulation. Les extrémités osseuses des articulations synoviales sont notamment recouvertes par du cartilage articulaire de surface, formant avec l'os sous-chondral sous-jacent, une entité fonctionnelle appelée unité ostéochondrale, ou encore unité ostéoarticulaire (**Figure 1**).

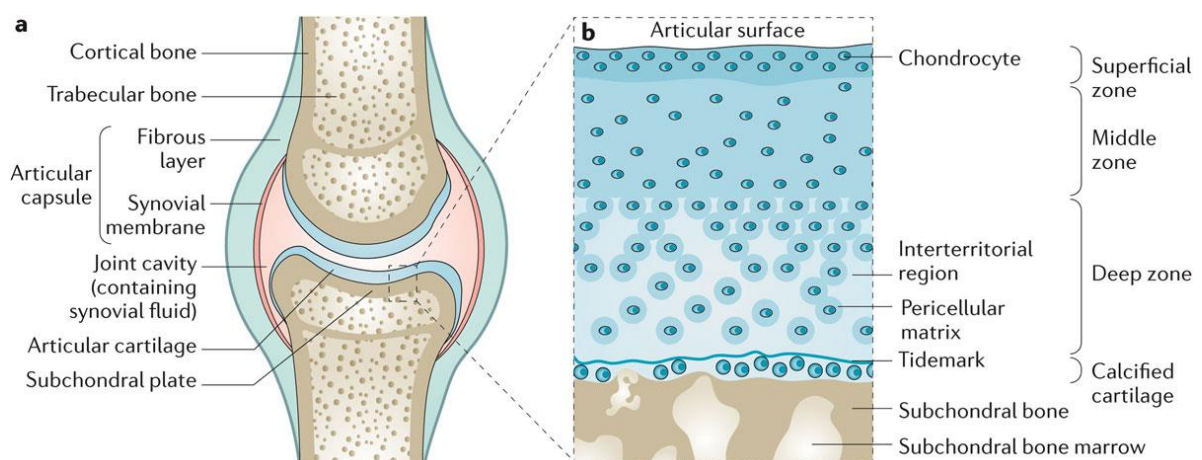


Figure 1 : Représentation schématique d'une articulation synoviale (a) et détail de l'unité ostéochondrale (b) [1].

1.1. Le cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu conjonctif hautement spécialisé obtenu par le processus de chondrogenèse, et jouant un rôle essentiel dans la formation (ossification endochondrale), la croissance et le maintien du squelette. Il existe plus exactement trois types de tissus cartilagineux dans le corps humain, qui diffèrent par leur localisation, leur fonction et leur composition spécifiques [2]. On distingue en effet le cartilage hyalin ou cartilage articulaire (genoux, coudes, hanches), le cartilage fibreux ou fibrocartilage (ménisque, disques intervertébraux, articulation temporo-mandibulaire), ainsi que le cartilage élastique (épiglotte, nez). Le propos de ce manuscrit concernera plus particulièrement le cartilage hyalin articulaire, élément constitutif de l'unité ostéochondrale précédemment décrite.

1.1.1. Composition

Le cartilage se distingue de la plupart des autres tissus par une matrice extracellulaire (MEC) hautement spécifique, constituée d'un type cellulaire unique : les chondrocytes. Ces derniers

correspondent à des cellules souches mésenchymateuses spécialisées, distribuées de manière sporadique dans le cartilage articulaire, et occupant moins de 5% du volume tissulaire total [3]. Les chondrocytes jouent un rôle central dans l'intégrité du tissu cartilagineux, et le maintien de son homéostasie. Ils assurent en effet la synthèse et la dégradation des protéines de la MEC, et expriment à leur surface des récepteurs pour diverses cytokines inflammatoires et facteurs de croissance, également impliqués dans la régulation de l'homéostasie. Par ailleurs, le cartilage articulaire étant un tissu avasculaire, l'apport en oxygène est assuré par imbibition du liquide synovial. Cela entraîne notamment la formation d'un gradient d'oxygène au sein du tissu. Le métabolisme des chondrocytes varie ainsi selon leur localisation dans le cartilage articulaire, et fonctionne à une faible tension en oxygène (allant de 10% dans les couches superficielles du cartilage, jusqu'à moins de 1% dans les couches plus profondes) [4]. D'autre part, les chondrocytes matures se retrouvent totalement encapsulés dans la MEC très dense du cartilage articulaire. Ils ne sont pas capables de migrer ou de proliférer de manière significative, contrairement aux cellules du tissu osseux, ce qui limite les capacités régénératives intrinsèques du cartilage à la suite d'un traumatisme [5].

La MEC du cartilage articulaire consiste, quant à elle, en un réseau structuré de fibres (collagène et élastine), étroitement associé à une substance fondamentale constituée d'eau, de protéoglycanes, de glycoprotéines et de protéines non-collagéniques. Le collagène est la macromolécule de structure la plus abondante dans le cartilage articulaire. On distingue plusieurs types de collagènes au sein de ce tissu, mais le collagène de type II y est majoritairement présent (90 à 95%). Les autres types de collagènes (IX et XI notamment), minoritaires (environ 5%), participent toutefois à la formation et au maintien du réseau de fibres de collagène de type II. Ce réseau collagénique est notamment responsable de la résistance du cartilage articulaire aux charges de traction. Bien qu'elle soit faiblement présente dans la MEC, l'élastine apporte quant à elle de l'élasticité au tissu. Sous tension, les fibres d'élastine sont en effet capables de s'étirer jusqu'à 150% de leur longueur initiale. Par ailleurs, l'eau peut constituer jusqu'à 80% du poids humide du cartilage articulaire, et représente de ce fait son composant le plus abondant. Le flux d'eau au travers du tissu cartilagineux, et à la surface articulaire, participe notamment au transport et à la distribution des nutriments aux chondrocytes, en plus d'assurer la lubrification articulaire.

Les protéoglycanes sont des monomères protéiques hautement glycosylés, représentant le second groupe de macromolécules le plus présent dans la MEC cartilagineuse. Ils consistent en une protéine centrale, sur laquelle sont covalamment attachées une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) sulfatés, tels que la chondroïtine sulfate ou le kératane sulfate. Ces GAGs possèdent des caractéristiques physicochimiques uniques, attribuant aux protéoglycanes un caractère hydrophile leur permettant d'attirer et de retenir les molécules d'eau. Ils procurent ainsi au cartilage articulaire de la résistance aux forces de compression, avec une déformation minimale. L'aggrécane représente notamment un des protéoglycanes les plus grands et les plus abondants du cartilage articulaire. Il contient plus de 100

chaînes de chondroïtine sulfates et de kératane sulfates, et peut également interagir avec l'acide hyaluronique, pour former de larges agrégats de protéoglycanes. L'acide hyaluronique est notamment l'unique GAG non-sulfaté, qui ne se lie pas de manière covalente à une protéine centrale pour former un protéoglycane. Enfin, la MEC contient en plus faibles quantités des glycoprotéines et des protéines non-collagéniques, impliquées dans l'organisation et le maintien de la structure macromoléculaire de la matrice.

1.1.2. Architecture

Le cartilage articulaire peut structurellement être divisé en 4 zones distinctes : la zone superficielle (10 à 20% de l'épaisseur tissulaire), la zone moyenne (40 à 60%), la zone profonde (30 à 40%) et la zone calcifiée (5 à 10%) (**Figure 2**).

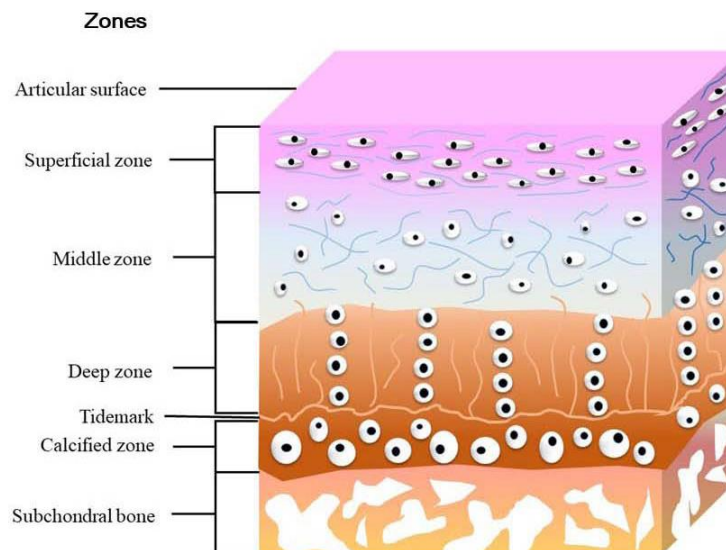


Figure 2 : Les différentes zones structurelles du cartilage articulaire mature [6].

La fine zone superficielle est directement en contact avec le liquide synovial, et protège les couches plus profondes des forces de cisaillement. Les fibres de collagène y sont étroitement compactées, et alignées parallèlement à la surface articulaire. Comparativement aux zones plus profondes, la zone superficielle contient le plus haut taux de collagène, et le plus bas taux de protéoglycanes. Les chondrocytes y sont nombreux et aplatis. Cette zone pourvoit, en grande partie, la résistance aux forces de traction subies par l'articulation. Dans la zone moyenne, le taux de protéoglycanes est plus élevé. Les fibres de collagène, plus fines, y sont organisées obliquement par rapport à la surface, tandis que les chondrocytes y sont arrondis et peu nombreux. Du point de vue fonctionnel, cette zone représente la première ligne de résistance aux forces de compression. La zone profonde fournit quant à elle une résistance plus importante à ce type de forces. En effet, le taux de protéoglycanes y est le plus important, et la concentration en eau la plus faible. Les fibres y sont plus épaisses, et orientées perpendiculairement à la surface articulaire. Les chondrocytes y sont sphériques et agencés sous forme de colonnes parallèles aux

fibres. Enfin, la zone calcifiée est séparée de la précédente par une fine interface correspondant au front de minéralisation (ou « *tidemark* »). Les chondrocytes, de plus grande taille, y sont moins nombreux et hypertrophiques. Cette zone permet notamment la solidarisation du cartilage articulaire sur l'os sous-chondral [6].

1.1.3. Fonction au sein de l'articulation

Le cartilage articulaire correspond à une structure unique conçue pour être robuste, fonctionnelle, et durable. Il s'agit d'un tissu non innervé, dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques, et possédant par conséquent une capacité d'autorégénération très limitée. Sa subsistance dépend principalement de la simple diffusion d'oxygène et de nutriments, provenant en grande majorité du liquide synovial en surface, mais également de l'os sous-chondral sous-jacent [7]. La fonction principale de ce tissu est de pourvoir une surface articulaire lisse et lubrifiée, pour assurer le bon glissement entre les pièces osseuses de l'articulation avec un faible coefficient de friction [8]. Malgré sa faible épaisseur (de 1,5 à 4 mm en moyenne dans le genou humain), il permet également d'amortir les chocs, et de protéger l'articulation en facilitant la transmission des charges vers l'os sous-chondral. Ainsi, ce tissu aux caractéristiques viscoélastiques uniques, est essentiel pour les propriétés biomécaniques du système squelettique.

1.2. L'os sous-chondral

Directement situé sous le cartilage articulaire, l'os sous-chondral constitue une zone de transition entre ce dernier, et la moelle osseuse.

1.2.1. Composition

A l'inverse du tissu cartilagineux, le tissu osseux est constitué de plusieurs types de cellules, qui sont les cellules ostéoprogénitrices, les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Les cellules ostéoprogénitrices dérivent des cellules souches mésenchymateuses, et peuvent se différencier en cellules plus spécialisées de l'os : les ostéoblastes et les ostéocytes. Les ostéoblastes sont notamment responsables de la formation du tissu osseux. Durant la synthèse de la MEC osseuse, un large nombre d'ostéoblastes meurent, tandis que d'autres retournent à un état de repos. D'autres encore, se retrouvent emprisonnés dans la matrice qu'ils ont synthétisée, modifient leur structure, et se différencient en ostéocytes. Les ostéocytes correspondent aux cellules primaires de l'os mature, et chaque ostéocyte est localisé dans une lacune entourée de tissu, appelée ostéoplaste. L'os possède une nature très dynamique permise par le processus intrinsèque de remodelage osseux. Il existe en effet un équilibre continu entre synthèse osseuse, réalisée par les ostéoblastes, et résorption osseuse, réalisée par les cellules appelées

ostéoclastes. Ces derniers démantèlent notamment la matrice osseuse minéralisée au moyen d'enzymes protéolytiques.

La MEC osseuse occupe, quant à elle, jusqu'à 95% du volume tissulaire total. Elle peut être divisée en matrice organique (20 à 40%), et en matrice inorganique minérale (50 à 70%). Sa teneur en eau (5 à 10%), est très variable en fonction du degré de minéralisation et de l'âge. D'une part, la fraction organique de la MEC est composée d'une substance fibrillaire (90%) contenant des protéines fibreuses structurales (collagène, élastine) ou adhérentes (fibronectine), et d'une substance interfibrillaire (10%). Cette dernière englobe des GAGs, des protéoglycanes, des petites protéines non-collagéniques (ostéopontine, ostéonectine, ostéocalcine et les sialoprotéines osseuses), et des lipides en petites quantités. Au sein du tissu osseux, ces molécules peuvent induire ou inhiber la minéralisation osseuse. Le collagène de type I est le constituant majeur de la matrice organique, et peut représenter jusqu'à 90% des macromolécules de celle-ci. Le réseau collagénique fibreux favorise la minéralisation du tissu osseux par la fixation, sur les fibres de collagène, de la fraction minérale sous forme de cristaux d'hydroxyapatite, qui confèrent au tissu osseux sa dureté. La fibronectine intervient dans l'adhérence entre les cellules et la matrice. Dotés d'un grand pouvoir osmotique, les GAGs et protéoglycanes attirent et retiennent les molécules d'eau pour former des gels fortement hydratés. Cependant, dans le tissu osseux, la phase aqueuse de ces gels est rapidement remplacée par les minéraux qui vont durcir la matrice. Les phénomènes de diffusion des nutriments et métabolites s'en retrouvent fortement amoindris. Enfin, les protéines non-collagéniques possèdent un rôle essentiel dans le renouvellement du tissu osseux, et certaines d'entre-elles contribuent également à l'initiation de la minéralisation de la matrice (notamment en liant le calcium). La sialoprotéine osseuse II (BspII) et l'ostéopontine permettent, respectivement, l'adhésion des ostéoblastes et des ostéoclastes à la matrice, tandis que l'ostéocalcine active les ostéoclastes. L'ostéonectine sert, quant à elle, de lien entre les cristaux minéraux. D'autre part, la fraction inorganique de la MEC est composée de sels minéraux, dont les plus abondants sont le calcium et le phosphore. L'hydroxyapatite est notamment l'espèce minérale majoritairement représentée dans la MEC osseuse [9].

1.2.2. Architecture

L'os sous-chondral correspond à une unité fonctionnelle très dynamique qui adapte sa structure selon les forces mécaniques subies par l'articulation, via le processus hautement régulé de remodelage osseux. Son épaisseur est variable en fonction des articulations. Celui-ci est constitué de deux composantes anatomiquement différentes, possédant des propriétés biologiques et mécaniques uniques [10]. Il est en effet formé (*i*) par le plateau sous-chondral, directement situé sous la zone calcifiée du cartilage articulaire, de laquelle il est séparé par la ligne de ciment ; et (*ii*) par l'os spongieux sous-chondral sous-jacent. Le plateau sous-chondral consiste en une fine couche d'os compact (ou cortical),

relativement peu poreux et faiblement vascularisé, s'imbriquant dans un os spongieux (ou trabéculaire) sous-chondral, fortement poreux et métaboliquement plus actif. Ce dernier est en effet constitué d'un nombre étonnamment élevé de nerfs, de vaisseaux sanguins et de vaisseaux lymphatiques [11]. Par ailleurs, l'os sous-chondral est envahi d'espaces creux pourvoyant une connexion directe entre l'os spongieux (moelle osseuse) et les couches basales du cartilage articulaire. A travers ces cavités, les nerfs et les vaisseaux atteignent le cartilage calcifié sus-jacent en y projetant de petites ramifications [12].

1.2.3. Fonction au sein de l'articulation

L'os sous-chondral possède deux fonctions essentielles au sein de l'articulation. Il est premièrement reconnu comme étant un facteur clé dans le soutien et la protection de celle-ci. Il fournit en effet un support solide au cartilage articulaire, et exerce un rôle important dans l'absorption des chocs mécaniques en atténuant jusqu'à 30% de la charge articulaire [13]. Par ailleurs, l'os sous-chondral est également impliqué dans la subsistance et le métabolisme du cartilage articulaire sus-jacent [7,11]. Il fournit en effet des nutriments aux couches basales du cartilage articulaire, perméables aux petits solutés, via les vaisseaux émanant de l'os spongieux sous-chondral, et facilite l'élimination des déchets métaboliques [14]. Cet apport nutritif vient notamment compléter celui permis par le liquide synovial en surface, pouvant difficilement atteindre les régions les plus profondes du cartilage articulaire.

1.3. Les lésions ostéochondrales

Une réelle communication existe entre l'os sous-chondral et le cartilage articulaire, qui agissent de concert pour assurer et maintenir les fonctions protectives et mécaniques de l'articulation. Ainsi, l'altération d'un des deux tissus module inéluctablement les fonctions de l'autre, et participe à la dégénération de l'articulation. De manière générale, les dommages causés au cartilage articulaire peuvent être classés en deux catégories majeures. On distingue, d'une part, les lésions d'épaisseur partielle (« *partial-thickness defects* ») qui n'atteignent pas l'os sous-chondral. Et, d'autre part, les lésions de pleine épaisseur (« *full-thickness defects* ») qui pénètrent l'os sous-chondral [15].

A l'heure actuelle, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et l'arthroscopie représentent les pratiques cliniques de référence pour visualiser les lésions ostéochondrales focales, et les classer plus précisément selon leur degré de sévérité. Pas moins de 30 systèmes de classification, en 4 à 5 grades de sévérité, ont été décrits au cours des dernières années, mais ils ne permettent pas tous de réaliser une évaluation fiable et reproductible [16]. La Société Internationale de Réparation du Cartilage (« *International Cartilage Repair Society* », ICRS) a notamment développé un système d'évaluation

arthroscopique en 4 grades de sévérité, plus compréhensible, et de plus en plus utilisé par les chirurgiens orthopédistes [17] (**Figure 3**).

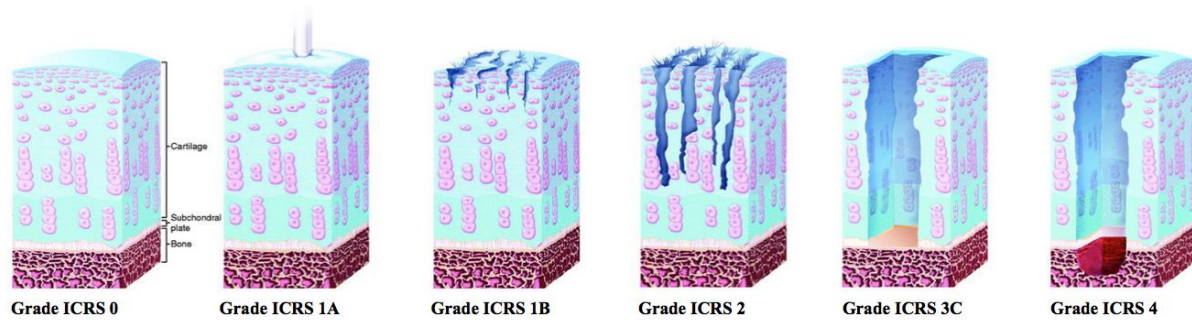


Figure 3 : Illustration simplifiée des 4 grades de sévérité des lésions ostéochondrales selon le système d'évaluation développé par l'ICRS (modifié à partir de clinicalgate.com)

Le grade ICRS 0 est attribué au cartilage articulaire « normal ». Le grade ICRS 1 est attribué à un cartilage dit « presque normal ». Il se subdivise en grade 1A, correspondant à un cartilage dont la surface est sujette à un ramollissement, et en grade 1B, correspondant à un cartilage présentant des fissures superficielles. Le grade ICRS 2 est attribué à un cartilage « anormal », comportant des lésions étendues jusqu'à 50% de son épaisseur. Les grades ICRS 3 et 4 sont attribués à un cartilage « sévèrement anormal ». Le grade ICRS 3 correspond à un cartilage dont les lésions s'étendent au-delà de 50% de son épaisseur. Il se subdivise en grade 3A, lorsque les lésions n'atteignent pas la zone calcifiée ; en grade 3B, lorsque les lésions atteignent la zone calcifiée ; et en grade 3C, lorsque les lésions exposent le plateau sous-chondral, sans toutefois l'altérer. Enfin, le grade ICRS 4 correspond à un cartilage endommagé sur toute son épaisseur, avec extension de la lésion au travers du plateau sous-chondral.

1.4. Les pathologies articulaires

En plus des lésions ostéochondrales résultant d'un traumatisme destructeur, les articulations et l'appareil locomoteur de manière plus générale, peuvent être sujets à diverses pathologies. Ces affections forment un groupe relativement hétérogène de pathologies le plus souvent chroniques, pouvant atteindre des individus de tout âge, et de toute condition physique (hyperactivité sportive chez les jeunes, vieillissement, etc.). Elles sont sources de fortes douleurs et d'handicap, et représentent l'un des principaux problèmes de santé publique. On ne dénombre pas moins de 150 pathologies articulaires pouvant être dégénératives, traumatiques, inflammatoires, ou simplement associées au vieillissement physiologique (arthrose, ostéoporose, lombalgies, polyarthrite rhumatoïde, ostéochondrite disséquante etc.). Ces dernières touchent un quart de la population européenne, et l'arthrose, une pathologie articulaire dégénérative, est notamment la plus répandue. En 2000, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a en effet recensé plus de 70 millions de personnes concernées par l'arthrose en Europe, un

chiffre en constante augmentation, qui représente un coût sociétal considérable de plus de 80 milliards d'euros. D'après l'Association Française de Lutte Anti-Rhumatismale, l'arthrose touche entre 9 et 10 millions de personnes en France, soit 17% de la population, et concerne toutes les tranches d'âge. En ayant engendré 5 millions d'arrêts de travail en l'espace d'une dizaine d'années, l'arthrose représente la première cause d'invalidité des plus de 40 ans. De 2002 à 2010, le coût afférent à la prise en charge de cette pathologie, par la sécurité sociale française, est passé d'1,6 milliards à plus de 3,5 milliards d'euros [18,19]. Les prévisions suggèrent, par ailleurs, que la prévalence de l'arthrose croîtra encore d'ici 2020, en raison de divers facteurs de risques qui souvent, se cumulent et se potentialisent les uns les autres, tels que le vieillissement de la population, ou encore l'augmentation de la prévalence de l'obésité.

2. Les stratégies thérapeutiques actuelles et leurs limites

Plusieurs options thérapeutiques sont actuellement disponibles pour traiter les lésions ostéocondrales de manière plus générale, et vont dépendre de la sévérité de chaque condition. Dans un premier temps, les patients souffrant de dommages légers à modérés se voient proposer des options non-chirurgicales, avant qu'un traitement par chirurgie ne devienne inévitable.

2.1. Traitements non-chirurgicaux

Toute une variété d'options non-chirurgicales permet d'apporter une amélioration significative en termes de douleur et de fonction articulaire chez les patients souffrant de dommages légers. A cette fin, des mesures non-médicamenteuses peuvent en premier lieu être entreprises. L'exercice physique de faible impact (aérobic, exercice aquatique) est la modalité la plus systématiquement recommandée contre l'arthrose, car il permet d'en atténuer les symptômes, d'améliorer la fonction articulaire et de prévenir l'invalidité du patient [20]. Etant donné l'existence d'un lien entre la prise de poids et l'aggravation des douleurs articulaires, la perte de poids est une mesure recommandée chez les patients en surpoids. Elle permet notamment de diminuer les forces de compression exercées sur les articulations. La kinésithérapie et le renforcement musculaire sont également couramment prescrits. Enfin, des orthèses peuvent être portées par les patients dans le but d'assister, de stabiliser, voire d'immobiliser les articulations touchées. Cependant, ces recommandations non-médicamenteuses ne permettent pas de traiter les lésions, mais uniquement de retarder leur progression [21]. La dégradation progressive du cartilage restant inévitable, des traitements à base de molécules thérapeutiques ou de cellules peuvent, par la suite, être initiés.

2.1.1. Traitements par les molécules thérapeutiques

Les antalgiques simples tels que l'acétaminophène (paracétamol), ainsi que les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), peuvent être utilisés par voie orale pour soulager les douleurs légères à modérées, tandis que les analgésiques opioïdes peuvent être prescrits dans le cas de douleurs plus sévères. Les AINS sont également utilisables par voie topique, directement sur l'articulation douloureuse. Malgré leur efficacité certaine en termes de réduction de la douleur, l'utilisation de ces diverses molécules, à court ou long terme, peut être associée à un certain nombre d'effets indésirables hépatotoxiques (acétaminophène) et gastro-intestinaux (AINS) entre autres, en plus des risques de dépendance (analgésiques opioïdes). De nombreux patients souhaitant éviter les traitements médicamenteux classiques, et leurs effets secondaires, se tournent vers des suppléments oraux obtenus sans ordonnance, tels que la glucosamine, ou encore la chondroïtine sulfate. Néanmoins, l'effet de ces derniers s'avère moindre.

Certaines options thérapeutiques permettent de traiter plus spécifiquement et plus efficacement les douleurs localisées. A cette fin, des infiltrations intra-articulaires sont couramment réalisées en rhumatologie. Leur principe est de délivrer le produit actif directement à proximité du tissu endommagé, et ainsi, de recourir à une dose minimale pour réduire les effets systémiques. Cependant, l'effet local et systémique d'une telle procédure est difficilement prévisible, ce qui engendre notamment des controverses liées à son indication. Les corticostéroïdes sont certainement les médicaments les plus utilisés par voie intra-articulaire. Ils permettent de produire un effet anti-inflammatoire local puissant, associé à une réduction de la douleur. Leur durée d'action est cependant très variable, et le bénéfice ne persiste de quelques semaines à quelques mois seulement. De plus, les infiltrations répétées de corticostéroïdes ont été incriminées dans la survenue de lésions du cartilage. La viscosupplémentation, ou viscosuppléance, par injection intra-articulaire d'acide hyaluronique exogène permet, quant à elle, de lubrifier l'articulation en restaurant la viscoélasticité du liquide synovial. L'efficacité de ce traitement est toutefois largement débattue, et comme pour les corticostéroïdes, le bénéfice de réduction de la douleur n'excède pas les quelques mois, et va dépendre du grade lésionnel du patient. Enfin, l'utilisation de préparations à base de Plasma Riche en Plaquettes (PRP), obtenu par centrifugation de sang autologue, est actuellement en plein essor, et semblerait avoir un effet plus important et de plus longue durée, comparativement aux traitements précédemment décrits (jusqu'à 12 mois). Des études restent cependant nécessaires pour confirmer son efficacité réelle, établir le nombre d'injections requises, ou encore déterminer la meilleure formulation du produit [22].

2.1.2. Thérapie cellulaire

Initialement étudiée pour stimuler la régénération du cartilage articulaire, l'injection intra-articulaire de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) s'est finalement révélée efficace dans la modulation de l'inflammation, et le soulagement de la douleur [23]. Les CSMs possèdent en effet la capacité de sécréter des molécules thérapeutiques, telles que des cytokines, qui vont leur permettre de moduler l'inflammation au sein de l'articulation. Il est aujourd'hui établi que la persistance d'une inflammation intra-articulaire contribue indéniablement à l'aggravation des dommages articulaires. La thérapie cellulaire par injection de CSMs représente ainsi une stratégie de protection, puisque la réduction de l'inflammation permet de préserver le cartilage, et de retarder la progression de ses lésions. Elle ne permet cependant pas la régénération du tissu cartilagineux. Plusieurs études cliniques ont démontré les effets bénéfiques de réduction de la douleur, entraînés par l'injection intra-articulaire de CSMs dérivées de la moelle osseuse ou du tissu adipeux, chez des patients souffrant d'arthrose. Malgré les résultats satisfaisants obtenus, des études plus approfondies restent nécessaires pour déterminer l'efficacité réelle de cette méthode, ainsi que la durabilité des améliorations observées [24].

2.2. Traitements chirurgicaux

Bien que les options thérapeutiques non-chirurgicales permettent de soulager la douleur, et potentiellement de retarder l'aggravation des dommages légers, ces dernières sont incapables de promouvoir la régénération tissulaire, et ne sont, par conséquent, pas curatives. On constate très fréquemment une détérioration progressive de l'articulation, associée à des douleurs articulaires invalidantes et des déficiences fonctionnelles graves. Lorsque les dommages sont plus sévères, un traitement est alors réalisé par arthroscopie ou par chirurgie. A ce jour, il existe notamment plusieurs procédures thérapeutiques appliquées en chirurgie orthopédique pour traiter les lésions cartilagineuses.

2.2.1. La technique de microfracture

Relativement simple et rapide à mettre en œuvre sous arthroscopie, la microfracture a longtemps été considérée comme l'approche chirurgicale de premier choix pour traiter les lésions de petite taille (moins de 2,5cm²). Inspirée du processus intrinsèque de réparation spontanée des lésions de pleine épaisseur (« *full-thickness* »), cette méthode consiste à créer plusieurs micro-forages dans la lésion, afin de perforer l'os sous-chondral (**Figure 4c**). Ces perforations de 0,5 à 1 millimètre de diamètre, sont uniformément réparties sur l'intégralité de la zone lésée, de la périphérie vers le centre, sur une profondeur de 4 millimètres, et espacées de 3 à 4 millimètres les unes des autres. Cette action permet notamment au sang et à la moelle osseuse, en temps normal absents du compartiment cartilagineux, d'y accéder pour former un caillot sanguin. Le recrutement des cellules souches de la moelle osseuse, ainsi

stimulé, va permettre le comblement de la lésion par la formation d'un nouveau tissu cartilagineux. La microfracture est une technique chirurgicale très répandue, car elle est peu onéreuse, faiblement invasive, et nécessite une période de convalescence relativement courte. Elle entraîne toutefois la régénération d'un néo-tissu de type fibrocartilagineux, aux propriétés biochimiques et biomécaniques inférieures à celles du cartilage hyalin initial. Sans la robustesse mécanique du cartilage hyalin, ce néo-tissu est vulnérable aux forces mécaniques articulaires, et finit par se détériorer entre 18 à 24 mois après la chirurgie [25]. De plus, les perforations de l'os sous-chondral entraînent, dans 20 à 50% des cas, le développement d'ostéophytes intra-lésionnels.

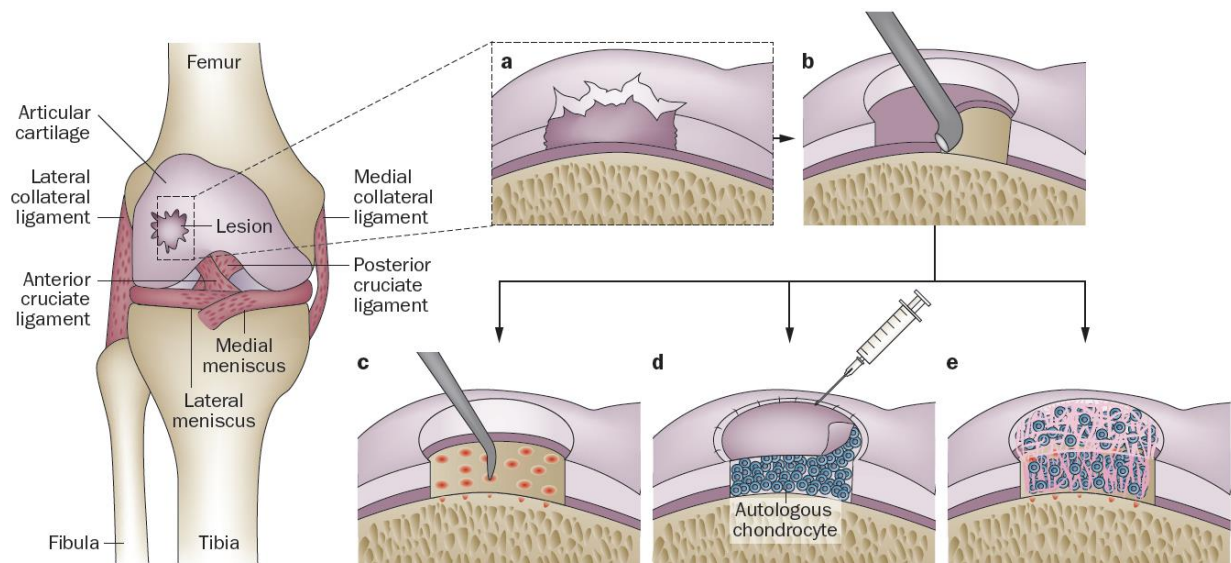


Figure 4 : Les techniques de réparation des lésions ostéochondrales actuellement utilisées en clinique [26].

2.2.2. La mosaïcplastie

La mosaïcplastie est une autre technique chirurgicale peu onéreuse, utilisée pour traiter les lésions ostéochondrales de grades 3 à 4 de petite taille (moins de 4cm^2). Elle est fréquemment indiquée pour réparer les lésions du genou et du talus. Cette méthode ne nécessitant qu'une seule étape chirurgicale, peut être réalisée sous arthroscopie ou après incision, en fonction de la taille du défaut à traiter. Elle consiste à prélever des greffons cylindriques ostéochondraux sains, de 6 à 9 millimètres de diamètre, au niveau d'une zone non-portante de l'articulation du patient, puis à les utiliser pour combler la majorité de la zone portante lésée (plus de 90%) (**Figure 5**). Des résultats cliniques très encourageants ont été reportés à court, moyen, et long termes, puisque cette approche thérapeutique permet de restituer un compartiment cartilagineux de type hyalin [27]. Elle est en revanche associée à d'importantes limitations : morbidité des sites donneurs, quantité limitée de greffons disponibles, faible capacité des greffons issus d'une zone non-portante à supporter les contraintes mécaniques dans leur nouvel

environnement portant, instabilité due à un défaut d'intégration périphérique des greffons à la zone d'implantation, et disparité entre les différentes surfaces.

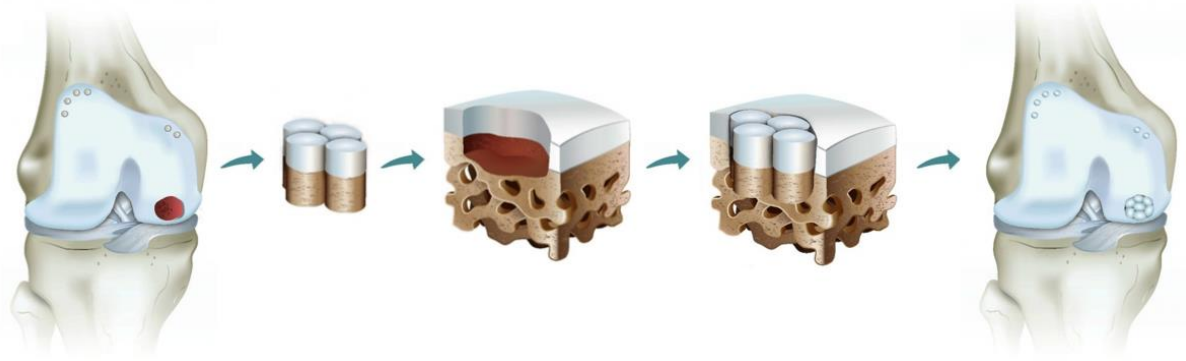


Figure 5 : L'autogreffe ostéochondrale par mosaïcplastie (modifié à partir de cartilage.org).

2.2.3. L'implantation de chondrocytes autologues

L'implantation de chondrocytes autologues (ACI) est une procédure thérapeutique en deux étapes chirurgicales, permettant de traiter des lésions ostéochondrales de plus grande taille (jusqu'à 10cm²). La première étape, réalisée sous arthroscopie, consiste à prélever une petite biopsie de cartilage sain au niveau d'une zone non-portante de l'articulation du patient à traiter. Les chondrocytes autologues sont alors isolés à partir de cette biopsie, puis amplifiés par culture en monocouche *in vitro* durant 3 à 6 semaines, afin d'en obtenir un nombre suffisant (entre 12 et 48x10⁶ cellules). La seconde étape, cette fois-ci réalisée en chirurgie ouverte, consiste à réimplanter les chondrocytes autologues par injection sous un patch de périoste (généralement prélevé du tibia proximal), ou une membrane collagénique commerciale, recouvrant la zone lésée (**Figure 4d**).

Depuis son développement dans les années 1980, de nombreuses études ont prouvé l'efficacité de cette méthode. Elle permet en effet de régénérer un tissu cartilagineux de type hyalin principalement, de traiter des lésions ostéochondrales plus larges, et induit une amélioration notable des capacités fonctionnelles chez les patients, en comparaison aux techniques précédemment décrites [28]. L'ACI reste toutefois une procédure très onéreuse, et complexe à mettre en œuvre. Elle est également associée à un certain nombre de limitations : technique invasive nécessitant deux opérations chirurgicales, difficulté à récolter un nombre suffisant de chondrocytes autologues, tendance des chondrocytes à se différencier lors de l'amplification *in vitro*, hypertrophie entraînée par l'usage du patch de périoste, longue période de convalescence (entre 6 et 12 mois), etc.

2.2.4. L'implantation de chondrocytes autologues assistée par une matrice

L'implantation de chondrocytes autologues assistée par une matrice (MACI), qualifiée par certains de deuxième, voire de troisième génération d'ACI, correspond plus précisément aux prémices de l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire, qui sera notamment développée dans la partie I.3 de ce manuscrit. Le principe de base de la technique MACI reste le même que celui de l'ACI : les chondrocytes autologues sont isolés à partir d'une biopsie prélevée chez le patient, puis amplifiés en culture *in vitro*. Le protocole a cependant été amélioré : après amplification, les chondrocytes autologues ne sont plus simplement injectés, mais sont ensemencés sur une matrice de support, avant l'implantation de l'ensemble dans la zone lésée (**Figure 4e**). Les premières matrices introduites dans les pratiques cliniques, à la fin des années 1990, étaient notamment constituées de collagène ou d'acide hyaluronique, des composants naturellement présents dans le cartilage hyalin mature [29]. L'usage d'une telle structure permet de fournir un échafaudage tridimensionnel biodégradable, sur lequel les chondrocytes adhèrent, et à partir duquel ils synthétisent un nouveau tissu cartilagineux. Cette approche régénérative innovante a montré des résultats prometteurs, comparables à ceux obtenus après ACI, et permet de pallier les principales limitations associées aux précédentes techniques. Son principal désavantage reste cependant la nécessité de prélever du tissu autologue, et d'amplifier les chondrocytes en culture *in vitro*.

2.2.5. Arthroplastie partielle ou totale de l'articulation

Lorsque les dommages et pathologies articulaires atteignent un stade trop avancé, et que les traitements précédemment décrits ne permettent pas ou plus de les traiter, une arthroplastie partielle ou totale de l'articulation est réalisée. Pour ce faire, la ou les parties articulaires endommagées sont retirées, et remplacées par une ou plusieurs pièces artificielles de forme adaptée, en fonction de l'étendue des dommages. Ces pièces sont généralement faites de différents alliages métalliques (titane, cobalt, chrome), et sont, dans le cas d'une arthroplastie totale, articulées entre elles par une pièce assurant le glissement (polyéthylène, céramique), le tout constituant la prothèse de remplacement [30].

En chirurgie orthopédique, l'arthroplastie représente un traitement curatif permettant de rétablir la mobilité articulaire du patient, et ainsi, de considérablement améliorer sa qualité de vie. Qu'elle soit partielle ou totale, l'arthroplastie reste cependant une procédure chirurgicale très invasive, et très coûteuse. Dans certains cas, des complications post-opératoires de gravité variable peuvent se développer plus ou moins tardivement : raideur articulaire, persistance des douleurs, infection, fracture d'une pièce de la prothèse due à un défaut de conception, descellement de la prothèse, etc. Certaines de ces complications, en plus de l'usure normale et inévitable de la prothèse (liée à une durée de vie limitée), entraînent la nécessité d'une révision prothétique par chirurgie. Cette dernière requiert une opération plus longue et un séjour hospitalier prolongé pour le patient, en comparaison à l'arthroplastie

initiale, augmentant les risques opératoires et les complications post-opératoires, et entraînant également une charge financière supplémentaire pour la sécurité sociale [31].

3. La médecine régénérative ostéoarticulaire

3.1. Définition et principe de l'ingénierie tissulaire

Le terme « ingénierie tissulaire » a officiellement été défini en 1988 en Californie, au cours d'une conférence parrainée par la « *National Science Foundation* », comme l'application des principes et méthodes de l'ingénierie et des sciences de la vie, pour la compréhension fondamentale de la relation entre structure et fonction dans les tissus mammifères normaux et pathologiques, et le développement de substituts biologiques permettant de restaurer, maintenir, ou améliorer les fonctions tissulaires [32,33]. En 1993, l'ingénierie tissulaire a gagné encore plus d'attention suite à la publication de l'article fondateur de Langer et Vacanti dans la revue *Science*, où ils la décrivent comme un nouveau domaine scientifique interdisciplinaire, aux multiples possibilités d'applications [34]. Le principe de l'ingénierie tissulaire, réside en fait dans l'utilisation et l'association de biomatériaux, de cellules du patient et/ou de molécules thérapeutiques, pour élaborer *in vitro* des constructions biologiques biomimétiques implantables, permettant de réparer et régénérer *in vivo* des tissus humains endommagés suite à un traumatisme ou une pathologie (**Figure 6**).

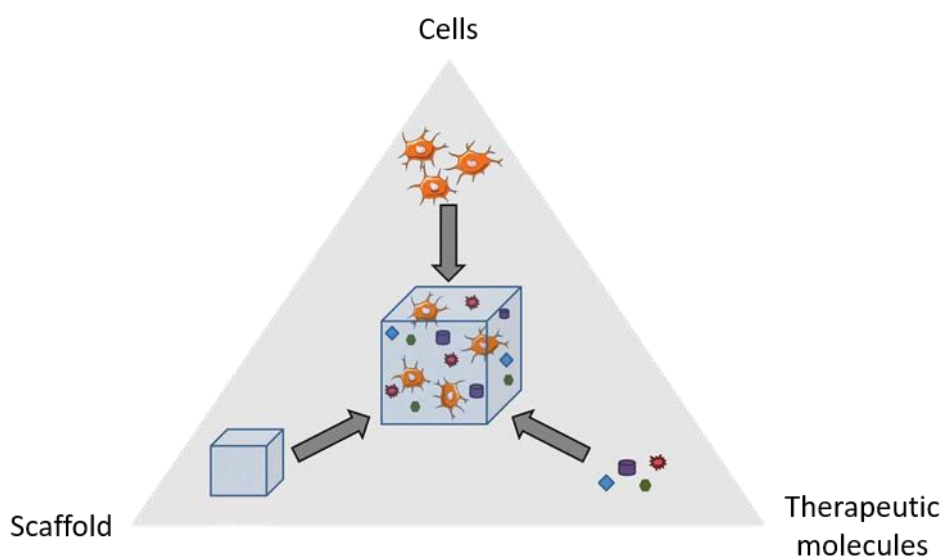


Figure 6 : Le triangle d'or de l'ingénierie tissulaire représentant les éléments requis pour la conception *in vitro* d'un substitut biologique implantable [35].

Cette stratégie novatrice offre ainsi un potentiel thérapeutique très large, et représente d'ores et déjà une réalité clinique. De plus, l'état actuel de l'avancement des recherches en ingénierie tissulaire laisse présager de grandes innovations dans la reconstruction de nombreux tissus et organes complexes. En permettant la régénération tissulaire, cette discipline de la médecine régénérative pourrait permettre de réduire le besoin de remplacer les organes endommagés, palliant ainsi le déficit de don d'organes et les problèmes associés aux greffes (faible biocompatibilité, rejet immunitaire, etc.). La création de modèles physiologiques *in vitro*, offrirait par ailleurs la possibilité d'étudier la pathogenèse de certaines pathologies, de développer et de tester de nouveaux médicaments, et ce, directement à partir de ces systèmes tissulaires, réduisant ainsi le recours à l'expérimentation animale [36]. En 2000, le Centre Européen pour la Validation des Méthodes Alternatives, du Centre Commun de la Recherche de la Commission Européenne, a notamment reconnu la validité scientifique d'un modèle *in vitro* de peau humaine, permettant de distinguer de manière fiable les substances corrosives et non-corrosives pour la peau [37].

Depuis son avènement, des protocoles d'ingénierie tissulaire, applicables à divers systèmes biologiques du corps humain, ne cessent d'être mis au point et améliorés, pour s'affranchir des limites des traitements conventionnels. Les possibilités d'applications variées que cette approche thérapeutique innovante représente, suscitent un intérêt de plus en plus grandissant de la part des acteurs de la santé. Le marché mondial de l'ingénierie tissulaire approchait en effet les 9,9 milliards de dollars en 2014, et devrait atteindre les 73 milliards de dollars d'ici à 2025, sur une base de croissance annuelle moyenne particulièrement élevée, estimée à 21% [38]. Le présent manuscrit se concentrera plus particulièrement sur la médecine régénérative et l'ingénierie tissulaire du système ostéoarticulaire précédemment décrit. Chaque élément clé de la conception des constructions biologiques implantables (cellules, biomatériaux et molécules thérapeutiques), élaborées pour la médecine régénérative ostéoarticulaire, fera notamment l'objet d'une discussion ci-dessous.

3.2. Les cellules dans l'ingénierie tissulaire ostéoarticulaire

La régénération tissulaire est physiologiquement induite par des cellules progénitrices provenant de l'environnement du site endommagé. Dans le contexte de l'ingénierie tissulaire de l'unité ostéochondrale, et plus particulièrement du tissu cartilagineux articulaire, pour lequel le processus d'autorégénération est extrêmement limité, les cellules doivent être apportées de manière exogène. Pour permettre une régénération tissulaire optimale, il est ainsi nécessaire de trouver une source cellulaire idéale, qui puisse facilement être isolée et cultivée, qui possède ou puisse acquérir un phénotype chondrocytaire, qui soit capable de synthétiser les éléments spécifiques de la MEC cartilagineuse, et enfin, qui ne provoque pas de réaction immunitaire [39]. Actuellement, ce sont des cellules primaires autologues (chondrocytes) qui sont utilisées en clinique pour régénérer le cartilage articulaire.

Cependant, des sources cellulaires alternatives, telles que les cellules souches, suscitent un intérêt de plus en plus grandissant de la part des chercheurs et cliniciens.

3.2.1. Les chondrocytes

Cellules constitutives du cartilage articulaire natif, les chondrocytes sont apparus comme le choix le plus évident, et ont largement été étudiés et utilisés pour la régénération de ce tissu. Ces derniers sont en effet responsables de la production des composants majeurs de la MEC cartilagineuse, tels que le collagène de type II et les protéoglycanes, et jouent un rôle primordial dans le maintien et le remodelage de cette matrice. Les chondrocytes peuvent facilement être obtenus par digestion enzymatique du tissu cartilagineux articulaire, et cultivés dans les conditions *in vitro* adéquates [40]. L'efficacité de cette source cellulaire a pu être démontrée dès ses premières applications en clinique vers la fin des années 1980, notamment avec la technique ACI. Malgré cela, l'usage des chondrocytes autologues souffre d'importantes limitations. D'une part, la procédure de biopsie cartilagineuse est hautement invasive pour le patient, et entraîne une morbidité du site donneur, associée à une perte de fonction. D'autre part, l'obtention d'un nombre suffisant de chondrocytes est nécessaire pour permettre la réparation d'une lésion. Or, les chondrocytes sont présents en quantité limitée dans le tissu cartilagineux articulaire (moins de 5% du volume total). L'étape d'amplification *ex vivo* est alors indispensable, mais fait face à une problématique majeure. En effet, la culture en monocouche entraîne une dédifférenciation des chondrocytes vers un phénotype fibroblastique, et ce, dès le premier passage cellulaire [41]. Cette perte du phénotype chondrocytaire est, entre autres, caractérisée par une diminution de la synthèse de protéoglycanes (aggrécane notamment) et de l'expression de collagène de type II, et par une augmentation de l'expression de collagène de type I. L'utilisation de chondrocytes autologues, amplifiés en culture *in vitro*, ne représente pas une option viable, puisque la perte de leur phénotype peut compromettre la qualité du tissu régénéré *in vivo*, dont les propriétés mécaniques et la composition biochimique, ne satisfont pas celles du tissu natif.

3.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses

Initialement, les chondrocytes présentaient des propriétés intéressantes pour une application en médecine régénérative du cartilage articulaire. Les limites associées à leur obtention, leurs capacités prolifératives restreintes, et leur perte de phénotype, ont conséquemment poussé les équipes de recherche à envisager d'autres sources cellulaires. Récemment, les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) ont suscité un grand intérêt dans l'ingénierie tissulaire ostéoarticulaire, et sont depuis, sérieusement étudiées comme une source alternative très prometteuse. Les CSMs correspondent à des cellules souches adultes possédant la faculté d'auto-renouvellement, et pouvant être isolées à partir d'une variété de tissus de notre organisme : moelle osseuse, tissu adipeux, liquide synovial, placenta,

cordon ombilical (gelée de Wharton), etc. Ces cellules multipotentes, possèdent une plasticité cellulaire leur permettant de se différencier en de multiples types cellulaires, sous des conditions physiologiques *in vivo* et de culture *in vitro* bien spécifiques. Les CSMs sont en effet capables de se spécialiser vers des lignées dérivées du mésoderme (chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes), mais également vers certaines lignées dérivées de l'ectoderme (neurocytes) ou encore de l'endoderme (hépatocytes) [42]. La compréhension de cette plasticité cellulaire n'est cependant pas encore totalement élucidée. Par ailleurs, l'isolement de ces cellules, relativement aisé et peu invasif, à partir de tissus variés, pourrait permettre de remédier aux problématiques de morbidité du site donneur et de perte de fonction, rencontrées avec la biopsie de cartilage réalisée pour isoler les chondrocytes autologues. Le recours à l'anesthésie, ainsi que le coût global de la procédure, s'en trouveraient réduits. De plus, les CSMs possèdent un fort potentiel prolifératif permettant une expansion *ex vivo* rapide et élevée, garantissant l'obtention d'un nombre suffisant de cellules. Enfin, ces cellules possèdent des propriétés immunomodulatrices leur permettant de réguler le microenvironnement au sein du tissu hôte, les rendant ainsi peu immunogènes.

Depuis leur première caractérisation, de nombreuses dénominations ont été employées pour qualifier ces cellules : progéniteurs mésenchymateux, cellules stromales mésenchymateuses, cellules stromales multipotentes, etc. [43]. Dans le but de clarifier cette nomenclature, des critères standards minimums à respecter pour satisfaire à la définition de CSMs, ont été proposés en 2005 par la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (« *International Society for Cellular Therapy* », ICST) [44,45] :

- une capacité à adhérer au plastique dans des conditions standards de culture *in vitro* ;
- un phénotype membranaire déterminé par cytométrie en flux, avec une majorité de cellules positives pour les marqueurs CD73, CD90 et CD105, et négatives pour les marqueurs CD14, CD19, CD34, CD45 et HLA-DR (cette liste de marqueurs membranaires reste toutefois encore un sujet de débat et d'investigation à l'heure actuelle) ;
- un potentiel de différenciation *in vitro* en lignées ostéogénique, adipogénique et chondrogénique (démonstré par des colorations histologiques spécifiques).

Avec toutes leurs caractéristiques pour le moins remarquables, les CSMs représentent un outil thérapeutique unique et prometteur pour l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Plusieurs sources de CSMs, telles que la moelle osseuse, le tissu adipeux, ou encore le cordon ombilical, ont été et sont encore aujourd'hui étudiées pour une éventuelle application clinique dans ce domaine.

➤ Les CSMs dérivées de la moelle osseuse

Les CSMs dérivées de la moelle osseuse ont été les premières à être identifiées, et sont les plus étudiées et les mieux caractérisées à ce jour. La moelle osseuse représente la source la plus couramment utilisée, car elle est relativement riche en CSMs, et il est plutôt aisé d'en récolter ce type de cellules

[46]. Bien que les CSMs ne représentent que 0,001% à 0,01% de la population de cellules nucléées de la moelle osseuse, ce fait est largement compensé par leur capacité d'expansion de 100 jusqu'à 10000 fois en quelques semaines de culture *in vitro* [47]. L'intérêt et l'efficacité des CSMs de la moelle osseuse, dans le cadre de la réparation du cartilage articulaire, ont aujourd'hui clairement été établis par de nombreuses équipes de recherche. Des études cliniques récentes ont en effet montré qu'elles possèdent un potentiel de réparation équivalent, voire supérieur aux chondrocytes autologues après implantation [48], et que leur utilisation par injection (thérapie cellulaire) ou implantation (ingénierie tissulaire), permet de traiter aussi bien l'arthrose, que les lésions cartilagineuses de manière plus générale [49-55]. Une étude comparative a toutefois révélé que la stratégie d'implantation offrait de meilleurs résultats que la stratégie d'injection, puisqu'elle permet la régénération du tissu [56]. En 2011, Wakitani et al. ont par ailleurs confirmé que l'implantation des CSMs de la moelle osseuse était une procédure sûre et sans danger, en soulignant qu'aucune infection ni tumeur ne s'était développée en 11 années de suivi post-opératoire, chez 41 patients traités pour de l'arthrose ou d'autres dommages cartilagineux [57].

➤ Les CSMs dérivées du tissu adipeux

Plus récemment, le tissu adipeux a été envisagé comme une source alternative de CSMs très intéressante pour une potentielle application clinique. En effet, ce tissu peut facilement être collecté en grande quantité et de manière répétée, par simple liposuction. Cette procédure à faible morbidité est notamment moins douloureuse pour le patient que l'aspiration de moelle osseuse [58], et peut par conséquent être réalisée chez des patients de tout âge. Le tissu adipeux représente par ailleurs une des sources les plus abondantes en CSMs : un gramme de tissu adipeux contient approximativement 50 fois plus de CSMs qu'un gramme de moelle osseuse [46]. Les CSMs du tissu adipeux peuvent aisément être cultivées dans des conditions standards de culture *in vitro*, et leur multipotence a également été confirmée [59]. Elles sont en effet capables de se différencier *in vitro* vers les lignées ostéogénique, adipogénique, myogénique et chondrogénique [60]. En revanche, elles montrent un potentiel de différenciation chondrogénique et ostéogénique plus faible que les CSMs dérivées de la moelle osseuse, ce qui réduit grandement leur valeur pour une éventuelle application en médecine régénérative ostéoarticulaire [61]. Malgré cela, la faisabilité clinique et la sûreté d'utilisation de ces CSMs ont pu être confirmées après injection intra-articulaire dans le genou chez des patients âgés souffrant d'arthrose [62].

➤ Les CSMs dérivées du cordon ombilical

Les CSMs ont également pu être isolées à partir de différents compartiments du cordon ombilical, tels que le sang, le tissu avoisinant les vaisseaux, le sous-endothélium des veines ou encore la gelée de Wharton [46]. Elles peuvent ainsi facilement être récoltées après la naissance d'un nouveau-né, puisque le cordon ombilical est initialement considéré comme un déchet opératoire. Ce statut post-natal et extracorporel, résout notamment les problématiques éthiques et politiques rencontrées avec les cellules souches embryonnaires (CSEs), dont l'utilisation est actuellement interdite en France. Par ailleurs, ces CSMs fœtales possèdent un taux de prolifération *in vitro* plus élevé, et une meilleure stabilité après une expansion prolongée que les CSMs adultes [63]. Leur potentiel chondrogénique se montre également plus élevé que celui des CSMs dérivées de la moelle osseuse [64], et leurs capacités immunomodulatrices sont équivalentes à celles des CSMs de moelle osseuse et du tissu adipeux [65], ce qui pourrait permettre une utilisation allogénique [66]. A ce jour, le potentiel régénératif de ces cellules a pu être confirmé par des études précliniques réalisées après implantation chez le rat [67], le lapin [68], ou encore le mini-porc [69]. De plus, une étude clinique récente a reporté, en 2017, la possibilité d'implanter les CSMs dérivées du cordon ombilical pour traiter l'arthrose chez l'homme, et a confirmé la sûreté et l'efficacité de cette stratégie après une période de suivi post-opératoire de 7 ans [70].

3.2.3. Les cellules souches pluripotentes induites

Les nombreuses controverses liées à l'usage des CSEs ont encouragé les équipes de recherche à tenter de développer des cellules souches aux propriétés avantageuses équivalentes. Une technique permettant de transformer une cellule adulte spécialisée en une cellule immature, capable de redonner tous les types cellulaires de l'organisme, a notamment été mise au point par le chercheur japonais Shinya Yamanaka de l'Université de Kobé en 2006 [71], et lui a d'ailleurs valu le prix Nobel de médecine en 2012. Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) sont ainsi générées à partir de cellules somatiques, reprogrammées génétiquement pour devenir pluripotentes. Cette reprogrammation est d'ailleurs applicable à pratiquement tous les types de cellules adultes, et le potentiel de différenciation des iPSCs a été confirmé [72]. Ces cellules sont déjà largement utilisées pour la modélisation de nombreuses pathologies, et pour tester l'efficacité de molécules potentiellement thérapeutiques. Elles pourraient, en outre, considérablement bénéficier au développement de stratégies de médecine régénérative ostéoarticulaire, du fait de leur facilité d'accès, leur croissance illimitée, et de leur pluripotence. La génération de chondrocytes articulaires fonctionnels, à partir d'iPSCs humaines, a d'ailleurs récemment été reportée, et leur injection en sous-cutané chez la souris immunodéprimée « nude » a permis de confirmer que leur phénotype chondrocytaire était maintenu *in vivo* [73]. La possibilité de les produire en grande quantité laisse ainsi présager de grandes innovations dans

l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. En revanche, l'efficacité et la sûreté d'utilisation de ces chondrocytes, obtenus à partir d'iPSCs, restent encore à vérifier dans des modèles animaux pertinents.

3.3. Les biomatériaux dans l'ingénierie tissulaire ostéoarticulaire

Dans l'ingénierie tissulaire ostéoarticulaire, les cellules sont généralementensemencées sur un biomatériau, dont l'objectif premier est de reproduire les caractéristiques du tissu cible, avant l'implantation de la structure obtenue dans le site endommagé (technique MACI). Ces matériaux sont utilisés en tant que support physique, et sont conçus pour mimer l'environnement physiologique tridimensionnel de la MEC du tissu à régénérer [74]. En se basant sur la biomimétique, ils offrent un environnement idéal à l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire, et favorisent ainsi la régénération du tissu cible. Depuis l'émergence du concept d'ingénierie tissulaire, des avancées considérables ont permis le développement de biomatériaux toujours plus sophistiqués, et différentes générations ont d'ailleurs pu être identifiées [75].

3.3.1. Les différentes générations de biomatériaux

La première génération de biomatériaux a été développée dans les années 1960, et correspond à des matériaux biologiquement inertes qui, une fois implantés, provoquent une réaction toxique minimale et interagissent très peu avec le tissu hôte environnant [76]. Cette génération représente notamment les métaux utilisés dans la fabrication des prothèses de remplacement du genou ou de la hanche, tels que l'acier inoxydable, un matériau résistant à la corrosion et à la compression mécanique, mais fortement sujet à l'usure et l'abrasion. Le titane et ses alliages, utilisés à l'origine dans le secteur aéronautique, ont eux aussi généré un grand intérêt en orthopédie, en raison de leur forte résistance à la corrosion. Des matériaux polymériques inertes furent également envisagés dans cette première génération. Le polyéthylène a notamment rencontré un franc succès, avec sa forte résistance à l'usure, et est aujourd'hui utilisé dans les composantes de frottement de certaines prothèses.

La seconde génération est apparue au début des années 1970, et correspond à des biomatériaux conçus pour être intrinsèquement bioactifs, et engendrer une réponse biologique en interagissant avec le tissu hôte environnant, pour une meilleure intégration. Une autre avancée majeure apportée par cette seconde génération a été le caractère résorbable de certains de ces biomatériaux, permettant notamment le remplacement progressif de la construction implantée par un néo-tissu régénéré par l'organisme hôte [76]. Dans ce cas, le recours à une seconde chirurgie visant à retirer l'implant, n'est plus nécessaire. Les produits de dégradation de ces biomatériaux, non-toxiques, sont en effet éliminés par le métabolisme normal du patient.

Cette seconde génération inclut notamment des polymères biodégradables d'origine naturelle ou synthétique. D'une part, parmi les polymères naturels les plus couramment utilisés, on retrouve : (i) des polysaccharides structurellement similaires aux GAGs du tissu cartilagineux, tels que l'agarose, l'alginate ou le chitosane ; (ii) des GAGs naturellement présents dans le tissu cartilagineux, tels que l'acide hyaluronique ou la chondroïtine sulfate ; (iii) des protéines naturelles, telles que le collagène ou la fibrine [77]. Les polymères naturels ont rencontré un franc succès dans la régénération du cartilage, en raison de leurs excellentes propriétés de biocompatibilité. Le collagène et l'acide hyaluronique permettent notamment d'induire une réaction biologique innée chez les cellules de l'hôte, augmentant ainsi l'adhérence cellulaire et le chimiotactisme [78]. Malgré leurs propriétés intéressantes, les polymères naturels sont limités par la réponse immunitaire, des taux variables de dégradation *in vivo*, ou encore des variations de lots entraînées par les processus de purification. D'autre part, les polymères synthétiques ont suscité un intérêt de plus en plus vif de la part des équipes de recherche, car ils offrent la flexibilité d'adapter leurs caractéristiques en fonction de l'application souhaitée (architecture, propriétés mécaniques, cinétique de dégradation, etc.) [75]. Parmi les plus étudiés, on retrouve notamment l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA), leur copolymère (PLGA), ou encore la poly- ϵ -caprolactone (PCL) [77].

Enfin, la troisième génération, développée plus récemment, regroupe les biomatériaux conçus pour stimuler, au niveau moléculaire, une réponse cellulaire spécifique et favorable [79]. L'objectif ici est de mettre au point des systèmes qui, une fois implantés, vont encourager et améliorer la régénération du tissu cible. Pour cela, les biomatériaux résorbables de seconde génération sont optimisés par l'incorporation de molécules thérapeutiques permettant d'engendrer une réponse biologique au sein même du biomatériau : amélioration de l'adhésion, de la survie et de la prolifération des cellules, induction de leur différenciation et de leur engagement vers une lignée cellulaire spécifique, augmentation de la production de MEC, amélioration de la vascularisation de l'implant, etc. Cette approche inclut notamment l'utilisation de facteurs solubles (facteurs de croissances, cytokines, hormones, etc.), ou de facteurs insolubles (molécules de la MEC, molécules d'adhésion, etc.) [80]. Plusieurs techniques d'incorporation de ces molécules thérapeutiques ont d'ailleurs été mises au point, et feront l'objet d'une discussion dans la partie I.3.4. de ce manuscrit. L'application des nanotechnologies à l'ingénierie tissulaire, offre ainsi un moyen de mieux contrôler le microenvironnement biochimique et mécanique après implantation, pour une régénération tissulaire plus efficace.

Les différentes générations de biomatériaux précitées, ont toutes leur importance en fonction de l'avancée des lésions à traiter (**Figure 7**). En effet, dans le cas des lésions de petite taille, il est possible, par ingénierie tissulaire, d'induire la régénération du tissu endommagé en utilisant un biomatériau, combiné à des cellules et des molécules thérapeutiques. En revanche, lorsque les lésions sont trop étendues pour pouvoir être traitées par ingénierie tissulaire, la solution finale vise directement le

remplacement du tissu endommagé par la pose d'une prothèse. L'ingénierie tissulaire ostéoarticulaire représente ainsi une stratégie curative de prévention, à appliquer au plus tôt pour éluder le recours à l'arthroplastie. C'est plus spécifiquement dans ce domaine-là que se sont établis les travaux de thèse qui seront présentés dans ce manuscrit.

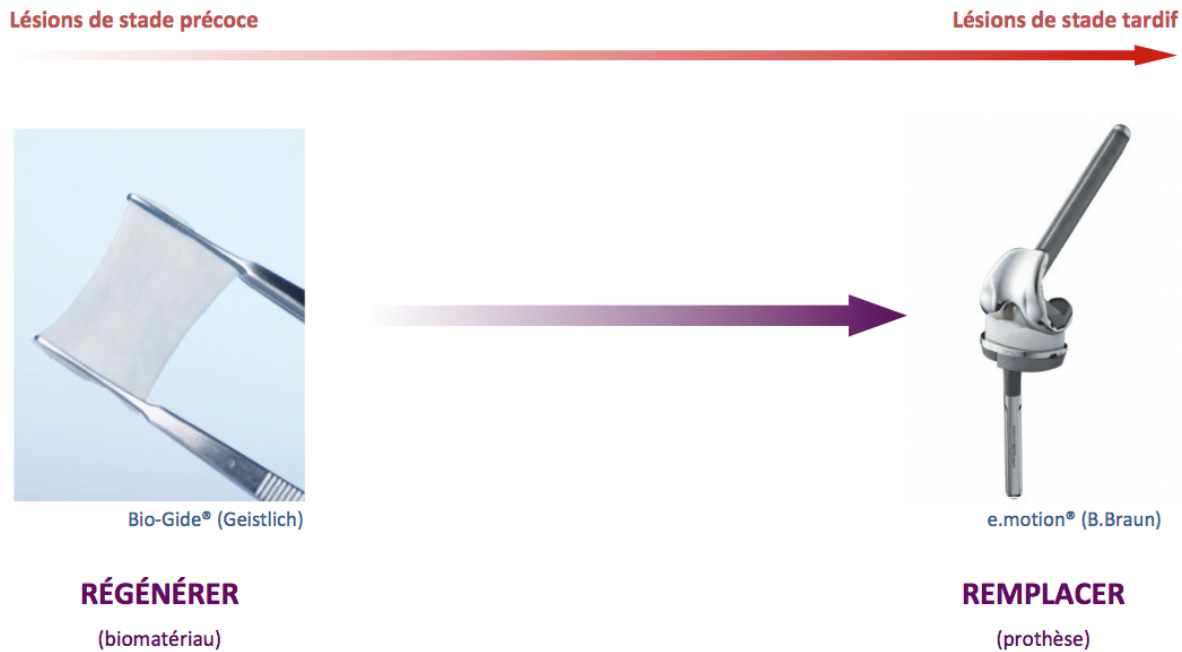


Figure 7 : Les solutions thérapeutiques envisagées en fonction du stade d'avancement des lésions à traiter (sources : geistlich.fr ; bbraun.fr).

3.3.2. Cahier des charges du biomatériau idéal

Les avancées réalisées en médecine régénérative et en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire, ont permis l'amélioration significative de la qualité et de la complexité des constructions implantables. Les travaux de recherche portent sur la conception de biomatériaux qui tendent à imiter au plus près la structure et les propriétés de la MEC du tissu cible. Leurs caractéristiques sont cruciales pour permettre une régénération tissulaire spécifique et efficace, et plusieurs paramètres clés sont à prendre en considération dans leur élaboration [5] (**Annexe 1**).

La biocompatibilité : le premier critère à respecter pour un biomatériau implantable, est qu'il doit être biocompatible avec le tissu hôte. En effet, celui-ci doit minimiser l'induction d'une réaction inflammatoire, pour éviter tout rejet immunitaire de la part de l'organisme. De plus, les cellules doivent pouvoir y adhérer, le coloniser, y proliférer et fonctionner normalement, pour permettre la régénération du néo-tissu et son intégration au tissu hôte environnant.

La biodégradabilité : n'étant pas conçu pour être permanent, le biomatériau doit être de nature biodégradable. Sa vitesse de résorption doit être favorable et s'ajuster à la régénération tissulaire. En effet, le biomatériau, qui permet initialement de fournir un support structural à la prolifération cellulaire, doit par la suite se dégrader de manière progressive (dégradation enzymatique ou hydrolytique), pour finalement être graduellement remplacé par le néo-tissu synthétisé. Par ailleurs, les produits de dégradation en résultant, ne doivent pas être toxiques pour l'organisme, et doivent pouvoir être éliminés par le métabolisme de l'hôte, sans causer de dommages.

L'architecture et la porosité : l'architecture générale et la porosité du biomatériau sont elles aussi d'une grande importance. Le biomatériau doit présenter une structure tridimensionnelle poreuse, favorable à l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation des cellules. Cette structure sous forme de pores interconnectés de taille adaptée, doit permettre la colonisation cellulaire d'une part, et la diffusion efficace des nutriments, de l'oxygène et des déchets métaboliques d'autre part.

Les propriétés mécaniques : idéalement, le biomatériau doit posséder des propriétés mécaniques appropriées, lui permettant de supporter le remodelage tissulaire tout en résistant aux contraintes mécaniques régnant au niveau du site anatomique où il est implanté. La production de biomatériaux aux propriétés mécaniques adéquates, représente d'ailleurs l'une des plus grandes difficultés rencontrées dans l'ingénierie tissulaire.

3.3.3. Exemples de produits commerciaux

Plusieurs produits commerciaux, développés pour la médecine régénérative du cartilage articulaire, sont actuellement disponibles sur la marché [77,81]. Le tableau ci-après regroupe quelques exemples d'implants commerciaux, et résume leur composition, la procédure chirurgicale associée à leur utilisation, les résultats cliniques obtenus, ainsi que leur statut actuel (**Tableau 1**).

Produit	Fabricant	Composition	Procédure chirurgicale	Indication clinique	Résultats et statut clinique
BioSeed®-C	BioTissue Technologies GmbH	Biomatériau de PLGA renforcé avec de la polydioxanone, ensemencé avec des chondrocytes autologues amplifiés suspendus dans une solution de fibrine	Technique MACI en 2 étapes	Lésion focale de grade III à IV	Disponible en Europe. Plus de 3000 patients traités depuis 2002.
CaReS®	Arthro Kinetics	Hydrogel de collagène I murin, ensemencé avec des chondrocytes autologues amplifiés	Technique MACI en 2 étapes	3,5 à 14 cm ² ; lésion de grade III ou IV ; ostéochondrite disséquante	Disponible dans certains pays d'Europe, en Iran, en Turquie et en Chine. Résultats supérieurs en comparaison à la microfracture après 3 ans.
Cartipatch®	Tissue Bank of France	Hydrogel d'alginate et d'agarose, ensemencé avec des chondrocytes autologues amplifiés	Technique MACI en 2 étapes	2,5 à 7,5 cm ² ; lésion fémorale focale de grade III ou IV ; ostéochondrite disséquante	Résultats inférieurs en comparaison à la mosaicplastie après 2 ans (essai clinique de phase III). Essai clinique de phase III plus long pour résultats complémentaires annulé.
Hyalograft® C	Anika Therapeutics, Inc.	Biomatériau à base d'acide hyaluronique, ensemencé avec chondrocytes autologues amplifiés	Technique MACI en 2 étapes	1,0 à 5,0 cm ² ; lésion focale de grade III ou IV du condyle fémoral / trochlée	Plus de 5000 patients traités de 1999 à 2011. Retiré du marché en 2013.
NeoCart®	Histogenics Corporation	Biomatériau de collagène I bovin ensemencé avec des chondrocytes autologues amplifiés et cultivés en bioréacteur	Technique MACI en 2 étapes	Lésion symptomatique du cartilage	Résultats supérieurs en comparaison à la microfracture après 2 ans (essai clinique de phase II) et après 1 an (essai clinique de phase III, 2018)
NOVOCART® 3D	TEDEC® Tissue Engineering Technologies AG	Éponge biphasique de collagène I bovin et de chondroïtine sulfate, ensemencé avec des chondrocytes autologues amplifiés	Technique MACI en 2 étapes	2,0 à 6,0 cm ² ; lésion isolée du condyle fémoral	Plus de 6000 patients traités depuis 2003. Fin d'un essai clinique de phase III avec suivi après 5 ans prévue en juin 2019. En cours d'étude pour le traitement de l'ostéochondrite disséquante

Tableau 1 : Exemples de produits commerciaux développés pour la régénération du cartilage articulaire.

3.4. Les molécules thérapeutiques dans l'ingénierie tissulaire ostéoarticulaire

Afin d'augmenter le potentiel thérapeutique des biomatériaux implantés, différentes molécules, en plus des cellules, peuvent y être combinées pour induire, accélérer et/ou améliorer la régénération tissulaire. Ce sont essentiellement des facteurs de croissance qui sont utilisés en ingénierie tissulaire ostéoarticulaire. Cependant, d'autres molécules, comme l'acide hyaluronique, ou encore la chondroïtine sulfate, sont également étudiées pour une telle application.

3.4.1. Les facteurs de croissance pour la régénération cartilagineuse et osseuse

La différenciation chondrogénique ou ostéogénique des cellules souches peut être induite par des facteurs intrinsèques et extrinsèques variés. Les facteurs de croissance jouent notamment un rôle essentiel dans ce processus. Ils représentent un groupe de polypeptides biologiquement actifs, produits par l'organisme, et pouvant stimuler la prolifération et la différenciation cellulaire. Concernant la régénération cartilagineuse, de nombreux facteurs de croissance régulant le développement du tissu cartilagineux, ainsi que l'intégrité et l'homéostasie du cartilage articulaire mature, ont pu être identifiés. Parmi ces facteurs, on retrouve notamment : le facteur de croissance transformant bêta (« *Transforming Growth Factor beta* », TGF- β), les protéines de morphogenèse osseuse (« *Bone Morphogenetic Proteins* », BMPs), les facteurs de croissance des fibroblastes (« *Fibroblast Growth Factors* », FGFs), ainsi que le facteur de croissance analogue à l'insuline (« *Insulin-like Growth Factor - 1* », IGF-1) [35].

Les facteurs de croissance de la superfamille TGF- β figurent parmi les molécules thérapeutiques les plus étudiées dans l'ingénierie tissulaire du cartilage. Ces derniers jouent un rôle majeur dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Le TGF- β 1 initie les interactions cellulaires permettant la condensation des cellules progénitrices, et participe au maintien du phénotype des chondrocytes. Il permet également la différenciation chondrogénique des CSMs, et favorise l'expression de collagène de type II et d'aggrécane. Le TGF- β 2 arbitre la différenciation hypertrophique, tandis que le TGF- β 3 possède un effet plus conséquent sur la différenciation chondrogénique des CSMs, et augmente la synthèse des GAGs sulfatés [40,82]. Les BMPs appartiennent également à cette superfamille TGF- β , et ont un impact à la fois sur la chondrogenèse et sur l'ostéogenèse. Plusieurs BMPs sont capables de stimuler la différenciation chondrogénique des CSMs, et de favoriser la synthèse de composants de la MEC cartilagineuse. Plus spécifiquement, la BMP-2 et la BMP-7 peuvent augmenter la production de matrice chez les chondrocytes et les cellules progénitrices, et peuvent également agir en synergie pour une meilleure synthèse matricielle. En revanche, si elles sont implantées dans des zones ectopiques, les BMPs induisent la formation d'os par le processus d'ossification endochondrale, ce qui doit impérativement être évité dans le cadre de la régénération cartilagineuse [35].

L'IGF-1, une hormone similaire à l'insuline, est quant à lui considéré comme un médiateur essentiel de l'homéostasie du cartilage, en raison de ses capacités à stimuler la synthèse de protéoglycanes, ainsi qu'à promouvoir la survie et la prolifération des chondrocytes. Il est par ailleurs établi que l'IGF-1 module également la chondrogenèse des CSMs. Le FGF-2 favoriserait la prolifération des chondrocytes et des CSMs, et augmenterait la production de protéoglycanes chez les CSMs. Il jouerait également un rôle dans la protection du cartilage contre les dommages et le développement de l'arthrose. Par ailleurs, le FGF-18 assurerait le maintien du phénotype des chondrocytes. Cependant, en raison de nombreux résultats contradictoires reportés, des études complémentaires restent nécessaires pour mieux comprendre le rôle de ces facteurs de croissance, et pour évaluer leur potentiel réel pour la régénération cartilagineuse [40].

Concernant la régénération osseuse, les facteurs de croissance étudiés sont semblables à ceux considérés pour la régénération cartilagineuse. En effet, l'ingénierie tissulaire osseuse s'intéresse également aux BMPs, aux FGFs, aux TGF- β et à l'IGF-1, en plus du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (« *Vascular Endothelial Growth Factor* », VEGF). Les BMP-2 et -7, les FGF-1 et -18, le TGF- β 3 et l'IGF-1 correspondent à des facteurs pro-ostéogéniques, favorisant la prolifération et la différenciation cellulaire. Une attention particulière a notamment été portée à la BMP-2 et la BMP-7, puisque ces facteurs ont obtenu l'autorisation de la « *Food and Drug Administration* » (FDA), pour une application clinique chez l'Homme [83]. La BMP-2 est largement étudiée en ingénierie tissulaire osseuse, et représente un des facteurs ostéogéniques les plus notables puisqu'il joue un rôle central dans l'expression des marqueurs ostéogéniques. Le VEGF est quant à lui un régulateur clé de l'angiogenèse au cours de la formation du tissu osseux, et peut ainsi stimuler la migration et la prolifération des cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins, permettant le recrutement et la survie des cellules de l'os [84].

3.4.2. Les méthodes de fonctionnalisation des biomatériaux

Afin d'augmenter les propriétés biologiques et le potentiel régénératif des biomatériaux, diverses stratégies de fonctionnalisation, au moyen de molécules thérapeutiques, ont été mises au point. De manière générale, il existe différents types de formulations ou vectorisations des molécules thérapeutiques, à des échelles nano- et micrométriques (nanoparticules, liposomes, etc.), le plus souvent utilisés sous forme injectable. En ce qui concerne plus précisément les biomatériaux implantables, la fonctionnalisation par addition de molécules thérapeutiques peut se faire selon deux principales méthodes : la fonctionnalisation par immobilisation chimique, réversible ou irréversible, et la fonctionnalisation par adsorption physique [85].

C'est notamment la seconde méthode qui a été retenue dans les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit. En effet, au sein du laboratoire, notre équipe a développé et breveté une stratégie de

fonctionnalisation des biomatériaux par la technologie des nanoréservoirs (brevet n° WO 2012113812 A1). En se basant sur la technique du dépôt de multicouches de polyélectrolytes de charges opposées (ou « *Layer by Layer* », LbL), notre technologie consiste à incorporer une molécule thérapeutique d'intérêt en présence d'un excipient, au sein de nanoréservoirs fonctionnalisant les biomatériaux (**Figure 8**). D'une part, les nanoréservoirs permettent de stabiliser la molécule thérapeutique, et de la protéger vis-à-vis des éléments extérieurs, évitant ainsi sa libération passive et non-contrôlée. D'autre part, cette stratégie permet une biodisponibilité contrôlée de la molécule thérapeutique, dépendante de l'adhésion et de la dégradation des nanoréservoirs par les cellules, au site d'implantation du biomatériau. Depuis son développement, cette technologie a été largement utilisée au sein du laboratoire pour fonctionnaliser des biomatériaux aussi bien synthétiques [86,87] que naturels [88], et a pu être validée pour la régénération des tissus osseux et cartilagineux.

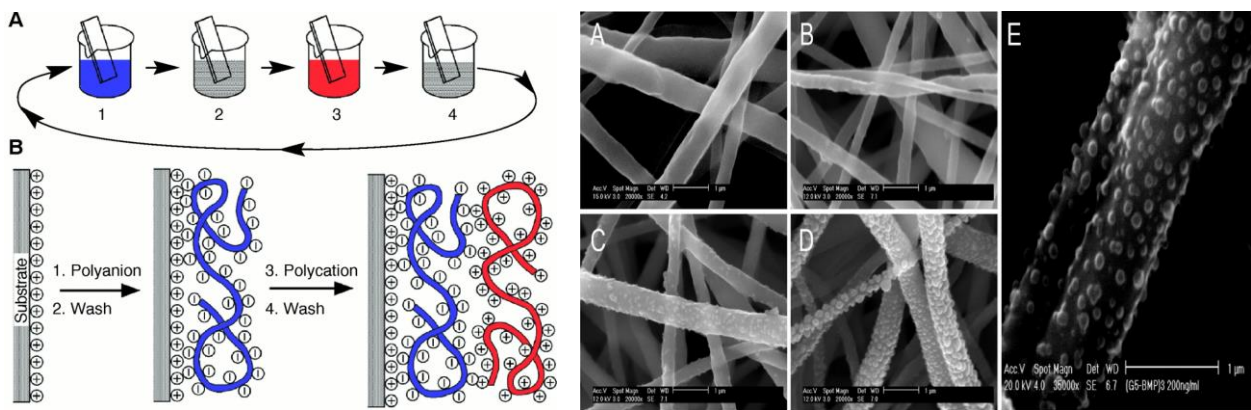


Figure 8 : La technique du « *Layer by Layer* » (LbL) [89] et la technologie des nanoréservoirs de molécules thérapeutiques [86].

À gauche, la représentation schématique de la technique LbL : le biomatériau est alternativement immergé dans une solution de polyanion (1) puis dans une solution de polycation (3). Des étapes de rinçages (2,4) sont nécessaires pour éliminer les espèces n'ayant pas pu interagir avec les précédentes. Ce cycle alternant dépôts de polyanion et de polycation, s'adsorbant par des interactions électrostatiques principalement, permet l'obtention d'une première multicouche (bicouche). Celui-ci peut être répété plusieurs fois pour obtenir le nombre de multicouches désiré.

À droite, la visualisation par microscopie électronique à balayage de nanoréservoirs incorporant de la BMP-2, après fonctionnalisation d'un biomatériau nanofibreux de PCL par la technique LbL : (A) nanofibres de PCL inertes, (B) 1 cycle de fonctionnalisation ; (C) 3 cycles de fonctionnalisation ; (D) 6 cycles de fonctionnalisation ; (E) zoom de la condition C.

4. Les médicaments de thérapie innovante

Les progrès notoires apportés par la nanomédecine régénérative et l'ingénierie tissulaire ostéoarticulaire, au cours des dernières années, ont permis le développement de nombreux produits qui pourraient mener à de réelles percées dans le domaine de la santé. Ces derniers représentent, aujourd'hui, une des voies de l'innovation thérapeutique en France, en Europe et dans le monde. Cependant, ces traitements « candidats » entrent dans un cadre réglementaire on ne peut plus complexe, ancien au niveau national (premiers textes datant de 1996), mais plus récent au niveau européen (directives de 2004 et règlement de 2007). La réglementation européenne a notamment imposé de revoir, et de mettre à jour, les définitions et les bases réglementaires du cadre national. Les changements qui en ont découlé, ont impacté la réglementation et les régimes d'autorisation en France, à la fois pour les produits, et pour les établissements qui les développent et souhaitent les exploiter (avec notamment l'évolution des standards et référentiels de fabrication, qui deviennent les « Bonnes Pratiques de Fabrication » (BPF, de l'anglais « *Good Manufacturing Practices* », GMP). Malgré les efforts de communication réalisés au niveau national (entreprises du médicament (leem) ; Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (Ansm)), comme au niveau européen (Agence Européenne des Médicaments, EMA), ce contexte réglementaire reste actuellement peu connu des acteurs, et particulièrement des structures académiques, des « Très Petites Entreprises » (TPEs) ou encore des « Petites et Moyennes Entreprises » (PMEs). La partie I.4. de ce manuscrit a pour objectif de fournir plus de lisibilité à ce sujet, d'une part, en synthétisant le cadre réglementaire en question, et, d'autre part, en apportant les définitions et les statuts à envisager pour la fabrication, le développement et la mise sur le marché de ces produits.

(Source : <https://www.ansm.sante.fr>, rubrique « guichet innovation », consultée le 04/01/19)

4.1. Réglementation européenne sur les thérapies innovantes

Entré en vigueur à la fin de l'année 2008, le règlement européen CE n°1394/2007, relatif aux médicaments de thérapie innovante, a considérablement modifié le contexte réglementaire applicable aux approches thérapeutiques utilisant des gènes, des cellules, ou des tissus. Ce règlement confirme le statut de « médicament » (spécialité pharmaceutique) aux produits issus de la thérapie génique, de la thérapie cellulaire, de l'ingénierie tissulaire, et aux médicaments combinés de thérapie innovante. Il ne déroge pas aux principes fondamentaux de la directive 2004/23/CE, relative à l'instauration de normes de qualité et de sécurité concernant le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des cellules et tissus humains, mais y apporte des exigences supplémentaires. Avant son entrée en vigueur, l'absence en Europe d'un cadre réglementaire harmonisé, pouvait par ailleurs limiter le développement de ces produits innovants, et par conséquent, limiter l'accès

des patients à de nouvelles approches prometteuses pour traiter des pathologies actuellement sans solution thérapeutique.

(Source : <https://www.ansm.sante.fr>, rubrique « guichet innovation », consultée le 04/01/19)

4.2. Les différentes catégories de produits

A l'heure actuelle, trois grandes catégories de produits ont été identifiées à la suite de l'instauration du règlement européen, et chacune d'entre elles relève notamment d'un cadre réglementaire bien spécifique.

- **Les médicaments de thérapie innovante (MTI).** Cette définition couvre les médicaments issus de la thérapie génique, de la thérapie cellulaire somatique, de l'ingénierie tissulaire et cellulaire, et les médicaments combinés de thérapie innovante (qui associent un MTI à un dispositif médical). Les MTI suivent le règlement européen n°1394/2007, et la directive 2001/83/CE. Ils sont régulés à la fois au niveau national pour les essais cliniques, et au niveau européen pour leur autorisation de mise sur le marché (AMM), et leur suivi post-autorisation.
- **Les médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement (MTI-PP).** Ils correspondent à des MTI conçus et utilisés au sein d'un unique état membre de l'Union Européenne. Les MTI-PP sont soumis au régime des MTI du règlement européen, mais ils sont toutefois exemptés de la procédure centralisée d'AMM. Par conséquent, ils doivent suivre un cadre réglementaire national, qui doit être équivalent aux règles communautaires de qualité et de sécurité. En France, cette nouvelle catégorie de produit, créée par le règlement européen, a été introduite dans le code de la santé publique par la loi n°2011-302 de mars 2011.
- **Les préparations.** Il s'agit de produits cellulaires ou tissulaires (d'origine autologue ou allogénique) à finalité thérapeutique. Les préparations ne sont pas des MTI, et contrairement aux MTI et aux MTI-PP, elles ne sont pas des médicaments au sens du code de la santé publique. Les préparations correspondent en fait à des produits de santé, placés sous la compétence de l'Ansm, et réglementés au niveau national par la directive 2004/23/CE.

Bien que ces trois statuts, et les divers cadres réglementaires qui leur sont associés, possèdent le même objectif d'assurer la qualité des produits et la sécurité des patients, il est impératif de déterminer au plus tôt la qualification adéquate du produit développé, ou en cours de développement. Cette analyse du statut du produit permettra à son développeur de suivre les bons référentiels, et surtout d'éviter les impasses réglementaires. Elle doit être réalisée préalablement à la mise en place des études supportant la future demande d'AMM.

Il convient, en premier lieu, de déterminer si le produit en question répond à la définition de préparation, ou à celle de MTI (qui est équivalente à celle du MTI-PP au niveau réglementaire et scientifique). Le produit à classer sera un MTI en fonction de deux critères, basés sur le procédé de sa fabrication, son mode d'action et la fonction essentielle des cellules/tissus.

(i) Si des modifications substantielles des cellules/tissus sont réalisées au cours du procédé de fabrication, le produit ne pourra pas être une préparation et sera un MTI (ou un MTI-PP).

Cependant, le règlement ne décrit pas ce que sont les modifications substantielles, mais liste uniquement des manipulations n'étant pas considérées comme telles (trempage dans une solution antibiotique ou antimicrobienne, centrifugation, purification, filtration, cryoconservation, etc.). La notion de modification substantielle, peut se comprendre sur les conséquences de cette modification, qui est substantielle si elle induit un changement dans les propriétés biologiques ou la fonction initiale des cellules/tissus. Il est important de noter qu'une succession de modifications, chacune non-substantielle, peut entraîner un processus qui va modifier les propriétés des cellules/tissus, et constituera finalement une modification substantielle.

(ii) Si les cellules/tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le donneur et le receveur, le produit ne pourra pas être une préparation et sera un MTI (ou un MTI-PP).

Ainsi, si l'une de ces deux conditions n'est pas vérifiée, le produit est considéré comme un MTI (ou MTI-PP). Lorsqu'il est enfin établi que le produit répond à la définition de MTI, la question du statut de MTI-PP peut alors être posée. Un MTI-PP correspond simplement à un MTI qui, de par ses propriétés et sa destination, est préparé de manière ponctuelle à l'attention d'un patient donné. Il sera régulé au niveau national, pourra être utilisé uniquement dans l'état membre de l'Union Européenne où il est conçu, et ne pourra pas être exporté. Par ailleurs, aucune distinction n'est faite dans la réglementation, entre les produits autologues ou non. Par conséquent, un produit d'origine autologue peut tout aussi bien être un MTI, qu'un MTI-PP. Toutefois, un produit autologue répondrait peut-être plus naturellement à la définition de MTI-PP en raison de son caractère ponctuel, spécifiquement adapté à un patient déterminé.

(Source : <https://www.ansm.sante.fr>, rubrique « guichet innovation », consultée le 04/01/19)

4.3. Cadre européen applicable aux médicaments de thérapie innovante

4.3.1. Les différents types de médicaments de thérapie innovante

Il existe en tout quatre types de MTI définis dans le règlement européen.

- **Les médicaments de « thérapie génique ».** Ils correspondent à un médicament biologique répondant impérativement à ces deux conditions : **(i)** sa substance active contient ou constitue un acide nucléique recombinant, administré à des personnes dans le but de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique ; et **(ii)**, son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostic, dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient, ou du produit de l'expression génétique de cette séquence.
- **Les médicaments de « thérapie cellulaire somatique ».** Ils correspondent à un médicament biologique présentant les deux caractéristiques suivantes : **(i)** il contient ou consiste en des cellules/tissus ayant subi une manipulation substantielle de façon à modifier leurs caractéristiques biologiques, leurs propriétés structurelles ou leurs fonctions physiologiques ; ou en des cellules/tissus n'étant pas destinés à être employés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le donneur et le receveur ; et **(ii)**, il est présenté comme possédant des propriétés permettant le traitement, la prévention ou le diagnostic d'une pathologie, à travers l'action métabolique, immunologique ou pharmacologique des cellules/tissus ; ou il est utilisé chez un patient, ou administré à un patient, dans une telle perspective.
- **Les médicaments « issus de l'ingénierie tissulaire ou cellulaire ».** Les cellules/tissus considérés comme issus de l'ingénierie tissulaire ou cellulaire, doivent répondre au minimum à l'une des conditions suivantes : **(i)** les cellules/tissus ont été soumis à une modification substantielle, dans le but d'obtenir des caractéristiques biologiques, des propriétés structurelles ou des fonctions physiologiques utiles à la régénération, la réparation ou au remplacement recherchés ; et **(ii)**, les cellules/tissus ne sont pas destinés à être employés pour la ou les mêmes fonctions essentielles chez le donneur et le receveur.
- **Les médicaments « combinés de thérapie innovante ».** Ils correspondent à des MTI, et dès lors, à des médicaments de thérapie génique, de thérapie cellulaire somatique, ou issus de l'ingénierie tissulaire ou cellulaire, qui satisfont aux critères suivants : **(i)** ils intègrent dans leur composition un ou plusieurs dispositifs médicaux au sens de l'article 1^{er}, paragraphe 2, point a) de la directive 93/42/CEE ; ou un ou plusieurs dispositifs médicaux implantables actifs au sens de l'article 1^{er}, paragraphe 2, point c) de la directive 90/385/CEE ; et **(ii)**, leur partie cellulaire/tissulaire doit contenir des cellules ou tissus viables ; ou leur partie cellulaire/tissulaire, contenant des cellules ou

tissus non viables, doit être susceptible d'avoir, sur le corps humain, une action étant considérée comme essentielle par rapport à celle des dispositifs précités.

(Source : <https://www.ansm.sante.fr>, rubrique « guichet innovation », consultée le 04/01/19)

4.3.2. Essais cliniques et mise sur le marché d'un médicament de thérapie innovante

Les MTI étant considérés comme des médicaments, les essais cliniques doivent être réalisés conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques (BPC, de l'anglais « *Good Clinical Practices* », GCP) fixées par la directive 2005/28/CE, et aux guidelines décrites dans EudraLex Volume 10. Pour ensuite pouvoir être mis sur le marché, un MTI, comme pour tout autre médicament, doit obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM). Pour ce type de produits, cette AMM est obligatoirement obtenue dans le cadre d'une procédure centralisée d'autorisation. Elle est octroyée par la Commission Européenne, après évaluation de l'Agence Européenne du Médicament (EMA). Cette évaluation est effectuée par le Comité des Médicaments à Usage Humain (CHMP), en collaboration avec le Comité des Thérapies Innovantes (ou « *Committee for Advanced Therapies* », CAT), un comité d'experts en charge de l'évaluation de la qualité, la sécurité et l'efficacité des MTI.

Concernant les médicaments combinés de thérapie innovante, incluant des dispositifs médicaux ou des dispositifs médicaux implantables actifs, la réglementation est encore plus sévère. Les dispositifs en question doivent satisfaire aux exigences strictes énoncées respectivement dans la directive 93/42/CEE modifiée, et dans la directive 90/385/CEE modifiée. Les dispositifs associés aux MTI pour former les médicaments combinés de thérapie innovante, doivent, en outre, obtenir le marquage CE (pour Conformité Européenne), qui leur est délivré par un organisme notifié, et leur permet d'être utilisés dans tous les états membres de l'Union Européenne. Afin d'obtenir l'apposition de ce marquage, le développeur ou l'importateur du dispositif, doit réaliser ou faire réaliser, des essais, des contrôles ou des vérifications de conception, qui vont attester de sa conformité aux exigences essentielles de sécurité et de santé (EESS) des directives concernées. Ainsi, la demande d'AMM pour un médicament combiné de thérapie innovante, doit inclure les éléments prouvant la conformité du dispositif médical qu'il intègre, et les résultats de l'évaluation par un organisme notifié, conformément aux directives précédemment citées. L'obtention de cette AMM nécessite également que l'ensemble des molécules utilisées dans l'élaboration ou la modification du dispositif médical, soient approuvées par les autorités compétentes : l'EMA en Europe, ou la « *Food and Drug Administration* » (FD aux Etats-Unis).

(Source : <https://www.ansm.sante.fr>, rubrique « guichet innovation », consultée le 04/01/19)

4.3.3. Élaboration d'un médicament de thérapie innovante

Les MTI étant des médicaments, ils doivent être élaborés conformément aux principes et lignes directrices des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) de la directive 2003/94/EC, applicables aux médicaments à usage humain, et aux guidelines décrites dans EudraLex Volume 4. Si l'établissement concerné se situe en France, il devra être un établissement pharmaceutique autorisé par l'Ansm. Cette obligation doit d'ailleurs s'appliquer dès le premier essai clinique. La directive européenne et la loi française sur les recherches biomédicales prévoient, en effet, que tout lot de médicament expérimental doit être certifié par une personne compétente, qui attestera que ledit médicament expérimental a été fabriqué dans le respect des BPF, et ce, dans un établissement autorisé.

(Source : <https://www.anism.sante.fr>, rubrique « guichet innovation », consultée le 04/01/19)

II. Objectifs de la thèse

Ce projet de thèse s'inscrit dans le domaine de la nanomédecine régénérative ostéoarticulaire. L'objectif principal a été de développer, et d'optimiser, de nouvelles stratégies d'implants thérapeutiques biphasiques, de dernière génération, pour une régénération plus stable et efficace du cartilage articulaire. Ces implants thérapeutiques pourraient notamment représenter de meilleures alternatives aux traitements cliniques actuels des lésions ostéochondrales.

Pour ce faire, notre approche consiste à combiner :

(i) des biomatériaux innovants (dispositif médical implantable), mimant la matrice extracellulaire physiologique du tissu cible. Il s'agit d'optimiser des matériaux naturels d'origine mammifère, déjà autorisés pour une application clinique, de développer des matériaux synthétiques, ou encore d'utiliser des matériaux de source nouvelle non-mammifère ;

(ii) des molécules thérapeutiques actives, incorporées en faible quantité (nano-doses) au sein de nanoréservoirs fonctionnalisant les biomatériaux, par la technologie mise au point par notre équipe. Cette approche utilisant des doses plus physiologiques, permet notamment d'orienter et d'accélérer la régénération tissulaire ;

(iii) des cellules souches mésenchymateuses autologues (médicament de thérapie innovante), dont l'utilisation a été introduite en médecine régénérative ostéoarticulaire, afin de pallier les limites associées à l'utilisation des chondrocytes autologues, et d'améliorer l'efficacité thérapeutique de la construction implantable finale (associant le dispositif médical, les molécules et les cellules, le tout constituant un médicament combiné de thérapie innovante).

Mes travaux de thèse se sont organisés autour de trois chapitres principaux :

❖ *Chapitre 1 : Élaboration d'un modèle d'implant thérapeutique de collagène II issu des méduses, activé par des nanoréservoirs de TGF- β 3 et équipé de cellules souches mésenchymateuses humaines.*

Le premier chapitre de ma thèse décrit l'élaboration d'un modèle d'implant thérapeutique pour la régénération du cartilage articulaire, et ce, à partir d'une source nouvelle, et non-mammifère, de collagène de type II. Le produit Jellagen® est un collagène de type II dérivé de la méduse *Rhizostoma Pulmo*, dont l'usage semble plus approprié pour pallier les limites associées aux biomatériaux de collagène de type I, d'origine mammifère, actuellement utilisés en clinique. Nous avons, dans un premier temps, optimisé un implant poreux à partir de la solution Jellagen®, et, dans un deuxième temps, nous avons fonctionnalisé ce dernier par incorporation de TGF- β 3 au sein de nanoréservoirs. Il s'agit notamment d'un facteur de croissance majeur du développement endochondral et de la chondrogenèse.

Le potentiel et l'efficacité de ce modèle d'implant thérapeutique, ont ensuite été évalués par des analyses *in vitro*, après ensemencement de cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse humaine (hCSMs).

❖ *Chapitre 2 : Développement d'un implant thérapeutique nano-actif à deux compartiments, doté de nanoréservoirs de BMP-7 et équipé d'organoïdes hybrides à des fins de médecine régénérative ostéoarticulaire.*

Dans le second chapitre de ma thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la régénération de l'ensemble de l'unité ostéochondrale. En effet, la réparation du tissu cartilagineux est souvent réalisée sur un support osseux sous-chondral fragilisé, compromettant ainsi la régénération durable du tissu cible. C'est pourquoi, nous avons cherché à renforcer l'implant cartilagineux par un compartiment sous-jacent dédié à la régénération de l'os sous-chondral, tout en tenant compte des propriétés matricielles respectives de ces deux tissus très spécifiques. A cette fin, nous avons mis au point un implant thérapeutique doté de deux compartiments, l'un de nature fibreuse pour mimer le tissu osseux (compartiment 1), et l'autre sous forme d'un hydrogel reproduisant la forte teneur en eau du tissu cartilagineux (compartiment 2). Ainsi, le compartiment 1 a été conçu à partir d'un biomatériau synthétique de poly- ϵ -caprolactone (PCL), produit par la technique d'électrospinning, et fonctionnalisé par des nanoréservoirs de facteur de croissance ostéogénique BMP-7. Son potentiel ostéogénique a été testé *in vitro* en présence d'organoïdes (microtissus organisés) de hCSMs. Le compartiment 2 a lui été élaboré à partir d'un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, ensemencé d'organoïdes hybrides de hCSMs, co-cultivées avec des chondrocytes humains (hCHs), pour une modulation de l'hypertrophie indésirable du cartilage néoformé. Après évaluation *in vitro* du potentiel chondrogénique de ce second compartiment, et analyse de l'apport des hCHs au sein des organoïdes hybrides, les deux compartiments ont été assemblés. Le potentiel de ce modèle d'implant thérapeutique biphasique a finalement été évalué en sous-cutané, chez la souris « nude ».

❖ *Chapitre 3 : Évaluation de l'efficacité d'un implant thérapeutique biphasique et nano-actif, équipé d'organoïdes de cellules souches mésenchymateuses, pour la régénération ostéoarticulaire dans le modèle de brebis.*

Dans le dernier chapitre de ma thèse, nous avons évalué la faisabilité de cette stratégie d'implant thérapeutique biphasique et nano-actif dans le modèle de brebis, pour une validation préclinique en application orthopédique. Durant ces travaux, le compartiment 1, dédié à la régénération de l'os sous-chondral, a été remplacé par la membrane collagénique commerciale Bio-Gide® (Geistlich), approuvée par la « *Food and Drug Administration* » (FDA) et utilisée en clinique, que nous avons optimisée par l'ajout de nanoréservoirs de facteur de croissance ostéogénique BMP-2. Des défauts ostéochondraux de

taille critique ont été créés au niveau du condyle fémoral médial des brebis. Le compartiment 1 nano-actif a été placé au niveau de l'os sous-chondral, puis l'hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, équipé d'organoïdes de cellules souches mésenchymateuses de brebis (compartiment 2), a été déposé sur le compartiment 1 au niveau de la lésion. Le potentiel de régénération de l'unité os-cartilage du dispositif thérapeutique implanté, a ensuite été évalué sur une période post-opératoire de 6 mois. Par ailleurs, il est important de souligner que notre équipe a également réalisé cette évaluation préclinique en utilisant le compartiment à base de PCL.

III. Résultats et discussion

Chapitre 1

Élaboration d'un modèle d'implant thérapeutique de collagène II issu des méduses, activé par des nanoréservoirs de TGF- β 3 et équipé de cellules souches mésenchymateuses humaines

- ❖ **Pugliano, M.**, Van-Bellinghen, X., Schwinté, P., Benkirane-Jessel, N., and Keller, L. Combined jellyfish collagen type II, human stem cells and TGF- β 3 as a therapeutic implant for cartilage repair. 2017. **J. Stem Cell Res. Ther.** 7, 382–390.

1.1. Contexte et objectifs

Le collagène est un des biomatériaux les plus utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage, en raison de sa biodégradabilité, de sa biocompatibilité et de sa faible immunogénicité. Par ailleurs, le cartilage hyalin articulaire possède une matrice extracellulaire (MEC) majoritairement composée de collagène de type II. Or, les biomatériaux actuellement utilisés en clinique, pour régénérer le cartilage, sont le plus souvent élaborés à partir de collagènes de types I et III. Ces derniers sont pourtant associés à une régénération de type fibreuse, dont les propriétés structurales, fonctionnelles et biomécaniques, diffèrent fortement de celles du tissu cible. Ils ne permettent alors pas une régénération cartilagineuse efficace et durable. De plus, le collagène constituant ces biomatériaux est systématiquement d'origine mammifère, ce qui soulève de sérieuses problématiques, telles que les risques inflammatoires et les risques infectieux (encéphalopathie spongiforme bovine, ESB), ou encore le rejet pour des raisons religieuses. Récemment, une nouvelle source de collagène non-mammifère vient d'émerger, et pourrait pallier les limites précédemment citées. Il s'agit d'un collagène de type II marin, extrait de la méduse *Rhizostoma pulmo*, et commercialisé par l'entreprise spécialisée en biotechnologies marines Jellagen (Cardiff, Royaume-Uni). Ce produit présente de nombreux avantages : non-vecteur de l'ESB ou d'autres maladies, non-cytotoxique, biorésorbable, forte disponibilité et préservation de l'écosystème (déjà à risque en raison de l'expansion excessive des méduses), haute conservation de la triple hélice de collagène au cours de l'évolution, rentabilité économique vis-à-vis du collagène mammifère, etc. Par ailleurs, comparativement aux biomatériaux élaborés à partir de collagène I, ceux issus de ce collagène II marin, actuellement en cours d'essais précliniques, ont d'ores et déjà montré un impact plus important sur la chondrogenèse [90].

A des fins de régénération des lésions cartilagineuses, les stratégies cliniques associent actuellement, à ce genre de biomatériaux, des chondrocytes autologues (technique MACI). Cette méthode fait malheureusement face à d'importantes limitations, telles que la morbidité du site donneur, la disponibilité restreinte des chondrocytes, ou encore leur dédifférenciation en fibrocartilage. C'est pourquoi, l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) est aujourd'hui recommandée. En raison de leur haute capacité d'auto-renouvellement, de leur potentiel immunosuppresseur, ainsi que de leur multipotentialité, les CSMs dérivées de la moelle osseuse représentent, en effet, le type cellulaire idéal pour la régénération du tissu cartilagineux [91]. Dans ce contexte, des études cliniques récentes ont d'ailleurs démontré le potentiel équivalent des CSMs autologues, voire supérieur, à celui des chondrocytes autologues après implantation [48]. Il est toutefois essentiel de souligner l'importance d'autres sources de cellules souches pour la régénération du cartilage (*cf.* partie I.3.2.2. de ce manuscrit).

La médecine régénérative cartilagineuse combine non seulement le biomatériau à des cellules, mais également à des molécules thérapeutiques. Afin d'augmenter leur potentiel de régénération cartilagineuse, ces cellules sont, de plus en plus, combinées à des biomatériaux fonctionnalisés par

addition de molécules pro-chondrogéniques. Parmi ces dernières, on retrouve le « *Transforming Growth Factor beta 3* » (TGF- β 3) qui est un acteur majeur du processus de chondrogenèse, ainsi que du développement endochondral [92]. Son impact, dans le domaine, a notamment été évalué en l'associant à des biomatériaux collagéniques [93] ou encore polymériques [94]. Cependant, nombre de ces matériaux ont été fonctionnalisés par simple incorporation de la molécule au sein du biomatériau lui-même [93,95,96], entraînant sa libération passive et non-contrôlée. Or, l'efficacité de ces implants thérapeutiques activés dépend justement de la manière dont les molécules sont formulées et mises à la disposition des cellules. Afin de permettre une biodisponibilité contrôlée, et dépendante du contact cellulaire, notre équipe a mis au point une stratégie innovante consistant en l'incorporation de la molécule thérapeutique, en faibles quantités (nano-doses), au sein de nanoréservoirs fonctionnalisant le biomatériau [86,88,97,98]. Cette technologie de nanoréservoirs a déjà été testée et validée pour la réparation des tissus osseux et cartilagineux [99,100].

Ainsi, l'objectif de cette étude a été de mettre au point un modèle d'implant thérapeutique plus efficace en faveur de la régénération du cartilage. Pour les raisons mentionnées précédemment, nous nous sommes employés à optimiser un biomatériau de collagène II, issu des méduses, en le combinant (i) à des nanoréservoirs actifs de TGF- β 3, (ii) ainsi qu'à des CSMs dérivées de la moelle osseuse humaine. L'évaluation de ce modèle a ensuite été réalisée par l'analyse, *in vitro*, de sa biocompatibilité et de son potentiel chondrogénique.

1.2. Résultats et discussion

1.2.1. Fonctionnalisation et caractérisation de l'implant thérapeutique de collagène II

Dans un premier temps, une analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) a été réalisée afin de caractériser la structure de l'implant collagénique, obtenu après lyophilisation et réticulation de la solution Jellagen®. Nous avons ainsi pu observer un réseau de feuillettes et de fibres de tailles variables, dont la distribution aléatoire a octroyé une porosité de taille multiple au biomatériau formé. L'implant collagénique a également été analysé après fonctionnalisation au TGF- β 3 par la technologie des nanoréservoirs. Dans notre cas, c'est le chitosane qui a été utilisé pour incorporer le TGF- β 3 au sein de nanoréservoirs répartis de manière homogène à la surface des fibres de collagène. Nous sommes ainsi parvenus à optimiser un implant collagénique nanofibreux et poreux, à partir de la solution Jellagen® de collagène II de méduse, puis à le fonctionnaliser en y incorporant des nanoréservoirs de molécules thérapeutiques.

Dans un second temps, nous avons analysé la biocompatibilité de ce modèle d'implant thérapeutique. Pour cela, des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) ont étéensemencées sur l'implant fonctionnalisé (F) ou non (NF) par le TGF- β 3, puis cultivées en milieu de différenciation

chondrogénique durant 21 jours. L'activité métabolique des cellules a été mesurée à différents temps de culture en utilisant le test de l'Alamar Blue®, un indicateur du potentiel d'oxydo-réduction largement utilisé pour rendre compte de la viabilité cellulaire. Celle-ci s'est avérée constante au cours des 21 jours de culture, aussi bien sur le modèle d'implant actif (F) que sur le modèle d'implant inerte (NF). De plus, aucune différence significative n'a été relevée entre les deux modèles d'implants à chaque temps de mesure (après 7, 14 et 21 jours de culture), indiquant que la présence des nanoréservoirs de TGF- β 3 n'interférait aucunement avec l'activité métabolique des cellules. Ces résultats ont ainsi confirmé la biocompatibilité du modèle d'implant collagénique thérapeutique élaboré dans cette étude.

1.2.2. Potentiel chondrogénique de l'implant thérapeutique de collagène II fonctionnalisé

L'effet de la fonctionnalisation, au moyen des nanoréservoirs de TGF- β 3, sur la différenciation chondrogénique des hCSMs, a été évalué par réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (qRT-PCR), par immunofluorescence indirecte, mais aussi par des colorations histologiques spécifiques. Après 14 jours de culture en milieu de différenciation chondrogénique, l'expression des gènes spécifiques, tels que l'aggrécane (*ACAN*), le collagène II (*COLL2*) et les facteurs de transcription *SOX9* et *RUNX2*, par les cellules, a été quantifiée sur l'implant actif (F) et l'implant inerte (NF). L'expression de *COLL2* s'est avérée significativement plus élevée en présence des nanoréservoirs de TGF- β 3, tandis que celle du marqueur hypertrophique *RUNX2* n'a pas augmenté. Ainsi, la différenciation chondrogénique des hCSMs a été favorisée par l'implant préalablement fonctionnalisé, sans entraîner d'événement d'hypertrophie.

Concernant la synthèse des protéines, elle a pu être observée par immunofluorescence indirecte au sein des cellules cultivées pendant 21 jours, à la fois sur l'implant actif (F) et sur l'implant inerte (NF). Toutefois, la production du collagène II et du facteur de transcription Sox9 a semblé être plus importante en présence des nanoréservoirs de TGF- β 3, tandis que celle de l'aggrécane et du marqueur hypertrophique Runx2 n'a pas été modifiée par l'addition de ces nanoréservoirs. Ces observations sont en parfait accord avec les résultats obtenus par qRT-PCR, confirmant ainsi la supériorité de l'implant actif dans l'orientation des hCSMs vers une différenciation chondrogénique. D'ailleurs, après 14 jours de culture, une sécrétion plus importante de glycosaminoglycanes (GAGs) sulfatés a été constatée sur l'implant collagénique actif, après coloration avec la safranine-O couplée au Fast-Green, indiquant une action des nanoréservoirs de TGF- β 3 sur l'accélération de la différenciation chondrogénique des hCSMs. Enfin, l'absence de dépôt calcique dans les deux conditions, après coloration au rouge alizarine, a démontré que les nanoréservoirs de TGF- β 3 n'ont pas induit de minéralisation osseuse.

1.3. Conclusion

Cette première partie de mes travaux de thèse a permis de consolider la faisabilité de notre modèle d'implant thérapeutique, au moyen d'analyses *in vitro*. En raison de son caractère relativement biomimétique, comparativement au cartilage articulaire, il était essentiel de valider la biocompatibilité de cet implant de collagène de type II, légitimant ainsi son utilisation comme échafaudage pour la régénération du tissu cible. De surcroît, la potentialisation de ses propriétés pro-chondrogéniques a été rendue possible, à la fois par l'addition de TGF- β 3 confiné au sein de nanoréservoirs, et de CSMs de la moelle osseuse humaine. Ainsi, cette approche thérapeutique innovante, combinant collagène de type II dérivé de méduse, nanoréservoirs de molécules thérapeutiques et hCSMs, se révèle intéressante pour la régénération des lésions du cartilage articulaire. En effet, celle-ci représente une technologie ajustable, en faveur de la restauration d'autres tissus, en modifiant le type de cellules, ou encore le type de molécules thérapeutiques, associées à ce même échafaudage.

Il est toutefois important de souligner les limites de cette stratégie. Certes, il s'agit d'une stratégie innovante, basée sur l'utilisation d'un collagène de type II d'origine non-mammifère, candidat favorable pour la régénération du cartilage hyalin articulaire. Cependant, celle-ci ne tient pas compte de l'importance de l'os sous-chondral, pour obtenir une régénération plus stable. Ainsi, durant la deuxième partie de mes travaux de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la régénération de l'unité ostéochondrale, au moyen d'un implant à double-compartiment osseux et cartilagineux.

Combined Jellyfish Collagen Type II, Human Stem Cells and Tgf- β 3 as a Therapeutic Implant for Cartilage Repair

Marion Pugliano^{1,2#}, Xavier Vanbellinghen^{1,2#}, Pascale Schwinté^{1,2}, Nadia Benkirane-Jessel^{1,2*} and Laetitia Keller^{1,2*}

¹INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), "Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine Laboratory", UMR 1109, Faculté de Médecine, FMTS, Strasbourg, France.

²Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

These authors have equally contributed to this work.

Abstract

Background: The limitations associated to current therapies for articular cartilage repair led us to develop new strategies of applicable active therapeutic materials. Human mesenchymal stem cells from bone marrow are promising relevant cell sources for cell therapy and regenerative medicine, in particular for cartilage repair. Recently, a new source of non-mammalian collagen type II emerged and represents a promising tool for cartilage tissue engineering.

Methods: To develop a new therapeutic implant for cartilage repair, we combined (i) jellyfish collagen type II as an implant; (ii) active nanoreservoirs of growth factors (TGF- β 3); (iii) adult human mesenchymal stem cells derived from bone marrow.

Results: Our results indicated clearly that (i) the jellyfish collagen type II implant leads to chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells; (ii) the combined implant and active therapeutic TGF- β 3 as nanoreservoirs lead to chondrogenic gene expression and cartilage differentiation.

Conclusion: We reported here a new stem cell - based therapeutic active implant for cartilage repair. This approach combines jellyfish collagen type II, human stem cells and TGF- β 3 as a therapeutic implant to improve cartilage differentiation and repair.

Keywords: Jellyfish collagen type II; Mesenchymal stem cells; TGF- β 3 nanoreservoirs; Cartilage repair; Combined therapeutic implant

Background

Articular cartilage has very limited capacity of regeneration due to a lack of cells and vascularization. Current therapies treating focal cartilage lesions focus on the use of autologous chondrocytes and the use of biomaterials (alginate, collagen I, collagen III) as matrices supporting cell proliferation and differentiation (MACI, matrix-induced autologous chondrocyte implantation) [1,2]. These materials, of natural or synthetic origin, are used as hydrogels or porous sponges. In the clinic, the collagen is used as a membrane shape and is always originating from mammalian such as bovine or porcine: Chondro-Gide® AMIC®, (Porcine collagen type I and III, Geistlich) [3], Novocart® 3D (Bovine collagen type I and III) [4], CaReS® (Rat collagen I, ArthroKinetics AG) [5], MACI® (Porcine collagen type I and III, Genzyme Biosurgery) [6]. Indeed, collagen is one of the materials most used in the field of cartilage tissue engineering, due to its biodegradability, biocompatibility, low immunogenicity and cell-adhesive properties. Nevertheless, collagen type II is the main represented collagen of the hyaline cartilage tissue, and recently, an unexpected source of non-mammalian collagen emerged (jellyfish marine collagen type II) and leaves open the possibility to overcome the limitations attributed to mammalian collagen use, such as risks of infections (bovine spongiform encephalopathy), initiation of arthritis by inflammation, or rejections due to religious reasons [7-9]. This new source of marine collagen type II has shown to possess a superior impact on chondrogenesis compared to collagen I scaffold [8]. The Jellagen® (Cardiff, United Kingdom) is a marine collagen type II extracted from jellyfish, presenting good availability and easy handling. The use of marine sources of collagen type II presents huge advantages for articular cartilage regeneration: high conservation of collagen in the evolution (triple helix conservation) and preservation of the ecosystem (as the ecological environment is at risk with the excessive expansion of jellyfish). This jellyfish-extracted collagen type II material has already

shown its capacity for chondrocyte proliferation, biocompatibility and is currently under pre-clinical studies.

Currently applied in the clinic, collagen I and III therapeutic implants are equipped with pre-cultured autologous chondrocyte cells to fill the articular focal lesions [3-6]. Regrettably, this strategy is associated with limitations such as donor site morbidity and dedifferentiation of articular chondrocytes into fibrous cartilage [10-12]. To overcome these limitations, new strategies have been developed to reach the stem cells based therapies. Indeed, Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from the bone marrow appear to be the ideal candidates for cartilage repair therapies, due to their capacity of proliferation, immuno-suppressivity, and differentiation into chondrocytes under specific conditions [13-16]. Moreover, recent clinical studies concerning cartilage repair, have shown that autologous human MSCs have equivalent or higher potential than chondrocytes after implantation [17].

In the tissue engineering field, with the development of materials of the second generation, active materials were developed to improve the efficiency of tissue regeneration [18]. These materials can be activated by

***Corresponding authors:** Nadia Jessel, Faculty of Medicine, INSERM, French National Institute of Health and Medical Research and "Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine Laboratory", Strasbourg, France, Tel: +33 368853376; E-mail: nadia.jessel@inserm.fr

Laetitia Keller, Faculty of Medicine, INSERM, French National Institute of Health and Medical Research and "Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine Laboratory", Strasbourg, France, E-mail: lkeller@unistra.fr

Received March 06, 2017; Accepted March 20, 2017; Published March 27, 2017

Citation: Pugliano M, Vanbellinghen X, Schwinté P, Benkirane-Jessel N, Keller L (2017) Combined Jellyfish Collagen Type II, Human Stem Cells and Tgf- β 3 as a Therapeutic Implant for Cartilage Repair. J Stem Cell Res Ther 7: 382. doi: 10.4172/2157-7633.1000382

Copyright: © 2017 Pugliano M, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

the addition of active molecules and have already shown their efficiency in the osteoarticular repair domain. Specifically for articular cartilage regeneration, the transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) was tested in association with materials to increase articular tissue repair efficiency [19-23]. TGF- β 3 is a major driver of chondrogenesis and endochondral development [24] and was already incorporated within collagenic [22] or within polymeric [25] scaffold to increase their chondrogenic potential. However, a lot of these materials were made active by the incorporation of active molecules in the scaffold itself, leading to an uncontrolled release depending on the degradation rate of the scaffold. Yet, the efficiency of active material on tissue engineering depends on the way they are released. To design an active implantable material is a huge challenge, having to meet the expectations of active molecules, material diffusion, and body responses such as host proteolytic activity after implantation. The development of a therapy in which MSCs and active materials are implanted directly into cartilage defect sites necessitates a controlled release system providing sustained local delivery of TGF- β 3, to ensure therapeutic efficacy of the implanted MSCs constructs.

In our group, we have reported an innovative strategy based on nanoreservoirs technology by entrapping active therapeutic agents, with a cell-contact dependent release [26-29]. This strategy was used not only for bone repair but also for cartilage regeneration, based on the use of active nanofibrous implant equipped with nanoreservoirs of growth factors combined with stem cells [30-32]. The main aim of this work is to develop a new therapeutic implant for cartilage repair by combining jellyfish collagen type II as an implant, to avoid the collagen type I or III of mammalian origin, growth factors TGF- β 3 and adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow.

To functionalize our jellyfish implant with TGF- β 3, we use our nanoreservoirs technology (cell - contact dependent release). The efficiency of this new active collagen type II implant, equipped with nanoreservoirs of TGF- β 3 and stem cells, was evaluated for chondrogenic gene expression and cartilage differentiation.

Methods

Collagen type II implants preparation

Rhizostoma pulmo jellyfish type II collagen solution (Jellagen[®]; 3 mg.mL⁻¹ in 0.1M acetic acid) was used to prepare implants. Collagenic materials were first obtained by freezing at -80°C and then freeze-drying Jellagen[®] solution. Afterwards, lyophilisates were chemically cross-linked with the water-soluble chemical cross-linker N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, Thermo Fisher Scientific; 1% (m/v)) for 90 minutes, rinsed with water, and incubated in glycine (GE Healthcare; 1% (m/v)) for 12 h. For further experiments, collagen II implants were then rinsed with PBS, and sterilized by 30-minutes exposure to UV light.

Formation of therapeutics TGF- β 3 nanoreservoirs on collagen type II implants

Nanoreservoirs technology was performed to add nanoreservoirs of TGF- β 3 on the native collagen type II (Jellagen[®]) implant. For that, the native collagen type II implants were dipped consecutively (6 times during 15 minutes) in alternate solutions of (i) an excipient: chitosan (CHI, Protasan UP CL 113, Novamatrix, Sandvika, Norway; 500 mg.mL⁻¹) and (ii) a solution of recombinant human TGF- β 3 (Euromedex, France; 200 ng.mL⁻¹) containing heparin (Sigma-Aldrich, France; 500 μ g.mL⁻¹). These solutions were prepared in a buffer solution of Tris/NaCl (20 mM/0.15 M) at pH 7.4. Each bath was followed by a rinsing step in a solution of Tris/NaCl buffer. For further cell culture

with mesenchymal stem cells, the TGF- β 3 active implants were then rinsed with culture medium without serum.

Human mesenchymal stem cells culture

Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) from the bone marrow (Promocell, Heidelberg, Germany) were cultured in a proliferation medium (Promocell, Heidelberg, Germany) complemented with supplement mix serum (Promocell, Heidelberg, Germany). The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. When cells reached subconfluence, they were harvested with trypsin and cultured at the density of 3.2.10⁵ cells/material on collagen type II jellyfish implants functionalized (F) or not (NF) with TGF- β 3 nanoreservoirs. Cells were cultured during 21 days in standard chondrogenic medium without addition of TGF- β 3 (Lonza, France).

Scanning electron microscopy (SEM) observations

To verify the addition of nanoreservoirs on the jellyfish collagen type II implants, samples were fixed just after performing nanoreservoirs technology with 4% (m/v) paraformaldehyde, during 10 minutes at 4°C. They were then dehydrated in successive ethanol baths of increasing concentration degree, and carbon-coated for further observations with a Hitachi S800 scanning electron microscope at 15 kV (Hitachi, Tokyo, Japan).

Biocompatibility

The biocompatibility of MSCs with the TGF- β 3 active implants was analysed by measuring metabolic activity of cells with an Alamar Blue[®] test (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at different times of culture (days D3, D7, D14, D21). For that, the cells were cultured during 4 hours in a solution of Alamar Blue[®] (10% (v/v) in complete medium without phenol red). Duplicates of each culture medium well were then analysed with a spectrometer (FC Multiskan) at the 570 and 595 nm wavelengths to determine the % of Alamar Blue[®] reduction. For each test, n=3. The p value was determined by a t test.

Indirect immunofluorescence

To verify the expression of proteins specific of the articular cartilage tissue, we performed indirect immunofluorescence against Sox9, aggrecan, collagen II and Runx2 for MSCs cultured on the jellyfish implants equipped (F) or not (NF) with TGF- β 3 nanoreservoirs. For that, cultured samples were fixed with 4% (m/v) paraformaldehyde during 10 minutes at 4°C, rinsed with PBS, embedded in OCT Tissue Tek[®] (Optimum Cutting Temperature; Fisher Scientific, France) and frozen before being cut with a cryostat (Leica CM 3000). Then, samples were saturated and permeabilized with a solution of Triton X-100/BSA (0.1%/1%, (m/v)/(m/v)). The primary antibodies (1/200) were then added to the samples at room temperature during 2 h. Rabbit anti-Sox9 (Sigma-Aldrich), rabbit anti-Runx2 (Sigma-Aldrich), rabbit anti-aggrecan (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), and rabbit anti-collagen II (Sigma-Aldrich) were used. After 3 rinses with PBS, 488 Alexa Fluor anti-rabbit (Molecular Probes; Life Technologies, Fisher Scientific, France) (1/200) was added during 1 h at room temperature. PBS rinses were made and a DAPI (Sigma-Aldrich) solution (200 nM) was then added to the samples to stain cell nuclei. For further observations with an epifluorescent microscope (Leica DM 4000B), the samples were mounted with Dako[®] (Dako, Courtaboeuf, France).

Histology

To evaluate the chondrogenesis of MSCs growing on jellyfish implants functionalized (F) or not (NF) with TGF- β 3 nanoreservoirs,

specific histological staining were performed on cryostat sectioned samples. For Safranin-O/Fast Green staining, the samples were rinsed with distilled water and dipped in a solution of Fast Green (0.02% m/v), acetic acid (1% m/v), and Safranin-O (0.1% m/v). For Alcian Blue staining, the samples were rinsed with distilled water and a solution of 2% (m/v) Alcian Blue (Sigma-Aldrich) at pH 4.2 was added during 2 h at room temperature. Alizarin Red staining was performed by dipping samples in distilled water and then in a solution of 1% (m/v) Alizarin red (Sigma-Aldrich) (pH 1) during 20 minutes at room temperature. Samples were then rinsed with distilled water. For further observations with bright field microscope (Leica DM 4000B), samples were mounted with Histolaque LMR® (LaboModerne, France).

Quantitative reverse transcriptase PCR (QRT-PCR)

To analyze quantitatively the effect of jellyfish implants equipped with TGF-β3 nanoreservoirs on the chondrogenic differentiation of MSCs, quantitative RT-PCR was performed by measuring specific genes of the articular cartilage tissue (SOX9, RUNX2, COL2 (Collagen II), ACAN (Aggrecan)). After 14 days of culture, the total RNA was extracted from MSCs cultured on implants containing (F) or not (NF) TGF-β3 nanoreservoirs, with the high pure RNA Isolation Kit (Roche). The retrotranscription was then performed using the iScript™ reverse Transcription Supermix (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). The Real-time PCR reaction was then carried out using the iTaq™ Universal SYBR® Green super mix (Biorad) and the CFX cycler system (BioRad) with the following cycle conditions: an initial denaturation step of 95°C for 2 minutes was performed, followed by 39 cycles of denaturation at 95°C for 5 seconds, annealing at 60°C during 30 seconds and extension at 65°C for 5 seconds. For each test, n=3. Statistical significance was determined by a t-test. The primers used were:

ACTIN B (5'-GATGAGATTGGCATGGCTTT-3'/5'-CACCTTCACCGTTCCAGTTT-3'),

COL2 (5'-CGTCCAGATGACCTTCCTACG-3',/5'-TGAGCAGGGCCTTCTTGAGT-3'),

ACAN (5'-TCCCCTGCTATTTTCATCGAC-3'/5'-CCAGCAGCACTACCTCCTTC-3'),

SOX9 (5'-GG A A T G T T T C A G C A G C C A A T - 3 / 5' - TGGTGTCTGAGAGGCACAG-3'),

RUNX2 (5'-CCAACCCACGAATGCACTATC-3'/5'-TAGT-GAGTGGTGGCGGACATAC-3').

Results

Design of a therapeutic active nanostructured Jellyfish collagen type II implant

To develop an active implant for cartilage regeneration, we used a new source of collagen type II (Jellyfish, Jellagen®) and attempted to make it active by adding TGF-β3 nanoreservoirs. We have first prepared the jellyfish collagenic II material by lyophilization and observed, by Scanning Electron Microscopy (SEM), the formation of the porous material made of smooth collagen type II sheets (Figure 1A). We have then functionalized this jellyfish collagenic II implant by incorporation of TGF-β3 into the nanoreservoirs using chitosan as excipient. Our results indicated clearly that we were able to build active nanocontainers on jellyfish collagenic II implant (Figure 1B).

Biocompatibility of the designed active implant

To analyze the biocompatibility of this nanostructured implant with

human mesenchymal stem cells (hMSCs), we evaluated their metabolic activity during growth on either non-active (NF) or TGF-β3 active (F) implants (Figure 1C). The metabolic activity of hMSCs was constant over the culture period for the F and the NF implants (From D7 to D21 p=0.131 for F, and p=0.645 for NF). Furthermore, no significant differences in metabolic activity were observed between the F and the NF implants at each time of culture period (Figure 1C), showing that addition of TGF-β3 nanoreservoirs doesn't interfere with the activity of hMSCs. These results showed that we were able to design a biocompatible nanoactive TGF-β3 implant, using collagen type II from jellyfish in the presence of hMSCs.

Chondrogenic differentiation ability of the designed active implant in the presence of hMSCs

To evaluate the potentiality of the jellyfish collagen II type implant for chondrogenic differentiation of hMSCs, and to analyze the effect of TGF-β3 nanoreservoirs on this differentiation, we performed quantitative RT-PCR, indirect immunofluorescence and histology (Figure 2). At 14 days of culture, the NF and the F implants expressed the chondrogenic specific genes SOX9, COL2, ACAN, and RUNX2 (Figure 2). Interesting results were observed for the COL2 gene, significantly (p=0.084) increased on the F implant (Figure 2). This indicates clearly that the TGF-β3 nanoreservoirs improved the capacity of hMSCs to secrete collagen II (Figure 2), thus accelerating their chondrogenic differentiation. Concerning the specific protein expression of the cartilage tissue, we performed indirect immunofluorescence after 21 days *in vitro* and observed the chondrogenic differentiation of the hMSCs (Figure 3). Our results undoubtedly show the expression of Sox9 (Figure 3A and 3E) and Runx2 (Figure 3D and 3H) growth factors, and the matrix proteins secretion of aggrecan (Figure 3B and 3F) and collagen II (Figure 3C and 3G). These results obtained by indirect immunofluorescence confirmed the observations after genes expression studies, since collagen II protein was more expressed at day 21 in presence of TGF-β3 nanoreservoirs (Figure 3G) compared to native jellyfish material (Figure 3C). Furthermore, it appeared that Sox9 transcription factor was also increased for hMSCs cultured on the active implant (Figure 3A and 3E). As noted in QRT-PCR, expression level of Aggrecan and Runx2 didn't varied for cells cultured on TGF-β3 active implant (Figure 3F and 3H). This chondrogenic differentiation was also confirmed by using specific staining of the cartilage tissue (Figure 4). After 14 and 21 days *in vitro*, we observed an increase in the Glycosaminoglycans (GAGs) secretion when the implants were equipped with TGF-β3 nanoreservoirs, visible by a high Safranin-O (Compare Figure 4A and 4B with Figure 4G and 4H). This difference was observed at D14 (Compare Figure 4A with Figure 4G). The Alcian Blue staining also confirmed the GAGs secretion in the active (F) and non-active (NF) implants (Figure 4C, 4D, 4I and 4J). Alizarin staining was negative in the two conditions (Figure 4E, 4F, 4K and 4L) and revealed that calcium was non deposited during culture time, showing that TGF-β3 doesn't accelerate the osteogenic differentiation of hMSCs. These results showed clearly the potential of the TGF-β3 nanoactive collagen type II implant for the chondrogenic differentiation and cartilage repair using hMSCs derived from the bone marrow.

Discussion

With the advent of third generation biomaterials, it is now well recognized that cells, materials, and growth factors form an indispensable prerequisite to improve current approaches of tissue repair. In this work, we developed a new strategy for the regenerative nanomedicine of articular cartilage, based on a jellyfish collagen- type II

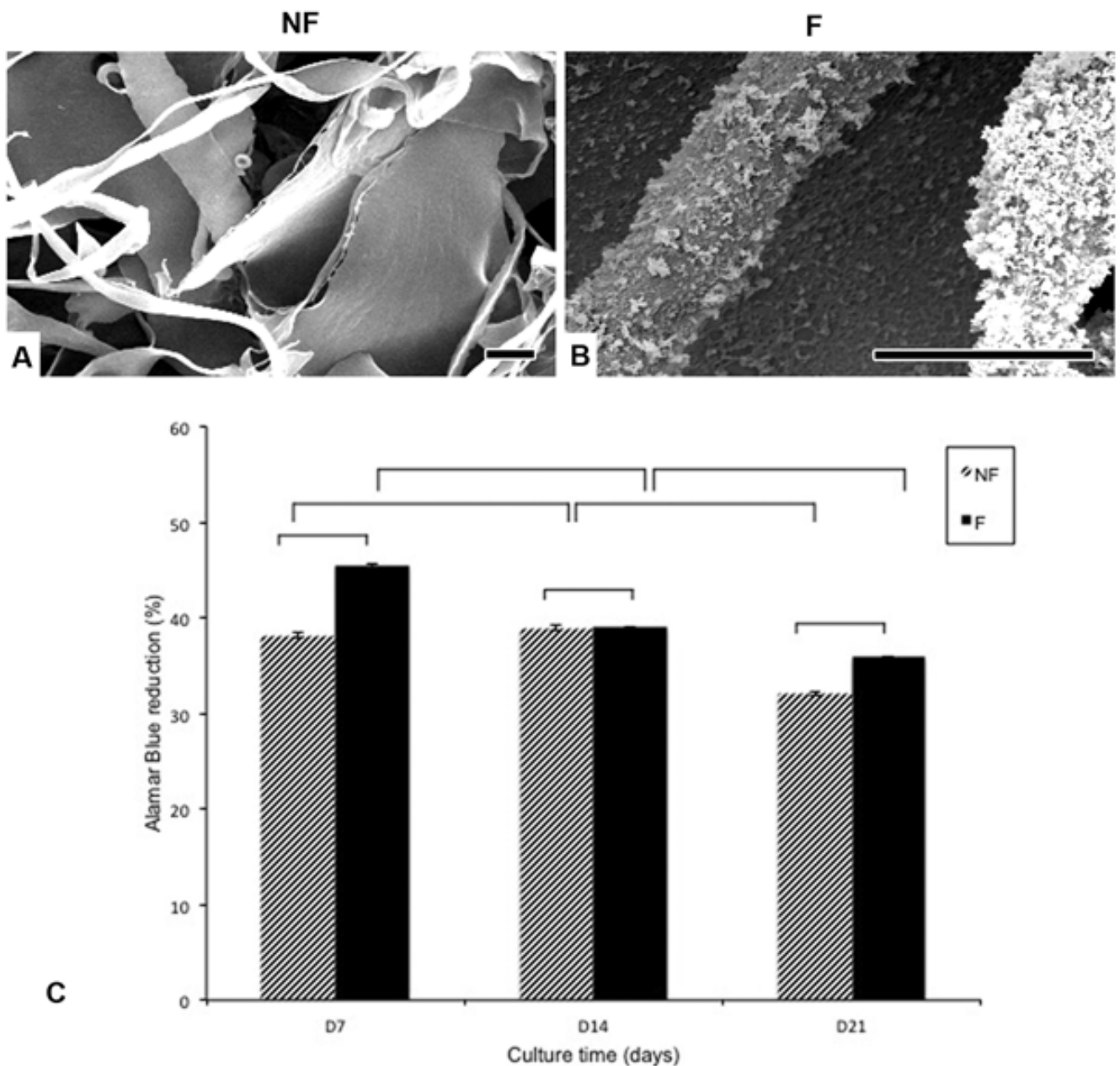


Figure 1: Design of a therapeutic active nanostructured collagen II implant for cartilage regeneration. Scanning electron microscopy images of the porous jellyfish collagen type II implant (Jellagen®) (A). Visualization of the therapeutic TGF-β3 nanoreservoirs on the collagen type II implant after nanoreservoirs technology processing (B). Metabolic activity of human mesenchymal stem cells (hMSCs) growing on the native (NF) and the TGF-β3 active (F) Collagen type II implants. To evaluate their biocompatibility with hMSCs, the % of Alamar Blue® reduction was determined at D7, D14, and D21 after seeding (n=3) (C). All values were expressed as mean ± SEM. Differences were considered significant at 95% CI (***) p<0.01=extremely significant; ** p<0.05=very significant; * p>0.1=significant). Scale bars=5μm. Abbreviations: D: Days; F: TGF-β3 Functionalized Implant; hMSCs: Human Mesenchymal Stem Cells; NF: Native Implant (not functionalized); SEM: Standard Error of the Mean; TGF-β3: Transforming Growth Factor-β3.

material doped with TGF-β3 and autologous MSCs. Proteins from the TGF-β family play a central role in the endochondral development from early to terminal stages, and are essential actors in the cartilage tissue maintenance [24]. Particularly, the role of the TGF-β3 is well recognized in the cartilage tissue engineering domain, as the loss of this growth factor in tissue induces chondrocyte hypertrophy, ultimately resulting in cartilage degeneration [33].

Moreover, this molecule is also implicated in the hypertrophy of MSCs, as it could preserve adipose derived stem cells chondrogenic differentiation from hypertrophy [34] and improve chondrogenesis by increasing the secretion of sulfated Glycosaminoglycans (GAGs) and collagen II [35,36]. Furthermore, TGF-β superfamily is an epigenetic regulator of chondrogenesis by stimulating Sox9-regulated genes inactivated by chromatin in condensed state [37]. Epigenetic

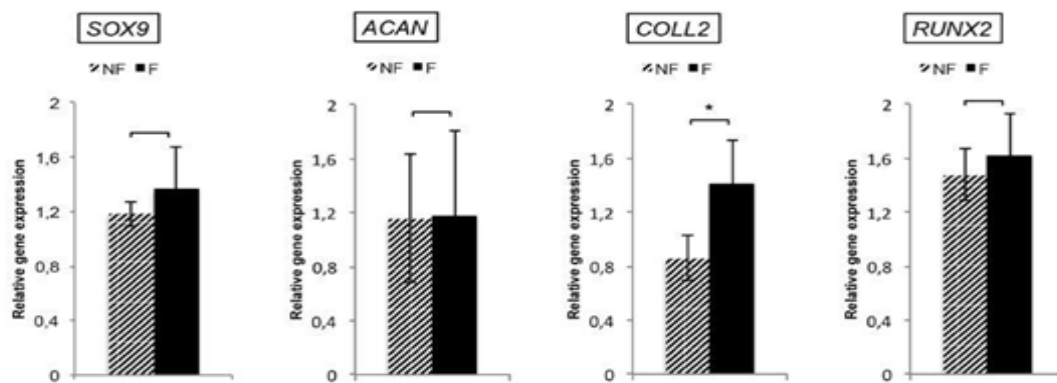


Figure 2: Chondrogenic genes expression of human mesenchymal stem cells on the TGF-β3 active implant. Quantitative expression of genes specific of the articular cartilage tissue (SOX9, COLL2, ACAN, RUNX2) analyzed by QRT-PCR after 14 days of culture on the native (NF) and the TGF-β3 active (F) Collagen type II implants (n=3). All values were expressed as mean ± SEM. Differences were considered significant at 95% CI (** $p < 0.01$ =extremely significant; ** $p < 0.05$ =very significant; * $p > 0.1$ =significant).

Abbreviations: ACAN: Aggrecan; COLL2: Collagen of type II; F: TGF-β3 Functionalized Implant; NF: Native Implant; SEM: Standard Error of the Mean; RUNX2: Runt-related Transcription Factor 2; SOX9: Sex Determining Region Y-box 9; TGF-β3: Transforming Growth Factor β3.

modifications are critical in chondrogenic differentiation, particularly H3K9 methyltransferases play an essential role in the hypertrophic and prehypertrophic state of MSCs, constituting an indispensable effector in their reprogramming and thus in their behaviour [38-42]. Changes at the epigenetic scale being considered as markers of pluripotency, it will be relevant to analyse epigenetic state of hMSCs cultured on the active TGF-β3 implant to observe its influence on epigenetic variations and chondrogenic differentiation. As this growth factor can exert therapeutic effects on cartilage repair, groups attempted to develop active strategies by using TGF-β3 for the promotion of chondrogenesis [35]. Regarding the difficulties associated to *in vivo* delivery of active molecules, a large amount of studies using TGF-β3 improving chondrogenesis are based on plasmid or adenoviral transfection [43], direct integration of the molecule in materials [20,22,23] or direct infusion of material [44]. Unfortunately, these kinds of approaches could lead to inaccurate regulation of the active molecule delivery, and side effects (osteophyte formation, fibrosis and swelling of the synovial) at the implantation site [45,46]. Thus, the huge impact that the TGF-β3 could have in case of articular repair is becoming relevant [35] and we chose to adapt it to our strategy of nanoreservoirs allowing cell-contact dependent local delivery of active molecules [26-29]. The *in vivo* half-life of TGF-β3 is very short [47,48], and its efficient delivery after implantation remains challenging, as the *in vivo* environment leads to rapid removal of the protein from the wound site, loss of its bioactivity, or its low availability. To overcome these constraints, the nanoreservoirs strategy used in this work to increase the chondrogenesis of MSCs, was performed using heparin molecules as chaperones. TGF-β3 contains a heparin-binding site able to potentiate its activity [49,50]. Indeed, the strategy of nanoreservoirs used here aims to protect TGF-β3 from degradation, via heparin binding and chitosan entrapment within nanoreservoirs.

It is established that the use of chondrocytes associated with MSCs improves their differentiation via paracrine factors [31,51-54]. Among these factors, TGF-β3 is secreted by chondrocytes [55]. The proposed use of growth factor nanocontainers can substitute the role of secreting chondrocytes, making TGF-β3 available for promoting chondrogenesis of MSCs. Today, the developed therapeutics for articular cartilage repair focus on the use of autologous chondrocytes [3-6].

In the osteoarticular cell therapy domain, autologous MSCs are used (Chondrogen™ (Osiris therapeutics)), but these cells are injected directly into the joint capsule, with the aim to modulate inflammation in case of osteoarthritis [56]. However for the repair and regeneration of articular cartilage with human MSCs, the use of a biomaterial, focusing cells at the defect site, is necessary. To closer mimic the natural cues of articular cartilage, we used the jellyfish collagen type II material (Jellagen®), offering a tridimensional environment, increasing cell-cell interactions and known to enhance chondrogenesis of MSCs [57]. This easy non-mammalian source of collagen type II (*R. pulmo*) offers a larger cell attachment in three-dimensional conformation, and the lack of integrin-binding sites probably leads to an alternative binding mechanism allowing cells to keep their round shape and preventing them from dedifferentiation. By using collagen type II from jellyfish we could overcome the limitations associated to bovine or porcine MACI (matrix-induced chondrocyte implantation) implants, such as fibrous cartilage formation and risks of zoonosis (Bovine spongiform encephalopathy). Thus, marine collagen type II from jellyfish is a very suitable and promising material for the development of articular cartilage tissue repair implants.

The association of MSCs with an active material to form an implant of the third generation represents today an essential strategy with real impact fitting the clinical market of articular repair, promising the amelioration of surgical procedures and recovery of patients. To facilitate the clinical approach of this smart active implant, we used clinical applicable MSCs, well proliferating *in vitro* and differentiating in contact with biomaterials functionalized with nanoreservoirs of growth factors [26,29-31]. We showed here that this strategy of TGF-β3 nanoreservoirs is biocompatible with hMSCs, and promotes the secretion of GAGs and collagen II, showing that the active jellyfish implant represents an efficient strategy to promote the cartilage regeneration.

Conclusion

We showed here that we were able to dope a jellyfish collagen type II implant, developed for cartilage regeneration, with therapeutic molecules. As the TGF-β3 growth factor is a well-known effector of

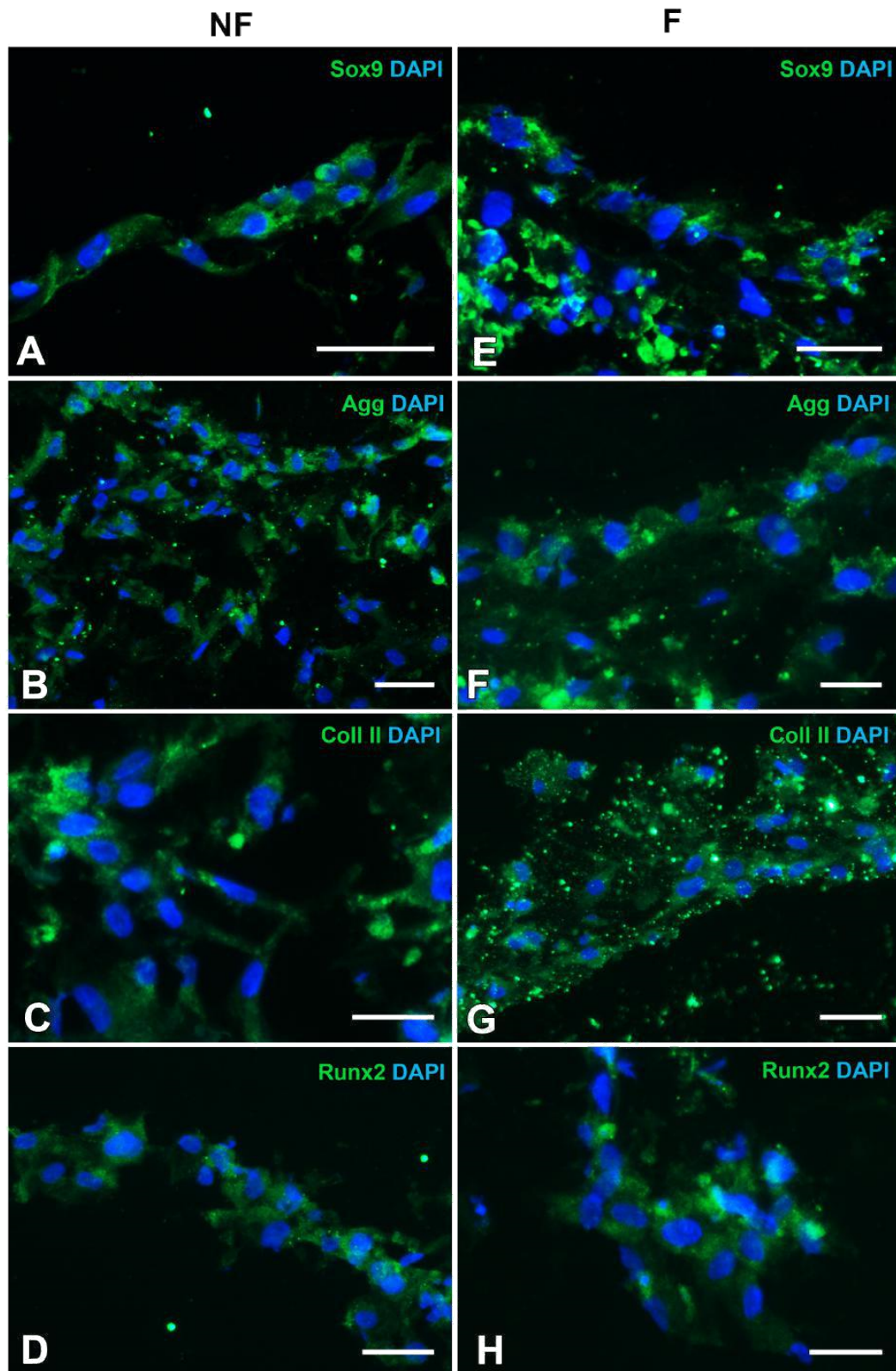


Figure 3: Chondrogenic proteins expression of human mesenchymal stem cells on the TGF- β 3 active implant. Expression of proteins specific of the articular cartilage tissue visible in green (A-H): Sox9 (A, E), Aggrecan (B, F), Collagen II (C, G) and Runx2 (D, H), observed by indirect immunofluorescence after 21 days of culture on the native (NF) (A-D) and the active (F) collagenic implants (E-H). Nuclei are visible in blue by DAPI staining. Scale bars=50 μ m.

Abbreviations: Agg: Aggrecan; Coll II: Collagen of type II; DAPI: 4',6'-diamidino-2-phenylindole; F: TGF- β 3 functionalized implant; NF: Native Implant; Runx2: Runt-related transcription factor 2; Sox9: Sex Determining region Y-box 9; TGF- β 3: Transforming Growth Factor β 3.

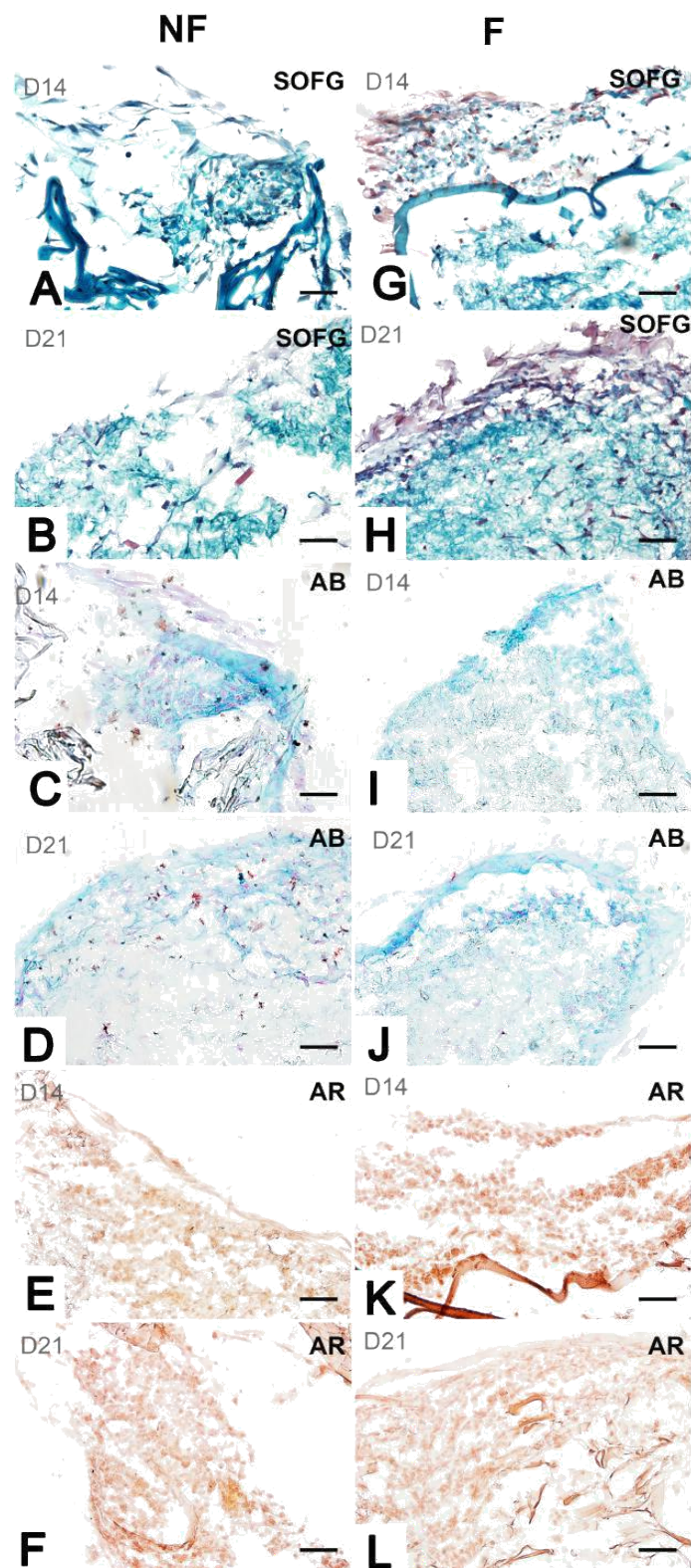


Figure 4: GAGs secretion of human mesenchymal stem cells on the TGF- β 3 active implant. Histological staining showing glycosaminoglycans secretion in red by Safranin-O/Fast Green (A, B, G, H) and in blue by Alcian Blue (C, D, I, J) after 14 and 21 days of culture on the native (NF) and the TGF- β 3 active (F) implants. Mineralization was also evaluated by an Alizarin Red staining after 14 and 21 days of culture on both materials (E, F, K, L). Scale bars=50 μ m.

Abbreviations: AB: Alcian Blue; AR: Alizarin Red; D: Days; F: TGF- β 3 functionalized implant; NF: Native Implant; SOFG: Safranin-O/Fast Green; TGF- β 3: Transforming Growth Factor β 3.

the chondrogenesis signalling way, this molecule represented an ideal candidate to produce therapeutic implants for improving cartilage regeneration. By using the nanoreservoirs strategy for entrapping this active molecule, we developed successful active therapeutic implants for regenerative medicine. This approach, developed here, could be adjusted with other therapeutic applicable cells, tissues or drugs. Our innovative therapeutic medical implant, as an adaptable medical device, is an adjustable technology, which can be tune by using different kinds of cells, active drugs and biomaterials and thereby apply for the regeneration of other tissues.

Competing Interests

The authors report no conflicts of interest in this work.

Authors' Contributions

MP: Conception, design collection and assembly of the data, analysis and interpretation, XV: formation of jellyfish implants, PS: Conception of nanoreservoirs, NJ and LK: Conception and design, assembly of the data, analysis and interpretation, writing of the manuscript.

Acknowledgement

This work was funded by INSERM and the authors are indebted to Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg for financial support. The authors thank Valérie Demais (INCI, Strasbourg) for her great help with SEM, Jellagen® PTY LTD (Cardiff, United Kingdom) for jellyfish collagen type II and Nicolas Humbert (CNRS, UMR7213, Strasbourg, France) for his help with lyophilization.

References

- Jacobi M, Villa V, Magnussen RA, Neyret P (2011) MACI - a new era? *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* 3: 10. [[PubMed](#)]
- Abdel-Sayed P, Pioletti DP (2015) Strategies for improving the repair of focal cartilage defects. *Nanomedicine* 10: 2893-2905. [[PubMed](#)]
- Volz M, Schaumburger J, Frick H, Grifka J, Anders S (2017) A randomized controlled trial demonstrating sustained benefit of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis over microfracture at five years. *Int Orthop* pp: 1-8
- Niethammer TR, Holzgruber M, Gülecüyüz MF, Weber P, Pietschmann MF, et al. (2017) Matrix based autologous chondrocyte implantation in children and adolescents: a match paired analysis in a follow-up over three years post-operation. *Int Orthop* 41: 343-350. [[PubMed](#)]
- Petri M, Broese M, Liodakis E, Guenther D, Krettek C, et al. (2013) CaReS® (MACT) versus microfracture in treating symptomatic patellofemoral cartilage defects: a retrospective matched-pair analysis. *J Orthop Sci* 18: 38-44. [[PubMed](#)]
- Nixon AJ, Rickey E, Butler TJ, Scimeca MS, Moran N, et al. (2015) A chondrocyte infiltrated collagen type I/III membrane (MACI® implant) improves cartilage healing in the equine patellofemoral joint model. *Osteoarthritis Cartilage* 23: 648-660. [[PubMed](#)]
- Pustlauk W, Paul B, Brueggemeier S, Gelinsky M, Bernhardt A (2015) Modulation of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in jellyfish collagen scaffolds by cell density and culture medium: Chondrogenic differentiation of hMSCs in jellyfish collagen scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med* [[PubMed](#)]
- Sewing J, Klinger M, Notbohm H (2015) Jellyfish collagen matrices conserve the chondrogenic phenotype in two- and three-dimensional collagen matrices: Jellyfish collagen matrices conserve the chondrogenic phenotype. *J Tissue Eng Regen Med* 11: 916-925. [[PubMed](#)]
- Hoyer B, Bernhardt A, Lode A, Heinemann S, Sewing J, et al. (2014) Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 10: 883-892. [[PubMed](#)]
- Caldwell KL, Wang J (2015) Cell-based articular cartilage repair: the link between development and regeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 23: 351-362. [[PubMed](#)]
- von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P (1977) Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267: 531-532. [[PubMed](#)]
- Benya PD, Padilla SR, Nimni ME (1978) Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 15: 1313-1321. [[PubMed](#)]
- Magne D, Vinatier C, Julien M, Weiss P, Guicheux J (2005) Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol Med* 11: 519-526. [[PubMed](#)]
- Woods A, Wang G, Beier F (2007) Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J Cell Physiol* 213: 1-8. [[PubMed](#)]
- Beane OS, Darling EM (2012) Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. *Ann Biomed Eng* 40: 2079-2097. [[PubMed](#)]
- Seo S, Na K (2011) Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *J. Biomed. Biotechnol* 2011: 806891. [[PubMed](#)]
- Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai BC, et al. (2010) Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med* 38: 1110-1116. [[PubMed](#)]
- Daw R, Tonzani S (2009) Biomaterials. *Nature* 462:425. [[PubMed](#)]
- Yang SS, Jin LH, Park SH, Kim MS, Kim YJ, et al. (2016) Extracellular Matrix (ECM) Multilayer Membrane as a Sustained Releasing Growth Factor Delivery System for rhTGF-β3 in Articular Cartilage Repair. *Burns JS, editor. PLOS ONE* 11: e0156292. [[PubMed](#)]
- Fisher MB, Belkin NS, Milby AH, Henning EA, Söegaard N, et al. (2016) Effects of Mesenchymal Stem Cell and Growth Factor Delivery on Cartilage Repair in a Mini-Pig Model. *Cartilage* 7: 174-84. [[PubMed](#)]
- Pan Q, Li W, Yuan X, Rakhmanov Y, Wang P, et al. (2016) Chondrogenic effect of cell-based scaffold of self-assembling peptides/PLGA-PLL loading the hTGFβ3 plasmid DNA. *J Mater Sci Mater Med* 27: 19. [[PubMed](#)]
- Matsiko A, Levingstone TJ, Gleeson JP, O'Brien FJ (2015) Incorporation of TGF-beta 3 within collagen-hyaluronic acid scaffolds improves their chondrogenic potential. *Adv Healthc Mater* 4: 1175-1159. [[PubMed](#)]
- Krüger JP, Machens I, Lahner M, Endres M, Kaps C (2014) Initial boost release of transforming growth factor-β3 and chondrogenesis by freeze-dried bioactive polymer scaffolds. *Ann Biomed Eng* 42: 2562-2576. [[PubMed](#)]
- Wang W, Rigueur D, Lyons KM (2014) TGFβ signaling in cartilage development and maintenance: TGFβ signaling in cartilage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 102: 37-51. [[PubMed](#)]
- Kim SH, Kim SH, Jung Y (2015) TGF-β3 encapsulated PLCL scaffold by supercritical CO₂-HFIP co-solvent system for cartilage tissue engineering. *J Control Release* 213: e100-101. [[PubMed](#)]
- Palomares CM, Ferrand A, Facca S, Fioretti F, Ladam G, et al. (2012) Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 6: 483-490. [[PubMed](#)]
- Eap S, Ferrand A, Schiavi J, Keller L, Kokten T, et al. (2013) Collagen implants equipped with "fish scale"-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine (Lond)* 9: 1253-1261 [[PubMed](#)]
- Eap S, Keller L, Ferrand A, Schiavi J, Lahiri D, et al. (2013) Nanomechanical properties of active nanofibrous implants after in vivo bone regeneration. *Nano LIFE* 4: 9.
- Eap S, Keller L, Schiavi J, Huck O, Jacomine L, et al. (2015) A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int J Nanomed* 10: 1061-1075. [[PubMed](#)]
- Keller L, Wagner Q, Schwinté P, Jessel NB (2015) Double compartmented and hybrid implant outfitted with well-organized 3D stem cells for osteochondral regenerative nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)* 10: 2833-2845. [[PubMed](#)]
- Keller L, Wagner Q, Pugliano M, Breda P, Ehlinger M, et al. (2015) Bi-layered Nano Active Implant with Hybrid Stem Cell Microtissues for Tuned Cartilage Hypertrophy. *J Stem Cell Res Ther* 1: 00004.
- Keller L, Schwinté P, Gomez-Barrena E, Arruebo M, Benkirane-Jessel N (2017) Smart Implants as a Novel Strategy to Regenerate Well-Founded Cartilage. *Trends Biotechnol* 35: 8-11. [[PubMed](#)]

33. Wu M, Chen G, Li YP (2016) TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 4: 16009. [[PubMed](#)]
34. Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, et al. (2007) Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol* 211: 682-691. [[PubMed](#)]
35. Tang QO, Shakib K, Heliotis M, Tsiridis E, Mantalaris A, et al. (2009) TGF-beta3: A potential biological therapy for enhancing chondrogenesis. *Expert Opin Biol Ther* 9: 689-701. [[PubMed](#)]
36. Gonzalez-Fernandez T, Tierney EG, Cunniffe GM, O'Brien FJ, Kelly DJ (2016) Gene Delivery of TGF- β 3 and BMP2 in an MSC-Laden Alginate Hydrogel for Articular Cartilage and Endochondral Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A* 22: 776-787. [[PubMed](#)]
37. Furumatsu T, Asahara H (2010) Histone acetylation influences the activity of Sox9-related transcriptional complex. *Acta Med Okayama* 64: 351-357. [[PubMed](#)]
38. Ideno H, Shimada A, Imaizumi K, Kimura H, Abe M, et al. (2013) Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development. *Gene Expr Patterns* 13: 84-90. [[PubMed](#)]
39. Zhang T, Termanis A, Özkan B, Bao XX, Culey J, et al. (2016) G9a/GLP Complex Maintains Imprinted DNA Methylation in Embryonic Stem Cells. *Cell Rep* 15: 77-85. [[PubMed](#)]
40. Yang J, Kaur K, Ong LL, Eisenberg CA, Eisenberg LM (2015) Inhibition of G9a Histone Methyltransferase Converts Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Cardiac Competent Progenitors. *Stem Cells Int* 2015: 270428. [[PubMed](#)]
41. Collas P, Noer A, Sørensen AL (2008) Epigenetic Basis for the Differentiation Potential of Mesenchymal and Embryonic Stem Cells. *Transfus Med Hemother* 35: 205-215. [[PubMed](#)]
42. Dahl JA, Duggal S, Coulston N, Millar D, Melki J, et al. (2008) Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. *Int J Dev Biol* 52: 1033-1042. [[PubMed](#)]
43. Zheng D, Dan Y, Yang S, Liu G, Shao Z, et al. (2015) Controlled chondrogenesis from adipose-derived stem cells by recombinant transforming growth factor- β 3 fusion protein in peptide scaffolds. *Acta Biomaterial* 1: 191-203. [[PubMed](#)]
44. Lee CH, Cook JL, Mendelson A, Moiola EK, Yao H, et al. (2010) Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study. *Lancet* 376: 440-448. [[PubMed](#)]
45. Saraf A, Mikos AG (2006) Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 592-603. [[PubMed](#)]
46. Lam J, Lu S, Kasper FK, Mikos AG (2015) Strategies for Controlled Delivery of Biologics for Cartilage Repair. *Adv Drug Deliv Rev* 84: 123-134. [[PubMed](#)]
47. Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M (2005) TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim Pol* 52: 329-337. [[PubMed](#)]
48. Moiola EK, Hong L, Guardado J, Clark PA, Mao JJ (2006) Sustained Release of TGF β 3 from PLGA Microspheres and Its Effect on Early Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng* 12: 537-546. [[PubMed](#)]
49. Park JS, Woo DG, Yang HN, Lim HJ, Chung HM, et al. (2008) Heparin-Bound Transforming Growth Factor- β 3 Enhances Neocartilage Formation by Rabbit Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation* 85: 589-596. [[PubMed](#)]
50. Park JS, Woo DG, Yang HN, Na K, Park KH (2009) Transforming growth factor β -3 bound with sulfate polysaccharide in synthetic extracellular matrix enhanced the biological activities for neocartilage formation in vivo. *J Biomed Mater Res A* 91: 408-415. [[PubMed](#)]
51. Lai JH, Kajiyama G, Smith RL, Maloney W, Yang F (2013) Stem cells catalyze cartilage formation by neonatal articular chondrocytes in 3D biomimetic hydrogels. *Sci Rep* 3: 3553. [[PubMed](#)]
52. Cooke ME, Allon AA, Cheng T, Kuo AC, Kim HT, et al. (2011) Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. *Osteoarthr. Cartil* 19: 1210-1218. [[PubMed](#)]
53. Hubka KM, Dahlin RL, Meretoja VV, Kasper FK, Mikos AG (2014) Enhancing chondrogenic phenotype for cartilage tissue engineering: monoculture and coculture of articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev* 20: 641-654. [[PubMed](#)]
54. Meretoja VV, Dahlin RL, Kasper FK, Mikos AG (2012) Enhanced chondrogenesis in co-cultures with articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 33: 6362-6369. [[PubMed](#)]
55. Villiger PM, Lotz M (1992) Differential expression of TGF beta isoforms by human articular chondrocytes in response to growth factors. *J Cell Physiol* 151: 318-325. [[PubMed](#)]
56. Evans CH, Kraus VB, Setton LA (2013) Progress in intra-articular therapy. *Nat Rev Rheumatol* 10: 11-22. [[PubMed](#)]
57. Li WJ, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson KG, et al. (2005) A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26: 599-609. [[PubMed](#)]

Citation: Pugliano M, Vanbellinghen X, Schwinté P, Benkirane-Jessel N, Keller L (2017) Combined Jellyfish Collagen Type II, Human Stem Cells and Tgf-B3 as a Therapeutic Implant for Cartilage Repair. *J Stem Cell Res Ther* 7: 382. doi: [10.4172/2157-7633.1000382](https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000382)

Chapitre 2

*Développement d'un implant thérapeutique nano-actif
à deux compartiments, doté de nanoréservoirs de
BMP-7 et équipé d'organoïdes hybrides à des fins de
médecine régénérative ostéoarticulaire*

- ❖ Keller, L., Wagner, Q., **Pugliano, M.**, Breda, P., Ehlinger, M., Schwinté, P., and Benkirane-Jessel, N. Bi-layered nano active implant with hybrid stem cell microtissues for tuned cartilage hypertrophy. 2015. **J. Stem Cell Res. Ther.** *1*, 1–9.

2.1. Contexte et objectifs

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif avasculaire et innervé, reposant sur un os sous-chondral minéralisé, lui-même au contact de l'os spongieux sous-jacent. En raison du faible nombre de cellules qui le composent, le tissu cartilagineux possède une capacité d'autorégénération limitée. Par ailleurs, dans une grande majorité des cas, les lésions cartilagineuses impactent également l'os sous-chondral. Le traitement des lésions ostéochondrales constitue ainsi un véritable challenge, puisque la régénération du cartilage est souvent réalisée sur un support osseux sous-chondral fragilisé, et évolue, à terme, en fibrocartilage [101]. Pour éviter le remodelage déficient d'un implant cartilagineux, il est essentiel de régénérer un os sous-chondral sain, capable de supporter à sa surface, une régénération durable et efficace du tissu cible. C'est pourquoi, nous nous sommes employés à élaborer un implant thérapeutique biphasique, destiné à la régénération de l'unité ostéochondrale. Pour ce faire, nous avons mis au point un implant composé de deux compartiments distincts, mimant l'environnement physiologique du cartilage articulaire d'une part, et de l'os sous-chondral d'autre part. En recherche, des biomatériaux dérivés de substrats naturels ou synthétiques ont été développés afin de mimer la matrice extracellulaire de ces deux tissus. Concernant le compartiment dédié à la régénération de l'os sous-chondral, le choix de notre équipe s'est porté sur l'utilisation de la poly- ϵ -caprolactone (PCL), un polymère synthétique biorésorbable, approuvé par la « *Food and Drug Administration* » (FDA) [86,87]. Dans un premier temps, nous avons préparé un implant nanofibreux de PCL, par la technique de l'électrospinning, que nous avons ensuite fonctionnalisé au moyen de nanoréservoirs contenant de la « *Bone Morphogenetic Protein 7* » (BMP-7). Concernant le compartiment dédié à la régénération du cartilage, nous avons choisi d'utiliser un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique. En effet, contrairement au tissu osseux qui n'est composé que d'environ 10 à 20% d'eau, le cartilage, lui, en comporte entre 70 et 80%. C'est pourquoi, nous avons sélectionné un modèle d'hydrogel combinant alginate et acide hyaluronique, deux molécules communément utilisées dans le domaine. Il est important de souligner que cet hydrogel, ainsi que la BMP-7 utilisée comme molécule thérapeutique, sont tous les deux approuvés pour une utilisation clinique.

Pour les raisons exposées dans le chapitre précédent, nous avons eu recours aux hCSMs pour coloniser notre modèle d'implant thérapeutique. Récemment, au sein du laboratoire, nous avons démontré clairement que les cellules primaires ou souches, utilisées sous forme de sphéroïdes (organoïdes), ont la capacité d'accélérer la régénération tissulaire par rapport aux cellules isolées. Plus précisément, lorsque ces organoïdes ont été cultivés sur un implant thérapeutique doté de nanoréservoirs de BMP-7, leur capacité ostéogénique a été démontrée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [98,102]. Il a également été rapporté que la culture en conformation tridimensionnelle (3D), permet une différenciation chondrogénique supérieure à la culture en cellules isolées [103,104]. Durant ces travaux, nous avons opté pour l'utilisation d'organoïdes de hMSCs pour la régénération du tissu cartilagineux. En effet, cet

environnement « double tridimensionnel » (organoïdes en hydrogel) constitue un réel atout pour la régénération cartilagineuse. Le potentiel régénérateur de chaque compartiment a tout d'abord été étudié de manière individuelle, puis de manière combinée, par des analyses *in vitro* et *in vivo*.

Du point de vue réglementaire, notre implant thérapeutique biphasique inerte constitue notamment un dispositif médical implantable. En y incorporant les nanoréservoirs de BMP-7, et les cellules souches, ce dispositif médical devient un médicament combiné de thérapie innovante.

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Compartiment 1 : régénération de l'os sous-chondral

En médecine régénérative osseuse, différents biomatériaux chargés de molécules thérapeutiques ont été développés. Malgré leur application en clinique, la libération de ces molécules s'effectue de manière passive et non-contrôlée. La technologie de nanoréservoirs, développée par notre équipe, est adaptée aux biomatériaux synthétiques et naturels [86-88,98,102]. Son avantage réside dans le fait qu'elle permet une biodisponibilité contrôlée de la molécule thérapeutique, en nano-doses, et dépendante de la présence et de l'adhésion des cellules. Dans le but d'analyser la biocompatibilité et le potentiel ostéogénique du compartiment 1 (os sous-chondral), des organoïdes de hMSCs ont été ensemencés sur l'implant de PCL, fonctionnalisé (F) ou non (NF) par les nanoréservoirs de BMP-7, et cultivés durant 28 jours en milieu de différenciation ostéogénique.

L'activité métabolique des hMSCs ayant augmenté tout au long de la période de culture, la biocompatibilité de l'implant thérapeutique de PCL a pu être confirmée. Après 14 jours de culture, les cellules ont synthétisé les marqueurs spécifiques du tissu osseux (Runx2, ostéocalcine, sialoprotéine osseuse II (BspII)), aussi bien sur l'implant fonctionnalisé (F) que l'implant inerte (NF). Il est intéressant de noter que la production des deux premiers marqueurs, a été plus importante en présence des nanoréservoirs de BMP-7. Ces résultats confirment que l'implant nanofibreux de PCL électrospinné, et fonctionnalisé *via* notre approche, représente un bon support pour la différenciation ostéogénique des hMSCs. Cette stratégie pourrait pallier certaines limites actuellement rencontrées en clinique. En effet, l'utilisation d'outils thérapeutiques tels que les éponges imbibées de 12 milligrammes de BMP-2 (InductOs®, développé par Medtronic) ou encore de 3,5 milligrammes de BMP-7 (Osigraft®, développé par Stryker Biotech) [105,106], est associée à un risque de surdose du facteur de croissance par relargage passif et massif, pouvant induire des effets indésirables potentiellement graves, tels que des croissances osseuses ectopiques [107,108].

2.2.2. Compartiment 2 : régénération du cartilage articulaire

Pour permettre la régénération du tissu cartilagineux à la surface du support osseux nano-actif (*compartiment 1*), nous avons utilisé un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique,ensemencé d'organoïdes de hCSMs seules, ou en présence de chondrocytes humains (hCHs). Cette conformation cellulaire permet notamment de mimer la condensation cellulaire survenant lors de la différenciation endochondrale, au cours du développement embryonnaire [109-111]. Par ailleurs, dans le cadre de la régénération du cartilage, l'impact d'une co-culture de CSMs avec des chondrocytes, sur la diminution significative des marqueurs de l'hypertrophie, a déjà été établi [112-114].

Durant ces travaux, nous avons choisi de substituer la culture en présence de facteurs de différenciation (milieu de différenciation), par ce système de culture 3D (organoïdes), favorisant les interactions cellulaires, et permettant de générer des signaux cellulaires à des doses plus physiologiques. D'une part, après 28 jours de culture en milieu non-chondrogénique (milieu de prolifération), nous avons démontré clairement la présence de GAGs au sein des organoïdes de hCSMs seules, et des organoïdes hybrides (hCSMs et hCHs). D'autre part, une diminution significative du marqueur précoce d'hypertrophie *RUNX2* a été observée dans les organoïdes hybrides. L'utilisation d'organoïdes hybrides contenant des CSMs et des hCHs, a ainsi permis d'induire la différenciation chondrogénique, tout en diminuant le phénotype hypertrophique.

2.2.3. Combinaison des compartiments 1 et 2 : régénération de l'unité ostéochondrale

L'analyse réalisée compartiment par compartiment, a démontré clairement l'efficacité d'utiliser, d'une part, des organoïdes de CSMs en présence d'un implant de PCL fonctionnalisé par la BMP-7, pour la régénération osseuse (compartiment 1), et, d'autre part, des organoïdes hybrides (hCSMs et hCHs), en présence d'un hydrogel, pour s'affranchir de l'hypertrophie du compartiment 2, destiné à régénérer le cartilage. Au vu des résultats encourageants précédemment décrits, nous nous sommes proposés d'évaluer, *in vivo*, l'association des deux compartiments. Pour cela, nous avons implanté cette construction, en sous-cutané, dans un modèle de souris immunodéprimée « nude » (Autorisation du Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche n°A 67-482-35).

Après 90 jours, les implants biphasiques ont été récupérés par biopsie tissulaire, afin de vérifier la présence des marqueurs spécifiques des tissus régénérés. Nous avons constaté la visibilité des deux compartiments de l'implant, après coloration avec la safranine-O couplée au Fast-Green : en bleu le compartiment osseux (compartiment 1) et en rouge les GAGs sulfatés du compartiment cartilagineux (compartiment 2). Il est important de noter, d'une part, la cohésion des deux compartiments préservée durant la période d'implantation, et, d'autre part, la présence homogène des cellules sur l'ensemble de la structure, montrant ainsi la viabilité de notre implant thérapeutique biphasique.

2.3. Conclusion

Durant cette deuxième partie de mes travaux de thèse, nous avons mis au point un implant thérapeutique biphasique, composé (i) d'un implant nanofibreux de PCL, doté de nanoréservoirs de BMP-7 (*compartiment 1*), et (ii) d'un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique ensemencé d'organoïdes hybrides de hCSMs et hCHs (*compartiment 2*). Le premier compartiment, de nature fibreuse, visait à mimer la matrice extracellulaire de l'os, en faveur de sa régénération, tout en lui conférant des propriétés mécaniques adéquates. A contrario, le deuxième compartiment, pourvu d'une teneur en eau plus importante, tendait à imiter la nature du tissu cartilagineux en vue de sa régénération. Dans cette étude, nous avons pris en compte l'importance d'avoir un site d'implantation sain, c'est-à-dire un socle osseux sous-chondral solide, pour obtenir une régénération cartilagineuse efficace et durable. Par ailleurs, nous avons également considéré l'importance de conférer un environnement 3D aux cellules, en utilisant des organoïdes plutôt que des cellules isolées. Cette stratégie, qui a permis d'améliorer les interactions cellulaires, s'est révélée efficace dans la production de matrice cartilagineuse, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, tout en limitant significativement l'évolution hypertrophique de ce néo-tissu. Ces travaux ont validé notre approche thérapeutique innovante, et ce, à travers une étude *in vivo* menée chez le petit animal. Il sera toutefois nécessaire de compléter ces résultats en réalisant la même étude chez le gros animal. Enfin, du point de vue réglementaire, il est important de souligner que cette construction bicompartimentée (ou biphasique), rentre dans la catégorie des médicaments combinés de thérapie innovante, prometteurs dans le champ de la nanomédecine régénérative ostéoarticulaire.

Les travaux réalisés, par la suite, décrivent l'évaluation de cette stratégie innovante d'implant thérapeutique biphasique et nano-actif, dans un modèle animal de grande taille.

Bi-layered Nano Active Implant with Hybrid Stem Cell Microtissues for Tuned Cartilage Hypertrophy

Research Article**Abstract**

Repair of articular cartilage defects remains challenging, as a majority of these defects reach the *subchondral bone*. The objectives of this work were first, to develop a new advanced therapeutic implant for osteoarticular repair, and second, to prevent hypertrophy of the articular cartilage region. For this aim, we developed a bi-compartmented implant, presenting a first layer for *subchondral bone* regeneration: Compartment 1, composed of a nanofibrous poly (ϵ -caprolactone) membrane equipped with BMP-7 growth factor nanoreservoirs, second layer for cartilage regeneration: Compartment 2, composed of alginate/hyaluronic acid hydrogel. To modulate hypertrophy, compartment 2 was seeded with *microtissues* of human *mesenchymal stem cells* co-cultured with human chondrocytes as differentiation inductors. This new strategy offers an appropriate double 3D environment (microtissues in Hydrogel) as inductive trigger for cartilage regeneration with tuned hypertrophy.

Keywords: Regenerative nanomedicine; Nanofibrous PCL implant; Human mesenchymal stem cells (hMSCs); Microtissues (MTs); Hypertrophy; BMP-7

Volume 1 Issue 1 - 2015

Laetitia Keller^{1,2#}, Quentin Wagner^{1,2#}, Marion Pugliano¹, Pierre Breda¹, Matthieu Ehlinger¹, Pascale Schwinte^{1#} and Nadia Benkirane-Jessel^{1,2*}

¹Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine, Faculte de Medecine, France

²Universite de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, France

#These authors have equally contributed to this work.

***Corresponding author:** Nadia Benkirane-Jessel, INSERM UMR1109, Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine, Faculte de Medecine, FMST, F-67085 Strasbourg, France, Universite de Strasbourg, Faculte de Chirurgie Dentaire, 1 place de l'Hopital, F-67000 Strasbourg, France, Tel: +33-368853376; E-mail: nadia.jessel@inserm.fr

Received: April 24, 2015 | **Published:** July 23, 2015

Abbreviations: BMP: Bone Morphogenic Protein; Bsp-II: Bone Sialoprotein-II, CHI: Chitosan; ECM: extracellular matrix; F: Functionalized; FDA: Food and Drug Administration; GAGs: Glycosaminoglycans; HA: Hyaluronic Acid; hCHs: human Chondrocytes; hMSCs: human Mesenchymal Stem Cells; LbL: Layer by Layer; MTs: Microtissues; NF: No Functionalized; Ocn: Osteocalcin; PEG: Polyethylene Glycol; PGA: Poly Glycolic Acid; PLA: Poly Lactic Acid; PCL: Poly(ϵ -Caprolactone); *Runx2*: Runt-related transcription factor 2; TGF: Transforming Growth Factor

Introduction

The articular cartilage is a very specific conjunctive tissue divided in several layers, from the articular zone on the articular surface to the mineralized *subchondral bone* in contact with the surrounding bone [1-3]. To resist to the compression and provide a low-friction surface for the joint, the osteochondral unit presents a high specific extracellular matrix (ECM) organization in each layer, from high density GAGs (glycosaminoglycans) absorbing water in the articular zone to a more collagen type I matrix in the *subchondral bone* [1-3]. Due to the lack of vascularisation and cells, articular cartilage has a weak capacity for self-repair. Therefore, repair of osteochondral lesions still remains challenging, as the articular cartilage lesion also affects the *subchondral bone* underneath, and often results in fibrous and frangible repaired tissue [4-8]. In order to increase the efficiency of articular cartilage repair, it is essential to first repair a solid *subchondral bone*, supporting articular cartilage regeneration on its surface.

Nanomaterials have a great potential in the field of regenerative medicine, especially in osteoarticular applications [1,9]. For bone

and cartilage, lots of materials have been developed to mimic the physiological extracellular matrix of tissues. They originate from natural substrates (collagen, alginate, gelatin, agarose, fibrin) or are synthetic materials (PEG (polyethylene glycol), PLA (poly lactic acid), PGA (poly glycolic acid) [10,11]. Recently, focus has been made on new generations of nanotechnology-based biomaterials.

As guidance offered by such materials allows the restoration of tissues by mimicking the ECM, nanofibrous scaffolds play a central role in modern strategies in nanomedicine [12,13]. Our group has developed biodegradable electrospun nanofibrous materials using some FDA (Food and Drug Administration) approved polymer such as poly (ϵ -caprolactone) (PCL) [14,15]. Furthermore, the functionalization of these new generation biomaterials, by incorporation of bioactive molecules, increases their efficiency to induce cell differentiation and tissue repair [14-32]. To this end, we have recently developed new strategies for active therapeutic implants associating FDA approved components [14,15,33-36]. We have reported the incorporation of active growth factors (TGF β , BMP-2, BMP-7) as a coating for nanofibrous scaffolds (synthetic or natural). The mechanism of the nanoreservoirs release of active therapeutics is cell contact dependent. These systems are already validated both *in vitro* and *in vivo* for the increase of the speed of bone regeneration [14,15,33-37].

In recent years, in the field of bone and osteoarticular regenerative medicine, the use of adult mesenchymal stem cells (MSCs) provides an increasing interest. Derived from adult tissues, MSCs are defined as self-renewable, multipotent and immunosuppressive. Able to differentiate in chondrocytes or osteoblasts under specific conditions [38-41], these stem cells represent ideal candidates for the osteochondral regeneration.

Indeed, with autologous chondrocytes, the procurement of a sufficient number of *autologous cells* is limited and these cells easily lose their phenotype *in vitro* [8,42,43]. In recent years, it has been shown that MSCs cultured in a 3D structure, named “micromass” or “pellet”, have a more important capacity to differentiate in the chondrogenic way, compared to their use as single cells [44,45]. Moreover, the use of spheroids (self-assembling microtissues) is known to mimic the embryonic condensation occurring during the embryonic *endochondral* development [46-49]. Indeed, in recent studies, we have shown that hMSCs, used as single cells but also in 3D well-organized *microtissues* (MTs), were able to produce bone *in vitro* and *in vivo* when associated with a nanofibrous membrane equipped with BMP-7 nanoreservoirs [35,36].

In the clinic today, repair strategies (microfracture, mosaicplasty etc...) mostly lead to the formation of fibrocartilage and have limited success, focusing on long-term repair limited to small lesions, and can reveal *subchondral bone* abnormality [4-8]. To overcome these clinical drawbacks, osteochondral tissue engineering approaches using multi-layered materials for the bone-cartilage unit regeneration (subchondral bone together with articular cartilage) have recently emerged [7,50-55]. In this work, we focussed on subchondral bone and cartilage regeneration and developed an implant composed of two compartments: one for *subchondral bone*, and the other for *articular cartilage* regeneration.

To mimic the physiological cues of the bone-cartilage unit, we have used

- (i) a nanofibrous polymeric membrane equipped with nanoreservoirs of BMP-7 for the *subchondral bone* regeneration (Compartment 1)
- (ii) Hyaluronic acid/alginate hydrogel for the articular cartilage repair (Compartment 2) seeded with hybrid *microtissues* (human MSCs combined with human chondrocytes), mimicking the *endochondral* differentiation development. With the compartment 1, we achieved the *subchondral bone* regeneration. We have confirmed that the presence of BMP-7 nanoreservoirs in this compartment (PCL membrane) is a good tool for *subchondral bone* repair. With the compartment 2, we achieved cartilage repair with less hypertrophy of the engineered cartilage.

Material and Methods

Bioactive PCL nanofibrous membrane design

PCL nanofibrous membranes (50 μm thick) were obtained by the electrospinning method as described previously [14,15]. Addition of BMP-7 nanoreservoirs (CHI/BMP-7)6 on the nanofibers was performed by the Layer-by-Layer (LbL) technology [37]. For that, the PCL membrane was dipped successively (6 times during 15 min) in alternate solutions of Chitosan (CHI) (Protasan UP CL 113; Novamatrix, Sandvika, Norway; 500 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and BMP-7 (Euromedex, Souffelweyersheim, France; 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) prepared in MES buffer (2-N-morpholino ethane sulfonic acid; Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA; 0.04 M, NaCl 0.15 M) at pH 5.5. Each bath was followed by a rinsing step in a solution of MES buffer (0.04 M, NaCl 0.15 M).

Cell culture

Human *mesenchymal stem cells* (hMSCs) and human *chondrocytes* (hCHs) (PromoCell, Heidelberg, Germany) were cultured in a proliferation medium (Promocell, Heidelberg, Germany) complemented with supplement mix serum (Promocell, Heidelberg, Germany), 50 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ of penicillin and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of streptomycin. The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . When cells reached sub-confluence, they were harvested with trypsin and sub-cultured to form *microtissues* (MTs). To form hMSCs MTs, 3 000 hMSCs were cultured in each droplet in suspension of 40 μL of medium in 3D culture plate system (GravityPLUS™ 3D Culture, InSphero AG, Zurich, Switzerland) during 5 days. To form hybrid MTs, 1000 hCHs and 2000 hMSCs were cultured in a droplet. The same number of formed MTs was then seeded in each nanofibrous PCL membrane (24 MTs. cm^{-2}) or in alginate/HA hydrogel.

Culture in alginate/HA hydrogel

Microtissues (MTs) were suspended in a solution of alginate (Sigma Aldrich) (12 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and hyaluronic acid (HA) (Lifecore Biomedical, Chaska, USA) (3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). The alginate/HA solution was then polymerized with a solution of CaCl_2 (Sigma Aldrich) at 102mM, during 15min at 37 °C. The *microtissues* embedded in alginate/ HA were then cultured in medium complemented with 1mM of CaCl_2 .

Microtissues differentiation

After seeding on PCL nanofibrous membrane functionalized (F) or not (NF) with BMP-7 nanoreservoirs, hMSCs MTs were cultured during 28 days in osteogenic medium consisting in Alpha-MEM complemented with L-glutamine (2mM), SVF (10%), fungizone (250 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), penicilline-streptomycine (10 μmL^{-1}), ascorbic acid (60 μm), β -glycerophosphate (10mM) and dexamethasone (10nM). After seeding in alginate/HA hydrogel, hybrid MTs were cultured during 28 days in hMSCs proliferation medium (Promocell, Heidelberg, Germany), and hMSCs MTs were cultured during 28 days in chondrogenic medium consisting in Alpha-MEM complemented with L-glutamine (2mM), SVF (10%), fungizone (250 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), penicilline-streptomycine (10 μmL^{-1}), L-Proline (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), dexamethasone (10nM) and ascorbic acid (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Indirect Immunofluorescence

Samples were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and were then treated with a solution of 0.1% Triton and 1% BSA for saturation and permeabilisation. Primary antibodies were then added during 2 hours at room temperature at the 1/200 concentration. Primary antibodies used were: rabbit anti-Runx2 (Sigma Aldrich), mouse anti-Osteocalcin (Ocn) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit anti-BspII Sigma Aldrich). After rinses with PBS, 488 Alexa Fluor anti-rabbit or anti-mouse (Molecular Probes; Life Technologies, Fisher Scientific, Illkirch, France) (1/200) were added during 1 hour at room temperature. PBS rinses were made and phalloidin (Molecular Probes; Life Technologies) (1/200) was added during 20min at room temperature. A DAPI (Sigma-Aldrich) solution (200nM) was then added to the sample to observe cell nuclei. After mounting with Dako® (Dako, Courtaboeuf, France), the samples were observed

with an epifluorescent microscope (Leica DM 4000B).

Alamar Blue® test

To analyse the metabolic activity of hMSCs MTs, the Alamar Blue® test (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used. For that, the cells were cultivated during 4 hours in a solution of 10% (v/v) Alamar Blue® in a complete medium without phenol red. Duplicates of each culture medium well were then analysed with a spectrometer (FC Multiskan) at the 570 and 595 nm wavelengths. For each test, n=3. The p value was determined by a t-paired test.

Quantitative RT-PCR

For the MTs grown in the alginate/HA-polymerized hydrogel, samples were first dissolved in a solution of citrate (55mM), NaCl (0,15 M) and EDTA (30mM). The total RNA was extracted from the MTs with the high pure RNA Isolation Kit (Roche). The RetroTRanscription was performed with the iScript™ reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The Real-time PCR reaction were then carried out using the iTaq™ Universal SYBR® green super mix (Bio-Rad) and the CFX cyclor system (Bio-Rad) with the following cycle condition: an initial denaturation step of 95 °C for 2 min was performed, followed by 39 cycles of denaturation at 95 °C for 5 seconds, annealing at 60 °C during 30 seconds and extension at 65 °C for 5 seconds. For each test, n=3. Statistical significance was determined by a t paired test (Table 1).

Table 1: The primers used.

Target gene	Forward	Reverse
ACTIN B	5'-GATGAGATTGGCATG-GCTTT-3'	5'-CACCTTCACCGTTC-CAGTTT-3'
RUNX2	5'-CCAACCCACGAATGCAC-TATC-3'	5'-TAGTGAGTGGTGGCGGA-CATAC-3'

In vivo experimentation

Animals and tissues: All procedures were designed in compliance with the recommendations of the European Union (2010/63/EU) for the care and use of laboratory animals. Ethics statement: Experiments followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU), and were performed according to authorized investigator Dr. N. Jessel (Director of the "Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine" Team), holder of a personal license from "Prefecture du Bas-Rhin" (No. 67-315), who oversaw experiments done on mice. All experiments were done in the "Animalerie Centrale de la Faculte de Medecine de Strasbourg" with the approval number: A 67-482-35 from the Veterinary Public Health Service of the "Prefecture du Bas-Rhin", representing the French Ministry of Agriculture, Department of Veterinary Science. For further tissues implantations, all surgery was performed under Ketamine and Xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering. Nude male mice (CTR: NIH-Foxn1nu, Charles River, France), 6 weeks of age, were anesthetized with intra-peritoneal injection of 100 mg.kg⁻¹ of ketamine (VIRBAC Sante Animale, Centravet) and 10 mg.kg⁻¹

of Xylazine (Rompun® 2%, Centravet). The nano structured bioactive implant was implanted behind the ears of mice, between skin and muscles. After 90 days, the animals were sacrificed with an intra-peritoneal injection of lethal dose of ketamine, to examine the explant by histological staining.

Histological staining of glycosaminoglycans

Samples of alginate hydrogel were first fixed with a solution of 4% para formaldehyde (PFA) containing 100mM of cacodylatetrihydrate and 10mM of CaCl₂. Samples were then embedded in paraffin for serial sections of 7 µm. For Safranin O/ Fast green staining, the samples were rinsed with PBS and dipped in a solution of Fast green (0,02% m/v), acetic acid (1% m/v) and finally Safranin O (0,1% m/v). For Alcian Blue staining, the samples were rinsed with distilled water and a solution of 2% (m/v) Alcian Blue (Sigma-Aldrich) at pH 4.2 was added during 2 hours at room temperature. Samples were then rinsed with distilled water, dehydrated and mounted with Histolaque LMR® (Labo Moderne, France) to be observed with bright field microscope (Leica DM 4000B).

Results and Discussion

PCL membrane equipped with BMP-7 nanoreservoirs for subchondral bone repair (compartment 1)

In bone regenerative medicine field, bioactive biomaterials mimicking the extracellular matrix have been developed [56,57]. As examples, Medtronic offers InductOs®, which is a basic collagen matrix (of animal origin) soaked in osteogenic growth factor BMP-2 (12mg), and Stryker® offers the same collagen membrane soaked in BMP-7 [58,59]. Despite their application in clinic, the release of these active molecules from these materials is passive and not controlled. Recently, we have developed a nano reservoirs technology, on synthetic or natural membranes [14,15,33,35,36] with active cell contact dependent release. The advantage of this technology resides in the fact that this material generates an active release of molecules dependent on the cells' adhesion on the nano reservoirs and their cell-dependent degradation [14], leading to an increase of growth factor bioavailability after implantation. For *bone tissue* repair, we have previously shown that BMP-7 nano reservoirs on collagen membrane (Bio Gide® from Geistlich) were able to increase mineralization of human osteoblasts and *mesenchymal stem cells* (hMSCs), seeded as single cells or as *microtissues* (MTs) [35,36]. The replacement of this natural material (of animal origin) by a synthetic polymer, can be a key to avoid inflammatory response and rejection *in vivo*. For that purpose, we developed electro spun nano fibrous membranes based on the poly (ε-caprolactone) (PCL), which is an FDA approved polymer [14,15]. This material, when equipped with nano reservoirs of BMP-2, can increase the speed of bone marker expression *in vitro* after 14 days and *in vivo* [14,15]. As a strategy to enhance *subchondral bone* regeneration efficiency *in vivo*, we used BMP-7 functionalized (F) nanofibrous PCL membrane and human *mesenchymal stem cells*. To confirm the osteogenic differentiation of hMSCs MTs on functionalized (F) PCL membrane, these hMSCs MTs were cultured in osteogenic medium during 28 days (Figure 1). The PCL (F) membrane was

biocompatible with hMSC MTs, as the cells metabolic activity increased all along the culture (Figure 1A). In the literature, it is reported that BMP-7 acts as an attenuator of cell cycling during early osteogenic differentiation of hMSCs [60] and our results are in accordance with previous observations [35,36]. After 14 days, hss MTs were able to express bone specific markers (*Runx2*, *Ocn*, *BspII*) on the (NF) and (F) PCL membrane (Figure 1B). *Runx2*, a transcription factor induced when *mesenchymal cells* are in the bone differentiation way was expressed in the two conditions (F, NF). Interestingly, *Runx2* and Osteocalcin (*Ocn*) seem to be more important in the presence of the nanoreservoirs (NRs) (Figure 1B). These results were in accordance with expected results as we previously showed the osteogenic differentiation of hMSCs as single cells with BMP-7 NRs [36], or as MTs [35]. As collagen represented a good tool for hMSCs MTs differentiation [35], the PCL electro spun nano fibrous membrane equipped with BMP-7 nano reservoirs can represent a good support for these cells and for bone regeneration *in vivo*. With this strategy, we can overcome the current approaches used in the clinic today (Stryker collagen soaked in BMP-7) for bone repair, leading to overdosing due to the massive and passive release of BMP-7, inducing adverse side effects.

Hybrid MTs in alginate/HA hydrogel for cartilage regeneration with tuned hypertrophy (Compartment 2)

To engineer cartilage on the bone surface functionalized support (compartment 1), we used Alginate/HA hydrogel seeded with *stem cells* to mimic the articular cartilage compartment. First, hMSCs in well-organized MTs were used to mimic the condensation during the *endochondral* differentiation way during *embryonic* development [46-49]. Already used in the cartilage-engineering field, MSCs cultured in a 3D configuration (micromass, pellet) show increased chondrogenic differentiation compared to MSCs single cells [44,45]. Moreover, it was shown that co-culture of MSCs with chondrocytes induces a chondrogenic differentiation of MSCs with less hypertrophic markers [61-64]. On the other hand, single cells and 2D culture systems can dedifferentiate chondrocytes via fibroblastic phenotype [65,66]. Rather than performing culture with growth factors, culture modes with cellular interactions have been shown to generate more physiological cues and doses. The paracrine signal between chondrocytes and MSCs is dependent on the distance between cells and an excessive distance blocks their interaction [67].

In this work we chose to increase these cell-cell interactions by using a co-culture of two kinds of cells (hMSCs and hCHs) in *microtissues* (MTs). Having shown that hMSCs MTs in HA/hydrogel can represent a good tool for chondrogenic differentiation, the next step was to analyse the effect of hCHs on hMSCs in MTs (Figure 2). For that purpose, hybrid MTs (hMSCs/hCHs) were cultured in alginate/HA hydrogel during 28 days in non chondrogenic medium (MSC proliferation medium). The glycosaminoglycans (GAGs) expression and the hypertrophic marker *Runx2* were then evaluated in the MTs (Figure 2B & 2C). We first observed the chondrogenic differentiation of these hybrid MTs by staining

specific GAGs (Figure 2B). QRT-PCR was then used to compare the expression of *RUNX2* in hybrid MTs and in hMSCs MTs, and revealed a significant decrease in *RUNX2* in the MTs containing hCHs (hybrid MTs) (Figure 2C). The use of hCHs in combination with hMSCs in MTs allows inducing a less hypertrophic phenotype. Alginate polymeric material was already shown as beneficial for cartilage engineering and repair, and has been used for the transplantation of cells in several clinical trials [11,68,69]. Indeed, this unmodified hydrogel, which has attractive properties such as immobilization of cells, can also benefit to the chondrogenic differentiation because it does not promote mammalian cell attachment and proliferation [70,71]. Using alginate hydrogel to mimic the natural environment of articular cartilage, associated with co-cultured hMSCs/hCHs in a tridimensional well organized conformation (hybrid MTs), is a good strategy to regenerate articular cartilage tissue with less hypertrophy.

Nano functionalized compartmented implant design (compartment 1+ compartment 2)

A majority of articular cartilage defects reach the *subchondral bone* and articular cartilage repair is done on frangible *subchondral bone* [4-8]. To increase the efficiency of cartilage repair we have used, not only an alginate hydrogel (compartment 2) seeded with hybrid MTs for cartilage repair, but also a functionalized membrane (compartment 1) for *subchondral bone* regeneration. By using this innovative strategy, our proposed therapeutic medical device associates two compartments in order to reproduce the bone-cartilage unit (Figure 3A).

For the design of the compartment 2, we have used alginate hydrogel seeded with hybrid MTs (hMSCs and Chondrocytes: hCHs). Autologous chondrocytes are used in conventional cell-based therapy, but these techniques are associated with several limitations such as the number of cells available and dedifferentiation in 2D culture [8,42,43]. By associating hCHs and hMSCs in MTs without the need of chondrogenic medium, we were able to produce chondrogenic MTs, and to prevent their hypertrophy (Figure 2). We assume that by associating hybrid MTs, alginate/HA hydrogel and a membrane equipped with BMP-7 nanoreservoirs, as a new advanced therapeutic medicinal device, we could regenerate first a robust *subchondral bone*, itself sustaining stable articular cartilage regeneration on its surface.

To demonstrate the behavior of these hybrid MTs *in vivo* on the membrane (F), we subcutaneously implanted our nanostructured therapeutic medical device (Figure 3A & 3B). After 90 days, implants were retrieved and cartilage specific staining (GAGs) of the samples was performed (Figure 3C). The two compartments of the implant were visible after 90 days *in vivo*, showing the bone part of the implant in green (Safranin O/ Fast green) (compartment 1) and the GAGs functional compartment visible in blue (Alcian Blue) or in red (Safranin O/ Fast green) (compartment 2) (Figure 3C). During implantation time, these two compartments were vascularized and cells coming from the *microtissues* migrated all along the alginate structure and membrane, showing viability of these associated structures (Figure 3C).

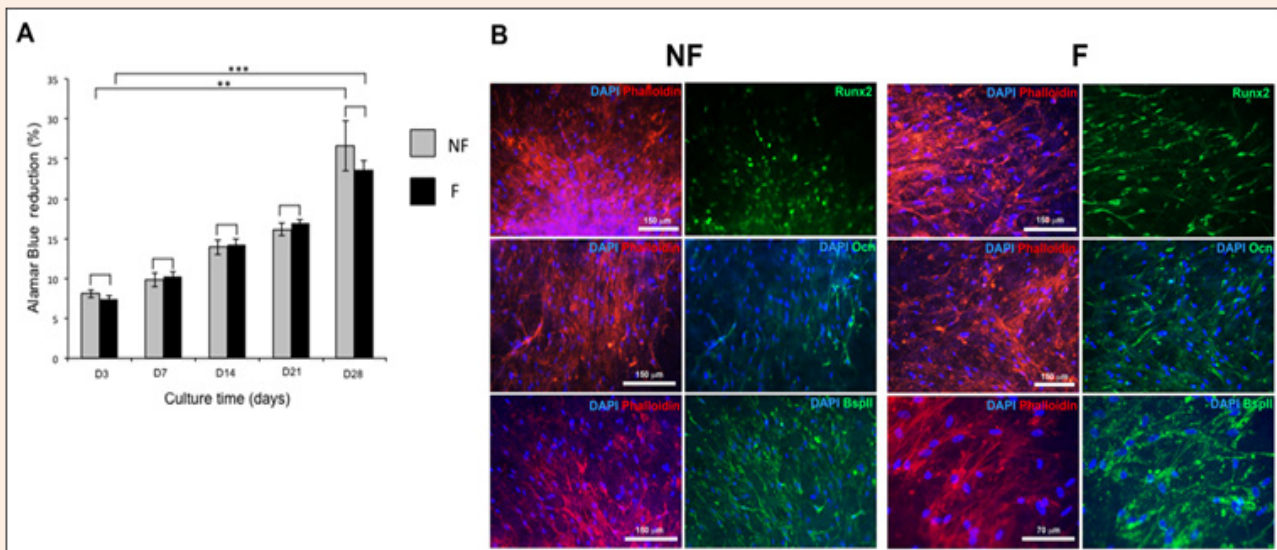


Figure 1: Osteogenic behaviour of hMSCs MTs on nanofibrous PCL equipped with (CHI-BMP-7) nanoreservoirs (compartment 1).
(A) Metabolic activity was measured by an Alamar Blue® test after 3, 7, 14, 21 and 28 days. n=3. All values are expressed as mean +/- SEM. Differences were considered significant at 95% confidence level (*** $P < 0.01$ = extremely significant; ** $P < 0.05$ = very significant, * $P < 0.1$ = significant). No significant differences were observed between cells growing on functionalized (F) and not functionalized (NF) nanofibrous membrane (t paired test).
(B) Expression of proteins specific to the bone tissue for hMSCs MTs growing on functionalized (F) and not functionalized (NF) nanofibrous PCL membrane after 14 days *in vitro*. *Runx2*, *Ocn* (Osteocalcin) and *BspII* (Bone sialoprotein II) were visible in green after indirect immunofluorescence. The nuclei were stained in blue with DAPI and actin in red with phalloidin.

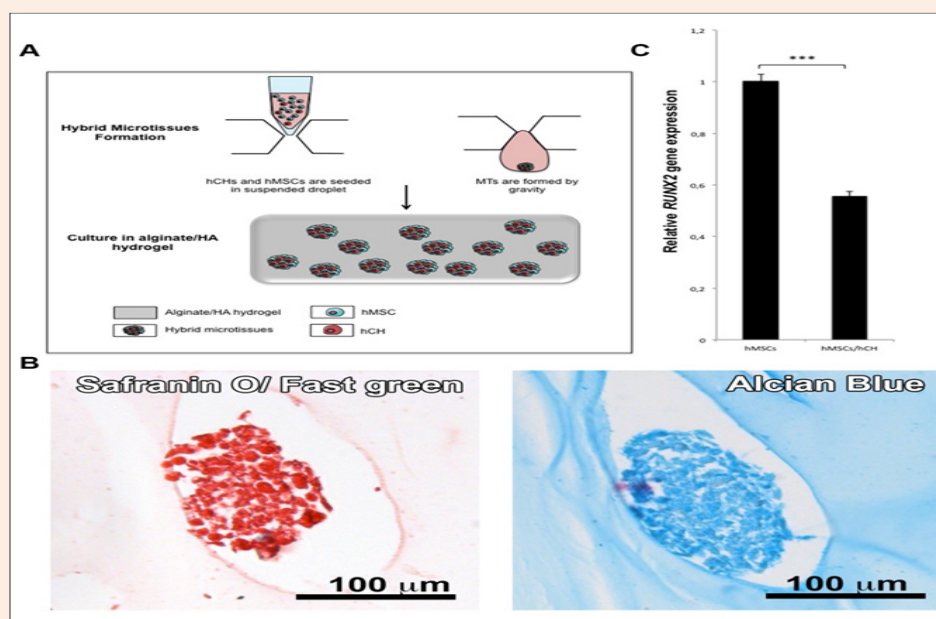


Figure 2: Chondrogenic behaviour and hypertrophy evaluation of hybrid MTs in alginate/HA hydrogel (compartment 2).
(A) Hybrid MTs were formed by culturing hChs and hMSCs in droplet suspension in a non-chondrogenic medium. After 5 days, hybrid MTs were embedded in alginate/HA hydrogel during 28 days without chondrogenic medium.
(B) Histological staining of hybrid MTs specific to glycosaminoglycans visible in blue (Alcian Blue) and in red (Safranin O/ Fast Green).
(C) Relative expression of the hypertrophic marker *RUNX2* for hybrid MTs compared to hMSCs MTs in chondrogenic medium after 28 days. *RUNX2* is significantly decreased in the hybrid MTs compared to the hMSCs MTs. n=3. All values are expressed as mean +/- SEM. Differences were considered significant at 95% confidence level (*** $P < 0.01$ = extremely significant; ** $P < 0.05$ = very significant, * $P < 0.1$ = significant), (t test).

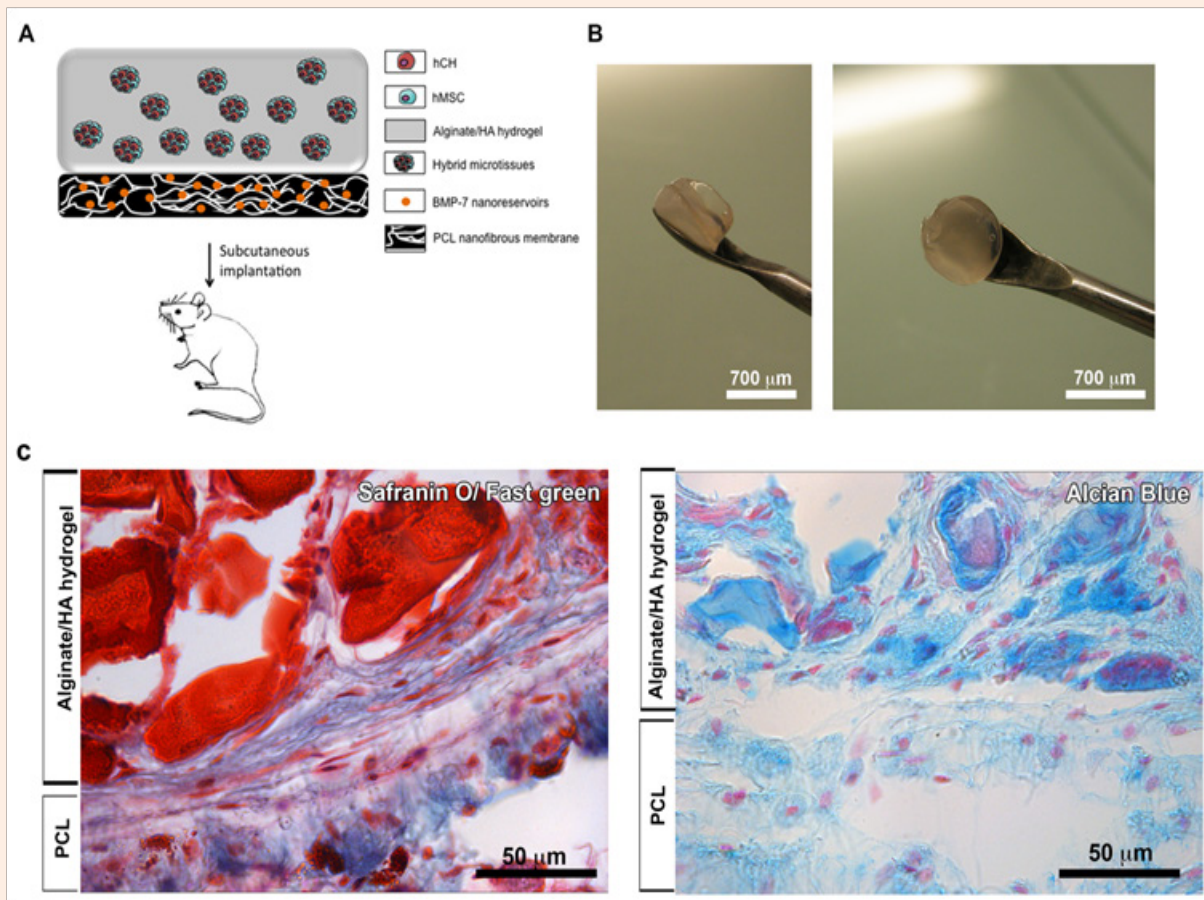


Figure 3: Nanostructured bioactive implant design (compartment 1 and compartment 2 association) for tuned cartilage hypertrophy. (A,B) The nanofibrous PCL membrane equipped with BMP-7 nanoreservoirs (compartment 1) was associated with the alginate/HA hydrogel containing hybrid MTs (compartment 2) and the system was implanted subcutaneously during 90 days in nude mice. (C) Safranin O/Fast green and Alcian Blue histological staining showing glycosaminoglycans in red and blue (respectively) in the Alginate/HA compartment compared to the (CHI-BMP-7), PCL part of the implant.

Conclusion

In this manuscript, we used not only a nano fibrous electrospun membrane fortified with active nano reservoirs of therapeutics (BMP-7) for *subchondral bone* repair (compartment 1) but also an appropriate 3D environment for *mesenchymal stem cells* based on an hydrogel and microtissues for cartilage regeneration with less hypertrophy. These hMSCs were co-cultured with human chondrocytes (hCHs) as inductors in *microtissues* and placed in some alginate/HA hydrogel (compartment 2). Based on *RUNX2* expression, we show that with this double 3D strategy, we are able to modulate the hypertrophic phenotype of the differentiated cells. We have as well-shown *in vivo subchondral bone* and cartilage regeneration by combining both compartment 1 and 2.

Success of osteochondral defect treatment can be achieved by targeting not only cartilage repair but also robust *subchondral bone*. By associating human *mesenchymal stem cells*/bioactive nano structured material, with alginate hydrogel/3D well-organized

co-cultured hMSCs, we are able to engineer an implant designed for the articular cartilage but also for the *subchondral bone tissue repair*. By using a nano fibrous bioactive PCL membrane, and alginate hydrogel combined with *stem cells* and chondrocytes *microtissues*, we enhance the cell-cell interactions and optimize the micro environment for subsequent cartilage-bone regeneration. Furthermore, with the use of hybrid *microtissues* (hCHs, hMSCs) in double 3D environment (alginate /HA, MT), we were able to modulate the hypertrophy of the cells in the articular cartilage compartment. These results demonstrate a promising approach to develop a nano structured and bioactive implantable medical device in the field osteoarticular regenerative nano medicine. Our proposed advanced therapeutic medicinal device opens a new strategy for cartilage repair combining the double 3D active environment of *stem cells* (Hybrid microtissues in hydrogel) and the nanofibrous active membrane for *subchondral bone* repair. Our innovative technology based on cells *microtissues* and hydrogels, as a double 3D environment, is an adaptable advanced therapeutic

medical device. This technology can be tuned by using different kinds of cells, active drugs and polymers (natural or synthetic) and thereby applied for the regeneration of other tissues such as skin and vasculature.

Acknowledgements

This work was supported by the project Nano OSCAR from the "Agence Nationale de la Recherche", ANR and SATT Conectus. We are indebted to "Faculté de Chirurgie Dentaire" Strasbourg for financial support.

Conflict of Interest

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

References

1. Schwinte P, Keller L, Eap S, Mainard D, Benkirane-Jessel N (2014) Osteoarticular Regenerative Nanomedicine: Advances and Drawbacks in Articular Cartilage Regeneration Implants. *Austin J Nanomed Nanotechnol* 2(4): 1025.
2. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, et al. (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* (391suppl) : S26-S33.
3. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA (2009) The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1(6): 461-468.
4. Falah M, Nierenberg G, Soudry M, Hayden M, Volpin G (2010) Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *Int Orthop* 34(5): 621-630.
5. Panseri S, Russo A, Cunha C, Bondi A, Di Martino A, et al. (2012) Osteochondral tissue engineering approaches for articular cartilage and subchondral bone regeneration. *Knee Surg Sports TraumatolArthrosc* 20(6): 1182-1191.
6. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW (2005) Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 9: 23-32; discussion 23-32.
7. Matsiko A, Levingstone TJ, O'Brien FJ (2013) Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair. *Materials* 6(2): 637-668.
8. Caldwell KL, Wang J (2015) Cell-based articular cartilage repair: the link between development and regeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 23(3): 351-362.
9. Schwintee P, Keller L, Lemoine S, Gottenberg J, Benkirane-Jessel N, et al. (2015) Nano-engineered scaffold for osteoarticular regenerative medicine. *J Nanomed Nanotechnol* 6(1): 258.
10. Frenkel SR, Cesare PED (2004) Scaffolds for articular cartilage repair. *Ann Biomed Eng* 32(1): 26-34.
11. Spiller KL, Maher SA, Lowman AM (2011) Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev* 17(4): 281-299.
12. Madurantakam PA, Cost CP, Simpson DG, Bowlin GL (2009) Science of nanofibrous scaffold fabrication: strategies for next generation tissue-engineering scaffolds. *Nanomedicine (Lond)* 4(2): 193-206.
13. Zhang YZ, Su B, Venugopal J, Ramakrishna S, Lim CT (2007) Biomimetic and bioactive nanofibrous scaffolds from electrospun composite nanofibers. *Int J Nanomedicine* 2(4): 623-638.
14. Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S, Fioretti F, Ladam G (2012) Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 6(1): 483-490.
15. Ferrand A, Eap S, Richert L, Lemoine S, Kalaskar D, et al. (2013) Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol Biosci* 14(1): 45-55.
16. Rossi F, van Griensven M (2014) Polymer functionalization as a powerful tool to improve scaffold performances. *Tissue Eng Part A* 20(15-16): 2043-2051.
17. Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazzon M, Liley M, et al. (2010) The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomater* 6(10): 3824-3846.
18. Wheeldon I, Farhadi A, Bick AG, Jabbari E, Khademhosseini A (2011) Nanoscale tissue engineering: spatial control over cell-materials interactions. *Nanotechnology* 22(21): 212001.
19. Choi JH, Park YW, Park TH, Song EH, Lee HJ, et al. (2012) Fuzzy nanoassembly of polyelectrolyte and layered clay multicomposite toward a reliable gas barrier. *Langmuir* 28(17): 6826-6831.
20. Wang D, Rogach AL, Caruso F (2002) Semiconductor quantum dot-labeled microsphere bioconjugates prepared by stepwise self-assembly. *Nano Lett* 2(8): 857-861.
21. Berth G, Voigt A, Dautzenberg H, Donath E, Mohwald H (2002) Polyelectrolyte complexes and layer-by-layer capsules from chitosan/chitosan sulfate. *Biomacromolecules* 3(3): 579-590.
22. Jessel N, Atalar F, Lavalle P, Mutterer J, Decher G, et al. (2003) Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Advanced Materials* 15(9): 692-695.
23. Hiller J, Mendelsohn JD, Rubner MF (2002) Reversibly erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers. *Nature Materials* 1(1): 59-63.
24. Benkirane-Jessel N, Schwinte P, Falvey P, Darcy R, Haikel Y, et al. (2004) Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Advanced Functional Materials* 14(2): 174-182.
25. Jessel NB, Schwinte P, Donohue R, Lavalle P, Boulmedais F, et al. (2004) Pyridylamino- β -cyclodextrin as a molecular chaperone for lipo polysaccharide embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Adv Funct Mater* 14(10): 963-969.
26. Benkirane-Jessel N, Lavalle P, Hübsch E, et al. (2005) Short-time tuning of the biological activity of functionalized poly electrolyte multilayers. *Adv Funct Mater* 15(4): 648-654.
27. Gangloff SC, Ladam G, Dupray V, Fukase K, Brandenburg K, et al. (2006) Biologically active lipid A antagonist embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture. *Biomaterials* 27(9): 1771-1777.
28. Jessel N, Oulad-Abdelghani M, Meyer F, Lavalle P, Haikel Y, et al. (2006) Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(23): 8618-8621.
29. Dierich A, Le Guen E, Messaddeq N, Stoltz J-F, Netter P, et al. (2007) Bone formation mediated by synergy-acting growth factor

- sembedded in a poly electrolyte multilayer film. *Advanced Materials* 19(5): 693-697.
30. Zhang X, Sharma KK, Boeglin M, Ogier J, Mainard D et al. (2008) Transfection ability and intracellular DNA pathway of nanostructured gene-delivery systems. *Nano Lett* 8(8): 2432-2436.
 31. Lee J, Kotov NA (2009) Notch ligand presenting acellular 3d microenvironments for *ex vivo* human hematopoietic stem-cell culture made by layer-by-layer assembly. *Small* 5(9): 1008-1013.
 32. Shim BS, Podsiadlo P, Lilly DG, Agarwal A, Lee J, et al. (2007) Nanostructured thin films made by dewetting method of layer-by-layer assembly. *Nano Lett* 7(11): 3266-3273.
 33. Eap S, Ferrand A, Schiavi J, Keller L, Kokten T, et al. (2014) Collagen implants equipped with "fish scale"-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine (Lond)* 9(8): 1253-1261.
 34. Facca S, Cortez C, Mendoza-Palomares C, Messadeq N, Dierich A, et al. (2010) Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8): 3406-3411.
 35. Schiavi J, Keller L, Morand DN, De Isla N, Huck O, et al. (2015) Active implant combining human stem cell microtissues and growth factors for bone-regenerative nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)* 10(5): 753-763.
 36. Eap S, Keller L, Schiavi J, Huck O, Jacomine L, et al. (2015) A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int J Nanomedicine* 10:1061-1075.
 37. Decher G (1997) Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multi composites. *Science* 277(5330): 1232-1237.
 38. Magne D, Vinatier C, Julien M, Weiss P, Guicheux J (2005) Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol Med* 11(11): 519-526.
 39. Woods A, Wang G, Beier F (2007) Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J Cell Physiol* 213(1): 1-8.
 40. Beane OS, Darling EM (2012) Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. *Ann Biomed Eng* 40(10): 2079-2097.
 41. Seo S, Na K (2011) Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2011: 80689 -806891.
 42. Von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, et al. (1977) Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267(5611): 531-532.
 43. Benya PD, Padilla SR, Nimni ME (1978) Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 15(4): 1313-1321.
 44. Wolf F, Candrian C, Wendt D, Farhadi J, Heberer M, et al. (2008) Cartilage tissue engineering using pre-aggregated human articular chondrocytes. *Eur Cell Mater* 16: 92-99.
 45. Lehmann M, Martin F, Mannigel K, Kaltschmidt K, Sack U, et al. (2013) Three-dimensional scaffold-free fusion culture: the way to enhance chondrogenesis of *in vitro* propagated human articular chondrocytes. *Eur J Histochem* 57(4): e31.
 46. Frenz DA, Jaikaria NS, Newman SA (1989) The mechanism of precartilaginous mesenchymal condensation: a major role for interaction of the cell surface with the amino-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Dev Biol* 136(1): 97-103.
 47. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS (2000) Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 8(5): 309-334.
 48. Singh P, Schwarzbauer JE (2012) Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis. *J Cell Sci* 125(16): 3703-3712.
 49. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3d complex tissues. *Trends in Biotechnol* 31(2): 108-115.
 50. Nooaeid P, Salih V, Beier JP, Boccaccini AR (2012) Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. *J Cell Mol Med* 16(10): 2247-2270.
 51. Nukavarapu SP, Dorcenus DL (2013) Osteochondral tissue engineering: current strategies and challenges. *Biotechnol Adv* 31(5): 706-721.
 52. Chen J, Chen H, Li P, Diao H, Zhu S, et al. (2011) Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone *in vivo* using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials* 32(21): 4793-4805.
 53. Yan LP, Silva-Correia J, Oliveira MB, Vilela C, Pereira H, et al. (2015) Bilayered silk/silk-nano Cap scaffolds for osteochondral tissue engineering: *in vitro* and *in vivo* assessment of biological performance. *Acta Biomater* 12: 227-241.
 54. Liu M, Yu X, Huang F, Cen S, Zhong G, et al. (2013) Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair. *Orthopedics* 36(11): 868-873.
 55. Steele JA, McCullen SD, Callanan A, Autefage H, Accardi MA, et al. (2014) Combinatorial scaffold morphologies for zonal articular cartilage engineering. *Acta Biomater* 10(5): 2065-2075.
 56. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC (2009) Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog* 25(6): 1539-1560.
 57. Lee SH, Shin H (2007) Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59(4-5): 339-359.
 58. Kanakaris NK, Mallina R, Calori GM, Kontakis G, Giannoudis PV (2009) Use of bone morphogenetic proteins in arthrodesis: clinical results. *Injury* 40(Suppl 3): S62-S66.
 59. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, et al. (2002) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 84-A(12): 2123-2134.
 60. Lavery K, Hawley S, Swain P, Rooney R, Falb D, et al. (2009) New insights into BMP-7 mediated osteoblastic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *Bone* 45(1): 27-41.
 61. Cooke ME, Allon AA, Cheng T, Kuo AC, Kim HT, et al. (2011) Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. *Osteoarthritis Cartilage* 19(10): 1210-1218.
 62. Hubka KM, Dahlin RL, Meretoja VV, Kasper FK, Mikos AG (2014) Enhancing chondrogenic phenotype for cartilage tissue engineering:

- monoculture and coculture of articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev* 20(6): 641-654.
63. Meretoja VV, Dahlin RL, Kasper FK, Mikos AG (2012) Enhanced chondrogenesis in co-cultures with articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 33(27): 6362-6369.
 64. Tsuchiya K, Chen G, Ushida T, Matsuno T, Tateishi T (2004) The effect of coculture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype *in vitro*. *Materials Science and Engineering: C* 24(3): 391-396.
 65. Caron MM, Emans PJ, Coolson MM, Voss L, Surtel DA, et al. (2012) Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage* 20(10): 1170-1178.
 66. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S (1960) The loss of phenotypic traits by differentiated cells *in vitro*, I. dedifferentiation of cartilage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 46(12): 1533-1542.
 67. Lai JH, Kajiyama G, Smith RL, Maloney W, Yang F (2013) Stem cells catalyze cartilage formation by neonatal articular chondrocytes in 3d biomimetic hydrogels. *Sci Rep* 3(3553): 1-9.
 68. Lim F, Sun AM (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210(4472): 908-910.
 69. Atala A, Kim W, Paige KT, Vacanti CA, Retik AB (1994) Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J Urol* 152(2 Pt 2): 641-643.
 70. Pokrywczynska M, Drewa T, Jundzill A, Lysik J (2008) Alginate is not a good material for growth of rapidly proliferating cells. *Transplant Proc* 40(5): 1664-1667.
 71. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ (1999) Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20(1): 45-53.

Chapitre 3

Évaluation de l'efficacité d'un implant thérapeutique biphasique et nano-actif, équipé d'organoïdes de cellules souches mésenchymateuses, pour la régénération ostéoarticulaire dans le modèle de brebis

- ❖ **Pugliano, M.***, Keller, L.*, Pijnenburg, L.*, Bouhout, S.*, Seitlinger, J., Favreau, H., Fioretti, F., Rosset, P., and Benkirane-Jessel, N. Promising osteochondral repair in a large animal study combining nanoactive therapeutics with mesenchymal stem cells organoids. Submitted to **Biofabrication**. * *these authors contributed equally to this work*

3.1. Contexte et objectifs

Le contexte de ce troisième chapitre rejoint celui du chapitre précédent. Durant ce travail, nous avons décidé d'évaluer notre approche d'implant thérapeutique, biphasique et nano-actif, dans une étude préclinique chez le grand animal, au moyen d'outils présents dans le cadre clinique.

Premièrement, l'implant thérapeutique de PCL du chapitre 2 n'ayant pas encore d'autorisation clinique, nous avons ici utilisé un biomatériau collagénique, non seulement approuvé par la FDA, mais également utilisé par les praticiens pour la réparation osseuse de petit calibre. Cet implant collagénique a été fonctionnalisé par notre technologie de nanoréservoirs de facteur de croissance, ici la BMP-2 à la place de la BMP-7 (choix stratégique du sponsor Medtronic), afin d'optimiser la réponse cellulaire au sein de ce compartiment dédié à la régénération de l'os sous-chondral. Comme précédemment, un second compartiment, constitué d'un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, enrichi avec des organoïdes de CSMs autologues, a été ajouté pour régénérer le cartilage articulaire.

Deuxièmement, nous avons testé l'efficacité de notre modèle d'implant thérapeutique biphasique chez l'animal de grande taille, à savoir la brebis, afin de générer des données fiables. En effet, les études menées dans les modèles rongeurs obtiennent généralement des résultats très encourageants, mais qui ne sont que trop rarement reproductibles chez l'Homme. Au contraire, les modèles ovins représentent un choix pertinent pour étudier la régénération du cartilage articulaire, puisqu'ils possèdent des articulations aux caractéristiques comparables à celles de l'Homme. En effet, elles sont pourvues d'une structure fémorale bicondyalaire, avec un ménisque et des ligaments croisés. De plus, elles subissent un stress mécanique équivalent à celui subi par les articulations du genou humain, qui est le site le plus affecté par les lésions ostéochondrales et l'arthrose secondaire [115,116]. Par ailleurs, l'évaluation de notre modèle d'implant thérapeutique, après 6 mois d'implantation chez la brebis, a été réalisée par des procédés couramment employés par les chirurgiens orthopédistes.

3.2. Résultats et discussion

3.2.1. Isolation et confirmation du caractère souche des CSMs dérivées de moelle osseuse de brebis

Afin d'outrepasser les limitations liées à l'utilisation de chondrocytes primaires, celle des CSMs est de plus en plus privilégiée pour les raisons exposées précédemment. Compte tenu de leur diversité, découlant à la fois de leur source et de l'âge du donneur, la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ICST) a défini, en 2005, une liste de critères à vérifier pour valider, de manière uniforme, la caractérisation de ces cellules en vue d'une application clinique [45]. Ainsi, après isolation et expansion *in vitro*, les cellules de moelle osseuse de brebis,ensemencées à faible densité,

ont été capables de générer des colonies fibroblastiques isolées. Leur multipotence a également été validée par leur habilité à se diriger vers les voies de différenciation adipogénique, chondrogénique et ostéogénique. Elles ont, en effet, été capables de produire respectivement, des gouttelettes lipidiques, des glycosaminoglycanes, ainsi que des dépôts calciques, sous des conditions de culture spécifiques à chaque type de différenciation.

Enfin, le phénotype membranaire des cellules a été analysé au moyen d'anticorps dirigés contre des marqueurs membranaires spécifiques (ou « cluster de différenciation », CD) humains, en raison de l'absence d'anticorps dirigés contre des antigènes de brebis disponibles dans le commerce. Alors qu'une réaction positive était attendue concernant le marquage des protéines membranaires CD90, CD105 et CD73, aucune réaction n'a été produite par les CSMs de brebis. Ceci a été expliqué, dans la littérature, par une réaction croisée limitée entre ces anticorps dirigés contre les protéines humaines et ces marqueurs de brebis [117,118]. En revanche, comme attendu, les marqueurs membranaires CD44 (92,1% \pm 1,2) et CD166 (86,9% \pm 2) ont été fortement détectés dans la population cellulaire analysée, tandis que seule une faible proportion a été positive pour le marqueur endothélial CD34 (0,6% \pm 0,3), le marqueur hématopoïétique CD45 (6% \pm 1,7), et le récepteur HLA-DR (locus DR des antigènes de leucocytes humains HLA) du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) (3,8% \pm 0,7). L'ensemble de ces analyses nous a ainsi permis de certifier la compatibilité entre les CSMs, que nous avons extraites et isolées, et une potentielle procédure d'implantation clinique.

3.2.2. Évaluation de la régénération du cartilage articulaire par des approches cliniques pertinentes

Les études cliniques n'étant pas envisageables sans données précliniques, préalablement collectées chez l'animal de grande taille, nous avons effectué l'évaluation de notre modèle sur des défauts de taille critique chez la brebis. Afin de prévenir leur réparation spontanée, des lésions ostéochondrales de 7 mm de diamètre et de 3 mm de profondeur ont été réalisées chez 4 brebis, au niveau des condyles fémoraux médians postérieurs et/ou antérieurs. Ce type de procédure est cliniquement pertinent, et ne peut pas être réalisé dans les modèles rongeurs, en raison des dimensions étroites de leurs articulations, et du faible nombre de couches cellulaires constituant le cartilage articulaire [119]. Dans le but de régénérer efficacement le cartilage, nous avons, comme précédemment, développé un modèle d'implant thérapeutique biphasique. Pour une réparation stable de l'os sous-chondral, un implant collagénique de grade clinique a été fonctionnalisé par des nanoréservoirs de facteur pro-ostéogénique BMP-2 [86,88]. Après implantation de ce dernier, au niveau des défauts expérimentaux créés sur le condyle fémoral médial, un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, ensemencé d'organoïdes de CSMs autologues, a été déposé en surface pour la régénération cartilagineuse.

Tout d'abord, tous les animaux ont montré une bonne tolérance à la chirurgie, et ont survécu à la période de 6 mois d'expérimentation. Aucun signe de synovite, d'épanchement articulaire, ou de fracture, n'a été observé à la suite de l'intervention. Le grade de régénération tissulaire a été déterminé au moyen du système d'évaluation macroscopique développé par la Société Internationale de Réparation du Cartilage (ICRS). Ce grade est notamment défini à partir de trois scores indépendants, comprenant le degré de réparation du cartilage, l'intégration au tissu hôte, ainsi que l'aspect général du tissu cartilagineux néoformé. A la suite des 6 mois d'implantation, un comblement de la lésion de 75 à 100% a été observé chez 4 des 6 échantillons. L'intégration de l'implant, associée à une frontière de démarcation inférieure à 1 mm, a été également observée chez 3 des 6 échantillons. L'évaluation globale de la régénération du cartilage nous a finalement permis de classer trois échantillons dans le grade ICRS 2 (néo-tissu physiologiquement proche du tissu natif), deux échantillons dans le grade ICRS 3 (néo-tissu anormal), et le dernier échantillon dans le grade 4 (néo-tissu sévèrement anormal). Un score ICRS médian de 8 a été déterminé, indiquant que nos implants ont le potentiel de régénérer un néo-tissu physiologiquement proche du cartilage articulaire normal. Par ailleurs, il convient de noter que la chirurgie a été effectuée au niveau des sites articulaires antérieurs ou postérieurs des brebis, et qu'aucune différence significative n'a été notée entre ces deux zones anatomiques.

Afin de poursuivre cette évaluation au moyen de techniques cliniques non-invasives, pertinentes et reproductibles, des analyses d'imagerie par résonance magnétique (IRM) ont été effectuées à différents temps de suivi post-opératoire : le jour même de l'intervention (D0), puis après 3 (3M) et 6 mois (6M). Retrouvé de manière récurrente dans un contexte de chirurgie ostéoarticulaire [120], un signal hyper-intense de type œdème a été révélé au niveau sous-chondral. Ce signal hyper-intense, concordant avec une inflammation tissulaire initiale inévitable, induite par la procédure chirurgicale traumatique, a été visible jusqu'à 3 mois post-opératoire, puis a considérablement diminué au bout de 6 mois d'évaluation. Les tissus soumis à un processus de guérison passent d'un signal hyper-intense à un signal hypo-intense en raison du remplacement du tissu inflammatoire par du tissu fibreux [121]. Il est à noter que l'intensité du signal, dans les acquisitions obtenues par IRM, sert de marqueur de guérison et de maturation tissulaire. Plusieurs auteurs rapportent que l'échec d'une chirurgie régénérative articulaire peut être suspecté si ce signal hyper-intense n'a pas diminué après un an [122,123]. De plus, les essais cliniques impliquant l'implantation de chondrocytes autologues, ont montré que l'évolution du signal hyper-intense vers un signal hypo-intense, a lieu au cours de la deuxième année suivant l'implantation, et se stabilise ensuite durant 5 ans. Notre période d'implantation a été trop courte pour permettre d'observer la disparition totale du signal hyper-intense sous-chondral. Elle nous a toutefois permis d'observer une amélioration conséquente, puisque l'intensité du signal a diminué de manière importante entre les acquisitions par IRM de 3 et 6 mois post-opératoire.

Par ailleurs, les analyses macroscopiques et par IRM n'ont pas révélé de décollement, ni de déplacement du greffon, démontrant ainsi sa bonne intégration au tissu hôte environnant. Nos acquisitions par IRM réalisées de manière longitudinale ayant démontré une maturation en tissu fibreux, nous avons examiné plus précisément la qualité de la régénération tissulaire, 6 mois après implantation, par microtomographie à rayons X assistée par ordinateur (micro-CT). Ces analyses ont notamment révélé une petite invagination, ainsi qu'une surface irrégulière de la partie minérale de l'implant dans toutes les conditions. Les projections en 2D ont cependant montré une condensation osseuse proche de la surface articulaire, suggérant que le volume de tissu fibreux initial a diminué en faveur d'une augmentation du volume de tissu minéral.

3.2.3. Évaluation de la régénération cartilagineuse à travers le dépôt de glycosaminoglycanes sulfatés

Les résultats histologiques permettant d'évaluer la qualité du cartilage néoformé sont difficiles à obtenir dans les essais cliniques, puisque les biopsies post-opératoires affecteraient inévitablement l'articulation traitée. Dans notre cas, nous avons pu réaliser ces analyses histologiques, qui ont notamment révélé un compartiment hydrogel, dédié à la restauration du cartilage, parfaitement ajusté au compartiment fibreux sous-jacent, dédié à la régénération de l'os sous-chondral. La présence cellulaire a pu être observée au sein des deux compartiments de la construction implantée, ainsi qu'à leur jonction, ce qui est essentiel à l'uniformité du remodelage tissulaire. Certaines discontinuités, de moins de 40 μm , ont été observées, mais nous postulons que la régénération totale du tissu serait justement permise par la présence de cellules dans ces zones spécifiques. Par ailleurs, après coloration avec la safranine-O couplée au Fast-Green, la partie superficielle du site d'implantation a révélé la présence de GAGs sulfatés, caractéristique d'une matrice cartilagineuse, ainsi que celle de chondrocytes au sein de chondroplastes organisés en gradient. Somme toute, ces résultats indiquent que notre implant thérapeutique a été capable de stimuler la régénération de cartilage hyalin, dont l'épaisseur a d'ailleurs été 2,7 fois plus importante comparativement à celle du tissu formé au sein des lésions non traitées.

3.3. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude pilote, révèle la capacité et l'efficacité de notre implant thérapeutique, biphasique et nano-actif, à régénérer de manière simultanée les deux tissus formant l'unité ostéochondrale, dans un modèle ovin de lésions critiques en site intra-articulaire. Notre stratégie innovante est basée sur l'utilisation d'un hydrogel incorporant des organoïdes de CSMs dérivées de la moelle osseuse autologue, pour la régénération du cartilage articulaire, et recouvrant un biomatériau collagénique, optimisé par des nanoréservoirs de facteurs de

croissance ostéogéniques BMP-2, pour la régénération de l'os sous-chondral. Nos analyses ont démontré la faisabilité de notre stratégie d'implant à double-compartiment, et l'efficacité de cette construction thérapeutique implantable. Celles-ci ont d'ailleurs été réalisées pendant une durée appréciable, et au moyen de procédés utilisés en clinique, des points forts confortant la fiabilité des données générées.

Ainsi, cette étude préclinique effectuée chez l'animal de grande taille, suggère un impact prometteur sur le traitement des lésions ostéochondrales chez l'Homme, compte tenu de l'analogie étroite entre les articulations humaines et les articulations de brebis. Enfin, du point de vue réglementaire, notre implant thérapeutique biphasique et nano-actif correspond à un médicament combiné de thérapie innovante, dont la composition pourrait être adaptée à d'autres stratégies de régénération tissulaire.

Promising osteochondral repair in a large animal study combining nanoactive therapeutics with mesenchymal stem cells organoids

Laetitia Keller^{1,2*}, Marion Pugliano^{1,2*}, Luc Pijnenburg^{1,3*}, Sara Bouhout^{1,2*}, Joseph Seitlinger^{1,5}, Henri Favreau^{1,4}, Florence Fioretti^{1,2}, Phillippe Rosset⁶, Nadia Benkirane-Jessel^{1,2}

¹*INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), FMTS, 67000 Strasbourg.*

²*Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.*

³ *Hôpitaux universitaires de Strasbourg (HUS), Hôpital de Hautepierre, Service de rhumatologie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.*

⁴ *Hôpitaux universitaires de Strasbourg (HUS), Hôpital de Hautepierre, Service de chirurgie orthopédique et de traumatologie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.*

⁵ *Hôpitaux universitaires de Strasbourg (HUS), Nouvel Hôpital Civil, Service de chirurgie thoracique, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.*

⁶ *CHRU de Tours, Service de Chirurgie Orthopédique 2, Faculté de Médecine de Tours, Université François Rabelais, Tours, France.*

**Contributed equally to this work.*

ABSTRACT

Functional articular cartilage regeneration remains challenging, and yet seems essential to restore osteochondral defects and prevent secondary osteoarthritis. By combining cells with bioresorbable biomaterials and bioactive molecules, we developed a living hybrid implant targeting articular cartilage and subchondral bone repair aiming to treat osteochondral lesions over the long-term. Composed of a bone morphogenetic protein 2 nanoactive collagen part, associated with a hydrogel part containing autologous bone marrow mesenchymal stem cells organoids, this biphasic implant was evaluated in a sheep model after 6 months of implantation, in osteochondral defects of the femoral condyles (n=6). We first isolated and characterised mesenchymal stem cells *in vitro*, and then analysed their osteochondral regenerative potential when associated to our functionalised biomaterial *in vivo*. We performed a macroscopic grading score of the osteochondral lesions, a longitudinal magnetic

1
2
3 resonance imaging follow-up, X-ray microtomography and histology studies, to evaluate the
4 feasibility of our strategy. After 6 months of implantation, we observed a median grade II
5 repair score (nearly normal) according to ICRS macroscopic score. Structural analysis
6 revealed that osteochondral tissue repair occurred with a hyaline-like cartilage formation. Our
7 findings demonstrate the positive impact of this active hybrid implant to meet the need in the
8 regenerative field.
9
10
11
12
13

14 15 **Key Words**

16 Bone marrow mesenchymal stem cells; spheroidal organoids; cartilage regeneration;
17 subchondral bone regeneration; sheep model; hybrid active implant
18
19
20
21

22 **1. Introduction**

23 Articular cartilage restoration remains challenging due to the limited physiological repair
24 potential of osteochondral tissue, as noticed earlier by the anatomist William Hunter [1].
25 Although current therapies have demonstrated some promising short term results, they all
26 imply limitations, such as the need for precious autologous cartilage tissue, and fibrocartilage
27 tissue formation responsible for unsustainable long term repair. Therefore, regenerative
28 medicine is based on the development of a new generation of sophisticated biomaterials [2-6].
29 Marrow stimulation by microfractures allows a complete filling of osteochondral defects.
30 However, compared to a native osteochondral unit, this neotissue is characterised by
31 fibrocartilaginous profile, responsible for deficient mechanical and watertight properties [7],
32 leading to a rapid constitution of osteoarthritis in the affected joint [8]. Using xenogeneic
33 scaffolds (Chondro-Gide®, CaReS®, Novocart® 3D) as a template for cell colonisation,
34 matrix-assisted autologous chondrocyte implantation (MACI) is another technique for
35 cartilage repair [9-11]. Nevertheless, fibrocartilaginous deposition by autologous
36 chondrocytes still occurs, with the same negative outcome on long-term repair.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 These last years, a plethora of new strategies are being developed, aiming to offer
49 promising alternatives to current treatments. With the advances of third generation
50 biomaterials [12], it appeared that combinations of synthetic or natural materials, with active
51 molecules and living cells, constitute an efficient approach to maximise tissue regeneration.
52 Functionalised scaffolds have already been developed for bone regeneration in fracture sites,
53 such as the collagen matrix soaked with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) produced by
54 InductOs® implant (Medtronic). However, in this existing therapeutic device, passive burst-
55 release of bioactive factors takes place, which is far from physiological regulation and leads
56
57
58
59
60

1
2
3 to post-implantation adverse effects [13, 14]. These adverse effects could be reduced by using
4 a more sustained delivery system, such as the nanocontainers technology that our group
5 developed, leading to cell-contact dependent release of growth factors [15, 16], and has
6 shown potential to enhance bone regeneration in combination with human mesenchymal stem
7 cells (MSCs) [17, 18]. Indeed, expanding knowledge on MSCs potential has spurred new
8 experimental routes, dismissing the need for autologous chondrocytes that necessarily imply
9 the impairment of a healthy cartilage site [19-23]. Through their capacity to differentiate via
10 the osteogenic and chondrogenic ways, in addition to their immunomodulating competences
11 and self-renewal abilities, bone marrow derived MSCs appear as suitable alternative for bone
12 and cartilage regeneration [24-27]. Moreover, it was recently raised that offering an initial 3D
13 conformation to MSCs (high-density micromass, pellet-culture, microtissues, etc.) also
14 improves their chondrogenic and osteogenic differentiation process [28-30].

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24 Hyaline articular cartilage and subchondral bone form together a functional unit. It has
25 to be noted that subchondral bone plays a central role in osteochondral homeostasis of the
26 joint, by absorbing mechanical shocks and providing nutritive elements that diffuse to the
27 chondral tissue. Therefore, to increase long term-stability of the newly regenerated tissue in
28 focal cartilage defects (less than 5 cm²) and prevent occurrence of secondary osteoarthritis,
29 we elaborated a bicompartimented implant targeting the restoration of both layers of
30 osteochondral tissue. Composed of an active BMP-2-containing collagen membrane for the
31 subchondral bone regeneration and a living hydrogel enriched with MSCs organoids for the
32 articular cartilage development, our graft design is more sophisticated than current
33 therapeutics applied in clinic [9-11, 31]. We previously showed that this strategy promoted *in*
34 *vitro* formation of the cellular and extracellular matrix components gradients of the
35 osteochondral unit [32-34]. The aim of this work was to validate our regenerative strategy
36 with this advanced therapy medicinal product (ATMP) in a large animal model. We used a
37 collagen membrane already marketed for clinical practice, optimised with BMP-2 and
38 autologous MSCs, to attest the versatility of the implant design and to accelerate the transfer
39 to the clinic. The osteoarticular repair was evaluated 6 months post-implantation by joint
40 magnetic resonance imaging, X-ray micro-computed tomography and macroscopic
41 International Cartilage Repair Society (ICRS) score assessment.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 2. Methods

59 2.1 Animal experimental implantation procedure

60

A total of 4 healthy, skeletally mature sheep (“Ile de France”), aged between 2 and 3 years, were included in this study. The experiments were approved by the legal representative, and performed in accordance with the guidelines of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. For aspiration of 20-30 ml of bone marrow from the iliac crest in heparinised syringe, sheep were anaesthetised by intravenous injection of Xylazine (0.05 mg/kg) and Ketamine (5 mg/Kg). MSCs were then isolated from the total bone marrow through a culture process.

One month after bone marrow aspiration, animals were anaesthetised by intravenous injection of Xylazine (0.05 mg/kg) and Ketamine (5 mg/Kg) and endotracheally intubated with 100% O₂ and 5% isoflurane to maintain anaesthesia. Sheep were placed in dorsal recumbency. Posterior legs were prepared in sterile conditions, and medial femoral condyles were exposed by dislocation of the patella after incision of the patellar tendon. Osteochondral defects (7 mm of diameter by 3 mm of depth) were created in 4 sheep in the posterior part and/or anterior part of the medial femoral condyle using a drill, after which the combined ATMP was applied (**Table 1**). In our procedure (n=6), the first step was to cover the subchondral bone lesion by the BMP-2 active collagen membrane, and the second step was to implement the hydrogel solution containing autologous MSCs organoids, in order to macroscopically fill the defect. Jellification of the hydrogel was then performed by injection of CaCl₂. In the same sheep, lesions were performed and left untreated as control (n=6). The knee joint was repositioned, the patellar tendon was sutured as well as the leg wound, which was sutured layer by layer. The animals received a single post-surgical injection of morphine (10 mg) and were then free to move. After 6 months, euthanasia was performed using lethal dose of sodium pentobarbital by intravenous injection in the jugular vein.

Sheep	Right hind limb anterior condyle	Right hind limb posterior condyle	Left hind limb anterior condyle	Left hind limb posterior condyle
1	untreated defect	untreated defect	untreated defect	untreated defect
2	untreated defect			untreated defect
3	nanoactive implant	nanoactive implant	nanoactive implant	nanoactive implant
4	nanoactive implant		nanoactive implant	

Table 1. Treatments distribution on sheep included in the study. A total of 12 defects were made in the hind limbs of 4 sheep, in order to receive nanoactive implants (n=6 defects) or to remain untreated (n=6 defects).

2.2 Bone marrow MSCs isolation and culture

1
2
3 MSCs harvested from sheep iliac crest were isolated, based on their *in vitro* adherence to
4 plastic. Bone marrow aspirates were first washed by addition of an equal volume of phosphate
5 buffer saline (PBS; Sigma-Aldrich, France) and centrifugation at 220 g during 5 minutes. The
6 cell pellets were then suspended with the proliferation culture Dulbecco's Modified Eagle
7 Medium (DMEM; Lonza, Germany) containing 10% of decomplexed foetal bovine serum
8 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, France), 50 U/mL of penicillin (Lonza, Germany), 50
9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of streptomycin (Lonza, Germany), 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of fungizone (Lonza, Germany), and
10 seeded into 75 cm^2 culture flasks in standard cell culture conditions at 37°C under humidified
11 atmosphere with 5% CO_2 . The following day, medium was discarded and attached cells were
12 gently washed up several times with PBS to remove non-adherent cells. Flasks were then
13 incubated for several days with proliferation medium, replaced every 72 hours to promote
14 emergence of colonies from adherent cells. When cells finally reached sub-confluence, they
15 were sub-cultured until passage 2, when they were expanded for stemness characterisation,
16 then used to form organoids for implantation.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 **2.3 Stemness characterisation: colony-forming unit-fibroblast (CFU-F) assay**

30 CFU-F assays were performed in triplicates ($n=3$) with 2 different ranges of serial dilutions.
31 Cells were cultured in proliferation culture medium at 37°C in humidified atmosphere of 5%
32 CO_2 for 14 days with medium replacement every 72 hours. After 14 days of culture, cells
33 were rinsed with PBS, fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde, and colonies were stained
34 using hematoxylin/eosin (Sigma-Aldrich, France). The number of colonies was counted,
35 representing the number of fibroblastic cells able to form a single colony.
36
37
38
39
40
41
42

43 **2.4 Stemness characterisation: multipotence**

44 The potential of isolated sheep cells to undergo trilineage differentiation was demonstrated *in*
45 *vitro*. For *adipogenic differentiation*, sheep cells were seeded at 21×10^3 cells/ cm^2 and cultured
46 for 3 days with proliferation culture medium. After that, they were induced to differentiate by
47 means of 3 alternate adipogenic induction/maintenance cycles. For each cycle, cells were
48 cultured for 3 days in standard induction medium (Lonza, PT-3004), followed by 3 days of
49 culture in standard maintenance medium (Lonza, PT-3004). After 3 cycles, cells were then
50 cultured for 7 days with maintenance medium, replaced every 72 hours. Negative controls for
51 differentiation were obtained by cultivating sheep MSCs in standard culture medium. After 28
52 days of culture, cells were rinsed with PBS, fixed during 10 minutes at 4°C in 4% (w/v)
53 paraformaldehyde, rinsed with 60% (v/v) isopropanol and finally stained with 0.5% (w/v) Oil
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Red O solution to detect lipid vesicles. For *chondrogenic differentiation*, sheep cells were
4 seeded as a pellet at the density of 25×10^3 cells and cultured in standard chondrogenic
5 medium (Lonza, PT-3925) supplemented with 10 ng/mL of TGF- β 3 growth factor (Peprotech,
6 France). Negative control pellets were also formed and cultured in standard culture medium
7 of proliferation. After 28 days of culture, pellets were rinsed with PBS, fixed during 10
8 minutes at 4°C in 4% (w/v) paraformaldehyde, and embedded in paraffin. Paraffin sections
9 were stained with Alcian Blue solution (Sigma-Aldrich, France) to visualize
10 glycosaminoglycans and with Fast Red solution (Sigma-Aldrich, France) to visualize cells
11 nuclei. For *osteogenic differentiation*, sheep cells were seeded at 21×10^3 cells/cm² and
12 cultured for 3 days with proliferation culture medium. After that, they were cultured in
13 osteogenic standard medium (Lonza, PT-3002). Negative controls for differentiation,
14 consisted in cultivating sheep cells in standard proliferation culture medium. After 21 days of
15 culture, cells were rinsed with PBS, fixed with ice-cold 70% (v/v) ethanol and stained during
16 20 minutes with Alizarin Red solution (40 mM, pH 4.1; Sigma-Aldrich, France) to detect
17 calcium deposits.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 **2.5 Stemness characterisation: flow cytometry**

33
34 For cell surface markers analyses, cells were treated with 0.5% (w/v) bovine serum albumin
35 and double-stained using monoclonal labelled antibodies, including phycoerythrin (PE)-
36 conjugated mouse anti-human CD34 (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France) with
37 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human CD90 (Beckman Coulter,
38 Villepinte, France), PE-conjugated mouse anti-human CD166 (Beckman Coulter, Villepinte,
39 France) with FITC-conjugated mouse anti-human CD45 (Dako, Glostrup, Denmark), PE-
40 conjugated mouse anti-human CD105 (Beckman Coulter, Villepinte, France) with FITC-
41 conjugated mouse anti-human CD44 (Beckman Coulter, Villepinte, France), and PE-
42 conjugated mouse anti-human CD73 (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France) with FITC-
43 conjugated mouse anti-human leukocyte antigen-antigen D related (HLA-DR) (Beckman
44 Coulter, Villepinte, France). Antibodies were used at a dilution of 1:10 (PE CD34, FITC
45 CD90, PE CD166, FITC CD44, PE CD105, FITC HLA-DR and PE CD73) or 1:20 (FITC
46 CD45). Appropriate isotype-matched control antibodies named FITC or PE mouse IgG1
47 (Dako, Glostrup, Denmark) were used in each analysis. Cells were then examined by flow
48 cytometry using a BD LSR II flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose,
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 California). Fluorescence intensity and percentage of antigen positive cells were determined
4 for each surface marker.
5
6
7

8 **2.6 Therapeutic implants preparation**

9
10 For the formation of the BMP-2 active part of the implant, collagen Bio-Gide® (Geistlich
11 Pharma France) membranes were alternately dipped during 15 minutes in solutions of BMP-2
12 (rh-BMP-2, Inductos®, Medtronic, France, 200 µg/ml, in pH 5.5 MES buffer) and chitosan
13 (Chitosan, Protasan UP CL 113, Novamatrix, Sandvika, Norway, 0.5 mg/ml in MES), with a
14 step of MES buffer bath (40 mM of 4-Morpholino-ethane-sulfonic acid, and 150 mM sodium
15 chloride, Sigma-Aldrich, pH=5.5) after each dip. To form nanoreservoirs of BMP-2, this
16 cycle was repeated 12 times. The nanofunctionalised collagen membranes were then stored at
17 4°C in MES buffer until their implantation.
18
19

20
21 The hydrogel part of the implant was produced by dissolution of sodium alginate (12 mg/ml,
22 Sigma-Aldrich) and hyaluronic acid (3 mg/ml, Lifecore Biomedical, Chaska, USA) in sodium
23 chloride (9 mg/ml, Sigma-Aldrich). Autologous MSCs were sub-cultured in suspension using
24 a multi-well culture plate (GravityPLUSTM 3D Culture, InSphero AG, Zurich, Switzerland)
25 to form organoids in proliferation culture medium. After 5 days, they were collected to be
26 suspended in the alginate/hyaluronic acid solution, at a final concentration of 10^7 cells/ml, and
27 aspirated in a syringe under sterile laminar flow to be transported at 37°C until surgical
28 procedure. The hydrogel was applied onto the implanted nanoactive membrane, and then
29 jellified using calcium chloride (102 mM, Sigma-Aldrich).
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **2.7 Magnetic Resonance Imaging (MRI)**

42
43 For a longitudinal analyses of the knee repair, treated joints were examined at three different
44 times after sheep surgery: immediately after the surgery (D0), at 3 months (3M) and 6 months
45 (6M) after implantation. MRI imaging was performed using a 3 Tesla MRI Scanner (Siemens
46 Magnetom Verio®). For that, they were anaesthetised (intravenous injection of Xylazine
47 (0.05 mg/kg) and Ketamine (5 mg/Kg) and placed in dorsal decubitus. The six surgical sites
48 were imaged, in the four sheep (Hans Adriaensen, CIRE Plateform, INRA, Nouzilly, France).
49 Proton density (PD) fat saturation (FS) sagittal sections of the acquisitions were analysed
50 using the Osisrix program. Dark signal represents cortical bone, grey signal spongy bone and
51 bright signal the waterborne protons.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2.8 Macroscopic ICRS scoring

After sheep underwent euthanasia, photographs of the defects (n=6) were taken, and scoring was achieved using three independent cartilage repair assessments based on the macroscopic ICRS score. To calculate the total score, 3 parameters (degree of defect repair, integration of border zone, and macroscopic appearance) were evaluated and scored from 0 to 4. The ICRS score evaluates the grade of cartilage regeneration from grade I to grade IV (grade I: normal cartilage, grade II: nearly normal, grade III: abnormal cartilage and grade IV: severely abnormal cartilage) (**Table 2**). Box plot were obtained using GraphPad Prism software.

Characteristic		Score
Degree of defect repair	100%	4
	>75%	3
	>50%	2
	>25%	1
	<25%	0
Integration to the border zone	Complete integration	4
	Demarcating border <1mm	3
	3/4 of graft integrated	2
	1/2 of graft integrated	1
	1/4 of graft integrated	0
Macroscopic cartilage appearance	Normal and smooth cartilage	4
	Fibrillations	3
	Several, small or few but large fissures	1
	Total degeneration	0
ICRS grade	Grade I, normal	12
	Grade II, nearly normal	8-11
	Grade III, abnormal	4-7
	Grade IV, severely abnormal	0-3

Table 2. ICRS score grading for evaluation of macroscopic cartilage repair. The addition of scores attributed to the degree of defect repair, the integration and the macroscopic appearance of the implant, determinates the total value corresponding to the ICRS grade.

2.9 Three-dimensional X-Ray micro-computed tomography (micro-CT)

For bone mineralisation analysis, the explanted femoral condyles from euthanized sheep were observed with three-dimensional micro-CT (Quantum Fx mCT, Julien Becker, ICS, IGBMC, Strasbourg, France). Micro CT was performed after 6 months of implantation. The surgical sites were imaged in the treated group and control group. 2D sections images were analysed and three-dimensional surface rendering obtained from 2D micro-CT images using the Osirix program.

2.10 Measurement of regenerated cartilage

1
2
3 Before 3D volume rendering micro-CT acquisitions, two slides intersecting the centre of the
4 original defect were analysed for average cartilage regeneration thickness. Area of
5 regenerated cartilage covering bone were measured (Osirix program) for each slide, and the
6 mean area calculated to estimate quantitatively the cartilage recovering degree of the defects
7 (n=5 for non-treated defects; n=5 for treated defects). Values were expressed as mean \pm SEM.
8 Statistical analyses (t-student) were performed using BiostaTGV program. Differences were
9 considered significant at $p < 0.05$.

16 17 **2.11 Histological analyses of repaired cartilage**

18 At 6 months post-implantation, 3 mm diameter biopsies were performed in the superficial
19 phase of each implanted site. Biopsies were then embedded in optimum cutting temperature
20 medium, 20 μ m cryostat sections were performed and laid on gelatine coated glasses. For
21 total glycosaminoglycans staining, a solution of 2% (*m/v*) Alcian Blue (Sigma-Aldrich) at pH
22 4.2 was added on samples during 2 hours at room temperature after rinsing with distilled
23 water. For sulphated glycosaminoglycans staining, samples were soaked in distilled water and
24 dipped alternately in a solution of Fast Green (0.02% *m/v*), acetic acid (1% *m/v*), and
25 Safranin-O (0.1% *m/v*). Slides were analysed under a bright field microscope (Leica DM
26 4000B) after mounting with Histolaque LMR® (LaboModerne, France).

35 36 **3. Results and discussion**

37 38 **3.1 Stemness validation of sheep bone marrow MSCs**

39 Spontaneous cartilage wound healing remains very limited and may lead to osteoarthritis over
40 time. The recently expanding new therapeutic strategies and biological approaches have made
41 accessible innovative tools in order to support cartilage repair. These last years, it appeared
42 that the third generation biomaterials, involving active molecules and living cells, offer
43 significant advantages in that objective [12, 35-37]. The well-established autologous
44 chondrocytes implantation (ACI) approach is used in clinical practice. Nevertheless,
45 chondrocytes need *in vitro* pre-amplification before being implanted, responsible for gradual
46 phenotype loss. Chondrocyte dedifferentiation subsequently leads to fibrous cartilage
47 formation, which does not satisfy the mechanical properties of native hyaline cartilage. To
48 overcome the limitations associated with the restricted quantity of primary chondrocytes,
49 other cell sources such as MSCs can be privileged, and can be available in larger number.
50 Stem cell-based therapies are expanding strategies for osteochondral repair [38, 39], and have
51 the ATMP status in several clinical trials [19-21]. In the cartilage repair field, the collected
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 results are encouraging but still remain exploratory, and need confirmation in non-rodent
4 animal models and clinical research [40].

5
6 As the diversity of MSCs is source-related and age-dependent, the International Society for
7 Cellular Therapy (ISCT) stated in 2006 a range of criteria to validate the characterisation of
8 MSCs for clinical application [41-43]. In accordance to these recommendations, we
9 demonstrated in our study that autologous MSCs aspirated from sheep bone marrow are
10 consistent with the ISCT definition of stemness. After the *in vitro* culture period, they were
11 able to generate CFU-F (**Figure 1(A)**). We also confirmed their multipotency through
12 adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation, since they were able to produce lipid
13 rich vacuoles (**Figure 1(B)**), GAGs (**Figure 1(C)**) and calcium (**Figure 1(D)**), respectively,
14 under specific culture conditions. Finally, cluster of differentiation (CD) markers profile were
15 investigated by using antibodies reactive to human cells (**Figure 1(E)**), due to the lack of
16 commercially available antibodies for this large animal. No reaction was observed concerning
17 CD90, CD105 and CD73 markers, which we attributed to a limited cross reactivity between
18 man and sheep species, as reported in other studies [44, 45]. However, as expected, only a
19 minor proportion of cellular population was positive for endothelial CD34 (0.6% \pm 0.3),
20 haematopoietic CD45 (6% \pm 1.7) and major histocompatibility complex (MHC) class II
21 receptor HLA-DR (3.8% \pm 0,7) detection, while the presence of CD44 (92.1% \pm 1,2) and
22 CD166 (86.9 % \pm 2) was more extensively displayed. This thorough cell isolation step allowed
23 us to obtain a MSCs population with guaranteed stemness potential, and suitable for
24 implantation.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 **3.2 Cartilage repair assessment with clinically relevant approaches**

41
42 It is noteworthy that maintenance of healthy subchondral bone is a key element participating
43 to a stable articular cartilage recovery after a traumatic lesion. Although the physiological
44 crosstalk between bone and cartilage is incompletely understood, the mutual influence of
45 these tissues on one another is supported by their anatomical proximity and common
46 embryogenic background [46]. One of the most highlighted issue is related to the nutrients,
47 oxygen and secreted factors emanating from the subchondral bone towards the overlying
48 avascular cartilage [47]. Damaged subchondral bone compromises chondral repair through
49 abnormal neoangiogenesis, jeopardizing the physiological hypoxic environment of cartilage.
50 Microvascular invasion of injured chondral tissue, and therefore improper diffusion of
51 inflammatory factors [48], associated with an increased nutrient and oxygen supply, are the
52 archstones of secondary osteoarthritis. Thus, subchondral bone appears to be a regulatory
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 interface between cartilage and trabecular bone, rather than a simple mechanical support. To
4 avoid long term degeneration of the cartilage graft [49], we previously investigated
5 restoration of the subchondral plate by developing functionalised materials with osteogenic
6 factors, like BMP-2 or BMP-7 [15, 16], that were able to efficiently support MSCs bone
7 regeneration [17, 18]. We hypothesised that cartilage regeneration will be improved if it
8 occurs on a stable healthy subchondral environment, free from microvascular changes that are
9 observed in osteoarthritis. In order to regenerate effectively the joint cartilage, we decided to
10 associate our BMP-2 functionalised collagen layer with a superficial hydrogel made of
11 alginate and hyaluronic acid mix solution (**Figure 2**). Alginate and hyaluronic acid are well-
12 known to enhance chondrogenic differentiation. To mimic the cell condensation that initiates
13 the skeletogenesis [50], and therefore optimise this specific lineage induction, hydrogel was
14 amalgamated with autologous bone marrow MSCs organised as organoids [34, 51]. Our
15 ATMP strategy had been validated in good laboratory practice (GLP) preclinical studies in rat
16 and sheep models (data not shown). As clinical studies are not possible without supportive
17 preclinical data collected from large animal studies, we focused on critical defects in a sheep
18 model. Indeed, we created critical lesions of 7 mm diameter by 3 mm depth to prevent their
19 spontaneous repair. This type of procedure is clinically relevant, and cannot be realised in
20 rodent animal models, due to the restricted dimensions of their joints and and the few cell
21 layers that compose the articular cartilage [52]. Indeed, rodent animal studies generally obtain
22 very encouraging results which are unfortunately rarely replicable in human trials. On the
23 other hand, ovine studies represent strategic models for knee cartilage regeneration as they
24 display many comparable features to the human knee. Ovine models have a similar bicondylar
25 femoral structure, with meniscus, cruciate and asymmetrical ligaments. Furthermore, they
26 suffer similar mechanical stress than human knees, which is the most affected site by
27 osteochondral lesions and secondary osteoarthritis [53, 54].

28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
In our study, we chose to implant our active hybrid therapeutic device through a one-step
surgery, on experimental medial femoral condylar defects, in order to analyse their evolution
after 6 months. All animals survived the experimentation time period and showed satisfactory
tolerance to the surgery. No signs of synovitis, joint effusion or fracture were observed after
surgical intervention. The level of tissue repair was based on the ICRS score. This score is
derived from a macroscopic examination of the defect filling degree, its integration within the
host tissues, and the general aspect of the newly formed cartilage. After 6 months of
treatment, unimodal repartition of the ICRS scores have been observed (**Figure 3(A, B)**):

1
2
3 75% to 100% of wound filling was shown in 4 out of 6 samples, implant integration
4 (associated with a demarcating border lower than 1 mm) was displayed in 3 out of 6 samples,
5 while fibrillated to smooth surface appearance was obtained in 3 out of 6 samples. Thus,
6 overall repair assessment led to state that three samples were classified as a grade II (nearly
7 normal cartilage), two samples as a grade III (abnormal) and one sample as a grade IV
8 (severely abnormal). Finally, the median ICRS score was 8 (**Figure 3(C)**), showing the
9 potency of our implants to support a nearly normal neotissue formation through a grade II
10 cartilage regeneration process. It has to be noticed that surgery was performed at an anterior
11 or a posterior site of the medial femoral condyles, and no significant differences were
12 observed between both anatomical locations.
13
14
15
16
17
18
19

20
21 To pursue the evaluation of articular cartilage repair with clinically relevant and reproducible
22 non-invasive techniques, an MRI study was performed at different times during follow up: the
23 first MRI study was performed on the day of surgery (D0), the second one 3 months after
24 surgery and the third one 6 months after surgery. These MRI studies observed oedema-like
25 hyper-intense T2 weighted signals in subchondral sites which is a standard finding after
26 osteochondral surgery [55]. This hyper-intense signal, is consistent with the unavoidable
27 initial tissue inflammation induced by the traumatic surgical procedure, and was significantly
28 visible up to 3 months in the post-operative period (**Figure 4(A, B)**). This signal decreased
29 significantly at the sixth month of evaluation. Indeed, tissues undergoing a healing process,
30 switch from hyper-intense DP FS weighted signal to hypo-intense DP FS weighted signal, due
31 to fibrotic tissue replacing inflammatory tissue [56]. Signal intensity in MRI acquisitions
32 serves as a time marker for tissue healing and maturation, applied in human medicine. Several
33 authors reported that the failure of an articular regenerative surgery could be suspected if the
34 oedema-like response did not decrease after 1 year [57, 58]. Moreover, clinical trials
35 involving autologous chondrocyte implantation (ACI) have noted that the switch from the
36 hyper-intense to hypo-intense signals occurred at the second year of implantation, instead it
37 stabilised after this period during 5 years. Our follow up period may have been too short to
38 observe a total regression of subchondral hyper-intense signals, but definitely showed
39 improvement with substantial decrease of signal intensity during the implantation time,
40 between 3 months and 6 months acquisitions after surgery (**Figure 4(C)**). When analysing
41 osteochondral tissue regeneration, 5 out of 6 implanted sites were composed of a neoformed
42 osteochondral unit. This observation indicates that the repair of osteoarticular tissue using our
43 biphasic implant has a prolonged effect over time, from bioactive collagen scaffolds and
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 MSCs loaded hydrogels, to newly synthesised subchondral bone and neocartilage. In case of a
4 human clinical trial, evaluation of cartilage repair should be prolonged up to 2 years [11, 57],
5 and even 7 years after surgery [59]. In a 7 years follow-up clinical study, using an autologous
6 matrix-induced chondrogenesis (AMIC) process (Chondro-Gide®), some authors showed that
7 two thirds (66,6%) of the patients demonstrated great quality of repair with no deterioration
8 over time. With the same kind of procedure (AMIC), it was observed that clinical signs of
9 repair became significantly visible only after 24 months post-implantation [60]. However,
10 deteriorations of tissue could also appear precociously after the surgical procedure (first
11 months), showing that the implant behaviour is unpredictable during the early post-
12 implantation period. In our study, the implant was well integrated into host tissue, as
13 macroscopic and MRI studies revealed no delamination, nor displacement of a portion of the
14 graft. Since our longitudinal MRI observations revealed maturation of fibrous tissues, we
15 attempted to examine more precisely the quality of osteochondral repair by using three-
16 dimensional micro-CT imaging 6 months after implantation. Micro-CT studies revealed in all
17 cases a small invagination and an irregular surface of the mineralized part of the implant
18 (**Figure 4(D-F)**). However, the 2D projections revealed signs of bone healing and bone
19 remodelling, through bone condensation close to the articular surface. This suggests that the
20 volume of initial fibrous tissues, previously observed by MRI, decreased in favour of
21 increasing volume of mineralized tissue.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 **3.3 Cartilage regeneration through sulphated GAGs deposition**

38
39 Histological results showing cartilage repair during human clinical trials are difficult to
40 obtain, due to ethical considerations concerning the use of post-operative biopsies, which
41 would unavoidably affect the repaired joint. However, the advantage of our sheep model was
42 the possibility to evaluate *ex vivo* the histological quality of repaired tissue 6 months after
43 implantation (**Figure 5(A)**). Samples revealed that the superficial hydrogel part, dedicated to
44 cartilage repair, fully adjusts with its fibrous part devoted to subchondral bone regeneration
45 (**Figure 5(B)**). A sustained presence of cells was observed in both compartments of our
46 ATMP as well as in their junction, which is a paramount element to ensure tissue remodelling
47 throughout the whole engineered osteochondral unit. We postulate that extracellular matrix
48 deposition at the interface of the implant with the host tissue could explain the fusion of both
49 neotissues, assuring sustainable integration of the neoformed osteochondral unit. Some
50 discontinuities sized at most 40 μm were still observed, but complete tissue restoration could
51 be achieved due to cell localisation at these specific areas (**Figure 5(C)**). On the other hand,
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 examination of the most superficial part of the implant site allowed us to observe deposition
4 of sulphated GAGs, and distinct chondroblast morphologies, which were organised as a
5 gradient: an elongated shape close to the articular surface, and gradually adopting a more
6 rounded aspect close to the deep subchondral layer (**Figure 5(D)**). Altogether, these results
7 indicate that our ATMP was able to spur the formation of hyaline cartilage in an efficient and
8 stable way. Since the neoformed chondral tissue was histologically comparable to native
9 hyaline cartilage, we hope that it will persist on the long term, with similar mechanical
10 properties and an effective cross-talk with subchondral bone.
11
12
13
14
15
16
17

18 Current clinical therapeutics for cartilage repair do not sufficiently take into account the
19 importance of subchondral bone regeneration, though essential for the mechanical functions
20 of the joint, as well as the maintenance of cartilage homeostasis. During microfracture
21 procedures, cartilage regeneration successfully occurs, however it is limited in size compared
22 to the native cartilage, and has a fibrocartilaginous profile, hence composed of lesser GAGs,
23 and increased vascularisation [61, 62] than hyaline cartilage. With our strategy focusing
24 simultaneously on the regeneration of both layers of osteochondral unit, we observed that the
25 surface of neosynthesised cartilage was in average 2.7 fold superior ($p < 0.05$, Student's t-test)
26 in the treated defect ($6.924 \pm 1.570 \text{ mm}^2$), compared to the untreated defect (2.568 ± 0.693
27 mm^2) in micro-CT analysis (**Figure 6(A-D)**). Moreover, our histological studies confirmed
28 that this healing cartilage was hyaline-like. These results could be explained by the
29 bicompartmented structure of our implant, with interruption of vascular invasion at the
30 nanofibrous layer, preventing vessels to reach the superficial hydrogel part. Bone/cartilage
31 interface dysfunction is of great importance in the initiation and sustaining of osteoarticular
32 degenerative diseases, such as osteoarthritis. Recent constructed stratified materials
33 mimicking osteochondral features with layered interfaces, have the advantage to offer
34 comparable mechanical characteristics respecting natural gradients of osteoarticular tissue
35 [63, 64]. The bicompartmented product evaluated in this pilot study offers the possibility to
36 simultaneously promote the regeneration of subchondral bone and articular cartilage in a
37 single implantable device, easily useable for a one step surgical procedure. The
38 nanotechnology associated to this therapeutic approach offers significant advances for multi-
39 tissue interfaced differentiation, as BMP-2 nanocontainers drive a local cell-contact
40 dependent stimulation, when delivered in adequate dosage (nanoquantities).
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58

59 **4. Conclusion**

60

1
2
3 This study reveals the efficiency of our nanoactive living implant, to simultaneously
4 regenerate articular cartilage and subchondral bone, in an ovine model of critical knee defects.
5 Our strategy is based on a hydrogel embedding of bone-marrow derived MSCs organoids,
6 recovering an underlying collagen membrane enriched with nanoreservoirs of BMP-2 growth
7 factor. These results established the feasibility and efficiency of this hybrid implant to support
8 hyaline-like tissue formation, suggesting a promising impact on the repair of human
9 osteochondral lesions, considering the close analogy between sheep and human knee joints.
10 Therefore, this therapeutic strategy could be an adequate solution to avoid progression of
11 osteochondral defects to a degenerative joint disease, such as osteoarthritis, when these focal
12 defects are effectively treated beforehand.
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 **Declaration of interest**

23 None.
24
25
26

27 **Data availability**

28 The data associated with this manuscript is available upon request to the corresponding author
29 or the senior author.
30
31
32
33

34 **Acknowledgments**

35 This work was supported by SATT CONECTUS Alsace “Projet Maturation”. We would like
36 to thank Natalia De Isla for help with cytometry protocol, Nadia Messaddeq and Julien
37 Becker for micro-CT acquisitions, Jochen Barth for cytometry, Joseph Seitlinger for box plot
38 acquisition and CIRE Platform for experimental surgery and imaging, Val de Loire INRA
39 Centre, 37380 Nouzilly, France with Stéphanie Krissian for sheep surgery, Hans Adriaensen
40 for MRI acquisitions.
41
42
43
44
45
46
47

48 **Supporting Information**

49 Supporting information contains other characterisation data about harvested cells from sheep
50 bone marrow (flow cytometry, multipotence and CFU-F assays).
51
52
53
54
55
56
57
58
59

60 **References**

- 1
2
3 [1] W. Hunter, Of the structure and diseases of articular cartilages, *Philos. Trans. R. Soc.*
4 *Lond.* 42 (1743) 514-521.
- 5
6 [2] F.H. Chen, K.T. Rousche, R.S. Tuan, Technology Insight: adult stem cells in cartilage
7 regeneration and tissue engineering, *Nature Reviews Rheumatology* 2 (2006) 373-382.
- 8
9 [3] E.A. Makris, A.H. Gomoll, K.N. Malizos, J.C. Hu, K.A. Athanasiou, Repair and tissue
10 engineering techniques for articular cartilage, *Nature Reviews Rheumatology* 11 (2015) 21-
11 34.
- 12
13 [4] M. Liu, X. Zeng, C. Ma, H. Yi, Z. Ali, X. Mou, S. Li, Y. Deng, N. He, Injectable
14 hydrogels for cartilage and bone tissue engineering, *Bone Research* 5 (2017) 17014.
- 15
16 [5] L. Li, F. Yu, J. Shi, S. Shen, H. Teng, J. Yang, X. Wang, Q. Jiang, In situ repair of bone
17 and cartilage defects using 3D scanning and 3D printing, *Scientific Reports* 7 (2017) 9416.
- 18
19 [6] Z. Wang, Z. Wang, W.W. Lu, W. Zhen, D. Yang, S. Peng, 2017. Novel biomaterial
20 strategies for controlled growth factor delivery for biomedical applications. *NPG Asia*
21 *Materials* 9, e435.
- 22
23 [7] M.W. Pot, T.H. van Kuppevelt, V.K. Gonzales, P. Buma, J. IntHout, R.B.M. de Vries,
24 W.F. Daamen, 2017. Augmented cartilage regeneration by implantation of cellular versus
25 acellular implants after bone marrow stimulation: a systematic review and meta-analysis of
26 animal studies. *PeerJ.* 5, e3927.
- 27
28 [8] K. Mithoefer, D.B.F. Saris, J. Farr, E. Kon, K. Zaslav, B.J. Cole, J. Ranstam, J. Yao, M.
29 Shive, D. Levine, W. Dalemans, M. Brittberg, Guidelines for the Design and Conduct of
30 Clinical Studies in Knee Articular Cartilage Repair, *Cartilage* 2 (2011) 100-121.
- 31
32 [9] M. Petri, M. Broese, A. Simon, E. Liodakis, M. Ettinger, D. Guenther, J. Zeichen,
33 C.Krettek, M. Jagodzinski, C. Haasper, CaReS (MACT) versus microfracture in treating
34 symptomatic patellofemoral cartilage defects: a retrospective matched-pair analysis, *J.*
35 *Orthop. Sci.* 18 (2013) 38-44.
- 36
37 [10] M. Volz, J. Schaumburger, H. Frick, J. Grifka, S. Anders, A randomized controlled trial
38 demonstrating sustained benefit of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis over
39 microfracture at five years, *Int. Orthop.* 41 (2017) 797-804.
- 40
41 [11] T.R. Niethammer, M. Holzgruber, M.F. Gülecüyüz, P. Weber, M.F. Pietschmann, P.E.
42 Müller, Matrix based autologous chondrocyte implantation in children and adolescents: a
43 match paired analysis in a follow-up over three years post-operation, *Int. Orthop.* 41 (2017)
44 343-350.
- 45
46 [12] L.L. Hench, J.M. Polak, Third-generation biomedical materials, *Science* 295 (2002)
47 1014-1017.
- 48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [13] J.N Zara, R.K. Siu, X. Zhang, J. Shen, R. Ngo, M. Lee, W. Li, M. Chiang, J. Chung, J.
4 Kwak, B.M. Wu, K. Ting, C. Soo, High doses of bone morphogenetic protein 2 induce
5 structurally abnormal bone and inflammation *in vivo*. *Tissue Eng. Part A.* 17 (2011) 1389-
6 1399.
7
8
9
10 [14] A.W. James, G. LaChaud, J. Shen, G. Asatrian, V. Nguyen, X. Zhang, K. Ting, C. Soo,
11 A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2, *Tissue Eng. Part B*
12 *Rev.* 22 (2016) 284-297.
13
14 [15] C. Mendoza-Palomares, A. Ferrand, S. Facca, F. Fioretti, G. Ladam, S. Kuchler-Bopp, T.
15 Regnier, D. Mainard, N. Benkirane-Jessel, Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs
16 of therapeutics, *ACS Nano* 6 (2012) 483-490.
17
18 [16] S. Eap, A. Ferrand, J. Schiavi, L. Keller, T. Kokten, F. Fioretti, D. Mainard, G. Ladam,
19 N. Benkirane-Jessel, Collagen implants equipped with « fish scale » -like nanoreservoirs of
20 growth factors for bone regeneration, *Nanomedicine (Lond.)* 9 (2014) 1253-1261.
21
22 [17] S. Eap, L. Keller, J. Schiavi, O. Huck, L. Jacomine, F. Fioretti, C. Gauthier, V. Sebastian,
23 P. Schwinté, N. Benkirane-Jessel, A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with
24 active growth factor and stem cells for bone regeneration, *Int. J. Nanomedicine* 10 (2015)
25 1061-1075.
26
27 [18] J. Schiavi, L. Keller, D.N. Morand, N. De Isla, O. Huck, J.C. Lutz, D. Mainard, P.
28 Schwinté, N. Benkirane-Jessel, Active implant combining human stem cell microtissues and
29 growth factors for bone-regenerative nanomedicine, *Nanomedicine (Lond.)* 10 (2015) 753-
30 763.
31
32 [19] I.C.M. Slaper-Cortenbach, Current Regulations for the Production of Multipotent
33 Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Application, *Transfus. Med. Hemother.* 35 (2008)
34 295-298.
35
36 [20] X. Wei, X. Yang, Z. Han, F. Qu, L. Shao, Y. Shi, Mesenchymal stem cells: a new trend
37 for cell therapy, *Acta Pharmacol. Sin.* 34 (2013) 747-754.
38
39 [21] N. Kim, S.G. Cho, Clinical applications of mesenchymal stem cells, *Korean J. Intern.*
40 *Med.* 28 (2013) 387-402.
41
42 [22] E. Gómez-Barrena, C.A. Solá, C.P. Bunu, Regulatory authorities and orthopaedic clinical
43 trials on expanded mesenchymal stem cells, *Int. Orthop.* 38 (2014) 1803-1809.
44
45 [23] A. Goldberg, K. Mitchell, J. Soans, L. Kim, R. Zaidi, The use of mesenchymal stem cells
46 for cartilage repair and regeneration: a systematic review, *J. Orthop. Surg. Res.* 12 (2017) 39.
47
48 [24] D. Magne, C. Vinatier, M. Julien, P. Weiss, J. Guicheux, Mesenchymal stem cell therapy
49 to rebuild cartilage, *Trends Mol. Med.* 11 (2005) 519-526.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [25] A. Woods, G. Wang, F. Beier, Regulation of chondrocyte differentiation by the actin
4 cytoskeleton and adhesive interactions, *J. Cell. Physiol.* 213 (2007), 1-8.
5
6 [26] S. Seo, K. Na, Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis, *J.*
7 *Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 806891.
8
9 [27] O.S. Beane, E.M. Darling, Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for
10 cartilage regeneration, *Ann. Biomed. Eng.* 40 (2012) 2079-2097.
11
12 [28] L. Zhang, P. Su, C. Xu, J. Yang, W. Yu, D. Huang, Chondrogenic differentiation of
13 human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems,
14 *Biotechnol. Lett.* 32 (2010) 1339-1346.
15
16 [29] J.I. Sasaki, T. Matsumoto, H. Egusa, M. Matsusaki, A. Nishiguchi, T. Nakano, M.
17 Akashi, S. Imazato, H. Yatani, *In vitro* reproduction of endochondral ossification using a 3D
18 mesenchymal stem cell construct, *Integr. Biol. (Camb.)* 4 (2012) 1207-1214.
19
20 [30] J. Leijten, L.S.M. Teixeira, J. Bolander, W. Ji, B. Vanspauwen, J. Lammertyn, J.
21 Schrooten, F.P. Luyten, Bioinspired seeding of biomaterials using three dimensional
22 microtissues induces chondrogenic stem cell differentiation and cartilage formation under
23 growth factor free conditions, *Scientific Reports* 6 (2016) 36011.
24
25 [31] A.J. Nixon, E. Rickey, T.J. Butler, M.S. Scimeca, N. Moran, G.L. Matthews, A
26 chondrocyte infiltrated collagen type I/III membrane (MACI® implant) improves cartilage
27 healing in the equine patellofemoral joint model, *Osteoarthr. Cartil.* 23 (2015) 648-660.
28
29 [32] L. Keller, Q. Wagner, P. Schwinté, N. Benkirane-Jessel, Double compartmented and
30 hybrid implant outfitted with well-organized 3D stem cells for osteochondral regenerative
31 nanomedicine, *Nanomedicine (Lond.)* 10 (2015) 2833-2845.
32
33 [33] L. Keller, Q. Wagner, M. Pugliano, P. Breda, M. Ehlinger, P. Schwinté, N. Benkirane-
34 Jessel, Bi-layered nano active implant with hybrid stem cell microtissues for tuned cartilage
35 hypertrophy, *Journal of Stem Cell Research & Therapeutics* 1 (2015), 12-20.
36
37 [34] L. Keller, P. Schwinté, E. Gomez-Barrena, M. Arruebo, N. Benkirane-Jessel, Smart
38 Implants as a Novel Strategy to Regenerate Well-Founded Cartilage, *Trends Biotechnol.* 35
39 (2017) 8-11.
40
41 [35] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, J.A. Planell, Biomaterials in orthopaedics, *J. R.*
42 *Soc. Interface* 5 (2008) 1137-1158.
43
44 [36] F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today* 14 (2011)
45 88-95.
46
47 [37] A. Matsiko, T.J. Levingstone, F.J. O'Brien, Advanced Strategies for Articular Cartilage
48 Defect Repair, *Materials (Basel)* 6 (2013) 637-668.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [38] S.C. Picinich, P.J. Mishra, P.J. Mishra, J. Glod, D. Banerjee, The therapeutic potential of
4 mesenchymal stem cells. *Cell- & tissue-based therapy, Expert Opin. Biol. Ther.* 7 (2007) 965-
5 973.
6
7
8 [39] D.M. Patel, J. Shah, A.S. Srivastava, Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in
9 regenerative medicine, *Stem Cells Int.* 2013 (2013) 496218.
10
11 [40] W.Y. Lee, B. Wang, Cartilage repair by mesenchymal stem cells: Clinical trial update
12 and perspectives, *Journal of Orthopaedic Translation* 9 (2017) 76-88.
13
14 [41] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R.
15 Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent
16 mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement,
17 *Cytotherapy* 8 (2006) 315-317.
18
19 [42] A.J. Friedenstein, N.W. Latzinik, A.G. Grosheva, U.F. Gorskaya, Marrow
20 microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells
21 in porous sponges, *Exp. Hematol.* 10 (1982) 217-227.
22
23 [43] A. J. Friedenstein, R.K. Chailakhyan, U.V. Gerasimov, Bone marrow osteogenic stem
24 cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers, *Cell Tissue Kinet.* 20
25 (1987) 263-272.
26
27 [44] R.C. McCarty, S. Gronthos, A.C. Zannettino, B.K. Foster, C.J. Xian, Characterisation
28 and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells, *J. Cell.*
29 *Physiol.* 219 (2009) 324-333.
30
31 [45] S.A. Boxall, E. Jones, Markers for characterization of bone marrow multipotential
32 stromal cells, *Stem Cells Int.* 2012 (2012) 975871.
33
34 [46] A.R. Sharma, S. Jagga, S.S. Lee, J.S. Nam, Interplay between Cartilage and Subchondral
35 Bone Contributing to Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 19805-19830.
36
37 [47] D.M. Findlay, Vascular pathology and osteoarthritis, *Rheumatology, Volume 46* (2007)
38 1763-1768.
39
40 [48] T. Funck-Brentano, M. Cohen-Solal, Crosstalk between cartilage and bone: when bone
41 cytokines matter. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22 (2011) 91-97.
42
43 [49] M.K. Boushell, C.T. Hung, E.B. Hunziker, E.J. Strauss, H.H. Lu, Current strategies for
44 integrative cartilage repair, *Connect. Tissue Res.* 58 (2017) 393-406.
45
46 [50] B.K. Hall, T. Miyake, All for one and one for all: condensations and the initiation of
47 skeletal development, *Bioessays.* 22 (2000) 138-147.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [51] T. Bécavin, S. Kuchler-Bopp, T. Kökten, O. Huck, N. Messaddeq, H. Lesot, E. Deveaux,
4 N. Benkirane-Jessel, L. Keller, Well-organized spheroids as a new platform to examine cell
5 interaction and behaviour during organ development, *Cell Tissue Res.* 366 (2016) 601-615.
6
7 [52] C.R. Chu, M. Szczodry, S. Bruno, *Animal Models for Cartilage Regeneration and*
8 *Repair, Tissue Eng. Part B Rev.* 16 (2010) 105-115.
9
10 [53] B.J. Ahern, J. Parvizi, R. Boston, T.P. Schaer, Preclinical animal models in single site
11 cartilage defect testing: a systematic review, *Osteoarthritis and Cartilage* 17 (2009) 705-713.
12
13 [54] C.J. Moran, A. Ramesh, P.A.J. Brama, J.M. O'Byrne, F.J. O'Brien, T.J. Levingstone,
14 The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair, *J.*
15 *Exp. Orthop.* 3 (2016) 1.
16
17 [55] G. Chang, O. Sherman, G. Madelin, M. Recht, R. Regatte, MR imaging assessment of
18 articular cartilage repair procedures, *Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am.* 19 (2011) 323-337.
19
20 [56] A. Guermazi, F.W. Roemer, H. Alizai, C.S. Winalski, G. Welsch, M. Brittberg, S.
21 Trattinig, State of the Art: MR Imaging after Knee Cartilage Repair Surgery, *Radiology* 277
22 (2015) 23-43.
23
24 [57] L. Alparslan, C.S. Winalski, R.D. Boutin, T. Minas, Postoperative magnetic resonance
25 imaging of articular cartilage repair, *Semin. Musculoskelet. Radiol.* 5 (2001) 345-363.
26
27 [58] D.E. Anderson, R.J. Williams, T.M. DeBerardino, D.C. Taylor, C.B. Ma, M.S. Kane,
28 D.C. Crawford, Magnetic Resonance Imaging Characterization and Clinical Outcomes After
29 NeoCart Surgical Therapy as a Primary Reparative Treatment for Knee Cartilage Injuries,
30 *Am. J. Sports Med.* 45 (2017) 875-883.
31
32 [59] A. Schiavone Panni, C. Del Regno, G. Mazzitelli, R. D'Apolito, K. Corona, M. Vasso,
33 Good clinical results with autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC) technique in
34 large knee chondral defects, *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 26 (2018) 1130-1136.
35
36 [60] A. Dhollander, K. Moens, J. Van der Maas, P. Verdonk, K.F. Almqvist, J. Victor,
37 Treatment of patellofemoral cartilage defects in the knee by autologous matrix-induced
38 chondrogenesis (AMIC), *Acta Orthop. Belg.* 80 (2014) 251-259.
39
40 [61] C. Erggelet, M. Endres, K. Neumann, L. Morawietz, J. Ringe, K. Haberstroh, M.
41 Sittinger, C. Kaps, Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated
42 with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants, *J. Orthop. Res.* 27
43 (2009) 1353-1360.
44
45 [62] S.W. Kang, L.P. Bada, C.S. Kang, J.S. Lee, C.H. Kim, J.H. Park, B.S. Kim, Articular
46 cartilage regeneration with microfracture and hyaluronic acid, *Biotechnol. Lett.* 30 (2008)
47 435-439.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 [63] N.J. Castro, S.A. Hacking, L.G. Zhang, Recent progress in interfacial tissue engineering
4 approaches for osteochondral defects, *Ann. Biomed. Eng.* 40 (2012) 1628-1640.

5
6 [64] P. Nooeaid, G. Schulze-Tanzil, A.R. Boccaccini, *Methods Mol. Biol.* 1340 (2015) 191-
7
8 200.
9

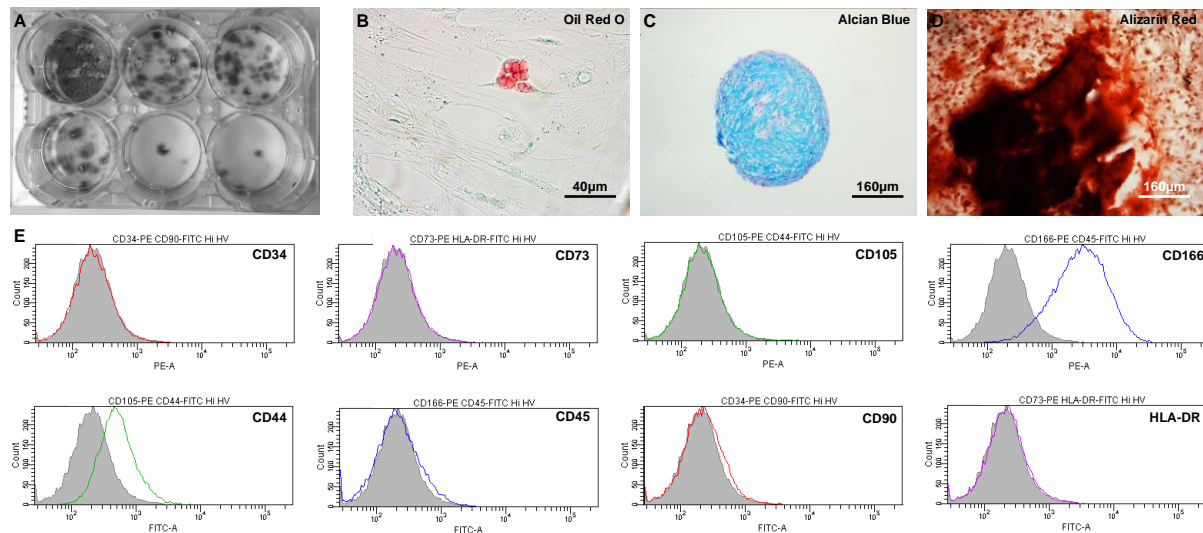


Figure 1. Stemness characterisation of bone marrow cells harvested from sheep. (A) CFU-F showing that a single cell can form a colony, revealing the proliferative and clonogenic potential of bone marrow harvested cells. Cell multipotency was analysed by differentiation into the adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. Lipid rich vacuoles were visible in red after Oil Red O staining demonstrating adipogenic differentiation (**B**). GAGs were visible in blue after Blue Alcian/Nuclear Fast Red staining revealing chondrogenic differentiation (**C**), and calcium deposits were visible in dark red after Alizarin Red staining indicating the osteogenic differentiation capacity (**D**). Flow cytometry analyses of surface marker expression showed that cells were positive for CD44 and CD166 while they were negative for CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 and HLA-DR (**E**). Grey areas represent the signal from isotype controls, while colored lines represent signal from specific surface marker.

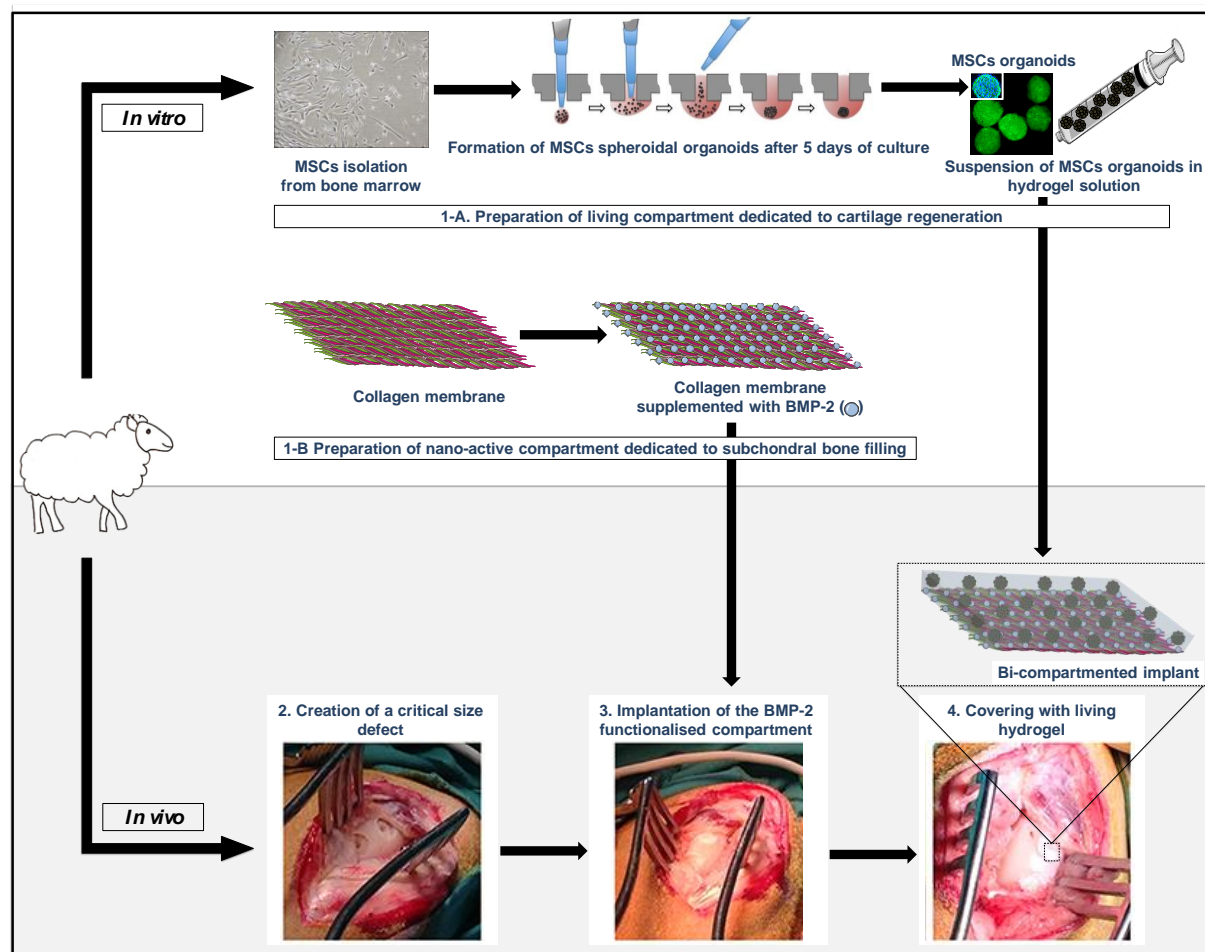


Figure 2. Schematic view of the implantation protocol using autologous mesenchymal stem cells. (1-A) Bone marrow was harvested from the sheep iliac crests, enabling mesenchymal stem cells isolation, and then culture in suspension to form autologous organoids by gravity, which are lastly mixed in an alginate/hyaluronic acid solution. **(1-B)** Concomitantly, collagen membranes were enriched with nano-containers of BMP-2 by cyclical immersion. **(2)** Critical defects of 7 mm of diameter by 3 mm of depth were created in medial femoral condyles of the sheep. The nano-active membranes were placed in the osteochondral lesions **(3)**, to be subsequently covered by the living hydrogel after its polymerisation **(4)**. The osteochondral unit regeneration was observed at 6 months post-implantation.

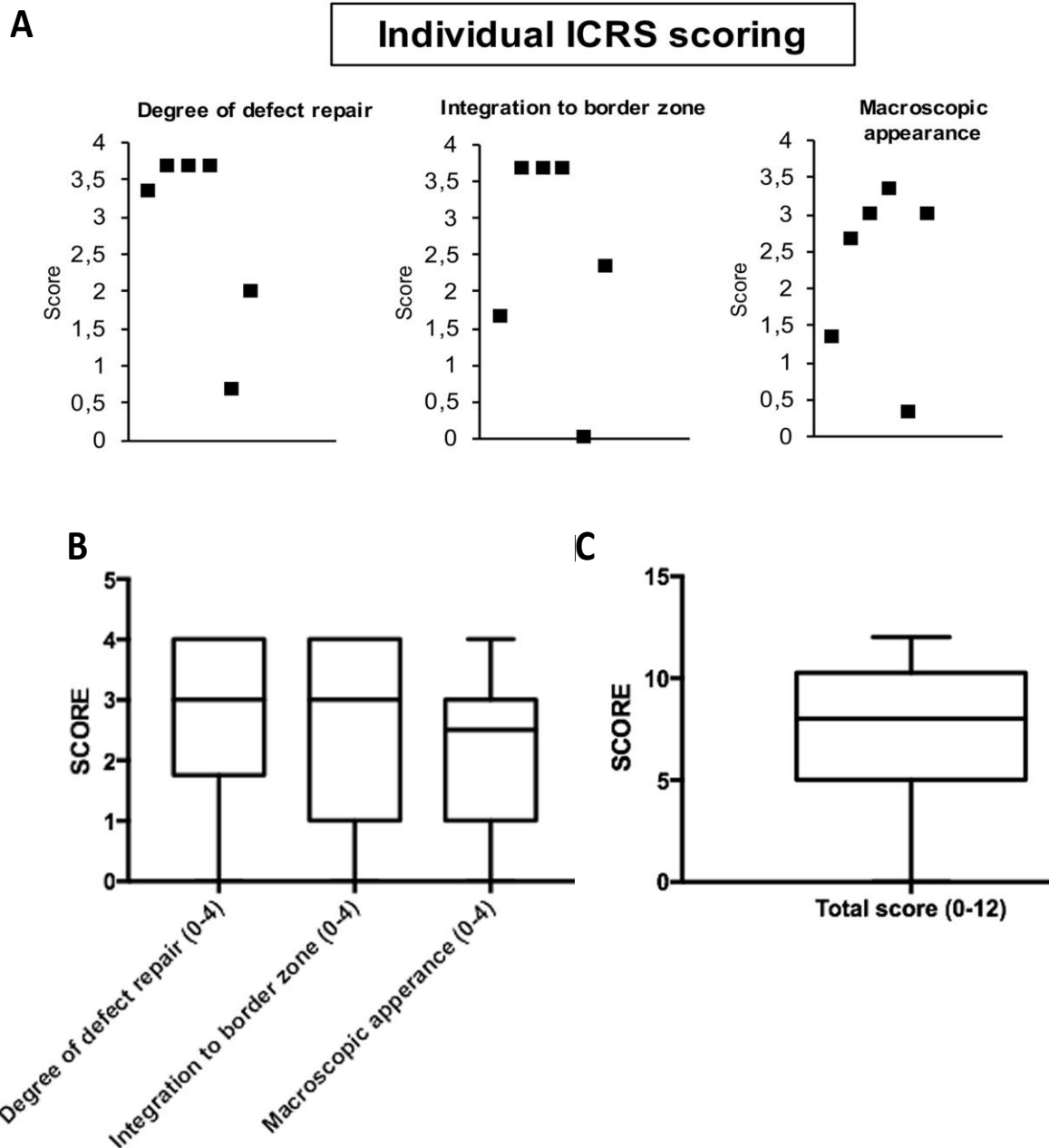


Figure 3. Macroscopic ICRS scores of the treated sheep 6 months after surgery. (A) Individual scores of each implanted site, evaluating the repairing degree of defects, based on integration of implants to border zone, and macroscopic appearance of cartilage. **(B)** Distribution of score related to each parameter (degree of defect repair, integration of border zone, and macroscopic appearance). **(C)** Box plot representing total median ICRS repair scores, after 3 independent counts, to evaluate grade of cartilage regeneration after 6 months of implantation (n=6).

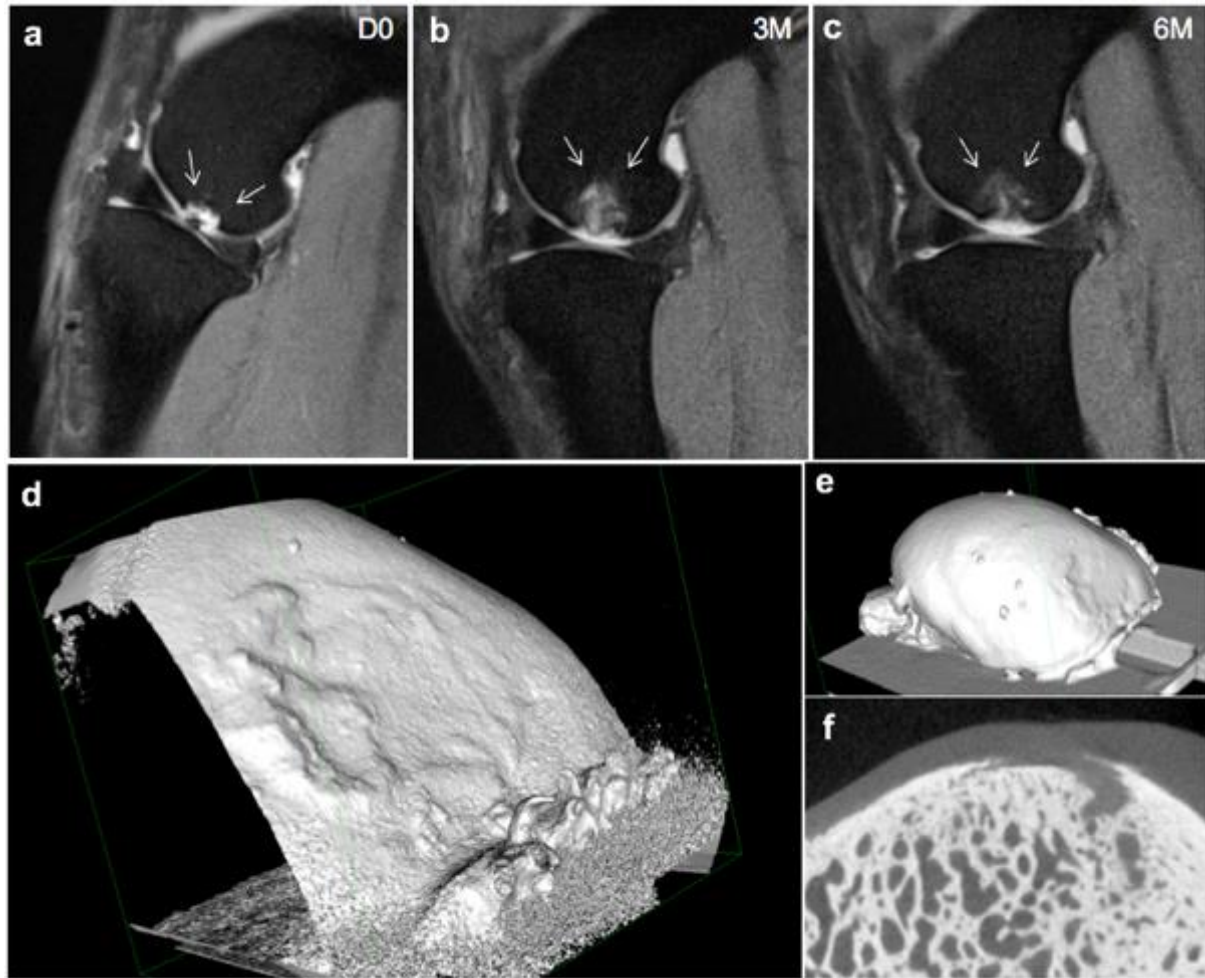


Figure 4. Longitudinal magnetic resonance imaging (MRI) and X-ray micro-computed tomography (micro-CT) explorations of treated osteochondral defects. (a) Sagittal MRI acquisitions were performed just after surgery (D0), **(b)** after 3 months (3M) and **(c)** 6 months (6M) of implantation. White arrows indicate oedema-like hyper-intense T2 weighted signals in subchondral sites, which is a standard finding after osteochondral surgery. After 6 months post-implantation, three-dimensional surface rendering **(d, e)** were obtained from medial slides of micro-CT acquisitions **(f)**.

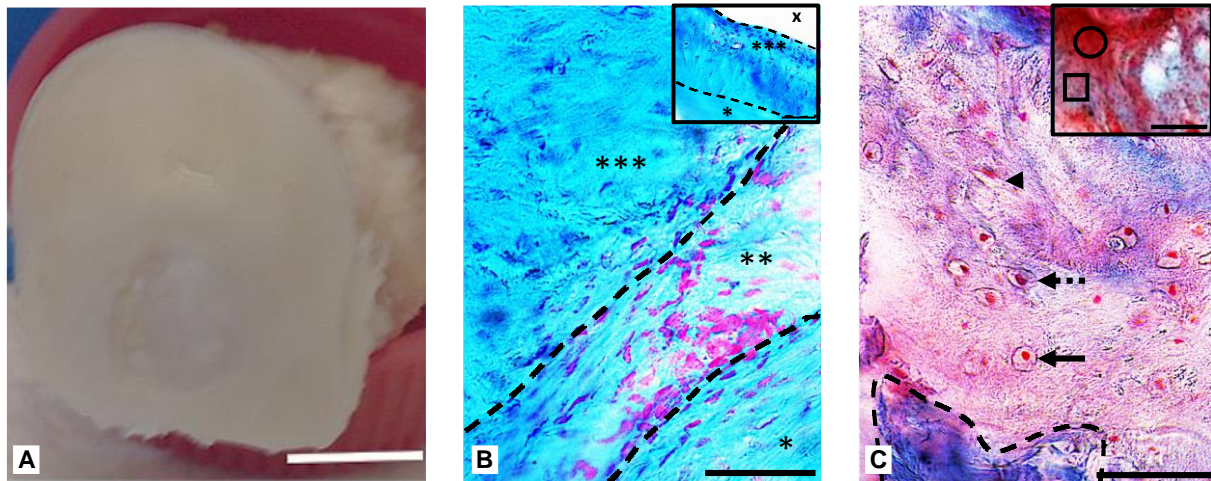


Figure 5. Macroscopic and microscopical observations of the living therapeutic device.

After 6 months of implantation, biopsies were performed at the implant site (A). After cutting, sections were stained with Alcian Blue (B) and Safranin O-Fast Green (C), which displayed the total GAGs and sulphated GAGs of cartilage, respectively in blue and red, enabling to visualise regenerated hyaline cartilage, containing high cellular colonisation. The cross indicates the articular surface, three asterisks indicate cartilaginous part of the implant, while one asterisk indicates bony part and two asterisks indicate the junction zone between hydrogel (cartilaginous part) and nanofibrous matrix (bony part) of the implant. The circle indicates areas of dense GAGs and the square indicates on-going GAG deposition. Arrowhead indicates elongated morphology of cell within chondroplast, which evolves progressively (dashed arrow) into a rounded shape (arrow), thus exhibiting the presence of a morpho-cellular gradient within the newly formed cartilage. Scale bars= 7 mm (A); 50 μ m (B, B inset, C); 100 μ m (C inset).

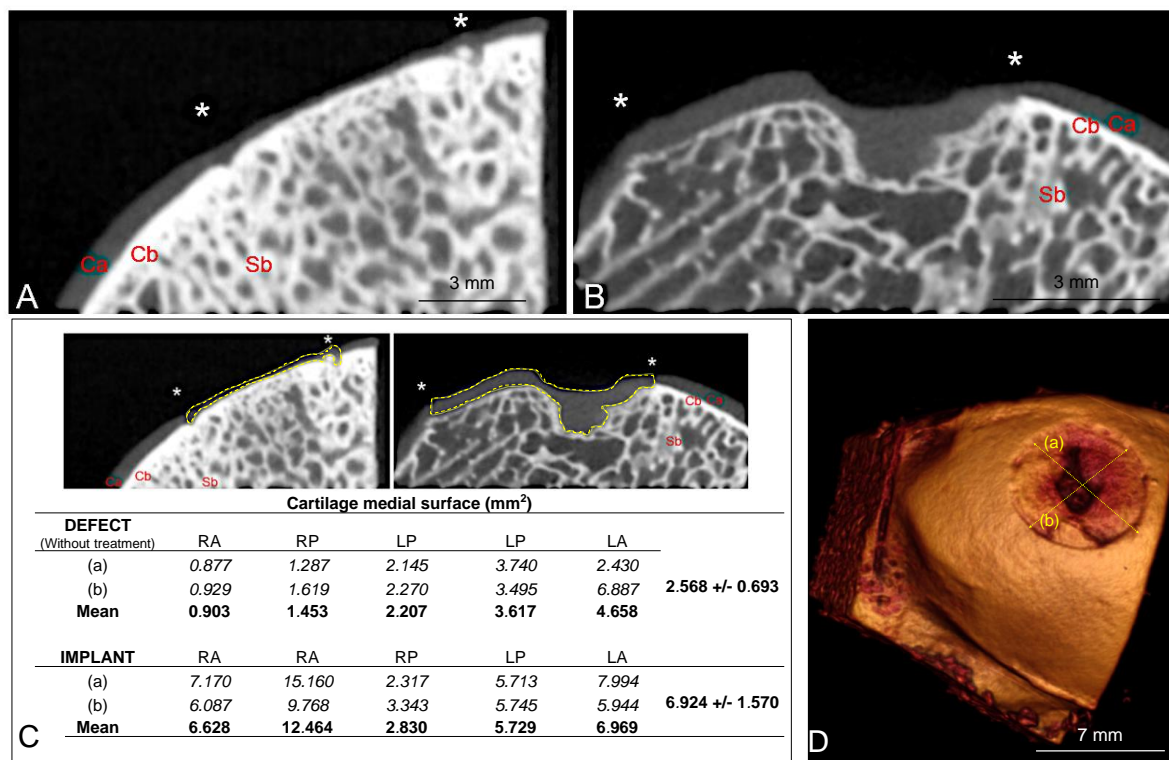


Figure 6. Cartilage overlapping measurement of treated and non-treated defects. 6 months after surgery, cartilage trans-sectional surfaces were measured on successive medial slides of micro-CT acquisitions, in order to provide an estimation of regenerated cartilage thickness for each implanted site. Micro-CT sections showed cartilage in grey (Ca), mineralised cortical bone (Cb) and spongy bone (Sb) in white, for a non treated defect (A) and a defect treated with the implant (B). White stars represent limits of the defect. (C) Surface delimited by yellow dashed line represents the cartilage area measured (mm²), on 2 medial (a, b) sections (D) of the defect. The mean surfaces of neocartilage thickness of implanted and untreated defects (n=5; p=0.047) was calculated to evaluate cartilage regeneration on right anterior (RA), right posterior (RP), left posterior (LP), left anterior (LA) medial femoral condyles of sheep. Values were expressed as mean ± SEM. Differences were considered significant at 95% CI (p < 0.05). Scale bars= 3mm (A, B); 7mm (D).

IV. Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ma thèse, s'inscrivant dans le domaine novateur de la nanomédecine régénérative ostéoarticulaire, était de concevoir, et d'optimiser, de nouvelles stratégies d'implants thérapeutiques permettant une régénération efficace et durable du cartilage articulaire, dans le cadre du traitement des lésions ostéochondrales, afin d'éviter le remplacement par une prothèse.

Dans un premier temps, nous nous sommes spécifiquement intéressés à la régénération du cartilage articulaire (**chapitre 1**). Nos travaux ont notamment porté sur l'élaboration d'un modèle d'implant thérapeutique, à partir d'un biomatériau collagénique de source nouvelle non-mammifère, optimisé par l'ajout de nanoréservoirs de facteur de croissance TGF- β 3, et de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs), dérivées de la moelle osseuse. Les analyses *in vitro* réalisées ont, d'une part, confirmé la biocompatibilité de cet implant à base de collagène de type II marin, dérivé de la méduse. Celles-ci ont, d'autre part, validé ses propriétés chondrogéniques, significativement améliorées en présence de nanoréservoirs de TGF- β 3 et de hCSMs. L'ensemble de ces résultats, a ainsi conforté le potentiel thérapeutique de cet implant collagénique au caractère biomimétique, pour la régénération du cartilage articulaire.

Dans le but de s'affranchir des limites associées à cette première stratégie, restreinte à la régénération du cartilage articulaire uniquement, nous nous sommes, dans un second temps, concentrés sur la régénération de l'unité ostéochondrale dans son ensemble (**chapitre 2**). Pour cela, nous avons cette fois-ci développé un implant thérapeutique doté de deux compartiments, l'un dédié à la régénération du cartilage articulaire en surface, et l'autre, dédié à la régénération d'un support osseux sous-chondral solide. Chacun de ces deux compartiments a tout d'abord été analysé *in vitro* de manière individuelle. D'une part, la biocompatibilité et le potentiel ostéogénique du compartiment osseux, composé d'un biomatériau synthétique et nanofibreux de poly- ϵ -caprolactone (PCL), fonctionnalisé par des nanoréservoirs de facteur de croissance BMP-7, ont été validés après son ensemencement avec des organoïdes de hCSMs. D'autre part, le compartiment cartilagineux, constitué d'un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, a été ensemencé avec des organoïdes hybrides de hCSMs et de chondrocytes humains (hCHs), dont l'utilisation a permis d'induire la différenciation chondrogénique, tout en diminuant l'hypertrophie. L'association de ces deux compartiments, en un implant biphasique, a ensuite été évaluée *in vivo*, après implantation en sous-cutané chez la souris « nude », et a démontré clairement la régénération simultanée du tissu osseux et du tissu cartilagineux.

Notre stratégie innovante tenant compte de l'importance de régénérer un socle osseux sous-chondral solide, capable de soutenir la régénération du cartilage à sa surface, et combinant, implant biphasique, nanoréservoirs de molécules thérapeutiques, et organoïdes de CSMs de moelle osseuse, a dans un troisième temps, été testée chez l'animal de grande taille (brebis), en site intra-articulaire (**chapitre 3**). Cette évaluation a notamment permis de valider la faisabilité et l'efficacité de notre stratégie, associant cette fois-ci un biomatériau collagénique commercial, optimisé par des nanoréservoirs de facteur de

croissance BMP-2 (pour l'os sous-chondral), et un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, incorporant des organoïdes de CSMs isolées de la moelle osseuse de brebis (pour le cartilage articulaire). Cette stratégie d'implant biphasique permet notamment de reproduire l'interface os-cartilage, un point fort pour permettre une régénération stable du cartilage articulaire. En effet, le dysfonctionnement de cette interface joue un rôle majeur dans l'initiation et le maintien des pathologies dégénératives, telles que l'arthrose. Un os sous-chondral endommagé compromet la régénération cartilagineuse par une néo-angiogenèse anormale, qui vient menacer l'environnement physiologique hypoxique du tissu cartilagineux. Cette invasion microvasculaire du cartilage lésé est responsable d'une diffusion inadaptée de facteurs inflammatoires [124], associée à un apport accru en oxygène et en nutriments. Le maintien d'un os sous-chondral sain constitue, par conséquent, un élément clé pour une régénération durable du cartilage articulaire, à la suite d'une lésion. Cependant, il est important de souligner que le plus souvent, les stratégies cliniques actuelles ciblent uniquement la régénération cartilagineuse. Ainsi, les implants cartilagineux finissent inévitablement par être envahis par la vascularisation, ce qui entraîne le caractère fibreux du cartilage régénéré. En reproduisant cette interface os-cartilage, nos implants biphasiques permettent, quant à eux, d'empêcher cette vascularisation d'atteindre le néo-cartilage.

Ainsi, les travaux réalisés au cours de ma thèse, ont permis d'élaborer et d'optimiser une stratégie innovante d'implants thérapeutiques biphasiques performants, permettant la régénération synchrone du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral. L'utilisation de ces médicaments combinés de thérapie innovante, prometteurs, pourrait potentiellement pallier les limites rencontrées avec les stratégies thérapeutiques actuellement utilisées en clinique, dans le traitement des lésions ostéochondrales. Ils pourraient ainsi prétendre à de possibles applications en chirurgie orthopédique, et, de manière générale, notre stratégie reste ajustable en faveur de la régénération d'autres tissus (**Annexe 2**). En effet, l'utilisation des CSMs de moelle osseuse, aux avantages d'ores et déjà établis, permettrait de remédier aux problématiques associées à l'utilisation des chondrocytes autologues. Leur usage en conformation tridimensionnelle, sous forme d'organoïdes, permet par ailleurs d'améliorer les interactions cellulaires, et de favoriser la régénération tissulaire, comparativement à leur utilisation en cellules isolées. De plus, la technologie de nanoréservoirs développée au sein de notre laboratoire, permet d'ajouter des molécules thérapeutiques aux biomatériaux, à des doses plus physiologiques (nanogrammes), et de fournir une biodisponibilité contrôlée, dépendante de l'adhésion des cellules. Cette méthode permettrait notamment d'éviter les effets indésirables induits par le surdosage et la libération non-contrôlée des molécules thérapeutiques dans les implants commerciaux (milligrammes).

En termes de perspectives, il serait intéressant d'évaluer l'incorporation d'autres sources de CSMs au sein de nos implants thérapeutiques. Les CSMs dérivées de la moelle osseuse représentent de bons candidats pour la régénération cartilagineuse. Elles sont obtenues par ponction de moelle osseuse (généralement à partir de la crête iliaque), une procédure de 20 à 30 minutes, réalisable sous anesthésie locale, et en ambulatoire. Cependant, leur utilisation pourrait s'avérer limitée par l'âge des patients à

traiter, et par l'étape d'amplification *in vitro* (notamment dans le cas de passages élevés). En effet, il est aujourd'hui établi que ces deux paramètres affectent la morphologie, ainsi que le potentiel de prolifération et de différenciation de ces CSMs [42,125,126]. Les CSMs dérivées du tissu adipeux (obtenu par liposuccion), ou celles dérivées de la gelée de Wharton (obtenue à partir du cordon ombilical, considéré comme un déchet opératoire), représentent ainsi des sources alternatives que nous pourrions utiliser, et tester, dans l'élaboration de nos implants.

Par ailleurs, durant mon travail de thèse, nous avons utilisé différents types de biomatériaux, chacun associé à une régénération tissulaire spécifique. D'une part, concernant la régénération du tissu cartilagineux, nous avons utilisé : (i) un biomatériau à base de collagène de type II de méduse ; (ii) un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique. Le collagène de type II de méduse a uniquement été analysé *in vitro*. Les résultats encourageants obtenus doivent être complétés par des analyses *in vivo*, en implantation sous-cutanée chez la souris « nude », ainsi qu'en implantation intra-articulaire chez le rat « nude ». Il serait également judicieux d'associer ce biomatériau à un second compartiment osseux, afin de tester la régénération de l'unité ostéocondrale. Ainsi, ce biomatériau innovant pourrait représenter une alternative intéressante à l'utilisation de l'hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique. D'autre part, concernant la régénération du tissu osseux, nous avons utilisé : (i) un biomatériau synthétique et nanofibreux de PCL ; (ii) un biomatériau collagénique commercial. Ces deux types de biomatériaux pourraient être associés au biomatériau de collagène de type II de méduse, encore une fois pour évaluer la régénération de l'unité os-cartilage.

Afin d'éviter les contraintes d'autorisation de mise sur le marché des dispositifs médicaux implantables dotés de molécules thérapeutiques, telles que les BMPs, une alternative à leur utilisation pourrait être d'incorporer de l'hydroxyapatite, principal composant de la fraction minérale de la MEC osseuse, durant la conception ou la fonctionnalisation de notre biomatériau destiné à la régénération de l'os sous-chondral. Que ce soit pour la régénération de l'os sous-chondral ou celle du cartilage articulaire, il serait également intéressant d'optimiser d'autres biomatériaux actuellement utilisés en clinique. Nous pourrions utiliser d'autres molécules thérapeutiques, comme par exemple, de la chondroïtine sulfate, pour renforcer la régénération du cartilage. Ces perspectives d'optimisation de nos implants pourraient également bénéficier des récentes avancées offertes par l'impression 3D. En effet, cette technologie permettrait de concevoir un implant thérapeutique sur mesure, à la composition, l'architecture et aux propriétés mécaniques adéquates, se rapprochant encore plus du tissu physiologique cible pour une meilleure régénération.

L'ensemble de ces perspectives, rentre dans le cadre du développement de technologies pour la santé de demain, avec une avancée dans le domaine de la nanomédecine régénérative, basée sur la régénération tissulaire, pour améliorer toujours plus le traitement et le confort des patients.

V. Annexes

Annexe 1

- ❖ Wagner, Q., **Pugliano, M.**, Idoux-Gillet, Y., Keller, L., and Benkirane-Jessel, N. 2018. Dispositifs médicaux thérapeutiques dotés de nanoréservoirs et de cellules souches pour la nanomédecine régénérative de demain. 2018. **Le Courrier de la Transplantation**. 18, 35–41.



L. Keller

Dispositifs médicaux thérapeutiques dotés de nanoréservoirs et de cellules souches pour la nanomédecine régénérative de demain

Therapeutic medical devices equipped with nanoreservoirs for the regenerative nanomedicine of tomorrow

Q. Wagner^{*,**}, M. Pugliano^{*,**}, Y. Idoux-Gillet^{*,**}, L. Keller^{*,**}, N. Benkirane-Jessel^{*,**}

RÉSUMÉ

» La médecine régénérative est un récent domaine de recherche multidisciplinaire qui a pour objectif le remplacement de tissus ou d'organes endommagés. Grâce aux dernières avancées, des biomatériaux de plus en plus sophistiqués ont été développés, aboutissant aux matériaux de troisième génération. Ces matériaux, constitués de biomatériaux assurant une matrice de support à la prolifération cellulaire, de molécules actives et de cellules, permettent une amélioration et une accélération considérable des processus régénératifs. L'élaboration de tels dispositifs implantables prenant en compte ces trois composantes permet de fournir des alternatives thérapeutiques aux produits actuellement employés en clinique. Cet article fait le point sur les biomatériaux et les stratégies de fonctionnalisation qui rendent ces matériaux actifs, notamment la technologie des nanoréservoirs permettant un relargage soutenu de molécules thérapeutiques, développées pour la nanomédecine régénérative tissulaire.

Mots-clés : Nanomédecine régénérative – Dispositifs médicaux thérapeutiques – Fonctionnalisation – Nanoréservoirs – Facteurs de croissance.

SUMMARY

The regenerative medicine is a new and multidisciplinary research field, aiming at replacing either tissues or damaged organs. Thanks to latest advances in regenerative medicine, biomaterials becoming increasingly sophisticated have been developed, leading to the design of third generation biomaterials. Those materials, incorporating biomaterials ensuring support matrix for cellular proliferation, active molecules and cells, improve and accelerate regenerative processes. The conception of these implantable devices, taking account of the three compounds (biomaterial, cell, active molecule) can provide therapeutic alternative to current medical products used in clinic. In this article, we will discuss about biomaterials and various functionalisation strategies to obtain active biomaterials, by focusing on the nanoreservoirs technology for a sustained release of active molecules and developed for tissue regenerative nanomedicine.

Keywords: Regenerative nanomedicine – Biomaterial – Functionalisation – Nanoreservoirs – Growth factor.

Ces dernières années, les statistiques mondiales montrent que les désordres osseux et cartilagineux ne cessent d'augmenter, suggérant que l'incidence de ces pathologies aura doublé entre 2012 et 2020 (1), suscitant par conséquent de profondes inquiétudes. Malgré le fait que certains tissus possèdent des propriétés intrinsèques d'autorenouvellement, ce degré de réparation varie d'une part selon la nature de ce tissu et, d'autre part, selon la sévérité du traumatisme ou de la pathologie. Concernant plus particulièrement les tissus ostéoarticulaires, les approches thérapeutiques classiques visant leur réparation sont les greffes (autogreffe ou allogreffe), le tissu osseux restant à l'heure actuelle le deuxième tissu le plus

transplanté mondialement, après la transplantation sanguine (2). Parmi les différents types de greffes, l'autogreffe est aujourd'hui considérée comme le traitement de référence pour réparer les défauts osseux en raison de ses caractéristiques comme l'histocompatibilité, la non-immunogénicité et le potentiel ostéo-inducteur/ostéoconducteur (1). Cependant, des limitations associées au besoin de tissus autologues sont toujours liées à ce traitement, puisque cette approche est considérée comme onéreuse et risquée (causant saignements, inflammations, risques d'infection mais également douleurs chroniques) [3].

Pour améliorer la réparation du tissu osseux et outrepasser les limitations des traitements actuels, la médecine

* Inserm, UMR 1260 Nanomédecine régénérative, faculté de médecine, fédération de médecine translationnelle de Strasbourg (FMTS).

** Université de Strasbourg, faculté de chirurgie dentaire, hôpitaux universitaires de Strasbourg (HUS).

régénérative s'est fortement développée ces dernières années, aboutissant à de nouvelles stratégies thérapeutiques implantables. Elle permet aujourd'hui la réparation ou le remplacement de tissus pathologiques ou endommagés en utilisant des technologies adaptées de la thérapie cellulaire, du dosage de molécules bioactives et de l'ingénierie tissulaire. La production de nouveaux biomatériaux, l'utilisation de cellules souches (adultes, fœtales, ou cellules pluripotentes induites), la production de molécules ou de peptides biomimétiques servant de signaux pour l'adhésion et la différenciation cellulaire sont les points clés de cette médecine régénérative. Les différentes générations de biomatériaux ont peu à peu amélioré la complexité des dispositifs implantables et leur degré de sophistication (4). La première génération a émergé dans les années 1960, développée dans le but "d'atteindre une combinaison convenable de propriétés physiques pour correspondre aux propriétés des tissus remplacés avec une réponse toxique minimale chez l'hôte" (5). Appelés généralement "biomatériaux inertes", avec l'exemple de l'acier (6) ou encore du titane et de ses alliages, ils engendraient des interactions minimales avec le tissu environnant. De ce fait, les biomatériaux de première génération ne stimulaient pas la formation osseuse mais provoquaient une formation de tissu fibreux (7). La deuxième génération est apparue dans les années 1980 avec le concept de "matériaux bioactifs", incluant les polymères biodégradables d'origine naturelle ou synthétiques (collagène, polyester, etc.), les phosphates calciques, sulfates calciques et bioverres (basés ou non sur la silice). Ces biomatériaux possèdent d'excellentes propriétés de biocompatibilité et biodégradabilité (8). Les polymères naturels comme le collagène ou l'acide hyaluronique permettent de diriger une réaction biologique innée pour les cellules, augmentent l'adhérence cellulaire et offrent une meilleure réponse chimiotactique. Cependant, ces polymères sont limités par une réponse immunitaire, des variations de lots dus aux processus de purification, et des taux variables de dégradation. Les polymères synthétiques ont une flexibilité permettant d'adapter les propriétés mécaniques et les cinétiques de dégradation; ils peuvent être conçus selon différentes formes avec les caractéristiques désirées. Les plus utilisés sont le polymère d'acide lactique (PLA), le polymère d'acide glycolique (PGA), le copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique (PLGA) et le polycaprolactone (PCL) [9, 10]. La troisième génération de biomatériaux a été conçue pour incorporer des molécules biologiques visant à induire une réponse cellulaire favorable, comme la survie cellulaire ou la différenciation cellulaire (11). Ces approches incluent l'utilisation de facteurs solubles (facteurs de croissance, cytokines, etc.) ou insolubles (molé-

cules de la matrice extracellulaire) [12]. Ces biomatériaux de troisième génération visaient à activer des gènes spécifiques, et à adapter les mécanismes moléculaires de manière à obtenir une réponse cellulaire adaptée à la régénération du tissu cible.

Les avancées de la médecine régénérative ont ainsi permis une amélioration significative de la qualité des constructions issues de l'ingénierie tissulaire. Les travaux de recherche portent notamment sur l'élaboration de biomatériaux qui tendent à imiter au plus près la structure de la matrice extracellulaire (MEC) du tissu physiologique d'intérêt. Leurs caractéristiques sont cruciales et divers paramètres sont à prendre en compte dans leur élaboration: la composition (matériau naturel ou synthétique), les propriétés physicochimiques, la topologie de surface, la biocompatibilité avec le tissu hôte, et la biodégradabilité (13). Ces dernières années, de nombreux biomatériaux avancés mimant la matrice extracellulaire ont été conçus à l'échelle micrométrique et nanométrique, fondés sur l'environnement matriciel physiologique (14-16).

Caractéristiques des dispositifs implantables pour la régénération osseuse

Les matériaux doivent satisfaire plusieurs propriétés macroscopiques et microscopiques nécessaires à la croissance du tissu osseux. Ces propriétés sont importantes pour les biomatériaux dans l'ingénierie tissulaire osseuse.

Biocompatibilité

Le biomatériau doit s'ajuster avec le tissu hôte en évitant toute réponse immunogénique. Cette propriété avantage le biomatériau synthétique par rapport à l'allogreffe, dont la réaction immunogénique engendre des rejets fréquents (17). Un nombre important de nouveaux implants sont conçus à partir de matériaux polymériques organiques. Une fois métabolisés, les résidus issus de l'hydrolyse de polymères synthétiques, tels que le PLA, le PGA, le PLGA, et tels que l'acide lactique et l'acide glycolique peuvent être métabolisés par le corps sans causer d'effets secondaires. D'autres polymères synthétiques comme le polycaprolactone ou encore les polyanhydrides sont également biocompatibles et largement utilisés en ingénierie tissulaire osseuse.

Porosité

La porosité est un élément très important à prendre en compte pour l'élaboration d'un dispositif implantable en médecine régénérative osseuse. En effet, la taille des pores et la porosité ont un effet synergique

sur le développement tissulaire. Une porosité élevée, associée à une importante interconnexion des pores, permet d'augmenter la surface du matériau et contribue à sa colonisation cellulaire. En contrôlant la porosité, le transport de l'oxygène et des nutriments ainsi que l'élimination des déchets métaboliques pourront être contrôlés afin de favoriser la prolifération et la colonisation cellulaires de l'implant.

Propriétés de surface

Les propriétés chimiques et topographiques des matériaux améliorent l'adhésion et la prolifération cellulaires. En effet, les propriétés chimiques participent à l'adhésion des cellules aux matériaux et à l'interaction du tissu hôte avec les protéines et autres agents bioactifs présents au sein de l'implant. Les propriétés topographiques, quant à elles, permettent de contrôler l'ostéoconduction (supportant la croissance osseuse en encourageant la croissance de l'os environnant), l'ostéo-induction (cellules ostéoprogénitrices se différenciant en ostéoblastes et initiant la synthèse osseuse) et l'ostéo-intégration (intégration au tissu environnant). L'incorporation d'agents bioactifs et de facteurs de croissance au sein du biomatériau améliore ces propriétés de surface.

Biodégradabilité

En médecine régénérative, les molécules utilisées dans la production de matériaux doivent être biodégradables par nature. La vitesse de dégradation des matrices doit en effet s'ajuster à la vitesse de régénération tissulaire. Dans le cas des polymères, le taux de dégradation du biomatériau peut être contrôlé, d'une part en variant la composition des monomères, et d'autre part en modifiant la technique de fabrication, de manière à s'adapter au mieux au tissu.

Procédés de fabrication de dispositifs médicaux synthétiques

Afin de répondre le plus précisément possible au cahier des charges en matière de médecine régénérative osseuse (porosité, biodégradabilité, biocompatibilité), une variété de processus technologiques a été développée pour optimiser au mieux la fabrication de dispositifs implantables tridimensionnels et poreux. Parmi ces procédés, on trouve principalement la lixiviation de porogènes (18), le moussage (19), la séparation de phases (20), l'électrospinning (21) et l'impression 3D (22). Il sera fait mention ici des méthodes d'obtention principales que sont la lixiviation de porogènes, l'électrospinning et l'impression 3D.

La lixiviation de porogènes repose sur l'utilisation d'un polymère solubilisé dans une solution organique contenant un sel inorganique (couramment le chlorure de sodium) insoluble avec la granulométrie et la taille souhaitées. Après coulage dans un moule, le solvant organique est évaporé puis les sels sont retirés par lixiviation à l'aide d'un solvant aqueux. On obtient ainsi un matériau poreux (23). Cette méthode facile à mettre en œuvre permet de contrôler la taille des pores et la porosité en adaptant le ratio polymère/sels inorganiques. Toutefois, le procédé reste limité à la réalisation de dispositifs fins (maximum 2 mm) et se confronte à la difficulté de retirer les sels à l'intérieur du matériau. De plus, on ne retrouve pas d'interconnexion des pores au sein des matériaux obtenus par cette technique, ce qui pourrait constituer un réel désavantage pour la colonisation cellulaire.

Afin de mimer au mieux les composants de la matrice extracellulaire des tissus, la technique d'électrospinning s'est largement développée ces dernières années. Cette technologie permet de produire des matériaux polymériques, en utilisant un champ électrique contrôlant la formation de fibres polymériques, avec un diamètre allant de quelques dizaines de nanomètres à quelques microns (24). Les polymères synthétiques sont dissous dans un solvant organique, puis disposés dans une seringue montée sur un pousse-seringue. La seringue est reliée à une aiguille par un tuyau souple. Une différence de potentiel est alors appliquée entre l'aiguille et le collecteur, qui va allonger la goutte formée au bout de l'aiguille jusqu'à ce que les forces électrostatiques soient supérieures à la tension de surface de la goutte ; il se formera alors un cône de Taylor. Le polymère va se déposer sur le collecteur sous forme de fibres, tandis que le solvant s'évaporerait. L'avantage de ce procédé est qu'il permet de contrôler un ensemble de paramètres du matériau, tels que le diamètre des fibres, leur forme, leur orientation et leur distribution. Ces éléments propres aux matériaux fibreux peuvent également être modulés par la concentration du polymère et par le choix du solvant influençant sa viscosité et sa conductivité. Outre les paramètres environnementaux (température, humidité), ceux liés à l'appareillage (débit, différence de potentiel entre aiguille et collecteur, diamètre d'ouverture de l'aiguille, distance entre aiguille et collecteur) jouent également un rôle important en influençant la conformation du matériau fibreux produit. Cette méthode permet d'obtenir des matériaux macro- et microporeux présentant une porosité interconnectée (21, 25, 26). L'appareillage simple permet des adaptations telles qu'un électrospinning coaxial (2 solutions de polymères forment des fibres de type cœur/écorce) ou l'utilisation de collecteurs

Dossier

particuliers pour moduler l'architecture et l'alignement des fibres. Un autre grand avantage de cette technique réside dans l'épaisseur des membranes, qui peut être modulée selon les besoins, allant de 30 μm à 1 cm (21, 25, 27).

Grâce à l'avènement de l'impression 3D et la conception assistée par ordinateur (CAO), des matériaux ont pu être conçus selon des géométries et des formes particulièrement précises (22). Contrairement aux autres techniques de fabrication, ces nouveaux procédés permettent d'obtenir des géométries à porosité complexe, conduisant peu à peu vers une médecine régénérative personnalisée. Les radiologies du patient peuvent être converties à l'aide d'un logiciel de CAO relié à une imprimante 3D pour application clinique et obtention d'un implant personnalisé. Cependant, cette technologie présente encore quelques limites liées à son coût, aux difficultés d'accès au logiciel de CAO ainsi qu'aux matériaux implantables et imprimables autorisés en pratique clinique.

Fonctionnalisation des dispositifs médicaux implantables pour améliorer leur efficacité

En médecine régénérative osseuse, de nouvelles stratégies augmentant le potentiel ostéoconducteur et ostéo-inducteur des dispositifs implantables ont été développées. Celles-ci reposent sur l'utilisation de molécules actives, telles que les facteurs de croissance, pour les rendre actifs. On trouve aujourd'hui sur le marché clinique des thérapeutiques actives et implantables pour la médecine régénérative du tissu osseux. Ces matériaux sont constitués de membranes de collagène associées par trempage à un facteur de croissance ostéo-inducteur (*recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2* [rhBMP-2], 12 mg). Ce dispositif médical, ayant obtenu une approbation de la Food and Drug Administration (FDA) dès 2002, est appliqué dans le cadre de la fusion de vertèbres lombaires, en chirurgie dentaire et maxillofaciale, et dans le traitement des traumatismes osseux. Ce produit thérapeutique permet une amélioration de la régénération osseuse, mais le relargage passif, rapide et incontrôlé de grandes quantités de facteurs de croissance peut également causer des effets secondaires dus à un surdosage des concentrations supraphysiologiques (ostéolyse, risque de métastases osseuses, croissance osseuse ectopique, développement d'anticorps, carcinogénèse) [28]. En effet, les données actuelles sur la dose appropriée de facteurs de croissance pour l'ingénierie osseuse, et par

conséquent pour l'ingénierie de lésion osseuse, restent contradictoires malgré la large gamme de concentrations étudiées (29). De plus, la dose de facteurs de croissance délivrée in vivo par le biomatériau dans un défaut osseux n'est pas clairement établie (30). Élaborer des stratégies innovantes permettant un relargage actif et soutenu de facteurs de croissance adaptant les cinétiques étendues de libération postimplantation pourrait améliorer l'efficacité de la médecine régénérative osseuse.

Pour augmenter les propriétés biologiques des dispositifs médicaux implantables synthétiques, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées au moyen de leur intégrer des biomolécules (31-33). Des stratégies ont été investiguées pour permettre de fonctionnaliser plus durablement ces dispositifs médicaux implantables avec des facteurs de croissance. Diverses méthodes ont ainsi permis de rendre les biomatériaux actifs, en prenant en compte leur composition ainsi que la biomolécule active et le temps de libération du composé. Deux principaux procédés ont été élaborés: la fonctionnalisation par liaison chimique et la fonctionnalisation par adsorption physique.

La fonctionnalisation par liaison chimique établit une liaison covalente entre le biomatériau et la biomolécule d'intérêt, de manière réversible ou irréversible. Le biomatériau est "traité" par une modification de sa structure chimique et physique. Ce traitement facilite alors la formation de liaisons avec des molécules d'intérêt telles qu'un groupement réactif (34), ou des molécules de la matrice extracellulaire comme les glycosaminoglycans, ligands naturels de facteurs de croissance par exemple (35, 36). La molécule d'intérêt, modifiée pour accepter une liaison covalente, se retrouve ainsi ancrée à la surface du biomatériau et non pas intégrée dans le matériau lui-même, permettant ainsi de réduire les quantités utilisées. Néanmoins, cette technique présente quelques désavantages. En effet, si la liaison chimique a lieu au niveau du site actif de la molécule d'intérêt ou si sa conformation spatiale est modifiée, son activité thérapeutique sera perdue. Ces liaisons chimiques peuvent également occasionner un encombrement stérique diminuant sa reconnaissance par les cellules, et donc son activité (37). De plus, greffer une biomolécule à la surface du biomatériau ne la protège pas forcément d'une dégradation par les différents composés cellulaires, telles les protéases par exemple, leur temps de demi-vie étant diminué avant même d'avoir pu agir sur le plan thérapeutique.

La fonctionnalisation par adsorption physique fait quant à elle intervenir des liaisons de faible énergie (interactions hydrophobes, électrostatiques, liaisons

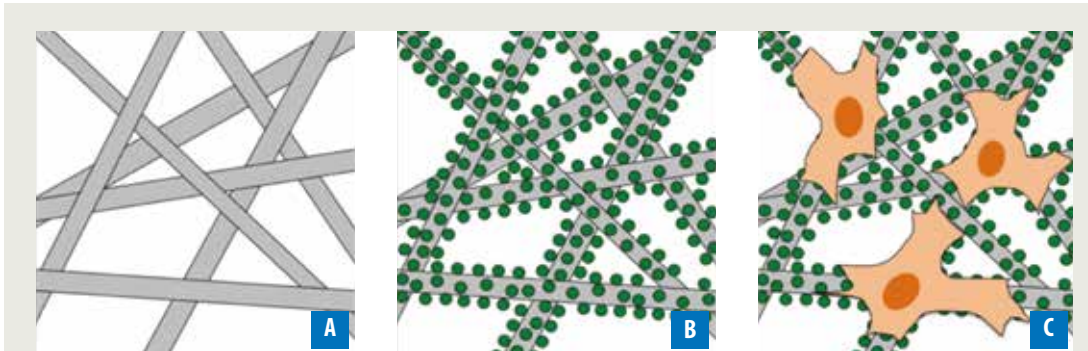


Figure. Représentation schématique d'une matrice nanofibreuse dotée de nanoréservoirs à facteurs de croissance et de cellules souches mésenchymateuses. Représentation de la matrice nanostructurée composant le dispositif médical (A). Par la technologie de nanoréservoirs, il est possible de doter ces fibres de facteurs de croissance pour une libération dépendant de l'adhésion cellulaire (B). Ces facteurs de croissance permettent d'accélérer la différenciation des cellules mésenchymateuses souches et d'améliorer la régénération tissulaire cible (C).

hydrogènes ou de van der Waals) [38]. Il est possible de réaliser une adsorption simple d'une biomolécule à la surface du biomatériau ; cependant, les liaisons étant de faible énergie, les biomolécules pourront rapidement se désolidariser du biomatériau (37, 39). Il a également été développé des adsorptions de molécules par l'utilisation de multicouches de polyélectrolytes. Pour cette technique, une alternance de dépôt couche par couche entre une espèce chargée positivement et une autre chargée négativement va créer de nombreuses interactions de faible énergie. La technique de dépôt de films multicouches a été réalisée pour la première fois par Decher et al. pour réaliser un revêtement de surface (40). Ce procédé a été largement utilisé ces dernières années pour fonctionnaliser et recouvrir la surface des matériaux, aussi bien naturels (41) que synthétiques (42-44). Adaptée aux matériaux nanofibreux, cette technique génère des nanoréservoirs à la surface des fibres sous forme de gouttelettes isolées dans l'ensemble du matériau, permettant l'accès des cellules au biomatériau ainsi qu'aux biomolécules thérapeutiques (figure) [42].

Cette technologie brevetée de nanoréservoirs a notamment permis, par intégration de facteurs de croissance ostéogéniques (BMP-2, BMP-7), d'augmenter le potentiel de réparation osseuse d'implants collagéniques utilisés en pratique clinique (41) mais également d'implants nanofibreux polymériques (27). Son intérêt réside dans le fait qu'elle permet d'augmenter la biodistribution des molécules thérapeutiques, en les protégeant de leur dégradation et en diminuant la quantité de facteurs de croissance utilisée. De plus, leur relargage se fait sur un mode dépendant de l'adhésion cellulaire et évitant un relargage passif. En effet, les

biomolécules sont diffusées de manière contrôlée par les cellules (42). De tels dispositifs médicaux implantables et actifs ont notamment déjà démontré leur efficacité pour une réparation osseuse. En effet, par la construction de matériaux de troisième génération, utilisant des implants nanofibreux polymériques, dotés de nanoréservoirs de BMP-7, il a été possible d'accélérer la régénération osseuse par ajout de cellules souches mésenchymateuses humaines adultes issues de moelle osseuse (27).

Conclusion

L'avènement de l'ingénierie tissulaire a permis le développement de plusieurs générations de biomatériaux à complexité croissante pour la régénération des tissus. Les biomatériaux de troisième génération permettent d'orchestrer le processus régénératif en proposant une matrice de support pour l'invasion et la prolifération cellulaires, de même qu'une amélioration de la différenciation cellulaire pour augmenter la synthèse de matrice cellulaire du tissu cible. Cette amélioration est possible par l'ajout de cellules souches autologues et l'incorporation de facteurs de croissance à partir de la technologie de nanoréservoirs. Cette dernière entraîne un relargage des molécules thérapeutiques continu dans le temps mais offre aussi une protection à ces molécules, tout en diminuant les quantités de facteurs de croissance utilisées. Cette stratégie de fonctionnalisation est mise à profit pour séquestrer, protéger et stabiliser les agents thérapeutiques au sein de dispositifs implantables pour la médecine régénérative, permettant ainsi d'élaborer des implants intelligents et innovants.

Dossier

Développée pour la nanomédecine régénérative osseuse, la technologie de nanoréservoirs est toutefois modulable et peut s'adapter à d'autres types de supports ou à d'autres molécules d'intérêt thérapeutique. Dans le cadre de la réparation cartilagineuse par exemple, le facteur de croissance transformant-bêta 3

(TGF-β3), au sein de nanoréservoirs disposés sur une matrice collagénique, permet d'accélérer la régénération cartilagineuse (45). Le facteur de croissance vasculaire (VEGF) au sein de nanoparticules a également permis d'accélérer le recrutement vasculaire postimplantation par l'utilisation de cette technologie (46). ■

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références bibliographiques

1. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 2012;40:363-408.
2. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2014;9:18.
3. St John TA, Vaccaro AR, Sah AP et al. Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2003;32:18-23.
4. Yu X, Tang X, Gohil SV, Laurencin CT. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Adv Healthc Mater* 2015;4:1268-85.
5. Hench LL. Biomaterials. *Science* 1980;208:826-31.
6. Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J. Bone Joint Surg Br* 1960;42-B:28-30.
7. Tirrell M, Kikkoli E, Biesalski M. The role of surface science in bioengineered materials. *Surf Sci* 2002;500:61-83.
8. Pérez RA, Won J-E, Knowles JC, Kim H-W. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:471-96.
9. Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev* 1999;99:3181-98.
10. Roohani-Esfahani SI, Lu ZF, Li JJ et al. Effect of self-assembled nanofibrous silk/polycaprolactone layer on the osteoconductivity and mechanical properties of biphasic calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomater* 2012;8:302-12.
11. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002;295:1014-7.
12. Alsberg E, von Recum HA, Mahoney MJ. Environmental cues to guide stem cell fate decision for tissue engineering applications. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6:847-66.
13. Velasco MA, Narváez-Tovar CA, Garzón-Alvarado DA. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Res Int* 2015;2015:729076.
14. Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol* 2011;6:13-22.
15. Kane R, Ma PX. Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone. *Mater Today (Kidlington)* 2013;16:418-23.
16. Gusić N, Ivković A, VaFaye J et al. Nanobiotechnology and bone regeneration: a mini-review. *Int Orthop* 2014;38:1877-84.



Retrouvez l'intégralité
des références bibliographiques
sur www.edimark.fr

 **eJournal**

En direct de l'**ATC 2018**
(American Transplant Congress)

Seattle, 2-6 juin 2018

**Retrouvez les temps forts
de l'ATC dès le 3 juin 2018**

 www.edimark.fr/ATC/2018/ej

SITE RÉSERVÉ AUX PROFESSIONNELS DE SANTÉ

DIMANCHE
3 JUIN

LUNDI
4 JUIN

MARDI
5 JUIN

MERCREDI
6 JUIN

Coordonneurs

Pr Gilles Blancho (Nantes)
Pr Faouzi Saliba (Paris)

Médecins rédacteurs

Pr Nassim Kamar (Toulouse)
Dr Dominique Bertrand (Rouen)
Dr Pauline Housseil (Rennes)
Dr Jean-Baptiste Hiriart (Pessac)

Sous l'égide de

 **Le Courrier**
DE LA TRANSPLANTATION

Avec le soutien institutionnel de

 **NOVARTIS**
 **SANDOZ** A Novartis
Division



Sous l'égide de **Le Courrier de la Transplantation** - Directeur de la publication : **Claudie Damour-Terrasson** - Rédacteur en chef : **Pr Yvon Calmus (Paris)**

Attention, ceci est un compte-rendu de congrès et/ou un recueil de résumés de communications de congrès dont l'objectif est de fournir des informations sur l'état actuel de la recherche; ainsi, les données présentées sont susceptibles de ne pas être validées par les autorités de santé françaises et ne doivent donc pas être mises en pratique. Le contenu est sous la seule responsabilité du coordonnateur, des auteurs et du directeur de la publication qui sont garants de son objectivité.

Cet eJournal est édité par Edimark SAS, 44, rue Prony, CS 10107, 75017 Paris - Tél. : 01 46 67 63 00 - Fax : 01 46 67 63 10

Références bibliographiques (suite p. 40)

17. Reikerås O, Shegarfi H, Naper C, Reinholt FP, Rolstad B. Impact of MHC mismatch and freezing on bone graft incorporation: an experimental study in rats. *J Orthop Res* 2008;26:925-31.
18. Johnson T, Bahrapourian R, Patel A, Mequanint K. Fabrication of highly porous tissue-engineering scaffolds using selective spherical porogens. *Biomed Mater Eng* 2010;20:107-18.
19. Nam YS, Yoon JJ, Park TG. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive. *J Biomed Mater Res* 2000;53:1-7.
20. Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater Today* 2004;7:30-40.
21. Eap S, Ferrand A, Palomares CM et al. Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering. *Biomed Mater Eng* 2012;22:137-41.
22. Thavorniyutikarn B, Chantarapanich N, Sitthiseriratip K, Thous GA, Chen Q. Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques. *Prog Biomater* 2014;3:61-102.
23. Lee SB, Kim YH, Chong MS, Hong SH, Lee YM. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials* 2005;26:1961-8.
24. Huang Z-M, Zhang Y-Z, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol* 2003;63:2223-53.
25. Eap S, Morand D, Clauss F et al. Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce bone. *Biomed Mater Eng* 2015;25:79-85.
26. Xu T, Mizuk JM, Zhao Y, Sun H, Fong H. Electrospun polycaprolactone 3D nanofibrous scaffold with interconnected and hierarchically structured pores for bone tissue engineering. *Adv Healthc Mater* 2015;4:2238-46.
27. Eap S, Keller L, Schiavi J et al. A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int J Nanomedicine* 2015;10:1061-75.
28. Tannoury CA, An HS. Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery. *Spine J* 2014;14:552-9.
29. Gothard D, Smith EL, Kanczler JM et al. Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater* 2014;28:166-207; discussion 207-8.
30. Santo VE, Gomes ME, Mano JF, Reis RL. Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering--Part II: challenges on the evolution from single to multiple bioactive factor delivery. *Tissue Eng Part B Rev* 2013;19:327-52.
31. Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater Today* 2008;11:18-25.
32. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol* 2012;30:546-54.
33. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol* 2014;14:15-56.
34. He X, Ma J, Jabbari E. Effect of grafting RGD and BMP-2 protein-derived peptides to a hydrogel substrate on osteogenic differentiation of marrow stromal cells. *Langmuir* 2008;24:12508-16.
35. Clark RA. Synergistic signaling from extracellular matrix-growth factor complexes. *J Invest Dermatol* 2008;128:1354-5.
36. Kim S-H, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 2011;209:139-51.
37. Nyberg E, Holmes C, Witham T, Grayson WL. Growth factor-eluting technologies for bone tissue engineering. *Drug Deliv Transl Res* 2016;6:184-94.
38. Haynes CA, Norde W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1994;2:517-66.
39. King WJ, Krebsbach PH. Growth factor delivery: how surface interactions modulate release in vitro and in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:1239-56.
40. Decher G, Hong JD, Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* 1992;210(Part 2):831-5.
41. Eap S, Ferrand A, Schiavi J et al. Collagen implants equipped with 'fish scale'-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomedicine (Lond)* 2014;9:1253-61.
42. Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S et al. Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 2012;6:483-90.
43. Ferrand A, Eap S, Richert L et al. Osteogenic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol Biosci* 2014;14:45-55.
44. Eap S, Keller L, Ferrand A et al. Nanomechanical Properties of Active Nanofibrous Implants After In Vivo Bone Regeneration. *Nano LIFE* 2014;4:1450001.
45. Pugliano M, Vanbellinghen X, Schwinté P, Benkirane-Jessel N, Keller L. Combined Jellyfish Collagen Type II, Human Stem Cells and Tgf- β 3 as a Therapeutic Implant for Cartilage Repair. *J Stem Cell Res Ther* 2017;7:382.
46. Wagner Q, Offner D, Idoux-Gillet Y et al. Advanced nanostructured medical device combining mesenchymal cells and VEGF nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization. *Nanomedicine (Lond)* 2016;11:2419-30.


Annexe 2

- ❖ **Pugliano, M.**, Van Bellingen, X., Idoux-Gillet, Y., Strub, M., Bornet, F., Clauss, F., Schwinté, P., Keller, L., Benkirane-Jessel, N., Kuchler-Bopp, S., Lutz, J.C., and Fioretti, F. 2018. Temporomandibular Joint Regenerative Medicine. **Int. J. Mol. Sci.** *19*, 446–467.



Review

Temporomandibular Joint Regenerative Medicine

Xavier Van Bellinghen ^{1,2,3,†}, Ysia Idoux-Gillet ^{1,2,†}, Marion Pugliano ^{1,2,†}, Marion Strub ^{1,2,3}, Fabien Bornert ^{1,2,3}, Francois Clauss ^{1,2,3}, Pascale Schwinté ^{1,2}, Laetitia Keller ^{1,2}, Nadia Benkirane-Jessel ¹, Sabine Kuchler-Bopp ¹ , Jean Christophe Lutz ^{1,3,4} and Florence Fioretti ^{1,2,3,*}

¹ INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), FMTS, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg, France; dr.xvb@laposte.net (X.V.B.); ysiaidouxgillet@free.fr (Y.I.-G.); marion.pugliano@gmail.com (M.P.); strub.marion@orange.fr (M.S.); bornertfabien@gmail.com (F.B.); francois_clauss@hotmail.com (F.C.); pschwinte@unistra.fr (P.S.); lkeller@unistra.fr (L.K.); nadia.jessel@inserm.fr (N.B.-J.); kuchler@unistra.fr (S.K.-B.); Jean-Christophe.LUTZ@chru-strasbourg.fr (J.C.L.)

² Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 8 rue Ste Elisabeth, 67000 Strasbourg, France

³ Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires & Chirurgie Maxillo-Facial, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France

⁴ Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg, France

* Correspondence: f.fioretti@unistra.fr; Tel.: +33-3-68-85-33-76

† These authors contributed equally to this work.

Received: 22 December 2017; Accepted: 29 January 2018; Published: 2 February 2018

Abstract: The temporomandibular joint (TMJ) is an articulation formed between the temporal bone and the mandibular condyle which is commonly affected. These affections are often so painful during fundamental oral activities that patients have lower quality of life. Limitations of therapeutics for severe TMJ diseases have led to increased interest in regenerative strategies combining stem cells, implantable scaffolds and well-targeting bioactive molecules. To succeed in functional and structural regeneration of TMJ is very challenging. Innovative strategies and biomaterials are absolutely crucial because TMJ can be considered as one of the most difficult tissues to regenerate due to its limited healing capacity, its unique histological and structural properties and the necessity for long-term prevention of its ossified or fibrous adhesions. The ideal approach for TMJ regeneration is a unique scaffold functionalized with an osteochondral molecular gradient containing a single stem cell population able to undergo osteogenic and chondrogenic differentiation such as BMSCs, ADSCs or DPSCs. The key for this complex regeneration is the functionalization with active molecules such as IGF-1, TGF- β 1 or bFGF. This regeneration can be optimized by nano/micro-assisted functionalization and by spatiotemporal drug delivery systems orchestrating the 3D formation of TMJ tissues.

Keywords: temporomandibular joint; regenerative medicine; stem cells; scaffolds; growth factors; functionalization; drug delivery systems; nanotechnology; osteochondral regeneration

1. Introduction

1.1. Temporomandibular Joint (TMJ)

The temporomandibular joint (TMJ) is an articulation covered by dense fibrocartilage formed between the mandibular condyle and the temporal bone. The temporal articular surface is large and consists of the mandibular fossa and the articular tubercle. Along this large articular temporal surface, each mandibular condyle has a wide motion range, consisting of both rotation and translation.

Fibrocartilaginous disc cushions mechanical stresses that exist between the temporal and mandibular articular surfaces. The high collagen content of this disc provides great rigidity and

durability. The TMJ disc has no direct vascularization or innervation by itself. However, its posterior attachment, known as retrodiscal tissue, features many vessels and nerves which are crucial during physio-pathological processes.

1.2. Temporomandibular Joint Disorders (TMJD)

TMJD (temporomandibular joint disorders) are very common, their prevalence being around 52% [1]. TMJD is a general term actually covering a large number of clinical occurrences affecting the TMJ and masticatory-related structures. They cover in various etiologies: traumatic, inflammatory, and congenital. TMJD are also characterized by deficient wound healing and fibrosis caused by continuous and irreversible injuries.

Pain, malocclusion, limited range of motion, deviation, joint clicking and clenching are most of time associated with TMJD. These disorders are often so painful during basic oral activities (eating and speaking) that quality of life of patients is greatly impacted [2]. Pain is the primary symptom and the main reason why patients are referred to practitioners to seek treatment.

Osteoarthritis-like degenerative joint disease belonging to TMJD is a destruction of bone and cartilage with a consecutive inflammation which enhances tissue destruction [3]. TMJ degeneration features are: displacement, thickening and/or disc perforation, whole destruction of articular fibrocartilage and crucial modifications of bone remodeling such as sclerosis or periarticular osteophyte formation [4,5]. The ultimate stage of degeneration can even result in the replacement of TMJ by a block of fibrous and bony tissue, namely, ankylosis [6] (Figure 1).

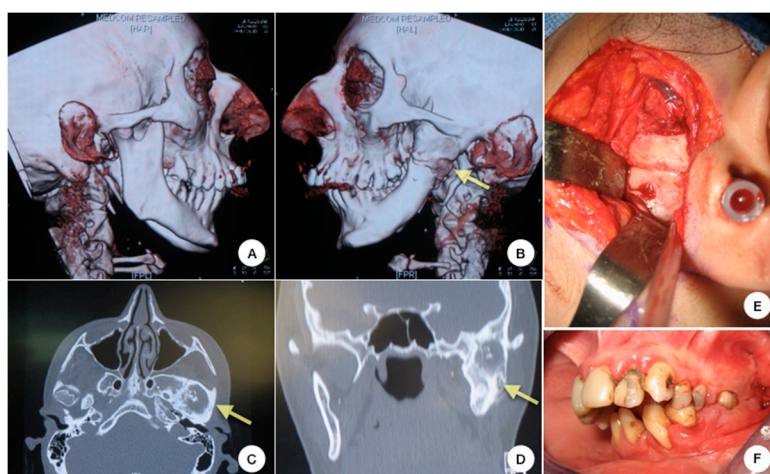


Figure 1. Invasive treatment of a patient suffering from TMJ (temporomandibular joint) ankylosis: Right lateral view of a 3D CT scan reconstruction of the head: the right TMJ is affected by joint space narrowing (A) and the left TMJ space has completely disappeared and been replaced by an osseous block (B). This replacement of the left TMJ by an osseous block of ankylosis is seen on transversal (C), and on coronal (D) CT scan sections. Intraoperative view of invasive treatment: the osseous bloc of ankylosis replacing the left TMJ space is approached through a pre-auricular incision (E). Preoperative intraoral photograph showing the absence of mouth opening (F).

2. Current Status of Temporomandibular Treatments

2.1. Current Therapies

Once the primary factors of TMJD have been identified and eliminated, the treatment can vary according to the severity of the disorder: non-invasive, minimally invasive and invasive procedures. However, permanent recovery is rarely obtained and therefore, follow-up therapies are required [7].

Occlusal orthodontics, medications, physical therapy and acupuncture are the most common non-invasive treatments. Although occlusal orthodontics are widely used, their effectiveness remains

questionable [8,9]. Non-invasive medications consist anxiolytics, muscle relaxants, non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioids [4,10]. Similarly, there is no consensus regarding the long-term effectiveness of such oral or topical medications [11].

Minimally invasive treatments can target either extrinsic masticatory muscles or TMJ itself. Masticatory muscles (masseter, temporalis and lateral pterygoid) have been injected with botulinum toxin type A (Botox) for thirty years [12,13]. The findings of a literature review conducted using The Cochrane Controlled Trials Register between 1980 and 2012 suggest that there is level 1 evidence supporting the efficacy of Botox in the treatment of TMJD [14].

Minimally invasive treatments of TMJ itself include intra-articular injections, arthrocentesis, and arthroscopy. Intra-articular injections of corticosteroids into either one or both joint compartments improve TMJD symptoms [15,16]. Arthrocentesis is a lavage of the superior TMJ space by a saline solution. The pressure generated by irrigation may remove adhesions. Some authors proposed morphine irrigation after arthrocentesis [17]. The short and long term efficacy of this minimally invasive treatment is well-documented [17–19]. The miniaturization of endoscopes allowed TMJ arthroscopy. It provides adequate visualization and manipulation of pathological intra-articular tissues [20]. Small-diameter instruments permit their direct removal with a high rate of success [20,21].

Invasive treatment is the only option for patients suffering from ankylosis, neoplasia, dislocation, and developmental disorders [22,23]. It consists of open joint surgery, namely arthrotomy, which aims at either restoring joint tissues or completely replacing the TMJ with autogenous or alloplastic material (Figure 1).

Regarding invasive treatment of the TMJ disc, both its surgical repositioning and the removal of affected tissues have short-term efficacy [24]. The surgical removal of the entire affected TMJ disc (discectomy) is most of the time prescribed [25]. Although discectomy has a significant long-term efficacy, it does not prevent from osteoarthritis [26]. Along with poor remodeling of the mandibular condyle, destruction of its articular surface or osteophyte formation can occur [26]. It has been shown in vivo also that a functional disc is crucial for mandibular condyle regeneration [27].

The many options proposed for disc replacement have not shown satisfactory clinical outcomes: teflon-proplast or silicone synthetic implants [28,29], sear cartilage, autologous dermal graft [26], full-thickness skin graft, or pedicled temporalis muscle flap [23,30,31]. For instance, the clinically tested TMJ disc implants did not provide any significant advantage over discectomy, except for the reduction of clicking [4].

For severe TMJ degeneration, the total surgical joint replacement is currently prescribed. The first experiments on regeneration using alloplastic TMJ implants showed a tendency for premature failure. Subsequent immune reactions were triggered, therefore resulting in catastrophic joint damage [32,33]. Thus, TMJ regeneration strategies have been reconsidered with more caution. At the moment, the consensual strategy seems to recommend reconstruction of the TMJ using autologous tissues for young patients, and TMJ replacement using metallic prostheses for adults. With conventional alloplastic strategies, the articular surfaces can be affected by erosion or heterotopic bone formation [34]. Therefore, two-piece 3D custom-made prostheses include an ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) implant for the replacement of the temporal articular surface (mandibular fossa). Such prostheses seem to currently be the most satisfying solution available for total surgical joint replacement [35,36].

Tissue engineering of TMJ has been a primary concern in scientific discussion and practice. The limitations of current therapeutics for TMJD have led to an increased interest in regenerative strategies combining cells, implantable scaffolds and well-targeting bioactive molecules. The recent advances of regenerative medicine for orthopedics may contribute to meet the challenge of this specific complex regeneration.

2.2. Challenging Regeneration

Meeting the demands for anatomic, structural, and functional regeneration of TMJ is very challenging. Innovative strategies and biomaterials are absolutely crucial because TMJ can be considered as one of the most difficult tissues to regenerate.

The TMJ is an anatomic zone so narrow and dense that surgical access is not easy. Its limited blood supply and hence its very limited healing capacity do not facilitate regenerative strategies either.

The mechanical and structural (three-dimensional) properties of the mandibular condyle implant must match that of anatomic condyle for human clinical applications. Also, the implanted tissue-engineered mandibular condyle must have rapid and adequate remodeling potential allowing oral functions.

Histologically, the TMJ cartilage differs a lot from the other hyaline articular cartilages. Thus, regenerating this unique articular cartilage with its complex structure and organization is very tricky. TMJ regeneration means to be able to engineer a mandibular condyle implant with its unique cartilage and its underlying bone in a single osteochondral construct. The challenge in TMJ regeneration is to promote matrix synthesis and tissue maturation of chondrogenic and osteogenic cells in suitable scaffolds containing active molecules which are able to separately orchestrate osteogenesis and chondrogenesis (Figure 2).

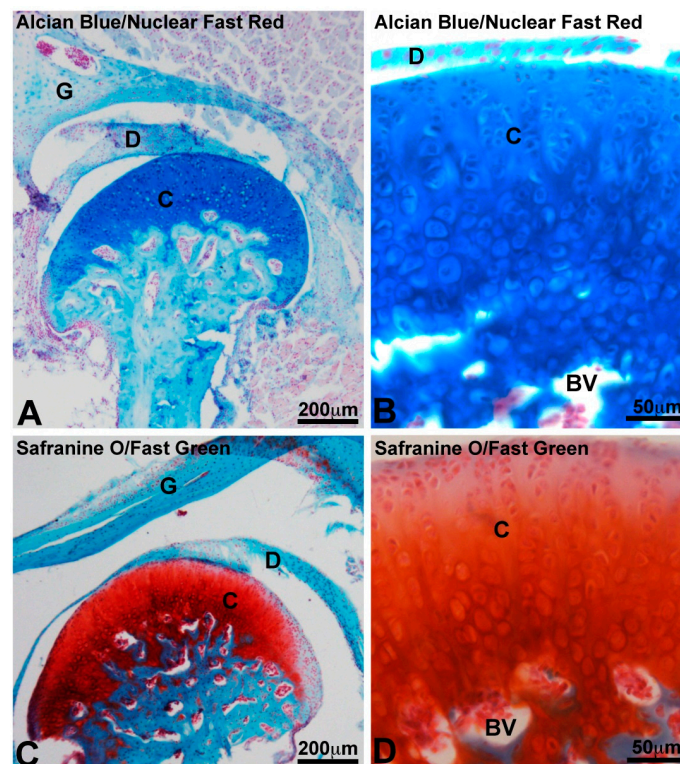


Figure 2. Histological organization of murine TMJ. TMJ is an articulation between the glenoid fossa of temporal bone (G) and mandibular condyle (C). TMJ disc cushioning articular mechanical stresses is fibrocartilaginous (D). TMJ condyle is made of a specific articular cartilage and a underlying bone containing blood vessels in medullar spaces (BV). Alcian Blue/Nuclear Fast Red specifically staining of mucopolysaccharides in blue (A,B) and Safranin O/Fast Green staining of cartilaginous proteoglycans in orange/red (C,D) highlight the osteochondral interface.

The success of TMJ regenerative strategy is not only measured by the restoration of function but also by the long-term prevention of ossified or fibrous adhesions which are the main complications of

engineered TMJ replacements [37]. Thus, pro-regenerative active molecules incorporated in scaffolds of engineered TMJ must also prevent any ossifications and any adhesions.

3. Histology and Macromolecular Biology of the TMJ

There is a continuous debate about the embryonic origin of mandibular articulating surface: blastemal or periosteal origin [38,39]. The thickness of condylar fibrocartilage in humans can reach 0.48 mm as a maximum and is subject to variations caused by age and functional conditions [40,41]. The articular surface of most synovial joints is covered by hyaline cartilage. It is not the case of the TMJ which has an articular surface covered by a layer of fibrous tissue [42]. This fibrous zone contains abundant type I collagen, while collagen type II is minimally present. Underlying this superficial fibrous zone, a fibrocartilage layer is described which can be subdivided schematically into proliferative and hypertrophic zones [42,43]. The proliferative zone functioning as a cell reservoir [44] is rich in type I collagen. In the fibrous and proliferative zones, the orientation of collagen fibers was revealed as anisotropic with initiation of antero-posterior alignment of the fibers [43,45]. A chondroitin sulfate-based proteoglycan resembling versican predominates in both of these zones [46,47]. The hypertrophic zone is rich in chondrocytes, in aggrecan and in collagen type II. Collagen types I and X are also detected [47]. TMJ condylar fibrocartilage contains less glycosaminoglycans (GAGs) than hyaline articular cartilage [48] (Figures 3 and 4).

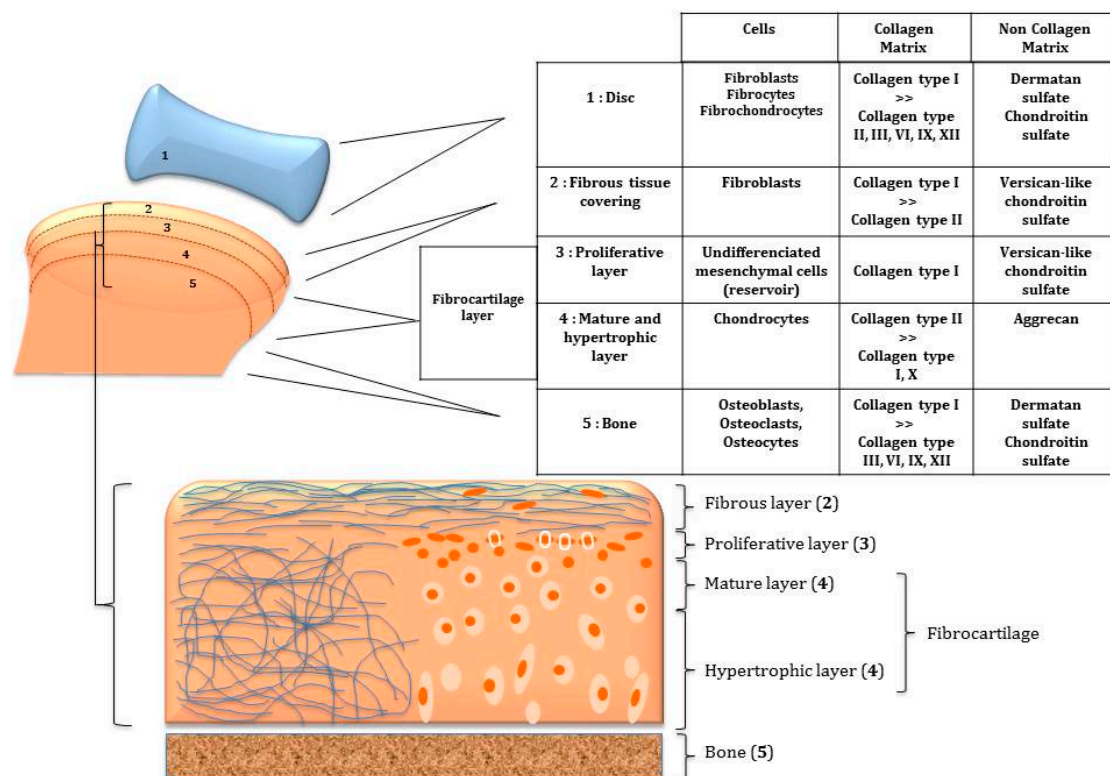


Figure 3. Scheme of the composition of the five compartments of TMJ to regenerate. Their cellular and macromolecular compositions differ of lot. An osteochondral molecular gradient of functionalization able to orchestrate the 3D formation of different TMJ tissues is the key of its regeneration.

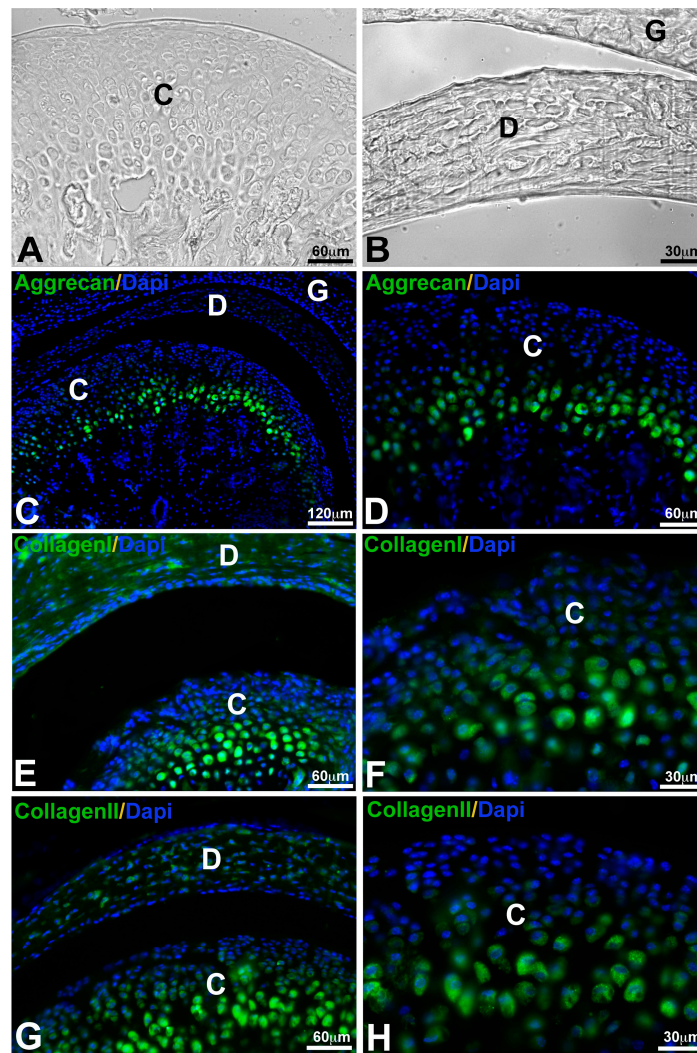


Figure 4. Expression of different conjunctive macromolecules in murine TMJ detected by immunofluorescence. TMJ observed by phase contrast microscope (A,B), Aggrecan expressed by chondrocytes in hypertrophic layer of mandibular condyle (C,D), type I collagen in the disc and in the fibrocartilage layer of mandibular condyle (E,F) and type II collagen in the fibrocartilage layer of mandibular condyle (G,H). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Condyle (C); Disc (D); Glenoid fossa (G).

The TMJ disc attached to the condyle and temporal bone by fibrous connective tissue measures 14 mm antero-posteriorly and 23 mm medico-laterally in humans [49]. Its periphery is thicker than the center, consequently its shape is biconcave. Populations of cells found in the TMJ disc differ from those of hyaline cartilage and are heterogeneous: fibroblasts, fibrocytes and fibrochondrocytes [50]. The periphery and attachments of the disc are well-vascularized but its central heart is avascular [51]. Type I collagen predominates but other collagens are found: types II, III, VI, IX, and XII [52]. Collagens in the disc are mostly anisotropic [53]. Orientation of fibers is antero-posterior in the center and more circumferential in the peripheral area [53]. Human disc mechanical tensile properties in anteroposterior and mediolateral directions reflect this anisotropy of the collagen fiber arrangement [49]. The particularity of these collagen fibers is to be crimped. It may improve the mechanical properties of the disc, in particular under tension [54]. TMJ disc contains less glycosaminoglycans (GAGS) than hyaline articular cartilage [55]: fraction of GAGS ranges from 1 to 10% by dry weight. Dermatan sulfate and chondroitin sulfate are the most abundant GAGS [56] (Figures 3 and 4).

4. TMJ Tissue Engineering

4.1. Cell Strategies

Two methods are possible in cartilage and bone engineering: (1) *in situ* tissue engineering, which involves an incorporation of an acellular scaffold matrix attracting local cells (cell homing) guiding the process of regeneration; (2) *ex vivo* cell seeding on the scaffold, which provides enough competent cells to orchestrate the regenerative mechanism [57]. The second strategy appears better for TMJ regeneration because of its limited capacities of self-repair and the rapid regeneration expected. Whatever the cell origin, low-intensity pulsing ultrasound on mandibular condyle enhances its regeneration [58]. In the same way, culture in spinner flasks, increases matrix production of TMJ disc cells as compared to static conditions [59].

Autogenic cells are the ideal cell source for tissue regeneration. Fibrochondrocytes from mandibular condyle seeded on polyglycolic acid (PGA) scaffolds showed weaker regenerative capacities than chondrocytes from ankle joint. Notably, they produced less GAGs and collagens [44]. In the same way, TMJ disc cells as compared to costal chondrocytes have inferior biochemical qualities and so produce less GAGs and collagens [60–62]. These limited capacities of TMJ fibrochondrocytes and the fact that it would be very difficult to have enough competent cells from the diseased TMJ, lead to find another sources of competent cells [63].

To regenerate TMJ condylar cartilage, primary costal-chondrocytes or hyaline cartilage cells from all cartilages in the body can be used [44,62]. Stem cells from the synovial capsule surrounding the joint can be extracted to generate new cartilage but their properties are reduced compared with other stem cells [64]. Human umbilical cord-derived mesenchymal-like stem cells (HUCM) are also proposed for TMJ regeneration [63]. Compared with the fibrochondrocytes from mandibular condyle, they promoted higher collagen types I and II, GAGs and cell colonization inside PGA scaffolds [63].

Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) provide a high rate of cell growth and division. Their advantage is the important volume of cells available and the numerous kind of possible differentiation. They can promote bone and cartilage regeneration of TMJ. Their disadvantage is their tendency to endochondral ossification [64–67].

Adipose stem cells (ADSCs) could be a potential cell source for TMJ engineering [65]. They are pluripotent mesenchymal stem cells that present multilineage differentiation [68]. These stem cells reaped from adipose tissue are easily obtainable whatever the quantity needed [67]. The implantation site of TMJ having a low vascularization, the capacity of ADSCs to undergo a low oxygen environment is very interesting. They can replicate the extracellular matrix environment of the implantation site, with the different types of collagen [65].

Different tooth-derived stem cells are also potential competent cells for TMJ regeneration. periodontal ligament stem cells (PDLSCs) and stem cells from apical papilla (SCAPs) similar to mesenchymal stem cells (MSCs) [69,70] are able to differentiate into chondrocytes and osteoblasts [71,72]. Dental follicle progenitor cells (DFPCs) which are stem cells from dental follicles involved in early tooth formation phases [73] can also differentiate into chondrocytes and osteoblasts [69,74].

Dental pulp stem cells (DPSCs) mesenchymal stem cells from dental pulp [75] are known to differentiate into different kinds of cells, such as osteoblasts and chondrogenic cells [69]. They are particularly adequate for regeneration of mineralized tissue [76]. Their multipotency, proliferation rate and availability appear better than those of BMSCs.

The capacity of osteogenic differentiation of DPSCs is well-documented [77–79]. DPSCs and collagen sponges showed excellent results inside human mandibular defects [71]. In a rabbit model of alveolar bone defects, it has shown high expression of BMP-2 by DPSCs as well as a high amount of bone formation [80]. This high expression of BMP-2 is the key for the differentiation of DPSCs [81–83]. The simple immobilization of DPSCs in scaffolds activates their osteogenic differentiation [84].

For regeneration of discal fibrocartilage, dermal fibroblasts are promising. Easily available, these autologous cells seeded in quantity and treated with IGF-1 showed a high chondrogenic potential [85]. For disc regeneration, seeding density must be carefully controlled in order to not decrease biomechanical properties. Increasing the cell number up to 1.2×10^8 cells/mL of scaffold volume enhanced fibrocartilaginous deposition but modified mechanical properties. The lowest seeding density that promotes functional properties close to in vivo conditions must be identified for each cell source to regenerate TMJ disc [85].

These stem cells able to undergo both chondrogenic and osteogenic differentiation are crucial for TMJ regeneration. The best strategy should be to use a unique stem cell type able to support in a unique scaffold biphasic osteochondral regeneration orchestrated by active pro-chondrogenic and pro-osteogenic molecules.

4.2. Scaffolds for TMJ Cartilage Regeneration

Hyaluronic acid (HA) is a polysaccharide abundant in cartilaginous matrices, which constitutes an ideal chondrogenic microenvironment, ideal for cartilage regeneration [86]. HA hydrogels promote the differentiation of stem cells into chondrocytes and their synthesis of cartilaginous matrix [87] and support a level of chondrogenic protein expression required for cartilage regeneration [88]. Incorporation of other molecules improves mechanical properties of HA scaffolds to support cartilage tissue regeneration.

Agarose is a polysaccharide extracted from seaweed, used as agar for cell culture. Its advantage is its adaptable stiffness, which allows an easy variation of mechanical features of the scaffold [89]. Agarose scaffolds promote differentiation of different stem cells, such as MSCs and ADSCs into chondrocytes [90–92].

Poly-vinyl alcohol (PVA) is a hydrophilic polymer which is also very appropriate for cartilage regeneration due to its high water content and its elastic properties [93]. Its capacity to promote repair of articular cartilage is well-documented [94–96]. Modifications of parameters in PVA hydrogel synthesis allow suitable tensile strength [97] and elastic modulus [98] to sustain cartilage regeneration. PVA scaffolds retain long enough their chondrogenic and mechanical properties in vivo. Indeed, the rate of degradation of PVA is enough low enough to give time for cartilage to regenerate [99].

Poly-L-lactic-coglycolic acid (PLGA) is a synthetic polymer approved by the FDA for clinical applications which is greatly interesting for cartilage regeneration. The versatility of its structure allows also a modulation of mechanical properties of the scaffold. PLGA scaffolds promote colonization and differentiation of MSCs in vivo [100]. PLGA interacts positively with chondrocytes and other resident cells of the TMJ disc to regenerate. Nevertheless, it does not interact well with native collagens of the TMJ disc [101]. Incorporation of other polymers in PLGA scaffolds improves their chondrogenesis capacity and reduces the process of degeneration [102].

4.3. Scaffold for Fibrocartilage Regeneration

For the specific regeneration of TMJ disc, a variety of scaffolds have shown their efficacy in vitro and in vivo [103,104]. An aporous scaffold of polyglycerol sebacate (PGS), an elastomer, was used for regeneration of the TMJ disc. PGS scaffolds revealed to be favorable for culture of goat fibrochondrocytes and therefore for TMJ disc regeneration [105]. Poly-glycolique acid (PGA) is a biodegradable polyester. An engineered disc was proposed, made by PGA mesh scaffold-included cells [106]. Scaffolds of PGA have shown their capacity to support the culture of stem cells from human umbilical cord, their chondrogenic differentiation and expansion [63]. Poly-L-Lactic acid (PLLA) is interesting for its slow degradation rate. PLLA scaffolds seeded with porcine TMJ cells and treated with TGF β -1 improved mechanicals properties and showed higher collagen and GAGS deposition as compared to PGA scaffolds [4,107]. A mixed scaffold made by polytetrafluorethylene monofilaments, PLA monofilaments, polyamide monofilaments, and natural bone has been shown to support human and porcine disc cells culture and expansion [108]. An acellular regenerative template

for reconstruction of TMJ disc made of porcine-derived extracellular matrix was studied. Implantation of this scaffold after six months showed attractive results [109].

4.4. Scaffold for Osteochondral Regeneration

Collagens are natural polymers very convenient for osteochondral regeneration and also for total TMJ disc reconstruction [110]. Collagens can be used as a gel which gives the opportunity to be injected into the narrow space of TMJ. Rigidity must be weak enough to allow intra-articular injection and important enough to allow cell adhesion and proliferation. Composite scaffolds incorporating collagens optimize the mechanical properties of osteochondral regenerative implants [111]. A collagen scaffold associated with GAGs increased chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a rat model [112]. Collagen scaffolds with hydroxyapatite and platelet-rich plasma promoted regeneration of entire TMJ condyles in children and adolescents suffering of TMJ ankyloses. Other clinical investigations are required to evidence the long-term efficiency of these scaffolds [113].

Gelatin, derived from the lysis of collagen is also appropriate for osteochondral regeneration. Gelatin extracellular environment is favorable to the adhesion and colonization of chondrocytes [114]. Gelatin scaffolds with chitosan have shown their capacity to support chondrogenic differentiation in vitro and in vivo [115,116].

Nanofibers constitute pro-regenerative biomimetic extracellular matrices very interesting for tissue regeneration. The electrospinning technique makes it possible to obtain different matrices made of synthetic and natural polymers whose nanofiber diameter is close to the size of the collagen nanofibers (50–500 nm). The network of electrospun nanofibers as well as the micropores formed (less than 100 μm in diameter) mimics the structure of the connective tissue matrix [117,118]. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a biodegradable synthetic polymer, approved by the FDA for clinical applications. Electrospun matrices of PCL show favorable results for osteochondral regeneration [119–121] (Figure 5).

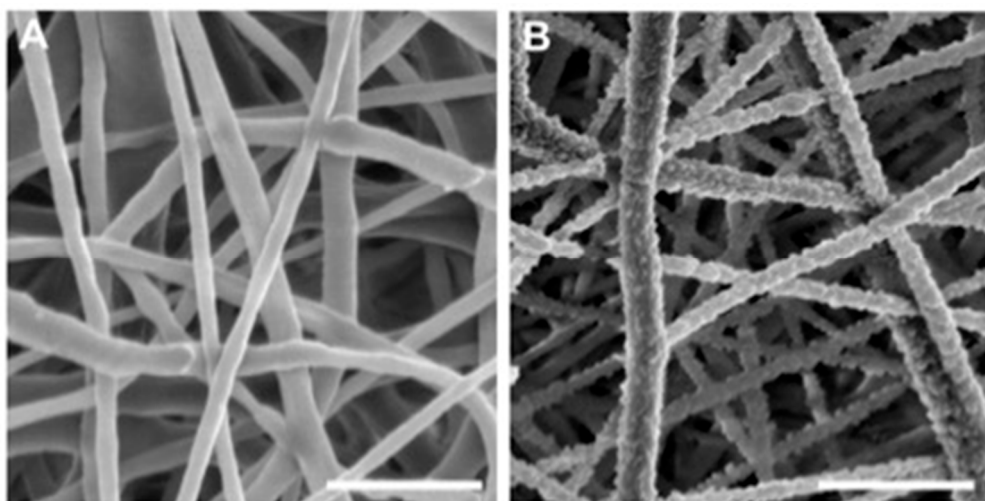


Figure 5. Scanning electron microscopy (SEM) observations of nanofibrous pro-regenerative biomimetic implants: Poly(ϵ -caprolactone) implant with an electrospun nanofiber network mimicking the pattern of the connective tissue matrix (A); Poly(ϵ -caprolactone) implant functionalized with nanoreservoirs of growth factors on the surface of nanofibers (B). Scale bar: 3 μm .

Fibrin presents a great interest for osteochondral regeneration. Most of studies deal with fibrin scaffolds for culture and differentiation of stem cells [89]. Fibrin-based scaffolds functionalized with adequate active molecules sustain differentiation of mesenchymal stem cells for cartilage [122,123] or bone [124,125] regeneration.

These scaffolds, able to support both cartilage and bone regeneration are crucial for TMJ regeneration. They give the opportunity to build an osteochondral construct in the same scaffold, i.e., a sole scaffold but biphasic due to its functionalization.

4.5. Growth Factors of Interest

Growth factors help tissue regeneration at different levels. They can promote the differentiation and proliferation of cells. They can support extracellular matrix synthesis and its mineralization [126]. They can also biologically modulate the regeneration in order to be self-limited and prevent ossification and fibrous adhesion [37].

The three key growth factors for TMJ regeneration are basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). They are able to maintain disc-like tissue in culture [127,128] and to induce BMSCs differentiation into fibroblast-like cells, synthesizing discal matrix of type I collagen and glycosaminoglycans (GAGs) [129,130].

The effect of IGF-1 on stimulating chondrogenesis is well-documented in vitro and in vivo. In particular, it increases both GAG and collagen contents of the engineered cartilage [131,132]. The fibrochondrocytes from mandibular condyle are less responsive to IGF-1 than hyaline chondrocytes [44].

TGF- β 1 shows some positive effects on cellular proliferation and on the production of extracellular matrix in TMJ disc implants [133]. It induces a significant increase in the total fraction of collagen and matrix deposition inside the engineered cartilage [134]. TGF- β 1 and IGF-1 promote cellular proliferation and secretion of type I collagen and GAGs in vitro on engineered mandibular condyle [130]. TGF- β 1 increased collagen synthesis, Young's modulus and compressive stiffness in co-culture of articular chondrocytes and fibrochondrocytes [133].

The stimulating effect of bFGF on cell proliferation and production of collagen is well-known. GAGs synthesis is also significantly stimulated by bFGF [7]. bFGF and IGF-1 synergistically better promote the proliferation of disc cells [106] than the synthesis of the TMJ disc matrix [65]. In 2D culture, 10 ng/mL of bFGF increased the proliferation of fibrochondrocytes from mandibular condyle more than the 10 ng/mL of TGF- β 1 and IGF-1 [135].

Platelet derivative growth factor (PDGF) significantly increases the proliferation rate of the TMJ-disc derived cells, collagen and hyaluronic acid synthesis in engineered TMJ disc. It upregulates RNA levels of type I and II collagens, matrix metalloproteinases (MMPs), and their specific tissue inhibitors (TIMPs) [136]. PDGF also significantly increases GAGs synthesis [7].

Over-expression of some interesting growth factors for tissue regeneration has been evidenced in malignant tumors. The debate about their oncogenic capability still hounds their clinical employment for tissue regeneration of the oral and maxillofacial region [137]. Finally, it is the drug delivery system of the active molecule, which is crucial.

5. Drug Delivery Systems

Various technologies for incorporation of growth factors into scaffolds are possible. The release of growth factors must match the rate of healing and regeneration [138,139]. The best drug delivery system can be achieved by incorporating active molecules into the scaffold. Immersion of scaffold in a solution of growth factors allows a snappy release in random distribution. Covalent binding of growth factors to the scaffold improves the control of the release. The covalent linkage may be sluggish and allows a more suitable release corresponding to cellular requests [140].

Functionalization can otherwise be accomplished by gene therapy. Gene transfer can also be conducted by viral or non-viral transduction. For tissue regeneration, the most appropriate method for gene transfer uses retroviruses, adenoviruses or adeno-associated viruses [141–143]. These functionalizations are optimized through nanotechnologies. Nanotechnologies could meet the challenge of the regeneration of ATM. To build drug delivery systems at a nanoscale level increases the quality of targeting and the control of distribution of the active molecules. It allows reduction of

their quantity, thereby their side effects and their cost. Concentration of different active molecules allowed by nanotechnologies is also very advantageous for orchestration of different stages of TMJ regeneration and for synergetic action of growth factors.

Nanofunctionalization of scaffolds made of electrospun nanofibers is possible by different techniques: plasma or wet chemical treatment, surface graft polymerization and co-axial electrospinning [144]. The co-axial technique consists of incorporating active molecules into the polymer solution to be electrospun and so of encapsulating them inside the nanofibers for a delayed action [145]. Electrospinning can be associated with electrospraying in order to functionalize nanofibers during their production [146]. The strategy of nanofibers functionalization by BMP-2 or BMP-7 nanoreservoirs is very effective for bone regeneration. This strategy also allows the differentiation of MSCs, and accelerates the tissue regeneration *in vivo* [147–149]. Besides, co-functionalization allowed by nanoreservoirs on nanofibers can promote regeneration but also normalization of inflammation at the implantation site [150] (Figure 5B).

Intra-articular drug delivery methods applied to the TMJ seem very attractive for both pain management and regenerative strategies. Benefits of current methods of intra-articular injection are controversial. Some alarming reports describing post-injection complications have discouraged their use for TMJ pain [151,152]. The risk of complications is correlated to the number of injections and so reduced by increasing the half-life of the drug and by promoting slow-release of intra-articular medications [151,152]. Hydrogels, polymeric microparticles and liposomes are suitable drug delivery systems. They limit rapid degradation and clearance of injected active molecules and therefore avoid frequent injections and high concentrations [153]. Intra-articular drug delivery can be convenient to modify the joint environment prior to implantation or to deliver pro-regenerative molecules in a surgically controlled fashion. It avoids systemic drug release, ectopic effects and other complications [153]. Microparticles of PLGA have been revealed to be biocompatible and suitable for intra-articular delivery to TMJ in rat and therefore can support regenerative strategies [154]. Controlled release of anti-inflammatory siRNA from biodegradable microparticles of PLGA have been proposed for intra-articular delivery to TMJ [155].

6. Osteochondral Regeneration

Bone and cartilage regeneration occur in very different competing conditions. To engineer a biphasic osteochondral implant is therefore challenging. Ideal approaches for TMJ regeneration are a single scaffold functionalized by an osteochondral molecular gradient and a unique stem cell population associated using rapid and synchronized tissue engineering techniques [156]. Understanding molecular interactions between cells of the osteochondral interface is crucial for engineering innovative osteochondral implants [157].

In large osteochondral defects of goat condyles, PLGA composite implants seeded with Nel-related protein 1 (NRP1) modified-autologous BMSCs were able to regenerate bone and cartilage tissue after transplantation. The fibrocartilage was regenerated six weeks after transplantation and the subchondral bone native articular cartilage after 24 weeks [158].

Promising results in mandibular condyle tissue regeneration were obtained after subcutaneous implantation of athymic mice with PGA and PLA scaffolds seeded with calf osteoblasts and chondrocytes in athymic mice. Analysis after 12 weeks of implantation evidenced the condylar shape of the neoformed bone and the formation of hyaline cartilage on the articular surface and of trabecular bone [159].

Hyper-hydrated collagen gels seeded with MSCs preconditioned in two different media were proposed with one osteogenic and one chondrogenic medium at each extremity. After seven days of *in vitro* culture, distinct bone-like and cartilage-like areas were observed which resembled to primordial joint-like structure [156].

The same strategy of gradient-based scaffolding was proposed with PLGA microspheres: implants were functionalized with TGF- β 1 at the cartilaginous end and BMP-2 at the bony end. It promoted

neoformed osteochondral tissue after six weeks of implantation in mandibular condyle defects of New Zealand rabbits [158,160].

A hybrid compartmented implant was proposed with cartilage-promoting alginate/HA hydrogel at the cartilaginous end and bone-promoting nanofibrous collagen membrane at the bony end. This biphasic scaffold promoted *in vitro* osteogenic and chondrogenic differentiation of a single stem cell population (human MSCs). A gradient of mineralization for articular cartilage and a natural 'glue' at the osteochondral interface were obtained *in vitro* [161].

7. 3D Regeneration of TMJ

Whatever the strategies used, the regeneration of TMJ must match the anatomic, structural, and functional particularities of the mandibular condyle and its disc.

A bone implant of biodegradable PLGA seeded with porcine bone marrow MSCs was designed as mandibular condyle [162]. Similarly, implants of TMJ disc were engineered in the shape of TMJ discs [58,163]. Rat MSCs seeded into condyle-shaped PEG hydrogel were able to differentiate into chondrogenic and osteogenic cells [164]. Porcine derived extracellular matrix scaffolds were designed to mimic the size and shape of the TMJ. Their implantation in a canine model of TMJ discectomy led to regeneration of a functional TMJ disc [109].

The application of static uniaxial load on shape-specific TMJ disc engineered by co-culture of articular chondrocytes and meniscal fibrochondrocytes increased its functional properties. It optimized GAG synthesis and anisotropic properties resembling those of a TMJ disc [165].

Current TMJ replacement is made by prostheses. These alloplastic strategies are constantly improving in order to obtain personalized 3D prosthesis. Personalized prostheses of TMJ fabricated by 3D-printing were designed and implanted in patients. Compared with stock devices, these personalized 3D prostheses present better biomechanical and clinical outcomes. This 3D-printing technique also improves the surgery. Indeed, the positioning of an implant is easier, due to its optimal shape and to the opportunity to have an optimal 3D surgical guide [166–170].

These crucial clinical advances of personalized 3D prosthesis benefit regenerative strategies. Indeed, personalized 3D scaffolds can be considered. In that direction, the computer-designed nanofibrous and microporous scaffolds proposed by Chen et al. are very attractive and lead the way of a personalized 3D bone regenerative nanomedicine [171].

Currently, different techniques exist to produce 3D scaffolds such as phase separation, self-assembly, electrospinning and bioprinting. As seen previously, two points are necessary for the 3D scaffold to help and favor tissue regeneration: growth factors and living cells. Electrospinning can combine these three parameters. It allows 3D and porous structures constituted of nanofibers mimicking extracellular matrix. It can also be tuned to modulate biodegradability and resistance depending of the type of tissue to regenerate. Living cells can be added on the 3D scaffold for colonization of the matrix, or directly be included inside fibers using coaxial techniques [172,173]. 3D bioprinting also brings together the three parameters necessary for tissue regeneration. Compared to electrospinning, 3D bioprinting can reproduce structure and shape of tissues identical to those found *in vivo* [174]. This technique works in a layer-by-layer fashion, in which cells and growth factors can be included, allowing the control of the entire architecture of the tissues to be reproduced. These technologies participate to significant advances in tissue engineering and are promising for future clinical regenerative strategies.

A personalized 3D polyamide implant coated by nanoscale hydroxyapatite was rapidly designed and manufactured by computer in replacement of mandibular condyle. Its implantation into a patient showed positive clinical outcomes [175].

3D printed scaffolds were engineered with a spatiotemporal delivery of connective tissue growth factor (CTGF) and TGF- β 3 encapsulated in microparticles in order to build a rabbit TMJ disc. Their implantation evidenced positive results. Significant improvement of regeneration was observed with the spatiotemporal gradient of functionalization [176]. Same approaches were developed to

engineer human 3D-printed TMJ discs. 3D-printed scaffolds mimicking anisotropic collagen alignment of the human TMJ disc were functionalized by microparticles of CTGF and TGF- β 3 and then colonized by human MSCs over six weeks. Synthesis and remodeling of the matrix promoted by this 3D growth factor delivery system allow the obtainment of an implant with heterogeneous fibrocartilaginous matrix close to a human TMJ disc. This 3D reproduction of matrix heterogeneity gives to the implant viscoelastic properties which are region-dependent and so crucial for its function in future clinical applications [177].

8. Conclusions

Prevalence of affections of TMJ is important. Severe affections are preferentially concerned by regeneration. Currently, they are treated by arthrotomy and implantation of prostheses. The recent advances in regenerative medicine for orthopedics may provide solutions for TMJ regeneration. However, anatomic, structural, and functional regeneration of TMJ is very challenging and specific. The fibrocartilaginous property of the mandibular condyle and its tight link with its fibrocartilaginous disk contribute to modifying issues. The difficulty is not to obtain a pure hyaline cartilage with an underlying bone as for the other articulations. The main issue is to get a long-term fibrocartilage well-separated from its underlying bone without ossifications or fibrous adhesions which are dramatic for crucial oral functions of patients. At present, concrete progress of TMJ arthroscopy allows adequate visualization and manipulation of pathological intra-articular tissues and motivate the emergence of innovative and specific regenerative strategies of TMJ. Numerous proposals of interest have been presented focusing on suitable cells, scaffolds or active molecules for TMJ regeneration. Global strategies, able to support the entire mandibular condyle regeneration, are very attractive. So, the desired approach is a unique scaffold inducing an osteochondral molecular gradient containing a single stem cell population able to undergo osteogenic and chondrogenic differentiation such as BMSCs, ADSCs or DPSCs. The key to this complex regeneration is the functionalization by active molecules such as IGF-1, TGF- β 1 or b-FGF. This regeneration can be optimized by nano/micro-assisted functionalization and by spatiotemporal drug delivery systems orchestrating the 3D formation of TMJ tissues.

Acknowledgments: We are indebted to Faculty of Dental Surgery (University of Strasbourg, UDS) for supporting Laetitia Keller, Ysia Idoux-Gillet, Marion Pugliano and Pascale Schwinté.

Author Contributions: Xavier Van Bellinghen, Ysia Idoux-Gillet, Marion Pugliano, Nadia Benkirane-Jessel, Jean Christophe Lutz and Florence Fioretti wrote the paper. Marion Strub, Fabien Bornert, Francois Clauss, Laetitia Keller and Sabine Kuchler-Bopp provided their expertise and contributed to the figures. Pascale Schwinté provided her expertise and contributed to revisions.

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

References

1. Gopal, S.K.; Shankar, R.; Vardhan, B.H. Prevalence of temporo-mandibular disorders in symptomatic and asymptomatic patients: A cross-sectional study. *Int. J. Adv. Health Sci.* **2014**, *1*, 14–20.
2. Su, N.; Liu, Y.; Yang, X.; Shen, J.; Wang, H. Association of malocclusion, self-reported bruxism and chewing-side preference with oral health-related quality of life in patients with temporomandibular joint osteoarthritis. *Int. Dent. J.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tanaka, E.; Detamore, M.S.; Mercuri, L.G. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: Etiology, diagnosis, and treatment. *J. Dent. Res.* **2008**, *87*, 296–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Aryaei, A.; Vapniarsky, N.; Hu, J.C.; Athanasiou, K.A. Recent tissue engineering advances for the treatment of temporomandibular joint disorders. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2016**, *14*, 269–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Zarb, G.A.; Carlsson, G.E. Temporomandibular disorders: Osteoarthritis. *J. Orofac. Pain* **1999**, *13*, 295–306. [[PubMed](#)]

6. Sporniak-Tutak, K.; Janiszewska-Olszowska, J.; Kowalczyk, R. Management of temporomandibular ankylosis—Compromise or individualization—A literature review. *Med. Sci. Monit.* **2011**, *17*, RA111–RA116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Murphy, M.K.; MacBarb, R.F.; Wong, M.E.; Athanasiou, K.A. Temporomandibular disorders: A review of etiology, clinical management, and tissue engineering strategies. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2013**, *28*, e393–e414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ingawalé, S.; Goswami, T. Temporomandibular joint: Disorders, treatments, and biomechanics. *Ann. Biomed. Eng.* **2009**, *37*, 976–996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Al-Ani, M.Z.; Davies, S.J.; Gray, R.J.; Sloan, P.; Glenny, A.M. Stabilisation splint therapy for temporomandibular pain dysfunction syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2004**, CD002778. [[CrossRef](#)]
10. Liu, F.; Steinkeler, A. Epidemiology, diagnosis, and treatment of temporomandibular disorders. *Dent. Clin. N. Am.* **2013**, *57*, 465–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Mujakperuo, H.R.; Watson, M.; Morrison, R.; Macfarlane, T.V. Pharmacological interventions for pain in patients with temporomandibular disorders. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2010**, CD004715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bakke, M.; Møller, E.; Werdelin, L.M.; Dalager, T.; Kitai, N.; Kreiborg, S. Treatment of severe temporomandibular joint clicking with botulinum toxin in the lateral pterygoid muscle in two cases of anterior disc displacement. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2005**, *100*, 693–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sunil Dutt, C.; Ramnani, P.; Thakur, D.; Pandit, M. Botulinum toxin in the treatment of muscle specific oro-facial pain: A literature review. *J. Maxillofac. Oral Surg.* **2015**, *14*, 171–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Persaud, R.; Garas, G.; Silva, S.; Stamatoglou, C.; Chatrath, P.; Patel, K. An evidence-based review of botulinum toxin (Botox) applications in non-cosmetic head and neck conditions. *JRSM Short Rep.* **2013**, *4*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Dym, H.; Bowler, D.; Zeidan, J. Pharmacologic treatment for temporomandibular disorders. *Dent. Clin. N. Am.* **2016**, *60*, 367–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Machado, E.; Bonotto, D.; Cunali, P.A. Intra-articular injections with corticosteroids and sodium hyaluronate for treating temporomandibular joint disorders: A systematic review. *Dent. Press J. Orthod.* **2013**, *18*, 128–133. [[CrossRef](#)]
17. Brennan, P.A.; Ilankovan, V. Arthrocentesis for temporomandibular joint pain dysfunction syndrome. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2006**, *64*, 949–951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Carvajal, W.A.; Laskin, D.M. Long-term evaluation of arthrocentesis for the treatment of internal derangements of the temporomandibular joint. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2000**, *58*, 852–855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Monje-Gil, F.; Nitzan, D.; González-García, R. Temporomandibular joint arthrocentesis. Review of the literature. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* **2012**, *17*, e575–e581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Dym, H.; Israel, H. Diagnosis and treatment of temporomandibular disorders. *Dent. Clin. N. Am.* **2012**, *56*, 149–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Rigon, M.; Pereira, L.M.; Bortoluzzi, M.C.; Loguercio, A.D.; Ramos, A.L.; Cardoso, J.R. Arthroscopy for temporomandibular disorders. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2011**, CD006385. [[CrossRef](#)]
22. Elgazzar, R.F.; Abdelhady, A.I.; Saad, K.A.; Elshaal, M.A.; Hussain, M.M.; Abdelal, S.E.; Sadakah, A.A. Treatment modalities of TMJ ankylosis: Experience in Delta Nile, Egypt. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2010**, *39*, 333–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dimitroulis, G. Temporomandibular joint surgery: What does it mean to the dental practitioner? *Aust. Dent. J.* **2011**, *56*, 257–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Dolwick, M.F. Disc preservation surgery for the treatment of internal derangements of the temporomandibular joint. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2001**, *59*, 1047–1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Miloro, M.; Henriksen, B. Discectomy as the primary surgical option for internal derangement of the temporomandibular joint. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2010**, *68*, 782–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dimitroulis, G. Condylar morphology after temporomandibular joint discectomy with interpositional abdominal dermis-fat graft. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2011**, *69*, 439–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hayashi, H.; Fujita, T.; Shirakura, M.; Tsuka, Y.; Fujii, E.; Terao, A.; Tanimoto, K. Role of articular disc in condylar regeneration of the mandible. *Exp. Anim.* **2014**, *63*, 395–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Kaplan, P.A.; Ruskin, J.D.; Tu, H.K.; Knibbe, M.A. Erosive arthritis of the temporomandibular joint caused by Teflon-Proplast implants: Plain film features. *Am. J. Roentgenol.* **1988**, *151*, 337–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Westesson, P.L.; Eriksson, L.; Lindström, C. Destructive lesions of the mandibular condyle following discectomy with temporary silicone implant. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **1987**, *63*, 143–150. [[CrossRef](#)]
30. Dimitroulis, G.; Slavin, J. Histological evaluation of full thickness skin as an interpositional graft in the rabbit craniomandibular joint. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2006**, *64*, 1075–1080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Bradley, P.; Brockbank, J. The temporalis muscle flap in oral reconstruction. A cadaveric, animal and clinical study. *J. Maxillofac. Surg.* **1981**, *9*, 139–145. [[CrossRef](#)]
32. Detamore, M.S.; Athanasiou, K.A.; Mao, J. A call to action for bioengineers and dental professionals: Directives for the future of TMJ bioengineering. *Ann. Biomed. Eng.* **2007**, *35*, 1301–1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dimitroulis, G. The prevalence of osteoarthritis in cases of advanced internal derangement of the temporomandibular joint: A clinical, surgical and histological study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2005**, *34*, 345–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mercuri, L.G. Alloplastic temporomandibular joint replacement: Rationale for the use of custom devices. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2012**, *41*, 1033–1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Sidebottom, A.J. Alloplastic or autogenous reconstruction of the TMJ. *J. Oral Biol. Craniofac. Res.* **2013**, *3*, 135–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gerbino, G.; Zavattero, E.; Bosco, G.; Berrone, S.; Ramieri, G. Temporomandibular joint reconstruction with stock and custom-made devices: Indications and results of a 14-year experience. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **2017**, *45*, 1710–1715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Mehrotra, D. TMJ bioengineering: A review. *J. Oral Biol. Craniofac. Res.* **2013**, *3*, 140–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Symons, N.B. The development of the human mandibular joint. *J. Anat.* **1952**, *86*, 326–332. [[PubMed](#)]
39. Baume, L.J. Ontogenesis of the human temporomandibular joint. I. Development of the condyles. *J. Dent. Res.* **1962**, *41*, 1327–1339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Hansson, T.; Oberg, T.; Carlsson, G.E.; Kopp, S. Thickness of the soft tissue layers and the articular disk in the temporomandibular joint. *Acta Odontol. Scand.* **1977**, *35*, 77–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bibb, C.A.; Pullinger, A.G.; Baldiaceda, F. Serial variation in histological character of articular soft tissue in young human adult temporomandibular joint condyles. *Arch. Oral Biol.* **1993**, *38*, 343–352. [[CrossRef](#)]
42. Ngan, P.W.; Deguchi, T.; Roberts, E.W. *Orthodontic Treatment of Class III Malocclusion*; Benthan Science: Charjah, UAE, 2014; ISBN 978-1-60805-686-6.
43. Singh, M.; Detamore, M.S. Biomechanical properties of the mandibular condylar cartilage and their relevance to the TMJ disc. *J. Biomech.* **2009**, *42*, 405–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wang, L.; Lazebnik, M.; Detamore, M.S. Hyaline cartilage cells outperform mandibular condylar cartilage cells in a TMJ fibrocartilage tissue engineering application. *Osteoarthr. Cartil.* **2009**, *17*, 346–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Detamore, M.S.; Athanasiou, K.A. Tensile properties of the porcine temporomandibular joint disc. *J. Biomech. Eng.* **2003**, *125*, 558–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Roth, S.; Müller, K.; Fischer, D.C.; Dannhauer, K.H. Specific properties of the extracellular chondroitin sulphate proteoglycans in the mandibular condylar growth centre in pigs. *Arch. Oral Biol.* **1997**, *42*, 63–76. [[CrossRef](#)]
47. Kuroda, S.; Tanimoto, K.; Izawa, T.; Fujihara, S.; Koolstra, J.H.; Tanaka, E. Biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **2009**, *17*, 1408–1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Delatte, M.; Von den Hoff, J.W.; van Rheden, R.E.; Kuijpers-Jagtman, A.M. Primary and secondary cartilages of the neonatal rat: The femoral head and the mandibular condyle. *Eur. J. Oral Sci.* **2004**, *112*, 156–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kalpakci, K.N.; Willard, V.P.; Wong, M.E.; Athanasiou, K.A. An interspecies comparison of the temporomandibular joint disc. *J. Dent. Res.* **2011**, *90*, 193–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Detamore, M.S.; Hegde, J.N.; Wagle, R.R.; Almarza, A.J.; Montufar-Solis, D.; Duke, P.J.; Athanasiou, K.A. Cell type and distribution in the porcine temporomandibular joint disc. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2006**, *64*, 243–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Wong, G.B.; Weinberg, S.; Symington, J.M. Morphology of the developing articular disc of the human temporomandibular joint. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1985**, *43*, 565–569. [[CrossRef](#)]

52. Detamore, M.S.; Orfanos, J.G.; Almarza, A.J.; French, M.M.; Wong, M.E.; Athanasiou, K.A. Quantitative analysis and comparative regional investigation of the extracellular matrix of the porcine temporomandibular joint disc. *Matrix Biol.* **2005**, *24*, 45–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Scapino, R.P.; Obrez, A.; Greising, D. Organization and function of the collagen fiber system in the human temporomandibular joint disk and its attachments. *Cells Tissues Organs* **2006**, *182*, 201–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Berkovitz, B.K. Collagen crimping in the intra-articular disc and articular surfaces of the human temporomandibular joint. *Arch. Oral Biol.* **2000**, *45*, 749–756. [[CrossRef](#)]
55. Plumb, M.S.; Aspden, R.M. The response of elderly human articular cartilage to mechanical stimuli in vitro. *Osteoarthr. Cartil.* **2005**, *13*, 1084–1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Almarza, A.J.; Bean, A.C.; Baggett, L.S.; Athanasiou, K.A. Biochemical analysis of the porcine temporomandibular joint disc. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2006**, *44*, 124–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kinoshita, Y.; Maeda, H. Recent developments of functional scaffolds for craniomaxillofacial bone tissue engineering applications. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 863157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. El-Bialy, T.; Uludag, H.; Jomha, N.; Badylak, S.F. In vivo ultrasound-assisted tissue-engineered mandibular condyle: A pilot study in rabbits. *Tissue Eng. Part C Methods* **2010**, *16*, 1315–1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Detamore, M.S.; Athanasiou, K.A. Use of a rotating bioreactor toward tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 1188–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Anderson, D.E.; Athanasiou, K.A. Passaged goat costal chondrocytes provide a feasible cell source for temporomandibular joint tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.* **2008**, *36*, 1992–2001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Johns, D.E.; Wong, M.E.; Athanasiou, K.A. Clinically relevant cell sources for TMJ disc engineering. *J. Dent. Res.* **2008**, *87*, 548–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Anderson, D.E.; Athanasiou, K.A. A comparison of primary and passaged chondrocytes for use in engineering the temporomandibular joint. *Arch. Oral Biol.* **2009**, *54*, 138–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Bailey, M.M.; Wang, L.; Bode, C.J.; Mitchell, K.E.; Detamore, M.S. A comparison of human umbilical cord matrix stem cells and temporomandibular joint condylar chondrocytes for tissue engineering temporomandibular joint condylar cartilage. *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 2003–2010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Wu, Y.; Gong, Z.; Li, J.; Meng, Q.; Fang, W.; Long, X. The pilot study of fibrin with temporomandibular joint derived synovial stem cells in repairing TMJ disc perforation. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 454021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Mäenpää, K.; Ellä, V.; Mauno, J.; Kellomäki, M.; Suuronen, R.; Ylikomi, T.; Miettinen, S. Use of adipose stem cells and polylactide discs for tissue engineering of the temporomandibular joint disc. *J. R. Soc. Interface* **2010**, *7*, 177–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Costello, B.J.; Kumta, P.; Sfeir, C.S. Regenerative technologies for craniomaxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2015**, *73*, S116–S125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Sunil, P.; Manikandhan, R.; Muthu, M.; Abraham, S. Stem cell therapy in oral and maxillofacial region: An overview. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **2012**, *16*, 58–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Zuk, P.A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **2001**, *7*, 211–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Saito, M.T.; Silvério, K.G.; Casati, M.Z.; Sallum, E.A.; Nociti, F.H. Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. *World J. Stem Cells* **2015**, *7*, 399–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Guo, L.; Li, J.; Qiao, X.; Yu, M.; Tang, W.; Wang, H.; Guo, W.; Tian, W. Comparison of odontogenic differentiation of human dental follicle cells and human dental papilla cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Park, Y.J.; Cha, S.; Park, Y.S. Regenerative applications using tooth derived stem cells in other than tooth regeneration: A literature review. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 9305986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Sedgley, C.M.; Botero, T.M. Dental stem cells and their sources. *Dent. Clin. N. Am.* **2012**, *56*, 549–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Silvério, K.G.; Davidson, K.C.; James, R.G.; Adams, A.M.; Foster, B.L.; Nociti, F.; Somerman, M.J.; Moon, R.T. Wnt/ β -catenin pathway regulates bone morphogenetic protein (BMP2)-mediated differentiation of dental follicle cells. *J. Periodontal. Res.* **2012**, *47*, 309–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

74. d'Aquino, R.; de Rosa, A.; Lanza, V.; Tirino, V.; Laino, L.; Graziano, A.; Desiderio, V.; Laino, G.; Papaccio, G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur. Cell Mater.* **2009**, *18*, 75–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahimi, J.; Robey, P.G.; Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13625–13630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Alge, D.L.; Zhou, D.; Adams, L.L.; Wyss, B.K.; Shadday, M.D.; Woods, E.J.; Gabriel Chu, T.M.; Goebel, W.S. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2010**, *4*, 73–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Akkouch, A.; Zhang, Z.; Rouabhia, M. Engineering bone tissue using human dental pulp stem cells and an osteogenic collagen-hydroxyapatite-poly (L-lactide-co- ϵ -caprolactone) scaffold. *J. Biomater. Appl.* **2014**, *28*, 922–936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Annibaldi, S.; Bellavia, D.; Ottolenghi, L.; Cicconetti, A.; Cristalli, M.P.; Quaranta, R.; Pilloni, A. Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial “critical size” defect: Preliminary data. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2014**, *102*, 815–825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Mangano, C.; de Rosa, A.; Desiderio, V.; d'Aquino, R.; Piattelli, A.; de Francesco, F.; Tirino, V.; Mangano, F.; Papaccio, G. The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures. *Biomaterials* **2010**, *31*, 3543–3551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Liu, H.C.; E, L.L.; Wang, D.S.; Su, F.; Wu, X.; Shi, Z.P.; Lv, Y.; Wang, J.Z. Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Tissue Eng. Part A* **2011**, *17*, 2417–2433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Ikeda, H.; Sumita, Y.; Ikeda, M.; Okumura, T.; Sakai, E.; Nishimura, M.; Asahina, I. Engineering bone formation from human dental pulp- and periodontal ligament-derived cells. *Ann. Biomed. Eng.* **2011**, *39*, 26–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Yang, X.; van der Kraan, P.M.; Bian, Z.; Fan, M.; Walboomers, X.F.; Jansen, J.A. Mineralized tissue formation by BMP2-transfected pulp stem cells. *J. Dent. Res.* **2009**, *88*, 1020–2025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Yang, X.; Walboomers, X.F.; van den Dolder, J.; Yang, F.; Bian, Z.; Fan, M.; Jansen, J.A. Non-viral bone morphogenetic protein 2 transfection of rat dental pulp stem cells using calcium phosphate nanoparticles as carriers. *Tissue Eng. Part A* **2008**, *14*, 71–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kanafi, M.M.; Ramesh, A.; Gupta, P.K.; Bhonde, R.R. Dental pulp stem cells immobilized in alginate microspheres for applications in bone tissue engineering. *Int. Endod. J.* **2014**, *47*, 687–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Almarza, A.J.; Athanasiou, K.A. Effects of initial cell seeding density for the tissue engineering of the temporomandibular joint disc. *Ann. Biomed. Eng.* **2005**, *33*, 943–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Park, H.; Choi, B.; Hu, J.; Lee, M. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 4779–4786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Kim, I.L.; Mauck, R.L.; Burdick, J.A. Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8771–8782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Chung, C.; Burdick, J.A. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng. Part A* **2009**, *15*, 243–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Willerth, S.M.; Sakiyama-Elbert, S.E. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. In *The Stem Cell Research Community*; StemBook, Ed.; Harvard Stem Cell Institute: Cambridge, MA, USA, 2008. [[CrossRef](#)]
90. Awad, H.A.; Wickham, M.Q.; Leddy, H.A.; Gimble, J.M.; Guilak, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* **2004**, *25*, 3211–3222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Finger, A.R.; Sargent, C.Y.; Dulaney, K.O.; Bernacki, S.H.; Lobo, E.G. Differential effects on messenger ribonucleic acid expression by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells seeded in agarose constructs due to ramped and steady applications of cyclic hydrostatic pressure. *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 1151–1158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Huang, C.Y.; Reuben, P.M.; D'Ippolito, G.; Schiller, P.C.; Cheung, H.S. Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in agarose culture. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **2004**, *278*, 428–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

93. Baker, M.I.; Walsh, S.P.; Schwartz, Z.; Boyan, B.D. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2012**, *100*, 1451–1457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Kobayashi, M.; Chang, Y.S.; Oka, M. A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3243–3248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Kobayashi, M.; Toguchida, J.; Oka, M. Preliminary study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials* **2003**, *24*, 639–647. [[CrossRef](#)]
96. Bodugoz-Senturk, H.; Macias, C.E.; Kung, J.H.; Muratoglu, O.K. Poly(vinyl alcohol)-acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. *Biomaterials* **2009**, *30*, 589–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Stammen, J.A.; Williams, S.; Ku, D.N.; Guldborg, R.E. Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. *Biomaterials* **2001**, *22*, 799–806. [[CrossRef](#)]
98. Holloway, J.L.; Spiller, K.L.; Lowman, A.M.; Palmese, G.R. Analysis of the in vitro swelling behavior of poly(vinyl alcohol) hydrogels in osmotic pressure solution for soft tissue replacement. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2477–2482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Shokrgozar, M.A.; Bonakdar, S.; Dehghan, M.M.; Emami, S.H.; Montazeri, L.; Azari, S.; Rabbani, M. Biological evaluation of polyvinyl alcohol hydrogel crosslinked by polyurethane chain for cartilage tissue engineering in rabbit model. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 2449–2460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Uematsu, K.; Hattori, K.; Ishimoto, Y.; Yamauchi, J.; Habata, T.; Takakura, Y.; Ohgushi, H.; Fukuchi, T.; Sato, M. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4273–4279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Kay, S.; Thapa, A.; Haberstroh, K.M.; Webster, T.J. Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion. *Tissue Eng.* **2002**, *8*, 753–761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Fan, H.; Hu, Y.; Zhang, C.; Li, X.; Lv, R.; Qin, L.; Zhu, R. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a PLGA-gelatin/chondroitin/hyaluronate hybrid scaffold. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4573–4580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Thomas, M.; Grande, D.; Haug, R.H. Development of an in vitro temporomandibular joint cartilage analog. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1991**, *49*, 854–856. [[CrossRef](#)]
104. Puelacher, W.C.; Wissler, J.; Vacanti, C.A.; Ferraro, N.F.; Jaramillo, D.; Vacanti, J.P. Temporomandibular joint disc replacement made by tissue-engineered growth of cartilage. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1994**, *52*, 1172–1177. [[CrossRef](#)]
105. Hagandora, C.K.; Gao, J.; Wang, Y.; Almarza, A.J. Poly (glycerol sebacate): A novel scaffold material for temporomandibular joint disc engineering. *Tissue Eng. Part A* **2013**, *19*, 729–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Almarza, A.J.; Athanasiou, K.A. Seeding techniques and scaffolding choice for tissue engineering of the temporomandibular joint disk. *Tissue Eng.* **2004**, *10*, 1787–1795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Allen, K.D.; Athanasiou, K.A. Scaffold and growth factor selection in temporomandibular joint disc engineering. *J. Dent. Res.* **2008**, *87*, 180–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Springer, I.N.; Fleiner, B.; Jepsen, S.; Açı, Y. Culture of cells gained from temporomandibular joint cartilage on non-absorbable scaffolds. *Biomaterials* **2001**, *22*, 2569–2577. [[CrossRef](#)]
109. Brown, B.N.; Chung, W.L.; Almarza, A.J.; Pavlick, M.D.; Reppas, S.N.; Ochs, M.W.; Russell, A.J.; Badylak, S.F. Inductive, scaffold-based, regenerative medicine approach to reconstruction of the temporomandibular joint disk. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2012**, *70*, 2656–2668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Grande, D.A.; Halberstadt, C.; Naughton, G.; Schwartz, R.; Manji, R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *34*, 211–220. [[CrossRef](#)]
111. Levingstone, T.J.; Matsiko, A.; Dickson, G.R.; O'Brien, F.J.; Gleeson, J.P. A biomimetic multi-layered collagen-based scaffold for osteochondral repair. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 1996–2004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Farrell, E.; O'Brien, F.J.; Doyle, P.; Fischer, J.; Yannas, I.; Harley, B.A.; O'Connell, B.; Prendergast, P.J.; Campbell, V.A. A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 459–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Mehrotra, D.; Kumar, S.; Dhasmana, S. Hydroxyapatite/collagen block with platelet rich plasma in temporomandibular joint ankylosis: A pilot study in children and adolescents. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2012**, *50*, 774–778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Balakrishnan, B.; Joshi, N.; Jayakrishnan, A.; Banerjee, R. Self-crosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 3650–3663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

115. Kuo, Y.-C.; Wang, C.-C. Effect of bovine pituitary extract on the formation of neocartilage in chitosan/gelatin scaffolds. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2010**, *41*, 150–156. [[CrossRef](#)]
116. Xia, W.; Liu, W.; Cui, L.; Liu, Y.; Zhong, W.; Liu, D.; Wu, J.; Chua, K.; Cao, Y. Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2004**, *71*, 373–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Ma, P.X. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater. Today* **2004**, *7*, 30–40. [[CrossRef](#)]
118. Beachley, V.; Wen, X. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 868–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Mendoza-Palomares, C.; Ferrand, A.; Facca, S.; Fioretti, F.; Ladam, G.; Kuchler-Bopp, S.; Regnier, T.; Mainard, D.; Benkirane-Jessel, N. Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* **2012**, *6*, 483–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Eap, S.; Morand, D.; Clauss, F.; Huck, O.; Stoltz, J.F.; Lutz, J.C.; Gottenberg, J.E.; Benkirane-Jessel, N.; Keller, L.; Fioretti, F. Nanostructured thick 3D nanofibrous scaffold can induce bone. *Biomed. Mater. Eng.* **2015**, *25*, 79–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Keller, L.; Wagner, Q.; Pugliano, M.; Breda, P.; Ehlinger, M.; Schwinté, P.; Benkirane-Jessel, N. Bi-layered nano active implant with hybrid stem cell microtissues for tuned cartilage hypertrophy. *J. Stem Cell Res. Ther.* **2015**, *1*. [[CrossRef](#)]
122. Im, G.I.; Shin, Y.W.; Lee, K.B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthr. Cartil.* **2005**, *13*, 845–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Worster, A.A.; Brower-Toland, B.D.; Fortier, L.A.; Bent, S.J.; Williams, J.; Nixon, A.J. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor- β 1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J. Orthop. Res.* **2001**, *19*, 738–749. [[CrossRef](#)]
124. Catelas, I.; Sese, N.; Wu, B.M.; Dunn, J.C.; Helgerson, S.; Tawil, B. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 2385–2396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Gurevich, O.; Vexler, A.; Marx, G.; Prigozhina, T.; Levdansky, L.; Slavin, S.; Shimeliovich, I.; Gorodetsky, R. Fibrin microbeads for isolating and growing bone marrow-derived progenitor cells capable of forming bone tissue. *Tissue Eng.* **2002**, *8*, 661–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Detamore, M.S.; Athanasiou, K.A. Motivation, characterization, and strategy for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Tissue Eng.* **2003**, *9*, 1065–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Almarza, A.J.; Athanasiou, K.A. Evaluation of three growth factors in combinations of two for temporomandibular joint disc tissue engineering. *Arch. Oral Biol.* **2006**, *51*, 215–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Detamore, M.S.; Athanasiou, K.A. Evaluation of three growth factors for TMJ disc tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.* **2005**, *33*, 383–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Su, X.; Bao, G.; Kang, H. Effects of basic fibroblast growth factor on bone marrow mesenchymal stem cell differentiation into temporomandibular joint disc cells. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* **2012**, *29*, 732–736. [[PubMed](#)]
130. Kang, H.; Bi, Y.D.; Li, Z.Q.; Qi, M.Y.; Peng, E.M. Effect of transforming growth factor β (1) and insulin-like growth factor-I on extracellular matrix synthesis of self-assembled constructs of goat temporomandibular joint disc. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **2011**, *46*, 541–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Fortier, L.A.; Lust, G.; Mohammed, H.O.; Nixon, A.J. Coordinate upregulation of cartilage matrix synthesis in fibrin cultures supplemented with exogenous insulin-like growth factor-I. *J. Orthop. Res.* **1999**, *17*, 467–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Sah, R.L.; Chen, A.C.; Grodzinsky, A.J.; Trippel, S.B. Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *308*, 137–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Kalpakci, K.N.; Kim, E.J.; Athanasiou, K.A. Assessment of growth factor treatment on fibrochondrocyte and chondrocyte co-cultures for TMJ fibrocartilage engineering. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1710–1718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Blunk, T.; Sieminski, A.L.; Gooch, K.J.; Courter, D.L.; Hollander, A.P.; Nahir, A.M.; Langer, R.; Vunjak-Novakovic, G.; Freed, L.E. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.* **2002**, *8*, 73–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

135. Jiao, Y.; Wang, D.; Han, W.L. Effects of various growth factors on human mandibular condylar cartilage cell proliferation. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **2000**, *35*, 346–349. [[PubMed](#)]
136. Hanaoka, K.; Tanaka, E.; Takata, T.; Miyauchi, M.; Aoyama, J.; Kawai, N.; Dalla-Bona, D.A.; Yamano, E.; Tanne, K. Platelet-derived growth factor enhances proliferation and matrix synthesis of temporomandibular joint disc-derived cells. *Angle Orthod.* **2006**, *76*, 486–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Jazayeri, H.E.; Tahriri, M.; Razavi, M.; Khoshroo, K.; Fahimipour, F.; Dashtimoghadam, E.; Almeida, L.; Tayebi, L. A current overview of materials and strategies for potential use in maxillofacial tissue regeneration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *70*, 913–929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Tollemar, V.; Collier, Z.J.; Mohammed, M.K.; Lee, M.J.; Ameer, G.A.; Reid, R.R. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. *Genes Dis.* **2016**, *3*, 56–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Amini, A.R.; Laurencin, C.T.; Nukavarapu, S.P. Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *40*, 363–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Zisch, A.H.; Lutolf, M.P.; Ehrbar, M.; Raeber, G.P.; Rizzi, S.C.; Davies, N.; Schmökel, H.; Bezuidenhout, D.; Djonov, V.; Zilla, P.; et al. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB J.* **2003**, *17*, 2260–2262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Scheller, E.L.; Krebsbach, P.H. Gene therapy: Design and prospects for craniofacial regeneration. *J. Dent. Res.* **2009**, *88*, 585–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Scheller, E.L.; Villa-Diaz, L.G.; Krebsbach, P.H. Gene therapy: Implications for craniofacial regeneration. *J. Craniofac. Surg.* **2012**, *23*, 333–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Zhang, X.; Kovtun, A.; Mendoza-Palomares, C.; Oulad-Abdelghani, M.; Fioretti, F.; Rinckenbach, S.; Mainard, D.; Epple, M.; Benkirane-Jessel, N. siRNA-loaded multi-shell nanoparticles incorporated into a multilayered film as a reservoir for gene silencing. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6013–6028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Yoo, H.S.; Kim, T.G.; Park, T.G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1033–1042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Huang, Z.M.; He, C.L.; Yang, A.; Zhang, Y.; Han, X.J.; Yin, J.; Wu, Q. Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *77*, 169–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Park, C.H.; Kim, K.H.; Lee, J.C.; Lee, J. In-situ nanofabrication via electrohydrodynamic jetting of countercharged nozzles. *Polym. Bull.* **2008**, *61*, 521–528. [[CrossRef](#)]
147. Ferrand, A.; Eap, S.; Richert, L.; Lemoine, S.; Kalaskar, D.; Demoustier-Champagne, S.; Atmani, H.; Mély, Y.; Fioretti, F.; Schlatter, G.; et al. Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 45–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Li, G.; Zhang, T.; Li, M.; Fu, N.; Fu, Y.; Ba, K.; Deng, S.; Jiang, Y.; Hu, J.; Peng, Q.; et al. Electrospun fibers for dental and craniofacial applications. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2014**, *9*, 187–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Eap, S.; Keller, L.; Schiavi, J.; Huck, O.; Jacomine, L.; Fioretti, F.; Gauthier, C.; Sebastian, V.; Schwinté, P.; Benkirane-Jessel, N. A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 1061–1075. [[CrossRef](#)]
150. Strub, M.; Van Bellinghen, X.; Idoux-Gillet, Y.; Fioretti, F.; Bornert, F.; Benkirane-Jessel, N.; Kuchler-Bopp, S.; Clauss, F. Maxillary bone regeneration based on nanoreservoirs functionalized ϵ -polycaprolactone biomembranes in a mouse model of jaw bone lesion. *BioMed Res. Int.* **2017**, in press.
151. Haddad, I.K. Temporomandibular joint osteoarthritis. Histopathological study of the effects of intra-articular injection of triamcinolone acetonide. *Saudi Med. J.* **2000**, *21*, 675–679. [[PubMed](#)]
152. Iida, K.; Kurita, K.; Tange, K.; Yoshida, K. Necrosis of the articular tubercle after repeated injections of sodium hyaluronate in the temporomandibular joint: A case report. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **1998**, *27*, 278–279. [[CrossRef](#)]
153. Mountziaris, P.M.; Kramer, P.R.; Mikos, A.G. Emerging intra-articular drug delivery systems for the temporomandibular joint. *Methods* **2009**, *47*, 134–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Mountziaris, P.M.; Sing, D.C.; Mikos, A.G.; Kramer, P.R. Intra-articular microparticles for drug delivery to the TMJ. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 1039–1044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Mountziaris, P.M.; Sing, D.C.; Chew, S.A.; Tzouanas, S.N.; Lehman, E.D.; Kasper, F.K.; Mikos, A.G. Controlled release of anti-inflammatory siRNA from biodegradable polymeric microparticles intended for intra-articular delivery to the temporomandibular joint. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 1370–1384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

156. Brady, M.A.; Sivananthan, S.; Mudera, V.; Liu, Q.; Wiltfang, J.; Warnke, P.H. The primordium of a biological joint replacement: Coupling of two stem cell pathways in biphasic ultrarapid compressed gel niches. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **2011**, *39*, 380–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Abou Neel, E.A.; Chrzanowski, W.; Salih, V.M.; Kim, H.W.; Knowles, J.C. Tissue engineering in dentistry. *J. Dent.* **2014**, *42*, 915–928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Zhu, S.; Zhang, B.; Man, C.; Ma, Y.; Hu, J. NEL-like molecule-1-modified bone marrow mesenchymal stem cells/poly lactic-co-glycolic acid composite improves repair of large osteochondral defects in mandibular condyle. *Osteoarthr. Cartil.* **2011**, *19*, 743–750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Weng, Y.; Cao, Y.; Silva, C.A.; Vacanti, M.P.; Vacanti, C.A. Tissue-engineered composites of bone and cartilage for mandible condylar reconstruction. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2001**, *59*, 185–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Dormer, N.H.; Busaidy, K.; Berkland, C.J.; Detamore, M.S. Osteochondral interface regeneration of rabbit mandibular condyle with bioactive signal gradients. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2011**, *69*, e50–e57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Keller, L.; Wagner, Q.; Schwinté, P.; Benkirane-Jessel, N. Double compartmented and hybrid implant outfitted with well-organized 3D stem cells for osteochondral regenerative nanomedicine. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 2833–2845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Abukawa, H.; Terai, H.; Hannouche, D.; Vacanti, J.P.; Kaban, L.B.; Troulis, M.J. Formation of a mandibular condyle in vitro by tissue engineering. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2003**, *61*, 94–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Girdler, N.M. In vitro synthesis and characterization of a cartilaginous meniscus grown from isolated temporomandibular chondroprogenitor cells. *Scand. J. Rheumatol.* **1998**, *27*, 446–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Alhadlaq, A.; Elisseeff, J.H.; Hong, L.; Williams, C.G.; Caplan, A.I.; Sharma, B.; Kopher, R.A.; Tomkoria, S.; Lennon, D.P.; Lopez, A.; et al. Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle. *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, *32*, 911–923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Tarafder, S.; Koch, A.; Jun, Y.; Chou, C.; Awadallah, M.R.; Lee, C.H. Micro-precise spatiotemporal delivery system embedded in 3D printing for complex tissue regeneration. *Biofabrication* **2016**, *8*, 025003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Ackland, D.C.; Robinson, D.; Redhead, M.; Lee, P.V.S.; Moskaljuk, A.; Dimitroulis, G. A personalized 3D-printed prosthetic joint replacement for the human temporomandibular joint: From implant design to implantation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *69*, 404–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Wang, Y.; Zhang, Y.; Zhang, Z.; Li, X.; Pan, J.; Li, J. reconstruction of mandibular contour using individualized high-density porous polyethylene (Medpor[®]) implants under the guidance of virtual surgical planning and 3D-printed surgical templates. *Aesthet. Plast. Surg.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Ryu, J.; Cho, J.; Kim, H.M. Bilateral temporomandibular joint replacement using computer-assisted surgical simulation and three-dimensional printing. *J. Craniofac. Surg.* **2016**, *27*, e450–e452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Green, J.M.; Lawson, S.T.; Liacouras, P.C.; Wise, E.M.; Gentile, M.A.; Grant, G.T. Custom anatomical 3D spacer for temporomandibular joint resection and reconstruction. *Craniomaxillofac. Trauma Reconstr.* **2016**, *9*, 82–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Levine, J.P.; Patel, A.; Saadeh, P.B.; Hirsch, D.L. Computer-aided design and manufacturing in craniomaxillofacial surgery: The new state of the art. *J. Craniofac. Surg.* **2012**, *23*, 288–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Chen, V.J.; Smith, L.A.; Ma, P.X. Bone regeneration on computer-designed nano-fibrous scaffolds. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3973–3979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Townsend-Nicholson, A.; Jayasinghe, S.N. Cell electrospinning: A unique biotechnique for encapsulating living organisms for generating active biological microthreads/scaffolds. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3364–3369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Jayasinghe, S.N. Cell electrospinning: A novel tool for functionalising fibres, scaffolds and membranes with living cells and other advanced materials for regenerative biology and medicine. *Analyst* **2013**, *138*, 2215–2223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Jessop, Z.M.; Javed, M.; Otto, I.A.; Combella, E.J.; Morgan, S.; Breugem, C.C.; Archer, C.W.; Khan, I.M.; Lineaweaver, W.C.; Kon, M.; et al. Combining regenerative medicine strategies to provide durable reconstructive options: Auricular cartilage tissue engineering. *Stem Cell Res Ther.* **2016**, *7*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

175. Li, J.; Hsu, Y.; Luo, E.; Khadka, A.; Hu, J. Computer-aided design and manufacturing and rapid prototyped nanoscale hydroxyapatite/polyamide (n-HA/PA) construction for condylar defect caused by mandibular angle ostectomy. *Aesthet. Plast. Surg.* **2011**, *35*, 636–640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. MacBarb, R.F.; Paschos, N.K.; Abeug, R.; Makris, E.A.; Hu, J.C.; Athanasiou, K.A. Passive strain-induced matrix synthesis and organization in shape-specific, cartilaginous neotissues. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20*, 3290–3302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Legemate, K.; Tarafder, S.; Jun, Y.; Lee, C.H. Engineering human TMJ discs with protein-releasing 3D-printed scaffolds. *J. Dent. Res.* **2016**, *95*, 800–807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

VI. Références

1. Martel-Pelletier, J., Barr, A.J., Cicuttini, F.M., Conaghan, P.G., Cooper, C., Goldring, M.B., Goldring, S.R., Jones, G., Teichtahl, A.J., and Pelletier, J.-P. (2016). Osteoarthritis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16072.
2. Wachsmuth, L., Söder, S., Fan, Z., Finger, F., and Aigner, T. (2006). Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol. Histopathol.* 21, 477–485.
3. Akkiraju, H., and Nohe, A. (2015). Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. *J. Dev. Biol.* 3, 177–192.
4. Archer, C.W., and Francis-West, P. (2003). The chondrocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 401–404.
5. Zhang, L., Hu, J., and Athanasiou, K.A. (2009). The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 37, 1–57.
6. Ng, H.Y., Lee, K.-X.A., and Shen, Y.-F. (2017). Articular Cartilage: Structure, Composition, Injuries and Repair. *JSM Bone and Joint Dis.* 2, 1010–1015.
7. Wang, Y., Wei, L., Zeng, L., He, D., and Wei, X. (2013). Nutrition and degeneration of articular cartilage. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 21, 1751–1762.
8. Sophia Fox, A.J., Bedi, A., and Rodeo, S.A. (2009). The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health Multidiscip. Approach* 1, 461–468.
9. Toppets, V., Pastoret, V., De Behr, V., Antoine, N., Dessy, C., and Gabriel, A. (2004). Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Méd. Vét.* 148, 1–13.
10. Goldring, S.R., and Goldring, M.B. (2016). Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage–bone crosstalk. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 632–644.
11. Li, G., Yin, J., Gao, J., Cheng, T.S., Pavlos, N.J., Zhang, C., and Zheng, M.H. (2013). Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res. Ther.* 15, 223.
12. Madry, H., van Dijk, C.N., and Mueller-Gerbl, M. (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 18, 419–433.
13. Castañeda, S., Roman-Blas, J.A., Largo, R., and Herrero-Beaumont, G. (2012). Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem. Pharmacol.* 83, 315–323.
14. Arkill, K.P., and Winlove, C.P. (2008). Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 708–714.
15. Redman, S.N., Oldfield, S.F., and Archer, C.W. (2005). Current strategies for articular cartilage repair. *Eur. Cell. Mater.* 9, 23–32.
16. Robert, H., Lambotte, J.C., and Flicoteaux, R. (2011). Arthroscopic Measurement of Cartilage Lesions of the Knee Condyle: Principles and Experimental Validation of a New Method. *Cartilage* 2, 237–245.
17. Rambani, R., and Venkatesh, R. (2014). Current concepts in articular cartilage repair. *J. Arthrosc. Jt. Surg.* 1, 59–65.

18. Le Pen, C., Reygrobelle, C., and Gérentes, I. (2005). Financial cost of osteoarthritis in France. *Joint Bone Spine* 72, 567–570.
19. Bertin, P., Rannou, F., Grange, L., Dachicourt, J.-N., Bruel, P., Emery, C., Grandfils, N., and Taieb, C. (2014). Annual Cost of Patients with Osteoarthritis of the Hip and Knee in France. *J. Musculoskelet. Pain* 22, 356–364.
20. Nelson, A.E., Allen, K.D., Golightly, Y.M., Goode, A.P., and Jordan, J.M. (2014). A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The Chronic Osteoarthritis Management Initiative of the U.S. Bone and Joint Initiative. *Semin. Arthritis Rheum.* 43, 701–712.
21. Poddar, S.K., and Widstrom, L. (2017). Nonoperative Options for Management of Articular Cartilage Disease. *Clin. Sports Med.* 36, 447–456.
22. Chevalier-Ruggeri, P., and Zufferey, P. (2016). Infiltrations intra-articulaires en rhumatologie : mise au point. *Rev. Med. Suisse* 12, 90–94.
23. Ichiseki, T., Shimasaki, M., Ueda, Y., Ueda, S., Tsuchiya, M., Souma, D., Kaneuji, A., and Kawahara, N. (2018). Intraarticularly-Injected Mesenchymal Stem Cells Stimulate Anti-Inflammatory Molecules and Inhibit Pain Related Protein and Chondrolytic Enzymes in a Monoiodoacetate-Induced Rat Arthritis Model. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 203–214.
24. Lopa, S., Colombini, A., Moretti, M., and de Girolamo, L. (2018). Injective mesenchymal stem cell-based treatments for knee osteoarthritis: from mechanisms of action to current clinical evidences. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 1–18.
25. Kreuz, P.C., Steinwachs, M.R., Erggelet, C., Krause, S.J., Konrad, G., Uhl, M., and Südkamp, N. (2006). Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 1119–1125.
26. Makris, E.A., Gomoll, A.H., Malizos, K.N., Hu, J.C., and Athanasiou, K.A. (2015). Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 21–34.
27. Marcacci, M., Kon, E., Delcogliano, M., Filardo, G., Busacca, M., and Zaffagnini, S. (2007). Arthroscopic Autologous Osteochondral Grafting for Cartilage Defects of the Knee: Prospective Study Results at a Minimum 7-Year Follow-up. *Am. J. Sports Med.* 35, 2014–2021.
28. Welch, T., and Mandelbaum, B. (2016). Autologous Chondrocyte Implantation: Past, Present, and Future. *Sportss Med Arthrosc Rev.* 24, 85-91.
29. Filardo, G., Kon, E., Roffi, A., Di Martino, A., and Marcacci, M. (2013). Scaffold-Based Repair for Cartilage Healing: A Systematic Review and Technical Note. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* 29, 174–186.
30. Hu, C.Y., and Yoon, T.-R. (2018). Recent updates for biomaterials used in total hip arthroplasty. *Biomater. Res.* 22, 33–45.
31. Weber, M., Renkawitz, T., Voellner, F., Craiovan, B., Greimel, F., Worlicek, M., Grifka, J., and Benditz, A. (2018). Revision Surgery in Total Joint Replacement Is Cost-Intensive. *BioMed Res. Int.* 2018, 1–8.
32. Heineken, F.G., and Skalak, R. (1991). Tissue Engineering: A Brief Overview. *J. Biomech. Eng.* 113, 111–112.

33. Nerem, R.M., and Sambanis, A. (1995). Tissue Engineering: From Biology to Biological Substitutes. *Tissue Eng.* 1, 3–13.
34. Langer, R., and Vacanti, J.P. (1993). Tissue Engineering. *Science.* 260, 920–926.
35. Vinatier, C., Bouffi, C., Merceron, C., Gordeladze, J., Brondello, J.-M., Jorgensen, C., Weiss, P., Guicheux, J., and Noel, D. (2009). Cartilage Tissue Engineering: Towards a Biomaterial-Assisted Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 4, 318–329.
36. Griffith, L.G., and Naughton, G. (2002). Tissue Engineering - Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science* 295, 1009–1014.
37. Directive 2000/33/CE de la Commission Européenne. (2000). *Journal officiel des Communautés européennes.* L 136, 90–107.
38. Direction Générale des Entreprises, Ministère de l'Economie de l'Industrie et du Numérique. (2015). *Technologies clés 2020. Ingénierie tissulaire et cellulaire.* 5, 459–465.
39. Correa, D., and Lietman, S.A. (2017). Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 62, 67–77.
40. Danišovič, L., Varga, I., Zamborský, R., and Böhmer, D. (2012). The tissue engineering of articular cartilage: cells, scaffolds and stimulating factors. *Exp. Biol. Med.* 237, 10–17.
41. Darling, E.M., and Athanasiou, K.A. (2005). Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J. Orthop. Res.* 23, 425–432.
42. Ullah, I., Subbarao, R.B., and Rho, G.J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* 35, 1–18.
43. Magalon, J., François, P., Velier, M., Grimaud, F., Veran, J., Calmels, B., and Sabatier, F. (2018). *Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018. Rev. Francoph. Lab.* 2018, 34–43.
44. Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., and Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395.
45. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
46. Via, A.G., Frizziero, A., and Oliva, F. (2012). Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Msc. Lig. Tend. J.* 2, 154–162.
47. Xiang, Y., Zheng, Q., Jia, B., Huang, G., Xu, Y., Wang, J., and Pan, Z. (2007). Ex vivo expansion and pluripotential differentiation of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 8, 136–146.
48. Nejadnik, H., Hui, J.H., Feng Choong, E.P., Tai, B.-C., and Lee, E.H. (2010). Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Versus Autologous Chondrocyte Implantation: An Observational Cohort Study. *Am. J. Sports Med.* 38, 1110–1116.

49. Wakitani, S., Imoto, K., Yamamoto, T., Saito, M., Murata, N., and Yoneda, M. (2002). Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* *10*, 199–206.
50. Wakitani, S., Mitsuoka, T., Nakamura, N., Toritsuka, Y., Nakamura, Y., and Horibe, S. (2004). Autologous Bone Marrow Stromal Cell Transplantation for Repair of Full-Thickness Articular Cartilage Defects in Human Patellae: Two Case Reports. *Cell Transplant.* *13*, 595–600.
51. Wakitani, S., Nawata, M., Tensho, K., Okabe, T., Machida, H., and Ohgushi, H. (2007). Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *1*, 74–79.
52. Kuroda, R., Ishida, K., Matsumoto, T., Akisue, T., Fujioka, H., Mizuno, K., Ohgushi, H., Wakitani, S., and Kurosaka, M. (2007). Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* *15*, 226–231.
53. Kasemkijwattana, C., Hongeng, S., Kesprayura, S., Rungsinaporn, V., Chaipinyo, K., and Chansiri, K. (2011). Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Implantation for Cartilage Defects: Two Cases Report. *94*, 395–400.
54. Centeno, C.J., Busse, D., Kisiday, J., Keohan, C., Freeman, M., and Karli, D. (2008). Increased Knee Cartilage Volume in Degenerative Joint Disease using Percutaneously Implanted, Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Pain Physician* *11*, 343–353.
55. Wong, K.L., Lee, K.B.L., Tai, B.C., Law, P., Lee, E.H., and Hui, J.H.P. (2013). Injectable Cultured Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Varus Knees With Cartilage Defects Undergoing High Tibial Osteotomy: A Prospective, Randomized Controlled Clinical Trial With 2 Years' Follow-up. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* *29*, 2020–2028.
56. Kim, Y.S., Kwon, O.R., Choi, Y.J., Suh, D.S., Heo, D.B., and Koh, Y.G. (2015). Comparative Matched-Pair Analysis of the Injection Versus Implantation of Mesenchymal Stem Cells for Knee Osteoarthritis. *Am. J. Sports Med.* *43*, 2738–2746.
57. Wakitani, S., Okabe, T., Horibe, S., Mitsuoka, T., Saito, M., Koyama, T., Nawata, M., Tensho, K., Kato, H., Uematsu, K., Kuroda, R., Kurosakak, M., Yoshiya, S., Hattori, K., and Ohgushi, H. (2011). Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *5*, 146–150.
58. Mizuno, H., Tobita, M., and Uysal, A.C. (2012). Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *STEM CELLS* *30*, 804–810.
59. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* *24*, 1294–1301.
60. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.* *7*, 211–228.
61. Im, G.-I., Shin, Y.-W., and Lee, K.-B. (2005). Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* *13*, 845–853.

62. Koh, Y.-G., Choi, Y.-J., Kwon, S.-K., Kim, Y.-S., and Yeo, J.-E. (2015). Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 23, 1308–1316.
63. Weiss, M.L., and Troyer, D.L. (2006). Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev.* 2, 155–162.
64. Park, Y.-B., Ha, C.-W., Rhim, J.H., and Lee, H.-J. (2018). Stem Cell Therapy for Articular Cartilage Repair: Review of the Entity of Cell Populations Used and the Result of the Clinical Application of Each Entity. *Am. J. Sports Med.* 46, 2540–2552.
65. Zhang, X., Hirai, M., Cantero, S., Ciubotariu, R., Dobrila, L., Hirsh, A., Igura, K., Satoh, H., Yokomi, I., Nishimura, T., Yamaguchi, S., Yoshimura, K., Rubinstein, P., and Takahashi, T.A. (2011). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: Reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells fro. *J. Cell. Biochem.* 112, 1206–1218.
66. Weiss, M.L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K.B., Weiss, R.J., VanderWerff, I., Troyer, D., and McIntosh, K.R. (2008). Immune Properties of Human Umbilical Cord Wharton’s Jelly-Derived Cells. *Stem Cells* 26, 2865–2874.
67. Park, Y.-B., Song, M., Lee, C.-H., Kim, J.-A., and Ha, C.-W. (2015). Cartilage repair by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells with different hydrogels in a rat model. *J. Orthop. Res.* 33, 1580–1586.
68. Park, Y.B., Ha, C.W., Kim, J.A., Han, W.J., Rhim, J.H., Lee, H.J., Kim, K.J., Park, Y.G., and Chung, J.Y. (2017). Single-stage cell-based cartilage repair in a rabbit model: cell tracking and in vivo chondrogenesis of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid hydrogel composite. *Osteoarthritis Cartilage* 25, 570–580.
69. Ha, C.-W., Park, Y.-B., Chung, J.-Y., and Park, Y.-G. (2015). Cartilage Repair Using Composites of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronic Acid Hydrogel in a Minipig Model: Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronic Acid Hydrogel. *STEM CELLS Transl. Med.* 4, 1044–1051.
70. Park, Y.-B., Ha, C.-W., Lee, C.-H., Yoon, Y.C., and Park, Y.-G. (2017). Cartilage Regeneration in Osteoarthritic Patients by a Composite of Allogeneic Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronate Hydrogel: Results from a Clinical Trial for Safety and Proof-of-Concept with 7 Years of Extended Follow-Up. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 613–621.
71. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.
72. Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318–324.
73. Craft, A.M., Rockel, J.S., Nartiss, Y., Kandel, R.A., Alman, B.A., and Keller, G.M. (2015). Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 33, 638–645.
74. Lee, E.J., Kasper, F.K., and Mikos, A.G. (2014). Biomaterials for Tissue Engineering. *Ann. Biomed. Eng.* 42, 323–337.

75. Yu, X., Tang, X., Gohil, S.V., and Laurencin, C.T. (2015). Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* *4*, 1268–1285.
76. Hench, L.L. (1980). Biomaterials. *Science*. *208*, 826–831.
77. Jeuken, R., Roth, A., Peters, R., van Donkelaar, C., Thies, J., van Rhijn, L., and Emans, P. (2016). Polymers in Cartilage Defect Repair of the Knee: Current Status and Future Prospects. *Polymers* *8*, 219.
78. Pérez, R.A., Won, J.-E., Knowles, J.C., and Kim, H.-W. (2013). Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *65*, 471–496.
79. Hench, L.L., and Polak, J.M. (2002). Third-Generation Biomedical Materials. *Science* *295*, 1014–1017.
80. Alsberg, E., von Recum, H.A., and Mahoney, M.J. (2006). Environmental cues to guide stem cell fate decision for tissue engineering applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* *6*, 847–866.
81. Huang, B.J., Hu, J.C., and Athanasiou, K.A. (2016). Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials* *98*, 1–22.
82. Chung, C., and Burdick, J.A. (2009). Engineering Cartilage Tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *60*, 243–262.
83. Reddi, A.H., and Reddi, A. (2009). Bone morphogenetic proteins (BMPs): From morphogens to metabologens. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 341–342.
84. De Witte, T.-M., Fratila-Apachitei, L.E., Zadpoor, A.A., and Peppas, N.A. (2018). Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. *Regen. Biomater.* *5*, 197–211.
85. Lee, K., Silva, E.A., and Mooney, D.J. (2011). Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J. R. Soc. Interface* *8*, 153–170.
86. Mendoza-Palomares, C., Ferrand, A., Facca, S., Fioretti, F., Ladam, G., Kuchler-Bopp, S., Regnier, T., Mainard, D., and Benkirane-Jessel, N. (2012). Smart Hybrid Materials Equipped by Nanoreservoirs of Therapeutics. *ACS Nano* *6*, 483–490.
87. Ferrand, A., Eap, S., Richert, L., Lemoine, S., Kalaskar, D., Demoustier-Champagne, S., Atmani, H., Mély, Y., Fioretti, F., Schlatter, G., Kuhn, L., Ladam, G., and Benkirane-Jessel, N. (2014). Osteogenic Properties of Electrospun Nanofibrous PCL Scaffolds Equipped With Chitosan-Based Nanoreservoirs of Growth Factors. *Macromol. Biosci.* *14*, 45–55.
88. Eap, S., Ferrand, A., Schiavi, J., Keller, L., Kokten, T., Fioretti, F., Mainard, D., Ladam, G., and Benkirane-Jessel, N. (2014). Collagen implants equipped with ‘fish scale’-like nanoreservoirs of growth factors for bone regeneration. *Nanomed.* *9*, 1253–1261.
89. Decher, G. (1997). Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* *277*, 1232–1237.
90. Sewing, J., Klinger, M., and Notbohm, H. (2017). Jellyfish collagen matrices conserve the chondrogenic phenotype in two- and three-dimensional collagen matrices: Jellyfish collagen matrices conserve the chondrogenic phenotype. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *11*, 916–925.

91. Beane, O.S., and Darling, E.M. (2012). Isolation, Characterization, and Differentiation of Stem Cells for Cartilage Regeneration. *Ann. Biomed. Eng.* *40*, 2079–2097.
92. Wang, W., Rigueur, D., and Lyons, K.M. (2014). TGF β signaling in cartilage development and maintenance. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *102*, 37–51.
93. Matsiko, A., Levingstone, T.J., Gleeson, J.P., and O'Brien, F.J. (2015). Incorporation of TGF-Beta 3 within Collagen-Hyaluronic Acid Scaffolds Improves their Chondrogenic Potential. *Adv. Healthc. Mater.* *4*, 1175–1179.
94. Kim, S.H., Kim, S.H., and Jung, Y. (2015). TGF- β 3 encapsulated PLCL scaffold by a supercritical CO₂-HFIP co-solvent system for cartilage tissue engineering. *J. Controlled Release* *206*, 101–107.
95. Krüger, J.P., Machens, I., Lahner, M., Endres, M., and Kaps, C. (2014). Initial Boost Release of Transforming Growth Factor- β 3 and Chondrogenesis by Freeze-Dried Bioactive Polymer Scaffolds. *Ann. Biomed. Eng.* *42*, 2562–2576.
96. Fisher, M.B., Belkin, N.S., Milby, A.H., Henning, E.A., Söegaard, N., Kim, M., Pfeifer, C., Saxena, V., Dodge, G.R., Burdick, J.A., Schaer, T.P., Steinberg, D.R., and Mauck, R.L. (2016). Effects of Mesenchymal Stem Cell and Growth Factor Delivery on Cartilage Repair in a Mini-Pig Model. *Cartilage* *7*, 174–184.
97. Eap, S., Keller, L., Ferrand, A., Schiavi, J., Lahiri, D., Lemoine, S., Facca, S., Fioretti, F., Mainard, D., Agarwal, A., and benkirane-Jessel, N. (2014). Nanomechanical Properties of Active Nanofibrous Implants After *In Vivo* Bone Regeneration. *Nano LIFE* *4*, 9.
98. Keller, L., Eap, S., Schiavi, J., Huck, O., Jacomine, L., Gauthier, C., Sebastian, V., Schwinté, P., Jessel, N., and Fioretti, F. (2015). A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int. J. Nanomedicine* *10*, 1061-1075.
99. Keller, L., Wagner, Q., Schwinté, P., and Benkirane-Jessel, N. (2015). Double compartmented and hybrid implant outfitted with well-organized 3D stem cells for osteochondral regenerative nanomedicine. *Nanomed.* *10*, 2833–2845.
100. Keller, L., Schwinté, P., Gomez-Barrena, E., Arruebo, M., and Benkirane-Jessel, N. (2017). Smart Implants as a Novel Strategy to Regenerate Well-Founded Cartilage. *Trends Biotechnol.* *35*, 8–11.
101. Falah, M., Nierenberg, G., Soudry, M., Hayden, M., and Volpin, G. (2010). Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *Int. Orthop.* *34*, 621–630.
102. Schiavi, J., Keller, L., Morand, D.-N., Isla, N.D., Huck, O., Lutz, J.C., Mainard, D., Schwinté, P., and Benkirane-Jessel, N. (2015). Active implant combining human stem cell microtissues and growth factors for bone-regenerative nanomedicine. *Nanomed.* *10*, 753–763.
103. Wolf, F., Candrian, C., Wendt, D., Farhadi, J., Heberer, M., Martin, I., and Barbero, A. (2008). Cartilage tissue engineering using pre-aggregated human articular chondrocytes. *Eur. Cell. Mater.* *16*, 92–99.
104. Lehmann, M., Martin, F., Mannigel, K., Kaltschmidt, K., Sack, U., and Anderer, U. (2013). Three-dimensional scaffold-free fusion culture: the way to enhance chondrogenesis of in vitro propagated human articular chondrocytes. *Eur. J. Histochem.* *57*, 31.

105. Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Börner, M.G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., et al. (2002). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J. Bone Joint Surg. Am.* *84*, 2123–2134.
106. Kanakaris, N.K., Mallina, R., Calori, G.M., Kontakis, G., and Giannoudis, P.V. (2009). Use of bone morphogenetic proteins in arthrodesis: Clinical results. *Injury* *40*, S62–S66.
107. Zara, J.N., Siu, R.K., Zhang, X., Shen, J., Ngo, R., Lee, M., Li, W., Chiang, M., Chung, J., Kwak, J., et al. (2011). High Doses of Bone Morphogenetic Protein 2 Induce Structurally Abnormal Bone and Inflammation *In Vivo*. *Tissue Eng. Part A* *17*, 1389–1399.
108. James, A.W., LaChaud, G., Shen, J., Asatrian, G., Nguyen, V., Zhang, X., Ting, K., and Soo, C. (2016). A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng. Part B Rev.* *22*, 284–297.
109. Frenz, D.A., Jaikaria, N.S., and Newman, S.A. (1989). The mechanism of precartilaginous mesenchymal condensation: A major role for interaction of the cell surface with the amino-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Dev. Biol.* *136*, 97–103.
110. DeLise, A.M., Fischer, L., and Tuan, R.S. (2000). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* *8*, 309–334.
111. Singh, P., and Schwarzbauer, J.E. (2012). Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis. *J. Cell Sci.* *125*, 3703–3712.
112. Cooke, M.E., Allon, A.A., Cheng, T., Kuo, A.C., Kim, H.T., Vail, T.P., Marcucio, R.S., Schneider, R.A., Lotz, J.C., and Alliston, T. (2011). Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy. *Osteoarthritis Cartilage* *19*, 1210–1218.
113. Hubka, K.M., Dahlin, R.L., Meretoja, V.V., Kasper, F.K., and Mikos, A.G. (2014). Enhancing Chondrogenic Phenotype for Cartilage Tissue Engineering: Monoculture and Coculture of Articular Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng. Part B Rev.* *20*, 641–654.
114. Meretoja, V.V., Dahlin, R.L., Kasper, F.K., and Mikos, A.G. (2012). Enhanced chondrogenesis in co-cultures with articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* *33*, 6362–6369.
115. Ahern, B.J., Parvizi, J., Boston, R., and Schaer, T.P. (2009). Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* *17*, 705–713.
116. Moran, C.J., Ramesh, A., Brama, P.A.J., O’Byrne, J.M., O’Brien, F.J., and Levingstone, T.J. (2016). The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *J. Exp. Orthop.* *3*, 1–12.
117. McCarty, R.C., Gronthos, S., Zannettino, A.C., Foster, B.K., and Xian, C.J. (2009). Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* *219*, 324–333.
118. Boxall, S.A., and Jones, E. (2012). Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells. *Stem Cells Int.* *2012*, 1–12.

119. Chu, C.R., Szczodry, M., and Bruno, S. (2010). Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair. *Tissue Eng. Part B Rev.* 16, 105–115.
120. Chang, G., Sherman, O., Madelin, G., Recht, M., and Regatte, R. (2011). MR Imaging Assessment of Articular Cartilage Repair Procedures. *Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am.* 19, 323–337.
121. Guermazi, A., Roemer, F.W., Alizai, H., Winalski, C.S., Welsch, G., Brittberg, M., and Trattnig, S. (2015). State of the Art: MR Imaging after Knee Cartilage Repair Surgery. *Radiology* 277, 23–43.
122. Alparslan, L., Winalski, C.S., Boutin, R.D., and Minas, T. (2001). Postoperative Magnetic Resonance Imaging of Articular Cartilage Repair. *Semin. Musculoskelet. Radiol.* 05, 345–364.
123. Anderson, D.E., Williams, R.J., DeBerardino, T.M., Taylor, D.C., Ma, C.B., Kane, M.S., and Crawford, D.C. (2017). Magnetic Resonance Imaging Characterization and Clinical Outcomes After NeoCart Surgical Therapy as a Primary Reparative Treatment for Knee Cartilage Injuries. *Am. J. Sports Med.* 45, 875–883.
124. Funck-Brentano, T., and Cohen-Solal, M. (2011). Crosstalk between cartilage and bone: When bone cytokines matter. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22, 91–97.
125. Zaim, M., Karaman, S., Cetin, G., and Isik, S. (2012). Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Annals of Hematology* 91, 1175–1186.
126. Li, Y., Charif, N., Mainard, D., Bensoussan, D., Stolz, J.F., and De Isla, N. (2014). Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Bio-Med. Materials and Eng.* 24, 47–52.

Résumé

Notre équipe a mis au point une stratégie innovante d'implants thérapeutiques biphasiques, pour une régénération plus efficace et plus durable du cartilage articulaire, dans le cadre du traitement des lésions ostéochondrales. Ces implants pourraient représenter de meilleures alternatives aux traitements actuellement utilisés en chirurgie orthopédique.

Dans un premier temps, nous avons élaboré un modèle d'implant thérapeutique à base de collagène de type II dérivé de méduse, fonctionnalisé par des nanoréservoirs de facteur de croissance TGF- β 3, et équipé de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) dérivées de la moelle osseuse. La biocompatibilité et les propriétés chondrogéniques de cet implant ont été validées par des analyses *in vitro*, confirmant son potentiel thérapeutique pour la régénération du cartilage articulaire.

Dans un second temps, nous nous sommes plus particulièrement concentrés sur la régénération de l'unité ostéochondrale. Il est en effet essentiel de régénérer un os sous-chondral sain, pour permettre une régénération stable du cartilage articulaire en surface. Dans ce but, nous avons développé un implant thérapeutique doté de deux compartiments : (i) un premier compartiment élaboré à partir d'un biomatériau synthétique de poly- ϵ -caprolactone (PCL), doté de nanoréservoirs de facteur de croissance BMP-7, pour la régénération de l'os sous-chondral ; (ii) un second compartiment à base d'un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, ensemencé d'organoïdes hybrides de hCSMs et de chondrocytes humains, pour la régénération du cartilage articulaire. L'efficacité de cet implant biphasique a été confirmée *in vitro* et *in vivo* chez la souris.

Dans un troisième temps, nous avons évalué notre stratégie d'implant thérapeutique biphasique en site intra-articulaire, chez l'animal de grande taille (brebis). Ces travaux ont permis de valider la faisabilité et l'efficacité de notre stratégie, combinant cette fois-ci : (i) un implant collagénique commercial, doté de nanoréservoirs de facteur de croissance BMP-2, pour la régénération de l'os sous-chondral ; (ii) un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, incorporant des organoïdes de CSMs de moelle osseuse de brebis, pour la régénération du cartilage articulaire.

En conclusion, ces médicaments combinés de thérapie innovante, associant des biomatériaux naturels ou synthétiques (dispositif médical implantable), des molécules thérapeutiques et des cellules souches mésenchymateuses (médicament de thérapie innovante), permettent la régénération de l'unité ostéochondrale dans son ensemble. Cette stratégie novatrice permettra sans nul doute de grandes avancées en nanomédecine régénérative ostéoarticulaire, dans l'optique d'améliorer toujours plus le traitement et le confort des patients.

Mots clés : Nanomédecine régénérative ostéoarticulaire ; ingénierie tissulaire ; cartilage ; os sous-chondral ; cellules souches mésenchymateuses (CSMs) ; organoïdes ; biomatériaux ; collagène de type II ; poly- ϵ -caprolactone (PCL) ; facteurs de croissance ; nanoréservoirs ; dispositif médical implantable ; médicament de thérapie innovante (MTI) ; médicament combiné de thérapie innovante.

Abstract

Our team has developed an innovative strategy based on biphasic therapeutic implants allowing a more effective and long-lasting regeneration of articular cartilage in the treatment of osteochondral lesions. These implants may represent better alternatives to the current treatments used in orthopaedic surgery.

First, we developed a jellyfish type II collagen therapeutic implant model, functionalized with TGF- β 3 growth factor nanoreservoirs, and equipped with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). The biocompatibility and chondrogenic properties of this implant have been validated *in vitro*, confirming its therapeutic potential for the regeneration of articular cartilage.

In a second time, we focused more on the regeneration of the osteochondral unit. Indeed, it is crucial to regenerate a healthy subchondral bone, to allow a stable regeneration of articular cartilage on the surface. To this end, we have developed a therapeutic implant with two compartments : (i) a first compartment based on a synthetic poly- ϵ -caprolactone (PCL) biomaterial, equipped with BMP-7 growth factor nanoreservoirs, for the regeneration of the subchondral bone ; (ii) a second compartment based on a hydrogel of alginate and hyaluronic acid, seeded with hybrid organoids of hMSCs and human chondrocytes, for the regeneration of the articular cartilage. The effectiveness of this biphasic implant has been confirmed *in vitro* and *in vivo* in mice.

Thirdly, we evaluated our biphasic therapeutic implant strategy in the large animal (sheep). This work validated the feasibility and effectiveness of our strategy, by combining : (i) a commercial collagen implant, with BMP-2 growth factor nanoreservoirs, for the regeneration of the subchondral bone ; (ii) a hydrogel of alginate and hyaluronic acid, incorporating organoids of sheep bone marrow MSCs, for the regeneration of articular cartilage.

In conclusion, these combined advanced therapy medicinal products (ATMPs), combining natural or synthetic biomaterials (implantable medical device), therapeutic molecules and mesenchymal stem cells, allow the regeneration of the entire osteochondral unit. This innovative strategy will undoubtedly lead to major advances in osteoarticular regenerative nanomedicine, aiming to improve the treatment and comfort of patients.

Key words : Osteoarticular regenerative nanomedicine ; tissue engineering ; cartilage ; subchondral bone ; mesenchymal stem cells (MSCs) ; organoids ; biomaterials ; collagen type II ; poly- ϵ -caprolactone (PCL) ; growth factors ; nanoreservoirs ; implantable medical device ; combined advanced therapy medicinal products (ATMPs).

Conception et optimisation d'un implant thérapeutique combiné à des organoïdes de cellules souches pour la nanomédecine régénérative ostéoarticulaire

Résumé

Notre équipe a mis au point une stratégie innovante d'implants thérapeutiques biphasiques, pour une régénération plus efficace et plus durable du cartilage articulaire, dans le cadre du traitement des lésions ostéochondrales. Ces implants pourraient représenter de meilleures alternatives aux traitements actuellement utilisés en chirurgie orthopédique.

Dans un premier temps, nous avons élaboré un modèle d'implant thérapeutique à base de collagène de type II dérivé de méduse, fonctionnalisé par des nanoréservoirs de facteur de croissance TGF- β 3, et équipé de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs) dérivées de la moelle osseuse. La biocompatibilité et les propriétés chondrogéniques de cet implant ont été validées par des analyses *in vitro*, confirmant son potentiel thérapeutique pour la régénération du cartilage articulaire. **Dans un second temps**, nous nous sommes plus particulièrement concentrés sur la régénération de l'unité ostéochondrale. Il est en effet essentiel de régénérer un os sous-chondral sain, pour permettre une régénération stable du cartilage articulaire en surface. Dans ce but, nous avons développé un implant thérapeutique doté de deux compartiments : (i) un premier compartiment élaboré à partir d'un biomatériau synthétique de poly- ϵ -caprolactone (PCL), doté de nanoréservoirs de facteur de croissance BMP-7, pour la régénération de l'os sous-chondral ; (ii) un second compartiment à base d'un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, ensemencé d'organoïdes hybrides de hCSMs et de chondrocytes humains, pour la régénération du cartilage articulaire. L'efficacité de cet implant biphasique a été confirmée *in vitro* et *in vivo* chez la souris. **Dans un troisième temps**, nous avons évalué notre stratégie d'implant thérapeutique biphasique en site intra-articulaire, chez l'animal de grande taille (brebis). Ces travaux ont permis de valider la faisabilité et l'efficacité de notre stratégie, combinant cette fois-ci : (i) un implant collagénique commercial, doté de nanoréservoirs de facteur de croissance BMP-2, pour la régénération de l'os sous-chondral ; (ii) un hydrogel d'alginate et d'acide hyaluronique, incorporant des organoïdes de CSMs de moelle osseuse de brebis, pour la régénération du cartilage articulaire.

En conclusion, ces médicaments combinés de thérapie innovante, associant des biomatériaux naturels ou synthétiques (dispositif médical implantable), des molécules thérapeutiques et des cellules souches mésenchymateuses (médicament de thérapie innovante), permettent la régénération de l'unité ostéochondrale dans son ensemble. Cette stratégie novatrice permettra sans nul doute de grandes avancées en nanomédecine régénérative ostéoarticulaire, dans l'optique d'améliorer toujours plus le traitement et le confort des patients.

Mots clés : Nanomédecine régénérative ostéoarticulaire ; ingénierie tissulaire ; cartilage ; os sous-chondral ; cellules souches mésenchymateuses (CSMs) ; organoïdes ; biomatériaux ; collagène de type II ; poly- ϵ -caprolactone (PCL) ; facteurs de croissance ; nanoréservoirs ; dispositif médical implantable ; médicament de thérapie innovante (MTI) ; médicament combiné de thérapie innovante.

Abstract

Our team has developed an innovative strategy based on biphasic therapeutic implants allowing a more effective and long-lasting regeneration of articular cartilage in the treatment of osteochondral lesions. These implants may represent better alternatives to the current treatments used in orthopaedic surgery.

First, we developed a jellyfish type II collagen therapeutic implant model, functionalized with TGF- β 3 growth factor nanoreservoirs, and equipped with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). The biocompatibility and chondrogenic properties of this implant have been validated *in vitro*, confirming its therapeutic potential for the regeneration of articular cartilage. **In a second time**, we focused more on the regeneration of the osteochondral unit. Indeed, it is crucial to regenerate a healthy subchondral bone, to allow a stable regeneration of articular cartilage on the surface. To this end, we have developed a therapeutic implant with two compartments : (i) a first compartment based on a synthetic poly- ϵ -caprolactone (PCL) biomaterial, equipped with BMP-7 growth factor nanoreservoirs, for the regeneration of the subchondral bone ; (ii) a second compartment based on a hydrogel of alginate and hyaluronic acid, seeded with hybrid organoids of hMSCs and human chondrocytes, for the regeneration of the articular cartilage. The effectiveness of this biphasic implant has been confirmed *in vitro* and *in vivo* in mice. **Thirdly**, we evaluated our biphasic therapeutic implant strategy in the large animal (sheep). This work validated the feasibility and effectiveness of our strategy, by combining : (i) a commercial collagen implant, with BMP-2 growth factor nanoreservoirs, for the regeneration of the subchondral bone ; (ii) a hydrogel of alginate and hyaluronic acid, incorporating organoids of sheep bone marrow MSCs, for the regeneration of articular cartilage.

In conclusion, these combined advanced therapy medicinal products (ATMPs), combining natural or synthetic biomaterials (implantable medical device), therapeutic molecules and mesenchymal stem cells, allow the regeneration of the entire osteochondral unit. This innovative strategy will undoubtedly lead to major advances in osteoarticular regenerative nanomedicine, aiming to improve the treatment and comfort of patients.

Key words : Osteoarticular regenerative nanomedicine ; tissue engineering ; cartilage ; subchondral bone ; mesenchymal stem cells (MSCs) ; organoids ; biomaterials ; collagen type II ; poly- ϵ -caprolactone (PCL) ; growth factors ; nanoreservoirs ; implantable medical device ; combined advanced therapy medicinal products (ATMPs).